

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-527309

(P2023-527309A)

(43)公表日 令和5年6月28日(2023.6.28)

(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 5
C 1 2 N 15/87 (2006.01)	C 1 2 N 15/87	Z 4 C 0 7 6
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63	Z 4 C 0 8 4
C 1 2 N 15/33 (2006.01)	C 1 2 N 15/33	4 C 0 8 5
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 C 0 8 6

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全278頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2022-571116(P2022-571116)	(71)出願人	522223741
(86)(22)出願日	令和3年5月19日(2021.5.19)		オルナ セラピューティクス インコーポ レイテッド
(85)翻訳文提出日	令和5年1月5日(2023.1.5)		アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチュー セッツ州 ケンブリッジ メモリアル ド ライブ 6 2 0 セカンド フロア
(86)国際出願番号	PCT/US2021/033276	(74)代理人	100102978
(87)国際公開番号	WO2021/236855		弁理士 清水 初志
(87)国際公開日	令和3年11月25日(2021.11.25)	(74)代理人	100102118
(31)優先権主張番号	63/027,292		弁理士 春名 雅夫
(32)優先日	令和2年5月19日(2020.5.19)	(74)代理人	100160923
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		弁理士 山口 裕孝
(31)優先権主張番号	PCT/US2021/031629	(74)代理人	100119507
(32)優先日	令和3年5月10日(2021.5.10)		弁理士 刑部 俊
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100142929
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA		

最終頁に続く

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 環状RNA組成物及び方法

(57)【要約】

環状RNAが、関連する組成物及び方法とともに本明細書に記載される。いくつかの実施形態では、本発明の環状RNAは、グループイントロンフラグメント、スパーサー、IRES、二重鎖形成領域、及び発現配列を含む。いくつかの実施形態では、発現配列は、抗原をコードする。いくつかの実施形態では、本発明の環状RNAは、直鎖状RNAと比較した場合に、改善された発現、機能安定性、免疫原性、製造容易性、及び/または半減期を有する。いくつかの実施形態では、本発明の方法及び構築物は、既存のRNA環化アプローチと比較した場合に、改善された環化効率、スプライシング効率及び/または純度をもたらす。

【選択図】図74

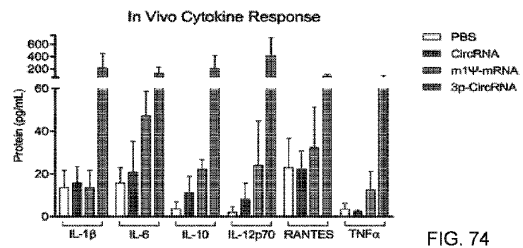


FIG. 74

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

環状RNAポリヌクレオチドであって、以下の順序で、

- a . 3' グループイントロンフラグメント、
- b . 内部リボソーム進入部位 (IRES)、
- c . 1つ以上の抗原、アジュバント、抗原様もしくはアジュバント様ポリペプチド、またはそれらのフラグメントをコードする、発現配列、及び
- d . 5' グループイントロンフラグメント

を含む、前記環状RNAポリヌクレオチド。

## 【請求項 2】

環状RNAポリヌクレオチドであって、以下の順序で、

- a . 3' グループイントロンフラグメント、
- b . 内部リボソーム進入部位 (IRES)、
- c . 非コード発現配列、及び
- d . 5' グループイントロンフラグメント

を含む、前記環状RNAポリヌクレオチド。

## 【請求項 3】

ベクターの転写から産生される環状RNAポリヌクレオチドであって、以下の順序で、

- a . 5' 二重鎖形成領域、
- b . 3' グループイントロンフラグメント、
- c . 内部リボソーム進入部位 (IRES)、
- d . 1つ以上の抗原、アジュバント、抗原様もしくはアジュバント様ポリペプチド、またはそれらのフラグメントをコードする、発現配列、
- e . 5' グループイントロンフラグメント、及び
- f . 3' 二重鎖形成領域

を含む、前記環状RNAポリヌクレオチド。

## 【請求項 4】

前記ベクターの転写から産生される環状RNAポリヌクレオチドであって、以下の順序で、

- a . 5' 二重鎖形成領域、
- b . 3' グループイントロンフラグメント、
- c . 内部リボソーム進入部位 (IRES)、
- d . 非コード発現配列、
- e . 5' グループイントロンフラグメント、及び
- f . 3' 二重鎖形成領域

を含む、前記環状RNAポリヌクレオチド。

## 【請求項 5】

前記5' 二重鎖形成領域と前記3' グループイントロンフラグメントとの間の第1のスペーサー、及び前記5' グループイントロンフラグメントと前記3' 二重鎖形成領域との間の第2のスペーサーを含む、請求項3または4に記載の環状RNAポリヌクレオチド。

## 【請求項 6】

前記第1及び第2のスペーサーが、各々、約10～約60ヌクレオチドの長さを有する、請求項5に記載の環状RNAポリヌクレオチド。

## 【請求項 7】

前記第1及び第2の二重鎖形成領域が、各々、約9～約19ヌクレオチドの長さを有する、請求項3～6のいずれか1項に記載の環状RNAポリヌクレオチド。

## 【請求項 8】

前記第1及び第2の二重鎖形成領域が、各々、約30ヌクレオチドの長さを有する、請求項3～6のいずれか1項に記載の環状RNAポリヌクレオチド。

## 【請求項 9】

10

20

30

40

50

前記 IRES が、タウラ症候群ウイルス、トリアトーマウイルス、タイラー脳脊髄炎ウイルス、シミアンウイルス 40、ヒアリ (*Solenopsis invicta*) ウイルス 1、ムギクビレアブラムシ (*Rhopalosiphum padi*) ウイルス、細網内皮症ウイルス、ヒトポリオウイルス 1、チャパネアオカメムシ (*Plautia stali*) 腸ウイルス、カシミールハチウイルス、ヒトライノウイルス 2、ホマロディスカ・コアグラータ (*Homalodisca coagulata*) ウイルス - 1、ヒト免疫不全ウイルス 1 型、*Homalodisca coagulata* ウイルス - 1、ヒメトビ P ウイルス、C 型肝炎ウイルス、A 型肝炎ウイルス、GB 型肝炎ウイルス、口蹄疫ウイルス、ヒトエンテロウイルス 71、ウマ鼻炎ウイルス、ウスジロエダシャク (*Ectropopsis obliqua*) ピコルナ様ウイルス、脳心筋炎ウイルス、ショウジョウバエ C ウイルス、ヒトコクサッキーウイルス B3、アブラナ科 (*Crucifer*) トバモウイルス、クリケット麻痺ウイルス、ウシウイルス性下痢ウイルス 1、ブラッククイーンセルウイルス、アブラムシ致死麻痺ウイルス、トリ脳脊髄炎ウイルス、急性ミツバチ麻痺ウイルス、ハイビスカス退緑斑ウイルス、豚熱ウイルス、ヒト FGF2、ヒト SFTPA1、ヒト AML1/RUNX1、ショウジョウバエアンテナベディア、ヒト AQP4、ヒト AT1R、ヒト BAG-1、ヒト BCL2、ヒト BiP、ヒト c-IAP1、ヒト c-myc、ヒト eIF4G、マウス NDST4L、ヒト LEF1、マウス HIF1 アルファ、ヒト n.myc、マウス Gtx、ヒト p27kip1、ヒト PDGF2/c-sis、ヒト p53、ヒト Pim-1、マウス Rbm3、ショウジョウバエ reaper、イヌ Scamper、ショウジョウバエ Ubx、ヒト UNR、マウス UtrA、ヒト VEGF-A、ヒト XIAP、ショウジョウバエ hairless、*S. cerevisiae* (cerevisiae) TFIID、*S. cerevisiae* YAP1、タバコエッチウイルス、カブクリンクルウイルス、EMCV-A、EMCV-B、EMCV-Bf、EMCV-Cf、EMCV-pEC9、ピコビルナウイルス、HCV Qc64、ヒトコサウイルス E/D、ヒトコサウイルス F、ヒトコサウイルス JMY、ライノウイルス NAT001、HRV14、HRV89、HRVC-02、HRV-A21、サリウイルス A SH1、サリウイルス FHB、サリウイルス NG-J1、ヒトパレコウイルス 1、クロヒウイルス B、Yc-3、ロザウイルス M-7、シャンバウイルス A、パシウイルス A、パシウイルス A2、エコーウイルス E14、ヒトパレコウイルス 5、アイチウイルス、A 型肝炎ウイルス HA16、フォピウイルス、CVA10、エンテロウイルス C、エンテロウイルス D、エンテロウイルス J、ヒトペギウイルス 2、GBV-C GT110、GBV-C K1737、GBV-C Iowa、ペギウイルス A 1220、パシウイルス A3、サペロウイルス、ロザウイルス B、バクンサ (*Bakunsa*) ウイルス、トレモウイルス A、ブタバシウイルス 1、PLV-CHN、パシウイルス A、シシニウイルス、ヘパシウイルス K、ヘパシウイルス A、BVDV1、ボーダー病ウイルス、BVDV2、CSFV-PK15C、SF573 ジシストロウイルス、フーベイピコルナ様ウイルス、CRPV、サリウイルス A BN5、サリウイルス A BN2、サリウイルス A 02394、サリウイルス A GUT、サリウイルス A CH、サリウイルス A SZ1、サリウイルス FHB、CVB3、CVB1、エコーウイルス 7、CVB5、EVA71、CVA3、CVA12、EV24、または、eIF4G に対するアプタマーからの IRES の配列を有する、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の環状 RNA ポリヌクレオチド。

【請求項 10】

天然ヌクレオチドからなる、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の環状 RNA ポリヌクレオチド。

【請求項 11】

前記発現配列が、コドン最適化されている、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の環状 RNA ポリヌクレオチド。

【請求項 12】

前記環状 RNA ポリヌクレオチドが、約 100 ヌクレオチド ~ 約 10 キロベースの長さである、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の環状 RNA ポリヌクレオチド。

10

20

30

40

50

## 【請求項 13】

少なくとも約 20 時間の、ヒトにおけるインビボでの治療効果持続期間を有する、請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の環状 RNA ポリヌクレオチド。

## 【請求項 14】

少なくとも約 20 時間の機能的半減期を有する、請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の環状 RNA ポリヌクレオチド。

## 【請求項 15】

同じ発現配列を含む同等の直鎖状 RNA ポリヌクレオチドの治療効果持続期間よりも長いまたは同等の、ヒト細胞における治療効果持続期間を有する、請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の環状 RNA ポリヌクレオチド。

10

## 【請求項 16】

同じ発現配列を含む同等の直鎖状 RNA ポリヌクレオチドの機能的半減期よりも長いまたは同等の、ヒト細胞における機能的半減期を有する、請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の環状 RNA ポリヌクレオチド。

## 【請求項 17】

同じ発現配列を有する同等の直鎖状 RNA ポリヌクレオチドの治療効果持続期間よりも長い、ヒトにおけるインビボでの治療効果持続期間を有する、請求項 1 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の環状 RNA ポリヌクレオチド。

## 【請求項 18】

同じ発現配列を有する同等の直鎖状 RNA ポリヌクレオチドの機能的半減期よりも長い、ヒトにおけるインビボでの機能的半減期を有する、請求項 1 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の環状 RNA ポリヌクレオチド。

20

## 【請求項 19】

前記アジュバントまたはアジュバント様ポリペプチドが、toll様受容体リガンド、サイトカイン、Flt3-リガンド、抗体、ケモカイン、キメラタンパク質、瀕死の腫瘍 (dying tumor) から放出される内因性アジュバント、及びチェックポイント阻害タンパク質を含む群から選択される、請求項 1、3、及び 5 ~ 18 のいずれか 1 項に記載の環状 RNA ポリヌクレオチド。

## 【請求項 20】

前記アジュバントまたはアジュバント様ポリペプチドが、BCSP31、MOMP、FomA、MymA、ESAT6、PorB、PVL、Porin、OmpA、PepO、OmpU、ルマジシン合成酵素、Omp16、Omp19、CobT、RpfE、Rv0652、HBHA、NhhA、DnaJ、ニューモリシン、ファルジェルリン (Falgellin)、IFN- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21、GM-CSF、IL-1b、IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-7、IL-17、IL-1 $\beta$ 、抗CTLA4、抗PD1、抗41BB、PD-L1、Tim-3、LAG-3、TIGIT、GITR、及びanti-CD3を含む群から選択される、請求項 1、3、及び 5 ~ 19 のいずれか 1 項に記載の環状 RNA ポリヌクレオチド。

30

## 【請求項 21】

前記アジュバントまたはアジュバント様ポリペプチドが、表 10 から選択される、請求項 1、3、及び 5 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の環状 RNA ポリヌクレオチド。

40

## 【請求項 22】

RNA ポリヌクレオチドであって、以下の順序で、3'イントロンフラグメント及び三リン酸化 5'末端を含む、前記 RNA ポリヌクレオチド。

## 【請求項 23】

前記 3'イントロンフラグメントの上流及び前記三リン酸化 5'末端の下流に位置する 5'スペーサーを含む、請求項 22 に記載の RNA ポリヌクレオチド。

## 【請求項 24】

RNA ポリヌクレオチドであって、以下の順序で、3'イントロンフラグメント及び三リン酸化 5'末端を含む、前記 RNA ポリヌクレオチド。

50

## 【請求項 25】

前記 3'イントロンフラグメントの上流及び前記一リン酸化 5'末端の下流に位置する 5'スパーサーを含む、請求項 24 に記載の RNA ポリヌクレオチド。

## 【請求項 26】

5'イントロンフラグメント及び三リン酸化 5'末端を含む、RNA ポリヌクレオチド。

## 【請求項 27】

前記 5'イントロンフラグメントの下流に位置する 5'スパーサーを含む、請求項 26 に記載の RNA ポリヌクレオチド。

## 【請求項 28】

5'イントロンフラグメント及び一リン酸化 5'末端を含む、RNA ポリヌクレオチド。 10

## 【請求項 29】

前記 5'イントロンフラグメントの下流に位置する 5'スパーサーを含む、請求項 28 に記載の RNA ポリヌクレオチド。

## 【請求項 30】

ポリ A 精製タグを更に含む、請求項 22 ~ 29 のいずれか 1 項に記載の RNA ポリヌクレオチド。

## 【請求項 31】

開始配列を更に含む、請求項 22 ~ 30 のいずれか 1 項に記載の RNA ポリヌクレオチド。

## 【請求項 32】

前記ベクターが、三リン酸化 5'末端を更に含む、請求項 3 または 4 に記載の環状 RNA ポリヌクレオチド。 20

## 【請求項 33】

前記ベクターが、一リン酸化 5'末端を更に含む、請求項 3 または 4 に記載の環状 RNA ポリヌクレオチド。

## 【請求項 34】

三リン酸化 5'末端を更に含む、請求項 24 ~ 25 及び 28 ~ 29 のいずれか 1 項に記載の RNA ポリヌクレオチド。

## 【請求項 35】

一リン酸化 5'末端を更に含む、請求項 22 ~ 23 及び 26 ~ 27 のいずれか 1 項に記載の RNA ポリヌクレオチド。 30

## 【請求項 36】

RNA 調製物であって、

a. 請求項 1、請求項 2、または両方に記載の環状 RNA ポリヌクレオチドと、

b. 直鎖状 RNA ポリヌクレオチドであって、

i. 一リン酸化 5'末端及び 3'イントロンフラグメントを含む 3'イントロンポリヌクレオチド、

ii. 一リン酸化 5'末端及び 5'イントロンフラグメントを含む 5'イントロンポリヌクレオチド、

iii. 三リン酸化 5'末端及び 3'イントロンフラグメントを含む 3'イントロンポリヌクレオチド、ならびに 40

iv. 三リン酸化 5'末端及び 3'イントロンフラグメントを含む 5'イントロンポリヌクレオチド

のうちの少なくとも 1 つを含む、前記直鎖状 RNA ポリヌクレオチドとを含み、

前記環状 RNA ポリヌクレオチドが、前記 RNA 調製物の少なくとも 90% を構成する、前記 RNA 調製物。

## 【請求項 37】

前記 3'イントロンポリヌクレオチドまたは 5'イントロンポリヌクレオチドが、スパーサーを含む、請求項 36 に記載の RNA 調製物。 50

## 【請求項 38】

前記 3'イントロンポリヌクレオチドまたは 5'イントロンポリヌクレオチドが、ポリ A 配列を含む、請求項 36 に記載の RNA 調製物。

## 【請求項 39】

前記 3'イントロンポリヌクレオチドまたは 5'イントロンポリヌクレオチドが、UTR を含む、請求項 36 ~ 38 のいずれか 1 項に記載の RNA 調製物。

## 【請求項 40】

前記 3'イントロンポリヌクレオチドまたは 5'イントロンポリヌクレオチドが、IRES を含む、請求項 39 のいずれか 1 項に記載の RNA 調製物。

## 【請求項 41】

請求項 1 ~ 21 のいずれか 1 項に記載の環状 RNA ポリヌクレオチドと、希釈剤と、任意で塩緩衝液と、を含む、薬学的組成物。

10

## 【請求項 42】

請求項 36 ~ 40 のいずれか 1 項に記載の RNA 調製物と、希釈剤と、任意で塩緩衝液と、を含む、薬学的組成物。

## 【請求項 43】

請求項 1 ~ 21 のいずれか 1 項に記載の環状 RNA ポリヌクレオチドと、ポリカチオン性、カチオン性、またはポリマー化合物と、を含む、薬学的組成物。

## 【請求項 44】

請求項 36 ~ 40 のいずれか 1 項に記載の RNA 調製物と、ポリカチオン性、カチオン性、またはポリマー化合物と、を含む、薬学的組成物。

20

## 【請求項 45】

前記ポリカチオン性またはカチオン性化合物が、カチオン性ペプチドまたはタンパク質、塩基性ポリペプチド、細胞透過性ペプチド (CPP)、Tat 由来ペプチド、ペネトラチン、VP22 由来またはアナログペプチド、ベスチウイルス Erns、HSV、VP22 (単純ヘルペス)、MAP、KALA またはタンパク質形質導入ドメイン (PTD)、PpT620、プロリンリッチペプチド、アルギニンリッチペプチド、リジンリッチペプチド、MPG ペプチド、Pep-1、L-オリゴマー、カルシトニンペプチド、アンテナペディア由来ペプチド、pAntp、pIsl、FGF、ラクトフェリン、トランスポータン、プフォルイン-2、Bac715-24、SynB、SynB(1)、pVEC、hCT 由来ペプチド、SAP、ヒストン、カチオン性多糖類、カチオン性ポリマー、カチオン性脂質、 dendrimer、ポリイミン、ポリアリルアミン、オリゴフェクトアミン、またはカチオン性もしくはポリカチオン性ポリマー、糖骨格系ポリマー、シラン骨格系ポリマー、修飾ポリアミノ酸、修飾アクリレート、修飾ポリベータアミノエステル (PBAE)、修飾アミドアミン、 dendrimer、1 つ以上のカチオン性ブロックの及び 1 つ以上の親水性もしくは疎水性ブロックの組み合わせからなるブロックポリマー

30

からなる群から選択される、請求項 43 または 44 に記載の薬学的組成物。

## 【請求項 46】

前記ポリマー化合物が、ポリアミン、ポリエーテル、ポリアミド、ポリエステル、ポリカルバメート、ポリウレア、ポリカーボネート、ポリスチレン、ポリイミド、ポリスルホン、ポリウレタン、ポリアセチレン、ポリエチレン、ポリエチレンイミン、ポリイソシアネート、ポリアクリレート、ポリメタクリレート、ポリアクリロニトリル、及びポリアクリレートからなる群から選択される、請求項 43 または 44 に記載の薬学的組成物。例えば、ポリマーは、ポリ(カプロラクトン) (PCL)、エチレン酢酸ビニルポリマー (EVA)、ポリ(乳酸) (PLA)、ポリ(L-乳酸) (PLLA)、ポリ(グリコール酸) (PGA)、ポリ(乳酸-co-グリコール酸) (PLGA)、ポリ(L-乳酸-co-グリコール酸) (PLLGA)、ポリ(D, L-ラクチド) (PDLA)、ポリ(Lラクチド) (PLLA)、ポリ(D, L-ラクチド-co-カプロラクトン)、ポリ(D, L-ラクチド-co-

40

50

PEO-co-D, L-ラクチド)、ポリ(D, L-ラクチド-co-PPO-co-D, L-ラクチド)、ポリアルキルシアノアクリレート、ポリウレタン、ポリ-L-リジン(PLL)、ヒドロキシプロピルメタクリレート(HPMA)、ポリエチレングリコール、ポリ-L-グルタミン酸、ポリ(ヒドロキシ酸)、ポリ無水物、ポリオルトエステル、ポリ(エステルアミド)、ポリアミド、ポリ(エステルエーテル)、ポリカーボネート、ポリエチレン及びポリプロピレンなどのポリアルキレン、ポリ(エチレングリコール)(PEG)などのポリアルキレングリコール、ポリアルキレンオキシド(PEO)、ポリ(エチレンテレフタレート)などのポリアルキレンテレフタレート、ポリビニルアルコール(PVA)、ポリビニルエーテル、ポリ(酢酸ビニル)などのポリビニルエステル、ポリ(塩化ビニル)(PVC)などのポリビニルハライド、ポリビニルピロリドン(PVP) 10、ポリシロキサン、ポリスチレン、ポリウレタン、誘導体化セルロース(例えば、アルキルセルロース、ヒドロキシアルキルセルロース、セルロースエーテル、セルロースエステル、ニトロセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、カルボキシメチルセルロース)、アクリル酸ポリマー、例えば、ポリ(メチル(メタ)アクリレート)(PMMA)、ポリ(エチル(メタ)アクリレート)、ポリ(ブチル(メタ)アクリレート)、3635101520253035WO2021/076805PCT/US2020/055844ポリ(イソブチル(メタ)アクリレート)、ポリ(ヘキシル(メタ)アクリレート)、ポリ(イソデシル(メタ)アクリレート)、ポリ(ラウリル(メタ)アクリレート)、ポリ(フェニル(メタ)アクリレート)、ポリ(メチルアクリレート)、ポリ(イソプロピルアクリレート)、ポリ(イソブチルアクリレート)、ポリ(オクタデシルアクリレート)及びコポリマーならびにこれらの混合物、ポリジオキサノン及びそのコポリマー、ポリヒドロキシアルカノエート、ポリプロピレンフィマレート、ポリオキシメチレン、ポロキサマー、ポロキサミン、ポリ(オルト)エステル、ポリ(酪酸)、ポリ(吉草酸)、ポリ(ラクチド-co-カプロラクトン)、トリメチレンカーボネート、ポリ(N-アクリロイルモルホリン)(PACM)、ポリ(2-メチル-2-オキサゾリン)(PMOX)、ポリ(2-エチル-2-オキサゾリン)(PEOZ)、ならびにポリグリセロールを含み得る。 20

【請求項47】

前記ポリカチオン性またはカチオン性化合物が、  
 プロタミン、ヌクレオリン、スペルミンまたはスペルミジン、ポリ-L-リジン(PLL) 30、ポリアルギニン、HIV結合ペプチド、HIV-1 Tat(HIV)、ポリエチレンイミン(PEI)、DOTMA:[1-(2,3-シオレイルオキシ)プロピル]-N,N,N-トリメチルアンモニウム塩化物、DMRIE、ジ-C14-アミジン、DOTIM、SAINT、DC-Chol、BGTc、CTAP、DOPC、DODAP、DOPE:ジオレイルホスファチジルエタノールアミン、DOSPA、DODAB、DOIC、DMEPC、DOGS:ジオクタデシルアミドグリシルスペルミン、DIMRI:ジミリストオキシプロピルジメチルヒドロキシエチルアンモニウムブロミド、DOTAP:ジオレイルオキシ-3-(トリメチルアンモニオ)プロパン、DC-6-14:O,O-ジテトラデカノイル-N-アルファ-トリメチルアンモニオアセチル)ジエタノールアミンクロリド、CLIP1:rac-[ (2,3-ジオクタデシルオキシプロピル)(2-ヒドロキシエチル)]-ジメチルアンモニウムクロリド、CLIP6:rac-[2(2,3-ジヘキサデシルオキシプロピルオキシメチルオキシ)エチル]-トリメチルアンモニウム、CLIP9:rac-[2(2,3-ジヘキサデシルオキシプロピルオキシスクシニルオキシ)エチル]-トリメチルアンモニウム、ベータ-アミノ酸-ポリマーまたは逆ポリアミド、PVP(ポリ(N-エチル-4-ビニルピリジニウムブロミド))、pDMAEMA(ポリ(ジメチルアミノエチルメチルアクリレート))、pAMAM(ポリ(アミドアミン))、ジアミン末端修飾1,4ブタンジオールジアクリレート-co-5-アミノ-1-ペンタノールポリマー、ポリプロピルアミンデンドリマーまたはpAMAM系デンドリマー、ポリイミン、PEI:ポリ(エチレンイミン)、ポリ(プロピレンイミン)、ポリアリルアミン、シクロデキストリン系ポリマー、デキストラン系ポリマー、 40 50

キトサン、及び P M O X A - P D M S コポリマー

を含む群から選択される、請求項 4 3 または 4 4 に記載の薬学的組成物。

【請求項 4 8】

請求項 1 ~ 2 1 のいずれか 1 項に記載の環状 R N A ポリヌクレオチドと、ナノ粒子と、任意で、前記ナノ粒子に作動可能に接続されたターゲティング部分とを含む、薬学的組成物。

【請求項 4 9】

請求項 3 6 ~ 4 0 のいずれか 1 項に記載の R N A 調製物と、ナノ粒子と、任意で、前記ナノ粒子に作動可能に接続されたターゲティング部分とを含む、薬学的組成物。

10

【請求項 5 0】

前記ナノ粒子が、脂質ナノ粒子、コア・シェルナノ粒子、生分解性ナノ粒子、生分解性脂質ナノ粒子、ポリマーナノ粒子、または生分解性ポリマーナノ粒子である、請求項 4 8 または 4 9 に記載の薬学的組成物。

【請求項 5 1】

ターゲティング部分を含み、前記ターゲティング部分が、細胞単離も精製もなしで、選択された細胞集団または組織のうちの選択された細胞への受容体仲介エンドサイトーシスまたは直接融合を仲介する、請求項 4 1 ~ 5 0 のいずれか 1 項に記載の薬学的組成物。

【請求項 5 2】

前記ターゲティング部分が、s c F v、ナノボディ、ペプチド、ミニボディ、ポリヌクレオチドアプタマー、重鎖可変領域、軽鎖可変領域、またはそのフラグメントである、請求項 4 8 ~ 5 1 のいずれか 1 項に記載の薬学的組成物。

20

【請求項 5 3】

前記環状 R N A ポリヌクレオチドまたは R N A 調製物が、その必要があるヒト対象における感染症を治療または予防するのに有効な量である、請求項 4 1 ~ 5 2 5 7 ~ 5 7 のいずれか 1 項に記載の薬学的組成物。

【請求項 5 4】

同じ抗原をコードする外因性 D N A を含むベクターを含む薬学的組成物と比較した場合に、増強された安全性プロファイルを有する、請求項 4 1 ~ 5 3 のいずれか 1 項に記載の薬学的組成物。

30

【請求項 5 5】

前記組成物における前記ポリヌクレオチドの 1 重量%未満が、二本鎖 R N A、D N A スプリント、または三リン酸化 R N A である、請求項 4 1 ~ 5 4 のいずれか 1 項に記載の薬学的組成物。

【請求項 5 6】

前記薬学的組成物における前記ポリヌクレオチド及びタンパク質の 1 重量%未満が、二本鎖 R N A、D N A スプリント、三リン酸化 R N A、ホスファターゼタンパク質、タンパク質リガーゼ、及びキャッピング酵素である、請求項 4 1 ~ 5 5 のいずれか 1 項に記載の薬学的組成物。

【請求項 5 7】

前記ナノ粒子が、C 1 2 - 2 0 0、M C 3、D L i n D M A、D L i n k C 2 D M A、c K K - E 1 2、I C E (イミダゾール系)、H G T 5 0 0 0、H G T 5 0 0 1、D O D A C、D D A B、D M R I E、D O S P A、D O G S、D O D A P、D O D M A 及び D M D M A、D O D A C、D L e n D M A、D M R I E、C L i n D M A、C p L i n D M A、D M O B A、D O c a r b D A P、D L i n D A P、D L i n c a r b D A P、D L i n C D A P、K L i n - K - D M A、D L i n - K - X T C 2 - D M A、H G T 4 0 0 3、ならびにそれらの組み合わせの群から選択される 1 つ以上のカチオン性脂質を含む、請求項 4 8 ~ 5 6 のいずれか 1 項に記載の薬学的組成物。

40

【請求項 5 8】

その必要がある対象を治療する方法であって、請求項 1 ~ 2 1 のいずれか 1 項に記載の

50



環状RNAポリヌクレオチドと、ナノ粒子と、任意で、前記ナノ粒子に作動可能に接続されたターゲティング部分と、を含む治療的有効量の組成物を投与することを含む、前記方法。

【請求項59】

その必要がある対象を治療する方法であって、請求項36～40のいずれか1項に記載のRNA調製物と、ナノ粒子と、任意で、前記ナノ粒子に作動可能に接続されたターゲティング部分と、を含む治療的有効量の組成物を投与することを含む、前記方法。

【請求項60】

前記ターゲティング部分が、scFv、ナノボディ、ペプチド、ミニボディ、重鎖可変領域、軽鎖可変領域、またはそれらのフラグメントである、請求項58または59に記載の方法。

10

【請求項61】

前記ナノ粒子が、脂質ナノ粒子、コア・シェルナノ粒子、または生分解性ナノ粒子である、請求項58～60のいずれか1項に記載の方法。

【請求項62】

前記ナノ粒子が、1つ以上のカチオン性脂質、イオン化可能脂質、またはポリ-アミノエステルを含む、請求項58～61のいずれか1項に記載の方法。

【請求項63】

前記ナノ粒子が、1つ以上の非カチオン性脂質を含む、請求項58～62のいずれか1項に記載の方法。

20

【請求項64】

前記ナノ粒子が、1つ以上のPEG修飾脂質、ポリグルタミン酸脂質、またはヒアルロン酸脂質を含む、請求項58～63のいずれか1項に記載の方法。

【請求項65】

前記ナノ粒子が、コレステロールを含む、請求項58～64のいずれか1項に記載の方法。

【請求項66】

前記ナノ粒子が、アラキドン酸またはオレイン酸を含む、請求項58～65のいずれか1項に記載の方法。

【請求項67】

前記組成物が、ターゲティング部分を含み、前記ターゲティング部分が、細胞単離も精製もなしで、選択された細胞集団のうちの選択された細胞への受容体仲介エンドサイトーシスを仲介する、請求項58～66のいずれか1項に記載の方法。

30

【請求項68】

前記ナノ粒子が、1つを超える環状RNAポリヌクレオチドを封入している、請求項58～67のいずれか1項に記載の方法。

【請求項69】

環状RNAポリヌクレオチドを作製するためのベクターであって、以下の順序で、  
 5'二重鎖形成領域、  
 3'グループイントロンフラグメント、  
 配列内リボソーム進入部位(IRES)、  
 1つ以上のアジュバント、抗原、アジュバント様もしくは抗原様ポリペプチド、またはそのフラグメントをコードする、発現配列、  
 5'グループイントロンフラグメント、及び  
 3'二重鎖形成領域  
 を含む、前記ベクター。

40

【請求項70】

環状RNAポリヌクレオチドを作製するためのベクターであって、以下の順序で、5'二重鎖形成領域、3'グループイントロンフラグメント、配列内リボソーム進入部位(IRES)、非コード配列、5'グループイントロンフラグメント、及び3'二重鎖形成

50

領域を含む、前記ベクター。

【請求項 7 1】

前記 5' 二重鎖形成領域と前記 3' グループイントロンフラグメントとの間の第 1 のスペーサー、及び前記 5' グループイントロンフラグメントと前記 3' 二重鎖形成領域との間の第 2 のスペーサーを含む、請求項 6 9 または 7 0 に記載のベクター。

【請求項 7 2】

前記第 1 及び第 2 のスペーサーが、各々、約 2 0 ~ 約 6 0 ヌクレオチドの長さを有する、請求項 6 9 ~ 7 1 のいずれか 1 項に記載のベクター。

【請求項 7 3】

前記第 1 及び第 2 のスペーサーが、各々、少なくとも 5 ヌクレオチドの長さの非構造化領域を含む、請求項 6 9 ~ 7 2 のいずれか 1 項に記載のベクター。 10

【請求項 7 4】

前記第 1 及び第 2 のスペーサーが、各々、少なくとも 7 ヌクレオチドの長さの構造化領域を含む、請求項 6 9 ~ 7 3 のいずれか 1 項に記載のベクター。

【請求項 7 5】

前記第 1 及び第 2 の二重鎖形成領域が、各々、約 9 ~ 5 0 ヌクレオチドの長さを有する、請求項 6 9 ~ 7 4 のいずれか 1 項に記載のベクター。

【請求項 7 6】

コドン最適化されている、請求項 6 9 ~ 7 5 のいずれか 1 項に記載のベクター。

【請求項 7 7】

同等の最適化前ポリヌクレオチドに存在する少なくとも 1 つのマイクロ RNA 結合部位を欠いている、請求項 6 9 ~ 7 6 のいずれか 1 項に記載のベクター。 20

【請求項 7 8】

請求項 6 9 ~ 7 7 のいずれか 1 項に記載のベクターを含む、原核細胞。

【請求項 7 9】

請求項 1 ~ 2 1 のいずれか 1 項に記載の環状 RNA ポリヌクレオチドを含む、真核細胞。

【請求項 8 0】

ヒト細胞である、請求項 7 9 に記載の真核細胞。

【請求項 8 1】

抗原提示細胞である、請求項 7 9 または 8 0 に記載の真核細胞。 30

【請求項 8 2】

脂質ナノ粒子へと製剤化される、  
少なくとも 1 つのウイルス抗原性ポリペプチド、アジュバントもしくはアジュバント様ポリペプチド、またはその免疫原性フラグメントをコードする発現配列を有する少なくとも 1 つの環状 RNA ポリヌクレオチドを含む、ワクチン。

【請求項 8 3】

前記アジュバントまたはアジュバント様ポリペプチドが、表 1 0 から選択される、請求項 8 2 に記載のワクチン。

【請求項 8 4】

前記抗原性ポリペプチドが、アデノウイルス；単純ヘルペス 1 型；単純ヘルペス 2 型；脳炎ウイルス、パピローマウイルス、水痘 - 帯状疱疹ウイルス；エプスタインバーウイルス；ヒトサイトメガロウイルス；ヒトヘルペスウイルス 8 型；ヒトパピローマウイルス；BK ウイルス；JC ウイルス；天然痘；ポリオウイルス；B 型肝炎ウイルス；ヒトボカウイルス；パルボウイルス B 1 9；ヒトアストロウイルス；ノーウォークウイルス；コクサッキーウイルス；A 型肝炎ウイルス；ポリオウイルス；ライノウイルス；重症急性呼吸器症候群ウイルス；C 型肝炎ウイルス；黄熱ウイルス；デングウイルス；西ナイルウイルス；風疹ウイルス；E 型肝炎ウイルス；ヒト免疫不全ウイルス (HIV)；インフルエンザウイルス；ガナリトウイルス；フニンウイルス；ラッサウイルス；マチュポウイルス；サピアウイルス；クリミア・コンゴ出血熱ウイルス；エボラウイルス；マールブルグウイル 40 50

ス；麻疹ウイルス；ムンプスウイルス；パラインフルエンザウイルス；呼吸器合胞体ウイルス；ヒトメタニューモウイルス；ヘンドラウイルス；ニパウイルス；狂犬病ウイルス；D型肝炎；ロタウイルス；オルビウイルス；コルチウイルス；バナウイルス；ヒトエンテロウイルス；ハンタウイルス；西ナイルウイルス；中東呼吸器症候群コロナウイルス；日本脳炎ウイルス；水疱疹ウイルス；SARS-CoV-2；東部ウマ脳炎、または前述の任意の2つ以上の組み合わせからのウイルスポリペプチドである、請求項82または83に記載のワクチン。

【請求項85】

前記ウイルス抗原性ポリペプチドまたはその免疫原性フラグメントが、配列番号325～336のうちのいずれか1つから選択されるか、またはそれに由来する、請求項82～84のいずれか1項に記載のワクチン。 10

【請求項86】

前記ウイルス抗原性ポリペプチドまたはその免疫原性フラグメントが、配列番号325～336のうちのいずれか1つのアミノ酸配列に対して少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、前記ウイルス抗原性ポリペプチドまたはその免疫原性フラグメントが、膜融合活性を有し、細胞受容体に付着し、ウイルスと哺乳類細胞膜の融合を引き起こし、及び/または感染した細胞への前記ウイルスの結合の原因となる、請求項82～85のいずれか1項に記載のワクチン。

【請求項87】

前記発現配列がコドン最適化されている、請求項82～86のいずれか1項に記載のワクチン。 20

【請求項88】

前記ワクチンが多価である、請求項82～87のいずれか1項に記載のワクチン。

【請求項89】

抗原特異的免疫応答を産生するのに有効な量で製剤化される、請求項82～88のいずれか1項に記載のワクチン。

【請求項90】

前記環状RNAポリヌクレオチドが、第1のウイルス抗原性ポリペプチドをコードする第1の発現配列、及び第2のウイルス抗原性ポリペプチドをコードする第2の発現配列を含む、請求項82～89のいずれか1項に記載のワクチン。 30

【請求項91】

対象における免疫応答を誘導する方法であって、前記対象における抗原特異的免疫応答を産生するのに有効な量で、前記対象に、請求項82～90のいずれか1項に記載のワクチンを投与することを含む、前記方法。

【請求項92】

前記抗原特異的免疫応答が、T細胞応答またはB細胞応答を含む、請求項91に記載の方法。

【請求項93】

前記対象に、単回用量の前記ワクチンを投与する、請求項91または92に記載の方法。 40

【請求項94】

前記対象に、ブースター用量の前記ワクチンを投与する、請求項91～93のいずれか1項に記載の方法。

【請求項95】

前記ワクチンが、鼻腔内投与、皮内注射、または筋肉注射によって前記対象に投与される、請求項91～94のいずれか1項に記載の方法。

【請求項96】

前記対象において産生される抗抗原性ポリペプチド抗体力価が、所定の閾値レベルと比較して、少なくとも1対数増加する、請求項91～95のいずれか1項に記載の方法。

【請求項97】

前記対象において産生される抗抗原性ポリペプチド抗体力価が、所定の閾値レベルと比較して、1～3対数増加する、請求項91～96のいずれか1項に記載の方法。

【請求項98】

前記対象において産生される前記抗抗原性ポリペプチド抗体力価が、所定の閾値レベルと比較して、少なくとも2倍増加する、請求項91～97のいずれか1項に記載の方法。

【請求項99】

前記対象において産生される前記抗抗原性ポリペプチド抗体力価が、所定の閾値レベルと比較して、2～10倍増加する、請求項91～98のいずれか1項に記載の方法。

【請求項100】

前記所定の閾値レベルが、前記抗原性ポリペプチドを含むワクチンを投与されていない対象において産生される抗抗原性ポリペプチド抗体力価である、請求項91～99のいずれか1項に記載の方法。 10

【請求項101】

前記所定の閾値レベルが、弱毒生ワクチンまたは前記抗原性ポリペプチドを含む不活性化ワクチンを投与された対象において産生される抗抗原性ポリペプチド抗体力価である、請求項91～100のいずれか1項に記載の方法。

【請求項102】

前記所定の閾値レベルが、前記抗原性ポリペプチドを含む組換えタンパク質ワクチンまたは精製タンパク質ワクチンを投与された対象において産生される抗抗原性ポリペプチド抗体力価である、請求項91～101のいずれか1項に記載の方法。 20

【請求項103】

脂質ナノ粒子へと製剤化される、  
少なくとも1つのSARS-CoV2ウイルス抗原性ポリペプチドまたはその免疫原性フラグメントをコードする発現配列を有する少なくとも1つの環状RNAポリヌクレオチドを含む、SARS-CoV2ワクチン。

【請求項104】

前記SARS-CoV2ウイルス抗原性ポリペプチドが、SARS-CoV2スパイクタンパク質、Nsp1～Nsp16、ORF3a、ORF6、ORF7a、ORFb、ORF8、ORF10、SARS-CoV2エンベロープタンパク質、SARS-CoV2膜タンパク質、SARS-CoV2ヌクレオカプシドタンパク質、または、SARS-CoV2の任意の抗原性ペプチド、もしくはSARS-CoV2ペプチドのフラグメント、から選択される、請求項102に記載のSARS-CoV2ワクチン。 30

【請求項105】

前記SARS-CoV2ウイルス抗原性ポリペプチドが、SARS-CoV2ウイルス株G、株GR、株GH、株L、株V、またはそれらの組み合わせに由来する、請求項102103または104に記載のSARS-CoV2ワクチン。

【請求項106】

前記発現配列がコドン最適化されている、請求項103～105のいずれか1項に記載のSARS-CoV2ワクチン。

【請求項107】

前記ワクチンが多価である、請求項103～106のいずれか1項に記載のSARS-CoV2ワクチン。 40

【請求項108】

抗原特異的免疫応答を産生するのに有効な量で製剤化される、請求項103～107のいずれか1項に記載のSARS-CoV2ワクチン。

【請求項109】

対象における免疫応答を誘導する方法であって、前記対象における抗原特異的免疫応答を産生するのに有効な量で、前記対象に、請求項103～108のいずれか1項に記載のSARS-CoV2ワクチンを投与することを含む、前記方法。

【請求項110】

前記抗原特異的免疫応答が、T細胞応答またはB細胞応答を含む、請求項109に記載の方法。

【請求項111】

前記対象に、単回用量の前記ワクチンを投与する、請求項109または110に記載の方法。

【請求項112】

前記対象に、ブースター用量の前記ワクチンを投与する、請求項109～111のいずれか1項に記載の方法。

【請求項113】

前記ワクチンが、鼻腔内投与、皮内注射、または筋肉注射によって前記対象に投与される、請求項109～112のいずれか1項に記載の方法。 10

【請求項114】

前記対象において産生される抗抗原性ポリペプチド抗体力価が、所定の閾値レベルと比較して、少なくとも1対数増加する、請求項109～113のいずれか1項に記載の方法。

【請求項115】

前記対象において産生される抗抗原性ポリペプチド抗体力価が、所定の閾値レベルと比較して、1～3対数増加する、請求項109～114のいずれか1項に記載の方法。

【請求項116】

前記対象において産生される前記抗抗原性ポリペプチド抗体力価が、所定の閾値レベルと比較して、少なくとも2倍増加する、請求項109～115のいずれか1項に記載の方法。 20

【請求項117】

前記対象において産生される前記抗抗原性ポリペプチド抗体力価が、所定の閾値レベルと比較して、2～10倍増加する、請求項109～116のいずれか1項に記載の方法。

【請求項118】

前記所定の閾値レベルが、前記抗原性ポリペプチドを含むワクチンを投与されていない対象において産生される抗抗原性ポリペプチド抗体力価である、請求項109～117のいずれか1項に記載の方法。

【請求項119】

前記所定の閾値レベルが、弱毒生ワクチンまたは前記抗原性ポリペプチドを含む不活性化ワクチンを投与された対象において産生される抗抗原性ポリペプチド抗体力価である、請求項109～118のいずれか1項に記載の方法。 30

【請求項120】

前記所定の閾値レベルが、前記抗原性ポリペプチドを含む組換えタンパク質ワクチンまたは精製タンパク質ワクチンを投与された対象において産生される抗抗原性ポリペプチド抗体力価である、請求項109～119のいずれか1項に記載の方法。

【請求項121】

少なくとも1つのウイルス抗原性ポリペプチド、アジュバントもしくはアジュバント様ポリペプチド、またはその免疫原性フラグメントをコードする発現配列を有する、環状RNAポリヌクレオチド。 40

【請求項122】

請求項1～21のいずれか1項に記載の少なくとも1つの環状RNAポリヌクレオチドをコードする遺伝子操作された核酸を含む、発現ベクター。

【請求項123】

脂質ナノ粒子へと製剤化された、請求項121に記載の環状RNAポリヌクレオチドを含む、環状RNAポリヌクレオチドワクチン。

【請求項124】

前記ナノ粒子が、50～200nmの平均直径を有する、請求項123に記載の環状RNAポリヌクレオチドワクチン。 50

## 【請求項 1 2 5】

前記脂質ナノ粒子が、カチオン性脂質、PEG修飾脂質、ステロール、及び非カチオン性脂質を含む、請求項 1 2 3 または 1 2 4 に記載の環状 RNA ポリヌクレオチドワクチン。

## 【請求項 1 2 6】

前記脂質ナノ粒子担体が、約 20 ~ 60 % カチオン性脂質、0.5 ~ 15 % PEG 修飾脂質、25 ~ 55 % ステロール、及び 25 % 非カチオン性脂質のモル比を含む、請求項 1 2 3 ~ 1 2 5 のいずれか 1 項に記載の環状 RNA ポリヌクレオチドワクチン。

## 【請求項 1 2 7】

前記カチオン性脂質が、イオン化可能なカチオン性脂質であり、前記非カチオン性脂質が、中性脂質であり、かつ前記ステロールが、コレステロールである、請求項 1 2 3 ~ 1 2 6 のいずれか 1 項に記載の環状 RNA ポリヌクレオチドワクチン。 10

## 【請求項 1 2 8】

前記カチオン性脂質が、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)、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)、及びジ((Z)-ノン-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)から選択される、請求項 1 2 3 ~ 1 2 7 のいずれか 1 項に記載の環状 RNA ポリヌクレオチドワクチン。

## 【請求項 1 2 9】

前記ナノ粒子が、0.4 未満の多分散値を有する、請求項 1 2 3 ~ 1 2 8 のいずれか 1 項に記載の環状 RNA ポリヌクレオチドワクチン。 20

## 【請求項 1 3 0】

前記ナノ粒子が、中和 pH 値で正味中性電荷を有する、請求項 1 2 3 ~ 1 2 9 のいずれか 1 項に記載の環状 RNA ポリヌクレオチドワクチン。

## 【請求項 1 3 1】

対象のワクチン接種に使用するための薬学的組成物であって、有効用量の、少なくとも 1 つのウイルス抗原、またはアジュバントもしくはアジュバント様ポリペプチド、またはその免疫原性フラグメントをコードする環状 RNA ポリヌクレオチドを含み、前記有効用量が、投与から 1 ~ 72 時間後の前記対象の血清において測定される際、前記抗原、またはアジュバントもしくはアジュバント様ポリペプチド、またはその免疫原性フラグメントに対する中和抗体によって生成される 1,000 ~ 10,000 の中和力価を生成するのに十分である、前記薬学的組成物。 30

## 【請求項 1 3 2】

対象のワクチン接種に使用するための薬学的組成物であって、有効用量の、少なくとも 1 つのウイルス抗原、またはアジュバントもしくはアジュバント様ポリペプチド、またはその免疫原性フラグメントをコードする環状 mRNA ポリヌクレオチドを含み、前記有効用量が、投与から 1 ~ 72 時間後の前記対象の血清において測定される際、検出可能なレベルの抗原、またはアジュバントもしくはアジュバント様ポリペプチド、またはその免疫原性フラグメントを生成するのに十分である、前記薬学的組成物。 40

## 【請求項 1 3 3】

対象における免疫応答を誘導、生成、または増強する方法であって、前記対象における抗原特異的免疫応答を誘導、生成、または増強するのに有効な量で、前記対象に、請求項 1 3 1 または 1 3 2 に記載の薬学的組成物を投与することを含む、前記方法。

## 【請求項 1 3 4】

前記薬学的組成物が、前記対象を、前記ウイルスに対して最大 2 年間にわたり免疫化する、請求項 1 3 3 に記載の方法。

## 【請求項 1 3 5】

前記薬学的組成物が、前記対象を、前記ウイルスに対して 2 年超にわたり免疫化する、請求項 1 3 3 または 1 3 4 に記載の方法。 50

## 【請求項 1 3 6】

前記対象が、前記ウイルスに曝露されており、該対象が前記ウイルスに感染しているか、または該対象が前記ウイルスによる感染症のリスクを有する、請求項 1 3 3 ~ 1 3 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 1 3 7】

前記対象が、免疫無防備状態である、請求項 1 3 3 ~ 1 3 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 1 3 8】

対象における抗原特異的免疫応答を生成するのに有効な量で、前記対象に、前記ワクチンまたは前記薬学的組成物を投与することを含む、前記対象における抗原特異的免疫応答を誘導する方法

10

で使用するための、請求項 8 2 ~ 9 0、1 0 3 ~ 1 0 8、及び 1 2 3 ~ 1 3 0 のいずれか 1 項に記載のワクチン、または請求項 1 3 1 もしくは 1 3 2 に記載の薬学的組成物。

## 【請求項 1 3 9】

対象に、前記対象における抗原特異的免疫応答を生成するのに有効な量で、前記ワクチンを投与することを含む、前記対象における抗原特異的免疫応答を誘導する方法

で使用するための医薬の製造における、請求項 8 2 ~ 9 0、1 0 3 ~ 1 0 8、及び 1 2 3 ~ 1 3 0 のいずれか 1 項に記載のワクチン、または請求項 1 3 1 もしくは 1 3 2 に記載の薬学的組成物の使用。

## 【請求項 1 4 0】

20

哺乳動物における様々なウイルスまたはウイルス株に対する交差反応を誘導する方法であって、その必要がある前記哺乳動物に、先行請求項のいずれかに記載のワクチンまたは先行請求項のいずれかに記載の薬学的組成物を投与することを含む、前記方法。

## 【請求項 1 4 1】

コンセンサスウイルス抗原を各々コードする発現配列を有する少なくとも 2 つの環状 RNA ポリヌクレオチドが、前記哺乳動物に別々に投与される、請求項 1 4 0 に記載の方法。

## 【請求項 1 4 2】

コンセンサスウイルス抗原を各々コードする発現配列を有する少なくとも 2 つの環状 RNA ポリヌクレオチドが、前記哺乳動物に同時に投与される、請求項 1 4 0 または 1 4 1

30

## 【請求項 1 4 3】

前記環状 RNA ポリヌクレオチドが、同じナノ粒子中のアジュバントとともに共製剤化される、請求項 8 2 ~ 9 0、1 0 3 ~ 1 0 8、及び 1 2 3 ~ 1 3 0 のいずれか 1 項に記載のワクチン。

## 【請求項 1 4 4】

前記アジュバントが、CpG、イミキモド、アルミニウム、またはフロイントアジュバントである、請求項 8 2 ~ 9 0、1 0 3 ~ 1 0 8、1 2 3 ~ 1 3 0、及び 1 4 3 のいずれか 1 項に記載のワクチン。

## 【発明の詳細な説明】

40

## 【技術分野】

## 【0 0 0 1】

## 関連出願の相互参照

本出願は、2020年5月19日に出願された米国仮出願第 6 3 / 0 2 7 , 2 9 2 号の利益及び優先権を主張し、その内容は全ての目的で参照により完全に組み込まれる。

## 【背景技術】

## 【0 0 0 2】

従来 of 遺伝子療法は、宿主細胞に所望の遺伝子情報を挿入するための DNA の使用を伴う。細胞へと導入された DNA は通常、1 つ以上のトランスフェクトされた細胞のゲノムへとある程度組み込まれ、宿主内での導入された遺伝物質の長期的な作用を可能にする。

50

かかる持続的な作用には実質的な利点があり得る一方で、外因性DNAの宿主ゲノムへの組み込みは、多くの有害な作用も有し得る。例えば、導入されたDNAがインタクトな遺伝子へと挿入され、内因性遺伝子の機能を妨げる、また更には完全に排除する変異をもたらすことになる可能性がある。ゆえに、DNAを用いた遺伝子療法は、処置される宿主において、致命的な遺伝子機能の障害、例えば、必須酵素の産生の排除もしくは有害な低下、または細胞成長の制御に決定的に重要な遺伝子の妨害をもたらす可能性があり、非制御またはがん性細胞増殖をもたらし得る。加えて、従来DNAベースの遺伝子療法では、所望の遺伝子産物の効果的な発現のためには強力なプロモーター配列を含める必要があり、これもまた、細胞内の正常な遺伝子発現の制御において望ましくない変化をもたらし得る。また、DNAベースの遺伝物質が望ましくない抗DNA抗体の誘導をもたらし、それが致命的となり得る免疫応答を誘発し得る可能性もある。ウイルスベクターを使用する遺伝子療法アプローチも、有害な免疫応答をもたらし得る。いくつかの状況では、ウイルスベクターが宿主ゲノムに組み込まれることさえある。加えて、臨床グレードのウイルスベクターの産生は、費用も時間もかかる。ウイルスベクターを使用した導入遺伝物質のターゲティング送達も、制御が難しくあり得る。ゆえに、DNAベースの遺伝子療法は、ウイルスベクターを使用する分泌タンパク質の送達に関して評価されてきたが（米国特許第6,066,626号；米国公開第2004/0110709号）、これらのアプローチは、これらの様々な理由で制限され得る。

10

#### 【0003】

DNAとは対照的に、遺伝子療法剤としてのRNAの使用は、RNAがトランスフェクトされた細胞のゲノムへと安定して組み込まれることのリスクを伴わないため、実質的により安全であり、ゆえに導入遺伝物質が必須遺伝子の正常な機能を妨害する、または有害もしくは発がん効果をもたらす変異を引き起こす懸念を排除し、外来プロモーター配列は、コードされたタンパク質の効果的な翻訳のために必要とされず、再度、起こり得る有害な副作用を回避する。加えて、mRNAは、その機能を実行するために核に入る必要がないが、DNAはこの大きな障壁を克服しなければならない。

20

#### 【0004】

環状RNAは、安定した形態のRNAの設計及び産生に役立つ。RNA分子の環状化は、特に、不活性なコンフォメーションで折り畳まれやすい分子の場合、RNA構造及び機能の研究に利点を提供する（Wang and Ruffner, 1998）。環状RNAはまた、特に、タンパク質置換療法及びワクチン接種を含む、遺伝子発現及び治療剤のRNAベースの制御の研究分野において、特に興味深く、インビボ用途に有用であり得る。

30

#### 【0005】

本発明の前に、インビトロで環状化RNAを作製するための3つの主要な技術があった：スプリントを介した方法、順列置換イントロン-エクソン法、及びRNAリガーゼを介した方法。ただし、既存の方法論は、環状化できるRNAのサイズによって制限されるため、その治療用途が制限される。

#### 【発明の概要】

#### 【0006】

環状RNAが、関連する組成物及び方法とともに本明細書に記載される。いくつかの実施形態では、本発明の環状RNAは、グループIイントロンフラグメント、スペーサー、IRES、二重鎖形成領域、及び発現配列を含む。いくつかの実施形態では、発現配列は、1つ以上の抗原をコードする。特定の実施形態では、発現配列は、非コード配列と置き換えられる。いくつかの実施形態では、本発明の環状RNAは、直鎖状RNAと比較した場合に、改善された発現、機能安定性、製造容易性、及び/または半減期を有する。いくつかの実施形態では、本発明の環状RNAは、低減された免疫原性を有する。いくつかの実施形態では、本発明の方法及び構築物は、既存のRNA環化アプローチと比較した場合に、改善された環化効率、スプライシング効率及び/または純度をもたらす。

40

#### 【0007】

50



一態様では、環状RNAポリヌクレオチドであって、以下の順序で、

- a . 3' グループイントロンフラグメント、
- b . 配列内リボソーム進入部位 (IRES)、
- c . 1つ以上の抗原、アジュバント、抗原様もしくはアジュバント様ポリペプチド、またはそのフラグメントをコードする、発現配列、及び
- d . 5' グループイントロンフラグメント

を含む、環状RNAポリヌクレオチドが、本明細書に提供される。いくつかの実施形態では、3' グループイントロンフラグメントは、3' グループイントロンスプライス部位ジヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、5' グループイントロンフラグメントは、5' グループイントロンスプライス部位ジヌクレオチドを含む。

10

【0008】

一態様では、環状RNAポリヌクレオチドであって、以下の順序で、

- a . 3' グループイントロンフラグメント、
- b . 配列内リボソーム進入部位 (IRES)、
- c . 非コード発現配列、及び
- d . 5' グループイントロンフラグメント

を含む、環状RNAポリヌクレオチドが、本明細書に提供される。

【0009】

一態様では、ベクターの転写から産生される環状RNAポリヌクレオチドであって、以下の順序で、

20

- a . 5' 二重鎖形成領域、
- b . 3' グループイントロンフラグメント、
- c . 配列内リボソーム進入部位 (IRES)、
- d . 1つ以上の抗原、アジュバント、抗原様もしくはアジュバント様ポリペプチド、またはそのフラグメントをコードする、発現配列、
- e . 5' グループイントロンフラグメント、及び
- f . 3' 二重鎖形成領域

を含む、環状RNAポリヌクレオチドが、本明細書に提供される。

【0010】

一態様では、ベクターの転写から産生される環状RNAポリヌクレオチドであって、以下の順序で、

30

- a . 5' 二重鎖形成領域、
- b . 3' グループイントロンフラグメント、
- c . 配列内リボソーム進入部位 (IRES)、
- d . 非コード発現配列、
- e . 5' グループイントロンフラグメント、及び
- f . 3' 二重鎖形成領域

を含む、環状RNAポリヌクレオチドが、本明細書に提供される。

【0011】

いくつかの実施形態では、ベクターは、三リン酸化5'末端を更に含む。いくつかの実施形態では、ベクターは、一リン酸化5'末端を更に含む。

40

【0012】

いくつかの実施形態では、環状RNAポリヌクレオチドは、5' 二重鎖形成領域と3' グループイントロンフラグメントとの間の第1のスペーサー、及び5' グループイントロンフラグメントと3' 二重鎖形成領域との間の第2のスペーサーを含む。いくつかの実施形態では、第1及び第2のスペーサーは、各々、約10~約60ヌクレオチドの長さを有する。いくつかの実施形態では、第1及び第2の二重鎖形成領域は、各々、約9~約19ヌクレオチドの長さを有する。いくつかの他の実施形態では、第1及び第2の二重鎖形成領域は、各々、約30ヌクレオチドの長さを有する。

【0013】

50

いくつかの実施形態では、IRESは、タウラ症候群ウイルス、トリアトーマウイルス、タイラー脳脊髄炎ウイルス、シミアンウイルス40、ヒアリ (*Solenopsis invicta*) ウイルス1、ムギクビレアブラムシ (*Rhopalosiphum padi*) ウイルス、細網内皮症ウイルス、ヒトポリオウイルス1、チャバネアオカメムシ (*Plautia stali*) 腸ウイルス、カシミールハチウイルス、ヒトライノウイルス2、ホマロディスカ・コアグラータ (*Homalodisca coagulata*) ウイルス-1、ヒト免疫不全ウイルス1型、*Homalodisca coagulata* ウイルス-1、ヒメトビPウイルス、C型肝炎ウイルス、A型肝炎ウイルス、GB型肝炎ウイルス、口蹄疫ウイルス、ヒトエンテロウイルス71、ウマ鼻炎ウイルス、ウスジロエダシャク (*Ectropis obliqua*) ピコルナ様ウイルス、脳心筋炎ウイルス、ショウジョウバエCウイルス、ヒトコクサッキーウイルスB3、アブラナ科 (*Crucifer*) トバモウイルス、クリケット麻痺ウイルス、ウシウイルス性下痢ウイルス1、ブラッククイーンセルウイルス、アブラムシ致死麻痺ウイルス、トリ脳脊髄炎ウイルス、急性ミツパチ麻痺ウイルス、ハイビスカス退緑斑ウイルス、豚熱ウイルス、ヒトFGF2、ヒトSFTPA1、ヒトAML1/RUNX1、ショウジョウバエアンテナペディア、ヒトAQP4、ヒトAT1R、ヒトBAG-1、ヒトBCL2、ヒトBiP、ヒトc-IAP1、ヒトc-myc、ヒトeIF4G、マウスNDST4L、ヒトLEF1、マウスHIF1アルファ、ヒトn.myc、マウスGtx、ヒトp27kip1、ヒトPDGF2/c-sis、ヒトp53、ヒトPim-1、マウスRbm3、ショウジョウバエreaper、イヌScamper、ショウジョウバエUbx、ヒトUNR、マウスUtrA、ヒトVEGF-A、ヒトXIAP、ショウジョウバエhairless、*S. cerevisiae* (cerevisiae) TFIID、*S. cerevisiae* YAP1、タバコエッチウイルス、カブクリンクルウイルス、EMCV-A、EMCV-B、EMCV-Bf、EMCV-Cf、EMCV pEC9、ピコビルナウイルス、HCV QC64、ヒトコサウイルスE/D、ヒトコサウイルスF、ヒトコサウイルスJMY、ライノウイルスNAT001、HRV14、HRV89、HRVC-02、HRV-A21、サリウイルスASH1、サリウイルスFHB、サリウイルスNG-J1、ヒトパレコウイルス1、クロヒウイルスB、Yc-3、ロザウイルスM-7、シャンバウイルスA、パシウイルスA、パシウイルスA2、エコーウイルスE14、ヒトパレコウイルス5、アイチウイルス、A型肝炎ウイルスHA16、フォピウイルス、CVA10、エンテロウイルスC、エンテロウイルスD、エンテロウイルスJ、ヒトペギウイルス2、GBV-C GT110、GBV-C K1737、GBV-C Iowa、ペギウイルスA1220、パシウイルスA3、サペロウイルス、ロザウイルスB、バクンサ (*Bakunsa*) ウイルス、トレモウイルスA、ブタパシウイルス1、PLV-CHN、パシウイルスA、シニウイルス、ヘパシウイルスK、ヘパシウイルスA、BVDV1、ボーダー病ウイルス、BVDV2、CSFV-PK15C、SF573ジシストロウイルス、フーベイピコルナ様ウイルス、CRPV、サリウイルスA BN5、サリウイルスA BN2、サリウイルスA 02394、サリウイルスA GUT、サリウイルスA CH、サリウイルスA SZ1、サリウイルスFHB、CVB3、CVB1、エコーウイルス7、CVB5、EVA71、CVA3、CVA12、EV24、または、eIF4Gに対するアプタマーからのIRESの配列を有する。

#### 【0014】

いくつかの実施形態では、環状RNAポリヌクレオチドは、天然ヌクレオチドからなる。いくつかの実施形態では、発現配列は、コドン最適化されている。いくつかの実施形態では、環状RNAポリヌクレオチドは、同等の最適化前ポリヌクレオチドに存在する少なくとも1つのマイクロRNA結合部位を欠くように最適化されている。いくつかの実施形態では、環状RNAポリヌクレオチドは、同等の最適化前ポリヌクレオチドに存在する少なくとも1つのエンドヌクレアーゼ感受性部位を欠くように最適化されている。いくつかの実施形態では、環状RNAポリヌクレオチドは、同等の最適化前ポリヌクレオチドに存在する少なくとも1つのRNA編集感受性部位を欠くように最適化されている。

10

20

30

40

50

## 【0015】

いくつかの実施形態では、環状RNAポリヌクレオチドは、約100ヌクレオチド～約10キロベースの長さである。

## 【0016】

いくつかの実施形態では、環状RNAポリヌクレオチドが、少なくとも約20時間の、ヒトにおけるインビボでの治療効果持続期間を有する。いくつかの実施形態では、環状RNAポリヌクレオチドが、少なくとも約20時間の機能的半減期を有する。いくつかの実施形態では、環状RNAポリヌクレオチドが、同じ発現配列を含む同等の直鎖状RNAポリヌクレオチドの治療効果持続期間よりも長いまたは同等の、ヒト細胞における治療効果持続期間を有する。いくつかの実施形態では、環状RNAポリヌクレオチドが、同じ発現配列を含む同等の直鎖状RNAポリヌクレオチドの機能的半減期よりも長いまたは同等の、ヒト細胞における機能的半減期を有する。いくつかの実施形態では、環状RNAポリヌクレオチドが、同じ発現配列を有する同等の直鎖状RNAポリヌクレオチドのものよりも長い、ヒトにおけるインビボでの治療効果持続期間を有する。いくつかの実施形態では、環状RNAポリヌクレオチドが、同じ発現配列を有する同等の直鎖状RNAポリヌクレオチドのものよりも長い、ヒトにおけるインビボでの機能的半減期を有する。

10

## 【0017】

いくつかの実施形態では、アジュバントまたはアジュバント様ポリペプチドが、tol1様受容体リガンド、サイトカイン、Flt3-リガンド、抗体、ケモカイン、キメラタンパク質、瀕死の腫瘍(dying tumor)から放出される内因性アジュバント、及びチェックポイント阻害タンパク質を含む群から選択される。いくつかの実施形態では、アジュバントまたはアジュバント様ポリペプチドが、BCSP31、MOMP、FomA、MymA、ESAT6、PorB、PVL、Porin、OmpA、PepO、OmpU、ルマジン合成酵素、Omp16、Omp19、CobT、RpfE、Rv0652、HBHA、NhhA、DnaJ、ニューモリシン、ファルジェリン、IFN-、IFN-、IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21、GM-CSF、IL-1b、IL-6、TNF-a、IL-7、IL-17、IL-1、抗CTLA4、抗PD1、抗41BB、PD-L1、Tim-3、Lag-3、TIGIT、GITR、及びandt1-CD3を含む群から選択される。いくつかの実施形態では、アジュバントまたはアジュバント様ポリペプチドが、表10から選択される。

20

30

## 【0018】

一態様では、RNAポリヌクレオチドであって、以下の順序で、

3'イントロンフラグメント及び

三リン酸化5'末端

を含む、RNAポリヌクレオチドが、本明細書に提供される。いくつかの実施形態では、RNAポリヌクレオチドは、3'イントロンフラグメントの上流及び三リン酸化5'末端の下流に位置する5'スペーサーを含む。

## 【0019】

一態様では、RNAポリヌクレオチドであって、5'イントロンフラグメント及び三リン酸化5'末端を含む、RNAポリヌクレオチドが、本明細書に提供される。いくつかの実施形態では、RNAポリヌクレオチドは、5'イントロンフラグメントの下流に位置する5'スペーサーを含む。

40

## 【0020】

いくつかの実施形態では、RNAポリヌクレオチドは、一リン酸化5'末端を更に含む。

## 【0021】

一態様では、RNAポリヌクレオチドであって、以下の順序で、

3'イントロンフラグメント及び

一リン酸化5'末端

を含む、RNAポリヌクレオチドが、本明細書に提供される。いくつかの実施形態では、RNAポリヌクレオチドは、3'イントロンフラグメントの上流及び一リン酸化5'末端の

50

下流に位置する 5' スペースーを含む。

【0022】

一態様では、RNAポリヌクレオチドであって、5'イントロンフラグメント及び一リン酸化5'末端を含む、RNAポリヌクレオチドが、本明細書に提供される。いくつかの実施形態では、RNAポリヌクレオチドは、5'イントロンフラグメントの下流に位置する5'スペースーを含む。

【0023】

いくつかの実施形態では、RNAポリヌクレオチドは、三リン酸化5'末端を更に含む。

【0024】

いくつかの実施形態では、RNAポリヌクレオチドは、ポリA精製タグを更に含む。いくつかの実施形態では、RNAポリヌクレオチドは、開始配列を更に含む。

【0025】

一態様では、RNA調製物であって、

a. 請求項1、請求項2、またはその両方に記載の環状RNAポリヌクレオチドと、

b. 直鎖状RNAポリヌクレオチドであって、

i. 一リン酸化5'末端及び3'イントロンフラグメントを含む3'イントロンポリヌクレオチド、

ii. 一リン酸化5'末端及び5'イントロンフラグメントを含む5'イントロンポリヌクレオチド、

iii. 三リン酸化5'末端及び3'イントロンフラグメントを含む3'イントロンポリヌクレオチド、ならびに

iv. 三リン酸化5'末端及び3'イントロンフラグメントを含む5'イントロンポリヌクレオチド

のうちの少なくとも1つを含む、直鎖状RNAポリヌクレオチドと

を含み、環状RNAポリヌクレオチドが、RNA調製物の少なくとも90%を構成する、RNA調製物が、本明細書に提供される。

【0026】

いくつかの実施形態では、3'イントロンポリヌクレオチドまたは5'イントロンポリヌクレオチドは、スペースーを含む。いくつかの実施形態では、3'イントロンポリヌクレオチドまたは5'イントロンポリヌクレオチドは、ポリA配列を含む。いくつかの実施形態では、3'イントロンポリヌクレオチドまたは5'イントロンポリヌクレオチドは、UTRを含む。いくつかの実施形態では、3'イントロンポリヌクレオチドまたは5'イントロンポリヌクレオチドは、IRESを含む。

【0027】

一態様では、本明細書に開示される環状RNAポリヌクレオチドと、希釈剤と、任意で塩緩衝液と、を含む、薬学的組成物が、本明細書に提供される。

【0028】

一態様では、本明細書に開示されるRNA調製物と、希釈剤と、任意で塩緩衝液と、を含む、薬学的組成物が、本明細書に提供される。

【0029】

一態様では、本明細書に開示される環状RNAポリヌクレオチドと、ポリカチオン性、カチオン性、またはポリマー化合物と、を含む、薬学的組成物が、本明細書に提供される。

【0030】

一態様では、本明細書に開示されるRNA調製物と、ポリカチオン性、カチオン性、またはポリマー化合物と、を含む、薬学的組成物が、本明細書に提供される。

【0031】

いくつかの実施形態では、ポリカチオン性またはカチオン性化合物は、

カチオン性ペプチドまたはタンパク質、塩基性ポリペプチド、細胞透過性ペプチド(CPP)、Tat由来ペプチド、ペネトラチン、VP22由来またはアナログペプチド、ペ

10

20

30

40

50

スチウイルスErns、HSV、VP22（単純ヘルペス）、MAP、KALAまたはタンパク質形質導入ドメイン（PTD）、PpT620、プロリンリッチペプチド、アルギニンリッチペプチド、リジンリッチペプチド、MPGペプチド、Pep-1、L-オリゴマー、カルシトニンペプチド、アンテナペディア由来ペプチド、pAntp、pIsl、FGF、ラクトフェリン、トランスポータン、ブフォリン-2、Bac715-24、SynB、SynB(1)、pVEC、hCT由来ペプチド、SAP、ヒストン、カチオン性多糖類、カチオン性ポリマー、カチオン性脂質、デンドリマー、ポリイミン、ポリアリルアミン、オリゴフェクトアミン、またはカチオン性もしくはポリカチオン性ポリマー、糖骨格系ポリマー、シラン骨格系ポリマー、修飾ポリアミノ酸、修飾アクリレート、修飾ポリベータアミノエステル（PBAE）、修飾アミドアミン、デンドリマー、1つ以上のカチオン性ブロックの及び1つ以上の親水性もしくは疎水性ブロックの組み合わせからなるブロックポリマー

10

からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ポリマー化合物は、

ポリアミン、ポリエーテル、ポリアミド、ポリエステル、ポリカルバメート、ポリウレア、ポリカーボネート、ポリスチレン、ポリイミド、ポリスルホン、ポリウレタン、ポリアセチレン、ポリエチレン、ポリエチレンイミン、ポリイソシアネート、ポリアクリレート、ポリメタクリレート、ポリアクリロニトリル、及びポリアリレート

からなる群から選択される。例えば、ポリマーは、

ポリ（カプロラクトン）（PCL）、エチレン酢酸ビニルポリマー（EVA）、ポリ（乳酸）（PLA）、ポリ（L-乳酸）（PLLA）、ポリ（グリコール酸）（PGA）、ポリ（乳酸-co-グリコール酸）（PLGA）、ポリ（L-乳酸-co-グリコール酸）（PLLGA）、ポリ（D,L-ラクチド）（PDLA）、ポリ（Lラクチド）（PLLA）、ポリ（D,L-ラクチド-co-カプロラクトン）、ポリ（D,L-ラクチド-co-カプロラクトン-コグリコリド）、ポリ（D,L-ラクチド-co-PEO-co-D,L-ラクチド）、ポリ（D,L-ラクチド-co-PPO-co-D,L-ラクチド）、ポリアルキルシアノアクリレート、ポリウレタン、ポリ-L-リジン（PLL）、ヒドロキシプロピルメタクリレート（HPMA）、ポリエチレングリコール、ポリ-L-グルタミン酸、ポリ（ヒドロキシ酸）、ポリ無水物、ポリオルトエステル、ポリ（エステルアミド）、ポリアミド、ポリ（エステルエーテル）、ポリカーボネート、ポリエチレン及びポリプロピレン等のポリアルキレン、ポリ（エチレングリコール）（PEG）等のポリアルキレングリコール、ポリアルキレンオキシド（PEO）、ポリ（エチレンテレフタレート）等のポリアルキレンテレフタレート、ポリビニルアルコール（PVA）、ポリビニルエーテル、ポリ（酢酸ビニル）等のポリビニルエステル、ポリ（塩化ビニル）（PVC）などのポリビニルハライド、ポリビニルピロリドン（PVP）、ポリシロキサン、ポリスチレン、ポリウレタン、誘導体化セルロース（例えば、アルキルセルロース、ヒドロキシアルキルセルロース、セルロースエーテル、セルロースエステル、ニトロセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、カルボキシメチルセルロース）、アクリル酸ポリマー、例えば、ポリ（メチル（メタ）アクリレート）（PMMA）、ポリ（エチル（メタ）アクリレート）、ポリ（ブチル（メタ）アクリレート）、363 5 10 15 20

20

30

25 30 35 WO 2021/076805 PCT/US2020/05584  
4 ポリ（イソブチル（メタ）アクリレート）、ポリ（ヘキシル（メタ）アクリレート）、ポリ（イソデシル（メタ）アクリレート）、ポリ（ラウリル（メタ）アクリレート）、ポリ（フェニル（メタ）アクリレート）、ポリ（メチルアクリレート）、ポリ（イソプロピルアクリレート）、ポリ（イソブチルアクリレート）、ポリ（オクタデシルアクリレート）及びコポリマーならびにこれらの混合物、ポリジオキサノン及びそのコポリマー、ポリヒドロキシアルカノエート、ポリプロピレンフィマレート、ポリオキシメチレン、ポロキサマー、ポロキサミン、ポリ（オルト）エステル、ポリ（酪酸）、ポリ（吉草酸）、ポリ（ラクチド-co-カプロラクトン）、トリメチレンカーボネート、ポリ（N-アクリロイルモルホリン）（PACM）、ポリ（2-メチル-2-オキサゾリン）（PMOX）、ポリ（2-エチル-2-オキサゾリン）（PEOZ）、ならびにポリグリセロール

40

50

を含み得る。いくつかの実施形態では、ポリカチオン性またはカチオン性化合物は、

プロタミン、ヌクレオリン、スペルミンまたはスペルミジン、ポリ-L-リジン (PLL)、ポリアルギニン、HIV結合ペプチド、HIV-1 Tat (HIV)、ポリエチレンイミン (PEI)、DOTMA: [1-(2,3-シオレイルオキシ)プロピル]-N,N,N-トリメチルアンモニウム塩化物、DMRIE、ジ-C14-アミジン、DOTIM、SAINT、DC-Chol、BGTC、CTAP、DOPC、DODAP、DOPE: ジオレイルホスファチジルエタノールアミン、DOSPA、DODAB、DOIC、DMEPC、DOGS: ジオクタデシルアミドグリシルスペルミン、DIMRI: ジミリストオキシプロピルジメチルヒドロキシエチルアンモニウムプロミド、DOTAP: ジオレイルオキシ-3-(トリメチルアンモニオ)プロパン、DC-6-14: O, O-ジテトラデカノイル-N-アルファ-トリメチルアンモニオアセチル)ジエタノールアミンクロリド、CLIP1: rac-[ (2,3-ジオクタデシルオキシプロピル) (2-ヒドロキシエチル) ]-ジメチルアンモニウムクロリド、CLIP6: rac-[2(2,3-ジヘキサデシルオキシプロピルオキシメチルオキシ)エチル]-トリメチルアンモニウム、CLIP9: rac-[2(2,3-ジヘキサデシルオキシプロピルオキシスクシニルオキシ)エチル]-トリメチルアンモニウム、ベータ-アミノ酸-ポリマーまたは逆ポリアミド、PVP (ポリ(N-エチル-4-ビニルピリジニウムプロミド))、pDMAEMA (ポリ(ジメチルアミノエチルメチルアクリレート))、pAMAM (ポリ(アミドアミン))、ジアミン末端修飾1,4ブタンジオールジアクリレート-co-5-アミノ-1-ペンタノールポリマー、ポリプロピルアミンデンドリマーまたはpAMAM系デンドリマー、ポリイミン、PEI: ポリ(エチレンイミン)、ポリ(プロピレンイミン)、ポリアリルアミン、シクロデキストリン系ポリマー、デキストラン系ポリマー、キトサン、及びPMOXA-PDMSコポリマーを含む群から選択される。

#### 【0032】

一態様では、本明細書に開示される環状RNAポリヌクレオチドと、ナノ粒子と、任意で、ナノ粒子に作動可能に接続されたターゲティング部分と、を含む、薬学的組成物が、本明細書に提供される。

#### 【0033】

一態様では、本明細書に開示されるRNA調製物と、ナノ粒子と、任意で、ナノ粒子に作動可能に接続されたターゲティング部分と、を含む、薬学的組成物が、本明細書に提供される。

#### 【0034】

いくつかの実施形態では、ナノ粒子は、脂質ナノ粒子、コア・シェルナノ粒子、生分解性ナノ粒子、生分解性脂質ナノ粒子、ポリマーナノ粒子、または生分解性ポリマーナノ粒子である。特定の実施形態では、ナノ粒子は、C12-200、MC3、DLinDMA、DLinC2DMA、cKK-E12、ICE (イミダゾール系)、HGT5000、HGT5001、DODAC、DDAB、DMRIE、DOSPA、DOGS、DODAP、DODMA及びDMDMA、DODAC、DLinDMA、DMRIE、CLinDMA、CpLinDMA、DMOBA、DOcarbDAP、DLinDAP、DLinCcarbDAP、DLinCDAP、KLin-K-DMA、DLin-K-XTC2-DMA、HGT4003、ならびにそれらの組み合わせの群から選択される1つ以上のカチオン性脂質を含む。

#### 【0035】

いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、ターゲティング部分を含み、ターゲティング部分は、細胞単離も精製もなしで、選択された細胞集団または組織のうちの選択された細胞への受容体仲介エンドサイトーシスまたは直接融合を仲介する。いくつかの実施形態では、ターゲティング部分は、scFv、ナノボディ、ペプチド、ミニボディ、ポリヌクレオチドアプタマー、重鎖可変領域、軽鎖可変領域、またはそのフラグメントである。いくつかの実施形態では、環状RNAポリヌクレオチドまたはRNA調製物は、その必要が

10

20

30

40

50

あるヒト対象における感染症（例えばウイルス感染症）を治療するのに有効な量である。いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、抗原をコードする外因性DNAを含むベクターを含む薬学的組成物と比較した場合に、増強された安全性プロファイルを有する。いくつかの実施形態では、組成物におけるポリヌクレオチドの1重量%未満は、二本鎖RNA、DNAスプリント、または三リン酸化RNAである。いくつかの実施形態では、薬学的組成物におけるポリヌクレオチド及びタンパク質の1重量%未満は、二本鎖RNA、DNAスプリント、三リン酸化RNA、ホスファターゼタンパク質、タンパク質リガーゼ、及びキャッピング酵素である。

【0036】

一態様では、その必要がある対象を治療する方法であって、本明細書に開示される環状RNAポリヌクレオチドと、ナノ粒子と、任意で、ナノ粒子に作動可能に接続されたターゲティング部分と、を含む治療的有効量の組成物を投与することを、方法が、本明細書に提供される。その必要がある対象を治療する方法であって、本明細書に開示されるRNA調製物と、ナノ粒子と、任意で、ナノ粒子に作動可能に接続されたターゲティング部分と、を含む治療的有効量の組成物を投与することを、方法が、本明細書に提供される。

10

【0037】

いくつかの実施形態では、対象は、感染症（例えば、ウイルス感染症）を有する。特定の実施形態では、必要がある対象を治療する方法は、抗炎症剤の同時投与を更に含む。

【0038】

いくつかの実施形態では、組成物は、ターゲティング部分を含み、ターゲティング部分は、細胞の単離も精製もなしで、選択された細胞集団のうちの選択された細胞への受容体仲介エンドサイトーシスを仲介する。いくつかの実施形態では、ターゲティング部分は、scFv、ナノボディ、ペプチド、ミニボディ、重鎖可変領域、軽鎖可変領域、またはそのフラグメントである。いくつかの実施形態では、組成物は、ターゲティング部分を含み、ターゲティング部分は、細胞の単離も精製もなしで、選択された細胞集団のうちの選択された細胞への受容体仲介エンドサイトーシスを仲介する。

20

【0039】

いくつかの実施形態では、ナノ粒子は、脂質ナノ粒子、コア・シェルナノ粒子、または生分解性ナノ粒子である。いくつかの実施形態では、ナノ粒子は、1つ以上のカチオン性脂質、イオン化可能脂質、またはポリ-アミノエステルを含む。いくつかの実施形態では、ナノ粒子は、1つ以上の非カチオン性脂質を含む。いくつかの実施形態では、ナノ粒子は、1つ以上のPEG修飾脂質、ポリグルタミン酸脂質、またはヒアルロン酸脂質を含む。いくつかの実施形態では、ナノ粒子は、コレステロールを含む。いくつかの実施形態では、ナノ粒子は、アラキドン酸またはオレイン酸を含む。いくつかの実施形態では、ナノ粒子は、1つを超える環状RNAポリヌクレオチドを封入している。

30

【0040】

一態様では、環状RNAポリヌクレオチドを作製するためのベクターであって、以下の順序で、

40

5'二重鎖形成領域、

3'グループイントロンフラグメント、

配列内リボソーム進入部位(IRES)、

1つ以上のアジュバント、抗原、またはアジュバント様もしくは抗原様ポリペプチド、またはそのフラグメントをコードする、発現配列、

5'グループイントロンフラグメント、及び

3'二重鎖形成領域

を含む、ベクターが、本明細書に提供される。

【0041】

一態様では、環状RNAポリヌクレオチドを作製するためのベクターであって、以下の順序で、

50

5' 二重鎖形成領域、  
 3' グループイントロンフラグメント、  
 配列内リボソーム進入部位 (IRES)、  
 非コード配列、  
 5' グループイントロンフラグメント、及び  
 3' 二重鎖形成領域

を含む、ベクターが、本明細書に提供される。

【0042】

いくつかの実施形態では、ベクターは、5' 二重鎖形成領域と3' グループイントロンフラグメントとの間の第1のスペーサー、及び5' グループイントロンフラグメントと3' 二重鎖形成領域との間の第2のスペーサーを含む。いくつかの実施形態では、第1及び第2のスペーサーは、各々、約20~約60ヌクレオチドの長さを有する。特定の実施形態では、第1及び第2のスペーサーは、各々、少なくとも5ヌクレオチドの長さの非構造化領域を含む。いくつかの実施形態では、第1及び第2のスペーサーは、各々、少なくとも7ヌクレオチドの長さの構造化領域を含む。いくつかの実施形態では、第1及び第2の二重鎖形成領域は、各々、約9~50ヌクレオチドの長さを有する。いくつかの実施形態では、ベクターは、コドン最適化されている。特定の実施形態では、ベクターは、同等の最適化前ポリヌクレオチドに存在する少なくとも1つのマイクロRNA結合部位を欠いている。

【0043】

一態様では、本明細書に開示されるベクターを含む原核細胞が、本明細書に提供される。一態様では、本明細書に開示される環状RNAポリヌクレオチドを含む真核細胞が、本明細書に提供される。いくつかの実施形態では、真核細胞は、ヒト細胞である。いくつかの実施形態では、真核細胞は、抗原提示細胞である。

【0044】

一態様では、脂質ナノ粒子へと製剤化された、

少なくとも1つのウイルス抗原性ポリペプチド、アジュバントもしくはアジュバント様ポリペプチド、またはその免疫原性フラグメントをコードする発現配列を有する少なくとも1つの環状RNAポリヌクレオチドを含む、ワクチン

が、本明細書に提供される。いくつかの実施形態では、アジュバントまたはアジュバント様ポリペプチドが、表10から選択される。いくつかの実施形態では、抗原性ポリペプチドは、アデノウイルス；単純ヘルペス1型；単純ヘルペス2型；脳炎ウイルス、パピローマウイルス、水痘-帯状疱疹ウイルス；エプスタインバーウイルス；ヒトサイトメガロウイルス；ヒトヘルペスウイルス8型；ヒトパピローマウイルス；BKウイルス；JCウイルス；天然痘；ポリオウイルス；B型肝炎ウイルス；ヒトポカウイルス；パルボウイルスB19；ヒトアストロウイルス；ノーウォークウイルス；コクサッキーウイルス；A型肝炎ウイルス；ポリオウイルス；ライノウイルス；重症急性呼吸器症候群ウイルス；C型肝炎ウイルス；黄熱ウイルス；デングウイルス；西ナイルウイルス；風疹ウイルス；E型肝炎ウイルス；ヒト免疫不全ウイルス(HIV)；インフルエンザウイルス；ガナリトウイルス；フニンウイルス；ラッサウイルス；マチュポウイルス；サビアウイルス；クリミア・コンゴ出血熱ウイルス；エボラウイルス；マールブルグウイルス；麻疹ウイルス；ムンプスウイルス；パラインフルエンザウイルス；呼吸器合胞体ウイルス；ヒトメタニューモウイルス；ヘンドラウイルス；ニパウイルス；狂犬病ウイルス；D型肝炎；ロタウイルス；オルビウイルス；コルチウイルス；パナウイルス；ヒトエンテロウイルス；ハンタウイルス；西ナイルウイルス；中東呼吸器症候群コロナウイルス；日本脳炎ウイルス；水疱疹ウイルス；SARS-CoV-2；東部ウマ脳炎、または前述の任意の2つ以上の組み合わせからのウイルスポリペプチドである。いくつかの実施形態では、ウイルス抗原性ポリペプチドまたはその免疫原性フラグメントは、配列番号325~336のうちのいずれか1つから選択されるか、またはそれに由来する。いくつかの実施形態では、ウイルス抗原性ポリペプチドまたはその免疫原性フラグメントは、配列番号325~336のうちのい



ずれか1つのアミノ酸配列に対して少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、抗原性ポリペプチドまたはその免疫原性フラグメントは、膜融合活性を有し、細胞受容体に付着し、ウイルスと哺乳類細胞膜の融合を引き起こし、及び/または感染した細胞へのウイルスの結合の原因となる。

【0045】

一態様では、脂質ナノ粒子へと製剤化された、

少なくとも1つのSARS-CoV2ウイルス抗原性ポリペプチドまたはその免疫原性フラグメントをコードする発現配列を有する少なくとも1つの環状RNAポリヌクレオチドを含む、SARS-CoV2ワクチン

が、本明細書に提供される。いくつかの実施形態では、SARS-CoV2ウイルス抗原性ポリペプチドは、SARS-CoV2スパイクタンパク質、Nsp1~Nsp16、ORF3a、ORF6、ORF7a、ORFb、ORF8、ORF10、SARS-CoV2エンベロープタンパク質、SARS-CoV2膜タンパク質、SARS-CoV2ヌクレオカプシドタンパク質、または、SARS-CoV2の任意の抗原性ペプチド、もしくはSARS-CoV2ペプチドのフラグメント、から選択される。いくつかの実施形態では、SARS-CoV2ウイルス抗原性ポリペプチドは、SARS-CoV2ウイルス株G、株GR、株GH、株L、株V、またはそれらの組み合わせに由来する。

10

【0046】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示するワクチン(例えば、SARS-CoV2ワクチン)に含まれる発現配列は、コドン最適化されている。いくつかの実施形態では、ワクチン(例えば、SARS-CoV2ワクチン)は、多価である。いくつかの実施形態では、ワクチン(例えば、SARS-CoV2ワクチン)は、抗原特異的免疫応答を産生するのに有効な量で製剤化される。

20

【0047】

いくつかの実施形態では、環状RNAポリヌクレオチドは、第1のウイルス抗原性ポリペプチドをコードする第1の発現配列、及び第2のウイルス抗原性ポリペプチドをコードする第2の発現配列を含む。

【0048】

一態様では、対象における免疫応答を誘導する方法であって、対象における抗原特異的免疫応答を産生するのに有効な量で、対象に、本明細書に開示されるワクチンを投与することを含む、方法が、本明細書に提供される。一態様では、対象における免疫応答を誘導する方法であって、対象における抗原特異的免疫応答を産生するのに有効な量で、対象に、本明細書に開示されるSARS-CoV2を投与することを含む、方法が、本明細書に提供される。

30

【0049】

いくつかの実施形態では、抗原特異的免疫応答は、T細胞応答またはB細胞応答を含む。いくつかの実施形態では、対象に、単回用量のワクチンを投与する。いくつかの実施形態では、対象に、ブースター用量のワクチンを投与する。いくつかの実施形態では、ワクチンは、対象に、鼻腔内投与、皮内注射、または筋肉注射によって投与される。いくつかの実施形態では、対象において産生される抗抗原性ポリペプチド抗体力価は、所定の閾値レベルと比較して、少なくとも1対数増加する。いくつかの実施形態では、対象において産生される抗抗原性ポリペプチド抗体力価は、所定の閾値レベルと比較して、1~3対数増加する。いくつかの実施形態では、対象において産生される抗抗原性ポリペプチド抗体力価は、所定の閾値レベルと比較して、少なくとも2倍増加する。いくつかの実施形態では、対象において産生される抗抗原性ポリペプチド抗体力価は、既定の閾値レベルと比較して、2~10倍増加する。いくつかの実施形態では、所定の閾値レベルは、抗原性ポリペプチドを含むワクチンを投与されていない対象において産生される抗抗原性ポリペプチド抗体力価である。いくつかの実施形態では、所定の閾値レベルは、弱毒生ワクチンまたは抗原性ポリペプチドを含む不活性化ワクチンを投与された対象において産生される抗抗原性ポリペプチド抗体力価である。いくつかの実施形態では、所定の閾値レベルは、抗原

40

50

性ポリペプチドを含む組換えタンパク質ワクチンまたは精製タンパク質ワクチンを投与された対象において産生される抗抗原性ポリペプチド抗体力価である。

【0050】

一態様では、少なくとも1つのウイルス抗原性ポリペプチド、アジュバントもしくはアジュバント様ポリペプチド、またはその免疫原性フラグメントをコードする発現配列を有する環状RNAポリヌクレオチドが、本明細書に提供される。一態様では、本明細書に開示される少なくとも1つの環状RNAポリヌクレオチドをコードする遺伝子操作された核酸を含む発現ベクターが、本明細書に提供される。

【0051】

一態様では、脂質ナノ粒子へと製剤化された、本明細書に開示される環状RNAポリヌクレオチドを含む環状RNAポリヌクレオチドワクチンが、本明細書に提供される。いくつかの実施形態では、ナノ粒子は、50～200nmの平均直径を有する。いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子は、カチオン性脂質、PEG修飾脂質、ステロール、及び非カチオン性脂質を含む。いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子担体は、約20～60%カチオン性脂質、0.5～15%PEG修飾脂質、25～55%ステロール、及び25%非カチオン性脂質のモル比を含む。いくつかの実施形態では、カチオン性脂質は、イオン化可能カチオン性脂質であり、非カチオン性脂質は、中性脂質であり、ステロールは、コレステロールである。いくつかの実施形態では、カチオン性脂質は、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)、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)、及びジ((Z)-ノン-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)から選択される。いくつかの実施形態では、ナノ粒子は、0.4未満の多分散値を有する。いくつかの実施形態では、ナノ粒子は、中性pHで正味中性電荷を有する。

【0052】

開示されるワクチンのいくつかの実施形態では、環状RNAポリヌクレオチドは、同じナノ粒子中のアジュバントとともに共製剤化される。いくつかの実施形態では、アジュバントは、CpG、イミキモド、アルミニウム、またはフロイントアジュバントである。

【0053】

一態様では、対象のワクチン接種に使用するための薬学的組成物であって、有効用量の、少なくとも1つのウイルス抗原、またはアジュバントもしくはアジュバント様ポリペプチド、またはその免疫原性フラグメントをコードする環状RNAポリヌクレオチドを含み、有効用量は、投与から1～72時間後の対象の血清において測定される際、当該抗原またはアジュバントもしくはアジュバント様ポリペプチド、またはその免疫原性フラグメントに対する中和抗体によって生成される1,000～10,000の中和力価を生成するのに十分である、薬学的組成物が、本明細書に提供される。一態様では、対象のワクチン接種に使用するための薬学的組成物であって、有効用量の、少なくとも1つのウイルス抗原、またはアジュバントもしくはアジュバント様ポリペプチド、またはその免疫原性フラグメントをコードする環状RNAポリヌクレオチドを含み、有効用量は、投与から1～72時間後の対象の血清において測定される際、検出可能なレベルの抗原、またはアジュバントもしくはアジュバント様ポリペプチド、またはその免疫原性フラグメントを生成するのに十分である、薬学的組成物が、本明細書に提供される。いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、対象における抗原特異的免疫応答を誘導する方法で使用するためのものであり、該方法は、対象における抗原特異的免疫応答を産生するのに有効な量で、対象に、ワクチンまたは薬学的組成物を投与することを含む。

【0054】

一態様では、対象における免疫応答を誘導、生成、または増強する方法であって、対象における抗原特異的免疫応答を誘導、生成、または増強するのに有効な量で、対象に、本明細書に開示される薬学的組成物を投与することを含む、方法が、本明細書に提供される。いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、対象を、ウイルスに対して最大2年間にわ

10

20

30

40

50

たり免疫化する。いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、対象を、ウイルスに対して2年超にわたり免疫化する。いくつかの実施形態では、対象は、ウイルスに曝露されており、該対象はウイルスに感染しているか、または該対象はウイルスによる感染症のリスクを有する。いくつかの実施形態では、対象は、免疫無防備状態である。

【0055】

一態様では、対象に、対象における抗原特異的免疫応答を生成するのに有効な量でワクチンを投与することを含む、対象における抗原特異的免疫応答を誘導する方法で使用するための医薬の製造における、本明細書に開示されるワクチンまたは薬学的組成物の使用が、本明細書に提供される。

【0056】

一態様では、哺乳動物における様々なウイルスまたはウイルス株に対する交差反応を誘導する方法であって、その必要がある哺乳動物に、任意の前述の特許請求の範囲のワクチンまたは任意の前述の特許請求の範囲の薬学的組成物を投与することを含む、方法が、本明細書に提供される。いくつかの実施形態では、本方法は、コンセンサスウイルス抗原を各々コードする発現配列を有する少なくとも2つの環状RNAポリヌクレオチドが、哺乳動物に別々に投与されることを含む。いくつかの実施形態では、本方法は、コンセンサスウイルス抗原を各々コードする発現配列を有する少なくとも2つの環状RNAポリヌクレオチドが、哺乳動物に同時に投与されることを含む。いくつかの実施形態では、本方法は、含む。

【図面の簡単な説明】

【0057】

【図1A】ガウシアルシフェラーゼ発現配列及び様々なIRES配列を含む環状RNAを用いたトランスフェクションから24時間後のHEK293（図1A、1D、及び1E）、HepG2（図1B）、または1C1C7（図1C）細胞の上清における発光を示す。

【図1B】ガウシアルシフェラーゼ発現配列及び様々なIRES配列を含む環状RNAを用いたトランスフェクションから24時間後のHEK293（図1A、1D、及び1E）、HepG2（図1B）、または1C1C7（図1C）細胞の上清における発光を示す。

【図1C】ガウシアルシフェラーゼ発現配列及び様々なIRES配列を含む環状RNAを用いたトランスフェクションから24時間後のHEK293（図1A、1D、及び1E）、HepG2（図1B）、または1C1C7（図1C）細胞の上清における発光を示す。

【図1D】ガウシアルシフェラーゼ発現配列及び様々なIRES配列を含む環状RNAを用いたトランスフェクションから24時間後のHEK293（図1A、1D、及び1E）、HepG2（図1B）、または1C1C7（図1C）細胞の上清における発光を示す。

【図1E】ガウシアルシフェラーゼ発現配列及び様々なIRES配列を含む環状RNAを用いたトランスフェクションから24時間後のHEK293（図1A、1D、及び1E）、HepG2（図1B）、または1C1C7（図1C）細胞の上清における発光を示す。

【0058】

【図2】ガウシアルシフェラーゼ発現配列及び異なる長さを有する様々なIRES配列を含む環状RNAを用いたトランスフェクションから24時間後のHEK293（図2A）、HepG2（図2B）、または1C1C7（図2C）細胞の上清における発光を示す。

【0059】

【図3】発光によって測定された、3日間にわたるHepG2（図3A）または1C1C7（図3B）細胞における選択されたIRES構築物の安定性を示す。

【0060】

【図4】図4Aおよび4Bは、細胞上清中の分泌されたガウシアルシフェラーゼからの発光によって測定された、Jurkat細胞における選択されたIRES構築物からのタンパク質発現を示す。

【0061】

【図5】図5Aおよび5Bは、発光によって測定された、3日間にわたるJurkat細胞における選択されたIRES構築物の安定性を示す。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 6 2 】

【図 6 A】ガウシアルシフェラーゼをコードする修飾直鎖状、未精製環状、または精製環状 RNA の 2 4 時間発光 (図 6 A) または 3 日間にわたる相対発光 (図 6 B) の比較を示す。

【図 6 B】ガウシアルシフェラーゼをコードする修飾直鎖状、未精製環状、または精製環状 RNA の 2 4 時間発光 (図 6 A) または 3 日間にわたる相対発光 (図 6 B) の比較を示す。

## 【 0 0 6 3 】

【図 7 A】修飾直鎖状、未精製環状、または精製環状 RNA を用いた Jurkat 細胞の電極ポレーション後の、IFN (図 7 A)、IL - 6 (図 7 B)、IL - 2 (図 7 C)、RIG - I (図 7 D)、IFN - 1 (図 7 E)、及び TNF (図 7 F) の転写産物誘導を示す。

10

【図 7 B】修飾直鎖状、未精製環状、または精製環状 RNA を用いた Jurkat 細胞の電極ポレーション後の、IFN (図 7 A)、IL - 6 (図 7 B)、IL - 2 (図 7 C)、RIG - I (図 7 D)、IFN - 1 (図 7 E)、及び TNF (図 7 F) の転写産物誘導を示す。

【図 7 C】修飾直鎖状、未精製環状、または精製環状 RNA を用いた Jurkat 細胞の電極ポレーション後の、IFN (図 7 A)、IL - 6 (図 7 B)、IL - 2 (図 7 C)、RIG - I (図 7 D)、IFN - 1 (図 7 E)、及び TNF (図 7 F) の転写産物誘導を示す。

20

【図 7 D】修飾直鎖状、未精製環状、または精製環状 RNA を用いた Jurkat 細胞の電極ポレーション後の、IFN (図 7 A)、IL - 6 (図 7 B)、IL - 2 (図 7 C)、RIG - I (図 7 D)、IFN - 1 (図 7 E)、及び TNF (図 7 F) の転写産物誘導を示す。

【図 7 E】修飾直鎖状、未精製環状、または精製環状 RNA を用いた Jurkat 細胞の電極ポレーション後の、IFN (図 7 A)、IL - 6 (図 7 B)、IL - 2 (図 7 C)、RIG - I (図 7 D)、IFN - 1 (図 7 E)、及び TNF (図 7 F) の転写産物誘導を示す。

【図 7 F】修飾直鎖状、未精製環状、または精製環状 RNA を用いた Jurkat 細胞の電極ポレーション後の、IFN (図 7 A)、IL - 6 (図 7 B)、IL - 2 (図 7 C)、RIG - I (図 7 D)、IFN - 1 (図 7 E)、及び TNF (図 7 F) の転写産物誘導を示す。

30

## 【 0 0 6 4 】

【図 8 A】ヒト初代単球 (図 8 A) 及びマクロファージ (図 8 B 及び図 8 C) におけるガウシアルシフェラーゼをコードする環状 RNA 及び修飾直鎖状 RNA の発光の比較を示す。

【図 8 B】ヒト初代単球 (図 8 A) 及びマクロファージ (図 8 B 及び図 8 C) におけるガウシアルシフェラーゼをコードする環状 RNA 及び修飾直鎖状 RNA の発光の比較を示す。

【図 8 C】ヒト初代単球 (図 8 A) 及びマクロファージ (図 8 B 及び図 8 C) におけるガウシアルシフェラーゼをコードする環状 RNA 及び修飾直鎖状 RNA の発光の比較を示す。

40

## 【 0 0 6 5 】

【図 9】ガウシアルシフェラーゼ発現配列及び様々な IRES 配列を含む環状 RNA を用いた形質導入後の初代 T 細胞の上清における 3 日間にわたる相対発光 (図 9 A) または 2 4 時間発光 (図 9 B) を示す。

## 【 0 0 6 6 】

【図 10 A】ガウシアルシフェラーゼ発現配列を含む環状 RNA または修飾直鎖状 RNA を用いた形質導入後の初代 T 細胞の上清における 2 4 時間発光 (図 10 A)、または 3 日間にわたる相対発光 (図 10 B)、及び P BMC における 2 4 時間発光 (図 10 C) を示

50

す。

【図10B】ガウシアルシフェラーゼ発現配列を含む環状RNAまたは修飾直鎖状RNAを用いた形質導入後の初代T細胞の上清における24時間発光(図10A)、または3日間にわたる相対発光(図10B)、及びPBMCにおける24時間発光(図10C)を示す。

【図10C】ガウシアルシフェラーゼ発現配列を含む環状RNAまたは修飾直鎖状RNAを用いた形質導入後の初代T細胞の上清における24時間発光(図10A)、または3日間にわたる相対発光(図10B)、及びPBMCにおける24時間発光(図10C)を示す。

【0067】

【図11】異なる順列置換部位を有するRNA構築物のHPLCクロマトグラム(図11A)及び環状化効率(図11B)を示す。

【0068】

【図12】異なるイントロン及び/または順列置換部位を有するRNA構築物のHPLCクロマトグラム(図12A)及び環状化効率(図12B)を示す。

【0069】

【図13A】相同性アームを伴うまたは伴わない3つのRNA構築物のHPLCクロマトグラム(図13A)及び環状化効率(図13B)を示す。

【図13B】相同性アームを伴うまたは伴わない3つのRNA構築物のHPLCクロマトグラム(図13A)及び環状化効率(図13B)を示す。

【0070】

【図14】相同アームを伴わない、または様々な長さ及びGC含量を有する相同アームを伴う3つのRNA構築物の環状化効率を示す。

【0071】

【図15】図15Aおよび15Bは、スプライシング効率の改善に対する強い相同アームの寄与、選択された構築物における環状化効率とニックングとの間の関係、ならびに環状化効率の改善を示すと仮定された順列置換部位及び相同アームの組み合わせを示すHPLC HPLCクロマトグラムを示す。

【0072】

【図16】モック電ポレーションした(左)またはCARをコードする環状RNAで電ポレーション(右)し、GFP及びホタルルシフェラーゼを発現するRaji細胞と共培養したT細胞の蛍光画像を示す。

【0073】

【図17】モック電ポレーションした(上)またはCARをコードする環状RNAで電ポレーション(下)し、GFP及びホタルルシフェラーゼを発現するRaji細胞と共培養したT細胞の明視野(左)、蛍光(中心)、及びオーバーレイ(右)画像を示す。

【0074】

【図18】モック電ポレーションした、または異なるCAR配列をコードする環状RNAで電ポレーションしたT細胞によるRaji標的細胞の特異的溶解を示す。

【0075】

【図19】ガウシアルシフェラーゼ発現配列及び様々なIRES配列を含む直鎖状または環状RNAを用いた形質導入から24時間後のJurkat細胞(左)または休止初代ヒトCD3+T細胞(右)の上清における発光(図19A)、及び3日間にわたる相対発光(図19B)を示す。

【0076】

【図20A】修飾直鎖状、未精製環状、または精製環状RNAを用いたヒトCD3+T細胞の電ポレーション後のIFN-1(図20A)、RIG-I(図20B)、IL-2(図20C)、IL-6(図20D)、IFN(図20E)、及びTNF(

10

20

30

40

50

図 20 F) の転写産物誘導を示す。

【図 20 B】修飾直鎖状、未精製環状、または精製環状 RNA を用いたヒト CD3 + T 細胞のエレクトロポレーション後の IFN - 1 (図 20 A)、RIG - I (図 20 B)、IL - 2 (図 20 C)、IL - 6 (図 20 D)、IFN (図 20 E)、及び TNF (図 20 F) の転写産物誘導を示す。

【図 20 C】修飾直鎖状、未精製環状、または精製環状 RNA を用いたヒト CD3 + T 細胞のエレクトロポレーション後の IFN - 1 (図 20 A)、RIG - I (図 20 B)、IL - 2 (図 20 C)、IL - 6 (図 20 D)、IFN (図 20 E)、及び TNF (図 20 F) の転写産物誘導を示す。

【図 20 D】修飾直鎖状、未精製環状、または精製環状 RNA を用いたヒト CD3 + T 細胞のエレクトロポレーション後の IFN - 1 (図 20 A)、RIG - I (図 20 B)、IL - 2 (図 20 C)、IL - 6 (図 20 D)、IFN (図 20 E)、及び TNF (図 20 F) の転写産物誘導を示す。

【図 20 E】修飾直鎖状、未精製環状、または精製環状 RNA を用いたヒト CD3 + T 細胞のエレクトロポレーション後の IFN - 1 (図 20 A)、RIG - I (図 20 B)、IL - 2 (図 20 C)、IL - 6 (図 20 D)、IFN (図 20 E)、及び TNF (図 20 F) の転写産物誘導を示す。

【図 20 F】修飾直鎖状、未精製環状、または精製環状 RNA を用いたヒト CD3 + T 細胞のエレクトロポレーション後の IFN - 1 (図 20 A)、RIG - I (図 20 B)、IL - 2 (図 20 C)、IL - 6 (図 20 D)、IFN (図 20 E)、及び TNF (図 20 F) の転写産物誘導を示す。

【0077】

【図 21 A】ホタル発光の検出によって決定した、CAR をコードする circRNA でエレクトロポレーションしたヒト初代 CD3 + T 細胞による Raji 標的細胞の特異的溶解 (図 21 A)、及び CAR 配列をコードする異なる量の環状または直鎖状 RNA を用いたエレクトロポレーションの 24 時間後の IFN 転写産物誘導 (図 21 B) を示す。

【図 21 B】ホタル発光の検出によって決定した、CAR をコードする circRNA でエレクトロポレーションしたヒト初代 CD3 + T 細胞による Raji 標的細胞の特異的溶解 (図 21 A)、及び CAR 配列をコードする異なる量の環状または直鎖状 RNA を用いたエレクトロポレーションの 24 時間後の IFN 転写産物誘導 (図 21 B) を示す。

【0078】

【図 22】ホタルの発光の検出によって決定した、異なる E : T 比 (図 22 A 及び図 22 B) にて CAR をコードする環状または直鎖状 RNA でエレクトロポレーションしたヒト初代 CD3 + T 細胞による標的細胞または非標的細胞の特異的溶解を示す。

【0079】

【図 23】エレクトロポレーションの 1、3、5、及び 7 日後での、CAR をコードする RNA でエレクトロポレーションしたヒト CD3 + T 細胞による標的細胞の特異的溶解を示す。

【0080】

【図 24】CD19 または BCMA 標的 CAR をコードする環状 RNA でエレクトロポレーションしたヒト CD3 + T 細胞による標的細胞の特異的溶解を示す。

【0081】

【図 25】FLuc をコードし、50% 脂質 10b - 15、10% DSPC、1.5% PEG - DMG、及び 38.5% コレステロールで製剤化された環状 RNA が投薬された CD - 1 マウスから採取された器官の総フラックスを示す。

【0082】

【図 26】FLuc をコードし、50% 脂質 10b - 15、10% DSPC、1.5% PEG - DMG、及び 38.5% コレステロールで製剤化された環状 RNA が投薬された CD - 1 マウスから採取された器官の発光を強調する画像を示す。

【0083】

【図 27 A】脂質 10 a - 26 及び 10 a - 27 の分子特徴評価を示す。脂質 10 a - 26 のプロトン核磁気共鳴 (NMR) スペクトルを示す。

【図 27 B】脂質 10 a - 26 及び 10 a - 27 の分子特徴評価を示す。液体クロマトグラフィー - 質量分析 (LC-MS) によって測定された脂質 10 a - 26 の保持時間を示す。

【図 27 C】脂質 10 a - 26 及び 10 a - 27 の分子特徴評価を示す。脂質 10 a - 26 の質量スペクトルを示す。

【図 27 D】脂質 10 a - 26 及び 10 a - 27 の分子特徴評価を示す。脂質 10 a - 27 のプロトン NMR スペクトルを示す。

【図 27 E】脂質 10 a - 26 及び 10 a - 27 の分子特徴評価を示す。LC-MS によって測定された脂質 10 a - 27 の保持時間を示す。 10

【図 27 F】脂質 10 a - 26 及び 10 a - 27 の分子特徴評価を示す。脂質 10 a - 27 の質量スペクトルを示す。

【0084】

【図 28 A】脂質 22 - S14 及びその合成中間体の分子特徴評価を示す。2 - (テトラデシルチオ)エタン - 1 - オールの NMR スペクトルを示す。

【図 28 B】脂質 22 - S14 及びその合成中間体の分子特徴評価を示す。2 - (テトラデシルチオ)エチルアクリレートの NMR スペクトルを示す。

【図 28 C】脂質 22 - S14 及びその合成中間体の分子特徴評価を示す。ビス (2 - (テトラデシルチオ)エチル) 3, 3' - ((3 - (2 - メチル - 1H - イミダゾール - 1 - イル)プロピル)アザネジル)ジプロピオネート (脂質 22 - S14) の NMR スペクトルを示す。 20

【0085】

【図 29】ビス (2 - (テトラデシルチオ)エチル) 3, 3' - ((3 - (1H - イミダゾール - 1 - イル)プロピル)アザネジル)ジプロピオネート (脂質 93 - S14) の NMR スペクトルを示す。

【0086】

【図 30 A】ヘプタデカン - 9 - イル 8 - ((3 - (2 - メチル - 1H - イミダゾール - 1 - イル)プロピル) (8 - (ノニルオキシ) - 8 - オキソオクチル)アミノ)オクタノエート (脂質 10 a - 54) の分子特徴評価を示す。脂質 10 a - 54 のプロトン NMR スペクトルを示す。 30

【図 30 B】ヘプタデカン - 9 - イル 8 - ((3 - (2 - メチル - 1H - イミダゾール - 1 - イル)プロピル) (8 - (ノニルオキシ) - 8 - オキソオクチル)アミノ)オクタノエート (脂質 10 a - 54) の分子特徴評価を示す。LC-MS によって測定された脂質 10 a - 54 の保持時間を示す。

【図 30 C】ヘプタデカン - 9 - イル 8 - ((3 - (2 - メチル - 1H - イミダゾール - 1 - イル)プロピル) (8 - (ノニルオキシ) - 8 - オキソオクチル)アミノ)オクタノエート (脂質 10 a - 54) の分子特徴評価を示す。脂質 10 a - 54 の質量スペクトルを示す。

【0087】

【図 31 A】ヘプタデカン - 9 - イル 8 - ((3 - (1H - イミダゾール - 1 - イル)プロピル) (8 - (ノニルオキシ) - 8 - オキソオクチル)アミノ)オクタノエート (脂質 10 a - 53) の分子特徴評価を示す。脂質 10 a - 53 のプロトン NMR スペクトルを示す。 40

【図 31 B】ヘプタデカン - 9 - イル 8 - ((3 - (1H - イミダゾール - 1 - イル)プロピル) (8 - (ノニルオキシ) - 8 - オキソオクチル)アミノ)オクタノエート (脂質 10 a - 53) の分子特徴評価を示す。LC-MS によって測定された脂質 10 a - 53 の保持時間を示す。

【図 31 C】ヘプタデカン - 9 - イル 8 - ((3 - (1H - イミダゾール - 1 - イル)プロピル) (8 - (ノニルオキシ) - 8 - オキソオクチル)アミノ)オクタノエート (脂質 50

10 a - 53) の分子特徴評価を示す。脂質 10 a - 53 の質量スペクトルを示す。

【0088】

【図32】図32Aは、ホタルルシフェラーゼ (FLuc) をコードし、目的のイオン化可能脂質、DSPC、コレステロール、及びDSPE-PEG 2000 (Avanti Polar Lipids Inc.) で16:1:4:1の重量比または62:4:33:1のモル比で製剤化された環状RNAが投薬されたCD-1マウスから採取された脾臓及び肝臓の総フラックスを示す。図32Bは、タンパク質発現の生体内分布についての平均輝度を示す。

【0089】

【図33】図33Aは、FLucをコードし、イオン化可能脂質22-S14、DSPC、コレステロール、及びDSPE-PEG 2000 (Avanti Polar Lipids Inc.) で16:1:4:1の重量比または62:4:33:1のモル比で製剤化された環状RNAが投薬されたCD-1マウスから採取された器官の発光を強調する画像を示す。図33Bは、FLucをコードし、イオン化可能脂質22-S14、DSPC、コレステロール、及びDSPE-PEG 2000 (Avanti Polar Lipids Inc.) で16:1:4:1の重量比または62:4:33:1のモル比で製剤化された環状RNAが投薬されたCD-1マウスの全身IVIS画像を示す。

【0090】

【図34】図34Aは、FLucをコードし、イオン化可能脂質93-S14、DSPC、コレステロール、及びDSPE-PEG 2000 (Avanti Polar Lipids Inc.) で16:1:4:1の重量比または62:4:33:1のモル比で製剤化された環状RNAが投薬されたCD-1マウスから採取された器官の発光を強調する画像を示す。図34Bは、FLucをコードし、イオン化可能脂質93-S14、DSPC、コレステロール、及びDSPE-PEG 2000 (Avanti Polar Lipids Inc.) で16:1:4:1の重量比または62:4:33:1のモル比で製剤化された環状RNAが投薬されたCD-1マウスの全身IVIS画像を示す。

【0091】

【図35】図35Aは、FLucをコードし、イオン化可能脂質10a-26、DSPC、コレステロール、及びDSPE-PEG 2000 (Avanti Polar Lipids Inc.) で16:1:4:1の重量比または62:4:33:1のモル比で製剤化された環状RNAが投薬されたCD-1マウスから採取された器官の発光を強調する画像を示す。図35Bは、FLucをコードし、イオン化可能脂質10a-26、DSPC、コレステロール、及びDSPE-PEG 2000 (Avanti Polar Lipids Inc.) で16:1:4:1の重量比または62:4:33:1のモル比で製剤化された環状RNAが投薬されたCD-1マウスの全身IVIS画像を示す。

【0092】

【図36A】FLucをコードし、脂質10b-15 (図36A)、脂質10a-53 (図36B)、または脂質10a-54 (図36C) で形成された脂質ナノ粒子に封入された環状RNAが投薬されたc57BL/6Jマウスから採取された器官の発光を強調する画像を示す。PBSを対照として使用した (図36D)。

【図36B】FLucをコードし、脂質10b-15 (図36A)、脂質10a-53 (図36B)、または脂質10a-54 (図36C) で形成された脂質ナノ粒子に封入された環状RNAが投薬されたc57BL/6Jマウスから採取された器官の発光を強調する画像を示す。PBSを対照として使用した (図36D)。

【図36C】FLucをコードし、脂質10b-15 (図36A)、脂質10a-53 (図36B)、または脂質10a-54 (図36C) で形成された脂質ナノ粒子に封入された環状RNAが投薬されたc57BL/6Jマウスから採取された器官の発光を強調する画像を示す。PBSを対照として使用した (図36D)。

【図36D】FLucをコードし、脂質10b-15 (図36A)、脂質10a-53 (図36B)、または脂質10a-54 (図36C) で形成された脂質ナノ粒子に封入され



た環状RNAが投薬されたC57BL/6Jマウスから採取された器官の発光を強調する画像を示す。PBSを対照として使用した(図36D)。

【0093】

【図37】図37Aおよび37Bは、ホタルルシフェラーゼをコードする環状RNAを含有する試験用脂質ナノ粒子との24時間のインキュベーション後のヒトPBMCの溶解物における相対的発光を示す。

【0094】

【図38】GFPまたはCD19 CARのいずれかをコードする環状RNAを含有する試験用脂質ナノ粒子とインキュベートした後のヒトPBMCにおけるGFP(図37A)及びCD19 CAR(図37B)の発現を示す。

10

【0095】

【図39】抗ネズミCD19 CAR発現配列及び様々なIRES配列を含む環状RNAでリポトランスフェクトされた1C1C7細胞における抗ネズミCD19 CARの発現を示す。

【0096】

【図40】ネズミT細胞に対する抗ネズミCD19 CARの細胞傷害を示す。CD19 CARは、ネズミT細胞にエレクトロポレーションされた環状RNAによってコードされ、発現する。

【0097】

【図41A】抗ネズミCD19 CARをコードする環状RNAを封入している試験用脂質ナノ粒子が1日おきに注射されたC57BL/6Jマウスにおける末梢血(図40A及び40B)または脾臓(図40C)におけるB細胞数を示す。

20

【図41B】抗ネズミCD19 CARをコードする環状RNAを封入している試験用脂質ナノ粒子が1日おきに注射されたC57BL/6Jマウスにおける末梢血(図40A及び40B)または脾臓(図40C)におけるB細胞数を示す。

【図41C】抗ネズミCD19 CARをコードする環状RNAを封入している試験用脂質ナノ粒子が1日おきに注射されたC57BL/6Jマウスにおける末梢血(図40A及び40B)または脾臓(図40C)におけるB細胞数を示す。

【0098】

【図42】図42Aおよび42Bは、環状RNAから発現した抗ヒトCD19 CARの発現レベルを直鎖状mRNAから発現したものと比較している。

30

【0099】

【図43】図43Aおよび43Bは、環状RNAから発現した抗ヒトCD19 CARの細胞傷害効果を直鎖状mRNAから発現したものと比較している。

【0100】

【図44】T細胞において単一の環状RNAから発現した2つのCAR(抗ヒトCD19 CAR及び抗ヒトBCMA CAR)の細胞傷害を示す。

【0101】

【図45A】脂質10a-27もしくは10a-26または脂質10b-15で形成されたLNPでの処置後の様々な脾臓免疫細胞サブセットにおけるtdTomato発現の頻度とともに代表的なFACSプロットを示す。

40

【図45B】Cre環状RNAで成功裏にトランスフェクトされた各細胞集団の割合と同等な、tdTomatoを発現する骨髓細胞、B細胞、及びT細胞の割合の定量を示す(平均+標準偏差、n=3)。

【図45C】脂質27及び26での処置後にtdTomatoを発現するNK細胞、古典的単球、非古典的単球、好中球、及び樹状細胞を含む追加の脾臓免疫細胞集団の割合を示す(平均+標準偏差、n=3)。

【0102】

【図46A】イントロンにビルトインポリA配列を有する例示的なRNA構築物設計を示す。

50

【図 4 6 B】未精製環状 RNA のクロマトグラフィートレースを示す。

【図 4 6 C】アフィニティー精製された環状 RNA のクロマトグラフィートレースを示す。

【図 4 6 D】様々な I V T 条件及び精製方法で調製された環状 RNA の免疫原性を示す。(市販 = 市販 I V T ミックス; カスタム = カスタマイズされた I V T ミックス; A f f = アフィニティー精製; E n z = 酵素精製; G M P : G T P 比 = 8、12.5、または 13.75)。

【0103】

【図 4 7】図 4 7 A は、ハイブリダイゼーション精製のためのポリ A の代替手段として特殊結合配列を有する例示的な RNA 構築物設計を示す。図 4 7 B は、未精製環状 RNA のクロマトグラフィートレースを示す。図 4 6 C は、アフィニティー精製された環状 RNA のクロマトグラフィートレースを示す。

10

【0104】

【図 4 8】図 4 8 A は、ジストロフィンをコードする未精製環状 RNA のクロマトグラフィートレースを示す。図 4 8 B は、ジストロフィンをコードする酵素精製された環状 RNA のクロマトグラフィートレースを示す。

【0105】

【図 4 9】J u r k a t 細胞における 3'イントロンフラグメント / 5'内部二重鎖領域と I R E S との間に異なる 5'スペーサーを有する精製された c i r c R N A の発現 (図 4 9 A) 及び安定性 (図 4 9 B) を比較している。(A C = A 及び C のみがスペーサー配列において使用された; U C = U 及び C のみがスペーサー配列において使用された)。

20

【0106】

【図 5 0】示されたオリジナルのまたは修飾 I R E S エlement を含有する環状 RNA からの初代 T 細胞における発光発現レベル及び発現の安定性を示す。

【0107】

【図 5 1】示されたオリジナルのまたは修飾された I R E S エlement を含有する環状 RNA からの H e p G 2 細胞における発光発現レベル及び発現の安定性を示す。

【0108】

【図 5 2】示されたオリジナルのまたは修飾 I R E S エlement を含有する環状 RNA からの 1 C 1 C 7 細胞における発光発現レベル及び発現の安定性を示す。

30

【0109】

【図 5 3】挿入された非翻訳領域 (U T R) を有する I R E S エlement またはハイブリッド I R E S エlement を含有する環状 RNA からの H e p G 2 細胞における発光発現レベル及び発現の安定性を示す。「S c r」は、対照として使用されたスクランブルを意味する。

【0110】

【図 5 4】ガウシアルシフェラーゼをコードする配列に作動可能に連結された I R E S 及び可変終止コドンカセットを含有する環状 RNA からの 1 C 1 C 7 細胞における発光発現レベル及び発現の安定性を示す。

【0111】

【図 5 5】ガウシアルシフェラーゼをコードする配列の開始コドンの前に挿入された I R E S 及び可変非翻訳領域 (U T R) を含有する環状 RNA からの 1 C 1 C 7 細胞における発光発現レベル及び発現の安定性を示す。

40

【0112】

【図 5 6】h E P O をコードする配列の下流に 2 つの m i R - 1 2 2 標的部含有する環状 RNA からの H u h 7 細胞におけるヒトエリスロポエチン (h E P O) の発現レベルを示す。

【0113】

【図 5 7】インビトロでホタルルシフェラーゼをコードする環状 RNA をトランスフェクトした L N P からの S u p T 1 細胞 (ヒト T 細胞腫瘍株から) 及び M V 4 - 1 1 細胞 (ヒ

50

トマクロファージ株から)における発光発現レベルを示す。

【0114】

【図58-1】異なるヘルパー脂質、PEG脂質、及びイオン化可能な脂質：リン酸比製剤に基づいて、ApoEの環状RNA依存性を含有するトランスフェクトされた初代ヒトT細胞LNPsの比較を示す。

【図58-2】図58-1の続きを示す図である。

【0115】

【図59】ApoE3を用いてまたは用いずに、eGFPをコードする環状RNAを含有するLNPを活性化された初代ヒトT細胞に取り込むことを示す。

【0116】

【図60】CreレポーターマウスモデルにおけるCre蛍光タンパク質をコードする環状RNAを含有するLNPからの免疫細胞発現を示す。

【0117】

【図61】mOX40Lをコードする環状RNAでトランスフェクトされたLNPの静脈内注射後の、野生型マウスにおけるmOX40Lの免疫細胞発現を示す。

【0118】

【図62A】mOX40Lを発現することができる環状RNAでトランスフェクトされたLNP中のmOX40Lの単回用量を示す。脾臓T細胞、CD4+T細胞、CD8+T細胞、B細胞、NK細胞、樹状細胞、及び他の骨髄細胞におけるmOX40L発現のパーセントを提供する。

【図62B】mOX40Lを発現することができる環状RNAでトランスフェクトされたLNP中のmOX40Lの単回用量を示す。脾臓T細胞、CD4+T細胞、CD8+T細胞、B細胞、NK細胞、樹状細胞、及び他の骨髄細胞におけるmOX40L発現のパーセントを提供する。

【図62C】mOX40Lを発現することができる環状RNAでトランスフェクトされたLNP中のmOX40Lの単回用量を示す。トランスフェクションから24時間後のマウス体重変化を提供する。

【0119】

【図63】マウスにおける環状RNAで静脈内にトランスフェクトされたLNPのB細胞枯渇を示す。図63Aは、生きたCD45+免疫細胞のB220+B細胞を介したBe細胞枯渇を定量化したものである。図63Bは、生きたCD45+免疫細胞のB220+B細胞のB細胞枯渇を、環状RNAを発現するルシフェラーゼと比較したものである。図63Cは、トランスフェクトされた細胞のB細胞重量増加を提供する。

【0120】

【図64】抗CD19 CARを発現する環状RNAを封入したLNPで処理した場合の末梢血(図64A)及び脾臓(図64B)におけるCAR発現レベルを示す。抗CD20(aCD20)及びルシフェラーゼをコードする環状RNA(oLuc)を比較のために使用した。

【0121】

【図65】抗CD19 CAR発現の全体的な頻度、細胞表面上の抗CD19 CAR発現の頻度、及びT細胞上の抗CD19 CARをコードするIRES特異的環状RNAの抗腫瘍応答への影響を示す。図65Aは、抗CD19 CARの幾何平均蛍光強度を示し、図65Bは、抗CD19 CAR発現のパーセンテージを示し、図65Cは、抗CD19 CARによって実施された標的細胞溶解のパーセンテージを示す。(CK=ヤギコブウイルス; AP=アポデムスピコルナウイルス; CK\*=コドン最適化されたヤギコブウイルス; PV=パラボウイルス; SV=サリウイルス)。

【0122】

【図66】IRES特異的環状RNA構築物で処理した場合のA20 FLuc標的細胞のCAR発現レベルを示す。

【0123】

10

20

30

40

50

【図 6 7】初代ヒト T 細胞における環状 RNA からの細胞質 (図 6 7 A) 及び表面 (図 6 7 B) タンパク質の発光発現レベルを示す。

【0 1 2 4】

【図 6 8 A】IRES 特異的環状構築物で処理した場合のヒト T 細胞における発光発現を示す。環状 RNA 構築物における発現を直鎖状 mRNA と比較した。図 6 8 A、図 6 8 B、及び図 6 8 G は、複数ドナー細胞におけるガウシアルシフェラーゼ発現を提供する。図 6 8 C、図 6 8 D、図 6 8 E、及び図 6 8 F は、複数ドナー細胞におけるホタルルシフェラーゼ発現を提供する。

【図 6 8 B】IRES 特異的環状構築物で処理した場合のヒト T 細胞における発光発現を示す。環状 RNA 構築物における発現を直鎖状 mRNA と比較した。図 6 8 A、図 6 8 B、及び図 6 8 G は、複数ドナー細胞におけるガウシアルシフェラーゼ発現を提供する。図 6 8 C、図 6 8 D、図 6 8 E、及び図 6 8 F は、複数ドナー細胞におけるホタルルシフェラーゼ発現を提供する。

【図 6 8 C】IRES 特異的環状構築物で処理した場合のヒト T 細胞における発光発現を示す。環状 RNA 構築物における発現を直鎖状 mRNA と比較した。図 6 8 A、図 6 8 B、及び図 6 8 G は、複数ドナー細胞におけるガウシアルシフェラーゼ発現を提供する。図 6 8 C、図 6 8 D、図 6 8 E、及び図 6 8 F は、複数ドナー細胞におけるホタルルシフェラーゼ発現を提供する。

【図 6 8 D】IRES 特異的環状構築物で処理した場合のヒト T 細胞における発光発現を示す。環状 RNA 構築物における発現を直鎖状 mRNA と比較した。図 6 8 A、図 6 8 B、及び図 6 8 G は、複数ドナー細胞におけるガウシアルシフェラーゼ発現を提供する。図 6 8 C、図 6 8 D、図 6 8 E、及び図 6 8 F は、複数ドナー細胞におけるホタルルシフェラーゼ発現を提供する。

【図 6 8 E】IRES 特異的環状構築物で処理した場合のヒト T 細胞における発光発現を示す。環状 RNA 構築物における発現を直鎖状 mRNA と比較した。図 6 8 A、図 6 8 B、及び図 6 8 G は、複数ドナー細胞におけるガウシアルシフェラーゼ発現を提供する。図 6 8 C、図 6 8 D、図 6 8 E、及び図 6 8 F は、複数ドナー細胞におけるホタルルシフェラーゼ発現を提供する。

【図 6 8 F】IRES 特異的環状構築物で処理した場合のヒト T 細胞における発光発現を示す。環状 RNA 構築物における発現を直鎖状 mRNA と比較した。図 6 8 A、図 6 8 B、及び図 6 8 G は、複数ドナー細胞におけるガウシアルシフェラーゼ発現を提供する。図 6 8 C、図 6 8 D、図 6 8 E、及び図 6 8 F は、複数ドナー細胞におけるホタルルシフェラーゼ発現を提供する。

【図 6 8 G】IRES 特異的環状構築物で処理した場合のヒト T 細胞における発光発現を示す。環状 RNA 構築物における発現を直鎖状 mRNA と比較した。図 6 8 A、図 6 8 B、及び図 6 8 G は、複数ドナー細胞におけるガウシアルシフェラーゼ発現を提供する。図 6 8 C、図 6 8 D、図 6 8 E、及び図 6 8 F は、複数ドナー細胞におけるホタルルシフェラーゼ発現を提供する。

【0 1 2 5】

【図 6 9】ホタルルシフェラーゼを発現する K 5 6 2 細胞に対して、抗 CD 1 9 または抗 BCMA CAR のいずれかをコードする環状 RNA を含む脂質ナノ粒子の処理後のヒト T 細胞における抗 CD 1 9 CAR (図 6 9 A 及び図 6 9 B) 及び抗 BCMA CAR (図 6 8 B) の発現を示す。

【0 1 2 6】

【図 7 0】特異的抗原依存的様式に抗 CD 1 9 CAR をコードする環状 RNA のインビトロにおけるエレクトロポレーションによる送達から生じる抗 CD 1 9 CAR 発現レベルを示す。図 7 0 A は、抗 CD 1 9 CAR による Na 1 m 6 細胞溶解を示す。図 7 0 B は、抗 CD 1 9 CAR による K 5 6 2 細胞溶解を示す。

【0 1 2 7】

【図 7 1 A】LNP 及び環状 RNA を発現する緑色蛍光タンパク質 (GFP) を含む溶液

10

20

30

40

50

中での A p o E 3 の使用を介した L N P のトランスフェクションを示す。図 7 1 A は、生死の結果を示した。図 7 1 B、図 7 1 C、図 7 1 D、及び図 7 1 E は、複数ドナーの発現頻度を提供する。

【図 7 1 B】L N P 及び環状 R N A を発現する緑色蛍光タンパク質 ( G F P ) を含む溶液中での A p o E 3 の使用を介した L N P のトランスフェクションを示す。図 7 1 A は、生死の結果を示した。図 7 1 B、図 7 1 C、図 7 1 D、及び図 7 1 E は、複数ドナーの発現頻度を提供する。

【図 7 1 C】L N P 及び環状 R N A を発現する緑色蛍光タンパク質 ( G F P ) を含む溶液中での A p o E 3 の使用を介した L N P のトランスフェクションを示す。図 7 1 A は、生死の結果を示した。図 7 1 B、図 7 1 C、図 7 1 D、及び図 7 1 E は、複数ドナーの発現頻度を提供する。

10

【図 7 1 D】L N P 及び環状 R N A を発現する緑色蛍光タンパク質 ( G F P ) を含む溶液中での A p o E 3 の使用を介した L N P のトランスフェクションを示す。図 7 1 A は、生死の結果を示した。図 7 1 B、図 7 1 C、図 7 1 D、及び図 7 1 E は、複数ドナーの発現頻度を提供する。

【図 7 1 E】L N P 及び環状 R N A を発現する緑色蛍光タンパク質 ( G F P ) を含む溶液中での A p o E 3 の使用を介した L N P のトランスフェクションを示す。図 7 1 A は、生死の結果を示した。図 7 1 B、図 7 1 C、図 7 1 D、及び図 7 1 E は、複数ドナーの発現頻度を提供する。

【 0 1 2 8 】

20

【図 7 2 A】様々な脂質製剤の全フラックス及び前中心発現を示す。実施例 7 4 を参照されたい。

【図 7 2 B】様々な脂質製剤の全フラックス及び前中心発現を示す。実施例 7 4 を参照されたい。

【図 7 2 C】様々な脂質製剤の全フラックス及び前中心発現を示す。実施例 7 4 を参照されたい。

【図 7 2 D】様々な脂質製剤の全フラックス及び前中心発現を示す。実施例 7 4 を参照されたい。

【図 7 2 E】様々な脂質製剤の全フラックス及び前中心発現を示す。実施例 7 4 を参照されたい。

30

【図 7 2 F】様々な脂質製剤の全フラックス及び前中心発現を示す。実施例 7 4 を参照されたい。

【図 7 2 G】様々な脂質製剤の全フラックス及び前中心発現を示す。実施例 7 4 を参照されたい。

【図 7 2 H】様々な脂質製剤の全フラックス及び前中心発現を示す。実施例 7 4 を参照されたい。

【図 7 2 I】様々な脂質製剤の全フラックス及び前中心発現を示す。実施例 7 4 を参照されたい。

【図 7 2 J】様々な脂質製剤の全フラックス及び前中心発現を示す。実施例 7 4 を参照されたい。

40

【図 7 2 K】様々な脂質製剤の全フラックス及び前中心発現を示す。実施例 7 4 を参照されたい。

【図 7 2 L】様々な脂質製剤の全フラックス及び前中心発現を示す。実施例 7 4 を参照されたい。

【 0 1 2 9 】

【図 7 3 A】安定化 ( 二重プロリン変異体 ) S A R S - C o V 2 スパイクタンパク質をコードする R N A 分子の環状化効率を示す。図 7 3 A は、約 4 . 5 k b の S A R S - C o V 2 スパイクをコードする c i r c R N A のインビトロ転写産物を示す。図 7 3 B は、293 細胞へのスパイクをコードする c i r c R N A のトランスフェクション後のフローサイトメトリーによるスパイクタンパク質表面発現のヒストグラムを示す。トランスフェクト

50

した293細胞を、CR3022一次抗体及びAPC標識二次抗体でトランスフェクトした24時間後に染色した。図73Cは、スパイクをコードするcircRNAのトランスフェクション後の293細胞におけるスパイクタンパク質表面発現のフローサイトメトリープロットを示す。トランスフェクトした293細胞を、CR3022一次抗体及びAPC標識二次抗体でトランスフェクトした24時間後に染色した。

【図73B】安定化(二重プロリン変異体)SARS-CoV2スパイクタンパク質をコードするRNA分子の環状化効率を示す。図73Aは、約4.5kbのSARS-CoV2スパイクをコードするcircRNAのインビトロ転写産物を示す。図73Bは、293細胞へのスパイクをコードするcircRNAのトランスフェクション後のフローサイトメトリーによるスパイクタンパク質表面発現のヒストグラムを示す。トランスフェクトした293細胞を、CR3022一次抗体及びAPC標識二次抗体でトランスフェクトした24時間後に染色した。

10

【図73C】安定化(二重プロリン変異体)SARS-CoV2スパイクタンパク質をコードするRNA分子の環状化効率を示す。図73Aは、約4.5kbのSARS-CoV2スパイクをコードするcircRNAのインビトロ転写産物を示す。図73Bは、293細胞へのスパイクをコードするcircRNAのトランスフェクション後のフローサイトメトリーによるスパイクタンパク質表面発現のヒストグラムを示す。トランスフェクトした293細胞を、CR3022一次抗体及びAPC標識二次抗体でトランスフェクトした24時間後に染色した。

20

【0130】

【図74】複数の制御されたアジュバント戦略を提供する。図に示されるcircRNAは、インビトロでGTPを指標分子として使用した未精製センス環状RNAスプライシング反応を伴う。3p-circRNAは、精製されたセンス環状RNA、ならびに三リン酸化5'末端を含有する精製されたアンチセンス環状RNAを含む。図74Aは、インビトロで野生型及びMAVSノックアウトA549細胞におけるIFN-誘導を示し、図74Bは、指示された戦略を使用して生成された製剤化されたcircRNAに対するインビボでのサイトカイン応答を示す。

30

【0131】

【図75A】環状RNA構築物を含有するLNPの筋肉内送達を示す。6時間後の生体全身フラックスを提供する。

【図75B】環状RNA構築物を含有するLNPの筋肉内送達を示す。LNP環状RNA構築物の1μgの用量の6時間後の全身IVISを提供する。

【図75C】環状RNA構築物を含有するLNPの筋肉内送達を示す。24時間にわたるエクスピボ発現分布を提供する。

40

【0132】

【図76】単一の脂質製剤からの複数の環状RNAの発現を示す。図76Aは、環状RNA構築物を含有するLNPの単一及び混合セットからのhEPO力価を提供する。図76Bは、環状RNA構築物を含有するLNPの単一または混合セットからの生物発光発現の総フラックスを提供する。

【0133】

【図77A】スパイクSARS-CoV2タンパク質をコードする環状RNAのSARS-CoV2スパイクタンパク質発現を示す。図77Aは、スパイクCoV2発現の頻度を示し、図77Bは、スパイクCoV2発現の幾何平均蛍光強度(gMFI)を示し、図77Cは、構築物のgMFI発現を発現頻度と比較する。

50

【図 77B】スパイク SARS - CoV2 タンパク質をコードする環状 RNA の SARS - CoV2 スパイクタンパク質発現を示す。図 77A は、スパイク CoV2 発現の頻度を示し、図 77B は、スパイク CoV2 発現の幾何平均蛍光強度 (gMFI) を示し、図 77C は、構築物の gMFI 発現を発現頻度と比較する。

【図 77C】スパイク SARS - CoV2 タンパク質をコードする環状 RNA の SARS - CoV2 スパイクタンパク質発現を示す。図 77A は、スパイク CoV2 発現の頻度を示し、図 77B は、スパイク CoV2 発現の幾何平均蛍光強度 (gMFI) を示し、図 77C は、構築物の gMFI 発現を発現頻度と比較する。

【発明を実施するための形態】

【0134】

10

詳細な説明

環状 RNA ワクチンの選択、設計、調製、製造、製剤化、及び/または使用のための組成物、方法、プロセス、キット、及びデバイスを、本明細書に記載する。本発明は、組成物、例えば、1つ以上の環状 RNA ワクチンを含む薬学的組成物を更に提供する。

【0135】

本発明の環状 RNA ワクチンは、1つ以上の野生型または操作されたタンパク質、ペプチド、またはポリペプチド (例えば、アジュバント及び抗原) をコードする、1つ以上の環状 RNA ポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、アジュバント、アジュバント様タンパク質、及び抗原が由来または遺伝子操作される感染性薬剤には、ウイルス、細菌、真菌、原虫、及び/または寄生虫が含まれるが、これらに限定されない。

20

【0136】

いくつかの実施形態では、細胞、組織、または生物における免疫応答を誘導、誘発、促進する、または引き起こす方法であって、当該細胞、組織、または生物を、本明細書に記載または教示される環状 RNA または直鎖状 mRNA ワクチンのいずれかと接触させることを含む、方法が提供される。

【0137】

本発明の態様は、第1の抗原性ポリペプチドをコードする発現配列を有する1つ以上の RNA ポリヌクレオチドを含む環状 RNA ワクチンを提供する。いくつかの実施形態では、環状 RNA ポリヌクレオチドは、輸送ビヒクル (例えば、脂質ナノ粒子) 内に製剤化される。

30

【0138】

いくつかの実施形態では、発現配列は、コドン最適化されている。いくつかの実施形態では、第1の抗原性ポリペプチドは、感染性因子に由来する。いくつかの実施形態では、感染性因子は、ウイルス株及びバクテリア株からなる群のメンバーから選択される。いくつかの実施形態では、1つ以上の RNA ポリヌクレオチドは、更なる抗原性ポリペプチドをコードする。いくつかの実施形態では、更なる抗原性ポリペプチドは、コドン最適化発現配列を有する RNA ポリヌクレオチドによってコードされる。

【0139】

いくつかの実施形態では、1つ以上の抗原性ポリペプチドが、表9に列挙されるタンパク質、またはその抗原性フラグメントから選択される。いくつかの実施形態では、1つ以上の RNA ポリヌクレオチドの発現配列及び/または第2の RNA ポリヌクレオチドの発現配列は、それぞれ独立して、表9から選択される抗原性ポリペプチド、またはその抗原フラグメントをコードする。いくつかの実施形態では、1つ以上の RNA ポリヌクレオチドの各発現配列は、表9に列挙される RNA 配列、またはその抗原フラグメントのいずれかから選択される。

40

【0140】

本明細書に提供されるいくつかの実施形態では、感染性因子は、

アデノウイルス; 単純ヘルペス1型; 単純ヘルペス2型; 脳炎ウイルス、パピローマウイルス、水痘 - 帯状疱疹ウイルス; エプスタインバーウイルス; ヒトサイトメガロウイルス; ヒトヘルペスウイルス8型; ヒトパピローマウイルス; BKウイルス; JCウイルス

50

；天然痘；ポリオウイルス；B型肝炎ウイルス；ヒトボカウイルス；パルボウイルスB19；ヒトアストロウイルス；ノーウォークウイルス；コクサッキーウイルス；A型肝炎ウイルス；ポリオウイルス；ライノウイルス；重症急性呼吸器症候群ウイルス；C型肝炎ウイルス；黄熱ウイルス；デングウイルス；西ナイルウイルス；風疹ウイルス；E型肝炎ウイルス；ヒト免疫不全ウイルス（HIV）；インフルエンザウイルス；ガナリトウイルス；フニンウイルス；ラッサウイルス；マチュポウイルス；サビアウイルス；クリミア・コンゴ出血熱ウイルス；エボラウイルス；マールブルグウイルス；麻疹ウイルス；ムンプスウイルス；パラインフルエンザウイルス；呼吸器合胞体ウイルス；ヒトメタニューモウイルス；ヘンドラウイルス；ニパウイルス；狂犬病ウイルス；D型肝炎；ロタウイルス；オルビウイルス；コルチウイルス；パナウイルス；ヒトエンテロウイルス；ハンタウイルス；西ナイルウイルス；中東呼吸器症候群コロナウイルス；日本脳炎ウイルス；及び東部ウマ脳炎からなる群から選択されるウイルス株である。

#### 【0141】

いくつかの実施形態では、ウイルスは、A型インフルエンザもしくはB型インフルエンザの株、またはそれらの組み合わせである。いくつかの実施形態では、A型インフルエンザまたはB型インフルエンザの株は、鳥類、ブタ、ウマ、イヌ、ヒト、または非ヒト霊長類に関連する。いくつかの実施形態では、抗原性ポリペプチドは、ヘマグルチニンタンパク質またはそのフラグメントをコードする。いくつかの実施形態では、ヘマグルチニンタンパク質は、H1、H2、H3、H4、H5、H6、H7、H8、H9、H10、H11、H12、H13、H14、H15、H16、H17、H18、またはそのフラグメントである。いくつかの実施形態では、ヘマグルチニンタンパク質は、頭部ドメイン（HA1）を含まない。いくつかの実施形態では、ヘマグルチニンタンパク質は、頭部ドメイン（HA1）の一部を含む。いくつかの実施形態では、ヘマグルチニンタンパク質は、細胞質ドメインを含まない。いくつかの実施形態では、ヘマグルチニンタンパク質は、細胞質ドメインの一部を含む。いくつかの実施形態では、ヘマグルチニンタンパク質は、切断されたヘマグルチニンタンパク質である。いくつかの実施形態では、切断されたヘマグルチニンタンパク質は、膜貫通ドメインの一部を含む。いくつかの実施形態では、ヘマグルチニンタンパク質またはそのフラグメントのアミノ酸配列は、表9に提供されるヘマグルチニンアミノ酸配列のうちの任意の1つと少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%配列同一性を含む。いくつかの実施形態では、ウイルスは、H1N1、H3N2、H7N9、及びH10N8からなる群から選択される。

#### 【0142】

いくつかの実施形態では、感染性因子が、*Mycobacterium tuberculosis*、*Clostridium difficile*、*Staphylococcus aureus*、*Enterococcus faecalis*、*Enterococcus faecium*、*Pseudomonas aeruginosa*、及び*Acinetobacter baumannii*から選択される細菌株である。いくつかの実施形態では、細菌は、1つ以上の抗生物質に耐性を示す。いくつかの実施形態では、細菌は、*Clostridium difficile*である。いくつかの実施形態では、*C. difficile*は、クリンダマイシン耐性及び/またはフルオロキノロン耐性である。いくつかの実施形態では、細菌は、*S. Aureus*である。いくつかの実施形態では、*S. Aureus*は、メチシリン耐性及び/またはバンコマイシン耐性である。

#### 【0143】

いくつかの実施形態では、環状RNAポリヌクレオチドは、1つを超える発現配列を含む。いくつかの実施形態では、発現配列は、1つを超える抗原性ポリペプチドをコードし得る。いくつかの実施形態では、1つ以上のRNAポリヌクレオチドの発現配列は、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、または10個の抗原性ポリペプチドをコードす



る。いくつかの実施形態では、1つ以上のRNAポリヌクレオチドの発現配列は、少なくとも10、15、20、または50個の抗原性ポリペプチドをコードする。いくつかの実施形態では、1つ以上のRNAポリヌクレオチドの発現配列は、2~10、10~15、15~20、20~50、50~100、または100~200個の抗原性ポリペプチドをコードする。

【0144】

いくつかの実施形態では、環状RNAポリヌクレオチドは、天然に存在する核酸のみを含む。

【0145】

追加の態様は、対象における抗原特異的免疫応答を誘導する方法であって、本明細書に記載のワクチンのうちのいずれかを抗原特異的免疫応答を産生するのに有効量で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、抗原特異的免疫応答は、T細胞応答を含む。いくつかの実施形態では、抗原特異的免疫応答は、B細胞応答を含む。いくつかの実施形態では、抗原特異的免疫応答を産生する方法は、ワクチンの単回投与を伴う。いくつかの実施形態では、本方法は、1つ以上のブースター用量のワクチンを投与することを更に含む。いくつかの実施形態では、ワクチンは、対象に、皮内または筋肉注射によって投与される。

10

【0146】

態様はまた、対象における抗原特異的免疫応答を誘導する方法において使用するための本明細書に記載のワクチンのうちのいずれかも提供する。いくつかの実施形態では、本方法は、ワクチンを抗原特異的免疫応答を産生するのに有効な量で対象に投与することを含む。いくつかの実施形態では、感染性疾患の少なくとも1つの症状または特徴が、強度、重症度、または頻度が低下するか、あるいは発症が遅延するように、環状RNAワクチンは、有効用量で、投与スケジュールを使用して投与される。

20

【0147】

他の態様は、対象における抗原特異的免疫応答を誘導する方法で使用するための医薬の製造における本明細書に記載のワクチンのうちのいずれかの使用を提供し、該方法は、抗原特異的免疫応答を生成するのに有効な量で対象にワクチンを投与することを含む。

【0148】

いくつかの実施形態では、アジュバントポリペプチドは、tol1様受容体リガンド、サイトカイン、FLt3-リガンド、抗体、ケモカイン、キメラタンパク質、瀕死の腫瘍から放出される内因性アジュバント、及びチェックポイント阻害タンパク質を含む。特定の実施形態では、アジュバントポリペプチドは、T細胞、B細胞、NK細胞、または骨髄細胞を直接的または間接的に刺激するタンパク質である。特定の実施形態では、アジュバントポリペプチドは、抗原提示細胞上の抗原ペプチド発現またはMHC複合体の取り込み、処理、提示を増加させる。特定の実施形態では、アジュバントポリペプチドは、下方調節を通じてMCHをブロックすることができる。

30

【0149】

いくつかの実施形態では、1つ以上のアジュバントポリペプチドが、表10に列挙されるタンパク質、またはそのアジュバントフラグメントから選択される。いくつかの実施形態では、1つ以上のRNAポリヌクレオチドの発現配列及び/または第2のRNAポリヌクレオチドの発現配列は、それぞれ独立して、表10から選択されるアジュバントポリペプチド、またはそのアジュバントフラグメントをコードする。いくつかの実施形態では、1つ以上のRNAポリヌクレオチドの各発現配列は、表10に列挙されるRNA配列、またはそのアジュバントフラグメントのうちのいずれかから選択される。

40

【0150】

特定の実施形態では、環状RNAを作製するためのベクターであって、5'二重鎖形成領域、3'グループイントロンフラグメント、任意の第1のスペーサー、配列内リボソーム進入部位(IRES)、発現配列、任意の第2のスペーサー、5'グループイントロンフラグメント、及び3'二重鎖形成領域を含む、ベクターが、本明細書に提供される

50

。いくつかの実施形態では、これらのエレメントは、上記の順序でベクター内に配置される。いくつかの実施形態では、ベクターは、3'グループイントロンフラグメントとIRESとの間の内部5'二重鎖形成領域、及び発現配列と5'グループイントロンフラグメントとの間の内部3'二重鎖形成領域を更に含む。いくつかの実施形態では、内部二重鎖形成領域は、互いの中に二重鎖を形成することができるが、外部二重鎖形成領域とは形成できない。いくつかの実施形態では、内部二重鎖形成領域は、第1及び第2のスペーサーの一部である。追加の実施形態には、本明細書で提供されるベクターを使用して作製された環状RNAポリヌクレオチドを含む環状RNAポリヌクレオチド、かかる環状RNAを含む組成物、かかる環状RNAを含む細胞、かかるベクター、環状RNA、組成物及び細胞を使用及び作製する方法が含まれる。

10

## 【0151】

いくつかの実施形態では、治療または有用なタンパク質の産生のために、本明細書で提供される環状RNAポリヌクレオチドを細胞に投与することを含む方法が、本明細書で提供される。いくつかの実施形態では、本方法は、リボヌクレアーゼに対し環状RNAが耐性であるために、直鎖状RNAよりも長い半減期を伴う真核細胞内での所望のポリペプチドの産生を提供することにおいて有利である。

## 【0152】

環状RNAポリヌクレオチドは、エキソヌクレアーゼを介した分解に必要な遊離端を欠いているため、同等の直鎖状RNAと比較した場合、RNA分解のいくつかのメカニズムに対して耐性をもたらされ、半減期が長くなる。環状化により、一般に半減期が短いRNAポリヌクレオチドの安定化が可能になり得、様々な用途において外因性mRNAの全体的な有効性が改善し得る。ある実施形態では、タンパク質合成によって評価される真核細胞（例えば、ヒト細胞などの哺乳動物細胞）における本明細書で提供される環状RNAポリヌクレオチドの機能的半減期は、少なくとも20時間（例えば、少なくとも80時間）である。

20

## 【0153】

## 定義

本明細書で使用する場合、「circRNA」または「環状ポリリボヌクレオチド」または「環状RNA」という用語は、互換可能に使用され、共有結合を通して環状構造を形成するポリリボヌクレオチドを指す。

30

## 【0154】

本明細書で使用する場合、「3'グループイントロンフラグメント」という用語は、スプライス部位ジヌクレオチド及び任意で天然エクソン配列のストレッチを含む天然グループイントロンの3'近位端と75%以上の類似性を有する配列を指す。

## 【0155】

本明細書で使用する場合、「5'グループイントロンフラグメント」という用語は、スプライス部位ジヌクレオチド及び任意で天然エクソン配列のストレッチを含む天然グループイントロンの5'近位端と75%以上の類似性を有する配列を指す。

## 【0156】

本明細書で使用する場合、「順列置換部位」という用語は、イントロンの順列置換の前に切断が行われるグループイントロン内の部位を指す。この切断により、3'及び5'グループイントロンフラグメントが生成され、これらは、環状化される前駆体RNAのストレッチのいずれかの側に順列置換される。

40

## 【0157】

本明細書で使用する場合、「スプライス部位」という用語は、グループイントロンに部分的または完全に含まれ、その間でRNA環状化中にホスホジエステル結合が切断されるジヌクレオチドを指す。

## 【0158】

ポリヌクレオチド構築物中の発現配列は、「切断部位」配列によって分離され得、発現配列によってコードされるポリペプチドが一旦翻訳されると、細胞中で明確かつ別個の分

50

離したポリペプチドとして発現されることを可能にする。

【0159】

「自己切断ペプチド」とは、2つの隣接するアミノ酸間のペプチド結合なしで翻訳されるか、またはタンパク質及び自己切断ペプチドを含むポリペプチドが産生されるときに、いかなる外部切断活性（例えば、酵素的切断）も必要なく、すぐに切断または明確かつ別個の第1及び第2のポリペプチドに分離されるように機能するペプチドを指す。

【0160】

本明細書で使用する場合、「治療用タンパク質」という用語は、対象に、翻訳された核酸の形態で直接または間接的に投与された場合に、治療的、診断的、及び/または予防効果を有する、及び/または望ましい生物学的及び/または薬理学的効果を引き出す、任意のタンパク質を指す。

10

【0161】

TCRの鎖及び鎖は、一般に、各々、2つのドメインまたは領域、すなわち、可変ドメイン及び定常ドメイン/領域を有するとみなされる。可変ドメインは、可変領域及び結合領域の連結からなる。したがって、本明細書及び特許請求の範囲では、「TCRアルファ可変ドメイン」という用語は、TCRアルファ可変（TRAV）及びTCRアルファ連結（TRAJ）領域の連結を指し、「TCRアルファ定常ドメイン」という用語は、細胞外TCRアルファ定常（TRAC）領域またはC末端切断TRAC配列を指す。同様に、「TCRベータ可変ドメイン」という用語は、TCRベータ可変（TRBV）及び、TCRベータ多様性（TRBD）、及びTCRベータ連結（TRBJ）領域の連結を指し、「TCRベータ定常ドメイン」という用語は、細胞外TCRベータ定常（TRBC）領域またはC末端切断TRBC配列を指す。

20

【0162】

本明細書で使用する場合、「免疫原性」という用語は、物質に対する。免疫応答は、生物の免疫系またはある特定のタイプの免疫細胞が免疫原性物質に曝露された場合に誘導され得る。「非免疫原性」という用語は、物質に対する検出可能な閾値を超える。免疫応答は、生物の免疫系またはある特定のタイプの免疫細胞が非免疫原性物質に曝露した場合には、検出されない。いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるような非免疫原性環状ポリリボヌクレオチドは、免疫原性アッセイによって測定された場合、所定の閾値を超える免疫応答を誘導しない。いくつかの実施形態では、自然免疫応答は、生物の免疫系または特定のタイプの免疫細胞が本明細書で提供されるような非免疫原性環状ポリリボヌクレオチドに曝露された場合には、検出されない。いくつかの実施形態では、適応免疫応答は、生物の免疫系または特定のタイプの免疫細胞が本明細書で提供されるような非免疫原性環状ポリリボヌクレオチドに曝露された場合には、検出されない。

30

【0163】

本明細書で使用する場合、「環状化効率」という用語は、その直鎖状出発物質と比較した、結果得られた環状ポリリボヌクレオチドの測定値を指す。

【0164】

本明細書で使用する場合、「翻訳効率」という用語は、リボヌクレオチド転写産物からのタンパク質またはペプチド産生の速度または量を指す。いくつかの実施形態では、翻訳効率は、タンパク質またはペプチドをコードする転写産物の所与の量当たりに産生されるタンパク質またはペプチドの量として表すことができる。

40

【0165】

「ヌクレオチド」という用語は、リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド、その修飾形態、またはその類似体を指す。ヌクレオチドには、プリン、例えば、アデニン、ヒポキサンチン、グアニン、ならびにその誘導体及び類似体、ならびにピリミジン、例えば、シトシン、ウラシル、チミン、ならびにその誘導体及び類似体を含む種が含まれる。ヌクレオチド類似体には、塩基、糖及び/またはリン酸の化学構造に修飾を有するヌクレオチドが含まれ、それには、5'位ピリミジン修飾、8'位プリン修飾、シトシン環外アミンでの修飾、及び5-プロモ-ウラシルの置換；ならびに2'位糖修飾、例えば限定されな

50

いが、2'-OHがH、OR、R、ハロゲン、SH、SR、NH<sub>2</sub>、NHR、NR<sub>2</sub>、またはCN（ここで、Rは、本明細書で定義するようなアルキル部分である）などの基によって置換されている糖修飾リボヌクレオチドが含まれるが、これに限定されない。ヌクレオチド類似体はまた、塩基、例えばイノシン、クエオシン、キサンチン；糖、例えば2'-メチルリボース；非天然ホスホジエステル連結、例えばメチルホスホン酸、ホスホロチオエート及びペプチド連結を伴うヌクレオチドを含むことを意図する。ヌクレオチド類似体には、5-メトキシウリジン、1-メチルシュードウリジン、及び6-メチルアデノシンが含まれる。

**【0166】**

「核酸」及び「ポリヌクレオチド」という用語は、本明細書において互換可能に使用され、任意の長さ、例えば、約2塩基を超える、約10塩基を超える、約100塩基を超える、約500塩基を超える、1000塩基を超える、または最大で約10,000塩基以上の、ヌクレオチド、例えば、デオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドから構成されるポリマーを説明し、酵素的または合成的に産生され得（例えば、米国特許第5,948,902号及びそこに引用される参考文献に記載されるとおりである）、これは2つの天然に存在する核酸のものに類似した配列特異的様式で天然に存在する核酸とハイブリダイズする、例えば、ワトソン-クリック塩基対形成相互作用に参加することができる。天然に存在する核酸は、グアニン、シトシン、アデニン、チミン、及びウラシル（それぞれ、G、C、A、T、及びU）を含むヌクレオチドから構成される。

10

**【0167】**

本明細書で使用する場合、「リボ核酸」及び「RNA」という用語は、リボヌクレオチドから構成されるポリマーを意味する。

20

**【0168】**

本明細書で使用する場合、「デオキシリボ核酸」及び「DNA」という用語は、デオキシリボヌクレオチドから構成されるポリマーを意味する。

**【0169】**

「単離された」または「精製された」は、一般に、物質（例えば、いくつかの実施形態では、化合物、ポリヌクレオチド、タンパク質、ポリペプチド、ポリヌクレオチド組成物、またはポリペプチド組成物）が、それが存在する試料のかなりのパーセント（例えば、1%を超える、2%を超える、5%を超える、10%を超える、20%を超える、50%を超える、またはそれ以上、通常は最大約90%~100%）を構成するような、物質の単離を指す。特定の実施形態では、実質的に精製された成分は、試料の少なくとも50%、80%~85%、また90%~95%を含む。目的のポリヌクレオチド及びポリペプチドを精製するための技術は当該技術分野で周知であり、例えば、イオン交換クロマトグラフィー、親和性クロマトグラフィー、及び密度に応じた沈降が含まれる。一般に、物質は、試料の他の成分と比較して、自然に見られる量よりも多い量で試料に存在する場合に精製される。

30

**【0170】**

本明細書で使用する場合、「二本鎖」、「二重鎖」、または「ハイブリダイズ」という用語は、相補的配列を含有する核酸の2本の一本鎖のハイブリダイゼーションによって形成された核酸を指す。ほとんどの場合、ゲノムDNAは二本鎖である。配列は、完全に相補的または部分的に相補的であることができる。

40

**【0171】**

本明細書で使用する場合、RNAに関して「非構造化」とは、RNA Foldソフトウェアまたは同様の予測ツールによって、それ自体または同じRNA分子内の他の配列と構造（例えば、ヘアピンループ）を形成すると予測されないRNA配列を指す。いくつかの実施形態では、非構造化RNAは、ヌクレアーゼ保護アッセイを使用して機能的に特徴評価することができる。

**【0172】**

本明細書で使用する場合、RNAに関して「構造化」とは、RNA Foldソフトウェ

50

アまたは同様の予測ツールによって、それ自体または同じRNA分子内の他の配列と構造（例えば、ヘアピンループ）を形成すると予測されるRNA配列を指す。

【0173】

本明細書で使用する場合、2つの「二重鎖形成領域」、「相同性アーム」、または「相同性領域」は、ハイブリダイゼーション反応のための基質として作用するために、2つの領域が互いの逆補体に対して十分なレベルの配列同一性を共有している場合、互いに相補体であるか、または相補的である。本明細書で使用する場合、ポリヌクレオチド配列は、それらが逆相補体または「相補的」配列に対して同一であるまたは配列同一性を共有する場合、「相同性」を有する。二重鎖形成領域及び対応する二重鎖形成領域の逆相補体間のパーセント配列同一性は、ハイブリダイゼーションが起こることを可能にする任意のパーセントの配列同一性であり得る。いくつかの実施形態では、本発明のポリヌクレオチドの内部二重鎖形成領域は、別の内部二重鎖形成領域と二重鎖を形成することができ、外部二重鎖形成領域と二重鎖を形成しない。

10

【0174】

直鎖状核酸分子は、核酸ホスホジエステル連結が置換基モノヌクレオチドの糖部分の5'炭素及び3'炭素で発生するため、「5'末端」（5'端）及び「3'末端」（3'端）を有すると言われている。新しい連結が5'炭素にあるポリヌクレオチドの端ヌクレオチドは、その5'末端ヌクレオチドである。新しい連結が3'炭素にあるポリヌクレオチドの端ヌクレオチドは、その3'末端ヌクレオチドである。本明細書で使用する場合、末端ヌクレオチドは、3'または5'末端の端位置にあるヌクレオチドである。

20

【0175】

「転写」は、DNA分子をテンプレートとして使用するRNAポリメラーゼによるRNA分子の形成または合成を意味する。本発明は、転写に使用されるRNAポリメラーゼに関して制限されない。例えば、いくつかの実施形態では、T7型RNAポリメラーゼを使用することができる。

【0176】

「翻訳」は、RNAテンプレートに基づくリボソームによるポリペプチド分子の形成を意味する。

【0177】

本明細書において使用される用語は、単に特定の実施形態を説明することを目的とし、制限することを意図しないことを理解されたい。本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用する場合、単数形「a」、「an」、及び「the」は、内容が明確に別様に指示しない限り、複数の指示対象を含む。ゆえに、例えば、「細胞」への言及は、2つ以上の細胞の組み合わせ、または細胞の培養物全体を含む；「ポリヌクレオチド」への言及は、実際問題として、そのポリヌクレオチドの多くのコピーを含む。具体的に述べられるまたは文脈から明らかでない限り、本明細書で使用する場合、「または」という用語は、包括的であると理解される。本明細書及び下の残りの本明細書において定義されない限り、本明細書において使用される全ての技術的及び科学的用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般に理解されるものと同じ意味を有する。

30

【0178】

具体的に述べられるまたは文脈から明らかでない限り、本明細書で使用する場合、「約」という用語は、当該技術分野における通常の許容範囲内、例えば、平均の2標準偏差内にあるものと理解される。「約」は、記載される値の10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.9%、0.8%、0.7%、0.6%、0.5%、0.4%、0.3%、0.2%、0.1%、0.09%、0.08%、0.07%、0.06%、0.05%、0.04%、0.03%、0.02%、または0.01%内であると理解され得る。文脈から別様に明確でない限り、本明細書で提供される全ての数値は、「約」という用語によって修飾される。

40

【0179】

本明細書で使用する場合、「コードする」という用語は、ポリマー巨大分子の情報を使

50

用して、第1の分子とは異なる第2の分子の生成を指示する任意のプロセスを広く指す。第2の分子は、第1の分子の化学的性質とは異なる化学構造を有し得る。

【0180】

「共投与」とは、本明細書で提供される治療剤を、1つ以上の追加の治療剤と併せて、本明細書で提供される治療剤が1つ以上の追加の治療剤の効果を上昇することができるように、またはその逆であるように、十分に近い時間で投与することを意味する。

【0181】

本明細書で使用する場合、「治療する」及び「予防する」という用語、ならびにそれらに由来する単語は、必ずしも100%または完全な治療または予防を意味するものではない。むしろ、当業者が潜在的な利益または治療効果を有すると認識する治療または予防の程度は様々である本明細書に開示する方法によって提供される。治療または予防は、疾患の1つ以上の病態または症状の治療または予防を含むことができる。また、本明細書の目的のために、「予防」は、疾患、またはその症状もしくは病態の発症を遅らせることを包含することができる。

10

【0182】

本明細書で使用する場合、「自己免疫」は、哺乳動物及びヒト内に侵入及び持続する細菌、ウイルス、真菌、または寄生生物由来の感染性非自己抗原とは異なる、非感染性自己抗原に対する持続性及び進行性の免疫反応として定義される。自己免疫疾患には、強皮症、バセドウ病、クローン病、シェールゲン病、多発性硬化症、橋本病、乾癬、重症筋無力症、自己免疫性多腺性内分泌不全症候群、I型糖尿病(T1DM)、自己免疫性胃炎、自己免疫性ブドウ膜網膜炎、多発性筋炎、大腸炎、及び甲状腺炎、ならびにヒトループスによって典型的に表される全身性自己免疫疾患が含まれる。本明細書で使用する「自己抗原(Autoantigen)」または「自己抗原(self-antigen)」は、哺乳動物に固有であり、当該哺乳動物において免疫原性である抗原またはエピトープを指す。

20

【0183】

本明細書で使用する場合、「発現配列」という用語は、産物、例えば、ペプチドもしくはポリペプチド、制御核酸、または非コード核酸をコードする核酸配列を指すことができる。ペプチドまたはポリペプチドをコードする例示的な発現配列は、複数のヌクレオチドトライアドを含むことができ、そのそれぞれは、アミノ酸をコードすることができ、「コドン」と称される。

30

【0184】

本明細書で使用する場合、「スペーサー」は、ポリヌクレオチド配列に沿って2つの他のエレメントを分離する1ヌクレオチドから数百または数千ヌクレオチドの範囲のポリヌクレオチド配列の領域を指す。配列は、定義することができるまたは無作為であることもできる。スペーサーは典型的には、非コードである。いくつかの実施形態では、スペーサーは、二重鎖形成領域を含む。

【0185】

本明細書で使用する場合、「配列内リボソーム進入部位」または「IRES」は、典型的なRNAキャップ構造の非存在下でポリペプチドの翻訳を開始することができる、100nt~1000nt以上のサイズ範囲のRNA配列または構造エレメントを指す。IRESは典型的には、約500nt~約700ntの長さである。

40

【0186】

本明細書で使用する場合、「miRNA部位」は、少なくとも8ヌクレオチドの天然miRNA配列と二重鎖を形成することができるポリヌクレオチド内のヌクレオチドのストレッチを指す。

【0187】

本明細書で使用する場合、「エンドヌクレアーゼ部位」は、エンドヌクレアーゼタンパク質によって認識及び切断されることができるポリヌクレオチド内のヌクレオチドのストレッチを指す。

50

## 【 0 1 8 8 】

本明細書で使用する場合、「バイシストロン性RNA」は、2つの異なるタンパク質をコードする2つの発現配列を含むポリヌクレオチドを指す。これらの発現配列は、多くの場合、2A部位またはIRES配列などの切断可能なペプチドによって分離される。

## 【 0 1 8 9 】

本明細書で使用する場合、「共製剤化する」という用語は、2つ以上の核酸または核酸及び他の活性薬物を含むナノ粒子製剤を指す。典型的には、比率は、等モルである、または2つ以上の核酸もしくは核酸及び他の活性薬物の比率計測量で定義される。

## 【 0 1 9 0 】

本明細書で使用する場合、「輸送ビヒクル」は、核酸を含む生物学的に活性な作用物質の投与に関連して使用することを一般に意図する標準的な医薬担体、希釈剤、賦形剤などのいずれかを含む。

## 【 0 1 9 1 】

本明細書で使用する場合、「脂質ナノ粒子」という語句は、1つ以上の脂質（例えば、いくつかの実施形態では、カチオン性脂質、非カチオン性脂質、及びPEG修飾脂質）を含む輸送ビヒクルを指す。

## 【 0 1 9 2 】

本明細書で使用する場合、「カチオン性脂質」という語句は、生理学的pHなどの選択されたpHで正味正電荷を持つ多くの脂質種のいずれかを指す。

## 【 0 1 9 3 】

本明細書で使用する場合、「非カチオン性脂質」という語句は、任意の中性、双性イオン性、またはアニオン性脂質を指す。

## 【 0 1 9 4 】

本明細書で使用する場合、「アニオン性脂質」という語句は、生理学的pHなどの選択されたpHで正味負電荷を持つ多くの脂質種のいずれかを指す。

## 【 0 1 9 5 】

本明細書で使用する場合、「イオン化可能脂質」という語句は、生理学的pH4などの選択されたpHで正味正電荷を持ち、生理学的pH7などの他のpHで中性電荷を持つ多くの脂質種のいずれかを指す。

## 【 0 1 9 6 】

「抗体」(Ab)という用語には、限定されないが、抗原と特異的に結合する糖タンパク質免疫グロブリンが含まれる。概して、抗体は、ジスルフィド結合によって相互接続された少なくとも2つの重(H)鎖及び2つの軽(L)鎖、またはその抗原結合分子を含み得る。各H鎖は、重鎖可変領域(本明細書ではVHと略される)及び重鎖定常領域を含み得る。重鎖定常領域は、3つの定常ドメイン、CH1、CH2、及びCH3を含むことができる。各軽鎖は、軽鎖可変領域(本明細書ではVLと略される)及び軽鎖定常領域を含むことができる。軽鎖定常領域は、1つの定常ドメインCLを含むことができる。VH及びVL領域は、フレームワーク領域(FR)と称されるより保存された領域が散在する、相補性決定領域(CDR)と称される超可変性の領域に更に細分され得る。各VH及びVLは、以下の順序:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、及びFR4でアミノ末端からカルボキシ末端に配置された3つのCDR及び4つのFRを含み得る。重鎖及び軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含む。Abの定常領域は、免疫系の様々な細胞(例えば、エフェクター細胞)及び古典的補体系の第1の成分を含む、宿主組織または因子への免疫グロブリンの結合を仲介し得る。抗体には、例えば、モノクローナル抗体、組換え産生抗体、単一特異性抗体、多重特異性抗体(二重特異性抗体を含む)、ヒト抗体、操作抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、免疫グロブリン、合成抗体、2つの重鎖分子及び2つの軽鎖分子を含む四量体抗体、抗体軽鎖単量体、抗体重鎖単量体、抗体軽鎖二量体、抗体重鎖二量体、抗体軽鎖-抗体重鎖対、イントラボディ、抗体融合体(本明細書では「抗体複合体」と呼ばれることもある)、ヘテロ複合抗体、単ドメイン抗体、一価抗体、単鎖抗体または単鎖可変フラグメント(scFv)、ラクダ化抗体

10

20

30

40

50

、アフィボディ、Fabフラグメント、F(ab')<sub>2</sub>フラグメント、ジスルフィド結合可変フラグメント(sdFv)、抗イデオタイプ(anti-id)抗体(例えば、抗抗Id抗体を含む)、ミニボディ、ドメイン抗体、合成抗体(本明細書では「抗体模倣物」と呼ばれることもある)、及び上記のいずれかの抗原結合フラグメントが含まれ得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗体は、ポリクローナル抗体集団を指す。

#### 【0197】

免疫グロブリンは、IgA、分泌型IgA、IgG、及びIgMを含むがこれらに限定されない、一般に知られているアイソタイプのいずれかに由来し得る。IgGサブクラスも当業者に周知であり、ヒトIgG1、IgG2、IgG3、及びIgG4を含むがこれらに限定されない。「アイソタイプ」は、重鎖定常領域遺伝子によってコードされるAbクラスまたはサブクラス(例えば、IgMまたはIgG1)を指す。「抗体」という用語は、例として、天然に存在する及び天然に存在しないAbの両方、モノクローナル及びポリクローナルAb、キメラ及びヒト化Ab、ヒトまたは非ヒトAb、完全合成Ab、ならびに一本鎖Abを含む。非ヒトAbは、ヒトにおけるその免疫原性を低減するために、組換え方法によってヒト化され得る。明示的に記載されない場合、及び文脈上別段の指示がない限り、「抗体」という用語は、前述の免疫グロブリンのいずれかの抗原結合フラグメントまたは抗原結合部分も含み、一価及び二価フラグメントまたは部分、ならびに一本鎖Abを含む。

10

#### 【0198】

「抗原結合分子」、「抗原結合部分」、または「抗体フラグメント」は、分子が由来する抗体の抗原結合部分(例えば、CDR)を含む任意の分子を指す。抗原結合分子は、抗原相補性決定領域(CDR)を含み得る。抗体フラグメントの例には、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fvフラグメント、dAb、直鎖状抗体、scFv抗体、及び抗原結合分子から形成される多重特異性抗体が含まれるが、これらに限定されない。ペプチボディ(すなわち、ペプチド結合ドメインを含むFc融合分子)は、好適な抗原結合分子の別の例である。いくつかの実施形態では、抗原結合分子は、腫瘍細胞上の抗原と結合する。いくつかの実施形態では、抗原結合分子は、過剰増殖性疾患に関与する細胞上の抗原、またはウイルスまたは細菌抗原と結合する。いくつかの実施形態では、抗原結合分子は、BCMAと結合する。更なる実施形態では、抗原結合分子は、抗原と特異的に結合する、その相補性決定領域(CDR)の1つ以上を含む抗体フラグメントである。更なる実施形態では、抗原結合分子は、単鎖可変フラグメント(scFv)である。いくつかの実施形態では、抗原結合分子は、アビマーを含むか、またはそれからなる。

20

30

#### 【0199】

本明細書で使用する場合、「可変領域」または「可変ドメイン」という用語は、互換的に使用され、当該技術分野において一般的である。可変領域は、典型的には、抗体の一部、一般に、軽鎖または重鎖の一部、典型的には、成熟重鎖におけるアミノ末端110~120アミノ酸、及び成熟軽鎖における約90~115アミノ酸を指し、これらは、抗体間で配列が大きく異なり、特定の抗体の特定の抗原に対する結合及び特異性に使用される。配列の可変性は、相補性決定領域(CDR)と呼ばれるそれらの領域に集中し、可変ドメイン内のより高度に保存された領域は、フレームワーク領域(FR)と呼ばれる。いかなる特定のメカニズムまたは理論に拘束されることを望まないが、軽鎖及び重鎖のCDRは、抗体と抗原との相互作用及び特異性に主に関与すると考えられる。いくつかの実施形態では、可変領域は、ヒト可変領域である。いくつかの実施形態では、可変領域は、げっ歯類またはマウスCDR及びヒトフレームワーク領域(FR)を含む。特定の実施形態では、可変領域は、霊長類(例えば、非ヒト霊長類)可変領域である。いくつかの実施形態では、可変領域は、げっ歯類またはマウスCDR及び霊長類(例えば、非ヒト霊長類)フレームワーク領域(FR)を含む。

40

#### 【0200】

「VL」及び「VLドメイン」という用語は、抗体またはその抗原結合分子の軽鎖可変領域を指すために互換的に使用される。

50



## 【0201】

「VH」及び「VHドメイン」という用語は、抗体またはその抗原結合分子の重鎖可変領域を指すために互換的に使用される。

## 【0202】

CDRのいくつかの定義は、Kabat番号付け、Chothia番号付け、AbM番号付け、またはコンタクト番号付けで一般に使用される。AbMの定義は、Oxford MolecularのAbM抗体モデリングソフトウェアによって使用される2つの間の中間物である。コンタクトの定義は、利用可能な複合結晶構造の分析に基づく。「Kabat番号付け」という用語及び同様の用語は、当該技術分野において認識されており、抗体またはその抗原結合分子の重鎖及び軽鎖可変領域における番号付けアミノ酸残基のシステムを指す。特定の態様では、抗体のCDRは、Kabat番号付けシステムに従って決定され得る（例えば、Kabat EA & Wu TT (1971) Ann NY Acad Sci 190:382-391及びKabat EA et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services、NIH公開第91-3242号を参照されたい）。Kabat番号付けシステムを使用して、抗体重鎖分子内のCDRは、典型的には、アミノ酸位置31~35に存在し、これは、任意で、35（Kabat番号付けスキームでは35A及び35Bと呼ばれる）（CDR1）、アミノ酸位置50~65（CDR2）、及びアミノ酸位置95~102（CDR3）に続く、1つまたは2つの追加のアミノ酸を含み得る。Kabat番号付けシステムを使用して、抗体軽鎖分子内のCDRは、典型的には、アミノ酸位置24~34（CDR1）、アミノ酸位置50~56（CDR2）、及びアミノ酸位置89~97（CDR3）に存在する。特定の実施形態では、本明細書に記載の抗体のCDRは、Kabat番号付けスキームに従って決定される。ある特定の態様では、抗体のCDRは、Chothia番号付けスキームに従って決定され得、これは、免疫グロブリン構造ループの位置を指す（例えば、Chothia C & Lesk AM, (1987), J Mol Biol 196:901-917、Al-Lazikani B et al, (1997) J Mol Biol 273:927-948、Chothia C et al., (1992) J Mol Biol 227:799-817、Tramontano A et al, (1990) J Mol Biol 215(1):175-82、及び米国特許第7,709,226号を参照されたい）。典型的には、Kabat番号付け規則を使用する場合、Chothia CDR-H1ループは、重鎖アミノ酸26~32、33、または34に存在し、Chothia CDR-H2ループは、重鎖アミノ酸52~56に存在し、Chothia CDR-H3ループは、重鎖アミノ酸95~102に存在し、一方でChothia CDR-L1ループは、軽鎖アミノ酸24~34に存在し、Chothia CDR-L2ループは、軽鎖アミノ酸50~56に存在し、Chothia CDR-L3ループは、軽鎖アミノ酸89~97に存在する。Kabat番号付け規則を使用して番号付けされた場合のChothia CDR-HIループの終了は、ループの長さに応じてH32とH34との間で変化する（これは、Kabat番号付けスキームが挿入をH35A及びH35Bに配置するためであり、35A及び35Bが存在しない場合、ループは32で終了し、35Aのみが存在する場合、ループは33で終了し、35A及び35Bの両方が存在する場合、ループは34で終了する）。特定の実施形態では、本明細書に記載の抗体のCDRは、Chothia番号付けスキームに従って決定される。

## 【0203】

本明細書で使用する場合、「定常領域」及び「定常ドメイン」という用語は、互換的であり、当該技術分野で一般的に理解される意味を有する。定常領域は、抗体部分、例えば、抗原への抗体の結合に直接関与しないが、Fc受容体との相互作用などの様々なエフェクター機能を示し得る、軽鎖及び/または重鎖のカルボキシル末端部分である。免疫グロブリン分子の定常領域は、一般に、免疫グロブリン可変ドメインと比較して、より保存さ

10

20

30

40

50

れたアミノ酸配列を有する。

【0204】

「結合親和性」は、一般に、分子（例えば、抗体）の単一結合部位とその結合パートナー（例えば、抗原）との間の非共有相互作用の合計の強度を指す。別段の指示がない限り、本明細書で使用する場合、「結合親和性」は、結合対のメンバー（例えば、抗体及び抗原）間の1：1の相互作用を反映する固有の結合親和性を指す。そのパートナーYに対する分子Xの親和性は、一般に、解離定数（KDまたはKd）によって表すことができる。親和性は、平衡解離定数（KD）及び平衡会合定数（KAまたはKa）を含むが、これらに限定されない、当該技術分野で即知の多くの方法で測定及び/または表現することができる。KDは $k_{off}/k_{on}$ の商から計算され、KAは $k_{on}/k_{off}$ の商から計算される。k<sub>on</sub>は、例えば、抗原に対する抗体の会合速度定数を指し、k<sub>off</sub>は、例えば、抗原に対する抗体の解離を指す。k<sub>on</sub>及びk<sub>off</sub>は、BIACORE（登録商標）またはKinExAなどの当業者に即知の技術によって決定され得る。

10

【0205】

本明細書で使用する場合、「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が同様の側鎖を有するアミノ酸残基で置き換えられたものである。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーが、当該技術分野で定義されている。これらのファミリーは、塩基性側鎖（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸など）、非荷電極性側鎖（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン、トリプトファン）、非極性側鎖（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン）、ベータ分岐側鎖（例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン）、及び芳香族側鎖（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）を有するアミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、CDR内または抗体またはその抗原結合分子のフレームワーク領域内の1つ以上のアミノ酸残基は、類似の側鎖を有するアミノ酸残基で置き換えられ得る。

20

【0206】

本明細書で使用する場合、「異種配列」という用語は、配列を発現する細胞または生物に天然または天然に存在しない外因性配列を意味する。

【0207】

本明細書で使用する場合、「エピトープ」は、当該技術分野における用語であり、抗体が特異的に結合し得る抗原の局所領域を指す。エピトープは、例えば、ポリペプチドの連続アミノ酸（直鎖状または連続したエピトープ）であり得るか、またはエピトープは、例えば、ポリペプチドまたはポリペプチドの2つ以上の非連続領域（立体構造、非直鎖状、不連続、または非連続エピトープ）から一緒になり得る。いくつかの実施形態では、抗体が結合するエピトープは、例えば、NMR分光法、X線回折結晶学的研究、ELISAアッセイ、質量分析と組み合わせた水素/重水素交換（例えば、液体クロマトグラフィーエレクトロスプレー質量分析）、アレイベースのオリゴペプチド走査アッセイ、及び/または変異誘発マッピング（例えば、部位特異的変異誘発マッピング）によって決定され得る。X線結晶学については、結晶化は、当該技術分野における既知の方法（例えば、Gieger et al., (1994) Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 50 (Pt 4): 339-350、McPherson A (1990) Eur J Biochem 189: 1-23、Chayen NE (1997) Structure 5: 1269-1274、McPherson A (1976) J Biol Chem 251: 6300-6303)のいずれかを使用して達成され得る。抗体：抗原結晶は、周知のX線回折技術を使用して研究することができ、X-PLOR (Yale University, 1992、Molecular Simulations, Inc.によって普及された；例えば、Meth Enzymol (1985) volumes 114 & 115, eds Wyckoff HW et al., 米国特許公開第2004/0014194号)、及びBUSTER (Bricco

30

40

50

gne G (1993) Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 49 (Pt 1): 37 - 60、Bricogne G (1997) Meth Enzymol 276A: 361 - 423, ed Carter CW、Roversi P et al., (2000) Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 56 (Pt 10): 1316 - 1323)などのコンピュータソフトウェアを使用して精製することができる。

【0208】

本明細書で使用する場合、抗原と第1の結合分子、抗体、またはそれらの抗原結合フラグメントとの間の相互作用が、参照結合分子、参照抗体、またはそれらの参照抗原結合フラグメントの抗原と相互作用する能力を遮断、制限、阻害、またはその他の方法で低減する場合、抗原結合分子、抗体、またはそれらの抗原結合フラグメントは、参照抗体またはそれらの参照抗原結合フラグメントと「交差競合」する。交差競合は、完全であり得、例えば、結合分子の抗原との結合は、参照結合分子が抗原に結合する能力を完全に遮断するか、または部分的であり得、例えば、結合分子の抗原との結合は、参照結合分子が抗原に結合する能力を低減させる。いくつかの実施形態では、参照抗原結合分子と交差競合する抗原結合分子は、参照抗原結合分子と同じまたは重複するエピトープと結合する。他の実施形態では、参照抗原結合分子と交差競合する抗原結合分子は、参照抗原結合分子とは異なるエピトープと結合する。多数のタイプの競合結合アッセイは、1つの抗原結合分子が別の抗原結合分子と競合するかどうかを決定するために、例えば、固相直接または間接ラジオイムノアッセイ (RIA)、固相直接または間接酵素免疫測定法 (EIA)、サンドイッチ競争アッセイ (Stahli et al., 1983, Methods in Enzymology 9: 242 - 253)、固相直接ビオチン - アビジン EIA (Kirkland et al., 1986, J. Immunol. 137: 3614 - 3619)、固相直接標識アッセイ、固相直接標識サンドイッチアッセイ (Harlow and Lane, 1988, Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press)、1 - 125 標識を用いた固相直接標識 RIA (Morel et al., 1988, Molec. Immunol. 25: 7 - 15)、固相直接ビオチン - アビジン EIA (Cheung, et al., 1990, Virology 176: 546 - 552)、及び直接標識 RIA (Moldenhauer et al., 1990, Scand. J. Immunol. 32: 77 - 82) を使用することができる。

【0209】

本明細書で使用する場合、「免疫特異的に結合する」、「免疫特異的に認識する」、「特異的に結合する」、及び「特異的に認識する」という用語は、抗体の文脈における類似の用語であり、かかる結合が当業者によって理解されるように、抗原 (例えば、エピトープまたは免疫複合体) と結合する分子を指す。例えば、抗原と特異的に結合する分子は、一般に、例えば、免疫アッセイ、BIA CORE (登録商標)、KinExA 3000 機器 (Sapidyne Instruments, Boise, ID)、または当該技術分野で即知の他のアッセイによって決定されるより低い親和性で、他のペプチドまたはポリペプチドと結合し得る。特定の実施形態では、抗原に特異的に結合する分子は、分子が別の抗原に結合する場合に、KA よりも少なくとも  $2 \log$ 、 $2.5 \log$ 、 $3 \log$ 、 $4 \log$  またはそれ以上である KA で抗原と結合する。

【0210】

本明細書で定義する場合、「抗原」という用語は、抗原結合分子、抗体、またはその抗原結合フラグメントに結合する分子を指す。例えば、抗原は、生物体内で先天的または適応的な免疫応答を引き出すことができる。抗原は、特に、タンパク質、ポリペプチド、多糖類、核酸、脂質などを含む任意の免疫原性物質であり得る。いくつかの実施形態では、抗原は、感染性因子に由来する。

【0211】

「自己」という用語は、物質が後に再導入される同じ個体に由来する任意の物質を指す

。例えば、本明細書に記載の操作自己細胞療法（eACT（商標））方法は、患者からのリンパ球の収集を伴い、次に、例えば、CAR構築物を発現するように操作され、次に、同じ患者に投与される。

【0212】

「同種異系」という用語は、ある個体に由来し、次に、同種の別の個体に導入される任意の物質、例えば、同種異系T細胞移植を指す。

【0213】

本明細書で使用する「サイトカイン」は、1つの細胞によって放出される非抗体タンパク質を指し、第2の細胞と相互作用して、第2の細胞における応答を仲介することができる。本明細書で使用する「サイトカイン」は、細胞間メディエーターとして別の細胞に作用する、ある細胞集団によって放出されるタンパク質を指すことを意味する。サイトカインは、細胞によって内因的に発現され得るか、または対象に投与され得る。サイトカインは、免疫応答を伝播するために、マクロファージ、B細胞、T細胞、好中球、樹状細胞、好酸球、及び肥満細胞を含むがこれらに限定されない、免疫細胞によって放出され得る。サイトカインは、様々な細胞応答を誘導し得る。サイトカインは、恒常性サイトカイン、ケモカイン、炎症促進性サイトカイン、エフェクターサイトカイン、及び急性期タンパク質を含み得る。例えば、インターロイキン（IL）7及びIL-15を含む恒常性サイトカインは、免疫細胞の生存及び増殖を促進し、炎症促進性サイトカインは、炎症反応を促進し得る。恒常性サイトカインの例には、IL-2、IL-4、IL-5、IL-7、IL-10、IL-12p40、IL-12p70、IL-15、及びインターフェロン（IFN）ガンマが含まれるが、これらに限定されない。炎症促進性サイトカインの例にはIL-1a、IL-1b、IL-6、IL-13、IL-17a、IL-23、IL-27、腫瘍壊死因子（TNF）-アルファ、TNF-ベータ、線維芽細胞増殖因子（FGF）2、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、可溶性細胞間接着分子1（sICAM-1）、可溶性血管接着分子1（sVCAM-1）、血管内皮増殖因子（VEGF）、VEGF-C、VEGF-D、及び胎盤増殖因子（PLGF）が含まれるが、これらに限定されない。エフェクターサイトカインの例には、グランザイムA、グランザイムB、可溶性Fasリガンド（sFasL）、TGF-ベータ、IL-35、及びパーフォリンが含まれるが、これらに限定されない。急性期タンパク質の例には、C反応性タンパク質（CRP）及び血清アミロイドA（SAA）が含まれるが、これらに限定されない。

【0214】

本明細書で使用する「リンパ球」という用語には、ナチュラルキラー（NK）細胞、T細胞、またはB細胞が含まれる。NK細胞は、自然免疫系の主要な構成要素である細胞傷害性（細胞傷害性）リンパ球の一種である。NK細胞は、腫瘍及びウイルス感染細胞のアポトーシスを誘発することができる。それらは、標的細胞を殺すために活性化を必要としないため、「ナチュラルキラー」と呼ばれた。T細胞は、細胞仲介性免疫において主要な役割を果たす（抗体の関与はない）。T細胞受容体（TCR）は、T細胞を他のリンパ球型と区別する。免疫系の特殊な器官である胸腺は、T細胞成熟のための主要な部位である。ヘルパーT細胞（例えば、CD4+細胞）、細胞傷害性T細胞（TC、細胞傷害性Tリンパ球、CTL、Tキラー細胞、細胞溶解性T細胞、CD8+T細胞またはキラーT細胞としても知られる）、メモリーT細胞（（i）幹メモリー細胞（TSCM）は、ナイーブ細胞と同様に、CD45RO-、CCR7+、CD45RA+、CD62L+（L-セレクチン）、CD27+、CD28+、及びIL-7Ra+であるが、CD95、IL-2R、CXCR3、LFA-1も大量に発現し、メモリー細胞に特有の多くの機能的属性を示す）、（ii）セントラルメモリー細胞（TCM）は、L-セレクチン及びCCR7を発現し、IL-2を分泌するが、IFN またはIL-4は分泌しない、（iii）しかしながら、エフェクターメモリー細胞（TEM）は、L-セレクチンまたはCCR7を発現しないが、IFN 及びIL-4などのエフェクターサイトカインを産生する）、制御性T細胞（Treg、サブレッサーT細胞、またはCD4+CD25+もしくはCD4+

F o x P 3 + 制御性 T 細胞)、ナチュラルキラー T 細胞 ( N K T )、及びガンマデルタ T 細胞を含む多くの種類の T 細胞が存在する。一方、B 細胞は、体液性免疫において主な役割を果たす ( 抗体関与を伴う )。B 細胞は、抗体を作製し、抗原提示細胞 ( A P C ) として機能し、抗原相互作用によって活性化された後、短命及び長寿の両方で、メモリー B 細胞及び形質細胞に変わることができる。哺乳動物では、未熟な B 細胞は骨髄で形成される。

【 0 2 1 5 】

「遺伝子操作」または「操作」という用語は、コードもしくは非コード領域またはその一部を欠失させること、またはコード領域もしくはその一部を挿入することを含むがこれらに限定されない、細胞のゲノムを修飾する方法を指す。いくつかの実施形態では、修飾される細胞は、患者またはドナーのいずれかから得ることができるリンパ球、例えば T 細胞である。細胞は、細胞のゲノムに組み込まれる、例えば、キメラ抗原受容体 ( C A R ) または T 細胞受容体 ( T C R ) などの外因性構築物を発現するように修飾され得る。

10

【 0 2 1 6 】

「免疫応答」とは、侵入病原体、病原体に感染した細胞もしくは組織、がん細胞もしくは他の異常細胞、または自己免疫もしくは病的炎症の場合は正常なヒト細胞もしくは組織の選択的ターゲティング、結合、損傷、破壊、及び/または脊椎動物の体からの排除をもたらす、免疫系の細胞 ( 例えば、T リンパ球、B リンパ球、ナチュラルキラー ( N K ) 細胞、マクロファージ、好酸球、肥満細胞、樹状細胞、及び好中球 ) とこれらの細胞または肝臓のいずれかによって生成される可溶性分子 ( A b、サイトカイン、及び補体を含む ) の作用を指す。

20

【 0 2 1 7 】

本明細書で使用する「配列同一性」という用語は、比較ウィンドウにわたって配列がヌクレオチド毎またはアミノ酸毎に同一である程度を指す。ゆえに、「配列同一性のパーセンテージ」は、2 つの最適に整列された配列を比較ウィンドウにわたって比較し、一致する位置の数を得るために両配列において同一の核酸塩基 ( 例えば、A、T、C、G、U ) または同一アミノ酸残基 ( 例えば、A l a、P r o、S e r、T h r、G l y、V a l、L e u、I l e、P h e、T y r、T r p、L y s、A r g、H i s、A s p、G l u、A s n、G l n、C y s 及び M e t ) が存在する位置の数を決定し、一致する位置の数を比較ウィンドウ内の位置の総数 ( すなわち、ウィンドウサイズ ) で割り、その結果に 1 0 0 を掛けることにより算出され得て、配列同一性のパーセンテージが得られる。本明細書に記載の参照配列のいずれかに対して、少なくとも約 5 0 %、5 5 %、6 0 %、6 5 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % 配列同一性を有するヌクレオチド及びポリペプチドが含まれ、典型的にはポリペプチドの場合、ポリペプチドバリエーションは、参照配列によってコードされるポリペプチドの少なくとも 1 つの生物学的活性を維持する。

30

【 0 2 1 8 】

本明細書で使用する場合、「アジュバント」は、抗原の免疫原性を調節する薬物または物質を指す。

【 0 2 1 9 】

本明細書で使用する場合、「ワクチン」は、生物、例えば、動物生物、例えば、哺乳類生物 ( 例えば、ヒト ) における免疫を刺激する、誘発する、引き起こす、または改善する組成物、例えば、物質または調製物を指す。いくつかの実施形態では、ワクチンは、予防的及び/または治療的免疫を含む、生物における 1 つ以上の疾患または障害に対する免疫を提供する。いくつかの実施形態では、ワクチンは、例えば、抗原成分の組み合わせを含む、疾患を引き起こす微生物の生きた形態、減衰した形態、修飾された形態、弱められた形態、または死滅した形態またはそれに由来するから抗原から作製することができる。いくつかの実施形態では、ワクチンは、いかなる疾患または障害を誘発することなく、生物における免疫を刺激する、誘発する、引き起こす、または改善するか、または生物における免疫応答を引き起こす、もしくは模倣する。いくつかの実施形態では、ワクチンは、対

40

50

象の組織、細胞外空間または細胞に導入された後に免疫応答を引き出す。いくつかの実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは、抗原をコードし得、ポリヌクレオチドが細胞内で発現されると、発現された抗原は、所望の免疫応答を引き出す。

#### 【0220】

ベクター、前駆体RNA、及び環状RNA

特定の態様では、スプライシング後3'グループイントロンフラグメント、任意で第1のスペーサー、配列内リボソーム進入部位(IRES)、発現配列、任意で第2のスペーサー、及びスプライシング後5'グループイントロンフラグメントを含む環状RNAポリヌクレオチドが、本明細書で提供される。いくつかの実施形態では、これらの領域は、この順序である。いくつかの実施形態では、環状RNAは、本明細書で提供される方法によって、または本明細書で提供されるベクターから作製される。

#### 【0221】

特定の実施形態では、本明細書に提供されるベクター(例えば、5'二重鎖形成領域、3'グループイントロンフラグメント、任意の第1のスペーサー、配列内リボソーム進入部位(IRES)、第1の発現配列、切断部位をコードするポリヌクレオチド配列、第2の発現配列、任意の第2のスペーサー、5'グループイントロンフラグメント、及び3'二重鎖形成領域を含む)の転写は、環状化することができる前駆直鎖状RNAポリヌクレオチドの形成をもたらす。いくつかの実施形態では、この前駆体直鎖状RNAポリヌクレオチドは、グアノシンヌクレオチドまたはヌクレオシド(例えば、GTP)及び二価カチオン(例えば、Mg<sup>2+</sup>)の存在下でインキュベートされる場合に環状化する。

#### 【0222】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるベクター及び前駆体RNAポリヌクレオチドは、第1の(5')二重鎖形成領域及び第2の(3')二重鎖形成領域を含む。特定の実施形態では、第1及び第2の二重鎖形成領域は、完全または不完全な二重鎖を形成し得る。ゆえに、特定の実施形態では、第1及び第2の二重鎖形成領域の少なくとも75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%が、互いに塩基対形成し得る。いくつかの実施形態では、二重鎖形成領域は、RNA内の意図しない配列(例えば、非二重鎖形成領域配列)と50%未満(例えば、45%未満、40%未満、35%未満、30%未満、25%未満)の塩基対形成を有すると予測される。かかる二重鎖形成領域を前駆体RNA鎖の端に含み、グループイントロンフラグメントに隣接するまたは非常に近接するいくつかの実施形態では、グループイントロンフラグメントを互いに近接させ、スプライシング効率を増加させる。いくつかの実施形態では、二重鎖形成領域は、3~100ヌクレオチドの長さ(例えば、3~75ヌクレオチドの長さ、3~50ヌクレオチドの長さ、20~50ヌクレオチドの長さ、35~50ヌクレオチドの長さ、5~25ヌクレオチドの長さ、9~19ヌクレオチドの長さ)である。いくつかの実施形態では、二重鎖形成領域は、約3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、または50ヌクレオチドの長さである。いくつかの実施形態では、二重鎖形成領域は、約9~約50ヌクレオチドの長さを有する。一実施形態では、二重鎖形成領域は、約9~約19ヌクレオチドの長さを有する。いくつかの実施形態では、二重鎖形成領域は、約20~約40ヌクレオチドの長さを有する。特定の実施形態では、二重鎖形成領域は、約30ヌクレオチドの長さを有する。

#### 【0223】

特定の実施形態では、本明細書で提供されるベクター、前駆体RNA、及び環状RNAは、第1の(5')及び/または第2の(3')スペーサーを含む。いくつかの実施形態では、3'グループイントロンフラグメントとIRESとの間にスペーサーを含むことは、それらが相互作用するのを防ぎ、ゆえにスプライシング効率を増加させることによって、それらの領域における二次構造を保存し得る。いくつかの実施形態では、第1の(3')

グループイントロンフラグメントとIRESとの間)及び第2の(発現配列と5'グループイントロンフラグメントとの間)スペーサーは、互いに塩基対形成し、第1及び第2の二重鎖形成領域に対してではないと予測される追加の塩基対形成領域を含む。いくつかの実施形態では、かかるスペーサー塩基対形成は、グループイントロンフラグメントを互いに近接させ、スプライシング効率を更に増加させる。加えて、いくつかの実施形態では、第1と第2の二重鎖形成領域との間の塩基対形成、及び別個に、第1と第2のスペーサーとの間の塩基対形成の組み合わせは、塩基対形成の隣接領域に接するグループイントロンフラグメントを含有するスプライシングバブルの形成を促進する。典型的なスペーサーは、以下の質：1)近位構造、例えば、IRES、発現配列、またはイントロンの干渉を回避すると予測される；2)少なくとも7nt長であり、100nt以下である；3)3'イントロンフラグメントの後及びこれに近接している及び/または5'イントロンフラグメントの前及びこれに近接している位置にある；ならびに4)以下：a)少なくとも5nt長の非構造化領域、b)別のスペーサーを含む遠位配列に少なくとも5nt長の塩基対形成の領域、及びc)スペーサーの配列に範囲が限定された少なくとも7nt長の構造化領域のうちの一つ以上を含有する、のうちの一つ以上を伴う連続した配列である。スペーサーは、非構造化領域、塩基対形成領域、ヘアピン/構造化領域、及びその組み合わせを含む、いくつかの領域を有し得る。ある実施形態では、スペーサーは、高いGC含量を伴う構造化領域を有する。ある実施形態では、スペーサー塩基内の領域は、同じスペーサー内の別の領域と対を形成する。ある実施形態では、スペーサー塩基内の領域は、別のスペーサー内の領域と対を形成する。ある実施形態では、スペーサーは、1つ以上のヘアピン構造を含む。ある実施形態では、スペーサーは、4~12ヌクレオチドのステム及び2~10ヌクレオチドのループを伴う1つ以上のヘアピン構造を含む。ある実施形態では、3'グループイントロンフラグメントとIRESとの間に追加のスペーサーが存在する。ある実施形態では、この追加のスペーサーは、IRESの構造化領域が3'グループイントロンフラグメントの折り畳みに干渉することを防止する、またはこれが生じる程度を低下させる。いくつかの実施形態では、5'スペーサー配列は、少なくとも7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、または30ヌクレオチドの長さである。いくつかの実施形態では、5'スペーサー配列は、100、90、80、70、60、50、45、40、35、または30ヌクレオチド以下の長さである。いくつかの実施形態では、5'スペーサー配列は、5~50、10~50、20~50、20~40、及び/または25~35のヌクレオチドの長さである。特定の実施形態では、5'スペーサー配列は、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、または50ヌクレオチドの長さである。一実施形態では、5'スペーサー配列は、ポリA配列である。別の実施形態では、5'スペーサー配列は、ポリAC配列である。一実施形態では、スペーサーは、約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%ポリAC含量を含む。一実施形態では、スペーサーは、約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%ポリピリミジン(C/TまたはC/U)含量を含む。

#### 【0224】

特定の実施形態では、3'グループイントロンフラグメントは、3'スプライス部位ジヌクレオチド及び任意で少なくとも1ntの長さ(例えば、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、または30ntの長さ)及び最大でエクソンの長さの隣接するエクソン配列を含む天然グループイントロンの3'近位フラグメントに対して少なくとも75%相同(例えば、少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%相同)である連続配列である。典型的には、5'グループイントロンフラグメントは、5'スプライス部位ジヌクレオチド及び任意で少なくとも1ntの長さ(例えば、少なくとも

2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、または30 ntの長さ)及び最大でエクソンの長さの隣接するエクソン配列を含む天然グループイントロンの5'近位フラグメントに対して少なくとも75%相同(例えば、少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%相同)である連続配列である。Umekage et al. (2012)によって記載されるように、3'グループイントロンフラグメント及び5'グループイントロンフラグメントの外部部分は、環状化において除去され、本明細書で提供される環状RNAは、少なくとも1 ntの長さの任意のエクソン配列によって形成される3'グループイントロンフラグメント及び少なくとも1 ntの長さの任意のエクソン配列によって形成される5'グループイントロンフラグメントの部分のみを含むようになるが、これはかかる配列が非環状化前駆体RNAに存在する場合である。環状RNAによって保持される3'グループイントロンフラグメントの一部は、本明細書では、「スプライシング後3'グループイントロンフラグメント」と称する。環状RNAによって保持される5'グループイントロンフラグメントの一部は、本明細書では、「スプライシング後5'グループイントロンフラグメント」と称する。

10

#### 【0225】

特定の実施形態では、本明細書で提供されるベクター、前駆体RNA及び環状RNAは、配列内リボソーム進入部位(IRES)を含む。IRESを含めることにより、環状RNAからの1つ以上のオープンリーディングフレーム(例えば、発現配列を形成するオープンリーディングフレーム)の翻訳が可能になる。IRESエレメントは、真核生物のリボソーム翻訳開始複合体を引き付け、翻訳開始を促進する。例えば、Kaufman et al., *Nuc. Acids Res.* (1991) 19: 4485 - 4490; Gurtu et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* (1996) 229: 295 - 298、Rees et al., *BioTechniques* (1996) 20: 102 - 110、Kobayashi et al., *BioTechniques* (1996) 21: 399 - 402、及びMosser et al., *BioTechniques* 1997 22 150 - 161を参照されたい。

20

#### 【0226】

多数のIRES配列が利用可能であり、多種多様なウイルスに由来する配列、例えば脳筋炎ウイルス(EMCV)UTRなどのピコルナウイルスのリーダー配列(Jang et al., *J. Virol.* (1989) 63: 1651 - 1660)、ポリオリダー配列、A型肝炎ウイルスリーダー、C型肝炎ウイルスIRES、ヒトライノウイルス2型IRES(Dobrikova et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2003) 100(25): 15125 - 15130)、口蹄疫ウイルスからのIRESエレメント(Ramesh et al., *Nucl. Acid Res.* (1996) 24: 2697 - 2700)、ジアルジアウイルスIRES(Garlapati et al., *J. Biol. Chem.* (2004) 279(5): 3389 - 3397)などが含まれる。

30

#### 【0227】

いくつかの実施形態では、IRESは、タウラ症候群ウイルス、トリアトーマウイルス、タイラー脳脊髄炎ウイルス、シミアンウイルス40、Solenopsis invictaウイルス1、Rhopalosiphum padiウイルス、細網内皮症ウイルス、ヒトポリオウイルス1、Plautia stali腸ウイルス、カシミールハチウイルス、ヒトライノウイルス2、Homalodisca coagulataウイルス-1、ヒト免疫不全ウイルス1型、ヒメトビPウイルス、C型肝炎ウイルス、A型肝炎ウイルス、GB型肝炎ウイルス、口蹄疫ウイルス、ヒトエンテロウイルス71、ウマ鼻炎ウイルス、Ectropis obliquaピコルナ様ウイルス、脳筋炎ウイルス、シヨウジョウバエCウイルス、ヒトコクサッキーウイルスB3、アブラナ科トバモウイルス、クリケット麻痺ウイルス、ウシウイルス性下痢ウイルス1、ブラッククイーンセルウイルス、アブラムシ致死麻痺ウイルス、トリ脳脊髄炎ウイルス、急性ミツバチ麻痺ウイルス

40

50



、ハイビスカス退緑斑ウイルス、豚熱ウイルス、ヒトFGF2、ヒトSFTPA1、ヒトAML1/RUNX1、ショウジョウバエアンテナペディア、ヒトAQP4、ヒトATR、ヒトBAG-1、ヒトBCL2、ヒトBiP、ヒトc-IAP1、ヒトc-myc、ヒトeIF4G、マウスNDST4L、ヒトLEF1、マウスHIF1アルファ、ヒトn.myc、マウスGtx、ヒトp27kip1、ヒトPDGF2/c-sis、ヒトp53、ヒトPim-1、マウスRbm3、ショウジョウバエreaper、イヌScamp er、ショウジョウバエUbx、ヒトUNR、マウスUtrA、ヒトVEGF-A、ヒトXIAP、ショウジョウバエhairless、S.cerevisiaeTFIID、S.cerevisiaeYAP1、タバコエッチウイルス、カブクリンクルウイルス、EMCV-A、EMCV-B、EMCV-Bf、EMCV-Cf、EMCVpEC9、ピコビルナウイルス、HCVQC64、ヒトコサウイルスE/D、ヒトコサウイルスF、ヒトコサウイルスJMY、ライノウイルスNAT001、HRV14、HRV89、HRVC-02、HRV-A21、サリウイルスASH1、サリウイルスFHB、サリウイルスNG-J1、ヒトパレコウイルス1、クロヒウイルスB、Yc-3、ロザウイルスM-7、シャンバウイルスA、パシウイルスA、パシウイルスA2、エコーウイルスE14、ヒトパレコウイルス5、アイチウイルス、A型肝炎ウイルスHA16、フォピウイルス、CVA10、エンテロウイルスC、エンテロウイルスD、エンテロウイルスJ、ヒトペギウイルス2、GBV-CGT110、GBV-CK1737、GBV-CIowa、ペギウイルスA1220、パシウイルスA3、サペロウイルス、ロザウイルスB、バクンサウイルス、トレモウイルスA、ブタパシウイルス1、PLV-CHN、パシウイルスA、シシニウイルス、ヘパシウイルスK、ヘパシウイルスA、BVDV1、ボーダー病ウイルス、BVDV2、CSFV-PK15C、SF573ジシストロウイルス、フーペイピコルナ様ウイルス、CRPV、サリウイルスABN5、サリウイルスABN2、サリウイルスA02394、サリウイルスAGUT、サリウイルスACH、サリウイルスASZ1、サリウイルスFHB、CVB3、CVB1、エコーウイルス7、CVB5、EVA71、CVA3、CVA12、EV24、または、eIF4Gに対するアプタマーのIRES配列である。

10

20

## 【0228】

いくつかの実施形態では、本明細書におけるポリヌクレオチドは、1つを超える発現配列を含む。

30

## 【0229】

特定の実施形態では、本明細書で提供されるベクターは、3'UTRを含む。いくつかの実施形態では、3'UTRは、ヒトベータグロビン、ヒトアルファグロビクセノプスベータグロビン、クセノプスアルファグロビン、ヒトプロラクチン、ヒトGAP-43、ヒトeEF1a1、ヒトTau、ヒトTNF、 Dengueウイルス、ハンタウイルス小mRNA、ブニヤウイルス小mRNA、カブ黄色モザイクウイルス、C型肝炎ウイルス、風疹ウイルス、タバコモザイクウイルス、ヒトIL-8、ヒトアクチン、ヒトGAPDH、ヒトチューブリン、ハイビスカス退緑斑ウイルス、ウッドチャック肝炎ウイルス肝炎ウイルス翻訳後制御エレメント、シンドビスウイルス、カブクリンクルウイルス、タバコエッチングウイルス、またはベネズエラウマ脳炎ウイルスに由来する。

40

## 【0230】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるベクターは、5'UTRを含む。いくつかの実施形態では、5'UTRは、ヒトベータグロビン、アフリカツメガエルベータグロビン、ヒトアルファグロビン、アフリカツメガエルアルファグロビン、ルベラウイルス、タバコモザイクウイルス、マウスGtx、 Dengueウイルス、熱ショックタンパク質70kDaタンパク質1A、タバコアルコールデヒドロゲナーゼ、タバコエッチングウイルス、カブクリンクルウイルス、またはアデノウイルス三者リーダーに由来する。

## 【0231】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるベクターは、ポリA領域を含む。いくつかの実施形態では、ポリA領域は、少なくとも12ヌクレオチド長、少なくとも30ヌ

50

クレオチド長、または少なくとも60ヌクレオチド長である。

【0232】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるDNA（例えば、ベクター）、直鎖状RNA（例えば、前駆体RNA）、及び/または環状RNAポリヌクレオチドは、300～15000、300～14000、300～13000、300～12000、300～11000、300～10000、400～9000、500～8000、600～7000、700～6000、800～5000、900～5000、1000～5000、1100～5000、1200～5000、1300～5000、1400～5000、及び/または1500～5000ヌクレオチドの長さである。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、少なくとも300nt、400nt、500nt、600nt、700nt、800nt、900nt、1000nt、1100nt、1200nt、1300nt、1400nt、1500nt、2000nt、2500nt、3000nt、3500nt、4000nt、4500nt、5000nt、6000nt、7000nt、8000nt、9000nt、10000nt、11000nt、12000nt、13000nt、14000nt、または15000ntの長さである。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、3000nt、3500nt、4000nt、4500nt、5000nt、6000nt、7000nt、8000nt、9000nt、10000nt、11000nt、12000nt、13000nt、14000nt、15000nt、または16000nt以下の長さである。いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるDNA、直鎖状RNA、及び/または環状RNAポリヌクレオチドの長さは、約300nt、400nt、500nt、600nt、700nt、800nt、900nt、1000nt、1100nt、1200nt、1300nt、1400nt、1500nt、2000nt、2500nt、3000nt、3500nt、4000nt、4500nt、5000nt、6000nt、7000nt、8000nt、9000nt、10000nt、11000nt、12000nt、13000nt、14000nt、または15000ntである。

【0233】

いくつかの実施形態では、ベクターが、本明細書で提供される。特定の実施形態では、ベクターは、以下の順序で、a) 5'二重鎖形成領域、b) 3'グループイントロンフラグメント、c) 任意の第1のスペーサー配列、d) IRES、e) 第1の発現配列、f) 切断部位をコードするポリヌクレオチド配列、g) 第2の発現配列、h) 任意の第2のスペーサー配列、i) 5'グループイントロンフラグメント、及びj) 3'二重鎖形成領域を含む。いくつかの実施形態では、ベクターは、5'二重鎖形成領域の上流に転写プロモーターを含む。

【0234】

いくつかの実施形態では、ベクターが、本明細書で提供される。特定の実施形態では、ベクターは、以下の順序で、a) 5'二重鎖形成領域、b) 3'グループイントロンフラグメント、c) 任意の第1のスペーサー配列、d) 第1のIRES、e) 第1の発現配列、f) 第2のIRES、g) 第2の発現配列、h) 任意の第2のスペーサー配列、i) 5'グループイントロンフラグメント、及びj) 3'二重鎖形成領域を含む。いくつかの実施形態では、ベクターは、5'二重鎖形成領域の上流に転写プロモーターを含む。

【0235】

いくつかの実施形態では、前駆体RNAが、本明細書で提供される。特定の実施形態では、前駆体RNAは、本明細書で提供されるベクターのインビトロ転写によって産生される直鎖状RNAである。いくつかの実施形態では、前駆体RNAは、以下の順序で、a) 任意の5'二重鎖形成領域、b) 3'グループイントロンフラグメント、c) 任意の第1のスペーサー配列、d) IRES、e) 第1の発現配列、f) 切断部位をコードするポリヌクレオチド配列、g) 第2の発現配列、h) 任意の第2のスペーサー配列、i) 5'グループイントロンフラグメント、及びj) 任意の3'二重鎖形成領域を含む。いくつかの実施形態では、前駆体RNAは、以下の順序で、a) 5'二重鎖形成領域、b) 3'グル

ープイントロンフラグメント、c) 任意の第1のスペーサー配列、d) 第1のIRES、e) 第1の発現配列、f) 第2のIRES、g) 第2の発現配列、h) 任意の第2のスペーサー配列、i) 5'グループイントロンフラグメント、及びj) 3'二重鎖形成領域を含む。前駆体RNAは、未修飾である、部分的に修飾される、または完全に修飾されることができる。

#### 【0236】

特定の実施形態では、環状RNAが、本明細書で提供される。特定の実施形態では、環状RNAは、本明細書で提供されるベクターによって産生される環状RNAである。いくつかの実施形態では、環状RNAは、本明細書で提供される前駆体RNAの環状化によって産生される環状RNAである。いくつかの実施形態では、環状RNAは、以下の配列で、a) 第1のスペーサー配列、b) IRES、c) 第1の発現配列、d) 切断部位をコードするポリヌクレオチド配列、e) 第2の発現配列、及びf) 任意の第2のスペーサー配列を含む。いくつかの実施形態では、環状RNAは、以下の配列で、a) スプライシング後3'グループイントロンフラグメント、b) 第1のスペーサー配列、c) IRES、d) 第1の発現配列、e) 切断部位をコードするポリヌクレオチド配列、f) 第2の発現配列、及びg) 第2のスペーサー配列、h) スプライシング後5'グループイントロンフラグメントを含む。いくつかの実施形態では、環状RNAは、以下の配列で、a) 第1のスペーサー配列、b) 第1のIRES、c) 第1の発現配列、d) 第2のIRES、e) 第2の発現配列、及びf) 任意の第2のスペーサー配列を含む。いくつかの実施形態では、環状RNAは、3'スプライス部位の3'である3'グループイントロンフラグメントの部分を更に含む。いくつかの実施形態では、環状RNAは、5'スプライス部位の5'である5'グループイントロンフラグメントの部分を更に含む。いくつかの実施形態では、環状RNAは、少なくとも500、600、700、800、900、1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500、5000、6000、7000、8000、9000、10000、11000、12000、13000、14000、または15000ヌクレオチドのサイズである。環状RNAは、未修飾である、部分的に修飾される、または完全に修飾されることができる。

#### 【0237】

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

#### 【0238】

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

#### 【0239】

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

期を有する。

【0240】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される環状RNAは、同等の直鎖状mRNAよりも高い程度の発現、例えば、細胞へのRNAの投与24時間後により高い程度の発現を有し得る。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される環状RNAは、同じ発現配列、5' m<sup>o</sup>U修飾、最適化UTR、キャップ、及び/またはポリAテールを含むmRNAよりも高い程度の発現を有する。

【0241】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される環状RNAは、生物の免疫系またはある特定のタイプの免疫細胞に曝露された場合、同等のmRNAよりも免疫原性が低くあり得る。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される環状RNAは、生物の免疫系またはある特定のタイプの免疫細胞に曝露された場合、サイトカインの産生の調節に関連している。例えば、いくつかの実施形態では、本明細書で提供される環状RNAは、生物の免疫系またはある特定のタイプの免疫細胞に曝露された場合、同じ発現配列を含むmRNAと比較して、TNF、RIG-I、IL-2、IL-6、IFN、及び/または1型インターフェロン、例えば、IFN-1の産生の低下に関連している。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される環状RNAは、生物の免疫系またはある特定のタイプの免疫細胞に曝露された場合、同じ発現配列を含むmRNAと比較して、より少ないTNF、RIG-I、IL-2、IL-6、IFN、及び/または1型インターフェロン、例えば、IFN-1の転写産物誘導に関連している。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される環状RNAは、同じ発現配列を含むmRNAよりも免疫原性が低い。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される環状RNAは、同じ発現配列、5' m<sup>o</sup>U修飾、最適化UTR、キャップ、及び/またはポリAテールを含むmRNAよりも免疫原性が低い。

【0242】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の組成物及び方法は、ヌクレオシド修飾を必要とせずに、同等の直鎖状RNAよりも高い安定性または機能的安定性を有するRNA（例えば、circRNA）を提供する。いくつかの実施形態では、ヌクレオシド修飾を欠くRNAを産生する方法は、不稔転写の減少に起因するRNA含有ヌクレオシド修飾を産生する方法よりも高い割合の全長転写物を産生する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の組成物及び方法は、ヌクレオシド修飾を含むRNAに関連する不稔転写を追加することなく、大きな（例えば、5 kb ~ 15 kb、6 kb ~ 15 kb、7 kb ~ 15 kb、8 kb ~ 15 kb、9 kb ~ 15 kb、10 kb ~ 15 kb、11 kb ~ 15 kb、12 kb ~ 15 kb、13 kb ~ 15 kb、14 kb ~ 15 kb、5 kb ~ 10 kb、6 kb ~ 10 kb、7 kb ~ 10 kb、8 kb ~ 10 kb、9 kb ~ 10 kb、5 kb、6 kb、7 kb、8 kb、9 kb、10 kb、11 kb、12 kb、13 kb、14 kb、または15 kb）RNA構築物を産生することができる。

【0243】

特定の実施形態では、本明細書で提供される環状RNAは、そのまま細胞へとトランスフェクトすることができる、またはDNAベクターの形でトランスフェクトされて細胞内で転写されることができる。トランスフェクトされたDNAベクターからの環状RNAの転写は、追加のポリメラーゼまたは細胞にトランスフェクトされた核酸によってコードされるポリメラーゼを介する、または好ましくは内因性ポリメラーゼを介することができる。

【0244】

特定の実施形態では、本明細書で提供される環状RNAポリヌクレオチドは、修飾RNAヌクレオチド及び/または修飾ヌクレオシドを含む。いくつかの実施形態では、修飾ヌクレオチドは、m<sup>5</sup>C（5-メチルシチジン）である。別の実施形態では、修飾ヌクレオチドは、m<sup>5</sup>U（5-メチルウリジン）である。別の実施形態では、修飾ヌクレオチドは、m<sup>6</sup>A（N<sup>6</sup>-メチルアデノシン）である。別の実施形態では、修飾ヌクレオチドは、

$s^2 U$  (2 - チオウリジン) である。別の実施形態では、修飾ヌクレオシドは、(シュードウリジン) である。別の実施形態では、修飾ヌクレオシドは、 $U m$  (2 - O - メチルウリジン) である。他の実施形態では、修飾ヌクレオシドは、 $m^1 A$  (1 - メチルアデノシン);  $m^2 A$  (2 - メチルアデノシン);  $A m$  (2' - O - メチルアデノシン);  $m s^2 m^6 A$  (2 - メチルチオ -  $N^6$  - メチルアデノシン);  $i^6 A$  ( $N^6$  - イソペンテニルアデノシン);  $m s^2 i^6 A$  (2 - メチルチオ -  $N^6$  - イソペンテニルアデノシン);  $i o^6 A$  ( $N^6$  - (cis - ヒドロキシイソペンテニル) アデノシン);  $m s^2 i o^6 A$  (2 - メチルチオ -  $N^6$  - (cis - ヒドロキシイソペンテニル) アデノシン);  $g^6 A$  ( $N^6$  - グリシニルカルバモイルアデノシン);  $t^6 A$  ( $N^6$  - トレオニルカルバモイルアデノシン);  $m s^2 t^6 A$  (2 - メチルチオ -  $N^6$  - トレオニルカルバモイルアデノシン);  $m^6 t^6 A$  ( $N^6$  - メチル -  $N^6$  - トレオニルカルバモイルアデノシン);  $h n^6 A$  ( $N^6$  - ヒドロキシノルバリルカルバモイルアデノシン);  $m s^2 h n^6 A$  (2 - メチルチオ -  $N^6$  - ヒドロキシノルバリルカルバモイルアデノシン);  $A r(p)$  (2' - O - リボシルアデノシン (ホスフェート));  $I$  (イノシン);  $m^1 I$  (1 - メチルイノシン);  $m^1 I m$  (1, 2' - O - ジメチルイノシン);  $m^3 C$  (3 - メチルシチジン);  $C m$  (2' - O - メチルシチジン);  $s^2 C$  (2 - チオシチジン);  $a c^4 C$  ( $N^4$  - アセチルシチジン);  $f^5 C$  (5 - ホルミルシチジン);  $m^5 C m$  (5, 2 - O - ジメチルシチジン);  $a c^4 C m$  ( $N^4$  - アセチル - 2' - O - メチルシチジン);  $k^2 C$  (リシジン);  $m^1 G$  (1 - メチルグアノシン);  $m^2 G$  ( $N^2$  - メチルグアノシン);  $m^7 G$  (7 - メチルグアノシン);  $G m$  (2 - O - メチルグアノシン);  $m^2_2 G$  ( $N^2$ ,  $N^2$  - ジメチルグアノシン);  $m^2 G m$  ( $N^2$ , 2' - O - ジメチルグアノシン);  $m^2_2 G m$  ( $N^2$ ,  $N^2$ , 2' - O - トリメチルグアノシン);  $G r(p)$  (2' - O - リボシルグアノシン (ホスフェート));  $y W$  (ワイプトシン);  $o_2 y W$  (ペルオキシワイプトシン);  $O H y W$  (ヒドロキシワイプトシン);  $O H y W^*$  (未修飾ヒドロキシワイプトシン);  $i m G$  (ワイオシン);  $m i m G$  (メチルワイオシン);  $Q$  (ケウオシン);  $o Q$  (エポキシケウオシン);  $g a l Q$  (ガラクトシル - ケウオシン);  $m a n Q$  (マンノシル - ケウオシン);  $p r e Q_0$  (7 - シアノ - 7 - デアザグアノシン);  $p r e Q_1$  (7 - アミノメチル - 7 - デアザグアノシン);  $G^+$  (アルカエオシン);  $D$  (ジヒドロウリジン);  $m^5 U m$  (5, 2' - O - ジメチルウリジン);  $s^4 U$  (4 - チオウリジン);  $m^5 s^2 U$  (5 - メチル - 2 - チオウリジン);  $s^2 U m$  (2 - チオ - 2' - O - メチルウリジン);  $a c p^3 U$  (3 - (3 - アミノ - 3 - カルボキシプロピル) ウリジン);  $h o^5 U$  (5 - ヒドロキシウリジン);  $m o^5 U$  (5 - メトキシウリジン);  $c m o^5 U$  (ウリジン 5 - オキシ酢酸);  $m c m o^5 U$  (ウリジン 5 - オキシ酢酸メチルエステル);  $c h m^5 U$  (5 - (カルボキシヒドロキシメチル) ウリジン);  $m c h m^5 U$  (5 - (カルボキシヒドロキシメチル) ウリジンメチルエステル);  $m c m^5 U$  (5 - メトキシカルボニルメチルウリジン);  $m c m^5 U m$  (5 - メトキシカルボニルメチル - 2' - O - メチルウリジン);  $m c m^5 s^2 U$  (5 - メトキシカルボニルメチル - 2 - チオウリジン);  $n m^5 s^2 U$  (5 - アミノメチル - 2 - チオウリジン);  $m n m^5 U$  (5 - メチルアミノメチルウリジン);  $m n m^5 s^2 U$  (5 - メチルアミノメチル - 2 - チオウリジン);  $m n m^5 s e^2 U$  (5 - メチルアミノメチル - 2 - セレノウリジン);  $n c m^5 U$  (5 - カルバモイルメチルウリジン);  $n c m^5 U m$  (5 - カルバモイルメチル - 2 - O - メチルウリジン);  $c m n m^5 U$  (5 - カルボキシメチルアミノメチルウリジン);  $c m n m^5 U m$  (5 - カルボキシメチルアミノメチル - 2 - O - メチルウリジン);  $c m n m^5 s^2 U$  (5 - カルボキシメチルアミノメチル - 2 - チオウリジン);  $m^6_2 A$  ( $N^6$ ,  $N^6$  - ジメチルアデノシン);  $I m$  (2' - O - メチルイノシン);  $m^4 C$  ( $N^4$  - メチルシチジン);  $m^4 C m$  ( $N^4$ , 2' - O - ジメチルシチジン);  $h n^5 C$  (5 - ヒドロキシメチルシチジン);  $m^3 U$  (3 - メチルウリジン);  $c m^5 U$  (5 - カルボキシメチルウリジン);  $m^6 A m$  ( $N^6$ , 2' - O - ジメチルアデノシン);  $m^6_2 A m$  ( $N^6$ ,  $N^6$ , O - 2' - トリメチルアデノシン);  $m^7_7 G$  ( $N^2$ , 7 - ジメチルグアノシン);  $m^2_2_7 G$  ( $N^2$ ,  $N^2$ , 7 - トリメチルグアノシン);  $m^3 U m$  (3, 2' - O - ジ

メチルウリジン) ;  $m^5 D$  (5 - メチルジヒドロウリジン) ;  $f^5 C m$  (5 - ホルミル - 2' - O - メチルシチジン) ;  $m^1 G m$  (1, 2' - O - ジメチルグアノシン) ;  $m^1 A m$  (1, 2' - O - ジメチルアデノシン) ;  $m^b U$  (5 - タウリノメチルウリジン) ;  $m^5 s^2 U$  (5 - タウリノメチル - 2 - チオウリジン) ;  $i m G - 14$  (4 - デメチルワイオシン) ;  $i m G 2$  (イソワイオシン) ; または  $a c^6 A$  ( $N^6$  - アセチルアデノシン) である。

【0245】

いくつかの実施形態では、修飾ヌクレオシドには、ピリジン - 4 - オンリボヌクレオシド、5 - アザ - ウリジン、2 - チオ - 5 - アザ - ウリジン、2 - チオウリジン、4 - チオ - シュードウリジン、2 - チオ - シュードウリジン、5 - ヒドロキシウリジン、3 - メチルウリジン、5 - カルボキシメチル - ウリジン、1 - カルボキシメチル - シュードウリジン、5 - プロピニル - ウリジン、1 - プロピニル - シュードウリジン、5 - タウリノメチルウリジン、1 - タウリノメチル - シュードウリジン、5 - タウリノメチル - 2 - チオ - ウリジン、1 - タウリノメチル - 4 - チオ - ウリジン、5 - メチル - ウリジン、1 - メチル - シュードウリジン、4 - チオ - 1 - メチル - シュードウリジン、2 - チオ - 1 - メチル - シュードウリジン、1 - メチル - 1 - デアザ - シュードウリジン、2 - チオ - 1 - メチル - 1 - デアザ - シュードウリジン、ジヒドロウリジン、ジヒドロシュードウリジン、2 - チオ - ジヒドロウリジン、2 - チオ - ジヒドロシュードウリジン、2 - メトキシウリジン、2 - メトキシ - 4 - チオ - ウリジン、4 - メトキシ - シュードウリジン、4 - メトキシ - 2 - チオ - シュードウリジン、5 - アザ - シチジン、シュードイソシチジン、3 - メチル - シチジン、 $N^4$  - アセチルシチジン、5 - ホルミルシチジン、 $N^4$  - メチルシチジン、5 - ヒドロキシメチルシチジン、1 - メチル - シュードイソシチジン、ピロロ - シチジン、ピロロ - シュードイソシチジン、2 - チオ - シチジン、2 - チオ - 5 - メチル - シチジン、4 - チオ - シュードイソシチジン、4 - チオ - 1 - メチル - シュードイソシチジン、4 - チオ - 1 - メチル - 1 - デアザ - シュードイソシチジン、1 - メチル - 1 - デアザ - シュードイソシチジン、ゼブラリン、5 - アザ - ゼブラリン、5 - メチル - ゼブラリン、5 - アザ - 2 - チオ - ゼブラリン、2 - チオ - ゼブラリン、2 - メトキシ - シチジン、2 - メトキシ - 5 - メチル - シチジン、4 - メトキシ - シュードイソシチジン、4 - メトキシ - 1 - メチル - シュードイソシチジン、2 - アミノプリン、2, 6 - ジアミノプリン、7 - デアザ - アデニン、7 - デアザ - 8 - アザ - アデニン、7 - デアザ - 2 - アミノプリン、7 - デアザ - 8 - アザ - 2 - アミノプリン、7 - デアザ - 2, 6 - ジアミノプリン、7 - デアザ - 8 - アザ - 2, 6 - ジアミノプリン、1 - メチルアデノシン、 $N^6$  - メチルアデノシン、 $N^6$  - イソペンテニルアデノシン、 $N^6$  - (*cis* - ヒドロキシイソペンテニル) アデノシン、2 - メチルチオ -  $N^6$  - (*cis* - ヒドロキシイソペンテニル) アデノシン、 $N^6$  - グリシニルカルバモイルアデノシン、 $N^6$  - トレオニルカルバモイルアデノシン、2 - メチルチオ -  $N^6$  - トレオニルカルバモイルアデノシン、 $N^6$ ,  $N^6$  - ジメチルアデノシン、7 - メチルアデニン、2 - メチルチオ - アデニン、2 - メトキシ - アデニン、イノシン、1 - メチル - イノシン、ワイオシン、ワイプトシン、7 - デアザ - グアノシン、7 - デアザ - 8 - アザ - グアノシン、6 - チオ - グアノシン、6 - チオ - 7 - デアザ - グアノシン、6 - チオ - 7 - デアザ - 8 - アザ - グアノシン、7 - メチル - グアノシン、6 - チオ - 7 - メチル - グアノシン、7 - メチルイノシン、6 - メトキシ - グアノシン、1 - メチルグアノシン、 $N^2$  - メチルグアノシン、 $N^2$ ,  $N^2$  - ジメチルグアノシン、8 - オキソ - グアノシン、7 - メチル - 8 - オキソ - グアノシン、1 - メチル - 6 - チオ - グアノシン、 $N^2$  - メチル - 6 - チオ - グアノシン、及び  $N^2$ ,  $N^2$  - ジメチル - 6 - チオ - グアノシンの群から選択される化合物が含まれ得る。別の実施形態では、修飾は、5 - メチルシトシン、シュードウリジン及び1 - メチルシュードウリジンからなる群から独立して選択される。

【0246】

いくつかの実施形態では、修飾リボヌクレオシドは、5 - メチルシチジン、5 - メトキシウリジン、1 - メチル - シュードウリジン、 $N^6$  - メチルアデノシン、及び/またはシ

10

20

30

40

50

コードウリジンを含む。いくつかの実施形態では、かかる修飾ヌクレオチドは、更なる安定性及び免疫活性化に対する耐性を提供する。

【0247】

特定の実施形態では、ポリヌクレオチドは、コドン最適化され得る。コドン最適化配列は、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドのコドンが、ポリペプチドの発現、安定性及び/または活性を増加させるために、置換されている配列であり得る。コドン最適化に影響を与える因子には、(i) 2つ以上の生物もしくは遺伝子または合成的に構築されたバイアステーブル間のコドンバイアスの変動、(ii) 生物、遺伝子、または遺伝子のセット内のコドンバイアスの程度の変動、(iii) 状況を含むコドンの系統の変動、(iv) それらのデコードtRNAに従ったコドンの変動、(v) トリプレットの全体的または1つの位置のいずれかで、GC%に従ったコドンの変動、(vi) 例えば天然に存在する配列のような参照配列に対する類似度の変動、(vii) コドン頻度カットオフの変動、(viii) DNA配列から転写されたmRNAの構造特性、(ix) コドン置換セットの設計に基づくDNA配列の機能に関する事前知識、及び/または(x) 各アミノ酸のコドンセットの系統の変動のうち1つ以上が含まれるが、これに限定されない。いくつかの実施形態では、コドン最適化ポリヌクレオチドは、リボザイム衝突を最小化し得る及び/または発現配列とIRESとの間の構造的干渉を制限し得る。

10

【0248】

特定の実施形態では、本明細書で提供される環状RNAは、細胞の内側で産生される。いくつかの実施形態では、前駆体RNAは、バクテリオファージRNAポリメラーゼによって細胞質中で、または宿主RNAポリメラーゼIIによって核内で、DNAテンプレートを使用して(例えば、いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるベクターを使用して)転写され、次に環状化される。

20

【0249】

特定の実施形態では、本明細書で提供される環状RNAは、環状RNA分子によってコードされるポリペプチドが動物の内側で発現されるように、動物(例えば、ヒト)に注射される。

【0250】

ペイロード

本発明の環状RNAワクチンは、1つ以上の野生型または操作されたタンパク質、ペプチド、またはポリペプチド(例えば、抗原、アジュバント、またはアジュバント様タンパク質)をコードする、1つ以上の環状RNAポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、1つ以上の環状RNAポリヌクレオチドは、感染性因子に由来する抗原またはアジュバントをコードする。いくつかの実施形態では、抗原またはアジュバントが由来または遺伝子操作される感染性因子には、ウイルス、細菌、真菌、原虫、及び/または寄生虫が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、抗原は、ウイルス抗原である。ある実施形態では、抗原は、SARS-CoV-2抗原である。ある実施形態では、抗原は、SARS-CoV-2スパイクタンパク質である。

30

【0251】

いくつかの実施形態では、環状RNAポリヌクレオチドは、1つを超える発現配列を含む。いくつかの実施形態では、発現配列は、1つを超える抗原性ポリペプチドをコードし得る。いくつかの実施形態では、1つ以上のRNAポリヌクレオチドの発現配列は、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、または10個の抗原性ポリペプチドをコードする。いくつかの実施形態では、1つ以上のRNAポリヌクレオチドの発現配列は、少なくとも10、15、20、または50個の抗原性ポリペプチドをコードする。いくつかの実施形態では、1つ以上のRNAポリヌクレオチドの発現配列は、2~10、10~15、15~20、20~50、50~100、または100~200個の抗原性ポリペプチドをコードする。

40

【0252】

ある実施形態では、抗原は、ロタウイルス、口蹄疫ウイルス、インフルエンザAウイルス

50

ス、インフルエンザBウイルス、インフルエンザCウイルス、H1N1、H2N2、H3N2、H5N1、H7N7、H1N2、H9N2、H7N2、H7N3、H10N7、ヒトパラインフルエンザ2型、単純ヘルペスウイルス、エプスタイン-バーウイルス、水痘ウイルス、ブタヘルペスウイルス1、サイトメガロウイルス、リッサウイルス、炭疽菌、炭疽菌PA及び誘導体、ポリオウイルス、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、E型肝炎、ジステンパーウイルス、ベネズエラウマ脳脊髄炎、ネコ白血病ウイルス、レオウイルス、呼吸器合胞体呼吸ウイルス、ラッサ熱ウイルス、ポリオマ腫瘍ウイルス、イヌパルボウイルス、乳頭腫ウイルス、ダニ媒介性脳炎ウイルス、牛疫ウイルス、ヒトライノウイルス種、エンテロウイルス種、メンゴウイルス、パラミクソウイルス、トリ伝染性気管支炎ウイルス、ヒトT細胞白血病リンパ腫ウイルス1、ヒト免疫不全ウイルス1、ヒト免疫不全ウイルス2、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス、パルボウイルスB19、アデノウイルス、風疹ウイルス、黄熱ウイルス、デングウイルス、ウシ呼吸器合胞体ウイルス、コロナウイルス、*Bordetella pertussis*、*Bordetella bronchiseptica*、*Bordetella parapertussis*、*Brucella abortus*、*Brucella melitensis*、*Brucella suis*、*Brucella ovis*、*Brucella*種、*Escherichia coli*、*Salmonella*種、*Salmonella typhi*、*Streptococci*、*Vibrio cholera*、*Vibrio parahaemolyticus*、*Shigella*、*Pseudomonas*、結核、*avium*、*Bacille Calmette Guerin*、*Mycobacterium leprae*、*Pneumococci*、*Staphylococci*、*Enterobacter*種、*Rochalimaimia henselae*、*Pasteurella haemolytica*、*Pasteurella multocida*、*Chlamydia trachomatis*、*Chlamydia psittaci*、*Lymphogranuloma venereum*、*Treponema pallidum*、*Haemophilus*種、*Mycoplasma bovis*、*Mycoplasma genitalium*、*Mycoplasma pulmonis*、*Mycoplasma*種、*Borrelia burgdorferi*、*Legionella pneumophila*、*Colstridium botulinum*、*Corynebacterium diphtheriae*、*Yersinia enterocolitica*、*Rickettsia rickettsii*、*Rickettsia typhi*、*Rickettsia prowasekii*、*Ehrlichia chaffeensis*、*Anaplasma phagocytophilum*、*Plasmodium falciparum*、*Plasmodium vivax*、*Plasmodium malariae*、*Schistosoma*s、トリパノソーマ、*Leishmania*種、*Filarial nematodes*、トリコモナス症、肉胞子虫症、*Taenia saginata*、*Taenia solium*、*Leishmania*、*Toxoplasma gondii*、*Trichinella spiralis*、コクシジウム症、*Eimeria tenella*、*Cryptococcus neoformans*、*Candida albicans*、*Aspergillus fumigatus*、コクシジオイデス症、*Neisseria gonorrhoeae*、マラリア原虫スポロゾイト表面タンパク質、マラリアメロゾイトタンパク質、トリパノソーマ表面抗原タンパク質、百日咳、アルファウイルス属、アデノウイルス、ジフテリアトキソイド、破傷風トキソイド、髄膜炎菌(*meningococcal*)外膜タンパク質、連鎖球菌(*streptococcal*)Mタンパク質、インフルエンザ赤血球凝集素、がん抗原、腫瘍抗原、毒素、ウェルシュ菌(*clostridium perfringens*)毒素、リシン毒素、シュードモナス(*pseudomonas*)外毒素、外毒素、神経毒、サイトカイン、サイトカイン受容体、モノカイン、モノカイン受容体、植物花粉、動物の鱗屑、及びイエダニ、からなる群から選択されるか、またはそれらに由来する。

【0253】



いくつかの実施形態では、アジュバントは、BCSP31、MOMP、FomA、MymA、ESAT6、PorB、PVL、Porin、OmpA、PepO、OmpU、ルマジン合成酵素、Omp16、Omp19、CobT、RpfE、Rv0652、HBHA、NhhA、DnaJ、ニューモリシン、ファルジェリン、IFN-、IFN-、IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21、GM-CSF、IL-1b、IL-6、TNF-a、IL-7、IL-17、IL-1、抗CTLA4、抗PD1、抗41BB、PD-L1、Tim-3、Lag-3、TIGIT、GITR、及びandti-CD3からなる群から選択されるか、またはそれらに由来する。

#### 【0254】

免疫原性ベクター及びRNA調製物

いくつかの実施形態では、本発明の環状RNAワクチンは、細胞における免疫応答を引き起こすことができる1つ以上の環状RNAポリヌクレオチドまたは直鎖状RNAポリヌクレオチド対応物を含む。非免疫原性環状RNAポリヌクレオチドの修飾または操作は、アジュバント様の特性を可能にすることができる(Wesselhoef, 2019)。同様に、直鎖状RNAポリヌクレオチドを操作して、操作されていない直鎖状RNAポリヌクレオチドよりも増加した免疫応答を引き起こすことができる。直鎖状RNAポリヌクレオチドに対する増加した免疫原性の例には、様々なキャッピング戦略が含まれる(Pardi, 2018)。キャッピング戦略には、インビボ転写反応にヌクレオチドリン酸を添加することによって末端5'末端に一リン酸化または三リン酸化を組み込むことが含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、RNA調製物中の三リン酸化：一リン酸化5'末端キャップの比率を変化させることは、インビボでの転写中のGMP：GTP比を変化させることに基づいて制御され得る。他の実施形態では、酵素(例えば、RppH)は、RNA調製物中の三リン酸化：一リン酸化5'末端キャップの比率を制御するために使用され得る。任意のRNA調製物における一リン酸化：三リン酸化の比率は、好ましい免疫原性レベルに基づいて、100:1、90:10、80:20、70:30、60:40、50:50、40:60、30:70、20:80、10:90、100:1であり得る。三リン酸化：一リン酸化比の比率が高いほど、より大きな免疫応答活性化が可能になる。

#### 【0255】

いくつかの実施形態では、一リン酸または三リン酸包含キャップは、RNAポリヌクレオチドの開発中に開始剤分子を提供することに基づく合成方法を使用して生成され得る。いくつかの実施形態では、インビボ転写によって産生されるRNA分子の5'末端における三リン酸の数は、インビボ転写反応に特定のヌクレオチド及び/またはヌクレオシドを含めることによって制御され得る。これらのヌクレオチドは、次いで、新たなRNA鎖のための開始剤ヌクレオチド/ヌクレオシドとして様々な効率で使用される。同じ実施形態では、RNAポリメラーゼ酵素(例えば、T7 RNAポリメラーゼ)は、利用可能な基質から開始剤ヌクレオチド/ヌクレオシドを確率的に選択する能力を有する。いくつかの実施形態では、複数の異なる開始剤ヌクレオシド/ヌクレオチド(例えば、GTP及びGMP)を合成に含むことにより、5'一リン酸塩を有するいくつかのRNA分子及び5'三リン酸塩を有するいくつかのRNA分子が得られる。使用される開始剤ヌクレオチド/ヌクレオシドの比率及び特定のヌクレオチド/ヌクレオシドの組み込み速度は、特定の5'末端同一性を有するRNA分子の割合を決定する。一リン酸5'末端を有するRNA分子を生成するための好ましい実施形態では、GMPは、GTPの開始濃度の1倍以上、最も好ましくは4倍でT7 RNAポリメラーゼにインビボ転写反応に添加される。いくつかの実施形態では、代替の開始剤分子は、例えば、アデノシンヌクレオチド/ヌクレオシドを、特に代替のRNAポリメラーゼ酵素を使用する場合に使用され得る。

#### 【0256】

別の実施形態では、一リン酸または三リン酸包含キャップの方法は、スプライシング方法を含み得る。グアノシンヌクレオチド/ヌクレオシドは、グループイントロン及び順序置換グループイントロスプライシング中に、5'スプライス部位の第2のスプライ

10

20

30

40

50

ス部位ジヌクレオチドの前に組み込まれ得る。このヌクレオチド/ヌクレオシドは、5'位にゼロ以上のリン酸基を含むことができる。複数の異なるヌクレオシド/ヌクレオチド（例えば、GTP及びGMP）を含むことにより、5'-リン酸を有するいくつかのイントロン生成物、及び5'-三リン酸を有するいくつかのイントロン生成物が得られる。使用されるヌクレオチド/ヌクレオシドの比率及びグループイントロンによる特定のヌクレオチド/ヌクレオシドの利用率は、特定の5'末端同一性を有するRNA分子の割合を決定する。好ましい実施形態では、使用されるヌクレオシド/ヌクレオチドの比率は、前駆体分子のインビトロ転写に使用されるものと同じであり、スプライシングは、共転写的に生じる。この比率は、独立して、インビトロ転写反応から前駆体RNA分子を精製し、所望の比率のヌクレオシド/ヌクレオチドとともにスプライシングに必要な補助因子を添加することによって制御され得る。グループイントロンは、一般に、補助因子としてグアノシンヌクレオチド/ヌクレオシドのみを受け入れるが、アデノシンヌクレオチド/ヌクレオシドなどの他のヌクレオチド/ヌクレオシドを受け入れることがある。

#### 【0257】

別の実施形態では、一リン酸または三リン酸包含キャップは、酵素法を使用して生成され得る。三リン酸末端は、酵素処理によって一リン酸またはヒドロキシル末端に変換され得る。RNA 5'ピロホスホヒドロラーゼ（RppH）またはタバコ酸ピロホスファターゼ（TAP）による三リン酸化RNA分子の処理は、三リン酸化末端を一リン酸化末端に変換し、これは次いで、T4 RNAリガーゼIなどのリガーゼ酵素によるライゲーションに使用することができ、RIG-Iを引き起こさない。他のホスファターゼ酵素、例えば、カーフ腸管ホスファターゼ（CIP/CIAP）、エピアルカリホスファターゼ（SAP）などは、末端リン酸塩を除去し、それによって末端一リン酸塩、二リン酸塩、または三リン酸塩を末端ヒドロキシル基に変換する。次いで、末端ヒドロキシル基は、T4ポリヌクレオチドキナーゼ（PNK）などのキナーゼ酵素を使用して、一リン酸基に変換することができる。

#### 【0258】

いくつかの実施形態では、RNA調製物は、様々な割合で異なる構造またはRNAポリヌクレオチドの製剤を使用することによって、より免疫刺激的に作製することができる。別の実施形態では、RNA調製物は、非免疫刺激性環状RNAポリヌクレオチドと、5'末端キャップまたは免疫刺激性修飾環状RNAポリヌクレオチドを含有する直鎖状RNAポリヌクレオチドとの両方を含有し得る。特定の実施形態では、RNA調製物は、免疫応答を刺激するのに役立つ直鎖状RNAポリヌクレオチドまたは免疫刺激修飾環状RNAとともに、アジュバント、抗原、またはアジュバント様タンパク質をコードする環状RNAポリヌクレオチドを含有する。

#### 【0259】

追加の標的及び組み合わせ

いくつかの実施形態では、1つ以上のペプチドをコードする1つ以上のポリヌクレオチドを含む環状RNAワクチンを投与することによって、対象における微生物感染症（例えば、細菌感染症もしくはウイルス感染症）及び/または微生物感染症もしくはウイルス感染症に関連する疾患、障害もしくは病態、またはその症状を治療または予防するための方法が、提供される。投与は、本明細書に記載の抗菌剤、例えば、抗菌剤、抗菌ポリペプチド、または小分子抗菌化合物と組み合わせてもよい。抗菌剤には、抗菌剤、抗ウイルス剤、抗真菌剤、抗原虫剤、抗寄生虫剤、及び抗プリオン剤が含まれ得るが、これらに限定されない。

#### 【0260】

細菌性感染症に関連する病態

本発明の環状RNAワクチンを使用して治療され得る細菌性感染症に関連し得る疾患、障害、または病態としては、膿瘍、放線菌症、急性前立腺炎、アエロモナス細菌、一年生ライグラス中毒、炭疽病、桿菌性紫斑症、菌血症、細菌性胃腸炎、細菌性髄膜炎、細菌性肺炎、細菌性膣炎、細菌関連皮膚状態、バルトネラ症、BCG-oma、ブドウ菌腫、ボ

ツリヌス中毒症、ブラジル紫斑熱、プロディ膿瘍、ブルセラ症、ブルーリ潰瘍、カンピロバクター感染症、カリエス、カリオン病、ネコひっかき病、蜂巣炎、クラミジア感染症、コレラ、慢性細菌性前立腺炎、慢性再発性多巣性骨髄炎、クロストリジウム壊死性腸炎、歯周-歯内病変 (combined periodontic-endodontic lesions)、牛肺疫、ジフテリア、ジフテリア性口内炎、エーリキア症、丹毒、喉頭蓋炎 (piglotitis)、丹毒、Fitz-Hugh-Curtis 症候群、ノミ媒介性斑点熱、腐蹄症 (感染性足皮膚炎)、Garre 硬化性骨髄炎、淋病、鼠径部肉芽腫、ヒト顆粒球性アナプラズマ症、ヒト単球向性エーリキア症、百日咳 (hundred days' cough)、膿痂疹、後期先天性梅毒性眼病、レジオネラ症、レミエール症候群、ライ病 (ハンセン病)、レプトスピラ症、リステリア症、ライム病、リンパ節炎、類鼻疽、髄膜炎菌性疾患、髄膜炎菌性髄膜炎 (meningococcal septicæmia)、メチシリン耐性 *Staphylococcus aureus* (MRSA) 感染症、*Mycobacterium avium-intracellulare* (MAI)、マイコプラズマ肺炎、壊死性筋膜炎、ノカルジア症、水がん (nomma) (水がん (cancrum oris) または壊疽性口内炎)、臍炎、眼窩蜂巣炎、骨髄炎、脾臓摘出後重症感染症 (OPSI)、ヒツジブルセラ症、パストレルラ病、眼窩周囲蜂窩織炎、百日咳 (pertussis) (百日咳 (whooping cough))、ペスト、肺炎球菌性肺炎、ポット病、直腸炎、シュドモナス感染症、オウム病、膿血症、化膿性筋炎、Q熱、回帰熱 (腸チフス)、リウマチ熱、ロッキー山紅斑熱 (RMSF)、リケッチア症、サルモネラ症、猩紅熱、敗血症、セラチア感染症、細菌性赤痢、南部ダニ紅斑病 (southern tick-associated rash illness)、ブドウ球菌性熱傷様皮膚症候群、連鎖球菌咽頭炎、プール肉芽腫、ブタブルセラ症、梅毒、梅毒性大動脈炎、破傷風、毒素性ショック症候群 (TSS)、トラコーマ、塹壕熱、熱帯性潰瘍、結核、野兎病、腸チフス (typhoid fever)、発疹チフス、泌尿生殖器結核、尿路感染症、バンコマイシン耐性 *Staphylococcus aureus* 感染症、Waterhouse-Friderichsen 症候群、偽性結核 (エルシニア) 症、及びエルシニア症のうちの一つ以上が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0261】

##### 細菌性病原体

本明細書に記載の細菌は、グラム陽性細菌またはグラム陰性細菌であり得る。細菌病原体としては、*Acinetobacter baumannii*、*Bacillus anthracis*、*Bacillus subtilis*、*Bordetella pertussis*、*Borrelia burgdorferi*、*Brucella abortus*、*Brucella canis*、*Brucella melitensis*、*Brucella suis*、*Campylobacter jejuni*、*Chlamydia pneumoniae*、*Chlamydia trachomatis*、*Chlamydia psittaci*、*Clostridium botulinum*、*Clostridium difficile*、*Clostridium perfringens*、*Clostridium tetani*、コアグラールゼ陰性 *Staphylococcus*、*Corynebacterium* ジフテリア、*Enterococcus faecalis*、*Enterococcus faecium*、*Escherichia coli*、腸管毒素原性 *Escherichia coli* (ETEC)、病原性 *E. coli*、*E. coli* 0157:H7、*Enterobacter* sp.、*Francisella tularensis*、*Haemophilus influenzae*、*Helicobacter pylori*、*Klebsiella pneumoniae*、*Legionella pneumophila*、*Leptospira interrogans*、*Listeria monocytogenes*、*Moraxella catarrhalis*、*Mycobacterium leprae*、*Mycobacterium tuberculosis*、*Mycoplasma*

pneumoniae、Neisseria gonorrhoeae、Neisseria meningitides、Preteus mirabilis、Proteus spp.、Pseudomonas aeruginosa、Rickettsia rickettsii、Salmonella typhi、Salmonella typhimurium、Serratia marcescens、Shigella flexneri、Shigella sonnei、Staphylococcus aureus、Staphylococcus epidermidis、Staphylococcus saprophyticus、Streptococcus agalactiae、Streptococcus mutans、Streptococcus pneumoniae、Streptococcus pyogenes、Trep  
 onema pallidum、Vibrio cholerae、及びYersinia pestisが挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0262】

細菌性病原体には、耐性細菌感染症を引き起こす細菌、例えば、クリンダマイシン耐性Clostridium difficile、フルオロキノロン耐性Clostridium difficile、メチシリン耐性Staphylococcus aureus (MRSA)、多剤耐性Enterococcus faecalis、多剤耐性Enterococcus faecium、多剤耐性Pseudomonas aeruginosa、多剤耐性Acinetobacter baumannii、及びバンコマイシン耐性Staphylococcus aureus (VRSA) も含まれ得る。

#### 【0263】

##### 抗生物質の組み合わせ

いくつかの実施形態では、本発明の環状RNAワクチン、例えば、本発明の1つ以上の抗原をコードするポリヌクレオチドを含む環状RNAワクチンは、1つ以上の抗菌剤と併せて投与され得る。

#### 【0264】

##### 抗菌剤

抗菌剤としては、アミノグリコシド（例えば、アミカシン (AMIKIN (登録商標))、ゲンタマイシン (GARAMYCIN (登録商標))、カナマイシン (KANTREX (登録商標))、ネオマイシン (MYCIFRADIN (登録商標))、ネチルマイシン (NETROMYCIN (登録商標))、トブラマイシン (NEBCIN (登録商標))、パロモマイシン (HUMATIN (登録商標))、アンサマイシン（例えば、ゲルダナマイシン、ハービマイシン）、カルバセフェム（例えば、ロラカルベフ (LORABID (登録商標))、カルバペネム（例えば、エルタベネム (INVANZ (登録商標))、ドリペネム (DORIBAX (登録商標))、イミペネム/シラスタチン (PRIMAXIN (登録商標))、メロペネム (MERREM (登録商標))、セファロスポリン（第1世代）（例えば、セファドロキシル (DURICEF (登録商標))、セファゾリン (ANCEF (登録商標))、セファロチンまたはセファロチン (KEFLIN (登録商標))、セファレキシン (KEFLEX (登録商標))、セファロスポリン（第2世代）（例えば、セファクロル (CECLOR (登録商標))、セファマンドール (MANDOL (登録商標))、セフォキシチン (MEFOXIN (登録商標))、セフプロジル (CEFZIL (登録商標))、セフロキシム (CEFTIN (登録商標))、ZINNAT (登録商標))、セファロスポリン（第3世代）（例えば、セフィキシム (SUPRAX (登録商標))、セフジニル (OMNICEF (登録商標))、CEFDIEL (登録商標))、セフジトレン (SPECTRACEF (登録商標))、セフォペラゾン (CEFOBID (登録商標))、セフォタキシム (CLAFORAN (登録商標))、セフポドキシム (VANTIN (登録商標))、セフタジジム (FORTAZ (登録商標))、セフチブテン (CEDAX (登録商標))、セフチゾキシム (CEFIZOX (登録商標))、セフトリアキソン (ROCEPHIN (登録商標))、セファロスポリン（第4世代）（例えば、セフェピム (MAXIPIME (登録商標))、セファロスポリン（第

5 世代) (例えば、セフトピブロール (Z E F T E R A (登録商標))、糖ペプチド (例えば、テイコプラニン (T A R G O C I D (登録商標))、バンコマイシン (V A N C O C I N (登録商標))、テラバンシン (V I B A T I V (登録商標))、リンコサミド (例えば、クリンダマイシン (C L E O C I N (登録商標))、リンコマイシン (L I N C O C I N (登録商標))、リボペプチド (例えば、ダプトマイシン (C U B I C I N (登録商標))、マクロライド (例えば、アジスロマイシン (Z I T H R O M A X (登録商標)、S U M A M E D (登録商標)、Z I T R O C I N (登録商標))、クラリスロマイシン (B I A X I N (登録商標))、ジリスロマイシン (D Y N A B A C (登録商標))、エリスロマイシン (E R Y T H O C I N (登録商標)、E R Y T H R O P E D (登録商標))、ロキシスロマイシン、トロレアンドマイシン (T A O (登録商標))、テ  
10  
リスロマイシン (K E T E K (登録商標))、スペクチノマイシン (T R O B I C I N (登録商標))、モノバクタム (例えば、アズトレオナム (A Z A C T A M (登録商標))、ニトロフラン (例えば、フラゾリドン (F U R O X O N E (登録商標))、ニトロフアントイン (M A C R O D A N T I N (登録商標)、M A C R O B I D (登録商標))、ペニシリン (例えば、アモキシシリン (N O V A M O X (登録商標)、A M O X I L (登録商標))、アンピシリン (P R I N C I P E N (登録商標))、アズロシリン、カルベニシリン (G E O C I L L I N (登録商標))、クロキサシリン (T E G O P E N (登録商標))、ジクロキサシリン (D Y N A P E N (登録商標))、フルクロキサシリン (F L O X A P E N (登録商標))、メズロシリン (M E Z L I N (登録商標))、メチ  
20  
シリン (S T A P H C I L L I N (登録商標))、ナフシリン (U N I P E N (登録商標))、オキサシリン (P R O S T A P H L I N (登録商標))、ペニシリン G (P E N T I D S (登録商標))、ペニシリン V (P E N - V E E - K (登録商標))、ピペラシリン (P I P R A C I L (登録商標))、テモシリン (N E G A B A N (登録商標))、チカルシリン (T I C A R (登録商標))、ペニシリンの組み合わせ (例えば、アモキシシリン/クラブラネート (A U G M E N T I N (登録商標))、アンピシリン/スルバクタム (U N A S Y N (登録商標))、ピペラシリン/タゾバクタム (Z O S Y N (登録商標))、チカルシリン/クラブラネート (T I M E N T I N (登録商標))、ポリペプチド (例えば、バシトラシン、コリスチン (C O L Y - M Y C I N - S (登録商標))、ポリミキシシン B、キノロン (例えば、シプロフロキサシン (C I P R O (登録商標)、C I P R O X I N (登録商標)、C I P R O B A Y (登録商標))、エノキサシン (P E  
30  
N E T R E X (登録商標))、ガチフロキサシン (T E Q U I N (登録商標))、レボフロキサシン (L E V A Q U I N (登録商標))、ロメフロキサシン (M A X A Q U I N (登録商標))、モキシフロキサシン (A V E L O X (登録商標))、ナリジクス酸 (N E G G R A M (登録商標))、ノルフロキサシン (N O R O X I N (登録商標))、オフロキサシン (F L O X I N (登録商標)、O C U F L O X (登録商標))、トロバフロキサシン (T R O V A N (登録商標))、グレパフロキサシン (R A X A R (登録商標))、スパルフロキサシン (Z A G A M (登録商標))、テマフロキサシン (O M N I F L O X (登録商標))、スルホンアミド (例えば、マフェニド (S U L F A M Y L O N (登録商標))、スルホンアミドクリソイジン (P R O N T O S I L (登録商標))、スルファセタミド (S U L A M Y D (登録商標)、B L E P H - 1 0 (登録商標))、スルファジ  
40  
アジン (M I C R O - S U L F O N (登録商標))、スルファジアジン銀 (S I L V A D E N E (登録商標))、スルファメチゾール (T H I O S U L F I L F O R T E (登録商標))、スルファメトキサゾール (G A N T A N O L (登録商標))、スルファニルイミド、スルファサラジン (A Z U L F I D I N E (登録商標))、スルフィソキサゾール (G A N T R I S I N (登録商標))、トリメトプリム (P R O L O P R E V I (登録商標))、T R I M P E X (登録商標))、トリメトプリム - スルファメトキサゾール (c o - トリモキサゾール) (T M P - S M X) (B A C T R I M (登録商標)、S E P T R A (登録商標))、テトラサイクリン (例えば、デメクロサイクリン (D E C L O M Y C I N (登録商標))、ドキシサイクリン (V I B R A M Y C I N (登録商標))、ミノサイクリン (M I N O C I N (登録商標))、オキシテトラサイクリン (T E R R A M Y  
50

C I N (登録商標)、テトラサイクリン (SUMYCIN (登録商標)、ACHROMYCIN (登録商標) V、STECLIN (登録商標))、マイコバクテリアに対する薬物 (例えば、クロファジミン (LAMPRENE (登録商標))、ダブソン (AVLOSULFON (登録商標))、カプレオマイシン (CAPASTAT (登録商標))、サイクロセリン (SEROMYCIN (登録商標))、エタンブトール (MYAMBUTOL (登録商標))、エチオナミド (TRECATOR (登録商標))、イソニアジド (I.N.H. (登録商標))、ピラジニアミド (ALDINAMIDE (登録商標))、リファンピン (RIFADIN (登録商標)、RIMACTANE (登録商標))、リファブチン (MYCOBUTIN (登録商標))、リファペンチン (PRIFTIN (登録商標))、ストレプトマイシン)、及びその他 (例えば、アルスフェナミン (SALVARSAN (登録商標))、クロラムフェニコール (CHLOROMYCETIN (登録商標))、ホスホマイシン (MONUROL (登録商標))、フシジン酸 (FUCIDIN (登録商標))、リネゾリド (ZYVOX (登録商標))、メトロニダゾール (FLAGYL (登録商標))、ムピロシン (BACTROBAN (登録商標))、プラテンシマイシン、キヌプリスチン/ダルホプリスチン (SYNERCID (登録商標))、リファキシミン (XIFAXAN (登録商標))、チアンフェニコール、チゲサイクリン (TIGACYL (登録商標))、チニダゾール (TINDAMAX (登録商標))、FASIGYN (登録商標)) が挙げられるが、これらに限定されない。

10

#### 【0265】

ウイルス感染症に関連する病態

20

いくつかの実施形態では、抗ウイルスポリペプチド、例えば、本明細書に記載の抗ウイルスポリペプチドをコードする1つ以上のポリヌクレオチドを含む環状RNAワクチンを投与することによって、対象におけるウイルス感染症、及び/またはウイルス感染に関連する疾患、障害、もしくは病態、またはその症状を治療または予防する方法が、提供される。いくつかの実施形態では、環状RNAワクチンは、抗ウイルス剤、例えば、本明細書に記載の抗ウイルスポリペプチドまたは小分子抗ウイルス剤と組み合わせて投与される。

#### 【0266】

本発明の環状RNAワクチンを使用して治療され得るウイルス感染症に関連する疾患、障害、または病態としては、急性熱性咽頭炎、咽頭結膜熱、流行性角結膜炎、幼児胃腸炎、Coxsackie感染症、伝染性単核球症、パーキットリンパ腫、急性肝炎、慢性肝炎、肝硬変、肝細胞癌、一次HSV-1感染症 (例えば、小児の歯肉口内炎、成人の扁桃炎及び咽頭炎、角結膜炎)、潜伏性HSV-1感染症 (例えば、口唇ヘルペス及びヘルペス)、一次HSV-2感染症、潜伏性HSV-2感染症、無菌性髄膜炎、伝染性単核球症、細胞性封入体病、カポジ肉腫、多中心性キャスルマン病、原発性滲出液リンパ腫、AIDS、インフルエンザ、ライ症候群、麻疹、感染後脳脊髄炎、ムンプス、過形成性上皮病変 (例えば、尋常性疣贅、扁平疣贅、足底疣贅、及び肛門性器疣贅、喉頭乳頭腫、疣贅状表皮発育異常症)、子宮頸癌、扁平上皮細胞癌、クループ、肺炎、気管支炎、感冒、ポリオ、狂犬病、気管支炎、肺炎、インフルエンザ様症候群、肺炎を伴う重症気管支炎、風疹、先天性風疹、水痘、带状疱疹、及びSARS-CoV-2が挙げられるが、これらに限定されない。

30

40

#### 【0267】

ウイルス病原体

ウイルス感染症薬剤の例には、感染性因子は、アデノウイルス；単純ヘルペス1型；単純ヘルペス2型；脳炎ウイルス、パピローマウイルス、水痘-带状疱疹ウイルス；エプスタインバーウイルス；ヒトサイトメガロウイルス；ヒトヘルペスウイルス8型；ヒトパピローマウイルス；BKウイルス；JCウイルス；天然痘；ポリオウイルス；B型肝炎ウイルス；ヒトボカウイルス；パルボウイルスB19；ヒトアストロウイルス；ノーウォークウイルス；コクサッキーウイルス；A型肝炎ウイルス；ポリオウイルス；ライノウイルス；重症急性呼吸器症候群ウイルス；C型肝炎ウイルス；黄熱ウイルス；デングウイルス；西ナイルウイルス；風疹ウイルス；E型肝炎ウイルス；ヒト免疫不全ウイルス (HIV)

50

；インフルエンザウイルス A 型、B 型；ガナリトウイルス；フニンウイルス；ラッサウイルス；マチュポウイルス；サビアウイルス；クリミア・コンゴ出血熱ウイルス；エボラウイルス；マールブルグウイルス；麻疹ウイルス；ムンプスウイルス；パラインフルエンザウイルス；呼吸器合胞体ウイルス；ヒトメタニューモウイルス；ヘンドラウイルス；ニパウイルス；狂犬病ウイルス；D 型肝炎；ロタウイルス；オルビウイルス；コルチウイルス；ハンタウイルス；中東呼吸器コロナウイルス；チクングンヤ熱ウイルス；バナウイルス；または S A R S - C o V - 2 が含まれるが、これらに限定されない。ウイルス病原体はまた、抗ウイルス抵抗性感染症を引き起こすウイルスを含み得る。

#### 【 0 2 6 8 】

#### 抗ウイルス剤

例示的な抗ウイルス剤としては、アバカビル（Z I A G E N（登録商標））、アバカビル/ラミブジン/ジドブジン（トリジビル（登録商標））、アシクロビルまたはアシクロビル（C Y C L O V I R（登録商標）、H E R P E X（登録商標）、A C I V I R（登録商標）、A C I V I R A X（登録商標）、Z O V I R A X（登録商標）、Z O V I R（登録商標））、アデフォビル（P r e v e o n（登録商標）、H e p s e r a（登録商標））、アマンタジン（S Y M M E T R E L（登録商標））、アンプレナビル（A G E N E R A S E（登録商標））、アンブレゲン、アルビドール、アタザナビル（R E Y A T A Z（登録商標））、ボセプレビル、シドフォビル、ダルナビル（P R E Z I S T A（登録商標））、デラビルジン（R E S C R I P T O R（登録商標））、ジダノシン（V I D E X（登録商標））、ドコサノール（A B R E V A（登録商標））、エドキスジン、エファビレンツ（S U S T I N A（登録商標）、S T O C R I N（登録商標））、エムトリシタピン（E M T R I V A（登録商標））、エムトリシタピン/テノフォビル/エファビレンツ（A T R I P L A（登録商標））、エンフィルチド（F U Z E O N（登録商標））、エンテカビル（B A R A C L U D E（登録商標））、ENNAVIR（登録商標）、ファミシクロビル（F A M V I R（登録商標））、ホミビルセン（V I T R A V E N E（登録商標））、ホスアンプレナビル（L E X I V A（登録商標）、T E L Z I R（登録商標））、f o s c a r n e t（F O S C A V I R（登録商標））、フォスフォネット、ガンシクロビル（C Y T O V E N E（登録商標））、C Y M E V E N E（登録商標）、V I T R A S E R T（登録商標））、G S 9 1 3 7（E L V I T E G R A V I R（登録商標））、イミキモド（A L D A R A（登録商標）、Z Y C L A R A（登録商標）、B E S E L N A（登録商標））、インジナビル（C R I X I V A N（登録商標））、イノシン、イノシンプラノベックス（I M U N O V I R（登録商標））、インターフェロン I 型、インターフェロン I I 型、インターフェロン I I I 型、クタプレシン（N E X A V I R（登録商標））、ラミブジン（Z E F F I X（登録商標））、H E P T O V I R（登録商標）、E P I V I R（登録商標））、ラミブジン/ジドブジン（C O M B I V I R（登録商標））、ロピナビル、ロピリド、マラビロク（S E L Z E N T R Y（登録商標）、C E L S E N T R I（登録商標））、メチサゾン、MK - 2 0 4 8、モロキシジン、ネルフィナビル（V I R A C E P T（登録商標））、ネビラピン（V I R A M U N E（登録商標））、オセルタミビル（T A M I F L U（登録商標））、ペグインターフェロンアルファ - 2 a（P E G A S Y S（登録商標））、ペンシクロビル（D E N A V I R（登録商標））、ペラミビル、プレコナリル、ポドフィロトキシシン（C O N D Y L O X（登録商標））、ラルテグラビル（I S E N T R E S S（登録商標））、リバビリン（C O P E G U S（登録商標））、R E B E T O L（登録商標）、R I B A S P H E R E（登録商標）、V I L O N A（登録商標）、及び V I R A Z O L E（登録商標））、リマンタジン（F L U M A D I N E（登録商標））、リトナビル（N O R V I R（登録商標））、ピラミジン、サキナビル（I N V I R A S E（登録商標））、F O R T O V A S E（登録商標））、スタブジン、ティーツリーオイル（メラレウカ油）、テノフォビル（V I R E A D（登録商標））、テノフォビル/エムトリシタピン（T R U V A D A（登録商標））、チプラナビル（A P T I V U S（登録商標））、トリフルリジン（V I R O P T I C（登録商標））、トロマンタジン（V I R U - M E R Z（登録商標））、パラシクロビル（V A L T R E X（登録商標））、バルガンシ

10

20

30

40

50

クロビル (VALCYTE (登録商標))、ピクリピロク、ピダラビン、ピラミジン、ザルシタピン、ザナミビル (RELENZA (登録商標))、ならびにジドブジン (アジドチミジン (AZT)、RETROVIR (登録商標)、RETROVIS (登録商標)) が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0269】

##### 真菌感染症に関連する病態

本発明の環状RNAワクチンを使用して治療され得る真菌感染症に関連する疾患、障害、または病態には、アスペルギルス症、プラストミセス症、カンジダ症、コクシジオイデス症、クリプトコッカス症、ヒストプラズマ症、ミセトーマ、パラコクシジオイデス症、及び足白癬が含まれるが、これらに限定されない。コクシジオイデス症、クリプトコッカス症、ヒストプラズマ症、菌腫、パラコクシジオイデス症、及び足白癬が挙げられるが、これらに限定されない。更に、免疫不全を有する人は、*Aspergillus*、*Candida*、*Cryptococcus*、*Histoplasma*、及び *Pneumocystis* などの真菌属による疾患に特に感受性であり、これらは、本発明の環状RNAワクチンを使用して治療され得る。本発明の環状RNAワクチンを使用して治療され得る他の真菌には、眼、爪、毛髪、及び特に皮膚を攻撃し得る真菌、いわゆる皮膚性真菌及び好角質性真菌 (*keratinophilic fungi*) が含まれ、それは水虫 (*athlete's foot*) などの白癬が一般的である多様な状態を引き起こす。本発明の環状RNAワクチンはまた、様々な分類群の真菌孢子、及び真菌によって引き起こされるアレルギーを治療するために使用され得る。

10

20

#### 【0270】

##### 真菌性病原体

真菌病原体としては、*Ascomycota* (例えば、*Fusarium oxysporum*、*Pneumocystis jirovecii*、*Aspergillus spp.*、*Coccidioides immitis/posadasii*、*Candida albicans*)、*Basidiomycota* (例えば、*Filobasidiella neoformans*、*Trichosporon*)、*Microsporidia* (例えば、*Encephalitozoon cuniculi*、*Enterocytozoon bieneusi*)、及び *Mucoromycotina* (例えば、*Mucor circinelloides*、*Rhizopus oryzae*、*Lichtheimia corymbifera*) が挙げられるが、これらに限定されない。

30

#### 【0271】

##### 抗真菌剤

本発明の環状RNAワクチンと組み合わせて使用され得る抗真菌剤としては、ポリエン系抗真菌剤 (例えば、ナタマイシン、リモシジン、フィリピン、ナイスタチン、アムホテリシンB、カンダイシン、ハママイシン)、イミダゾール抗真菌剤 (例えば、ミコナゾール (MICATIN (登録商標))、DAKTARIN (登録商標))、ケトコナゾール (NIZORAL (登録商標))、FUNGORAL (登録商標)、SEBIZOLE (登録商標))、クロトリマゾール (LOTRIMIN (登録商標))、LOTRIMIN (登録商標) AF、CANESTEN (登録商標))、エコナゾール、オモコナゾール、ビホナゾール、プトコナゾール、フェンチコナゾール、イソコナゾール、オキシコナゾール、セルタコナゾール (ERTACZO (登録商標))、スルコナゾール、チオコナゾール)、トリアゾール抗真菌剤 (例えば、アルパコナゾール、フルコナゾール、イトラコナゾール、イサブコナゾール、ラブコナゾール、ポサコナゾール、ポリコナゾール、テルコナゾール)、チアゾール抗真菌薬 (例えば、アバファンギン (*abafungin*))、アリルアミン (例えば、テルピナフィン (LAMISIL (登録商標))、ナフチフィン (NAFTIN (登録商標))、プテナフィン (LOTRIMIN (登録商標) ウルトラ))、エキノキャンディン (例えば、アニデュラファンギン、カスポファンギン、ミカファンギン)、及びその他 (例えば、ポリゴジアル、安息香酸、シクロピロックス、トルナフテート (TINACTIN (登録商標))、DESENEXT (登録商標))、AFTATE (登

40

50



録商標) )、ウンデシレン酸、フルシトシン、または5 - フルオロシトシン、グリセオフルピン、ハロプロジン、炭酸水素ナトリウム、アリシン) が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0272】

原虫感染症に関連する病態

本発明の環状RNAワクチンを使用して治療され得る原生動物感染症に関連する疾患、障害、または病態としては、アメーバ症、ジアルジア症、トリコモナス症、アフリカ睡眠病、アメリカ睡眠病、リーシュマニア症(カラ - アザール)、バランチジウム症、トキソプラズマ症、マラリア、アカントアメーバ角膜炎、及びバベシア症が挙げられるが、これらに限定されない。

10

#### 【0273】

原虫病原体

原虫病原体には、*Entamoeba histolytica*、*Giardia lamblia*、*Trichomonas vaginalis*、*Trypanosoma brucei*、*T. cruzi*、*Leishmania donovani*、*Balantidium coli*、*Toxoplasma gondii*、*Plasmodium* spp.、及び*Babesia microti*が含まれるが、これらに限定されない。

#### 【0274】

抗原虫剤

例示的な抗原虫剤には、エフロールニチン、フラゾリドン(FUROXONE(登録商標))、DEPENDAL-M(登録商標))、メラルソプロール、メトロニダゾール(FLAGYL(登録商標))、オルニダゾール、パロモマイシン硫酸塩(HUMATIN(登録商標))、ペンタミジン、ピリメタミン(DARAPRIM(登録商標))、及びチニダゾール(TINDAMAX(登録商標))、FASIGYN(登録商標))が含まれるが、これらに限定されない。

20

#### 【0275】

寄生虫感染に関連する病態

本発明の環状RNAワクチンを使用して治療され得る寄生虫感染に関連する疾患、障害、または病態には、アカントアメーバ角膜炎、アメーバ症、回虫症、バベシア症、バランチジウム症、ベイリスアスカリス症(*baylisascariasis*)、シャーガス病、肝吸虫症、コクリオミヤ、クリプトスポリジウム症、裂頭条虫症、メジナ虫症、エキノコックス症、象皮病、蟯虫症、肝蛭症、肥大吸虫症、フィラリア症、ジアルジア症、顎口虫症、膜様条虫症、イソスポラ症、片山熱、リーシュマニア症、ライム病、マラリア、メタゴニムス症、ハエ幼虫症、オンコセルカ症、シラミ寄生症、疥癬、住血吸虫症、睡眠病、糞線虫症、条虫症、トキソカラ症、トキソプラズマ症、施毛虫症、及び鞭虫症が含まれるが、これらに限定されない。

30

#### 【0276】

寄生性病原体

寄生性病原体としては、*Acanthamoeba*、*Anisakis*、*Ascaris lumbricoides*、ウマバエ、*Balantidium coli*、南京虫、*Cestoda*、ツツガムシ、*Cochliomyia hominivorax*、*Entamoeba histolytica*、*Fasciola hepatica*、*Giardia lamblia*、鉤虫、*Leishmania*、*Linguatula serrata*、肝吸虫、*Loa loa*、*Paragonimus*、蟯虫、*Plasmodium falciparum*、*Schistosoma*、*Strongyloides stercoralis*、ダニ、サナダムシ、*Toxoplasma gondii*、*Trypanosoma*、鞭虫、及びが挙げられるが、これらに限定されない。

40

#### 【0277】

抗寄生虫剤

例示的な抗寄生虫剤としては、抗線虫剤(例えば、メベンダゾール、パモ酸ピランテル

50

、チアベンダゾール、ジエチルカルバマジン、イベルメクチン)、抗条虫剤(例えば、ニコロサミド、プラジカンテル、アルベンダゾール)、抗トレマトーデス(例えば、プラジカンテル)、抗アメーバ剤(例えば、リファンピン、アンホテリシンB)、及び抗原虫剤(例えば、メラルソプロ、エフロルニチン、メトロニダゾール、チニダゾール)が挙げられるが、これらに限定されない。

【0278】

切断部位

いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチド構築物中の2つ以上の発現配列は、1つ以上の切断部位配列によって分離され得る。切断部位は、2つ以上のポリペプチドが分離されることを可能にする任意の配列であり得る。切断部位は、ポリペプチドが産生されると、外部切断活性を必要とせず個々のポリペプチドに即座に切断されるように、自己切断性であり得る。

10

【0279】

いくつかの実施形態では、切断部位は、フューリン切断部位であり得る。フューリンは、サブチリシン様プロタンパク質転換酵素ファミリーに属する酵素である。このファミリーのメンバーは、潜在的な前駆体タンパク質を生物学的に活性な生成物に処理するプロタンパク質転換酵素である。フューリンは、カルシウム依存性セリンエンドプロテアーゼであり、前駆体タンパク質を対になった塩基性アミノ酸処理部位で効率的に切断することができる。フューリン基質の例には、プロ副甲状腺ホルモン、トランスフォーミング増殖因子ベータ1前駆体、プロアルブミン、プロベータセクレターゼ、膜タイプ1マトリックスメタロプロテイナーゼ、プロ神経成長因子のベータサブユニット、及びフォンヴィレブランド因子が含まれる。フューリンは、塩基性アミノ酸標的配列(典型的には、Arg-X-(Arg/Lys)-Arg)のすぐ下流でタンパク質を切断し、ゴルジ体で濃縮される。

20

【0280】

いくつかの実施形態では、切断部位は、自己切断ペプチドをコードし得る。

【0281】

いくつかの実施形態では、切断部位は、2A自己切断ペプチドのC末端におけるグリシル-プロピル結合のスキップなどのリボソームスキップによって動作し得る。いくつかの実施形態では、立体障害は、リボソームスキッピングを引き起こす。いくつかの実施形態では、2A自己切断ペプチドは、配列GDVEXNPGP(配列番号324)を含み、Xは、EまたはSである。いくつかの実施形態では、2A自己切断ペプチドの上流にコードされるタンパク質は、C末端プロリン翻訳後を除いて、2A自己切断ペプチドに結合される。いくつかの実施形態では、2A自己切断ペプチドの下流にコードされるタンパク質は、翻訳後N末端でプロリンに結合される。

30

【0282】

いくつかの実施形態では、自己切断ペプチドは、アフトウイルスまたはカルジオウイルス由来の2A自己切断ペプチドであり得る。アフトウイルス及びカルジオウイルスの主要な2A/2B切断は、そのC末端での2A切断によって仲介される。口蹄疫ウイルス(FMDV)及びウマ鼻炎Aウイルスなどのアフトウイルスでは、2A領域は、タンパク質2BのN末端残基(保存されたプロリン残基)とともに、そのC末端での切断を仲介することができる自律的なエレメントを表す、約18個のアミノ酸の短い切片である(Donnelly et al. (2001))。

40

【0283】

2A様配列は、アフトウイルスまたはカルジオウイルス以外のピコルナウイルス、「ピコルナウイルス様」昆虫ウイルス、C型口タウイルス及びトリパノソーマ属及び細菌配列内の反復配列において見出されている(Donnelly et al. (2001))。いくつかの実施形態では、切断部位は、表8に列挙されるものなどのこれらの2A様配列のうちの1つを含み得る。

【0284】

50

いくつかの実施形態では、自己切断ペプチドは、F2Aである。いくつかの実施形態では、自己切断ペプチドは、口蹄疫ウイルスに由来する。いくつかの実施形態では、自己切断ペプチドは、E2Aである。いくつかの実施形態では、自己切断ペプチドは、ウマ鼻炎Aウイルスに由来する。いくつかの実施形態では、自己切断ペプチドは、P2Aである。いくつかの実施形態では、自己切断ペプチドは、ブタテスコウイルス-1に由来する。いくつかの実施形態では、自己切断ペプチドは、T2Aである。いくつかの実施形態では、自己切断ペプチドは、ゾセア・アシグナ(Thosea asigna)ウイルスに由来する。いくつかの実施形態では、自己切断ペプチドは、表8に列挙される配列を有する。

【0285】

ある実施形態では、切断部位によって分離されたペプチドをコードする発現配列は、同じレベルのタンパク質発現を有する。 10

【0286】

いくつかの実施形態では、自己切断ペプチドは、Liu, Z., Chen, O., Wall, J. B. J. et al. Systematic comparison of 2A peptides for cloning multi-genes in a polycistronic vector. Sci Rep 7, 2193 (2017)に記載されている。

【0287】

ポリヌクレオチドの産生

本明細書で提供されるベクターは、当業者に知られている標準的な分子生物学技術を使用して作製することができる。例えば、本明細書で提供されるベクターの様々なエレメントは、組換え法を使用して、例えば細胞からcDNA及びゲノムライブラリーをスクリーニングすることによって、またはポリヌクレオチドを含むことが知られているベクターからポリヌクレオチドを誘導することによって得ることができる。 20

【0288】

本明細書で提供されるベクターの様々なエレメントはまた、既知の配列に基づいて、クローン化されるのではなく、合成的に生成することもできる。完全な配列は、標準的な方法によって調製された重複するオリゴヌクレオチドから組み立て、完全な配列へと組み立てることができる。例えば、Edge, Nature (1981) 292: 756、Nambair et al., Science (1984) 223: 1299、及びJay et al., J. Biol. Chem. (1984) 259: 631-1を参照されたい。 30

【0289】

ゆえに、特定のヌクレオチド配列は、所望の配列を抱えるベクターから取得する、または完全に、もしくは部分的に、適切な場合には部位特異的変異誘発及びポリメラーゼ連鎖反応(PCR)技術などの当該技術分野で公知の様々なオリゴヌクレオチド合成技術を使用して合成することができる。所望のベクターエレメントをコードするヌクレオチド配列を取得する1つの方法は、従来 of 自動ポリヌクレオチドシンセサイザーで産生された重複する合成オリゴヌクレオチドの相補的セットをアニーリングし、続いて適切なDNAリガーゼでライゲーションし、PCRを介してライゲーションされたヌクレオチド配列を増幅することによる。例えば、Jayaraman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1991) 88: 4084-4088を参照されたい。加えて、オリゴヌクレオチド特異的合成(Jones et al., Nature (1986) 54: 75-82)、既存のヌクレオチド領域のオリゴヌクレオチド特異的変異誘発(Riechmann et al., Nature (1988) 332: 323-327)及びVerhoeyen et al., Science (1988) 239: 1534-1536)、及びT4 DNAポリメラーゼを使用するギャップを伴うオリゴヌクレオチドの酵素的充填(Queen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1989) 86: 10029-10033)を使用することができる。 40

【0290】

本明細書で提供される前駆体RNAは、本明細書で提供されるベクターを、ベクターによってコードされる前駆体RNAの転写を許容する条件下で、インキュベートすることによって生成することができる。例えば、いくつかの実施形態では、前駆体RNAは、その5'二重鎖形成領域及び/または発現配列の上流にRNAポリメラーゼプロモーターを含む本明細書で提供されるベクターを、適合性RNAポリメラーゼ酵素とインビトロ転写を許容する条件下でインキュベートすることによって合成される。いくつかの実施形態では、ベクターは、バクテリオファージRNAポリメラーゼによって細胞の内側で、または宿主RNAポリメラーゼIIによって細胞の核内でインキュベートされる。

#### 【0291】

特定の実施形態では、テンプレートとして本明細書に提供されるベクター（例えば、5'二重鎖形成領域の上流に配置されたRNAポリメラーゼプロモーターを有する本明細書に提供されるベクター）を使用してインビトロ転写を行うことによって前駆体RNAを生成する方法が、本明細書で提供される。

#### 【0292】

特定の実施形態では、結果得られた前駆体RNAを使用して、それをマグネシウムイオン及びグアノシンヌクレオチドまたはヌクレオシド存在下で、RNA環状化が生じる温度（例えば、20 ~ 60）にてインキュベートすることによって、環状RNA（例えば、本明細書で提供される環状RNAポリヌクレオチド）を生成することができる。

#### 【0293】

ゆえに、特定の実施形態では、環状RNAを作製する方法が、本明細書で提供される。特定の実施形態では、本方法は、本明細書で提供されるベクター（例えば、以下の順序で、5'二重形成領域、3'グループイントロンフラグメント、第1のスペーサー、配列内リボソーム進入部位（IRES）、第1の発現配列、切断部位をコードするポリヌクレオチド配列、第2の発現配列、第2のスペーサー、5'グループイントロンフラグメント、及び3'二重形成領域を含む、ベクター）を鋳型として使用して転写（例えば、ランオフ転写）によって前駆体RNAを合成することと、得られた前駆体RNAを二価陽イオン（例えば、マグネシウムイオン）及びGTPの存在下で、環状化して環状RNAを形成するようにインキュベートすることと、を含む。いくつかの実施形態では、本発明の前駆体RNAは、マグネシウムイオン及びGTPの非存在下で、及び/またはマグネシウムイオン及びGTPとのインキュベーションのステップを伴わずに、環状化することができる。いくつかの実施形態では、転写は、過剰のGMPの存在下で行われる。

#### 【0294】

いくつかの実施形態では、環状RNAを含む組成物は、精製されている。環状RNAは、当該技術分野で一般的に使用される任意の公知の方法、例えばカラムクロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、及びサイズ排除クロマトグラフィーによって精製され得る。いくつかの実施形態では、精製は、以下のステップ：ホスファターゼ処理、HPLCサイズ排除精製、及びRNase R消化のうちの1つ以上を含む。いくつかの実施形態では、精製は、以下のステップを順序：RNase R消化、ホスファターゼ処理、及びHPLCサイズ排除精製で含む。いくつかの実施形態では、精製は、逆相HPLCを含む。いくつかの実施形態では、精製された組成物は、未精製RNAよりも少ない二本鎖RNA、DNAスプリント、三リン酸化RNA、ホスファターゼタンパク質、タンパク質リガーゼ、キャッピング酵素及び/またはニックの入ったRNAを含有する。いくつかの実施形態では、精製組成物は、未精製組成物よりも免疫原性が低い。いくつかの実施形態では、精製組成物に曝露された免疫細胞は、未精製組成物に曝露された免疫細胞よりも少ないTNF、RIG-I、IL-2、IL-6、IFN、及び/または1型インターフェロン、例えばIFN-1を産生する。

#### 【0295】

ナノ粒子

特定の態様では、本明細書で提供されるのは、本明細書で提供される環状RNAを含む薬学的組成物である。特定の実施形態では、かかる薬学的組成物は、送達を容易にするた

めにナノ粒子とともに製剤化される。

【0296】

特定の実施形態では、本明細書で提供される環状RNAは、例えば、ナノ粒子またはナノ粒子を含む組成物などの輸送ビヒクル中で細胞に送達され及び/または細胞へとターゲティングされ得る。いくつかの実施形態では、環状RNAはまた、対象に、輸送ビヒクルまたは輸送ビヒクルを含む組成物にて送達され得る。いくつかの実施形態では、輸送ビヒクルは、ナノ粒子である。いくつかの実施形態では、ナノ粒子は、脂質ナノ粒子、固体脂質ナノ粒子、ポリマーコアシェルナノ粒子、または生分解性ナノ粒子である。いくつかの実施形態では、輸送ビヒクルは、1つ以上のカチオン性脂質、非カチオン性脂質、イオン性脂質、PEG修飾脂質、ポリグルタミン酸ポリマー、ヒアルロン酸ポリマー、ポリ -

10

【0297】

一実施形態では、標的細胞への環状RNAの送達を最適化するために、輸送ビヒクルを選択及び/または調製することができる。例えば、標的細胞が抗原提示細胞である場合、輸送ビヒクルの特性（例えば、サイズ、電荷及び/またはpH）は、かかる輸送ビヒクルを標的細胞に効果的に送達し、免疫クリアランスを低減し、及び/またはその標的細胞での保持を促進するように最適化することができる。

【0298】

標的細胞への核酸の送達を促進するための輸送ビヒクルの使用は、本発明によって企図される。リポソーム（例えば、リポソーム脂質ナノ粒子）は、一般に、研究、産業、及び医学における様々な用途に有用であり、特に、インビボにおける診断または治療用化合物の輸送ビヒクルとしてのそれらの使用に有用であり（Lasica, Trends Biotechnol., 16:307-321, 1998; Drummond et al., Pharmacol. Rev., 51:691-743, 1999）、通常、1つ以上の二重層の膜によって外側の媒体から隔離された内部水性空間を有する顕微鏡的小胞として特徴付けられる。リポソームの二重層膜は、典型的には、空間的に分離された親水性及び疎水性ドメインを含む、合成または天然由来の脂質などの両親媒性分子によって形成される（Lasica, Trends Biotechnol., 16:307-321, 1998）。リポソームの二重層膜は、両親媒性ポリマー及び界面活性剤（例えば、ポリマーソーム、ニオソームなど）によっても形成され得る。

20

30

【0299】

本発明の文脈では、輸送ビヒクルは、典型的には、環状RNAを標的細胞に輸送する役割を果たす。本発明の目的のために、輸送ビヒクルは、所望の核酸を含有または封入するように調製される。所望の実体（例えば、核酸）をリポソームに組み込むプロセスは、しばしば負荷すると称される（Lasica, et al., FEBS Lett., 312:255-258, 1992）。リポソームに取り込まれた核酸は、リポソームの内部空間、リポソームの二分子膜内に完全にもしくは部分的に位置するか、またはリポソーム膜の外表面と結合することができる。リポソームなどの輸送ビヒクルに環状RNAを組み込む目的は、多くの場合、核酸を分解する酵素もしくは化学物質、及び/または核酸の急速な排泄を引き起こすシステムもしくは受容体を含み得る環境から核酸を保護することである。したがって、本発明のある実施形態では、選択された輸送ビヒクルは、その中に含まれる環状RNAの安定性を向上させることができる。リポソームは、封入されたcircRNAが標的細胞に到達することを可能にし得る、または代替的に、投与された環状RNAの存在が不要または望ましくない可能性がある他の部位または細胞へのかかる環状RNAの送達を制限することができる。更に、環状RNAを例えばカチオン性リポソームなどの輸送ビヒクルに組み込むことも、かかるcircRNAの標的細胞への送達を促進する。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される輸送ビヒクルは、例えば、輸送ビヒクルに封入された内容物（例えば、脂質ナノ粒子）のエンドソームまたはリソソーム放出を促進する働きをすることができる。

40

50

## 【0300】

理想的には、輸送ビヒクルは、組成物が高いトランスフェクション効率及び向上した安定性を示すように、1つ以上の所望の環状RNAを封入するように調製される。リボソームは標的細胞への核酸の導入を容易にすることができるが、コポリマーとしてのポリカチオン（例えば、ポリL-リジン及びプロタミン）の添加は、場合によっては、インビトロ及びインビボの両方の多くの細胞株において、数種類のカチオン性リボソームのトランスフェクション効率を2～28倍に著しく高めることができる。（N. J. Caplen, et al., Gene Ther. 1995; 2: 603、S. Li, et al., Gene Ther. 1997; 4, 891を参照されたい）。

## 【0301】

本発明のいくつかの実施形態では、輸送ビヒクルは、脂質ナノ粒子として製剤化されている。ある実施形態では、脂質ナノ粒子は、1つ以上のcircRNAを1つ以上の標的細胞に送達するように製剤化される。好適な脂質の例としては、ホスファチジル化合物（例えば、PBAE、ポリグルタミン酸、ポリアスパラギン酸、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルエタノールアミン、スフィンゴ脂質、セレブロシド、及びガングリオシド）が挙げられる。また、ポリマーを、単独でまたは他の輸送ビヒクルと組み合わせて、輸送ビヒクルとして使用することも企図される。好適なポリマーは、例えば、ポリアクリレート、ポリアルキシアノアクリレート、ポリラクチド、ポリラクチド-ポリグリコリドコポリマー、ポリカプロラクトン、デキストラン、アルブミン、ゼラチン、アルギン酸塩、コラーゲン、キトサン、シクロデキストリン、デンドリマー、及びポリエチレンイミンを含み得る。いくつかの実施形態では、輸送ビヒクルは、米国特許出願第16/065,067号（その全体が本明細書に組み込まれる）に記載されている脂質として製剤化される。いくつかの実施形態では、輸送ビヒクルは、標的細胞へのcircRNAのトランスフェクションを促進するその能力に基づいて選択される。

## 【0302】

本発明は、タンパク質産生のためのデポーターとして機能する標的細胞へのcircRNAの送達をロード及び/または封入及び/または増強するためのカチオン性脂質を含む輸送ビヒクルとしての脂質ナノ粒子の使用を企図する。企図される脂質ナノ粒子は、1つ以上のカチオン性脂質、非カチオン性脂質、及びPEG修飾脂質を使用して、様々な比率の多成分脂質混合物を含むことによって調製され得る。いくつかのカチオン性脂質は、文献に記載されており、その多くは市販されている。

## 【0303】

本発明の組成物及び方法において使用するのに好適なカチオン性脂質としては、国際特許公開第2010/053572号及び/または米国特許出願第15/809,680号に記載されているもの、例えばC12-200が挙げられる。特定の実施形態では、本発明の組成物及び方法は、例えば、(15Z, 18Z)-N, N-ジメチル-6-(9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエン-1-イル)テトラコサ-15, 18-ジエン-1-アミン(HGT5000)、(15Z, 18Z)-N, N-ジメチル-6-(9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエン-1-イル)テトラコサ-4, 15, 18-トリエン-1-アミン(HGT5001)、及び(15Z, 18Z)-N, N-ジメチル-6-(9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエン-1-イル)テトラコサ-5, 15, 18-トリエン-1-アミン(HGT5002)などの、2012年3月29日に出願された米国特許仮出願第61/617,468号（参照により本明細書に組み込まれる）に記載のイオン化可能なカチオン性脂質を含む脂質ナノ粒子を用いる。

## 【0304】

いくつかの実施形態では、カチオン性脂質N-[1-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル]-N, N, N-トリメチルアンモニウム塩化物または「DOTMA」が、使用される。（Felgner et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. 84, 7413 (1987)、米国特許第4,897,355号）。DOTMAは、単独で製剤

10

20

30

40

50

化され得、または輸送ビヒクルもしくは脂質ナノ粒子中に中性脂質、ジオレイルホスファチジル-エタノールアミンもしくは「DOPE」または他のカチオン性もしくは非カチオン性脂質と組み合わせられ得、かかるリポソームは、標的細胞への核酸の送達を増強するために使用され得る。他の好適なカチオン性脂質には、例えば、5-カルボキシスペルミルグリシンジオクタデシルアミドまたは「DOGS」、2,3-ジオレイルオキシ-N-[2(スペルミン-カルボキサミド)エチル]-N,N-ジメチル-1-プロパンアミニウムまたは「DOSPA」(Behr et al., Proc. Nat. l Acad. Sci. 86, 6982 (1989)、米国特許第5,171,678号、同第5,334,761号)、1,2-ジオレイル-3-ジメチルアンモニウム-プロパンまたは「DODAP」、1,2-ジオレイル-3-トリメチルアンモニウム-プロパンまたは「DOTAP」が含まれる。企図されるカチオン性脂質には、1,2-ジステアリルオキシ-N,N-ジメチル-3-アミノプロパンまたは「DSDMA」、1,2-ジオレイルオキシ-N,N-ジメチル-3-アミノプロパンまたは「DODMA」、1,2-ジリノレイルオキシ-N,N-ジメチル-3-アミノプロパンまたは「DLinDMA」、1,2-ジリノレニルオキシ-N,N-ジメチル-3-アミノプロパンまたは「DLenDMA」、N-ジオレイル-N,N-ジメチルアンモニウムクロリドまたは「DODAC」、N,N-ジステアリル-N,N-ジメチルアンモニウムブロミドまたは「DDAB」、N-(1,2-ジミリスチルオキシプロパ-3-イル)-N,N-ジメチル-N-ヒドロキシエチルアンモニウムブロミドまたは「DMRIE」、3-ジメチルアミノ-2-(コレスト-5-エン-3-ベータ-オキシブタン-4-オキシ)-1-(cis,cis-9,12-オクタデカジエノキシ)プロパンまたは「CLinDMA」、2-[5'-(コレスト-5-エン-3-ベータ-オキシ)-3'-オキサベントキシ)-3-ジメチル1-1-(cis,cis-9',1-2'-オクタデカジエノキシ)プロパンまたは「CpLinDMA」、N,N-ジメチル-3,4-ジオレイルオキシベンジルアミンまたは「DMOBA」、1,2-N,N'-ジオレイルカルバミル-3-ジメチルアミノプロパンまたは「DOcarbDAP」、2,3-ジリノレイルオキシ-N,N-ジメチルプロピルアミンまたは「DLinDAP」、1,2-N,N'-ジリノレイルカルバミル-3-ジメチルアミノプロパンまたは「DLincarbDAP」、1,2-ジリノレイルカルバミル-3-ジメチルアミノプロパンまたは「DLinCDAP」、2,2-ジリノレイル-4-ジメチルアミノメチル-[1,3]-ジオキソランまたは「DLin-K-DMA」、2,2-ジリノレイル-4-ジメチルアミノエチル-[1,3]-ジオキソランまたは「DLin-K-XTC2-DMA」、及び2-(2,2-ジ((9Z,12Z)-オクタデカ-9,12-ジエン-1-イル)-1,3-ジオキソラン-4-イル)-N,N-ジメチルエタンアミン(DLin-KC2-DMA)(WO2010/042877; Semple et al., Nature Biotech. 28:172-176 (2010)を参照されたい)、またはこれらの混合物も含まれる。(Heyes, J., et al., J Controlled Release 107:276-287 (2005)、Morrissey, D.V., et al., Nat. Biotechnol. 23(8):1003-1007 (2005)、PCT公開WO2005/121348A1)。

10

20

30

40

#### 【0305】

コレステロールベースのカチオン性脂質の使用も本発明によって企図される。かかるコレステロールベースのカチオン性脂質は、単独でまたは他のカチオン性もしくは非カチオン性脂質と組み合わせて使用され得る。好適なコレステロールベースのカチオン性脂質には、例えば、GL67、DC-Chol(N,N-ジメチル-N-エチルカルボキサミドコレステロール)、1,4-ビス(3-N-オレイルアミノ-プロピル)ピペラジン(Gao, et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 179, 280 (1991)、Wolf et al., BioTechniques 23, 139 (1997)、米国特許第5,744,335号)、またはICEが含まれる。

#### 【0306】

50

加えて、トランスフェクションの有効性を増強するためのいくつかの試薬が、市販されている。好適な例としては、LIPOFECTIN (DOTMA:DOPE) (Invitrogen, Carlsbad, CA)、LIPOFECTAMINE (DOSPA:DOPE) (Invitrogen)、LIPOFECTAMINE 2000 (Invitrogen)、FUGENE (Promega, Madison, WI)、TRANSFECTAM (DOGS) (Promega)、及びEFFECTENE (Qiagen, Valencia, CA)が挙げられる。

【0307】

米国特許第10,413,618号に記載されるものなどのジアルキルアミノ系、イミダゾール系、及びグアニジニウム系の脂質などのカチオン性脂質も、企図される。

10

【0308】

他の実施形態では、本明細書に記載の組成物及び方法は、米国仮出願第61/494,745号(この教示全体が参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる)に更に記載される、1つ以上の切断可能な脂質、例えば、1つ以上のカチオン性脂質または切断可能なジスルフィド(S-S)官能基を含む化合物(例えば、HGT4001、HGT4002、HGT4003、HGT4004、及びHGT4005)などを含む脂質ナノ粒子を対象とする。

【0309】

N-オクタノイル-スフィンゴシン-1-[スクシニル(メトキシポリエチレングリコール)-2000](C8 PEG-2000セラミド)を含むポリエチレングリコール(PEG)修飾リン脂質、及び誘導体化セラミド(PEG-CER)など誘導体化脂質の使用はまた、単独でまたは他の脂質と組み合わせて、一緒に輸送ビヒクル(例えば、脂質ナノ粒子)を含む本発明によって企図される。企図されるPEG修飾脂質には、C6~C20長さのアルキル鎖を伴う脂質に共有結合的に付着した最大5kDaの長さのポリエチレングリコール鎖が含まれるが、これに限定されない。かかる成分の添加により、複合体の凝集を防ぐことができ、また、循環寿命を延ばし、標的細胞への脂質-核酸組成物の送達を増加させる手段も提供することができ、(Klibanov et al., (1990) FEBS Letters, 268(1):235-237)、またはそれらは、インビボで製剤から迅速に交換されるよう選択され得る(米国特許第5,885,613号を参照されたい)。特に有用な交換可能脂質は、より短いアシル鎖(例えば、C14またはC18)を有するPEG-セラミドである。本発明のPEG修飾リン脂質及び誘導体化脂質は、輸送ビヒクルに存在する総脂質の約0%~約20%、約0.5%~約20%、約1%~約15%、約4%~約10%、または約2%のモル比を含み得る。PEG末端基が、本明細書に企図される。いくつかの実施形態では、PEG末端基は、-OH、-OCH<sub>3</sub>、酸、アミン、またはグアニジンである。

20

30

【0310】

いくつかの実施形態では、RNA(例えば、circRNA)ワクチンは、プロタミン、ヌクレオリン(nucleoline)、スベルミン、またはスベルミジンを含むカチオン性もしくはポリカチオン性化合物、またはポリ-L-リジン(PLL)などの他のカチオン性ペプチドもしくはタンパク質、ポリアルギニン、塩基性ポリペプチド、HIV結合ペプチドを含む細胞透過性ペプチド(CPP)、HIV-1 Tat(HIV)、Tat由来ペプチド、ペネトラチン、VP22由来もしくは類似のペプチド、ペスティウィルスErn、HSV、VP22(単純ヘルペス)、MAP、KALAまたはタンパク質形質導入ドメイン(PTD)、PpT620、プロリンリッチペプチド、アルギニンリッチペプチド、リジンリッチペプチド、MPGペプチド、Pep-1、L-オリゴマー、カルシトニンペプチド、アンテナペディア由来ペプチド(特にDrosophila antennapedia由来)、pAntp、pIsl、FGF、ラクトフェリン、トランスポーター、プフォルイン-2、Bac715-24、SynB、SynB(1)、pVEC、hCT由来ペプチド、SAP、ヒストン、カチオン性多糖類、例えば、キトサン、ポリブレン、カチオン性ポリマー、例えば、ポリエチレンイミン(PEI)、カチオン性脂質、

40

50



例えば DOTMA : [ 1 - ( 2 , 3 - シオレイルオキシ ) プロピル ) ] - N , N , N - トリメチルアンモニウムクロリド、DMRIE、ジ - C 1 4 - アミジン、DOTIM、SAINT、DC - Chol、BGTC、CTAP、DOPC、DODAP、DOPE : ジオレイルホスファチジルエタノール - アミン、DOSPA、DODAB、DOIC、DMEPC、DOGS : ジオクタデシルアミドグリシルスベルミン、DIMRI : ジミリストオキシプロピルジメチルヒドロキシエチルアンモニウムプロミド、DOTAP : ジオレイルオキシ - 3 - ( トリメチルアンモニオ ) プロパン、DC - 6 - 1 4 : O , O - ジテトラデカノイル - N - ( トリメチルアンモニオアセチル ) ジエタノールアミンクロリド、CLIP1 : rac - [ ( 2 , 3 - ジオクタデシルオキシプロピル ) ( 2 - ヒドロキシエチル ) ] - ジメチルアンモニウムクロリド、CLIP6 : rac - [ 2 ( 2 , 3 - ジヘキサデシルオキシプロピルオキシメチルオキシ ) エチル ] - トリメチルアンモニウム、CLIP9 : rac - [ 2 ( 2 , 3 - ジヘキサデシルオキシプロピルオキシスクシニルオキシ ) エチル ] - トリメチルアンモニウム、オリゴフェクトアミン、またはカチオン性もしくはポリカチオン性ポリマー、例えば修飾ポリアミノ酸、例えば、 $\alpha$  - アミノ酸 - ポリマーまたは逆ポリアミドなど、修飾ポリエチレン、例えば、PVP ( ポリ ( N - エチル - 4 - ビニルピリジニウムプロミド ) ) など、修飾アクリレート、例えば、pDMAEMA ( ポリ ( ジメチルアミノエチルメチルアクリレート ) ) など、修飾アミドアミン、例えば、pAMAM ( ポリ ( アミドアミン ) ) など、修飾ポリベータアミノエステル ( PBAE )、例えば、ジアミン末端修飾 1 , 4 ブタンジオールジアクリレート - co - 5 - アミノ - 1 - ペンタノールポリマーなど、デンドリマー、例えば、ポリプロピルアミンデンドリマーまたは pAMAM 系デンドリマーなど、ポリイミン、例えば、PEI : ポリ ( エチレンイミン )、ポリ ( プロピレンイミン ) など、ポリアリルアミン、糖骨格系ポリマー、例えば、シクロデキストリン系ポリマー、デキストラン系ポリマー、キトサンなど、シラン骨格系ポリマー、例えば、PMOXA - PDMS コポリマーなど、1 つ以上のカチオン性ブロック ( 例えば上述のとおりのカチオン性ポリマーから選択される ) と 1 つ以上の親水性もしくは疎水性ブロック ( 例えばポリエチレングリコール ) などとの組み合わせからなるブロックポリマーなど、と関連され得る。

#### 【 0 3 1 1 】

本発明は、米国特許出願第 1 5 / 8 0 9 , 6 8 0 号に記載されているものを含む、非カチオン性脂質の使用も企図する。非カチオン性脂質としては、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 カルボキシラート ( DOPE - mal )、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン ( DPPE )、ジミリストイルホスホエタノールアミン ( DMPE )、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン ( DSPE )、1 6 - O - モノメチル PE、1 6 - O - ジメチル PE、1 8 - 1 - トランス PE、1 - ステアロイル - 2 - オレイルホスファチジルエタノールアミン ( SOPE )、コレステロール、またはそれらの混合物が挙げられるが、これらに限定されない。かかる非カチオン性脂質は、単独でまたは他の賦形剤、例えば、カチオン性脂質と組み合わせて使用され得る。カチオン性脂質と組み合わせて使用される場合、非カチオン性脂質は、輸送ビヒクルに存在する総脂質の 5 % ~ 約 9 0 %、または約 1 0 % ~ 約 7 0 % のモル比を含み得る。

#### 【 0 3 1 2 】

輸送ビヒクル ( 例えば、脂質ナノ粒子 ) は、複数の脂質及び / またはポリマー成分を組み合わせることによって調製され得る。例えば、輸送ビヒクルは、C 1 2 - 2 0 0、DOPE、コレステロール、DMG - PEG 2 K を 4 0 : 3 0 : 2 5 : 5 のモル比で、または DODAP、DOPE、コレステロール、DMG - PEG 2 K を 1 8 : 5 6 : 2 0 : 6 の

モル比で、HGT5000、DOPE、コレステロール、DMG-PEG2Kを40:20:35:5のモル比で、またはHGT5001、DOPE、コレステロール、DMG-PEG2Kを40:20:35:5のモル比で使用して調製され得る。脂質ナノ粒子を含むカチオン性脂質、非カチオン性脂質、及び/またはPEG修飾脂質、ならびにかかる脂質の互いに対する相対モル比の選択は、選択された脂質の特徴、意図された標的細胞の性質、送達されるcircRNAの特徴に基づいている。追加の考慮事項には、例えば、アルキル鎖の飽和度、ならびに選択された脂質のサイズ、電荷、pH、pKa、融合性及び毒性が含まれる。ゆえに、モル比は、それに応じて調整され得る。例えば、いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子中のカチオン性脂質の割合は、10%超、20%超、30%超、40%超、50%超、60%超、または70%超であり得る。脂質ナノ粒子中の非カチオン性脂質の割合は、5%超、10%超、20%超、30%超、または40%超であり得る。脂質ナノ粒子中のコレステロールの割合は、10%超、20%超、30%超、または40%超であり得る。脂質ナノ粒子におけるPEG修飾脂質の割合は、1%超、2%超、5%超、10%超、または20%超であり得る。

10

#### 【0313】

本発明の組成物で使用するための輸送ビヒクルは、当該技術分野で現在知られている様々な技術によって調製され得る。複層状小胞(MLV)は、従来の技術を使用して、例えば、好適な容器(container)または容器(vessel)の内壁に選択された脂質が沈着し、脂質を適切な溶媒中に溶解させ、次いで容器の内側に薄膜が残るように溶媒を蒸発させるか、または噴霧乾燥することによって調製され得る。次いで、水相を、MLVの形成をもたらすボルテックス運動を用いて容器に添加し得る。次いで、単層状小胞(ULV)は、多小胞体の均質化、超音波処理、または押し出しによって形成され得る。加えて、ULVは、洗浄剤除去技術によって形成され得る。

20

#### 【0314】

本発明の特定の実施形態では、本発明の組成物は、輸送ビヒクルを含み、circRNAは、輸送ビヒクルの表面の両方に関連し、同じ輸送ビヒクル内に封入される。例えば、本発明の組成物の調製中に、カチオン性輸送ビヒクルは、静電相互作用を通してcircRNAと関連付け得る。

#### 【0315】

特定の実施形態では、本発明の組成物は、インビトロ及びインビボ用途の両方で検出可能な診断用放射性核種、蛍光材料、または他の材料をロードし得る。例えば、本発明で使用するための好適な診断材料は、ローダミン-ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン(Rh-PE)、緑色蛍光タンパク質circRNA(GFP circRNA)、RenillaルシフェラーゼcircRNA、及びホタルルシフェラーゼcircRNAを含み得る。

30

#### 【0316】

いくつかの実施形態では、輸送ビヒクルの適切なサイズの選択は、標的細胞または組織の部位、及びある程度、リポソームが作製される用途を考慮に入れる。いくつかの実施形態では、circRNAの特定の細胞または組織へのトランスフェクションを制限することが望ましい場合がある。例えば、肝細胞を標的とするために、輸送ビヒクルは、その寸法が肝臓の肝類洞を覆う内皮層の開窓よりも小さいように寸法決定され得る。したがって、適切なサイズの輸送ビヒクルは、かかる内皮開窓を容易に貫通し、標的肝細胞に達することができる。あるいは、輸送ビヒクルは、リポソームの寸法が、ある特定の細胞または組織への分布を制限する、または明確に避けるために十分な直径のものであるように寸法決定され得る。例えば、輸送ビヒクルは、その寸法が肝臓の肝類洞を覆う内皮層の開窓よりも大きいように寸法決定され得、それによって、輸送ビヒクルの肝細胞への分布を制限する。一般に、輸送ビヒクルのサイズは、約25~250nmの範囲内である。いくつかの実施形態では、輸送ビヒクルのサイズは、約250nm、175nm、150nm、125nm、100nm、75nm、50nm、25nm、または10nm未満である。

40

#### 【0317】

50

当該技術分野で知られている様々な代替方法は、輸送ビヒクルの集団の寸法決定のために利用可能である。そのような寸法決定の方法の1つは、米国特許第4,737,323号(参照により本明細書に組み込まれる)に記載されている。リポソーム懸濁液を浴またはプローブ超音波処理のいずれかによって超音波処理することは、約0.05ミクロン未満の直径の小さいULVまで漸進的なサイズの減少をもたらす。均質化は、大きいリポソームをより小さいリポソームにフラグメント化するために剪断エネルギーに依存する別の方法である。典型的な均質化手順において、MLVは、選択されたリポソームの大きさ、典型的には約0.1~0.5ミクロンが観察されるまで、標準的なエマルジョンホモジナイザーを通して再循環される。リポソーム小胞のサイズは、Bloomfield, Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 10:421-450(1981)(参照により本明細書に組み込まれる)に記載される準電気光散乱(QELS)によって決定され得る。平均リポソーム直径は、形成されたリポソームの超音波処理によって低減され得る。効率的なリポソーム合成を導くために、断続的な超音波処理サイクルは、QELS評価と交互に行われ得る。

10

#### 【0318】

更に、特定の実施形態では、本明細書で提供される環状RNAは、1つ以上のリポソーム、リポブックス、または脂質ナノ粒子を使用して製剤化することができる。一実施形態では、環状RNAは、国際公開第2012/170930号(その全体が参照により本明細書に組み込まれる)に記載されているような脂質ナノ粒子中で製剤化され得る。一実施形態では、脂質は、国際公開第2012/170889号(その全体が参照により本明細書に組み込まれる)に記載されているような切断可能な脂質であり得る。一実施形態では、環状RNAの薬学的組成物は、国際公開第2012/099755号(参照により本明細書に組み込まれる)に記載されているPEG化脂質のうちの少なくとも1つを含み得る。一実施形態では、脂質ナノ粒子製剤は、国際公開第2011/127255号または同第2008/103276号(これらの各々は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる)に記載されている方法によって調製され得る。脂質ナノ粒子は、ブロックコポリマー、例えば、国際公開第2013/012476号(その全体が参照により本明細書に組み込まれる)に記載されている分枝状ポリエーテル-ポリアミドブロックコポリマーなどであるが、これらに限定されないコポリマーにコーティングされ得るか、または関連付けられ得る。リポソーム、リポブックス、または脂質ナノ粒子は、これらの製剤が、環状RNAによる細胞トランスフェクションを増加させ、環状RNAのインビボまたはインビトロ半減期を増加させ、及び/または制御放出を可能にすることができるため、環状RNA指向タンパク質産生の有効性を改善するために使用され得る。

20

30

#### 【0319】

他の実施形態では、本明細書で提供される環状RNAポリヌクレオチドは、1つ以上のポリマーを使用して製剤化することができる。ポリマーは、RNAまたは脂質ナノ粒子に含まれ、及び/またはRNAまたは脂質ナノ粒子を封入するまたは部分的に封入するために使用され得る。ポリマーは、生分解性及び/または生体適合性であり得る。ポリマーは、ポリアミン、ポリエーテル、ポリアミド、ポリエステル、ポリカルバメート、ポリウレア、ポリカーボネート、ポリスチレン、ポリイミド、ポリスルホン、ポリウレタン、ポリアセチレン、ポリエチレン、ポリエチレンイミン、ポリイソシアネート、ポリアクリレート、ポリメタクリレート、ポリアクリロニトリル、及びポリアリレートからなる群から選択され得るが、これらに限定されない。例えば、ポリマーは、ポリ(カプロラクトン)(PCL)、エチレン酢酸ビニルポリマー(EVA)、ポリ(乳酸)(PLA)、ポリ(L-乳酸)(PLLA)、ポリ(グリコール酸)(PGA)、ポリ(乳酸-co-グリコール酸)(PLGA)、ポリ(L-乳酸-co-グリコール酸)(PLLGA)、ポリ(D,L-ラクチド)(PDLA)、ポリ(Lラクチド)(PLLA)、ポリ(D,L-ラクチド-co-カプロラクトン)、ポリ(D,L-ラクチド-co-PEO-co-D,L-ラクチド)、ポリ(D,L-ラクチド-co-PPO-co-D,L-ラクチド)、ポリアルキシルシル

40

50

シアクリレート、ポリウレタン、ポリ-L-リジン (PLL)、ヒドロキシプロピルメタクリレート (HPMA)、ポリエチレングリコール、ポリ-L-グルタミン酸、ポリ(ヒドキシ酸)、ポリ無水物、ポリオルトエステル、ポリ(エステルアミド)、ポリアミド、ポリ(エステルエーテル)、ポリカーボネート、ポリエチレン及びポリプロピレンなどのポリアルキレン、ポリ(エチレングリコール) (PEG) などのポリアルキレングリコール、ポリアルキレンオキシド (PEO)、ポリ(エチレンテレフタレート) などのポリアルキレンテレフタレート、ポリビニルアルコール (PVA)、ポリビニルエーテル、ポリ(酢酸ビニル) などのポリビニルエステル、ポリ(塩化ビニル) (PVC) などのポリビニルハライド、ポリビニルピロリドン (PVP)、ポリシロキサン、ポリスチレン、ポリウレタン、誘導体化セルロース (例えば、アルキルセルロース、ヒドロキシアルキルセルロース、セルロースエーテル、セルロースエステル、ニトロセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、カルボキシメチルセルロース)、アクリル酸ポリマー、例えば、ポリ(メチル(メタ)アクリレート) (PMMA)、ポリ(エチル(メタ)アクリレート)、ポリ(ブチル(メタ)アクリレート)、363 5 10 15 20 25 30 35 WO 2021/076805 PCT/US2020/055844 ポリ(イソブチル(メタ)アクリレート)、ポリ(ヘキシル(メタ)アクリレート)、ポリ(イソデシル(メタ)アクリレート)、ポリ(ラウリル(メタ)アクリレート)、ポリ(フェニル(メタ)アクリレート)、ポリ(メチルアクリレート)、ポリ(イソプロピルアクリレート)、ポリ(イソブチルアクリレート)、ポリ(オクタデシルアクリレート) 及びコポリマーならびにこれらの混合物、ポリジオキサノン及びそのコポリマー、ポリヒドロキシアルカノエート、ポリプロピレンフィマレート、ポリオキシメチレン、ポロキサマー、ポロキサミン、ポリ(オルト)エステル、ポリ(酪酸)、ポリ(吉草酸)、ポリ(ラクチド-co-カプロラクトン)、トリメチレンカーボネート、ポリ(N-アクリロイルモルホリン) (PACM)、ポリ(2-メチル-2-オキサゾリン) (PMOX)、ポリ(2-エチル-2-オキサゾリン) (PEOZ)、ならびにポリグリセロールを含み得る。

10

20

30

40

50

### 【0320】

いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、1つを超える遺伝子によってコードされるサブユニットから構成されるタンパク質をコードする。例えば、タンパク質は、タンパク質の各鎖またはサブユニットが別個の遺伝子によってコードされているヘテロダイマーであり得る。1つを超える circRNA 分子が輸送ビヒクルにて送達され、各 circRNA がタンパク質の別個のサブユニットをコードすることが可能である。代替的に、単一の circRNA を操作して、1つより多いサブユニットをコードし得る (例えば、一本鎖 Fv 抗体の場合)。特定の実施形態では、個々のサブユニットをコードする別個の circRNA 分子は、別個の輸送ビヒクルにて投与され得る。

### 【0321】

本発明は、受動的及び能動的ターゲティング手段の両方による標的細胞及び組織の差別的ターゲティングも企図する。受動的ターゲティングの現象は、標的細胞による輸送ビヒクルの認識を向上するための追加の賦形剤または手段の使用に依存することなく、インビボでの輸送ビヒクルの天然分布パターンを利用する。例えば、細網内皮系の細胞による食作用に供される輸送ビヒクルは、肝臓または脾臓に蓄積する可能性が高く、したがって、かかる標的細胞への組成物の送達を受動的に導く手段を提供し得る。

### 【0322】

代替的に、本発明は、輸送ビヒクルに (共有結合または非共有結合のいずれかで) 結合し得るターゲティング部分を使用して、ある特定の標的細胞または標的組織へのかかる輸送ビヒクルの局在化を助長することを含む、能動的ターゲティングを企図する。例えば、ターゲティングは、標的細胞または組織への分布を助長するために、輸送ビヒクルの中または上に1つ以上の内因性ターゲティング部分を含めることによって仲介され得る。標的組織によるターゲティング部分の認識は、標的細胞及び組織における輸送ビヒクル及び/またはその内容物の組織分布及び細胞取り込みを能動的に容易にする (例えば、輸送ビヒクルの中または上にアポリタンパク質-Eターゲティングリガンドを含めることは、肝

細胞によって発現される内因性低密度リポタンパク質受容体への輸送ビヒクルの認識及び結合を助長する)。本明細書で提供されるように、組成物は、標的細胞に対する組成物の親和性を向上することができる部分を含むことができる。ターゲティング部分は、製剤化中または製剤化後に脂質粒子の外側の二重層に連結され得る。これらの方法は、当該技術分野で周知である。加えて、一部の脂質粒子製剤は、融合性ポリマー、例えばPEAA、血球凝集素、他のリポペプチド(米国特許出願第08/835,281号、及び同第60/083,294号を参照されたく、参照により本明細書に組み込まれる)ならびにインビボ及び/または細胞内送達に有用である他の特性を採用し得る。いくつかの実施形態では、本発明の組成物は、改善されたトランスフェクション効率を実証する、及び/または目的の標的細胞もしくは組織に対する選択性の向上を示す。したがって、標的細胞または組織に対する組成物及びその核酸内容物の親和性を向上することができる1つ以上の部分(例えば、ペプチド、アプタマー、オリゴヌクレオチド、小分子、ビタミン、または他の分子)を含む組成物が企図される。好適な部分は、任意で、輸送ビヒクルの表面に結合または連結され得る。いくつかの実施形態では、ターゲティング部分は、輸送ビヒクルの表面に広がり得る、または輸送ビヒクル内に封入され得る。好適な部分は、それらの物理的、化学的または生物学的特性(例えば、選択的親和性及び/または標的細胞表面マーカーもしくは特徴の認識)に基づいて選択される。細胞特異的標的部及びその対応するターゲティングリガンドは、大きく異なり得る。好適なターゲティング部分は、標的細胞の固有の特徴を利用するように選択され、ゆえに、組成物が標的細胞と非標的細胞とを差別することを可能にする。例えば、本発明の組成物は、(例えば、かかる表面マーカーの受容体仲介認識及びかかる表面マーカーへの結合によって)肝細胞の認識、または肝細胞に対する親和性を選択的に向上する表面マーカー(例えば、アポリポタンパク質Bまたはアポリポタンパク質E)を含み得る。例として、ターゲティング部分としてのガラクトースの使用は、本発明の組成物を、肝実質細胞に指向させると予想され得る、また代替的にターゲティングリガンドとしての糖残基を含有するマンノースの使用は、本発明の組成物を、肝臓内皮細胞に指向させると予想され得る(例えば、肝細胞に存在するアジア糖タンパク質受容体に優先的に結合し得る糖残基を含有するマンノース)。(Hillery A M, et al., "Drug Delivery and Targeting: For Pharmacists and Pharmaceutical Scientists" (2002) Taylor & Francis, Inc. を参照されたい。)輸送ビヒクル(例えば、脂質ナノ粒子)に存在する部分に複合されているかかるターゲティング部分の提示はそれゆえ、標的細胞及び組織における本発明の組成物の認識及び取り込みを容易にする。好適なターゲティング部分の例としては、1つ以上のペプチド、タンパク質、小分子、アプタマー、ビタミン、及びオリゴヌクレオチドが挙げられる。

#### 【0323】

いくつかの実施形態では、ターゲティング部分は、受容体仲介性エンドサイトーシスを選択的に特定の細胞集団に仲介する。いくつかの実施形態では、ターゲティング部分は、肝細胞抗原に結合することができる。いくつかの実施形態では、ターゲティング部分は、一本鎖可変フラグメント(scFv)、ナノボディ、ペプチド、ペプチドベースの大員環、ミニボディ、重鎖可変領域、軽鎖可変領域、またはそのフラグメントである。

#### 【0324】

いくつかの実施形態では、環状RNAは、米国特許出願第15/809,680号に記載されているプロセスに従って製剤化される。いくつかの実施形態では、本発明は、脂質ナノ粒子中に環状RNAを封入するプロセスであって、予備形成した脂質ナノ粒子(すなわち、RNAの非存在下で形成した)内に脂質を形成し、次いで予備形成した脂質ナノ粒子をRNAと組み合わせるステップを含む、プロセスを提供する。いくつかの実施形態では、新規の製剤化プロセスは、脂質ナノ粒子を予備形成するステップを伴わずに調製された(例えば、脂質をRNAと直接組み合わせた)同じRNA製剤と比較して、より高い効力(ペプチドまたはタンパク質発現)ならびにより高い有効性(生物学的に関連するエンドポイントの改善)を、インビトロ及びインビボの両方で有し、潜在的により良好な忍容

性を伴う、RNA製剤をもたらす。

【0325】

RNAの特定のカチオン性脂質ナノ粒子製剤の場合、RNAの高い封入を達成するために、緩衝液（例えば、クエン酸緩衝液）中のRNAを加熱する必要がある。これらのプロセスまたは方法では、製剤化後（ナノ粒子の形成後）の加熱は脂質ナノ粒子へのRNAの封入効率を増加させないため、製剤化プロセスの前に加熱を行う必要がある（すなわち、別個の成分を加熱する）。対照的に、本発明のプロセスのいくつかの実施形態では、RNAの加熱の順序は、RNA封入パーセンテージに影響を与えるようには見えない。いくつかの実施形態では、予備形成脂質ナノ粒子を含む溶液、RNAを含む溶液、及び脂質ナノ粒子に封入されたRNAを含む混合溶液のうちの1つ以上の加熱は、製剤化プロセスの前後で生じる必要がない（すなわち、周囲温度で維持される）。 10

【0326】

RNAは、RNAが脂質ナノ粒子に封入され得るように、脂質溶液と混合される溶液にて提供され得る。好適なRNA溶液は、様々な濃度で封入されるRNAを含有する任意の水溶液であり得る。例えば、好適なRNA溶液は、約0.01mg/ml、0.05mg/ml、0.06mg/ml、0.07mg/ml、0.08mg/ml、0.09mg/ml、0.1mg/ml、0.15mg/ml、0.2mg/ml、0.3mg/ml、0.4mg/ml、0.5mg/ml、0.6mg/ml、0.7mg/ml、0.8mg/ml、0.9mg/ml、または1.0mg/ml以上の濃度でRNAを含有し得る。いくつかの実施形態では、好適なRNA溶液は、約0.01~1.0mg/ml、0.01~0.9mg/ml、0.01~0.8mg/ml、0.01~0.7mg/ml、0.01~0.6mg/ml、0.01~0.5mg/ml、0.01~0.4mg/ml、0.01~0.3mg/ml、0.01~0.2mg/ml、0.01~0.1mg/ml、0.05~1.0mg/ml、0.05~0.9mg/ml、0.05~0.8mg/ml、0.05~0.7mg/ml、0.05~0.6mg/ml、0.05~0.5mg/ml、0.05~0.4mg/ml、0.05~0.3mg/ml、0.05~0.2mg/ml、0.05~0.1mg/ml、0.1~1.0mg/ml、0.2~0.9mg/ml、0.3~0.8mg/ml、0.4~0.7mg/ml、または0.5~0.6mg/mlの範囲の濃度でRNAを含有し得る。 20

【0327】

典型的には、好適なRNA溶液はまた、緩衝剤及び/または塩を含有し得る。通常、緩衝剤は、トリス、HEPES、硫酸アンモニウム、重炭酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、リン酸カリウム、またはリン酸ナトリウムを含み得る。いくつかの実施形態では、緩衝剤の好適な濃度は、約0.1mM~100mM、0.5mM~90mM、1.0mM~80mM、2mM~70mM、3mM~60mM、4mM~50mM、5mM~40mM、6mM~30mM、7mM~20mM、8mM~15mM、または9~12mMの範囲であり得る。 30

【0328】

例示的な塩には、塩化ナトリウム、塩化マグネシウム、及び塩化カリウムが含まれ得る。いくつかの実施形態では、RNA溶液における塩の好適な濃度は、約1mM~500mM、5mM~400mM、10mM~350mM、15mM~300mM、20mM~250mM、30mM~200mM、40mM~190mM、50mM~180mM、50mM~170mM、50mM~160mM、50mM~150mM、または50mM~100mMの範囲であり得る。 40

【0329】

いくつかの実施形態では、好適なRNA溶液は、約3.5~6.5、3.5~6.0、3.5~5.5、3.5~5.0、3.5~4.5、4.0~5.5、4.0~5.0、4.0~4.9、4.0~4.8、4.0~4.7、4.0~4.6、または4.0~4.5の範囲のpHを有し得る。

【0330】

様々な方法が、本発明に好適なRNA溶液を調製するために使用され得る。いくつかの実施形態では、RNAは、本明細書に記載の緩衝溶液に直接的に溶解され得る。いくつかの実施形態では、RNA溶液は、封入のための脂質溶液と混合する前に、RNAストック溶液を緩衝液と混合することによって生成され得る。いくつかの実施形態では、RNA溶液は、封入のための脂質溶液と混合する直前に、RNAストック溶液を緩衝液と混合することによって生成され得る。

#### 【0331】

本発明によれば、脂質溶液は、RNAの封入のための脂質ナノ粒子を形成するのに好適な脂質の混合物を含有する。いくつかの実施形態では、好適な脂質溶液は、エタノールベースである。例えば、好適な脂質溶液は、純粋なエタノール（すなわち、100%エタノール）に溶解した所望の脂質の混合物を含有し得る。別の実施形態では、好適な脂質溶液は、イソプロピルアルコールベースである。別の実施形態では、好適な脂質溶液は、ジメチルスルホキシドベースである。別の実施形態では、好適な脂質溶液は、エタノール、イソプロピルアルコール及びジメチルスルホキシドを含むがこれらに限定されない好適な溶媒の混合物である。

#### 【0332】

好適な脂質溶液は、様々な濃度で所望の脂質の混合物を含有し得る。いくつかの実施形態では、好適な脂質溶液は、約0.1~100mg/ml、0.5~90mg/ml、1.0~80mg/ml、1.0~70mg/ml、1.0~60mg/ml、1.0~50mg/ml、1.0~40mg/ml、1.0~30mg/ml、1.0~20mg/ml、1.0~15mg/ml、1.0~10mg/ml、1.0~9mg/ml、1.0~8mg/ml、1.0~7mg/ml、1.0~6mg/ml、または1.0~5mg/mlの範囲の総濃度で所望の脂質の混合物を含有し得る。

#### 【0333】

任意の所望の脂質は、RNAをカプセル化するために好適な任意の比率で混合され得る。いくつかの実施形態では、好適な脂質溶液は、カチオン性脂質、ヘルパー脂質（例えば、非カチオン性脂質及び/またはコレステロール脂質）及び/またはPEG化脂質を含む所望の脂質の混合物を含有する。いくつかの実施形態では、好適な脂質溶液は、1つ以上のカチオン性脂質、1つ以上のヘルパー脂質（例えば、非カチオン性脂質及び/またはコレステロール脂質）、ならびに1つ以上のPEG化脂質を含む所望の脂質の混合物を含有する。

#### 【0334】

いくつかの実施形態では、本発明の組成物は、標的細胞を差別的にトランスフェクションまたは分配する（すなわち、非標的細胞をトランスフェクトしない）。本発明の組成物はまた、肝細胞、上皮細胞、造血細胞、上皮細胞、内皮細胞、肺細胞、骨細胞、幹細胞、間葉細胞、神経細胞（例えば、髄膜、星状膠細胞、運動ニューロン、後根神経節細胞及び前角運動ニューロン）、光受容体細胞（例えば、杆体及び錐体）、網膜色素上皮細胞、分泌細胞、心細胞、脂肪細胞、血管平滑筋細胞、心筋細胞、骨格筋細胞、ベータ細胞、下垂体細胞、滑膜ライニング細胞、卵巣細胞、精巣細胞、線維芽細胞、B細胞、T細胞、抗原提示細胞（例えば、樹枝状細胞）、網状赤血球、白血球、顆粒球、及び腫瘍細胞を含むが、これらに限定されない様々な標的細胞を優先的に標的とするように調製され得る。

#### 【0335】

##### 薬学的組成物

特定の実施形態では、本明細書で提供される治療剤を含む組成物（例えば、薬学的組成物）が、本明細書で提供される。特定の実施形態では、治療剤は、本明細書で提供されるRNAポリヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、治療剤は、本明細書で提供される環状RNAポリヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、治療剤は、本明細書で提供されるベクターである。いくつかの実施形態では、治療剤は、本明細書で提供されるRNAポリヌクレオチド、環状RNA、またはベクターを含む細胞（例えば、ヒト抗原提示細胞などのヒト細胞）である。特定の実施形態では、組成物は、薬学的に許容可能な

10

20

30

40

50

担体を更に含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される組成物は、本明細書で提供される治療剤を、他の薬学的に活性な作用物質または薬物、例えば、B細胞抗原を標的とすることができる抗炎症薬物または抗体、例えば、抗CD20抗体、例えば、リツキシマブと組み合わせて含む。

【0336】

薬学的組成物に関して、薬学的に許容可能な担体は、慣習的に使用されるものいずれかであることができ、化学物理的考慮、例えば溶解度及び活性薬剤との反応性の欠如、ならびに投与経路によってのみ、限定される。本明細書に記載の薬学的に許容可能な担体、例えば、ビヒクル、アジュバント、賦形剤、及び希釈剤は、当業者に周知であり、一般に容易に入手可能である。薬学的に許容可能な担体は、治療剤に対して化学的に不活性であり、使用条件下で有害な副作用または毒性を有さないものであることが好ましい。

10

【0337】

担体の選択は、特定の治療剤、ならびに治療剤を投与するために使用される特定の方法によって部分的に決定される。したがって、本明細書で提供される薬学的組成物の様々な好適な製剤が存在する。

【0338】

特定の実施形態では、薬学的組成物は、防腐剤を含む。特定の実施形態では、好適な防腐剤は、例えば、メチルパラベン、プロピルパラベン、安息香酸ナトリウム、及び塩化ベンザルコニウムを含み得る。任意で、2つ以上の防腐剤の混合物を使用し得る。防腐剤またはその混合物は、典型的には、総組成物の約0.0001重量%～約2重量%の量で存在する。

20

【0339】

いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、緩衝剤を含む。いくつかの実施形態では、好適な緩衝剤には、例えば、クエン酸、クエン酸ナトリウム、リン酸、リン酸カリウム、ならびに様々な他の酸及び塩が含まれ得る。2つ以上の緩衝剤の混合物を、任意で使用してよい。緩衝剤またはその混合物は、典型的には、総組成物の約0.001重量%～約4重量%の量で存在する。

【0340】

いくつかの実施形態では、薬学的組成物中の治療剤の濃度は、変動することができ、例えば、約1重量%未満、または少なくとも約1重量%、2重量%、3重量%、4重量%、5重量%、6重量%、7重量%、8重量%、9重量%、10重量%、15重量%、20重量%、25重量%、30重量%、35重量%、40重量%、45重量%、もしくは約50重量%以上であることができ、選択された特定の投与様式に従って、流体容量、及び粘度によって主に選択することができる。

30

【0341】

経口、エアロゾル、非経口（例えば、皮下、静脈内、動脈内、筋肉内、皮内、腹腔内、及び髄腔内）、及び局所投与のための以下の製剤は、単なる例示であり、決して限定するものではない。本明細書で提供される治療剤を投与するために1つより多い経路を使用することができ、ある特定の例では、特定の経路は、別の経路よりも迅速及びより効果的な応答を提供することができる。

40

【0342】

経口投与に好適な製剤は、(a)液体溶液、例えば水、生理食塩水またはオレンジジュースなどの希釈剤中に溶解させた有効量の治療剤；(b)各々が所定量の活性成分を固体または顆粒として含有する、カプセル、サシェ、錠剤、舐剤、及びトローチ；(c)粉末；(d)適切な液体中の懸濁液；ならびに(e)好適なエマルジョンを含むまたはこれらからなることができる。液体製剤は、希釈剤、例えば水及びアルコール、例えば、エタノール、ベンジルアルコール及びポリエチレンアルコールを、薬学的に許容可能な界面活性剤の添加を伴ってまたは伴わずに含み得る。カプセル形態は、例えば、界面活性剤、滑剤、ならびに不活性充填剤、例えばラクトース、スクロース、リン酸カルシウム、及びコーンスターチを含有する通常のハードシェルまたはソフトシェルゼラチンタイプのものである

50



ことができる。錠剤形態は、ラクトース、スクロース、マンニトール、コーンスターチ、ジャガイモでんぷん、アルギン酸、微結晶性セルロース、アカシア、ゼラチン、グアーガム、コロイド状二酸化ケイ素、クロスカルメロースナトリウム、タルク、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸亜鉛、ステアリン酸、及び他の賦形剤、着色剤、希釈剤、緩衝剤、崩壊剤、湿潤剤、防腐剤、香味料、ならびに他の薬理学的に適合する賦形剤のうちの一つ以上を含むことができる。舐剤の形態は、香味料、通常はスクロース、アカシア、またはトラガカントを伴う治療剤を含むことができる。香錠は、当該技術分野で知られているような賦形剤に加えて、不活性塩基、例えばゲラチン及びグリセリン、またはスクロース及びアカシア、エマルジョン、ゲルなどを有する治療剤を含むことができる。

10

#### 【0343】

非経口投与に好適な製剤には、製剤を意図されたレシピエントの血液と等張にする抗酸化剤、緩衝剤、制菌剤、及び溶質を含有し得る水性及び非水性の等張滅菌注射液、ならびに懸濁剤、可溶化剤、増粘剤、安定剤及び防腐剤を含み得る水性及び非水性の滅菌懸濁液が含まれる。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される治療剤は、水、生理食塩水、デキストロース水溶液及び関連糖溶液、アルコール、例えばエタノールもしくはヘキサデシルアルコール、グリコール、例えばプロピレングリコールもしくはポリエチレングリコール、ジメチルスルホキシド、グリセロール、ケタール、例えば2,2-ジメチル-1,3-ジオキソラン-4-メタノール、エーテル、ポリ(エチレングリコール)400、油、脂肪酸、脂肪酸エステルもしくはグリセリド、またはアセチル化脂肪酸グリセリドを含む滅菌の液体または液体の混合物などの医薬担体中の生理学的に許容可能な希釈剤にて、薬学的に許容可能な界面活性剤、例えば石鹸剤もしくは洗剤、懸濁剤、例えばベクチン、カルボマー、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、もしくはカルボキシメチルセルロース、または乳化剤及び他の医薬アジュバントの添加を伴ってまたは伴わずに投与することができる。

20

#### 【0344】

油は、いくつかの実施形態では非経口製剤で使用することができ、石油、動物油、植物油、または合成油を含む。油の具体例としては、ピーナッツ、大豆、ゴマ、綿実、トウモロコシ、オリーブ、ワセリン、及び鉱油が含まれる。非経口製剤での使用に好適な脂肪酸には、オレイン酸、ステアリン酸、及びイソステアリン酸が含まれる。オレイン酸エチル及びミリスチン酸イソプロピルは、好適な脂肪酸エステルの例である。

30

#### 【0345】

非経口製剤の特定の実施形態での使用に好適な石鹸には、脂肪アルカリ金属、アンモニウム、及びトリエタノールアミン塩が含まれ、好適な洗剤には、(a)カチオン性洗剤、例えば、ジメチルジアルキルアンモニウムハライド、及びアルキルピリジニウムハライド、(b)アニオン性洗剤、例えば、アルキル、アリアル、及びオレフィンスルホン酸塩、アルキル、オレフィン、エーテル、及びモノグリセリド硫酸塩、及びスルホサクシネート、(c)非イオン性洗剤、例えば、脂肪アミン酸化物、脂肪酸アルカノールアミド、及びポリオキシエチレンポリプロピレンコポリマー、(d)両性洗剤、例えば、アルキル-アミノプロピオネート、及び2-アルキル-イミダゾリン四級アンモニウム塩、ならびに(e)その混合物が含まれる。

40

#### 【0346】

いくつかの実施形態では、非経口製剤は、例えば、約0.5重量%~約25重量%の治療剤を溶液中に含有するだろう。防腐剤及び緩衝液を使用してよい。注射部位での刺激を最小限に抑えるまたは排除するために、かかる組成物は、例えば、約12~約17の親水性-親油性バランス(HLB)を有する一つ以上の非イオン性界面活性剤を含有し得る。かかる製剤中の界面活性剤の量は、典型的には、例えば、約5重量%~約15重量%の範囲であるだろう。好適な界面活性剤には、ポリエチレングリコール、ソルビタン脂肪酸エステル、例えばソルビタンモノオレート、及びプロピレンオキシドとプロピレングリコールとの縮合によって形成される疎水性塩基とのエチレンオキシドの高分子量付加物が含

50

まれる。非経口製剤は、アンプル及びバイアルなどの単位用量または複数用量の密封コンテナで提供することができ、注射のために、使用直前に、滅菌液体賦形剤、例えば水の添加のみを必要とするフリーズドライ（凍結乾燥）状態で保管することができる。即時注射溶液及び懸濁液は、前述の種類の滅菌散剤、顆粒剤、及び錠剤から調製することができる。

#### 【0347】

特定の実施形態では、注射可能な製剤が、本明細書で提供される。注射可能な組成物のための有効な医薬担体の要件は、当業者に周知である（例えば、Pharmaceuticals and Pharmacy Practice, J. B. Lippincott Company, Philadelphia, PA, Banker and Chalmers, eds., pages 238 - 250 (1982)、及びASHP Handbook on Injectable Drugs, Toissel, 4th ed, pages 622 - 630 (1986)を参照されたい）。

#### 【0348】

いくつかの実施形態では、局所製剤が、本明細書で提供される。経皮薬物放出に有用なものを含む局所製剤は、皮膚への適用のために本明細書で提供される特定の実施形態の状況において好適である。いくつかの実施形態では、治療剤は、単独で、または他の好適な成分と組み合わせて、吸入を介して投与されるエアロゾル製剤にすることができる。これらのエアロゾル製剤は、ジクロロジフルオロメタン、プロパン、窒素などの加圧された許容可能な推進剤に入れることができる。それらはまた、ネブライザーまたはアトマイザーなどの非加圧調製物用の医薬品として製剤化され得る。かかる噴霧製剤も、粘膜を噴霧するために使用され得る。

#### 【0349】

特定の実施形態では、本明細書で提供される治療剤は、包接複合体、例えばシクロデキストリン包接複合体、またはリポソームとして製剤化することができる。リポソームは、治療剤が特定の組織を標的とするのに役立つ。リポソームは、治療剤の半減期を延長するために使用することもできる。リポソームを調製するために多くの方法が利用可能であり、例えば、Szoka et al., Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 9, 467 (1980)ならびに米国特許第4,235,871号、同第4,501,728号、同第4,837,028号、及び同第5,019,369号に記載のとおりである。

#### 【0350】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される治療剤は、組成物の送達が処置される部位の感作の前に、それを引き起こすのに十分な時間で起こるように、時間放出、遅延放出、または持続放出送達システムで製剤化される。かかるシステムは、治療剤の反復投与を回避することができ、それにより、対象及び医師に対する利便性が増加し、本明細書で提供されるある特定の組成物の実施形態に特に好適であり得る。一実施形態では、本発明の組成物は、そこに含有されるcircRNAの徐放に好適であるように製剤化される。かかる徐放性組成物は、対象に、延長された投薬間隔で好都合に投与され得る。例えば、一実施形態では、本発明の組成物は、対象に、1日2回、毎日、または隔日で投与される。ある実施形態では、本発明の組成物は、対象に、週2回、週1回、10日毎に、2週毎に、3週毎に、4週毎に、月1回、6週毎に、8週毎に、3か月毎に、4か月毎に、6か月毎に、8か月毎に、9か月毎に、または毎年投与される。

#### 【0351】

いくつかの実施形態では、本発明のポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質は、持続量の時間にわたって、標的細胞によって産生される。例えば、タンパク質は、投与後1時間より長く、4時間より長く、6時間より長く、12時間より長く、24時間より長く、48時間より長く、または72時間より長く産生され得る。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、投与から約6時間後にピークレベルで発現される。いくつかの実施形態では、ポリペプチドの発現は、少なくとも治療レベルで持続される。いくつかの実

施形態では、ポリペプチドは、少なくとも治療レベルで、投与後1時間より長く、4時間より長く、6時間より長く、12時間より長く、24時間より長く、48時間より長く、または72時間より長く発現される。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、患者の組織（例えば、肝臓または肺）において治療レベルで検出可能である。いくつかの実施形態では、検出可能なポリペプチドのレベルは、投与後1時間より長く、4時間より長く、6時間より長く、12時間より長く、24時間より長く、48時間より長く、または72時間より長い時間にわたる、circRNA組成物からの継続的な発現からである。

#### 【0352】

特定の実施形態では、本発明のポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質は、正常な生理学的レベルを超えるレベルで産生される。タンパク質のレベルは、対照と比較して増加し得る。いくつかの実施形態では、対照は、正常な個体または正常な個体の集団におけるポリペプチドのベースライン生理学的レベルである。他の実施形態では、対照は、関連するタンパク質もしくはポリペプチドに欠損を有する個体または関連するタンパク質もしくはポリペプチドに欠損を有する個体の集団におけるポリペプチドのベースライン生理学的レベルである。いくつかの実施形態では、対照は、組成物が投与される個体における関連するタンパク質またはポリペプチドの正常レベルであることができる。他の実施形態では、対照は、1つ以上の比較可能な時点での、他の治療的介入時、例えば、対応するポリペプチドの直接注射時のポリペプチドの発現レベルである。

10

#### 【0353】

特定の実施形態では、本発明のポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質のレベルは、投与後3日、4日、5日、または1週間以上で検出可能である。組織（例えば、肝臓または肺）においてタンパク質の増加したレベルが観察され得る。

20

#### 【0354】

いくつかの実施形態では、本方法は、本発明のポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質の持続的な循環半減期をもたらす。例えば、タンパク質は、タンパク質またはタンパク質をコードするmRNAの皮下注射を介して観察される半減期よりも長い時間または日数にわたって検出され得る。いくつかの実施形態では、タンパク質の半減期は、1日、2日、3日、4日、5日、または1週間以上である。

#### 【0355】

多くのタイプの放出送達システムが利用可能であり、当業者に公知である。それらは、ポリマーをベースとしたシステム、例えばポリ（ラクチド-グリコリド）、コポリオキサレート、ポリカプロラクトン、ポリエステルアミド、ポリオルトエステル、ポリヒドロキシブチル酸、及びポリ無水物を含む。薬剤を含有する前述のポリマーのマイクロカプセルが、例えば、米国特許第5,075,109号に記載されている。送達システムはまた、コレステロール、コレステロールエステル及び脂肪酸などのステロールまたはモノ-ジ-及びトリ-グリセリドなどの中性脂肪を含む脂質；ヒドロゲル放出システム；シラスティックシステム；ペプチドをベースとしたシステム；ワックス被覆剤；従来の結合剤及び賦形剤を使用する圧縮錠剤；部分的に融合した移植片；などを含む非ポリマーシステムを含む。具体例としては、これに限定されないが、(a) 侵食システム、ここで、活性組成物は、米国特許第4,452,775号、同第4,667,014号、同第4,748,034号、及び同第5,239,660号に記載のものなどのマトリックス内の形状にて含有される、ならびに(b) 拡散システムが含まれ、ここで、活性成分は、米国特許第3,832,253号及び同第3,854,480号に記載されるようなポリマーから制御された速度で浸透する。加えて、ポンプをベースとしたハードウェア送達システムを使用することができ、そのうちいくつかは、移植に適合している。

30

40

#### 【0356】

いくつかの実施形態では、治療剤は、ターゲティング部分に連結部分を通して直接的または間接的に複合することができる。治療剤をターゲティング部分に複合するための方法は、当該技術分野で公知である。例えば、Wadwa et al., J. Drug Targeting 3:111 (1995) 及び米国特許第5,087,616号を参照

50

されたい。

【0357】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される治療剤は、治療剤が、それが投与される体内に放出される様式が、体内の時間及び位置に関して制御されるように、デポー形態へと製剤化される（例えば、米国特許第4,450,150号を参照されたい）。治療剤のデポー形態は、例えば、治療剤及びポリマーなどの多孔質または非多孔質物質を含む埋め込み型組成物であることができ、治療剤は物質によって封入される、もしくは物質全体に拡散される、及び/または非多孔質物質の分解。デポーは次に体内の所望の位置に埋め込まれ、治療剤は、埋め込み物から所定の速度で放出される。

【0358】

治療方法

特定の態様では、病態、例えば、ウイルス感染症を治療及び/または予防する方法が、本明細書で提供される。

【0359】

特定の実施形態では、本明細書で提供される治療剤は、1つ以上の追加の治療剤と（例えば、同じ薬学的組成物にて、または別個の薬学的組成物にて）共投与される。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される治療剤を最初に投与することができ、1つ以上の追加の治療剤を次に投与することができ、またはその逆も可能である。代替的に、本明細書で提供される治療剤及び1つ以上の追加の治療剤を同時に投与することができる。

【0360】

いくつかの実施形態では、対象は、哺乳動物である。いくつかの実施形態では、本明細書で言及される哺乳動物は、げっ歯目の哺乳動物、例えばマウス及びハムスター、またはウサギ目（Lagomorpha）の哺乳動物、例えばウサギを含むがこれに限定されない任意の哺乳動物であり得る。哺乳動物は、ネコ科（ネコ）及びイヌ科（イヌ）を含む食肉目からであり得る。哺乳動物は、ウシ科（ウシ）及びイノシシ科（ブタ）を含む偶蹄目、またはウマ科（ウマ）を含む奇蹄目からであり得る。哺乳動物は、霊長目、セボイド目、もしくはシモイド目（サル）、または類人猿目（ヒト及び類人猿）であり得る。好ましくは、哺乳動物は、ヒトである。

【0361】

配列

（表1）IRES配列

10

20

30

40

50

配列番号	IRES	配列
1	EMCV-A	ccccctcctccccccccctaacgttactggccgaagccgcttgaataaggccggtgtgctttgtct atatgttattttccaccatattgccgtctttggcaatgtgagggcccggaaacctggcctgtcttctgac gagcattcctaggggtcttccccctcgcgcaaaaggaatgcaaggtctgtgaatgtcgtgaaggaagc agttcctctggaagcttctgaagacaacaacgtctgtagcgacccttgcaggcagcgggaaccccc acctggcgacaggtgcctctcgggcaaaaagccacgtgtataagatacacctgcaaaggcggcaca ccccagtgccacgtgtgagttggatagttgtgaaagagtcaaatggctctcctcaagcgtattcaaca aggggctgaaggatgccagaaggtacccattgtatgggatctgatctggggcctcgggtcacatgc ttfacatgtttagtcgaggttaaaaaacgtctaggccccccgaaccacggggacgtggttttcttga aaaacacgatgataatatggccacaacc
2	EMCV-B	ctccccctccccccccctactatactggccgaagccacttgaataaggccggtgtgctttgtctacat gctattttctaccgcaattaccgtcttatggtaatgtgagggccagaacctgacctgtcttctgacgaac actcctaggggtcttccccctcgcgcaaaaggagtgaaggctgttgaatgtcgtgaaggaagcagttc ctctggaagcttctaaagacaacaacgtctgtagcgacccttgcaggcagcgggaacccccacct ggtgacaggtgcctctcgggcaaaaagccacgtgtataagatacacctgcaaaggcggcacaacccc agtgccacgtgtgagttggatagttgtgaaagagtcaaatggctctcctcaagcgtattcaacaaggg gctgaaggatgccagaaggtacccattgtatgggatctgatctggggcctcgggtcacgtgctttac acgtgtgagtcgaggtgaaaaacgtctaggccccccgaaccacggggacgtggttttcttgaaaa ccacgattacaat
3	EMCV-Bf	ttgccagtctgctcgatcgcaggtgggtccgtgactaccactcccccttcaacgtgaaggctacg atagtccagggcggtactgccgtaagtccaccccaacaacaacaacaactccccctc cccccttactatactggccgaagccacttgaataaggccggtgtgctttgtctacatgctattttcta ccgcaattaccgtcttatggtaatgtgagggccagaacctgacctgtcttctgacgaacactcctagg ggctttccccctcgcgcaaaaggagtgaaggctgttgaatgtcgtgaaggaagcagttcctctggaag cttctaaagacaacaacgtctgtagcgacccttgcaggcagcgggaacccccacctgggtgacagg tgctctcgggcaaaaagccacgtgtataagatacacctgcaaaggcggcacaaccccagtgccacg ttgtgagttggatagttgtgaaagagtcaaatggctctcctcaagcgtattcaacaaggggctgaagg atgccagaaggtacccattgtatgggatctgatctggggcctcgggtcacgtgctttacacgtgttga gtcgaggtgaaaaacgtctaggccccccgaaccacggggacgtggttttcttgaaccacgatt acaat

10

20

30

40

50

4	EMCV-Cf	<p>ttgccagtctgctcgatatcgaggctgggtccgtgactaccactcccccttcaacgtgaaggctacg  atagtccaggggggtactgccgaagtgcaccccaaaacaacaacccccctctccctccT  ccccccctaacgttactggccgaagccgcttgaataaggccggtgtgcgtttgtctatatgtattttcca  ccatattgccgtcttttggcaatgtgagggcccggaaacctggccctgtcttcttgacgagcattcctagg  ggctttccccctcgcgcaaaaggaatgcaaggctgttgaatgtcgtgaaggaagcagttcctctggaag  cttctgaagacaacaacgtctgtagcgacctttgcaggcagcggaaacccccacctggcgacag  gtgcctctgcggccaaaagccacgtgtataagatacacctgcaaaaggcggcacaacccccagtgccac  gttgtgagttggatagttgtgaaagagtcaaatggctctcctcaagcgtattcaacaaggggctgaag  gatgccagaaggtacccattgtatggatctgatctggggcctcgggtgcacatgctttacatgtgtta  gtcgaggttaaaaaacgtctagccccccgaaccacggggacgtggttttctttgaaaaacacgatg  ataat</p>	10
5	EMCV pEC9	<p>cccccccctaacgttactggccgaagccgcttgaataaggccggtgtgcgtttgtctatatgtattttc  caccatattgccgtcttttggcaatgtgagggcccggaaacctggccctgtcttcttgacgagcattccta  ggggctttccccctcgcgcaaaaggaatgcaaggctgttgaatgtcgtgaaggaagcagttcctctgga  agcttctgaagacaacaacgtctgtagcgacctttgcaggcagcggaaacccccacctggcgaca  gggtcctctgcggccaaaagccacgtgtataagatacacctgcaaaaggcggcacaacccccagtgcca  cgttgtgagttggatagttgtgaaagagtcaaatggctctcctcaagcgtattcaacaaggggctgaa  ggatgccagaaggtacccattgtatgggatctgatctggggcctcgggtgcacatgctttacatgtgttt  agtcgaggttaaaaaacgtctagccccccgaaccacggggacgtggttttctttgaaaaacacgat  gataat</p>	20
6	ピコビル ナウイ ルス	<p>gtaaattaaatgctatttacaataaataacagaaaggagagatgttatgaaccggtttacaaggttcat  acatcgaaaatagcactacctggggcagccgacacactaacatcgtctgtttaaccagaaggttactg  aaaggaggtattta</p>	
7	HCV QC64	<p>acctgcccctaataaggggcgacactccgcatgaatcactcccctgtgaggaactactgtcttcacgca  gaaagcgtctagccatggcgtagtatgagtgctgtacagcctccaggccccccccctccgggagag  ccatagtggtctcggaaccggtgagtacaccggaattgccgggaagactgggtcctttcttgataaa  cccactctatcccggacatttggcggtgccccgcaagactgctagccgagtagcgttgggttgcga  aaggccttgggtactgcctgatagggtgcttgcgagtgccccgggaggtctcgtagaccgtgcatc</p>	30
8	ヒトコサ ウイルス E/D	<p>ctacaagctttgtgtaacaacttttgttggcttttctcaagcttctcacaatcagccccaaagatgtc  ctgaaggtacccgttatctgaggatgagcaccatcgactaccggacctgcaaaatttgcacaacgc  atgtggtatcccagccccctctcggggaggggctttgtcactcagcacagatctgatcagga  gatccacctccggtgctttacaccgggctgtgatttaaaaattgccaaggcctggcgcaacaacta  ggggactaggtttccttatattttaaagctgcaat</p>	40

9	ヒトコサウ ウイルス F	gtcttaggacgacgcatgtggtatcccagccccgcctacattggcgggggctttgaagcaccaga cactggatctgatcaggaggaggtagctgctffacagcccctfataaaattgccaaggtccggc caccaacctaggggactaggttttcctttatttttaattgtcatt
10	ヒトコサウ ウイルス JMY	acatgggggagactgcatgtggcagcttgaacgtgtggttgacgtctaccttatatggcagtggtg ggagtactgcaaagatgcaccgtgctttacacggttttgaacccccacaccggctgttgacgctcgt agggcagcaggtttatttccattaaaattcttactttctagctgcatgagttctattcatgcagacggagt atactcccgttcttcttggacaggttgcctccacgccccttgggacttfaaggtgaccaagtactgg tgttggaggtgaagatagagagtccttgggaatgcatgtggctgtgccaggggttagcagatgc cattcgtgtgtcggatttctctcgtggtagacacgagcctcacaggccaaaagccccgtccgaaag gaccggaatggtggagtgacctgactccccctgcatagtttggattaggaactgaggaattct gtcataaatctctatcacatcaggcccaagatgtcctgaaggtaccctgtgtatctgaggatgagca ccaccgactaccggacttgcaatagcagacacatgtggtgcccagccccacctctcagaggtgg ggctttgctcactcagcagcagatctgatcaggagccccgctcgtgtgctttacactcgcagcgggt taaaaattgccaagcctggcacaacaacctaggggactaggttttctattttgtaaatatgtcaat
11	ライノウイ ルス NAT001	gtgacaatcagccagattgtaacggtaagcacttctgttccccggctaccctgtatacgttccacc gaggcgaaaagttaggttatcgttatccgcaaagtcctacgagaagcctagtagcactttgaagc ctatggctggctcgtcaactgttaccagcagtagacctggcagatgaggctagatgttcccacca gcgatggtgatctagcctcgtggctgacctcactctattgagtggaagccagaaaagtgacaaa gggtggaagagcctattgtctcactttgagtcctccggcccctgaatgtggttaacctaaccctga gctgttgcatgtaatcaacatgtctgcagtcgtaatgggcaactatgggatggaaccaactcttgg gtgtccgtgttctgttttcttatgcttgcctatggtgacaactgtagttattacattgttacc
12	HRV14	ttaaacagcggatgggtatcccaccattcaccattgggtgtagtactctggtactatgtaccttgt acgcctgttttcccccaaccaccttcttaaaattcccacctgaaacgttagaagcttgacattaa gtacaataggtggcgccatatccaatggtgtctatgtacaagcacttctgttcccaggagcaggtat aggctgtaccactgcaaaaagccttaaccgttatccgccaaccaactacgtaacagttagtaacat cttgttctgactggacgttcgatcagggtgattttcctccactagtttggctgataggctaggaattc cccacgggtgaccgtgtcctagcctgcgtggcgccaaccagcttatgctgggaccccctttaag gacatggtgtgaagactcgcagtgtgcttgggtgtgagtcctccggcccctgaatgcggttaacctaa ccctagagccttatgccacgatccagtggtgtaaggctgtaatgagcaattccgggacgggaccga ctactttgggtgtccgtgttctcattttctcatattgtcttatggtcacagcatatatacatatactgtg atc

10

20

30

40

50

13	HRV89	<p>ttaaactgggagtggtgttcccactcactccaccatgcggtgtgtactctgttattacggtaactttg  tacgccagttttcccaccctcccataatgtaacttagaagttgtacaatatgaccaataggtgacaat  catccagactgtcaaaggcaagcactctgtttccccgggcaatgaggatagctttaccaaggcaaa  aaccttagagatcgttatccccacactgcctacacagagcccagttacattttgatataattgggttgct  gtccctgcaaaccagcagtagacctggcagatgaggctggacattccccactggcgacagtggtc  cagcctgcgtggctgctgtcaccctctgggtgagaagcctaattattgacaagggtgaagagcc  gcgtgtgctcagtgcttctccggcccctgaatgtggctaaccttaacctgcagccgtgccataa  tccaatgggttgcggctgtaatgcgtaagtcgggatgggaccaactactttgggtgtccgtgttctctg  ttttctttgattgcattttatggtgacaattatagtgatagattgtcatc</p>	10
14	HRVC-02	<p>ttaaactgggtacagggtgttcccacctgtatcaccacgtggtgtggtgctctgtattccggtaactt  gcacgccagttgccaccctcaccctgctgaacttagaagctaacaactgaccaacaggcgggtgt  aaaccataccacttacggcaagcactcctgtttccccgggatgcgaggaatagactcctacagggtga  agcctcaagtatcgttatccgattggactacgcaaagcttagtagtgcctfgaaagtccttgggtgct  gctccgctagttcccctagtagacctggcagatgaggcaggacactccccactggcgacagtggtcc  tgctgcgtggctgctgcaccccttaggggtgcaagccaagtacagacaagggtgaagagcc  ccgtgtgctaccaatgagtcctccggcccctgaatcgggctaaccaacccacagctattgcacaaa  gccagtgtgtatgtagtcgtaatgagcaattgtgggacggaaccgactactttgggtgtccgtgttctctt  tattcttatcattctgcttatggtgacaactgtgaaatagttgttacc</p>	20
15	HRV-A21	<p>taaaactggatccagggtgttcccacctggatctcctattgggagttgtactctattattccggtaattttgta  cgccagttttatcttcccctcccattgtaacttagaaggttatcaatacgaaccaataggtgtagttag  ccaaactaccaaaggcaagcactctgtttccccgggcaagttgatagctccaacagggcaaaaac  aactgagatcgttatccgcaaagtcctacgcaaagcctagtaaacctttgaagattatggttggtcgt  tccgctatttcccatagtagacctggcagatgaggctagaaatccccactggcgacagtgctctagcc  tgctggctgctgcgacccctgggtgcaagccatacattggacaagggtgaagagccccgtg  gtcactttgagtcctccggcccctgaatgtggctaaccttaacctgcagctagtgcatgtaaccaac  atgtgctagtcgtaatgagtaattcggggacgggaccaactactttgggtgtccgtgttctctctt  taatattgcttatggtgacaatatatagctatatatattgacacc</p>	30

10

20

30

40

50



16	サリウイルス A SH1	<p>ttccctgcaaccattacgcttactcgcgatgcatgagtggtgcatgtgtgaacaaacagctaca  ctcacatgggggcggttttcccgccctacggcttctcgcgaggccaccctccccttctccat  aactacagtgcfttggtaggaagcactcctgatcccccggaagctgctcacgtggcaactgtg  ggaccagacaggtatcaaaggcaccggcttccgccttcaggagtacccctgtagcaatt  ctagtagggctctgcttgggtccaacctccccaaatgcgcgctcgggagtctctcccact  cacctagtatcctctcatgtgtgcttgggtcagcatatctgagacgatgtccgctgtcccagacc  agtccagtaatggacggccagtgtgcgtagtcgtctccggcttgcggcgcatgtttggtgaa  ccggtggggaaggttgggtgcccacgccctactcaggggatacctcaaggcaccaggaa  tgccagggaggtacccgctcagcgggatctgacctgggtaaatgtctcggggggtctt  cttggcccacttctcagtactttcagg</p>	10
17	サリウイルス FHB	<p>acatgggggctcggcagggctcggcccaccgacagaagaatgccgtcatctgtcctcatta  cccgtatccttcccctccccgcaaccaccacgcttactcgcgcacgtgtgagtggcacgtgct  tgtcaaacagctacaccacacctcggggcgggttgtcccgcctcgggttctcgcggaa  ccccctcccctctctcttctatccgccctcactccataactacagtgcfttggtagtgagc  accctgacccccgcggaagctgtaacgtggcaactgtgggatccaggcaggtatcaaagg  caccggcttccgccttcaggagtatctcgggtgaattccggtagggctctgcttgggtcca  acctccccaaatgcgcgctcgggagtgtcttcccactcatcttagtaacctctcatgtgtg  cttgggtcagcatatctgaggcagcttccgctgtcccagaccagtcagcaatggacggccagt  gtgcgtagtcgttccgggttccggcgcatgttggcgaacgctgaggtgaaggttgggtgccc  aacgccgtaatttgggtgatactcaagaccaccagggaatgccaggaggtacccacttcggt  gggatctgacctgggctaattgtctacgggtgttcttcttcttccacttctttttctggcatg</p>	20
18	サリウイルス NG-J1	<p>tatggcaggcgggcttggacggctcggcccaccacagcaagaatgccatcatctgtctca  ccccaaatttccccttctcccctgcaaccattacgcttactcgcgatgcatgagtggtgcatgtg  ttgaacaaacagctacactcacatggggcgggtttcccgcctacggcctctcgcgaggcca  ccccctccccttataactacagtgcfttggtaggaagcactcctgatcccccggaagctgct  cacgtggcaactgtgggaccagacaggtatcaaaggcaccggcttccgcctcaggagt  atccctactagtgaattctagcgggctctgcttgggtccaacctccccaaatgcgcgctcggg  agtgtcttcccactcacctagtatcctctcatgtgtgtgcttgggtcagcatatctgagacgatg  tccgctgtcccagaccagtcagtaatggacggccagtgcgtgtagtcgttccggcttgcgg  ggcatgttgggaaccggtggggaaggttgggtgcccacgccctacttgggtgacacctc  aagaccaccagggaatccaggaggtacccacctcacgggtgggatctgacctgggctaatt  gtctacgggtgttcttcttccacttcttcttctgttcacg</p>	30

10

20

30

40

50

19	ヒトパレコ ウイルス 1	<p>tftgaaaggggtctcctagagagcttggccgtcggccttataccccgacttctgagtttcttagga  gagccctttccagccctgaggcggctggtaataaaagcctcaaacgtaactaacacctaagaag  atcatgtaaaccctatgcctggctccactattcgaaggcaacttgcaataagaagagtgatcaag  acgctaaagcatagagacagtttttcttaaccacattgtgtggggggcagatggcgtgccata  actctaagttagataaccacgcttggaccttattgctcacacagccatcctctagtaagttgtgaga  cgtctggtgacgtgtgggaacttattggaacaacattttgctgcaagcatcctactgccagcggaa  aacacctggtaacaggtgcctctggggccaaaagccaaggttaacagacccttagattggttct  aacctgagatgtgtggaagatatttagacctgctgatctggtagttatgcaaacactagttgtaagg  cccatgaaggatgccagaaggtaccgtaggtaacaagtacactatggatctgattggggcca  gatacctctatcttggtagctggtaaaaaacatctaattgggccaaccgggggggatccccggtt  cctctattctatcaatgccact</p>	10
20	クロヒウイ ルス B	<p>gtataagagacaggtgttgccttcttctggactggcatcttggaccaacccccctttccccagcc  atgggttaaatggcaataaaggacgtaacaactttgtaaccattaagcttgaatgttaaccactaag  ctttgtcacataatgtaacctcaagctttagtccagcaggaggttgcagctttagccgaaat  ggggctcgacccccatagtaggatactgattttgcaattcattgtggacctgcaactctacacata  gaggctttgtcttgcataaacacctgagtacagtgtgtacctagaccctatagtagggaggacct  tttttctcaataacctacataataggctagggtggcatgcccaattgcaagatcccagactgggg  gtcggctgggcagggttagatccctgttagctactgcctgatagggtggtgtcaacctatgtagtt  taaattgagctgtcatatacc</p>	20
21	Yc-3	<p>actgaagatcctacagtaactactgccccaatgaacgccacagatgggtctgctgatgactacatc  ttagtctagttgaggttgaagtgagccggttttagaagaaccagttctgaacattatcatcccagc  atctattctatacgcacaagatagatagctatcagcagacacatctgtgctactgctgatagagttgcg  gctggtaacttagattggtataaccagttgagtgga</p>	30
22	ロザウイル ス M-7	<p>tatgcatcactggacggcctaacctcggctcgtggcttcttccgattcagcgtaccaggttctggt  ctcggcaggcgtgattagtaggtgactgtctaagtgaagacagcagtgctctctgtgaaaagttgat  gacactctcagggtttagcgcactcaaggctagcggattccccgtgtggaacacacgcctcta  ggcccagaaggcacgggttgacagcacccttgagtggtggtcttccccaccagcacctgatttg  tggattctcctagtaacggacaagcatggctgcttaagcattcagtgctccgggctgaaggat  gccagaaggtaccgcaggtaacgataagctcactgtggatctgatctggggctgcccggctgggt  gtcttccaccagccaaaaccgtaaacggtagtcgagttaaaaacgtctagccccaccccc  ccagggatggggggttcccttaaacctcacaagtcaac</p>	40

23	シャンバウイルス A	<p>tgaaaaggggcgagggtgggtggtggtactaaataccaccatcgccctgcacttccctttccc  tgtggctcagggtcacttagccccctcttgggtaccagtagtttctaccctgggcacagggtaac  tatgcaagacggaacaacaatctcttagtccccctcgcgatagtgggctcgacccccatgttagg  agtggataagggacggagtgagccgatacggggaagagtgtcggtcacaccttaattccatgagc  gctgcaagaaggaagctgtgaacaatggcgacctgaaccgtacacatggagctccacaggcatg  gtactcgttagactacgcagcctggtgggagtgggtataccctgggtgagccgccagtgaatggga  gttactggftaacacacactgcctgatagggtcagggcctctgtccccgccgtaatgaggtagac  catatgcc</p>	10
24	パシウイルス A	<p>gcggtggatattctggccgtgcaactgctttgaccagtggctctgggtaacttagccaaagtgtcct  tctcccttccctattatattatgctttatggctttgtctgtttagttatataataagatccttccgccgata  tagacctcgacagtctagttaggaggattggtgatattaattgcccagaagagtgacctgacac  atagaaacatgagtacatgtgtatccgtggaggatcgccgggactggattccatatcccattgcca  tcccaacaagcgagggtatacccactatgtgcacgtctgcagtgaggagtctgcagatttagtcatac  tgctgatagggtgtggcctgcactctgggtactcaggctgttatataat</p>	20
25	パシウイルス A2	<p>gctggacttctggctgcgcaactgctttaaccagtggctctgggtacttagccaaaaccccttcc  ccgtaccctagtgtgtgtgtattattttgtgtgtttttaaattttatataagatccttccgccgata  tagacctcgacagtctagttaggaggattggtgatattaatgcccagaagagtgacctgacac  atagaaacatgagtacatgtgtatccgtggaggatcgccgggactggattccatatcccattgcca  tcccaaaaacggagggtatacccctatgtgcgctctacagtgggaatctgtagatttagtcatac  gcctgatagggtgtggcctgcactctgggtactcaggctgttatataat</p>	20
26	エコーウイルス E14	<p>ttaaacagcctgtgggtgttccatccacagggccactgggcgccagcactctggtattcggta  ccttagtgcgctgtttatataccgtccccaaacgtaacttagacgatgtaacgaagaccaata  gtaagcgcagcacaccagctgtgtccggtaagcacttctgttaccgggaccgagtatcaataag  ctactcacgtggctgaaggagaaaacgttctgttaccggaccaattactcaagaacctagtaacacc  atgaagggtgcgaggttctgctccgcacaacccagtgtagatcaggtcgatgagtcaccgcattc  cccacgggtgaccgtggcgggtggctgcgctggcggcctgccatggggaaacccatgggacgctt  caatactgacatggtgcaagagctattgagctaatggtagtctccggcccctgaatcggtgtaat  cctaactgcggagcagatacccacacaccagtgggcagtctgtcgtaacgggcaactctgcagcg  gaaccgactacttgggtgtccgtgttctttatccttatactggctgcttatggtgacaattgagagat  gttaccatagctattggattggccatccgggtgacaaatagagcaattgtgtattgttgggttctg  gccattaaattacaaggttctaaacacccttaattcttattatagcattcaacacaacaaa</p>	30

10

20

30

40

50

27	ヒトパレコウ ウイルス 5	<p>gtacattagatgctcatctgcaactttagcaataaattacctccaatgtcattaccaacttccctac ctttcactaacacctaagacaacaagtacatgcctggctccactatfcgaaggcaacttgcaat aagaagagtggaaatlaagacgcttaaagcatagagctagttatcttttctaaccacaagtttttg gggtggcagatggcgtgccataactctattagttagataacatgctgtggatcttatgtcacaca gccatcctctagtaagttgataaggtgtctggatgtgggaactcacatgaaccattaattacc gtaaggatcctatagccagcgggaatcacatctggtagacagatgcctctggggccgaaagccaag gtttaacagacctataggattggttcaaacctgaattgatgtggattgtatagctgttgatc tggtaacagtgtcaactagtgtgaagcccacgaaggatgccagaaggtagccgtaggtaac aagtgcacatgtagctgtggggccagctacctctatcatggtgagttggttaaaaaacgtcta gtgggccaaccaggggggatccctggttcttttacctaatcaagccact</p>	10
28	Aichi ウイル ス	<p>ttgaaaaggggtggggggcctcggccccctaccctctttccgggtgctgtgcccggacc accgttactccattcagcttctcggaaactgttcggaggaatfaaacgggcaccataactcccc acccccctttgtaactaagtatgtgctcgtgatcttactcccacggaacggaccgatccgttg gaacaaacagctaggtccacatcctccctccctgggagggccccgccctccacatcctcc ccccagcctgacgtatcacaggctgtgtgaagcccccggaagctgctcacgtggcaattgtgg gtcccccttcatcaagacaccaggcttctccttaaggctagccccggcgtgtgaattcacgtg ggcaactagtgtgctactgtgcctcccaatctcggccgaggatgctgttcccaagccaaac ccctggcccttactatgtgcctggcaagcatatctgagaaggtgtccgctgtgctgccaactg gtgacagggtccccaggtgtgtaaccttctccgtcctcggacggtagtgattggttaagattgtg gtaagggtcatgtccaacgccctgtgcgggatgaaaccttactgccctaggaatgccaggcag gtacccacctccgggtgggatctgagcctgggctaattgtctacgggtagtttattccaatcctt tatgtcggagtc</p>	20
29	A 型肝炎ウイ ルス HA16	<p>ttcaagaggggtctccggagtttccggaaccctcttggaaagtcattggtgaggggacttgatac ctcaccgccgttgcctaggtataggctaaatttcccttccctgtccttccctatttctttttgt ttgtaaatattaattcctgcaggttcagggttcttaactgtttctctataagaacactcaattttcacgc tttctgtctcttcttccagggtctcccctgccttaggctctggccgttgcgccggggggtca actccatgattagcatggagctgtaggagctaaattggggacgcagatgttgggacgtcgcctg cagtgtaacttggttcatgaacctcttgcctccacaagggtaggctacgggtgaaacctctt aggctaatacttcaatgaagagatgccttgatagggtaacagcggcgatattggtgagttgtaa gacaaaaaccattcaacgccggaggactggctctcatcagtgatgcattgagggaattgattgt cagggctgtcttaggttaactcagacctctctgtccttagggcaaacactattggccttaaatgg gatcctgtgagagggggtccctccattgacagctggactgttcttggggccttatgtggtttgccc tctgaggtactcaggggcatttaggttttctcattcttaataata</p>	30

30	フォピウイルス	<p>gggagtaaacctcaccaccgttgcggtggttacggctacctatgttgatgtaaatattaattcc  tgcagggtcagggtcttgaattatgtccacgtagtggcactctctaccataagtgcgcctta  gcggaacctttctacacttgatggttaggggttacattatccctgggccttcttgcccttttc  ccctgcactatcattcttccgggctctcagcatgccaatgtccgaccgggctgcccgcggg  ggtaactccatggttagcatggagctgtagccctaaaagtctgacactggaactggactatt  gaagcatacactgtaactgaacatglaactccaatcagatctctacaagggtaggctacggg  tgaacccttaggtaataactcatattgagagatactctgataggttaaggtgctggataatgt  gagtttaacgacaaaaccattcaacagctgtggccaacctatcaggtagatgctttggagc  caagtgcgtaggggtgtgtggaatgctcagtggaaggtgccctcccgaaggtcgtagg  ggtaatcaggggtaggttaggttccacaattacaattgaa</p>	10
31	CVA10	<p>gctctccgatctgggtgttcccaccacagggcccactgggcgccagcactctgattccacg  gaatcttgtgcgctgtttacaaccttccaattgtaacgtagaagcaatacacactactgatc  aatagtaggcatggcgcgccagtcagatgcatgataagcactctgttccccggactgagatc  aatagactgctcacggtggaaggagaaaacgtcgttaccggctaactctcgagaacct  agtagcaccatggaagctgcggagtgttcgctcagcacttccccgtgtagatcaggctgatga  gtcactgcaatccccacggcgaccgtggcagtggtgctgctggcggcctgctatggggca  acctataggacgctctaatgtggacatggtgcgaagagtctattgagctagttagtctccg  gccccgaatgcggctaactcactgcggagcacatgccctcaaccaggaggtggtgtgctg  taacgggtaactctgcagcggaaaccgactactttgggtgtccgtttcctttatccttataatggc  tgcttatggtgacaatcacggaattgttccatatagtctattggattggccatccggtgctaacag  agctattgtatacctattgttgattactcccctatcatacaaatctctgaacactttgtgcttatac  tgaacttaaacacacgaaa</p>	20
32	エンテロウイルス C	<p>ttaaacagctctggggtgttcccacccagggcccacgtggcggccagtacaccggtacc  acggfaccctgtacgctgtttatactcccctccccgtaaactagaagcacgaaacacaagttc  aatagaaggggtacagaccagtagcaccacgaacaagcactctgttccccggtaggtca  catagactgtccccacggtaaaagtactgatccgtatccgctcagctacttccgaaagccta  gtaccacctggaatctacgatgcgttgcgctcagcactgacccccggagttagcttaggctg  atgagtctggacgttccccactggtgacagtggccaggctgctgtggcggcctactgtggtc  caaaaccaggaagctagtagtaacaaggtgtaagagcccactgagctacctgagaatcc  tccggcccctgaatcgggtaatccaaccacggagcaggtaatcgaaccagcggctcagc  ctgtcgtaacgcgtaagtctgtgcccgaaccgactactttgggtgtccgtttcctttatgtatg  gtggctgcttatggtgacaatcatagattgtatcataaagcaattggattggccatccggagtg  agctaaactatctattctctgagtggtgattcgttaccacattctgaacaatcagcctcattag  tgttaccctgtaataagacgatatacagc</p>	30

10

20

30

40

50

33	エンテロウイルス D	<p>ttaaacagctctggggtgttcccacccagaggccacgtggcggctagtactccggtacccc  ggfaccctgtacgcctgtttatactccccttcccagtaactttagaagaataaactaatgttcaac  aggaggggtacaaaccagtaccaccacgaacacacacttctgttccccggtagaagtgcatag  actgtaccacggtgaaagcgatgaatccgttaccgcttaggtacttcgagaagcctagtatcat  cttggaaactctcagatgcgttgcgatcagcactctaccccagtgtagcttgggicgatgagictgga  caccacacccggcgacgtggccaggtgcgttggcggcctacctatggctagcaccatggg  acgctagttgtgaacaagggtgcgaagagcctattgagctacctgagagctctccggcccctgaat  gcggtaatccaaccacggagcaaatgctcacaatccagtgagtggttgcgtaatgcgcaagt  ctgtggcgggaaccgactacttgggtgtccgtgttctttttattatggctgcttatgtgacaat  ctgagattgtatcatatagctattggattagccatccgggtgatatcttgaatttggcataacttttca  caaatctacaacattacactacacttcttgaataattgagacaactcata</p>	10
34	エンテロウイルス J	<p>ttaaaatagcctcagggtgttcccacccagaggccacgtgggtgtagtactctggattacggta  ccttgtacgcctatftatacccccttcccagtaatttagaagcaagcacaaccagttcagtagt  aagcagtacaatccagtactgtaataaagacttctgttaccgggaagggtctatcggtaaagc  tgtaccacggctgaagaatgacactaccgtaaccggctacctacttcgagaagcctagtaatgcc  gttgaagttttatgacttacgctcagcacactacccgtgtgtagtttggctgatgagtcacggca  ctccccacggggcaccgtggccgtggctgcgttggcggccaaccaaggagtgaagctcctg  gacgtcatattacagacatgggtgaagagcctattgagctagggtgtagtctccggcccctgaat  gcggtaatcctaactccggagcatalcgggtgcaaccagcactgggtgttgaataactgaaagtc  tgagcgggaaccgactacttgggtgtccgtgttctttaaactttatggctgcttatgtgacaa  ttaacattgtaccatagctgttgggttggccatccggatttgtataaaaccattctcctgctcctt  gaccttaacacattgtgaactctttaaactcccttttattagcttaataactaaga</p>	20
35	ヒトペギウイルス 2	<p>aactgttgttagcaatgcgcatattgctacttcggtagcctaattggtagggcggccggcacc  ggccccgcaaggcctagtaggacgtgtgacaatgcatgagggatcatgacactgggtgag  cggaggcagcaccgaagtcgggtgaactcactccagtcgaccacctggctggctgttcat  ggagggcatgcccacgggaacgctgatcgtgcaaaggatgggtccctgcactgggtgcatgc  gcgccaccactccgtacagcctgatagggtggcggcgggccccccagtgtagctccgtgga  gcgcaac</p>	30
36	GBV-C GT110	<p>tgacgtgggggggtgatTTTcccccccgactgggtgcaagccccagaaaccgacgcct  atctaagtagacgcaatgactcggcggcactcggcgaccggccaaaagggtggatgggtg  atgacaggggtggtaggtcgtaaatcccggctatcctggtagccactataggtgggtcttaagaga  aggtaagattcctcttacgcctcggcgagaccgcgcacgggtccacaggtgttggcctaccgg  tgtgaataaggggccgacatcaggc</p>	40

37	GBV-C K1737	gacgtgggggggtgatcccccccTTTggcactgggtgcaagccccagaaccgacgcc tattaaacagacgftaagaaccggcgccgaccggcgaccggccaaaaggtggtggtggg tgatgccagggtggttaggtcgtaaaccgggtcatcttgtagccactataggtgggtcttaag ggftggttaaggtccctctggcgcttgggcgagaaagcgcacgggtccacaggtgtggcccta ccgggtgtaataaggggcccgacgtcaggctcgtcgttaaacggagcccactaccacctgggc aaacaacgcccacgtacgggtccacgtgcccttcaatgtctcttgaccaataggttagccgg cgagttgacaaggaccagtgggggctggcggttaggggaagaccctgccgtgccttc ccgggtggagtgggaaatgc	10
38	GBV-C Iowa	tgacgtgggggggtgatccGccccccggcactCggtgcaagccccataaacgacgcc tatctaagtagacgcaatgactcggcgccgactcggcgaccggccaaaaggtggtggtggg tggtgacagggtggttaggtcgtaaaccgggtcatcttgtagccactataggtgggtcttaag agaaggtcaagactcctctgtgcctgcgcgagaccggcgacgggtccacaggtgtggccct accgggtgtaataaggggcccgacgtcaggctcgtcgttaaacggagcccgtaccacctgg gcaaacgacgcccacgtacgggtccacgtgccttca	
39	ペギウイルス A 1220	ttagcaatgcgcatattgctacttcgggtacgcctaattggtaggcggccggcaccggcccc gcaagggcctagtaggacgtgtgacaatgccatcgggatcatgacactgggtgagcggag gcagcaccgaagtgggtgaactcactcccagtcgaccacctggcttggctgctcatggag ggcatgcccacgggaacgtgatcgtgcaaagggtgggtccctgcactgggtgccatgcgcg gcaccactccgtacagcctgatagggtggcgcgggccccccagtgtagctccgtggagc gcaac	20
40	パシウイルス A3	atftctggccgtgtagctgctttgaccagtggtctgggttacttagccaaatccccttcttca ccctftaaattgatggctgtgtgtttgtttgtcttcttaataatataagatcctcccggca tacagacctcagactctgggtgtaggaggggtggtgttattaattgcccagaagagtaccgt gacacatagaaacctaggtacatgttatccgtggaggatcggcgggactggattccatc ccattgccatccaacaagcggagggtataccactatgtgcgcttgcagtggaatctgca aatftagtcatactgctgatagggtggtggcctgcactctgggtactcaggctgttcataat	30
41	サペロウイ ス	ccccccacccttaaggtggtgtatcccacataccccaccctccctccaagtgacgggaaa ctggatttgactaacggcaagtctgaatggtatgattggatacgtttaaaccggcagtagcgtg cgagctatggaaaaatcgcaattgctgatagccatgttagtgacgcgcttcggcgtctccttg gtgattcggcgactggttacaggagagtaggcagtgagctatgggcaaacctctacagtattact tagagggaatgtgcaattgagacttgacgagcgtctctttagatgtggcgcatgctctggcatt accatagtgacttccaggttgggaaacctggactggcctatactacctgatagggtcgcggc tgggccctgtaactagtatagtcagttgaaaccccc	40

42	ロザウイルス B	<p>gtctcttagtctatgcttcagagagcgggtaactgacaccgttctcttgacagcccttctg  gccgctctccggtctcgcacagcgttggcatcatggctagtaggctaagatagtgatgac  tagtgaacagtttggattgttggagttttagcagatgctagtagtgtgtggacctccccacgt  ggtaaacagtgccccacaggccaaaagccaagggtgtgaaagcaccctactagtgccagact  cacccatctgggaactcctctcatgaaaaatctagtaacttttgattcggctattcaaacctctct  agtcaagggtgaaggatgccggaaggfaccgcaggtaacgataagctactgtggatctg  atccggggcttgggtgcgaccgtctgcccggctagccagagttaaaaaacgtctaggcccttc  cacccaagggattggggttcccaatcattgaaagttcact</p>	10
43	バクンサウイ ス	<p>tttgaacgccacctcggagcgaatccggggaccccctccccttttctctcactcttccca  aatftccctctccctgttatttgggttggatttctggacatgactcggacggatctatctcattg  tttgtctgctccaccagtggcatggctgaaagatcaaacactggacgtgactgtaatggcc  aaacgtgcccacaggggaaacctaccggtcgtgtagcggcgggtggacgtgtggacc  ctctccctgctcataaacttgggtaggtaagggtcaagcagccttccgtgaggcgcac  cggatgggtgggaaccaacaaactaggctgtaatggccacctcaggtggatgagctagggt  gctgcacaaaagggactcgaatcgaatcccggcctgtagcctagtgacgtgactcgtagt  tgggaatctacactggcctagtagcagggtgtagccccgttccacgccacctgtttagg  gacaccccccc</p>	20
44	トレモウイ ス A	<p>tttgaagaggcctccggagtgtccggaggtctctttgaccaaccatactgggggggtgtg  tgggacctacctggagtgcacggtatataatgattcccgcagcaaggcgtgctacctg  ccctgacgatggtatcgctcatcatttgccttggtaagcccatagaaacaggcgtcacgt  gccgaaaatcccttgcgtttcacaacatcctaacatgggtgtagtatgggaactgtagt  gggatgattaggatctctgtagaggatagggtgcccattcaatccaggagactctggct  tgacattgggacattgatgaaccggactgggtcagatccgggtgtctgtattgttacgggt  atccgtctggcactgaaagggtattttgggtaatccttctactgcctgatagggtggcgtg  ccgggccacgagagattaagggtgcaatttaac</p>	30
45	ブタパンウイ ス I	<p>gctttgaccagtggctctgggttacttagccaagtccccttctcttatttctactagttatgtgtg  ttgtctgtttgtttttaaattgtatacaagatcctcccgcgacacagacctgcacagtctggt  gtaggagggttggatataaattgcccaaaagagtaccgtgatactggaaccatgagta  catgtgatccgtggagatgccccggactggatccatataccattgccatcccaacaacg  gagggtataccaccacgtgcgcgttgcagtgggaatctgcaaatfagtcatactgcctgata  gggtgtggcctgcacttgggttactcaggctgttcatataat</p>	40
46	PLV-CHN	<p>acatggggtatgtgtctgctgtttgtgaaacaatataaagatccttccgccgatatagacct  cgacagtctagttaggaggttggatagtaactgccccagaagagtaccgtgacacata  gaaacctaggtacatgtgtatccgtggagatgccccggactggatccatataccattgcca  tcccaacaacggagggtataccactatgtcgcgttgcagtgggagcctgcaaatfagtc  tactgcctgatagggtgtggcctgcactctgggttactcaggctgttataat</p>	50

10

20

30

40

50



47	パシウイルス A(より長い)	tgaaaaagtgggtgtgcagctggatttccggctgtgcaactgctttgaccagtggctctgggttactt agccaaattccttcccttatccctattggtttggttgtgtgtgtgtgtttttgtttgtcttaactatatacaag atccttcccgccgatacagacctgcacagtctgggtgtaggaggggtgggtgttattaattgccccaaaa gagtgaccgtgacacgtggaaaccatgagtacatgtgtatccgtggaggatcggcgggactggat tccatatcccattgccatccaacaaacggagggtataaccaccacgtgcgcggtttgagtggggaat ctgcaaatttagtcatactgcctgatagggtgtggcctgcacttgggggtactcaggctgtttataat	
48	シシニウイル ス	gtgtcattaaggtgtgttggagttcgaattagctggttgggtgattagtagaccccctggaggtac ccaattcggatctgaccagggacctgactataccgctccggaattcgggtttaaacaatgaacg tcaccacacaattactttctcattttatttcatcattgtcttctatttaccgattacactcgatttcttggat gttctgagatttccctggttacctggacctcattattgttgtttaccaccagcgcagctgtcccaatt gcttattttgccttacaactcgtcctaataattttctggtgatcgggtgattgagctccggggtat cctgccattcaac	10
49	へパシウイル ス K	gggaacaatggctccgcccggaaacgactctagccatgagctagtagcagtgctgcccaccatta gcacaaaaaccactgactgagccacacccccccggaatcctgagtagacaggacattcgtcggacg acgcatgagcctccatcccagaaaaattgggtataccaccgggtaaggggtggccaccagcggg aatcgggggctggtcactgactatggtacagcctgatagggtgctgccgcagcgtcagtggtatgc ggctgttcatggaac	20
50	へパシウイル ス A	acctcgtgctagggcacgggtcggtgtcagcgtttgcgcttgcagcgtacacgcgtcgtccaacg cggagggaaactcacatcaccatgtgtcactccccctatggagggtccaccccgttacacggaaa tgggttaaccatacccaagtagcgggtatcgggtcctcctagggccccccggcaggtcgaggg agctggaaattcgtgaattcgtgagtagcacgaaatcgcggctgaaactttagccttcggagccga aatttgggcgtgccccacgaaggaaggcggggcggtgttgggcccgcccccttatcccacg gtctgataggatgcttgcgagggcacctgccgtctcgttagaccataggac	
51	BVDV1	gtatacgagaatttgcctaggacctcgtttacaatatgggcaatctaaattataattaggcctaaggga caaatcctcctcagcgaaggccgaaaagaggctagccatgcccttagtaggactagcaaaataagg ggggtagcaacagtgtgagttcgttggatggctgaagccctgagtagcagggtagctcgtcagtggtt cgacgcttcggaggacaagcctcgagataccacgtggacgagggcatcccacagcacatcttaa cctggacgggggtcgtcaggtgaaaacggttfaaccaaccgctacgaatacagcctgatagggtg ctgcagaggcccactgtattgctactgaaaatctctgctgtacatggcac	30

10

20

30

40

50

52	ボーダー病ウイルス	gtatacgggagtagctcatgcccgatacaaaattggatattccaaaactcgattgggftaggagcc ctcctagcgacggccgaaccgtgtaaccatacacgtagtaggactagcagacgggaggactagc catcgtggtgagatccctgagcagctctaaatcctgagtacaggatagtcgtagtcaacgcagg cacggttctgccttgagatgctactgtaggacgagggcatgcccagactgcttfaatctcggcgggg gtcgccgaggtgaaaacacctaaccggtgtggggttacagcctgataggggtgctgcagaggcccac gaataggctagtataaaaatctctgctgtacatggcac
53	BVDV2	gtatacagagattagctaaagtactcgtatattggattggacgtcaacaaatfttaattggcaacgtaggg aaccttcccctcagcgaaggccgaaaagaggctagccatgccctftagtaggactagcaaaagtag ggggactagcggtagcagtgagttcgttggatggccgaaccctgagtacaggggagtcgtcaatg gttcgacactccattagtcgaggagtcctcgatgcatgtggacgagggcatgcccacggcacat cttaaccatgccccgggtgcatgggtgaaagcgtaatcgtggcgttatggacacagcctgatagg gtgtagcagagacctgctattccgctagtaaaaaactctgctgtacatggcac
54	CSFV-PK15C	gtatcagaggttagttcattctcgtatgattattggacaaatcaaaatftcaattggttcagggcctccc tccagcgacggccgaactgggctagccatgccatagtaggactagcaaacggaggactagcc gtagtggcgagctccctgggtgttctaagtcctgagtacagacagtcgtagtgcagctgagc agaagcccacctcgagatgctatgtggacgagggcatgcccagacgcacctaaccctagcggg ggtcgctagggtgaaatcacaccacgtgatgggagtcggacctgataggggtgctgcagaggctcac tattaggctagtataaaaaatctctgctgtacatggcac
55	SF573 ジシストロウイルス	aaaaccgaccccagagatcagaaagtcttgacgcgatctttattagaggacgttgcgctggcgcg agcttfaattagcagacgccaaaaataaacaacaaatgctgatcgcgagacttaattgtagacgatt ggccaaatccgatgtagctttgctgctccagattgccgaaataggagtagtag
56	フーペイピコルナ様ウイルス	ccccaaaacccccctaaactcaacactgtagtgattcatttccgtgcaaaacaaaacattacta cccgcatttatgtaggctctgtgtttctatgacaccttacattaatctctactctgacctactgtttata aaaccgaagacctgaatgaaacgattttccttctttcaaccttaacgaacctctgacggcttgagaa acctgaagtagtaattatgtttaaagaaaggaaagtcaaacgcgatgactcttacatccctattccat accgttgctccacaatgtgagcgatgcgaggtcgggactgcagtattaggggaacgagctacatgg agagttaattatctctcccctctacgggagtctcatgtgagctgtagaaagcggttggcacctctcgtt acctgcctgtacatgatcc
57	CRPV	aaaagcaaaaatgtgatcttgctgtaaatacaatfttgagaggtaataaattacaagtagtgctatfttt gtatfttaggttagctatfttagctttacgttccaggatgcctagtgccagccccacaataatccaggaagcc ctctctcgggttttcagattaggtagtcgaaaaacctaagaaatttacct

10

20

30

40

50

58	サリウイルス A BN5	<p>tttctccttcgaccgccttacggcaggcgggtccgcggacggcttggcctaccgcgacaag  aatgccgtcatctgtccttatcacccatattcttccctcccccaaccatcacgctfactcgcgca  cgtgttgagtggcacgtgcgtgtccaacagttacactcacaccttggggcgggttgcctccgc  cctcgggttcctcgcggaacctcctctctctcctcttctatcgccttcaacttccataactaca  gtgctttgtaggtaagcatcctgaccccccggaagctgccaacgtgcaactgtgggatcc  aggcaggttatcaaaggcaccgggttccgcctcaggagatccctgccggtgaattccgaca  gggctctgcttgggtccaacctcccccaaatgcgcgctgcccggagtgctcttccccaaactcatcta  gtaacctctcatgtgtgcttggcagcatactgaggcgacgttccgctgtccagaccagtcca  gcaatggacgggccagtgctgtagtcgcttccggttccggcgcagtttggcgaacgctga  ggtaaggttgggtgcccgaatgcccgaatttggtagacacctcaagaccaccagggaatgccagg  gaggtagccctcctgggtggatgacctgggctaattgtctacgggttcttctgttccactt  ctctttttctggcatg</p>	10
59	サリウイルス A BN2	<p>tatggcaggcgggcttggtagcgttccgcccaccacagcaagaatgccatcatctgtcctca  ccccatgttcccccttcttccctgcaaccgttacgcttactcgcaggtgcatftgagtggtgcacg  tgtgaataaacagctacactcacatggggcgggttccccccctcggcctctcgcgaggcc  caccctccccctcctccataactacagtcttggtaggtaagcatcctgatcccccggaagc  tgctacgtggcaactgtgggaccagacaggtatcaaaggcaccggcttccgcctcag  gagtatccctgctagtgaattctagtaggctctgcttgggtccaacctcccccaaatgcgcgctgc  gggagtgcttccccaaactaccctagatcctctcatgtgtgtgcttggcagcatactgagacg  atgttccgctgtcccagaccagtccagtaatggacgggccagtgctgtagtcgcttccggcttft  ccggcgcagtttgggaaccgggtgggtaaggttgggtgccaacgcccgtacttgggtgatac  ctcaagaccaccagggaatgccaggaggtagcccgctcacagcgggatctgacctgggcta  atgtctacgggtggttcttctgcttccacttcttctactgttc</p>	20
60	サリウイルス A 02394	<p>tttcgaccgccttatggcaggcgggcttggtagcgttccgcccaccacagcaagaatgccat  catctgtcctacccccattctcccctcctcccctgcaaccattacgcttactcgcagtgcttga  gtggtgcacgtgtgaacaacagctacactcacgtggggcgggttccccccctcggcctct  cgcgaggcccaccttccccctcctccataactacagtcttggtaggtaagcatcctgatccc  cgcggaagctgctcgcgtggcaactgtgggaccagacaggtatcaaaggcaccggcttft  ccgctccaggagtatccctgctagtgaattctagtagggctctgcttgggtccaacctccccaaa  tgcgcgctgcccggagtgcttccccaaactaccctagatcctctcatgtgtgtgcttggcagcat  atctgagacgatgtccgctgtcccagaccagtccagcaatggacgggccagtgctgtagtcgt  cttccggctgtccggcgcagtttgggaaccgggtgggtaaggttgggtgccaacgcccgt  cttgggtgacaactcaagaccaccagggaatgccaggaggtagcccgctcacggcgggatct  gacctgggctaattgtctacgggtggttcttctgcttccatttcttctctgttc</p>	30

40

50

61	サリウイルス A GUT	tatggcaggcgggcttggacggttcggcccaccacagcaagaatgcatcatctgtcctc acccccatttcccttctccctgcaatcatcacgctfactcgcattgagtggtgcatg tgtgaacaaacagctacactcacatggggcggtttcccgccctacggcctctcgcgaggc ccaccttccctcccctataactacagtgtttggcaggtaagcatcctgatccccgcggaa gctgctcacgtggcaactgtggggaccagacaggttatcaaaggcaccggcttccgcctt caggagcatccccactagtgaattctagtggggctctgcttgggtccaacctccccaaatgcg cgctgcgggagtgctcttcccaacctcctagatcctctcatgtgtgtgcttggcagcatatc tgagacgacgttccgtgtcccagaccagtccagtaatggacgggcccagtgctgtagtctgt tccggttgcgggcgatgttggtaaccgggtgggtaagggtggtggtgcccacgcccga cttgggtgacacctcaagaccaccaggaatgccaggagggtaccccgcctcacggcgggat ctgacctgggctaattgtctacgggtggttcttcttcttccacttcttct	10
62	サリウイルス A CH	ttctctgaaccattacgcttaatcgcattgagtggtgcatgtgtgaacaaacagctac aatcacatggggcggttttcccgccccacggcttctcgcgaggccccatccctcccttttcc cataactacagtgtttgtaggtaagcatccgatctcccgcggaagctgctcacgtggcaact gtggggaccagacaggttatcaaaggcaccggcttccgccttcaggagtatccctgctag cgaattctagtagggctctgcttgggtccaaccttcccaaatgcgcgctgcccggagtgcttcc ccaaatcacccagtatcctctcatgtgtgcttggcagcatatctgagacgatgttccgctg tcccagaccagtccagtaatggacgggcccagtgctgtagtctcctccggttgcgggcgc atgttggtaaccgggtgggtaagggtggtggtgcccacgcccgaatcaggggatacctcaa ggcaccaggaatgccaggagggtatccgcctcacagcgggatctgacctggggtaaagt tctgcggggggtccttctggcccaattctcagtaatttcagg	20
63	サリウイルス A SZ1	tctgtcctcacccatcttcccttcttctgaccgttacgctfactcgcattgagtggtgc acgtgcttgaacaaacagctacactcacatggggcggttttcccgccctcgcgctctcgcg aggccccctcccttctccataactacagtgtttgtaggtaagcatcctgatccccg cggaaagctgctcacgtggcaactgtggggaccagacaggttatcaaaggcaccggcttcc cgcttcaggagtatccctgctagtgaattctagtagggctctgcttgggtccaacctccccaaa tgcgctgcccggagtgcttcccaactcacctagtatcctctcatgtgtgtgcttggtcagc atatctgagacgatgttccgctgtcccagaccagtccagtaatggacgggcccagtgctgtagt cgtcttccgcttgcggcgcatgttggtaaccgggtgggtaagggtggtggtgcccacgc ccgtacttgggtgatacctcaagaccaccaggaatgccaggagggtaccccgcctcacagcg ggatctgacctgggctaattgtctacgggtggttcttcttcttccacttcttctactgttcatg	30

10

20

30

40

50

64	サリウイルス FHB	<p>acatgggggtctgaggacggctcggcccaccgcaagaatgccgtcatctgtcctcattacc  cgtatfcctccctccccgcaaccaccacgctactcgcgcacgtgtgagtgccacgtgcgttgc  caaacagctacaccacacctcggggcggtttgtcccgcctcgggttcctcgcggaaccccc  ccctccctctctcttctatccgacctactccataactacagtctttggtaggtgagcacctga  cccccgcggaagctgctaactgtggcaactgtgggatccaggcaggtatcaaaggcacccggt  cttccgcctcagagatctctgccgtgaattccggtagggtctgcttgggtccaacctcccca  aatgcgcgctcgggagtgctctcccaactcatcttagtaacctctcatgtgtgcttggcagcat  atctgaggcgacgttccgtgtcccagaccagtcagcaatggacgggccaagtgtcgtagtcgctt  tccggtttccggcgcatgtttggcgaacgctgaggtgaaggtggtgtgccaaccccgaatttg  gtgatacctaagaccaccaggaaatccaggggaggtaccccactcgggtgggatctgacctggg  ctaattgtctacgggtgttcttctgctccactctcttttctggcatg</p>	10
65	CVB3	<p>ttaaagcgcctgtgggtgatccaccacaggccattgggcgctagcactctggtatcacggtac  ctttgtgcctgtttataccccctcccccaactgtaactagaagtaacacacaccgatcaacagta  gctggcacaccagccacgtttgatcaagcacttctgttaccggactgagatcaatagactgctc  acgcggtgaaggagaaagcgttcgttatccggccaactactcgaaaaacctagtaacaccgtgga  agttgcagagtgttcgctcagcactacccagtgtagatcaggtcgatgagtcaccgcattccccac  ggcgaccgtggcggtgctgcgttggcggcctgccatggggaacctagggacgctctaata  cagacatggtgcgaagagtctattgagctagttgtagtctcggccctgaatgcggtaactcta  actgcggagcacacacctcaagccagaggcagtgctgtaacgggcaactctcagcgggaac  cgactactttgggtgctcgtttcattttattcctatactggctcttatggtgacaattgagagatcgtta  ccatatagctattggattggccatccgggtgactaatagagctattatataccctttgtgggttatacca  cttagctgaaagaggttaaacaattcattgtaagtgaatacagcaaa</p>	20
66	CVB1	<p>ttaaagcgcctgtgggtgttcccaccacaggccattgggcgctagcactctggtatcacggtac  ctttgtgcctgtttatccctccccaaattgtaattagaagttcacacaccgatcattagcaag  cgtggcacaccagccatgtttgatcaagcacttctgttaccggactgagatcaatagaccgctaa  cgcggtgaaggagaaaacgttcgttaccggccaactactcgaaaaacctagtaacaccatggaa  gttcggagtggttcgctcagcactacccagtgtagatcaggtcgatgagtcaccggttccccag  ggcgaccgtggcggtgctgcgttggcggcctgcctacggggaacctagtagcgtcctaatac  agacatggtgcgaagagtctattgagctagttggtaactcctccggccctgaatgcggtaactccta  ctgcggagcacataccctcaaacagggggcagtgctgtaacgggcaactctcagcgggaacc  gactactttgggtgctcgtttcattttattcctatactggctcttatggtgacaattgacaggtgttac  catatagttattggattggccatccgggtgactaacagagcaattatatactctttgtgggttataccac  ttagctgaaagaggttaaacaactacatctcatcattaaactaatacaacaaa</p>	30

67	エコーウイルス 7	<p>ttaaaacagcctgtgggtgtccaccacagggcccattgggcgtcagcacccctgggtacac  gggtacctttgtgcgctgtttatataccctcccccaattgtaacttagaagaacacacaccgatc  aacagcaagcgtggcacaccagccatgttttggtcaagcacttctgttaccgggactgagatc  aatagactgctcacgcggtgaaggagaaagcgtccgttatccggccagctactcagagaac  ctagtaacaccatggaagtgcggagtgttcgctcagcactaccagtgtagatcaggtcgat  gagtcaccgctttccccacggcgaccgtggcggtggctgcgttggcggcctgcctatgggg  gaaccataggacgctctaatacagacatggtgcgaagagtctattgagctagctggattcctc  cggcccctgaatgcggctaacttaactgtggagcacatgccctaatacgaagggtagtgtgt  cgtaatgagcaattccgcagcggaaaccgactactttgggtgtccgtgttctcttattctgactg  gctgcttatgggacaattgagagattgtaccatatactattggattggccatccgggtgactaat  agagctattgtatctctttgtggattgtaccacttaattgaaagaaatcaggacactacgcta  catttactattgaacaccgcaaa</p>	10
68	CVB5	<p>ttaaaacagcctgtgggtgtaccaccacagggcccactgggcgctagcactctgggtacac  gggtacctttgtgcgctgtttatgccccctcccccaattgaaactagaagtacacacaccgat  caacagcggcgctggcataaccagccgctctgatcaagcactcctgtttccccggaccgagt  atcaatagactgctcacgcggtgaaggagaaaacgtcgttaccggcctaactctcagagaaa  cctagtagcatcatgaaagttgcaagcgttcgctcagcacatccccagtgtagatcaggtcga  tagtcaccgattccccacggcgaccgtggcggtggctgcgttggcggcctgcctacggg  gcaaccctagtagcctcaatacagacatggtgcgaagagtcgattgagctagttagtagtcc  tccggcccctgaatccggctaacttaactgcggagcacataacctcaaccagggggcattgt  gtcgtaacgggtaactctgcagcggaaaccgactactttgggtgtccgtgttctcttattctataa  tggctgcttatgggacaattgaagattgtaccatatactattggattggccatccgggtgctaa  cagagctattataacctctttgttgattgtaccacttgatctaaaggaagtaagacactacaat  tcatcatacaattgaacacagcaaa</p>	20
69	EVA71	<p>ttaaaacagcctgtgggtgcaccactcacagggcccactgggcgcaagcactctggcacttc  gggtacctttgtgcgctgtttatataccctcccccaatgaaattagaagcagcaaacccgatca  atagcaggcataacgctccagttatgtctgatcaagcacttctgttccccggactgagatcaat  agactgctcacgcggtgaaggagaaaacgtcgttatccggcctaactctcggaaagcctagt  aacaccatggaagttcggagagtttcgctcagcacttccccagtgtagatcaggtcagtgagtc  accgattccccacggcgaccgtggcggtggctgcgttggcggcctgcccattgggtaacc  catgggacgctctaatacggacatggtgtgaagagtctactgagctagttagtagtctccggcc  cctgaatgcggctaataccaactgcggagcacaccccacaagccagtggttagtgtcgtgta  acgggcaactctgcagcggaaaccgactactttgggtgtccgtgttctcttattctatgttgctg  cttatgtgacaattaagagttgtaccatatactattggattggccatccgggtgcaacaga  gcgatcgttacctatttattgtttgtaccattgacactgaagctctgtatcacccttaatttattctt  aacctcaacacagcaaac</p>	30

70	CVA3	<p>ftaaaacagcctgtgggtgtaccacccacagggcccactgggcgctagcactggtattacggtacctttgtg  cgctgtttataccccccaacctcgaactfagaagtaaagcaaacccgatcaatagcagggtcggcgcac  cagtcgcatcttgatcaagcacttctgtaacccggaccgagtatcaatagactgctcacgcggtgaaggagaa  aacgttcgttaccggctaactactcgaagaacccagtagcatcatgaaagttgcagagtggttcgctcagcact  acccccgttagatcaggccgatgagtcaccgcacttcccacgggcgaccgtggcggtggctgctgtggcgg  cctgcctatggggcaacctataggacgcttaatacggacatggtgccaagagtctattgagctagtagtagtc  ctccggcccctgaatcgggctaactcctaactgcggagcacatacccttaaccaagggcagtgctgtaacgg  gtaactctgcagcgggaaccgactactttgggtgccgtgttccctttatcttactggctgcttatggtgacaattga  ggaaftgttccatatactattggattggccatccgggtgactaacagagctattgtgtccaatttggatttacc  ccgctcacactcacagtcgtaagaaccttcattacgtgtatttctcaactcaagaaa</p>	10
71	CVA12	<p>ftaaaacagcctgtgggtgtaccacccacagggcccactgggcgctagcactctggtactacggtacctttgtg  tgctgttttaagcccctacccccactcgaactfagaaggcttctcacactcgaatagtaggtgtggcacgc  cagtcacaccgtgatcaagcacttctgttaccggctctgagtaccaataagctgtaacgcggctgaaggggaa  aacgatcgttatccggctaactactcgaagaacccagtagcaccatgaacgttgcaggggtgttcgctcggcaca  accccagtgtagatcaggctgatgagtcaccgtattcccacgggcgaccgtggcggtggctgctgtggcggc  ctgcccattgggtgacctatgggacgcttaatactgacatggtgccaagagtctattgagctagtagtagtct  ccggcccctgaatcgggctaactcctaactgcggagcacatacccttaaccaagggcagtgctgtaacggg  caactctgcagcgggaaccgactactttgggtgccgtgttccctttattcttacttattggtgcttatggtgacaattga  aaagtgttaccatatactattggattggccatccgggtgacaaatagagctattgtatatttttgggttacgtac  cccttaattacaaagtgttcaactttgaatacatcctaactaaattgtagaaa</p>	20
72	EV24	<p>ftaaaacagcctgtgggtgtaccacccacagggcccacagggcgctagcactctggtatcacggtacctttgtg  gcgctgttttattacccttcccccaattgaaaattagaagcaatgcacaccgatcaacagcaggcgtggcgcac  cagtcacgtctcgaatcaagcacttctgttccccggaccgagtatcaatagactgctcacgcggtgaaggagaa  agtgttcgttaccggctaaccactcgaagaacccagtagcaccatgaacgttgcaggggtgttcgctcagcactt  ccccagtgtagatcaggctgatgagtcaccgcgttcccacgggcgaccgtggcggtggctgctgtggcggcc  tgcctatgggttaacctataggacgcttaatacagacatggtgccaagagttattgagctggttagtatccctcc  ggcccctgaatcgggctaactcctaactgcggagcacgtgctccaatccagggggtgcatgctgtaacgggta  actctgcagcgggaaccgactactttgggtgccgtgttccctttattcttatactggctgcttatggtgacaatcggag  gaattgttaccatatactattggattggccatccgggtgctaacagagcgattatatactcttgggtgattatgca  gctcaataccaccaacttaacacattgaaatatacttaaagttaaacacagcaaa</p>	30

【 0 3 6 2 】

いくつかの実施形態では、本発明のIRESは、表1に列挙される配列（配列番号1～72）を有するIRESである。いくつかの実施形態では、IRESは、サリウイルスIRESである。いくつかの実施形態では、IRESは、サリウイルスSZ1 IRESである。

【 0 3 6 3 】

（表2）アナベナ順列置換部位5'イントロンフラグメント配列

40

50

配列番号	順列置換部位	配列	
73	L2-1	GAAGAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAA CCTAAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCC GAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAAC TAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAA CGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAG CCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATC CGT	10
74	L2-2	AAGAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAAC CTAAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCG AAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAAC AATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAAC GTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGC CAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCC GT	20
75	L2-3	AGAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACC TAAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGA AGTAGTAATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAAC ATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACG TCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCC AATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCG T	
76	L5-1	GTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTA ATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAA GGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGAC GAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGC AGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT	30
77	L5-2	TTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAAT TAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGG TGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGA GGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAG TAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT	40



78	L5-3	TATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATT AGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAATAATCGGAAGGT GCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAG GGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGT AGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT
79	L5-4	ATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATT AGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAATAATCGGAAGGT GCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAG GGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGT AGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT
80	L5-5	TAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTA GTAAGTTAACAATAGATGACTTACAATAATCGGAAGGTG CAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGG GTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTA GCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT
81	L6-1	ACAATAGATGACTTACAATAATCGGAAGGTGCAGAGAC TCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGA GAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAG CTGCAAGAGAATGAAAATCCGT
82	L6-2	CAATAGATGACTTACAATAATCGGAAGGTGCAGAGACTC GACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGA GAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCT GCAAGAGAATGAAAATCCGT
83	L6-3	AATAGATGACTTACAATAATCGGAAGGTGCAGAGACTC GACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGA GAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCT GCAAGAGAATGAAAATCCGT
84	L6-4	ATAGATGACTTACAATAATCGGAAGGTGCAGAGACTCG ACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAG AGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGC AAGAGAATGAAAATCCGT
85	L6-5	TAGATGACTTACAATAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGAC GGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAG TCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAA GAGAATGAAAATCCGT

10

20

30

40

50

86	L6-6	AGATGACTTACAAC TAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGAC GGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAG TCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAA GAGAATGAAAATCCGT
87	L6-7	GATGACTTACAAC TAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACG GGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGT CCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAA GAGAATGAAAATCCGT
88	L6-8	ATGACTTACAAC TAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGG GAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTC CAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAG AGAATGAAAATCCGT
89	L6-9	TGACTTACAAC TAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGG AGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCC AATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGA GAATGAAAATCCGT
90	L8-1	CAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCA ATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT
91	L8-2	AAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAA TAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT
92	L8-3	AGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAAT AGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT
93	L8-4	GACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATA GGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT
94	L8-5	ACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAG GCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT
95	L9a-1	AATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCG T
96	L9a-2	ATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT
97	L9a-3	TAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT
98	L9a-4	AGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT
99	L9a-5	GGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT
100	L9-1	GAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT
101	L9-2	AAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT
102	L9-3	AAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT
103	L9-4	AGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT

10

20

30

40

50

104	L9-5	GCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT
105	L9-6	CTGCAAGAGAATGAAAATCCGT
106	L9-7	AAGAGAATGAAAATCCGT
107	L9-8	AGAGAATGAAAATCCGT
108	L9-9	GAGAATGAAAATCCGT
109	L9a-6	GCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT
110	L9a-7	AGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT
111	L9a-8	GTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT

10

## 【 0 3 6 4 】

いくつかの実施形態では、5'イントロンフラグメントは、表2に列挙される配列を有するフラグメントである。典型的には、表2に列挙された5'イントロンフラグメントを含有する構築物は、表3に列挙されるような対応する3'イントロンフラグメントを含有する（例えば、両方ともL9a-8順列置換部位を伴うフラグメントを表す）。

## 【 0 3 6 5 】

（表3）アナベナ順列置換部位3'イントロンフラグメント配列

20

30

40

50

配列番号	順列置換部位	配列
112	L2-1	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAA
113	L2-2	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAG
114	L2-3	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGA
115	L5-1	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTTA AGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTA
116	L5-2	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTTA AGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAG
117	L5-3	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTTA AGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGT
118	L5-4	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTTA AGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTT
119	L5-5	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTTA AGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTTA
120	L6-1	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTTA AGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTTA TAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTA GTAAGTTA
121	L6-2	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTTA AGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTTA TAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTA GTAAGTTAA
122	L6-3	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTTA AGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTTA TAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTA GTAAGTTAAC
123	L6-4	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTTA AGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTTA TAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTA GTAAGTTAACA

10

20

30

40

50

124	L6-5	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTTA AGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTTA TAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTA GTAAGTTAACAA
125	L6-6	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTTA AGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTTA TAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTA GTAAGTTAACAAT
126	L6-7	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTTA AGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTTA TAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTA GTAAGTTAACAATA
127	L6-8	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTTA AGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTTA TAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTA GTAAGTTAACAATAG
128	L6-9	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTTA AGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTTA TAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTA GTAAGTTAACAATAGA
129	L8-1	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTTA AGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTTA TAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTA GTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTG CAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGT
130	L8-2	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTTA AGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTTA TAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTA GTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTG CAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTC
131	L8-3	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTTA AGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTTA TAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTA GTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTG CAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCA

10

20

30

40

50

132	L8-4	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTTAA GTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTTATA GACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAA GTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGAG ACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAA
133	L8-5	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTTAA GTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTTATA GACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAA GTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGAG ACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAG
134	L9a-1	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTTAA GTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTTATA GACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAA GTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGAG ACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGA GAGAGTCCAATTCTCAAAGCC
135	L9a-2	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTTAA GTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTTATA GACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAA GTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGAG ACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGA GAGAGTCCAATTCTCAAAGCCA
136	L9a-3	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTTAA GTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTTATA GACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAA GTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGAG ACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGA GAGAGTCCAATTCTCAAAGCCA
137	L9a-4	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTTAA GTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTTATA GACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAA GTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGAG ACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGA GAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAAT

10

20

30

40

50

138	L9a-5	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTTAA GTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTTATA GACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTA AGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAG AGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAA AGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATA
139	L9-1	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTTAA GTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTTATA GACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTA AGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAG AGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAA AGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGC
140	L9-2	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTTAA GTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTTATA GACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTA AGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAG AGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAA AGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCG
141	L9-3	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTTAA GTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTTATA GACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTA AGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAG AGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAA AGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGA
142	L9-4	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTTAA GTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTTATA GACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTA AGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAG AGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAA AGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAA

10

20

30

40

50

143	L9-5	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTTAA GTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTTATA GACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAA GTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGAG ACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGA GAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAA
144	L9-6	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTTAA GTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTTATA GACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAA GTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGAG ACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGA GAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAAG
145	L9-7	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTTAA GTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTTATA GACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAA GTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGAG ACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGA GAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAAGCT GC
146	L9-8	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTTAA GTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTTATA GACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAA GTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGAG ACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGA GAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAAGCT GCA
147	L9-9	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTTAA GTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTTATA GACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAA GTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGAG ACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGA GAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAAGCT GCAA

10

20

30

40

50



148	L9a-6	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTTAA GTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTTATA GACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAA GTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGAG ACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGA GAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAG
149	L9a-7	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTTAA GTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTTATA GACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAA GTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGAG ACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGA GAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGC
150	L9a-8	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTTAA GTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTTATA GACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAA GTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGAG ACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGA GAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCA

10

20

## 【 0 3 6 6 】

いくつかの実施形態では、3'イントロンフラグメントは、表3に列挙される配列を有するフラグメントである。いくつかの実施形態では、表3に列挙された3'イントロンフラグメントを含有する構築物は、表2に列挙されるような対応する5'イントロンフラグメントを含有する（例えば、両方ともL9a-8順列置換部位を伴うフラグメントを表す）。

30

## 【 0 3 6 7 】

（表4）非アナベナ順列置換部位5'イントロンフラグメント配列

40

50

配列番号	イントロン	配列
151	Azop1	tgcgccgatgaagggtgtagactagacggcaccacctaaggcaaacgctatggtgaaggcat agtccagggagtgggcgaagtcacacaaaccggaatccgt
152	Azop2	ccggcgctatggcaacgccgagccaagctcggcgctgcgccgatgaagggtgtagactag acggcaccacctaaggcaaacgctatggtgaaggcatagtccagggagtgggcgaagtcaca caaaccggaatccgt
153	Azop3	acggcaccacctaaggcaaacgctatggtgaaggcatagtccagggagtgggcgaagtcaca caaaccggaatccgt
154	Azop4	acgctatggtgaaggcatagtccagggagtgggcgaagtcacacaaaccggaatccgt
155	S795p1	attaagttatagaattatcagagaatgatatagtccaagccttatgtaacatgagggcacttgacc ctggtag
156	Twortp1	aagatgtaggcaatcctgagctaagctcttagtaataagagaaagtgaacgactattccgatagg aagtagggtaagtactcgaatggggattacccttctagggtagtgatatagtctgaacatatat ggaaacatatagaaggataggagtaacgaacctattcgtaacataattgaacttttagttat
157	Twortp2	taataagagaaagtgaacgactattccgataggaagttagggtcaagtactcgaatggggatt acccttctagggtagtgatatagtctgaacatatatggaaacatatagaaggataggagtaacgaac ctattcgtaacataattgaacttttagttat
158	Twortp3	taggaagtagggtcaagtactcgaatggggattacccttctagggtagtgatatagtctgaacat atatggaaacatatagaaggataggagtaacgaacctattcgtaacataattgaacttttagttat
159	Twortp4	ctagggtagtgatatagtctgaacatatatggaaacatatagaaggataggagtaacgaacctattc gtaacataattgaacttttagttat
160	LSUp1	agftaataaagatgatgaatagtctgaaccattttgagaaaagtggaataaaagaaaatctttat gataacataaattgaacaggctaa
161	Phip1	caaagactgatgatatagtccgacactcctagtaataggagaatacagaaaggatgaaatcc
162	ノストック	agtcgagggtaaaggagagtgccaattctcaaagcctattggcagtagcgaagctgcgggaga atgaaaatccgt
163	ノストック	agccgagggtaaaggagagtgccaattctcaaagccaataggcagtagcgaagctgcgggag aatgaaaatccgt

10

20

30

40

164	ノドゥラリア	agccgagggtaaaggagagtgccaattctcaaagccgaaggtattaaaacctggcagcagtg aaagctgcgggagaatgaaaatccgt
165	プレウロカプ サ	agctgagggtaaagagagagtgccaattctcaaagccagcagatggcagtagcgaagctgcg ggagaatgaaaatccgt
166	プランクトス リックス	agccgagggtaaagagagagtgccaattctcaaagccaattggtagtagcgaagctacgggag aatgaaaatccgt

50

## 【 0 3 6 8 】

いくつかの実施形態では、5'イントロンフラグメントは、表4に列挙される配列を有するフラグメントである。表4に列挙された5'イントロンフラグメントを含有する構築物は、表5に列挙されるような対応する3'イントロンフラグメントを含有する（例えば、両方ともAzop1イントロンを伴うフラグメントを表す）。

## 【 0 3 6 9 】

（表5）非アナベナ順列置換部位3'イントロンフラグメント配列

配列番号	イントロン	配列
167	Azop1	gcggaactcatatttcgatgtgccttgcgccgggaaaccacgcaagggatggtgtcaaattcggcgaa acctaagcgccccggcggtatggcaacgccgagccaagcttcggcgcc
168	Azop2	gcggaactcatatttcgatgtgccttgcgccgggaaaccacgcaagggatggtgtcaaattcggcgaa acctaagcgccccgc
169	Azop3	gcggaactcatatttcgatgtgccttgcgccgggaaaccacgcaagggatggtgtcaaattcggcgaa acctaagcgccccggcggtatggcaacgccgagccaagcttcggcgccctgcgccgatgaag gtgtagagactag
170	Azop4	gcggaactcatatttcgatgtgccttgcgccgggaaaccacgcaagggatggtgtcaaattcggcgaa acctaagcgccccggcggtatggcaacgccgagccaagcttcggcgccctgcgccgatgaag gtgtagagactagacggcaccacctaaggcaa
171	S795p1	aggattagatactactaactaagtgtccccagactggtgacagtctggtgtcatccagctatatacgggt aaacccattgggtaataaccgagggaaagctatattatataataataaatagccccgtagagact atgtaggtaaggagatagaagatgataaaatcaaatcatc
172	Twortp1	actactgaaagcataaataattgtgcctttatacagtaatgtatatacgaaaaatccttaattcagggaac acctaaacaaact
173	Twortp2	actactgaaagcataaataattgtgcctttatacagtaatgtatatacgaaaaatccttaattcagggaac acctaaacaaactaagatgtaggcaatcctgagctaagctcttag
174	Twortp3	actactgaaagcataaataattgtgcctttatacagtaatgtatatacgaaaaatccttaattcagggaac acctaaacaaactaagatgtaggcaatcctgagctaagctcttagtaataagagaaagtgaacgact attccga
175	Twortp4	actactgaaagcataaataattgtgcctttatacagtaatgtatatacgaaaaatccttaattcagggaac acctaaacaaactaagatgtaggcaatcctgagctaagctcttagtaataagagaaagtgaacgact attccgataggaagtagggcaagtgaactcgaaatggggattaccctt
176	LSUp1	cgctagggattataactgtgagtcctccaatattataaatgttgtaatatattgggtaaattcaaga caactttctccacgctcaggatatagtgtatttgaagcgaactatttttagcagtgaaaagcaataa ggacgtcaacgactaaaaggtagtattgctaacaataatccttttttaattgccaacatctttattaa ct

10

20

30

40

50

177	Phip1	gtgggtgcataaactatttcattgtgcacattaaatctggtgaactcggggaaccctaattggggcaatac cgagccaagccatagggaggatataatgagaggcaagaagtaattcttgaggccactgagactggctg tatcatccctacgtcacacaaacttaatgccgatggttatttcagaagaaaaccaatggcgtcttagaga tgtatcacagaacgggtgtggaaggacataacggagacatacctgatggcttcgagatagaccataag tgtcgaatagggcttgcgtaatatagagcattacagatgcttgagggtacagcccactgttaaga ccaatcgtgaacgctacgcagacagaaaggaaacagctaggggaatactggctggagactggatgtac cggcctagcactcggtgagaagttgggtgtcgttctctctgcttgaagtggattagagaatggaagg cgtagagactatccgaaaggagtagggccgagggtgagactccctcgtaacccgaagcgcagaca gtcaact	10
178	ノストック	acggacttaagtaattgagccttaaagaagaaattcttaagtggcagctctcaactcagggaaaccta aatctgttcacagacaaggcaatcctgagccaagccgaaagagtcagtgctgagtagtgagtaaa ataaaagctcacaactcagaggttgaactctaagctagtcggaaggtgcagagactcgacgggagct accctaacgtaa	
179	ノストック	acggacttaactgaattgagccttagagaagaattctttaaagtgtcagctctcaactcagggaaacc taaactgttgacagacaaggcaatcctgagccaagccgagaactctaagttattcgggaaggtgcaga gactcgacgggagctaccctaacgtca	20
180	ノドゥラリア	acggacttagaaaactgagccttgatcgagaaatcttcaagtgaagctctcaattcagggaaaccta aatctgtttacagatatggcaatcctgagccaagccgaaacaagtcctgagtgtaaaagctcataactcat cggaaggtgcagagactcgacgggagctaccctaacgtta	
181	プレウロカプ サ	acggacttaaaaaattgagccttggcagagaaatctgtcatgcgaacgctctcaattcagggaaacc taagtctggcaacagatatggcaatcctgagccaagccttaataaggaaaaaacattttacctttac cttgaaaggaaggtgcagagactcaacgggagctaccctaacaggtca	
182	プランクトス リックス	acggacttaagataaaattgagccttgaggcgagaaatctctcaagtgttaagctgtcaattcagggaa acctaattctgtaaattcagacaaggcaatcctgagccaagccttaggggtattagaaatgagggagttt ccccaatctaagatcaatacctaggaaggtgcagagactcgacgggagctaccctaacgtta	30

## 【 0 3 7 0 】

いくつかの実施形態では、3'イントロンフラグメントは、表5に列挙される配列を有するフラグメントである。表5に列挙された3'イントロンフラグメントを含有する構築物は、表4に列挙されるような対応する5'イントロンフラグメントを含有する（例えば、両方ともAzoP1イントロンを伴うフラグメントを表す）。

## 【 0 3 7 1 】

（表6）スペーサー及びアナベナ5'イントロンフラグメント配列

40

配列番号	スペーサー	配列
183	T25 L10	agtatataagaacaaccacTAGATGACTTACAATAATCGGAAGGTG CAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGT AAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGA AAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTggctcgagc
184	T25 L20	ctgaaattatactatactcaacaaccacTAGATGACTTACAATAATCGGA AGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACG AGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGT AGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTggctcgagc
185	T25 L30(180- 10)[対照]	ctgaaattatactatactcagtatatgacaacaaccacTAGATGACTTACAATA ATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTC AAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATA GGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTggctcgagc
186	T25 L40	catcaacaatatgaaattatactatactcagtatatgacaacaaccacTAGATGACTTA CAACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCT AACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAG CCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCG Tggctcgagc
187	T25 L50	catcaacaatatgaaactatactatactcagtatatgaagcattatgcaacaaccacTAGAT GACTTACAATAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGC TACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTC TCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGA AAATCCGTggctcgagc
188	T50 L10	tagcgtcagcaacaacaacaaTAGATGACTTACAATAATCGGAAGGTG CAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGT AAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGA AAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTggctcgagc
189	T50 L20	atactatactagcgtcagcaacaacaacaaTAGATGACTTACAATAATCGG AAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGAC GAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAG TAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTggctcgagc

10

20

30

40

50

190	T50 L30	gtgtgaagctatactcatactagcgtcagcaacaacaacaaTAGATGACTTACA ACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGT CAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAAT AGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTggctcg cagc
191	T50 L40	cctcacctgagtggaagctatactcatactagcgtcagcaacaacaacaaTAGATGACTT ACA ACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCC TAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAA A GCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCC GTggctcg cagc
192	T50 L50	ccgaatgatgcctcacctgagtggaagctatactcatactagcgtcagcaacaacaacaaTAGA TGACTTACA ACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAG CTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATT CTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGA AAATCCGTggctcg cagc
193	T75 L10	cggtgcgagcaacaacaacaaTAGATGACTTACA ACTAATCGGAAGGTG CAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGT AAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGA AAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTggctcg cagc
194	T75 L20	cgctccgaccagtcgagcaacaacaacaaTAGATGACTTACA ACTAATCG GAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGA CGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCA GTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTggctcg cagc
195	T25 L30 1MM	ctgaaattatactAatactcagtatatgacaacaaccacTAGATGACTTACA ACTA ATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTC AAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATA GGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTggctcg cagc
196	T25 L30 3MM	ctgaaaAtatactAatactcaCtatatgacaacaaccacTAGATGACTTACA ACT AATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGT CAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAAT AGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTggctcg cagc

10

20

30

40

50

197	T25 L30 5MM	ctgaTaAtataGtAaactcaCtataatgacaacaaccacTAGATGACTTACAA CTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAA CGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGC CAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCG Tggctcgcagc
198	T25 L30 8MM	ctgaTaAtaAaGtAatacAcaCtataAgacaacaaccacTAGATGACTTAC AACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCT AACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAA GCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATC CGTggctcgcagc
199	T25 L30 オフターゲット ト 10	ctgaaattatacttatactcttaagtacaacaaccacTAGATGACTTACA ACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAAC GTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCC AATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTg gctcgcagc
200	T25 L30 オフターゲット ト 20	ctgaaattatgtgtgttacAtctaagttacaacaaccacTAGATGACTTACA ACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAAC GTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCC AATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTg gctcgcagc
201	T25 L30 オフターゲット ト 30	gtgatcgggtgtgttacAtctaagttacaacaaccacTAGATGACTTACA ACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAAC GTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCC AATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTg gctcgcagc
202	T25 L30 I25-10	ctgaaattatacttatactcagtatatgacaacaaccacTAGATGACTTACA ACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAAC GTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCC AATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTg attaaacag
203	T25 L30 I25-20	ctgaaattatacttatactcagtatatgacaacaaccacTAGATGACTTACA ACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAAC GTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCC AATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTg attcacaatataaattacg

10

20

30

40

50

204	T25 L30 I50-10	ctgaaattatacttatactcagtatatgacaacaaccacTAGATGACTTACAAC AATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACG TCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCA ATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTg gatcatagc
205	T25 L30 I50-20	ctgaaattatacttatactcagtatatgacaacaaccacTAGATGACTTACAAC AATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACG TCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCA ATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTg gatcgagcataatatccg
206	T25 L30 I80-20	ctgaaattatacttatactcagtatatgacaacaaccacTAGATGACTTACAAC AATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACG TCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCA ATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTg gctcgagcgcgctaccg
207	T25 L30 I80-20x2	ctgaaattatacttatactcagtatatgacaacaaccacTAGATGACTTACAAC AATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACG TCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCA ATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTg gctcgagcgcgctaccgaaagccggcgctgacgttagcgc
208	T25 L30 I50-20x2	ctgaaattatacttatactcagtatatgacaacaaccacTAGATGACTTACAAC AATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACG TCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCA ATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTg gatcgagcataatatccgaaacgaggatacaagtgacatgc
209	T25 L30 I25-20x2	ctgaaattatacttatactcagtatatgacaacaaccacTAGATGACTTACAAC AATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACG TCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCA ATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTg attcacaatctaattacgaaacgataaatgataacttaac
210	T0 L0	aaacaaccacTAGATGACTTACAAC AATCGGAAGGTGCAGAG ACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAG AGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAG CTGCAAGAGAATGAAAATCCGTggctcgagc

10

20

30

40

50



211	T100 L5	cgggcaacaacaaaTAGATGACTTACAAC TAATCGGAAGGTGCAG AGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAA GAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAG CTGCAAGAGAATGAAAATCCGTggctcgagc
212	T75 L30	cgctccgacgagcttccggccagtgcgagcaacaacaaaTAGATGACTTACAAC TAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACG TCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAA TAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTggctc gagc
213	T0 L0a	aaacaaccacGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATC CGTggctcgagc
214	T25 L10a	agtatataagaacaaccacGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGA AAATCCGTggctcgagc
215	T25 L20a	ctgaaattatacttatactcaacaaccacGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAG AATGAAAATCCGTggctcgagc
216	T25 L30a(180- 10)[对照]	ctgaaattatacttatactcagtatatgacaacaaccacGGCAGTAGCGAAAGCTG CAAGAGAATGAAAATCCGTggctcgagc
217	T50 L10a	tagcgtcagcaacaacaaaGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATG AAAATCCGTggctcgagc
218	T50 L20a	atactatactagcgtcagcaacaacaaaGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGA GAATGAAAATCCGTggctcgagc
219	T50 L30a	gtgtgaagctatactatactagcgtcagcaacaacaaaGGCAGTAGCGAAAGCT GCAAGAGAATGAAAATCCGTggctcgagc
220	T75 L10a	cggtcgagcaacaacaaaGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATG AAAATCCGTggctcgagc
221	T75 L20a	cgctccgaccagtgcgagcaacaacaaaGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAG AGAATGAAAATCCGTggctcgagc
222	T75 L30a	cgctccgacgagcttccggccagtgcgagcaacaacaaaGGCAGTAGCGAAAGC TGCAAGAGAATGAAAATCCGTggctcgagc
223	T0 L0b	aaacaaccacAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAA GCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCC GTggctcgagc
224	T25 L10b	agtatataagaacaaccacAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATT CTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGA AAATCCGTggctcgagc

10

20

30

40

50

225	T25 L20b	ctgaaattatacttatactcaacaaccacAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGT CCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGA GAATGAAAATCCGTggctcgagc
226	T25 L30b(180-10)[对照]	ctgaaattatacttatactcagtatatgacaacaaccacAAGACGAGGGTAAAGAG AGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTG CAAGAGAATGAAAATCCGTggctcgagc
227	T50 L10b	tagcgtcagcaacaacaacaaaAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAAT TCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATG AAAATCCGTggctcgagc
228	T50 L20b	atactatactagcgtcagcaacaacaacaaaAAGACGAGGGTAAAGAGAGAG TCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAG AGAATGAAAATCCGTggctcgagc
229	T50 L30b	gtgtgaagctatactatactagcgtcagcaacaacaacaaaAAGACGAGGGTAAAGA GAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCT GCAAGAGAATGAAAATCCGTggctcgagc
230	T75 L10b	cggtgcgagcaacaacaacaaaAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAAT TCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATG AAAATCCGTggctcgagc
231	T75 L20b	cgctccgaccagtcgagcaacaacaacaaaAAGACGAGGGTAAAGAGAGA GTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAA GAGAATGAAAATCCGTggctcgagc
232	T75 L30b	cgctccgacgagctccggccagtcgagcaacaacaacaaaAAGACGAGGGTAAA GAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAG CTGCAAGAGAATGAAAATCCGTggctcgagc
233	T25 L30 I0-0	ctgaaattatacttatactcagtatatgacaacaaccacTAGATGACTTACAACTA ATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTC AAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATA GGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT
234	T25 L30a I0-0	ctgaaattatacttatactcagtatatgacaacaaccacGGCAGTAGCGAAAGCTG CAAGAGAATGAAAATCCGT
235	T25 L30a I25-10	ctgaaattatacttatactcagtatatgacaacaaccacGGCAGTAGCGAAAGCTG CAAGAGAATGAAAATCCGTgattaacag
236	T25 L30a I25-20	ctgaaattatacttatactcagtatatgacaacaaccacGGCAGTAGCGAAAGCTG CAAGAGAATGAAAATCCGTgattacaatataaattacg
237	T25 L30a I50-10	ctgaaattatacttatactcagtatatgacaacaaccacGGCAGTAGCGAAAGCTG CAAGAGAATGAAAATCCGTggatcatagc

10

20

30

40

50

238	T25	L30a	I50-20	ctgaaattatacttatactcagtatatgacaacaaccacGGCAGTAGCGAAAGCT GCAAGAGAATGAAAATCCGTggatcgcagcataatccg
239	T25	L30a	I80-20	ctgaaattatacttatactcagtatatgacaacaaccacGGCAGTAGCGAAAGCT GCAAGAGAATGAAAATCCGTggctcgcagcgcctaccg
240	T25	L30b	I0-0	ctgaaattatacttatactcagtatatgacaacaaccacAAGACGAGGGTAAAGA GAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGC TGCAAGAGAATGAAAATCCGT
241	T25	L30b	I25-10	ctgaaattatacttatactcagtatatgacaacaaccacAAGACGAGGGTAAAGA GAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGC TGCAAGAGAATGAAAATCCGTgattaaacg
242	T25	L30b	I25-20	ctgaaattatacttatactcagtatatgacaacaaccacAAGACGAGGGTAAAGA GAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGC TGCAAGAGAATGAAAATCCGTgattcaatataaattaccg
243	T25	L30b	I50-10	ctgaaattatacttatactcagtatatgacaacaaccacAAGACGAGGGTAAAGA GAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGC TGCAAGAGAATGAAAATCCGTggatcatagc
244	T25	L30b	I50-20	ctgaaattatacttatactcagtatatgacaacaaccacAAGACGAGGGTAAAGA GAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGC TGCAAGAGAATGAAAATCCGTggatcgcagcataatccg
245	T25	L30b	I80-20	ctgaaattatacttatactcagtatatgacaacaaccacAAGACGAGGGTAAAGA GAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGC TGCAAGAGAATGAAAATCCGTggctcgcagcgcctaccg

10

20

30

## 【 0 3 7 2 】

いくつかの実施形態では、スペーサー及び5'イントロンフラグメントは、表6に列挙される配列を有するスペーサー及びフラグメントである。

## 【 0 3 7 3 】

(表7) スペーサー及びアナベナ3'イントロンフラグメント配列

40

50

配列番号	スペーサー	配列
246	T25 L10	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATT CTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAG TTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATT AGTAAGTTAACAAcacaacacaacttatatact
247	T25 L20	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATT CTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAG TTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATT AGTAAGTTAACAAcacaacacaagagtataagtataatttcag
248	T25 L30(180- 10)[対照]	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATT CTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAG TTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATT AGTAAGTTAACAAcacaacacaagtcataactgagtataagtataatttcag
249	T25 L40	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATT CTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAG TTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATT AGTAAGTTAACAAcacaacacaagtcataactgagtataagtataattcatattgtgatg
250	T25 L50	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATT CTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAG TTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATT AGTAAGTTAACAAcacaacacaagcgataatgcttcataactgagtataagtataattcatattgtgatg
251	T50 L10	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATT CTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAG TTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATT AGTAAGTTAACAAaacaacacaagctgacgcta
252	T50 L20	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATT CTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAG TTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATT AGTAAGTTAACAAaacaacacaagctgacgctagtatgagtat

10

20

30

40

50

253	T50 L30	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATT CTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAG TTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATT AGTAAGTTAACAAaacaanaaacaagctgacgctagtagtagcttcacac
254	T50 L40	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATT CTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAG TTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATT AGTAAGTTAACAAaacaanaaacaagctgacgctagtagtagcttcacactcagg tgagg
255	T50 L50	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATT CTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAG TTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATT AGTAAGTTAACAAaacaanaaacaagctgacgctagtagtagcttcacactcagg tgaggcatcattcgg
256	T75 L10	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATT CTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAG TTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATT AGTAAGTTAACAAaacaanaaacaagctcgaccg
257	T75 L20	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATT CTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAG TTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATT AGTAAGTTAACAAaacaanaaacaagctcgactgggtcggagcg
258	T25 L30 1MM	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATT CTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAG TTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATT AGTAAGTTAACAAcacaacacaagtcataactgagtataagtataaattcag
259	T25 L30 3MM	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATT CTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAG TTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATT AGTAAGTTAACAAcacaacacaagtcataactgagtataagtataaattcag

10

20

30

40

50

260	T25 L30 5MM	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATT CTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAG TTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATT AGTAAGTTAACAAcacaacacaagtcataactgagtataagtataatttcag
261	T25 L30 8MM	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATT CTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAG TTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATT AGTAAGTTAACAAcacaacacaagtcataactgagtataagtataatttcag
262	T25 L30 オフターゲット ット 10	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATT CTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAG TTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATT AGTAAGTTAACAAcacaacacaagtaacttagagagtataagtataatttcag
263	T25 L30 オフターゲット ット 20	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATT CTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAG TTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATT AGTAAGTTAACAAcacaacacaagtaacttagaTgtaacacacataatttcag
264	T25 L30 オフターゲット ット 30	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATT CTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAG TTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATT AGTAAGTTAACAAcacaacacaagtaacttagaTgtaacacacaccgatcaac
265	T25 L30 I25-10	ctgtttaatcACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTC TTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGT TATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTA GTAAGTTAACAAcacaacacaagtcataactgagtataagtataatttcag
266	T25 L30 I25-20	cgtaatttatattgtaatcACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAG AAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAA ATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTA GTAATTAGTAAGTTAACAAcacaacacaagtcataactgagtataagtataatt cag

10

20

30

40

50

267	T25 L30 I50-10	gctatgatccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATT CTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAG TTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATT AGTAAGTTAACAAcacaacacaagtcataactgagtataagtataattcag
268	T25 L30 I50-20	cggatattatgctgcatccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAA GAAATTCCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTA AATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGT AGTAATTAGTAAGTTAACAAcacaacacaagtcataactgagtataagtataat ttcag
269	T25 L30 I80-20	cggtaggcgcgctgagaccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGA AGAAATTCCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCT AAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAG TAGTAATTAGTAAGTTAACAAcacaacacaagtcataactgagtataagtata attcag
270	T25 L30 I80-20x2	gcgtaacgtcgacgccggcaaacggtaggcgcgctgagaccACGGACTTAAATA ATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCCTTTAAGTGGATGCTCTCAA ACTCAGGGAAACCTAAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCT GAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAAcacaacac aagtcataactgagtataagtataattcag
271	T25 L30 I50-20x2	gcatgtcactgtatcctcgaacggatattatgctgcatccACGGACTTAAATAATT GAGCCTTAAAGAAGAAATTCCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCT CAGGGAAACCTAAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAG CCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAAcacaacacaagtc ataactgagtataagtataattcag
272	T25 L30 I25-20x2	gtagagttatcattatcgaacgtaatttagattgtgaatcACGGACTTAAATAATTG AGCCTTAAAGAAGAAATTCCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTC AGGGAAACCTAAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGC CAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAAcacaacacaagtc ataactgagtataagtataattcag
273	T0 L0	gctgagaccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATT CTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAG TTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATT AGTAAGTTAACAAcacaacacaa

10

20

30

40

50

274	T100 L5	gctgagaccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATT CTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAG TTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATT AGTAAGTTAACAAaacaacaaagcccg
275	T75 L30	gctgagaccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATT CTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAG TTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATT AGTAAGTTAACAAaacaacaaagctcgactggccggaagctcgtagcgg
276	T0 L0a	gctgagaccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATT CTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAG TTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATT AGTAAGTTAACAAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTG CAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGT AAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAcacaacacaa
277	T25 L10a	gctgagaccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATT CTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAG TTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATT AGTAAGTTAACAAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTG CAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGT AAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAcacaacacaaacttatata ct
278	T25 L20a	gctgagaccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATT CTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAG TTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATT AGTAAGTTAACAAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTG CAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGT AAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAcacaacacaaagagtata agtataattcag
279	T25 L30a(180- 10)[对照]	gctgagaccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATT CTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAG TTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATT AGTAAGTTAACAAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTG CAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGT AAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAcacaacacaaagtcata actgagtataagtataattcag

10

20

30

40

50



280	T50 L10a	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATT CTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAG TTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATT AGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTG CAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGT AAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAaacaaaaacaagctgac gcta	10
281	T50 L20a	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATT CTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAG TTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATT AGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTG CAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGT AAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAaacaaaaacaagctgac gctagtatgagtat	20
282	T50 L30a	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATT CTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAG TTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATT AGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTG CAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGT AAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAaacaaaaacaagctgac gctagtatgagtatagcttcacac	30
283	T75 L10a	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATT CTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAG TTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATT AGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTG CAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGT AAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAaacaaaaacaagctgac accg	40
284	T75 L20a	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATT CTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAG TTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATT AGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTG CAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGT AAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAaacaaaaacaagctgac actgggtcggagcg	50

285	T75 L30a	gctgagaccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATT CTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAG TTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATT AGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTG CAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGT AAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAaacaaaaacaagctgc actggccggaagctcgtaggagcg	10
286	T0 L0b	gctgagaccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATT CTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAG TTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATT AGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTG CAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTcacaacacaaa	
287	T25 L10b	gctgagaccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATT CTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAG TTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATT AGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTG CAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTcacaacacaaacttatata ct	20
288	T25 L20b	gctgagaccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATT CTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAG TTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATT AGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTG CAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTcacaacacaaagagtata agtataatttcag	
289	T25 L30b(I80- 10)[对照]	gctgagaccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATT CTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAG TTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATT AGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTG CAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTcacaacacaaagtcatat actgagtataagtataatttcag	30
290	T50 L10b	gctgagaccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATT CTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAG TTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATT AGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTG CAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTcaacaaaaacaagctgac gcta	40

291	T50 L20b	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATT CTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAG TTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATT AGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTG CAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCaacaaaaacaagctgac gctagtatgagtat
292	T50 L30b	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATT CTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAG TTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATT AGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTG CAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCaacaaaaacaagctgac gctagtatgagtatagcttcacac
293	T75 L10b	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATT CTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAG TTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATT AGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTG CAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCaacaaaaacaagctcgca ccg
294	T75 L20b	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATT CTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAG TTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATT AGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTG CAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCaacaaaaacaagctcgca ctggctcggagcg
295	T75 L30b	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATT CTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAG TTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATT AGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTG CAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCaacaaaaacaagctcgca ctggccggaagctcgtcggagcg
296	T25 L30 I0-0	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTTAA GTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTTATA GACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAA GTTAACAacacaaacacaagctatatactagatataagataatttcag

10

20

30

40

50

297	T25 L30a I0-0	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTTAA GTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTTATA GACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAA GTTAACAATAGATGACTTACAATAATCGGAAGGTGCAGAG ACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGA GAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAcacaacacaagtcataactgagtat aagtataatttcag
298	T25 L30a I25-10	ctgtttaatcACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTC TTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGT TATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTA GTAAGTTAACAATAGATGACTTACAATAATCGGAAGGTGC AGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTA AAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAcacaacacaagtcataac tgagtataagtataatttcag
299	T25 L30a I25-20	cgtaatttatattgtgaatcACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAG AAATTCCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAA ATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTA GTAATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAATAATCGG AAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGAC GAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAcacaacaca caagtcataactgagtataagtataatttcag
300	T25 L30a I50-10	gctatgatccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATT CTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAG TTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATT AGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAATAATCGGAAGGTG CAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGT AAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAcacaacacaagtcata actgagtataagtataatttcag
301	T25 L30a I50-20	cggatattatgctgcatccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAA GAAATTCCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTA AATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGT AGTAATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAATAATCG GAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGA CGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAcacaac cacaagtcataactgagtataagtataatttcag

10

20

30

40

50

302	T25 L30a I80-20	cggtaggcgcgctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGA AGAAATCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCT AAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAG TAGTAATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCG GAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGA CGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATCTCAAAGCCAATAcacaaa cacaagcatatactgagtataagtataatttcag
303	T25 L30b I0-0	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATCTTTAA GTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTTATA GACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAA GTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGAG ACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCCacaaacacaagcatatactgagtat aagtataatttcag
304	T25 L30b I25-10	ctgtttaacACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTC TTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGT TATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTA GTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTGC AGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCCacaaacacaagcatatac tgagtataagtataatttcag
305	T25 L30b I25-20	cgtaatttatattggaatcACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAG AAATCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAA ATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTA GTAATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGG AAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCCacaaaca caagcatatactgagtataagtataatttcag
306	T25 L30b I50-10	gctatgatccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATT CTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAG TTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATT AGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTG CAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCCacaaacacaagcatat actgagtataagtataatttcag
307	T25 L30b I50-20	cggatattatgctgcgatccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAA GAAATCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTA AATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGT AGTAATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCG GAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCCacaaa cacaagcatatactgagtataagtataatttcag

10

20

30

40

50

308	T25 L30b I80-20	cggtaggcgcgctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGA AGAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCT AAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAG TAGTAATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAATAATCG GAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTcacaaa cacaagtcataactgagtataagtataatttcag
-----	--------------------	--

10

## 【0374】

いくつかの実施形態では、スペーサー及び3'イントロンフラグメントは、表7に列挙される配列を有するスペーサー及びフラグメントである。

## 【0375】

(表8) 切断部位配列

配列番号	切断部位	配列
309	2A様配列	YHADYYKQRLIHDVEMNPGP
310	2A様配列	HYAGYFADLLIHDIE TNPGP
311	2A様配列	QCTNYALLKLAGDVESNPGP
312	2A様配列	ATNFSLLKQAGDVEENPGP
313	2A様配列	AARQMLLLLSGDVETNPGP
314	2A様配列	RAEGRGSLLTCGDVEENPGP
315	2A様配列	TRAEIEDELIRAGIESNPGP
316	2A様配列	AKFQIDKILISGDVELNPGP
317	2A様配列	SSIIRTKMLVSGDVEENPGP
318	2A様配列	CDAQRQKLLLSGDIEQNPGP
319	2A様配列	YPIDFGGFLVKADSEFNPGP
320	P2A	GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP
321	F2A	GSGEGRGSLLTCGDVEENPGP
322	E2A	GSGQCTNYALLKLAGDVESNPGP
323	T2A	GSGVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP
324	2A保存配列	GDVEXNPGP

20

30

40

## 【0376】

(表9) SARS-CoV-2 タンパク質配列

50

配列番号	SARS-CoV-2 タンパク質	配列
325	スパイク糖 タンパク質	MFVFLVLLPLVSSQCVNLTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVF RSSVLHSTQDLFLPFFSNVTWFHAIHVSGTNGTKRFDNPVLPF NDGVYFASTEKSNIIRGWIFGTTLDSKTQSLIVNATNVIK CEQFCNDPFLGVYHKNKSWMESEFRVYSSANNCTFEYVS QPFLMDLEGKQGNFKNLREFVFNIDGYFKIYSKHTPINLVRD LPQGFSALEPLVDLPIGINITRFQTLALHRSYLPDSSSGWT AGAAAYYVGYLQPRTFLLKYNENGTITDAVDCALDPLSETKC TLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNAT RFASVYA WNRKRISNCVADYSVL YNSASFSTFKCYGVSPTKL NDLCFTNVYADSFVIRGDEV RQIAPGQTGKIADYNYKLPDDF TGCVIAWNSNLD SKVGGNYNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEI YQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQP YRVVLS FELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNENGLTGTGVLTESN KKFLPFQQFGRDIADTTDAVRDPQTLEILDITPCSFGGVS VITP GTNTSNQVAVLYQDVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTGSN VFQTRAGCLIGAEHVNSYECDIPIGAGICASYQTQTN SPRRA RSVASQSIIAYTMSLGAENSVAYSNN SIAIPTNFTISVTTEILPVS MTKTSVDCTMYICGDSTECSNLLLQYGSFCTQLNRALTGIAV EQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKDFGGFNFSQILPDPSKPSKRS FIEDLLFNKVTLADAGFIKQYGDCLGDIAARDLICAQKFENGLT VLPPLTDEMIAQYTSALLAGTITSGWTFGAGAALQIPFAMQ MAYRFNGIGVTQNVLYENQKLIANQFNSAIGKIQDSL SSTA LGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRLDK VEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKM SECVLGQSKRVDFCGKGYHLMSFPQSAPHGVVFLHVTYVPA QEKNF TAPAICH DGHKAHFPREGV FVSNGTHWVFTQRNFYEP QIITDNTFVSGNCDVVIGIVNNTVYDPLQPELDSFKEELDKYF KNHTSPD VDLGDISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDL QELGKYEQYIKWPWYIWLGFIAGLIAIVMVTIMLCCMTSCCS CLKGCCSCGSCCKFDEDDSEPV LKGVKLHYT

10

20

30

40

50

326	ORF1ab ポリタンパク質	<p>MESLVPGFNEKTHVQLSLPVLQVRDVLVRGFGDSVEEVLSEA  RQHLKDGTCGLVEVEKGVLPQLEQPYVFIKRS DARTAPHGHV  MVELVAELEGIQYGRSGETLGVLPVPHVGEIPVAYRKVLLRKN  GNKGAGGHSYGADLKSFDLGDELGTDPEYEDFQENWNTKHSS  GVTRELMRELNGGAYTRYVDNNFCGPDGYPLECICKDLLARA  GKASCTLSEQLDFIDTKRGVYCCREHEHEIAWYTERSEKSYEL  QTPFEIKLAKKFDTFNGECPNFVPLNSIIKTIQPRVEKKLDGF  MGRIRSVYPVASPNECNQMCLSTLMKCDHCGETSWQTGDFV  KATCEFCGTENLTKEGATTCGYLPQNAVVKIYCPACHNSEVG  PEHSLAEYHNESGLKTILRKGGRTIAFGGCVFSYVGCHNKCA  YVWPRASANIGCNHTGVVGESEGLNDNLEILQKEKVNINI  VGDFKLNEEIAIILASFSASTSAFVETVKGLDYKAFKQIVESCG  NFKVTKGKAKKGAWNIGE QKSILSPYAFASEAARVVR SIFSR  TLETAQNSVRVLQKAAITILDGISQYSLRLIDAMMFTSDLATN  NLVVMAYITGGVVQLTSQWLTNIFGTVYEKLPVLDWLEEK  FKEGVEFLRDGWEIVKFISTCACEIVGGQIVTCAKEIKESVQTF  FKLVNKFLALCADSHIIGGAKLKALNLGETFVTHSKGLYRKCV  KSREETGLLMPLKAPKEIIFLEGETLPTEVLTEE VVLKTGDLQP  LEQPTSEAVEAPLVGTPVCINGLMLEIKDTEKYCALAPNMM  VTNNTFTLKG GAPT KVTFGDDTVIEVQGYKSVNITFELDERID  KVLNEKCSAYTVELGTEVNEFACVVADAVIKTLQP VSELLTP  LGIDLDEWSMATYYLFDESGEFKLASHMYCSFYPPDEDEEEG  DCEEEEFEPSTQY EYGTEDDYQGKPLEFGATS AALQPEEEQEE  DWLDDDSQQTVGQQDGEDNQT TTIQTIVEVQPQLEMELTPV  VQTIEVNSFSGYLKLTDNVYIKNADIVEEAKKV KPTVVVNA  NVYLKHGGGVAGALNKATNNAMQVESDDYIATNGPLKVGG  SCVLSGHNLA KHCLHVVGPNVNGEDIQLLKSAYENFNQHE  VLLAPLLSAGIFGADPIHSLRVCVDTVRTNVYLA VFDKNLYD  KLVSSFLEMKSEKQVEQKIAEIPKEEVKPFITESKPSVEQRKQD  DKKIKACVEEVT TLEETKFLTENLLL YIDINGNLHPDSATLVS  DIDITFLKKDAPYIVGDVVQEGVLTAVVIPTKKAGGTTEMLA  KALRKVPTDNYITTPGQGLNGYTVEEAKTVLKKCKSAFYIL  PSIISNEKQEILGTVSWNLREMLAHAEE TRKLMPCVETKAIV  STIQRKYKGIKIQEGVVDYGARFYFYSKTTVASLINTLNDLN  ETLVTMPLGYVTHGLNLEEAARYMRS LKVPATVSVSSPDAVT  AYNGYLTSSSKTPEEHFIETISLAGSYKDWSYSQGSTQ</p>
-----	----------------	---

10

20

30

40

50



	<p>LGIEFLKRGDKSVYYTNSNPTTFHLDGEVITFDNLKTLLSLREVR  TIKVFTTVDNINLHTQVVDMSTMTYGQQFGPTYLDGADVTKIK  PHNSHEGKTFYVLPNDDTLRVEAFEYHYHTDPSFLGRYMSAL  NHTKKWKYPQVNGLTSLIKWADNNCYLATALLTQQIELKFN  PPALQDAYYRARAGEAANFCALILAYCNKTVGELGDVRETM  SYLFQHANLDSCKRVLNVVCKTCGQQQTTLKGVEAVMYMG  TLSYEQFKKGVQIPCTCGKQATKYLQQESPVMMSAPPAQY  ELKHGTFTCASEYTGNYQCGHYKHITSKETLYCIDGALLTKSS  EYKGPITDVFYKENSYTTTIKPVTYKLDGVVCTEIDPKLDNYY  KKDNSYFTEQPIDLVPNQYPNASFDNFKFVCDNIKFADDLNQ  LTGYKKPASRELKVTFPPDLNGDVVAIDYKHYPSPFKKGAKL  LHKPIVWHVNNATNKATYKPNTWCIRCLWSTKPVETSNSFDV  LKSEDAQMDNLACEDLKPVSEEVVENPTIQKDVLECNVKT  EVLGDIILKPANNSLKITEEVGHTDLMAAYVDNSSLTIKKNPNE  LSRVLGLKTLATHGLAAVNSVPWDTIANYAKPFLNKVVSTTT  NIVTRCLNRVCTNYMPYFFLLLQLCTFTRSTNSRIKASMPPTI  AKNTVKSVMGKFCLEASFNYLKSPNFSKLINIIWFLLSVCLGS  LIYSTAALGVLMNSNLGMPSYCTGYREGYLNSTNVTIATYCTG  SIPCSVCLSGLDSDLTYPSLETIQITISSFKWDLTAFGLVAEWFL  AYILFTRFFYVLGLAAIMQLFFSYFAVHFISNSWLMWLIINLVQ  MAPISAMVRMYIFFASFYVWKSYPVHVVDGCNSSTCMCCY  KRNRA TRVECTIVNGVRRSFYVYANGGKGFCKLHNWNCVN  CDTFCAGSTFISDEVARDLSLQFKRPINPTDQSSYIVDSVTVKN  GSIHLYFDKAGQKTYERHSLSHFVNLDNLRANNTKGSLPINVI  VFDGKSKCEESSAKSASVYYSQLMCQPILLDQALVSDVGDS  AEVAVKMFDAYVNTFSSTFNPMEKLTLVATAEAEELAKNV  SLDNVLSTFISARQGFVDSVETKDVVECLKLSHQSDIEVTG  DSCNNYMLTYNKVENMTPRDLGACIDCSARHINAQVAKSHNI  ALIWNVKDFMSLSEQLRKQIRSAKKNLFPKLTCAATTRQVV  NVVTTKIALKGGKIVNNWLKQLIKVTLVFLFVAAIFYLITPVH  VMSKHTDFSSEIIGYKAIDGGVTRDIASDTDCFANKHADFDTW  FSQRGGSYTNDKACPLIAAVITREVGFFVPLPGTILRTTNGD  FLHFLPRVFSAVGNICYTPSKLIEYTDFAVSACVLAECTIFKD  ASGKPVPCYDTNVLEGSVAYESLRPDTRYVLMDGSHIQFPNT  YLEGSRVVTTFDSEYCRHGTCERSEAGVCVSTSGRWVLNN  DYYRSLPGVFCGVDAVNLLTNMFTPLIQPIGALDISASIVAGGI  VAIVVTCLAYYFMRFRRAFGEYSHVVAFNLL</p>
--	--

10

20

30

40

50

	<p>FLMSFTVLCLTPVYSFLPGVYSVIYLYLTFYLTNDVSFLAHIQ  WMVMFTPLVPFWITAIYIICISTKHFYWFFSNYLKRRVVFNGV  SFSTFEEAALCTFLLNKEMYLKLRSDVLLPLTQYNRYLALYN  KYKYFSGAMDTTSYREAACCHLAKALNDFSNSGSDVLYQPP  QTSITSAVLQSGFRKMAFPSGKVEGCMVQVTCGTTTTLNLWL  DDVVYCPRHVICTSEDMLNPNYEDLLIRKSNHNFLVQAGNVQ  LRVIGHSMQNCVLKLVDTANPKTPKYKFVRIQPGQTFVLA  CYNGSPSGVYQCAMRPNFTIKGSFLNGSCGSVGFNIDYDCVFS  CYMHMELPTGVHAGTDLEGNFYGPFVDRQTAQAAGTDTTI  TVNVLAWLYAAVINGDRWFLNRFTTTLNDFNLVAMKYNYP  LTQDHVDILGPLSAQTGIAVLDMCASLKELLQNGMNGRTILG  SALLEDEFTPFVVRQCSGVTQSAVKRTIKGTHHWLLLTILT  SLLVLVQSTQWSLFFFLYENAFLPFAMGHIAMSAFAMMFVKH  KHAFLCLFLLPSLATVAYFNMVYMPASWVMRIMTWLDMVD  TSLSGFKLKDCVMYASAVVLLILMTARTVYDDGARRVWTLM  NVLTLVYKVYYGNALDQAISMWALIISVTSNYSGVVTTVMFL  ARGIVFMCVEYCPFITGNTLQCIMLVYCFLGYFCTCYFGLFC  LLNRYFRLTLGVYDYLSTQEFRYMNSQGLLPPKNSIDAFKL  NIKLLGVGGKPCIKVATVQSKMSDVKCTSVVLLSVLQQLRVE  SSSKLWAQCVQLHNDILLAKDTTEAFEKMSVLLSVLLSMQGA  VDINKLCEEMLDNRATLQAIASEFSSPSYAAFATAQEAYEQA  VANGDSEVVLKLLKSLNVAKSEFDRDAAMQRKLEKMAEQ  AMTQMYKQARSEDKRAKVTSAMQTMFTMLRKLNDNDALN  NIINNARDGCVPLNIPLTTAAKLMVVIPDYNTYKNTCDGTTF  TYASALWEIQVVDADSKIVQLSEISMDNSPNLAWPLIVTALR  ANSAVKLQNNELSPVALRQMCAAGTTQACTDDNALAYYN  TTKGGRFVLALLSDLQDLKWARFPKSDGTGTIYTELEPPCRFV  TDTPKGPKVKYLYFIKGLNLRGMVLGSLAATVRLQAGNA  TEVPANSTVLSFCAFAVDAAKAYKDYLASGGQPITNCVKMLC  THTGTGQAITVTPEANMDQESFGGASCCLYCRCHIDHPNPKG  FCDLKGKYVQIPTTCANDPVGFTLKNVCTVCGMWKGYGCS  CDQLREPLMSADAQSFLNRVCGVSAARLTPCGTGTSTDVVY  RAFDIYNDKVAGFAKFLKTNCCRFQEKDEDDNLIDSYFVVKR  HTFSNYQHEETIYNLLKDCPAVAKHDFKFRIDGDMVPHISRQ  RLTKYTMADLVYALRHFDEGNCDTLKEILVTYNCCDDDDYFN  KKDWYDFVENPDILRVYANLGERVRQALLKTVQFCDAMRN  AGIVGVLTLDNQDLNGNWDYDFGDFIQTTPGSGVPVVDYSY</p>
--	---

10

20

30

40

50

	<p>YSLMPILTLTRALTAESHVDTDLTKPYIKWDLKDYDFTEERL          KLFDYFKYWDQTYHPNCVNCLDDRCILHCANFNVLSTVFP          PTSFGPLVRKIFVDGVPFVSTGYHFRELGVVHNQDVLHSSR          LSKELLVYAADPAMHAASGNLLLDKRTTCFSVAALTNVAF          QTVKPGNFNKDFYDFAVSKGFFKEGSSVELKHFFFAQDGNA          ISDYDYRYNLPMTCDIRQLLFVVEVVDKYFDCYDGGCINAN          QVIVNNLDKSAGFPFNKWKARLYYDSMSYEDQDALFAYTK          RNVIPITITQMNLYAISAKNRARTVAGVSICSTMTNRQFHQKL          LKSIAATRIGATVIGTSKFGYGGWHNMLKTVYSDVENPHLMG          WDYPKCDRAMPNMLRIMASLVLARKHTTCCSLSHRFYRLAN          ECAQVLSEVMCGGSLYVKPGGTSSGDATTAYANSVFNICQ          AVTANVNALLSTDGNKIADKYVRNLQHRLYECLYRNRDVT          DFNVEFYAYLRKHFSMMILSDDAVVCFNSTYASQGLVASIKN          FKSVLYYQNNVFMSEAKCWTETDLTKGPHEFCSQHTMLVKQ          GDDYVYLPYPDPSTRILGAGCFVDDIVKTDGTLMIERFVSLAID          AYPLTKHPNQEYADVFLYLQYIRKLHDELGHMLDMYSVM          LTNDNTRSYWEPEFYEAMYPHTVLQAVGACVLCNSQTSR          CGACIRPFLCCKCCYDHVISTSHKLVLSVNPYVCNAPGCDVT          DVTQLYLGMSYYCKSHKPPISFPLCANGQVFGLYKNTCVGS          DNVTDNFNAIATCDWTNAGDYILANTCTERLKLFAAETLKATE          ETFKLSYGIATVREVLSDRELHLSWEVGKPRPPLNRNYVFTGY          RVTKNSKVQIGEYTFEKGDYGDVAVYRGTTTYKLVNGDYFV          LTSHTVMPLSAPTLVPQEHYVRITGLYPTLNISDEFSSNVANY          QKVGMMQKYSTLQPPGTGKSHFAIGLALYYPSARIVYTACSH          AAVDALCEKALKYLPIDKCSRIIPARARVECFDKFKVNSTLEQ          YVFCVNALPETTADIVVFDEISMATNYDLSVVNARLRAKHY          VYIGDPAQLPAPRTLLTKGTLEPEYFNSVCRLMKTIGPDMFLG          TCRRCPAEIVDVSALVYDNKLAHKDKSAQCFKMFYKGVIT          HDVSSAINRPQIGVVREFLTRNPAWRKAVFISPYNSQNAVASK          ILGLPTQTVDSQSEYDYVIFTQTTETAHSCNVNRFNVAITR          AKVGILCIMSDDRDLYDKLQFTSLEIPRRNVATLQAENVTGLFK          DCSKVITGLHPTQAPTHLSVDTKFKTEGLCVDIPGIPKDMTYR          RLISMMGFKMNYQVNGYPNMFITREEAIRHVRAWIGFDVEGC          HATREAVGTNLPLQLGFSTGVNLVAVPTGYVDTPNNTDFSRV          SAKPPGDQFKHLIPLMYKGLPWNVVRIVQMLSDTLKNLS          DRVVFVLAHGFELTSMKYFVKIGPERTCCLCDRRATCFSTA          SDTYACWHHSIGFDYVYNPFMIDVQQWGFTGNLQSN</p>	
--	--	--

10

20

30

40

50

	<p>HDLYCQVHGNAHVASCDAIMTRCLAVHECFVKRVDWTIEYP IIGDELKINAACRKVQHMMVKAALLADKFPVLHDIGNPKAIK CVPQADVEWKFYDAQPCSDKAYKIEELFYSYATHSDKFTDG VCLFWNCNVDRYPANSIVCRFDTRVLSNLSLPGCDGGSLYVN KHAFHTPAFDKSAFVNLKQLPFFYYSDSPCESHGKQVVSIDY VPLKSATCITRCNLGGAVCRHHANEYRLYLDAYNMMISAGFS LWVYKQFDTYNLWNTFTRLQSLNVAFNVVNKGHFDGQQG EVPVSIINNTVYTKVDGVDVELFENKTTLPVNVAFELWAKRNI KPVPEVKILNNLGVDAANTVIWDYKRDAPAHISTIGVCSMTD IAKKPTETICAPLTVFFDGRVDGQVDLFRNARNGVLITEGSVK GLQPSVGPQASLNGVTLIGEAVKTQFNYYKKVDGVVQQLP ETYFTQSRNLQEFKPRSQMEIDFLELAMDEFIERKLEGYAFE HIVYGDFSHSQLGGLHLLIGLAKRFKESPFELDFIPMDSTVKN YFITDAQTGSSKCVCSVIDLLDDFVEIIKSQDLSVSVKVVKVT IDYTEISFMLWCKDGHVETFYPKLQSSQAWQPGVAMPNLYK MQRMLLEKCDLQNYGDSATLPKGIMMNVAKYTQLCQYLNT LTLAVPYNMRVIHFGAGSDKGVAPGTAVLRQWLPTGTLVD SDLNDFVSDADSTLIGDCATVHTANKWDLIISDMYDPKTKNV TKENDSKEGFFTYICGFIQKLLALGGSVAIKITEHSWNADLYK LMGHFAWWTAFVTNVNASSSEAFILGCNYLGKPREQIDGYV MHANYIFWRNTNPIQLSSYSLFDMSKFPLKLRGTAVMSLKEG QINDMILSLLSKGRLIIRENNRVVISSDVLVNN</p>
--	---

10

20

30

40

50

327	ORF1a ポリタンパク質	<p>MESLVPGFNEKTHVQLSLPVLQVRDVLVRGFGDSVEEVLSEAR  QHLKDGTCGLVEVEKGVLPQLEQPYVFIKRS DARTAPHGHVM  VELVAELEGIQYGRSGETLGVLVPHVGEIPVAYRKVLLRKNGN  KGAGGHSYGADLKSFDLGDELGTDPYEDFQENWNTKHSSGVT  RELMRELNGGAYTRYVDNDFCGPDGYPLECIKDLLARAGKAS  CTLSEQLDFIDTKRGVYCCREHEHEIAWYTERSEKSYELQTPFEI  KLAKKFDTFNGECPNFVFLNSIIKTIQPRVEKKKLDGFMGRIRS  VYPVASPNECNQMCLSTLMKCDHCGETSWQTGDFVKATCEFC  GTENLTKEGATTCGYLPQNAVVKIYCPACHNSEVGPESHSLAEY  HNESGLKTILRKGGRRTIAFGGCVFSYVGCHNKCA YWVPRASAN  IGCNHTGVVGESEGLNDNLLEILQKEKVNINIVGDFKLNEEIAI  ILASFSASTSAFVETVKGLDYKAFKQIVESC GNFKVTKGKAKK  GAWNIGE QKSILSPLYAFASEAARVRSIFSRTLETAQNSVRVL  QKAAITILDGISQYSLRLIDAMMFTSDLATNNLVVMAYITGGVV  QLTSQWL TNIFGTVYEKLPVLDWLEEKFKEGVEFLRDGWEIV  KFISTCACEIVGGQIVTCAKEIKESVQTFKLVNKFLALCADSIH  GGAKLKALNLGETFVTHSKGLYRKC VKSREETGLLMPLKAPK  EIIFLEGETLPTEVLTEEVLKTGDLQPLEQPTSEAVEAPLVGTP  VCINGLMLLEIKDTEKYCALAPNMMVTNNTFTLKG GAPT KVTF  GDDTVIEVQGYKSVNITFELDERIDKVLNEKCSAYTVELGTEVN  EFACVVADAVIKTLQPVSELLTPLGIDLDEWSMATYYLFDSEGE  FKLASHMYCSFYPPDEDEEEGDCEEEEFEPSTQY EYGTEDDYQ  GKPLEFGATS AALQPEEEQEEDWLDDDSQQT VGGQDGEDNQ  TTTIQTIVEVQPQLEMELTPVVQTIEVNSFSGYLKLT DNVIKNA  DIVEEAKKVKPTVVVNAANVYLKHGGGVAGALNKATNNAMQ  VESDDYIATNGPLKVGGS CVLSGHNLA KHCLHVVGPNVNKGE  DIQLLKSA YENFNQHEVLLAPLLSAGIFGADPIHSLRVCVDTVR  TNVYLAVFDKNLYDKLVSSFLEMKSEKQVEQKIAEIPKEEVKPF  ITESKPSVEQRKQDDKKIKACVEEVTTTLEETKFLTENLLLYIDI  NGNLHPDSATLVSDIDITFLKKDAPYIVGDVVQEGVLTAVVIPT  KKAGGTTEMLAKALRKVPTDNYITTPGQGLNGYTVEEAKTV  LKKCKSAFYILPSIISNEKQEILGTVSWNLREMLAHAEETRCLM  PVCVETKAIVSTIQRKYKGIKIQEGVVDYGARFYFYTSKTTVAS  LINTLNDLNETLVTMPLGYVTHGLNLEEAARYMRS LKVPATVS  VSSPDAVTAYNGYLTSSSKTPEEHFIETISLAGSYK DWSYSQS  TQ</p>
-----	---------------	---

10

20

30

40

50

	<p>LGIEFLKRGDKSVYYTNSNPTTFHLDGEVITFDNLKTLSSLREVR  TIKVFTTVDNINLHTQVVDMMSMTYGQQFGPTYLDGADVTKIK  PHNSHEGKTFYVLPNDDTLRVEAFEYHYHTDPSFLGRYMSAL  NHTKKWKYPQVNGLTSLIKWADNNCYLATALLTQQIELKFN  PPALQDAYYRARAGEAANFCALILAYCNKTVGELGDVRETM  SYLFQHANLDSCKRVLNVVCKTCGQQQTTLKGVEAVMYMG  TLSYEQFKKGVQIPCTCGKQATKYLQQESPFVMMMSAPPAQY  ELKHGTFTCASEYTGNYQCGHYKHITSKETLYCIDGALLTKSS  EYKGPITDVFYKENSYTTTIKPVTYKLDGVVCTEIDPKLDNYY  KKDNSYFTEQPIDLVPNQYPNASFDNFKFVCDNIKFADDLNQ  LTGYKKPASRELKVTFPPDLNGDVVAIDYKHYPSPFKKGAKL  LHKPIVWHVNNATNKATYKPNWTCIRCLWSTKPVETSNSFDV  LKSEDAQGMDNLACEDLKPVSEEVVENPTIQKDVLECNVKT  EVVGDHILKANNLKITTEEVGHTDLMAAYVDNSSLTIKKNPNE  LSRVLGLKTLATHGLAAVNSVPWDTIANYAKPFLNKVVSTTT  NIVTRCLNRVCTNYMPYFFLLLQLCTFTRSTNSRIKASMPPTI  AKNTVKSVMGKFCLEASFNYLKSFNFSKLNIIHWFLLLSVCLGS  LIYSTAALGVLMNSNLGMPSYCTGYREGYLNSTNVTIATYCTG  SIPCSVCLSGLDSDLTYPSTLETIQITISSFKWDLTAFGLVAEWFL  AYILFTRFFYVLGLAAIMQLFFSYFAVHFISNSWLMWLIINLVQ  MAPISAMVRMYIFFASFYVWKSYPVHVVDGCNSSTCMCCY  KRNRA TRVECTIVNGVRRSFYVYANGGKGFCKLHNWNCVN  CDTFCAGSTFISDEVARDLSLQFKRPINPTDQSSYIVDSVTVKN  GSIHLYFDKAGQKTYERHSLSHFVNLDNLRANNTKGSLPINVI  VFDGKSKCEESSAKSASVYYSQLMCQPILLDQALVSDVGDS  AEVAVKMFDAYVNTFSSTFNVPMEKLTLVATAEAEELAKNV  SLDNVLSTFISARQGFVDSVETKDVVECKLKLHQSDIEVTG  DSCNNYMLTYNKVENMTPRDLGACIDCSARHINAQVAKSHNI  ALIWNVKDFMSLSEQLRKQIRSAKKNLFPKLTCAATTRQVV  NVVTTKIALKGGKIVNNWLKQLIKVTLVFLFVAAIFYLITPVH  VMSKHTDFSSEIIGYKAIDGGVTRDIASDTDCFANKHADFDTW  FSQRGGSYTNDKACPLIAAVITREVGFFVPLPGTILRTTNGD  FLHFLPRVFSAVGNICYTPSKLIEYTDFAVSACVLAECTIFKD  ASGKPVPCYDTNVLEGSVAYESLRPDTRYVLMDGSHIQFPNT  YLEGSRVVTTFDSEYCRHGTCERSEAGVCVSTSGRWVLLN  DYYRSLPGVFCGVDAVNLLTNMFTPLIQPIGALDISASIVAGGI  VAIVVTCLAYYFMRFRRAFGEYSHVVAFTLL</p>
--	---

10

20

30

40

50

	<p>FLMSFTVLCLTPVYSFLPGVYSVIYLYLTFYLTNDVSFLAHIQ  WMVMFTPLVPFWITIAIICISTKHFYWFFSNYLKRRVVFNGV  SFSTFEEAALCTFLLNKEMYLKLRSDVLLPLTQYNRYLALYN  KYKYFSGAMDTTSYREAACCHLAKALNDFSNSGSDVLYQPP  QTSITSAVLQSGFRKMAFPSGKVEGCMVQVTCGTTTLNGLWL  DDVVYCPRHVICTSEDMLNPNYEDLLIRKSNHNFLVQAGNVQ  LRVIGHSMQNCVLKLVDTANPKTPKYKFVRIQPGQTFSVLA  CYNGSPSGVYQCAMRPNFTIKGSFLNGSCGSVGFNIDYDCVSF  CYMHMELPTGVHAGTDLEGNFYGPFVDRQTAQAAGDTTI  TVNVLAWLYAAVINGDRWFLNRFTTTLNDFNLVAMKYNYP  LTQDHVDILGPLSAQTGIAVLDMCASLKELLQNGMNGRTILG  SALLEDEFTPFDDVVRQCSCGVTFQSAVKRTIKGTHHWLLLT  SLLVLVQSTQWSLFFFLYENAFLPFAMGIIAMSAFAMMFVKH  KHAFLCLFLLPSLATVAYFNMVYMPASWVMRIMTWLDMVD  TSLSGFKLKDCVMYASAVVLLILMTARTVYDDGARRVWTLM  NVLTLVYKVYYGNALDQAISMWALIISVTSNYSVGVTTVMFL  ARGIVFMCVEYCPFITGNTLQCIMLVYCFGLGYFCTCYFGLFC  LLNRYFRLTLGVYDYLVSTQEFYMNYSQGLLPPKNSIDAFKL  NIKLLGVGGKPCIKVATVQSKMSDVKCTSVVLLSVLQQLRVE  SSSKLWAQCVQLHNDILLAKDTTEAFEKMSVLLSVLLSMQGA  VDINKLCEEMLDNRATLQAIASEFSSLPSYAAFATAQEAYEQA  VANGDSEVVLKLLKSLNVAKSEFDRDAAMQRKLEKMAHQ  AMTQMYKQARSEDKRAKVTSAMQTMFTMLRKLNDNDALN  NIINNARDGCVPLNIPLTTAAKLMVVIPDYNTYKNTCDGTF  TYASALWEIQVVDADSKIVQLSEISMDNSPNLAWPLIVTALR  ANSAVKLQNNELSPVALRQMCAAGTTQACTDDNALAYYN  TTKGGRFVLALLSDLQDLKWARFPKSDGTGTIYTELEPPCRFV  TDTPKGPKVKYLYFIKGLNNLNRGMVLGSLAATVRLQAGNA  TEVPANSTVLSFCAFAVDAAKAYKDYLASGGQPITNCVKMLC  THTGTGQAITVTPEANMDQESFGGASCCLYCRCHIDHPNPKG  FCDLKGKYVQIPTTCANDPVGFTLKNVCTVCGMWKGYGCS  CDQLREPMLQSADAQSFLNGFAV</p>
--	--

10

20

30

40

50

328	ORF3a タンパク質	MDLFMRIFTIGTVTLKQGEIKDATPSDFVRATATIPIQASLPFG WLIVGVALLAVFQSASKIITLKKRWQLALSQGVHFCNLLLLF VTVYSHLLLVAAGLEAPFLYLYALVYFLQSINFVRIIMRLWLC WKCERSKNPLLYDANYFLCWHTNCYDYCIPYNSVTSSIVITSG DGTTPISEHDYQIGGYTEKWESGVKDCVVLHSYFTSDYYQL YSTQLSTDTGVEHVTFEYFNKIVDEPEEHVQIHTIDGSSGVVNP VMEPIYDEPTTTTTSVPL	
329	エンベロープタンパク質	MYSFVSEETGTLIVNSVLLFLAFVVFLVTLAILTALRLCAYCC NIVNVSLVKPSFYVYSRVKLNLSRVPDLLV	10
330	膜糖タンパク質	MADSNGTITVEELKKLLEQWNLVIGFLFTWICLLQFAYANR NRFLYIIKLIFLWLLWPVTLACFVLAAYRINWITGGIAIAMAC LVGLMWLSYFIASFRLFARTRSMWSFNPETNILLNVPLHGTIL TRPLLESELVIGAVILRGHLRIAGHHLGRCDIKDLPKEITVATS RTLSEYKLGASQRVAGDSGFAAYSRYRIGNYKLNTDHSSSSD NIALLVQ	
331	ORF6 タンパク質	MFHLVDFQVTIAEILLIIMRTFKVSIWNLDYIINLIKNLSKSLTE NKYSQLEDEEQPMEID	20
332	ORF7a タンパク質	MKIILFLALITLATCELYHYQECVVRGTTVLLKEPCSSGTYEGNS PFHPLADNKFALTCFSTQFAFACPDGVKHHVYQLRARSVSPKLF IRQEEVQELYSPIFLVAAIVFITLCTLKRKTE	
333	ORF7b タンパク質	MIELSLIDFYLCFLAFLFLVLIIMLIIFWFSLELQDHNETCHA	
334	ORF8 タンパク質	MKFLVFLGIITVAAFHQECSLQSQCTQHQPYYVDDPCPIHFYS KWYIRVGARKSAPLIELCVDEAGSKSPIQYIDIGNYTVSCLPFT INCQEPKLGSLVVRCSFYEDFLEYHDVRRVLDLFI	
335	ヌクレオカプシドリンタンパク質	MSDNGPQNQRNAPRITFGGPSDSTGSGNQNGERSGARSKQRRP QGLPNNTASWFTALTQHGKEDLKFPRGQGVPIINTSSPDDQI GYYRRATRRIRGGDGKMKDLSRWYFYLLGTGPEAGLPYGA NKDGIWVATEGALNTPKDHIGTRNPANNAIIVLQLPQGTTLTLP KGFYAEGSRGGSQASSRSSRSRNSRSTPGSSRGTSARMA GNGGDAALALLLDRLNQLESKMSGKGQQQQGQTVTKKSA AEASKKPRQKRTATKAYNVTQAFGRRGPEQTQGNFGDQELIR QGTDYKHWPQIAQFAPSASAFFGMSRIGMEVTPSGTWLTYTG AIKLDDKDPNFKDQVILLNKHIDAYKTFPPTPEPKDKKKKAD ETQALPQRQKQQTVTLLPAADLDDFSKQLQQSMSSADSTQA	30
336	ORF10 タンパク質	MGYINVFAPFTIYSLLLCRMNSRNYIAQVDVVNFNLT	40

## 【 0 3 7 7 】

いくつかの実施形態では、抗原性ポリペプチドは、SARS-CoV-2 タンパク質、SARS-CoV-2 タンパク質のフラグメントであるか、またはSARS-CoV-2 タンパク質もしくはそのフラグメントに由来する。いくつかの実施形態では、抗原性ポリペプチドは、SARS-CoV-2 スパイクタンパク質、Nsp1~Nsp16、ORF3a、ORF6、ORF7a、ORF7b、ORF8、ORF10、SARS-CoV-2 エンベロープタンパク質、SARS-CoV-2 膜タンパク質、SARS-CoV-2 ヌクレオカプシドタンパク質、または、SARS-CoV-2 スパイクタンパク質の免疫原性フラグメントからなり得るが、これらに限定されない。



## 【 0 3 7 8 】

いくつかの実施形態では、抗原は、表 9 上の配列の全部または一部を含有する。いくつかの実施形態では、ペプチドは、表 9 上の配列と少なくとも約 70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、または 99.5 % の類似性を有する配列を含有する。いくつかの実施形態では、環状 RNA ワクチンは、1 つを超える抗原をコードする RNA を含有する。いくつかの実施形態では、環状 RNA ワクチンは、少なくとも約 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または 15 個の抗原をコードする RNA を含有する。いくつかの実施形態では、環状 RNA ポリヌクレオチドは、1 つを超える抗原をコードする。いくつかの実施形態では、環状 RNA RNA ポリヌクレオチドは、少なくとも約 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または 15 個の抗原をコードする。

10

## 【 0 3 7 9 】

( 表 1 0 ) アジュバントポリペプチド

20

30

40

50

配列番号	アジュバントタンパク質	配列
337	BCSP31(BCSP_BRUME)	MKFGSKIRRLAVAAVAGAIALGASFAVAQAPFFRIGTG GTAGTYYPIGGLIANAISGAGEKGVPLVATAVSSNGSV ANINAIKSGALESGFTQSDVAYWAYNGTGLYDGKGKVE DLRLLATLYPETIHIVARKDANIKSVADLKGKRVSLEDPG SGTIVDARIVLEAYGLTEDDIKAEHLKPGPAGERLKD GAL DAYFFVGGYPTGAISELAISNGISLVPISGPEADKILEKYSF FSKDVPVAGAYKDVAETPTLAVAAQWVTS AKQPDDL IY NITKVLWNEDTRKALDAGHAKGKLIKLD SATSSLGIPLH PGAERFYKEAGV LK
338	MOMP(MOMP6_CHLP6)	MKLLK SALLFAATGSALS LQALPVG NPAEPSLLIDG TM WEGASGDPCDPCATWCD AISIRAGYYGDYVFDRVLKVD VNKTFSGMAATPTQATGNASNTNQPEANGRPNIA YGRH MQDAEWFSNA AFLALNIWDRFDIFCTLGASNGYFKASSA AFNLVGLIGFSAASSISTDLPMQLPNV GITQGVVEFY TDT SFSWSVGARGALWECGCATLGA EFQYAQSNPKIEMLN V TSSPAQFVIHKPRGYKGASSNFPLPITAGTTEATD TKSATI KYHEWQVGLALS YRLNMLVPYIGVNWSRATFDAD TIRI AQP K LKSEILNIT TWNP SLIGSTTALPNNSGKDV LSDV LQI ASIQINKMKS RKACGVAVGATLIDADKWSITGEARLINE RAAHMNAQFRF
339	フラゲリン (FLIC_ECOLI(株 K12))	MAQVINTNSLSLITQNNINKNQSALS SSSIERLSSGLRINSA KDDAAGQAIANRFTSNIKGLTQAARNANDGISVAQTTEG ALSEINNNLQRVRELT VQATTGTNSESDLSSIQDEIKSRLD EIDRVSGQTQFNGVNV LAKNGSMKIQVGANDNQ TITIDL KQIDAKTLGLDGF SVKNNDTVTTSAPVTAFGATTTNNIK LTGITLSTEAA TDTGGTNPASIEGVYTDNGNDYYAKITGG DNDGKYYAVTVANDGTVT MATGATANATVTDANTTKA TTTTSGGTPVQIDNTAGSATANLGAVSLV KLQDSKGNDT DTYALKDTNGNLYAADVNETTGAVSVKTITYTDSSGAA SSPTAVKLGDDGKTEVVDIDGKTYDSADLN GGNLQTG LTAGGEALTAVANGKTTDPLKALDDAIASVDKFRSSLGA VQNR LDSA VTNLNNTTTNLSEAQSRIQDADYATEVSNMS KAQIIQQAGNSVLAKANQVPQQVLSLLQG

10

20

30

40

50

340	IFN- $\alpha$ (IFNA1_ヒトインターフェロン $\alpha$ -1/13)	MASPFALLMVLVVLSCSSCSLGCCLPETHSLDNRRRTLM LLAQMSRISPSSCLMDRHDGFPQEEFDGNQFQKAPAI LHELIQQIFNLFTTKDSSAAWDEDLLDKFCTELYQQ LNDLEACVMQEERVGETPLMNADSILAVKKYFRITLYL TEKKYSPCAWEVVRAEIMRSLSLSTNLQERLRRKE
341	IFN- $\gamma$ (IFNG_ヒトインターフェロン $\gamma$ )	MKYTSYILAFQLCIVLGS LGCYCQDPYVKEAENLKKYFN AGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDRKIMQSQIVSFYFK L FKNFKDDQSIQKSVETIKEDMNVKFFNSNKKKRDDFEK LTNYSVTDLNVQRKAIHELIVMAELSPA AKTGKRKRSQ MLFRGRRASQ
342	IL-2 (IL2_ヒトインターロイキン-2)	MYRMQLLSCIALSLALVTNSAPTSSSTKKKTQLQLEHLLLD LQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCL EEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSE TTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT
343	IL-15 (IL15_ヒトインターロイキン-15)	MRISKPHLRISISIQCYLCLLN SHFLTEAGIHVFILGCFSAG LPKTEANWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPS CKVTAMKCFLELQVISLES GDASIHDTVENLILANNSLS SNGNVTESGCKECELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS
344	IL-18 (IL18_ヒトインターロイキン-18)	MAAEPVEDNCINFVAMK FIDNTLYFIAEDDENLES DYFG KLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNA PRTIFIISMYKDSQPRGMAVTISVKCEKISTLSCENKIISFK EMNPPDNIKDTKSDIIFQRSVPGHDNKMQFESSSYEGYF LACEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTVQNE D
345	Flt3-リガンド	MTVLAPAWSPTTYLLLLLLLLSSGLSGTQDCSFQHSPISD FAVKIRELSDYLLQDYPVTVASNLQDEELCGGLWRLVLA QRWMERLKT VAGSKMQGLLERNTEIHFVTKCAFQPPP SCLRFVQTNISRLLQETSEQLVALKPWITRQNF SRCLELQ CQPDSSTLPPPWSRPLEATAPTAPQPPLLLLLLLLPVGLL LAAAWCLHWQRTRRRTPRPGEQVPPVPSPQDLLLLVEH

10

20

30

40

50

346	抗 CTLA4(イピ ルミマブ)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLS CAASGFTFSSYTMHWVRQ APGKGLEWVTFISYDGN NKYYADSVKGRFTISR DNSKNTLYQMNSLRAED TAIYYCARTGWLGPFDY WGQGLVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTK VDKRVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFP PKPDTLMISRTPEVTCV VVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQD WLNKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRDELTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPV LDS DGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSP GK	10
347	抗 PD1(ニボル マブ)	QVQLVESGGGVVQPGRSL RLDCKASGITFSNSGMH WVRQAPGKGLEWVAVI WYDGSKRYYADSVKGR FTISRDNKNTLFLQMNS LRAEDTAVYYCATNDDY WGQGLVTVSSASTKGPS VFPLAPCSRSTSESTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGT KTYTCNVDHKPSNTKVD KRVESKYGPPCPPAPEFL GGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSD QEDPEVQFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQFNSTYR VVSVLTVLHQDWLNKEY KCKVSNKGLPSSIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPP SQEEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPVLDS DGS FFLYSRLTVDKSRWQEG NVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSLGK	20
348	抗 41BB(ウトミ ルマブ)	EVQLVQSGAEVKKPGESL RISCKGSGYSFSTYWIS WVRQMPGKGLEWMGKI YPGDSYTNYSFSFQGV TISADKSI STAYLQWSSLKASDTA MYYCARGYGIFDYWGQ GLVTVSSASTKGPSV FPLAPCSRSTSESTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSNFGT QTYTCNVDHKPSNTK VDKTV ERKCCVECP PAPPVAGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCV VVVDVSHEDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTFRVVS VLTVVHQDWLNKEYK CKVSNKGLPAPIEKT ISKTKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPMLDS DGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSP GK	30

40

## 【 0 3 8 0 】

いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチド、またはポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質は、本明細書に開示する1つ以上の配列と少なくとも約70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または99.5%の類似性を有する配列を含有する。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチド、またはポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質は、本明細書に開示する1つ以上の配列と同一の配列を含有する。いくつかの実施形態では、発現配列は、表8の配列と70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または99.5%の類

50

似性を有する配列を含むまたはそれからなるタンパク質をコードするか、または表 8 の配列と同一である。いくつかの実施形態では、発現配列は、表 8 の配列と 70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または 99.5% の類似性を有する配列を含むまたはそれからなるタンパク質をコードするか、または表 8 の配列と同一であり、IRES は、表 1 の配列と 70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または 99.5% の類似性を有する配列を含むまたはそれからなるか、表 1 の配列と同一である。いくつかの実施形態では、発現配列は、表 8 の配列と 70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または 99.5% の類似性を有する配列を含むまたはそれからなるタンパク質をコードするか、表 8 の配列と同一であり、3' 及び 5' グループイントロンフラグメントは、表 2 及び 3、4 及び 5、または 6 及び 7 の配列と 70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または 99.5% の類似性を有する対応する配列を含むまたはそれからなるか、あるいは表 2 及び 3、4 及び 5、または 6 及び 7 の配列と同一である。

#### 【0381】

好ましい実施形態を本明細書に記載する。これらの好ましい実施形態の変形は、前述の説明を読めば、当業者に明らかになり得る。本発明者らは、当業者がかかる変形を適切に用いることを予期しており、本発明者らは、本発明が本明細書に具体的に記載されるのとは別様に実践されることを意図している。したがって、本発明は、準拠法によって容認されているように、本明細書に添付の特許請求の範囲に記載される主題の全ての改変及び等価物を含む。更に、その全ての可能な変形における上記の要素の任意の組み合わせは、本明細書に別様に示されない限りまたは別様に文脈によって明らかに矛盾しない限り、本発明によって包含される。

#### 【実施例】

#### 【0382】

Wesselhoeft et al. (2019) RNA Circularization Diminishes Immunogenicity and Can Extend Translation Duration In vivo. Molecular Cell. 74 (3), 508 - 520、及び Wesselhoeft et al., (2018) Engineering circular RNA for Potent and Stable Translation in Eukaryotic Cells. Nature Communications. 9, 2629 は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。

#### 【0383】

本発明は、以下の実施例を参照することによって更に詳細に説明されるが、以下の実施例に限定されることを意図するものではない。これらの実施例は、主題の発明の作製方法及び使用方法を当業者に完全な開示及び説明を提供することを目的として例示のありとあらゆる変形を包含し、本発明とみなすものの範囲を限定することを意図しない。

#### 【0384】

##### 実施例 1

実施例 1 A : 外部二重鎖形成領域は、順列置換イントロンエクソン (PIE) 環状化戦略を使用して長い前駆体 RNA の環状化を可能にする。

全長脳心筋炎ウイルス (EMCV) IRES を含有する 1.1 kb 配列、ガウシアルシフェラーゼ (GLuc) 発現配列、及び順列置換イントロン - エクソン (PIE) 構築物の 2 つの短いエクソンフラグメントを、T4 フェージのチミジル酸シンターゼ (Td) 遺伝子の順列置換グループ I 触媒イントロンの 3' と 5' イントロンとの間に挿入した。前駆体 RNA は、ランオフ転写によって合成した。環状化を、前駆体 RNA を、マグネシウムイオン及び GTP の存在下で加熱することにより試みたが、スプライシング産物は得られ

なかった。

【0385】

完全に相補的な9ヌクレオチド及び19ヌクレオチド長の二重鎖形成領域を設計し、前駆体RNAの5'及び3'末端に追加した。これらの相同アームの追加により、前駆体RNAバンドの消失によって評価されるように、スプライシング効率が、9ヌクレオチド二重鎖形成領域で0から16%に、19ヌクレオチド二重鎖形成領域で48%に増加した。

【0386】

スプライシング産物をRNase Rで処理した。RNase Rで処理したスプライシング反応物の推定スプライスジャンクションにわたって配列決定すると、ライゲーションされたエクソンが明らかになり、RNase Rで処理したスプライシング反応物を、オリゴヌクレオチドを標的としたRNase Hで消化すると、RNase Hで消化された直鎖状前駆体によって得られた2つのバンドとは対照的に、単一のバンドが産生された。これは、環状RNAが、9または19ヌクレオチド長の外部二重鎖形成領域を含有する前駆体RNAのスプライシング反応物の主要な産物であることを示す。

10

【0387】

実施例1B：IRES及びPIEスプライス部位の二次構造を保存するスペーサーは、環状化の効率を増加する。

一連のスペーサーを設計し、3'PIEスプライス部位とIRESとの間に挿入した。これらのスペーサーは、IRES、3'PIEスプライス部位、及び/または5スプライス部位のイントロン配列内の二次構造を保存するまたは破壊するように設計した二次構造を保存するように設計された。スペーサー配列の追加は、87%スプライシング効率をもたらしたが、破壊的なスペーサー配列の追加は、検出可能なスプライシングをもたらさなかった。

20

【0388】

実施例2

実施例2A：外部二重鎖形成領域に加えて内部二重鎖形成領域は、スプライシングバブルを作製し、いくつかの発現配列の翻訳を可能にする。

スペーサーは、非構造化、イントロン及びIRES配列に非相同であり、スペーサー-スペーサー二重鎖形成領域を含有するように設計した。これらを、外部二重鎖形成領域、EMCV IRES、及びガウシアルシフェラーゼ(全長:1289nt)、ホタルルシフェラーゼ(2384nt)、eGFP(1451nt)、ヒトエリスロポエチン(1313nt)、及びCas9エンドヌクラーゼ(4934nt)の発現配列を含有する構築物の5'エクソンとIRESとの間ならびに3'エクソンと発現配列との間に挿入した。5つの構築物全ての環状化を達成した。T4ファージ及びアナベナイントロンを利用した構築物の環状化は、ほぼ同等であった。環状化効率は、配列が短いほど高かった。翻訳を測定するために、各構築物を、HEK293細胞にトランスフェクトした。ガウシア及びホタルルシフェラーゼをトランスフェクトした細胞は、発光によって測定されるように強い応答を示し、ヒトエリスロポエチンは、エリスロポエチンcircRNAでトランスフェクトした細胞の培地で検出可能であり、eGFP蛍光は、eGFP circRNAでトランスフェクトした細胞から観察された。Cas9 circRNAとGFPに対するsgRNAの、GFPを構成的に発現する細胞への同時トランスフェクションにより、sgRNAのみの対照と比較して、細胞の最大97%で蛍光が消失した。

30

40

【0389】

実施例2B：CVB3 IRESの使用は、タンパク質産生を増加させる。

内部及び外部二重鎖形成領域、ならびにガウシアルシフェラーゼまたはホタルルシフェラーゼ発現配列のいずれかを含有する異なるIRESを有する構築物を作製した。タンパク質産生は、トランスフェクションから24時間後のHEK293細胞の上清における発光によって測定した。コクサッキーウイルスB3(CVB3)IRES構築物は、両方の場合において最も多くのタンパク質を産生した。

【0390】

50

実施例 2 C : ポリ A またはポリ A C スペーサーの使用は、タンパク質産生を増加させる。

30ヌクレオチド長のポリ A またはポリ A C スペーサーを、実施例 2 B でタンパク質を産生した各 I R E S を伴う構築物の I R E S とスプライスジャンクションとの間に追加した。ガウシアルシフェラーゼ活性は、トランスフェクションから 24 時間後の H E K 2 9 3 細胞の上清における発光によって測定した。両方のスペーサーは、スペーサーを伴わない対照構築物よりも、全ての構築物で発現を改善した。

【 0 3 9 1 】

実施例 3

環状 R N A でトランスフェクトされた H E K 2 9 3 または H e L a 細胞は、同等の未修飾または修飾直鎖状 R N A でトランスフェクトされた細胞よりも多くのタンパク質を産生する。

10

H P L C で精製したガウシアルシフェラーゼをコードする *c i r c R N A* ( C V B 3 - G L u c - p A C ) を、標準的な未修飾 5'メチルグアノシンキャップ及び 3'ポリ A テール直鎖状 G L u c m R N A、ならびに市販のヌクレオシド修飾(シュドウリジン、5-メチルシトシン)直鎖状 G L u c m R N A ( T r i l i n k 製)と比較した。トランスフェクション 24 時間後に発光を測定し、*c i r c R N A* が、H E K 2 9 3 細胞において未修飾直鎖状 m R N A より 8 1 1 . 2 % 多いタンパク質を産生し、修飾 m R N A より 5 4 . 5 % 多いタンパク質を産生したことが明らかになった。同様の結果が、H e L a 細胞、及びヒトエリスロポエチンをコードする最適化された *c i r c R N A* と 5 - メトキシウリジンで修飾された直鎖状 m R N A との比較において得られた。

20

【 0 3 9 2 】

発光データは、6 日間にわたって収集した。H E K 2 9 3 細胞では、*c i r c R N A* トランスフェクションは 8 0 時間のタンパク質産生半減期をもたらし、それに対し、未修飾直鎖状 m R N A は 4 3 時間、及び修飾直鎖状 m R N A は 4 5 時間であった。H e L a 細胞では、*c i r c R N A* トランスフェクションは 1 1 6 時間のタンパク質産生半減期をもたらし、それに対し、未修飾直鎖状 m R N A は 4 4 時間、及び修飾直鎖状 m R N A は 4 9 時間であった。*C i r c R N A* は、両方の細胞型においてその寿命にわたって、未修飾及び修飾直鎖状 m R N A の両方よりも実質的に多くのタンパク質を産生した。

【 0 3 9 3 】

実施例 4

30

実施例 4 A : R N a s e 消化、H P L C 精製、及びホスファターゼ処理による *c i r c R N A* の精製は、免疫原性を低減する。完全に精製された環状 R N A は、未精製または部分的に精製された環状 R N A よりも免疫原性が有意に低い。タンパク質発現安定性及び細胞生存率は、細胞型及び環状 R N A 純度に依存する。

ヒト胎児腎臓 2 9 3 ( H E K 2 9 3 ) 及びヒト肺癌 A 5 4 9 細胞を、

- a . 未精製 G L u c 環状 R N A スプライシング反応物の産物、
- b . スプライシング反応物の R N a s e R 消化の産物、
- c . スプライシング反応物の R N a s e R 消化及び H P L C 精製の産物、または
- d . スプライシング反応物の R N a s e 消化、H P L C 精製、及びホスファターゼ処理

の産物、でトランスフェクトした。

40

【 0 3 9 4 】

スプライシング反応物の R N a s e R 消化は、トランスフェクトされていない対照と比較して、A 5 4 9 細胞においてサイトカイン放出を防ぐには不十分であった。

【 0 3 9 5 】

H P L C 精製の追加は、またサイトカイン放出を防ぐには不十分であったが、未精製スプライシング反応物と比較して、インターロイキン - 6 ( I L - 6 ) が有意に低下し、インターフェロン - 1 ( I F N 1 ) が有意に増加した。

【 0 3 9 6 】

H P L C 精製後及び R N a s e R 消化前にホスファターゼ処理を追加すると、A 5 4 9 細胞において評価された全ての上方制御されたサイトカインの発現が劇的に低下した。

50

分泌された単球化学誘引物質タンパク質 1 (MCP1)、IL-6、IFN-1、腫瘍壊死因子 (TNF)、及び IFN 誘導性タンパク質-10 (IP-10) は、検出不可能またはトランスフェクトされていないベースラインレベルまで低下した。

【0397】

HEK293細胞では実質的なサイトカイン放出はなかった。A549細胞は、より高純度の環状RNAでトランスフェクトすると、GLUC発現安定性及び細胞生存率が増加した。完全に精製された環状RNAは、トランスフェクトされた293細胞と同様の安定性表現型を有した。

【0398】

実施例4B：環状RNAは、有意な免疫原性を引き起こさず、RIG-Iリガンドではない。 10

A549細胞を、

a. 未精製環状RNA、

b. 高分子量(直鎖状及び環状連結)RNA、

c. 環状(ニックの入った)RNA、

d. 精製環状RNAの初期画分(ニックの入ったRNAピークとの重複が多い)、

e. 精製環状RNAの後期画分(ニックの入ったRNAピークとの重複が少ない)、

f. 環状化中に切除されたイントロン、または

g. ビヒクル(すなわち、トランスフェクトされていない対照)、でトランスフェクトした。 20

【0399】

前駆体RNAは、スプライシング反応物から好適に純粋な直鎖状前駆体RNAを取得することが困難なため、スプライス部位欠失変異体(DS)の形態で別個で合成及び精製した。サイトカイン放出及び細胞生存率を、各場合において測定した。

【0400】

スプライシング反応物内に存在する大半の種、ならびに前駆体RNAにตอบสนองして、強力なIL-6、RANTES、及びIP-10の放出が観察された。初期circRNA画分は、他の非circRNA画分に匹敵するサイトカイン応答を誘発した。これは、比較的少量の直鎖状RNA夾雑物でさえ、A549細胞において実質的な細胞性免疫応答を誘発できることを示す。後期circRNA画分は、トランスフェクトされていない対照からのサイトカイン応答を超えるサイトカイン応答を誘発しなかった。トランスフェクション36時間後のA549細胞生存率は、他の全ての画分と比較して、後期circRNA画分で有意に大きかった。 30

【0401】

後期circRNA HPLC画分、前駆体RNAまたは未精製スプライシング反応物を用いたA549細胞のトランスフェクション時のRIG-I及びIFN-1転写産物誘導を分析した。RIG-I及びIFN-1両方の転写産物の誘導は、前駆体RNA及び未精製スプライシング反応物よりも後期circRNA画分で弱かった。スプライシング反応物のRNase R処理だけでは、この効果を取り除くのに十分ではなかった。非常に少量のRIG-Iリガンド3p-hpRNAを環状RNAに加えると、実質的なRIG-I転写が誘導された。HeLa細胞では、RNase Rで消化したスプライシング反応物のトランスフェクションは、RIG-I及びIFN-1を誘導したが、精製circRNAでは誘導されなかった。全体として、HeLa細胞は、A549細胞よりも夾雑RNA種に対する感受性が低かった。 40

【0402】

スプライシング反応物または完全に精製されたcircRNAを用いたA549細胞のトランスフェクションから最初の8時間以内のRIG-I、IFN-1、IL-6、及びRANTES転写産物誘導をモニタリングする経時的実験では、circRNAに対する一過性の応答は明らかにならなかった。精製されたcircRNAも同様に、RAW264.7マウスマクロファージにおいて炎症促進性転写物を誘導できなかった。 50



## 【0403】

A549細胞を、EMCV IRES及びEGFP発現配列を含有する精製circRNAでトランスフェクトした。これは、炎症促進性転写物の実質的な誘導を産生することはできなかった。これらのデータは、スプライシング反応物の非環状成分が、以前の研究で観察された免疫原性の原因であり、circRNAがRIG-Iの天然リガンドではないことを実証する。

## 【0404】

## 実施例5

環状RNAは、TLRによる検出を回避する。

TLR3、7、及び8レポーター細胞株を、複数の直鎖状または環状RNA構築物でトランスフェクトし、分泌された胚性アルカリホスファターゼ(SEAP)を測定した。

## 【0405】

直鎖状化RNAは、イントロン及び相同アームの配列を欠失させることによって構築した。次に、直鎖状RNA構築物を、ホスファターゼで処理し(キャップされたRNAの場合、キャップした後)、HPLCによって精製した。

## 【0406】

試みたトランスフェクションのいずれも、TLR7レポーター細胞において応答を産生しなかった。TLR3及びTLR8レポーター細胞は、キャップされた直鎖状化RNA、ポリアデニル化直鎖状化RNA、ニックの入ったcircRNA HPLC画分、及び初期circRNA画分によって活性化された。後期circRNA画分及びm1-mRNAは、どの細胞株でもTLR仲介応答を誘発しなかった。

## 【0407】

2番目の実験では、circRNAを、2つの方法：マグネシウムイオンの存在下での熱を用いたcircRNAの処理、ならびにDNAオリゴヌクレオチド誘導RNase H消化を使用して直鎖状化した。どちらの方法でも、大部分の完全長直鎖状RNAと、少量のインタクトなcircRNAが得られた。TLR3、7、及び8レポーター細胞を、環状RNA、熱により分解された環状RNA、またはRNase Hにより分解された環状RNAでトランスフェクトし、SEAP分泌をトランスフェクションから36時間後に測定した。TLR8レポーター細胞は、分解された環状RNAの両方の形態に応答してSEAPを分泌したが、モックトランスフェクションよりも環状RNAトランスフェクションに対して大きな応答を産生しなかった。インビトロで転写された直鎖状化RNAによるTLR3の活性化にもかかわらず、分解またはインタクト条件では、TLR3及びTLR7レポーター細胞における活性化は観察されなかった。

## 【0408】

## 実施例6

未修飾環状RNAは、直鎖状RNAよりも増加した持続的なインビボタンパク質発現を産生する。

未修飾及びm1修飾ヒトエリスロポエチン(hEpo)直鎖状mRNA及びcircRNAを用いて、マウスに注射し、HEK293細胞をトランスフェクトした。m1-mRNA及び未修飾circRNAの等モルトランスフェクションにより、HEK293細胞で強力なタンパク質発現がもたらされた。hEpo直鎖状mRNA及びcircRNAは、HEK293及びA549細胞の等重量トランスフェクション時のGLuc直鎖状mRNA及びcircRNAと比較して、同様の相対的なタンパク質発現パターン及び細胞生存率を示した。

## 【0409】

マウスでは、hEpo circRNAまたは直鎖状mRNAを内臓脂肪に注射した後、hEpoが血清中に検出された。未修飾circRNAの注射後に検出されたhEpoは、未修飾またはm1-mRNAからのものよりもゆっくりと減衰し、注射後42時間でも依然として存在していた。血清hEpoは、未精製circRNAスプライシング反応物または未修飾直鎖状mRNAの注射時には急速に下降した。未精製スプライシング反

10

20

30

40

50

応物の注射は、血清中で検出可能なサイトカイン応答を産生し、これは精製 *circRNA* を含む他の *RNA* では観察されなかった。

#### 【0410】

##### 実施例 7

環状 *RNA* は、脂質ナノ粒子を介してインビボまたはインビトロで効果的に送達されることができる。

精製環状 *RNA* を、イオン化可能なリポイド *CKK-E12* を用いて脂質ナノ粒子 (*LNP*) へと製剤化した (Dong et al., 2014; Kaufman et al., 2015)。粒子は、5 *moU* で修飾された市販の対照直鎖状 *mRNA* を含有する粒子と同様の平均サイズ、多分散度指数、及び封入効率を備えた均一なマルチメラ構造を形成した。

10

#### 【0411】

精製 *hepo circRNA* は、*LNP* に封入し、*HEK293* 細胞に加えた場合、5 *moU-mRNA* よりも高い発現を示した。*HEK293* 細胞における *LNP-RNA* からの発現安定性は、5 *moU-mRNA* 及び *circRNA* の両方に関する減衰のわずかな遅延を除いて、トランスフェクション試薬によって送達された *RNA* の発現安定性と同様であった。未修飾 *circRNA* 及び 5 *moU-mRNA* は両方とも、インビトロで *RIG-I/IFN-1* を活性化できなかった。

#### 【0412】

マウスでは、*LNP-RNA* は、内臓脂肪組織への局所注射または肝臓への静脈内送達によって送達された。どちらの場合も、送達から 6 時間後、*circRNA* からの血清 *hepo* 発現は低かったが、5 *moU-mRNA* からの発現と同等であった。未修飾 *LNP-circRNA* の脂肪注射後に検出された血清 *hepo* は、*LNP-5moU-mRNA* からのものよりもゆっくりと減衰し、血清中に存在する発現減衰の遅延はインビトロで認められたものと同様であったが、*LNP-circRNA* または *LNP-5moU-mRNA* の静脈内注射後の血清 *hepo* は、およそ同じ速度で減衰した。これらの場合のいずれにおいても、血清サイトカインまたは局所 *RIG-I*、*TNF*、もしくは *IL-6* 転写産物誘導において増加はなかった。

20

#### 【0413】

##### 実施例 8

*HEK293*、*HepG2*、及び *1C1C7* 細胞における *IRES* による発現と機能安定性。

30

アナベナイントロン/エクソン領域、ガウシアルシフェラーゼ発現配列、及び様々な *IRES* を含む構築物を環状化した。100 *ng* の各環状化反応物を、*Lipofectamine Messenger Max* を使用して、20,000 個の *HEK293* 細胞、*HepG2* 細胞、及び *1C1C7* 細胞に別個にトランスフェクトした。各上清における発光は、タンパク質発現の尺度として 24 時間後に評価した。*HEK293* 細胞では、クロヒウイルス *B*、サリウイルス *FHB*、アイチウイルス、サリウイルス *HG-J1*、及びエンテロウイルス *J* *IRES* を含む構築物が、24 時間で最も多くの発光を産生した (図 1A)。*HepG2* 細胞では、アイチウイルス、サリウイルス *FHB*、*EMCV-Cf*、*CVA3* *IRES* を含む構築物が、24 時間で高い発光を産生した (図 1B)。*1C1C7* 細胞では、サリウイルス *FHB*、アイチウイルス、サリウイルス *NG-J1*、及びサリウイルス *ASZ-1* *IRES* を含む構築物が、24 時間で高い発光を産生した (図 1C)。

40

#### 【0414】

より大きな *IRES* が、24 時間でより大きな発光を産生する傾向が観察された。総配列長が短いと環状化効率が増加する傾向があるため、高い発現及び比較的短い *IRES* の選択は、構築物の改善をもたらし得る。*HEK293* 細胞では、クロヒウイルス *B* *IRES* を使用した構築物が、特に同様の長さの他の *IRES* と比較して、最も高い発光を産生した (図 2A)。*IRES* サイズに対してプロットされた *HepG2* 及び *1C1C7* 細

50

胞における I R E S 構築物からの発現を、図 2 B 及び 2 C に示す。

【 0 4 1 5 】

H e p G 2 及び 1 C 1 C 7 細胞における選択された I R E S 構築物の機能安定性を、3 日間にわたって測定した。上清中の分泌されたガウシアルシフェラーゼからの発光を、2 0 , 0 0 0 個の細胞を 1 0 0 n g の各環状化反応物でトランスフェクトした後 2 4 時間毎に測定し、その後完全に培地を交換した。サリウイルス A G U T 及びサリウイルス F H B は、H e p G 2 細胞で最も高い機能安定性を呈し、サリウイルス N - J 1 及びサリウイルス F H B は、1 C 1 C 7 細胞で最も安定した発現を産生した ( 図 3 A 及び 3 B ) 。

【 0 4 1 6 】

実施例 9

J u r k a t 細胞における I R E S による発現及び機能安定性。

アナベナイントロン/エクソン領域、ガウシアルシフェラーゼ発現配列、及び以前に試験した I R E S のサブセットを含む 2 セットの構築物を環状化した。6 0 , 0 0 0 個の J u r k a t 細胞を、1 μ g の各環状化反応物でエレクトロポレーションした。エレクトロポレーションから 2 4 時間後に、上清中の分泌されたガウシアルシフェラーゼからの発光を測定した。セット間の比較及び以前に定義された I R E S の有効性との比較のために、C V B 3 I R E S 構築物を両方のセットに含んだ。C V B 1 及びサリウイルス A S Z 1 I R E S 構築物は、2 4 時間で最も多くの発現を産生した。データは、図 4 A 及び 4 B に見出すことができる。

【 0 4 1 7 】

各ラウンドのエレクトロポレーションした J u r k a t 細胞における I R E S 構築物の機能安定性を、3 日間にわたって測定した。上清中の分泌されたガウシアルシフェラーゼからの発光を、6 0 , 0 0 0 個の細胞を 1 μ g の各環状化反応物でエレクトロポレーションした後 2 4 時間毎に測定し、その後完全に培地を交換した ( 図 5 A 及び 5 B ) 。

【 0 4 1 8 】

サリウイルス A S Z 1 及びサリウイルス A B N 2 I R E S 構築物は、他の構築物と比較して高い機能安定性を有した。

【 0 4 1 9 】

実施例 1 0

J u r k a t 細胞における環状及び直鎖状 R N A の発現、機能安定性、及びサイトカイン放出。

アナベナイントロン/エクソン領域、ガウシアルシフェラーゼ発現配列、及びサリウイルス F H B I R E S を含む、構築物を環状化した。ガウシアルシフェラーゼ発現配列及び約 1 5 0 n t ポリ A テールを含む m R N A 、ならびに 1 0 0 % のウリジンを 5 - メトキシウリジン ( 5 m o U ) に置き換えるように修飾されたものは市販されており、T r i l i n k から購入した。5 m o U ヌクレオチド修飾は、m R N A の安定性及び発現を改善することが示されている ( B i o c o n j u g C h e m . 2 0 1 6 M a r 1 6 ; 2 7 ( 3 ) : 8 4 9 - 5 3 ) 。 J u r k a t 細胞における修飾 m R N A の発現、環状化反応物 ( 未純化 ) 、及びサイズ排除 H P L C によって精製された c i r c R N A ( 純粋 ) を測定し、比較した ( 図 6 A ) 。上清中の分泌されたガウシアルシフェラーゼからの発光を、6 0 , 0 0 0 個の細胞を 1 μ g の各 R N A 種でエレクトロポレーションしてから 2 4 時間後に測定した。

【 0 4 2 0 】

上清中の分泌されたガウシアルシフェラーゼからの発光は、6 0 , 0 0 0 個の細胞を 1 μ g の各 R N A 種でエレクトロポレーションした後 2 4 時間毎に測定し、その後完全に培地を交換した。3 日間にわたる J u r k a t 細胞における修飾 m R N A 及び c i r c R N A の機能安定性データの比較を、図 6 B に示す。

【 0 4 2 1 】

I F N ( 図 7 A ) 、 I L - 6 ( 図 7 B ) 、 I L - 2 ( 図 7 C ) 、 R I G - I ( 図 7 D ) 、 I F N - 1 ( 図 7 E ) 、及び T N F ( 図 7 F ) 転写産物誘導を、6 0 , 0 0 0 個

10

20

30

40

50

の Jurkat 細胞を  $1 \mu\text{g}$  の上記の各 RNA 種及び 3p-hpRNA (RIG-I アゴニストとして知られる 5' 三リン酸ヘアピン RNA) でエレクトロポレーションしてから 18 時間後に測定した。

#### 【0422】

##### 実施例 11

単球及びマクロファージにおける環状及び直鎖状 RNA の発現。

アナベナイントロン/エクソン領域、ガウシアルシフェラーゼ発現配列、及びサリウイルス FHB IRES を含む構築物を環状化した。ガウシアルシフェラーゼ発現配列及び約 150 nt ポリ A テールを含む mRNA、ならびに 100% のウリジンを 5-メトキシウリジン (5moU) に置き換えるように修飾されたものは、Trilink から購入した。環状及び修飾 mRNA の発現を、ヒト初代単球 (図 8A) 及びヒト初代マクロファージ (図 8B) において測定した。上清中の分泌されたガウシアルシフェラーゼからの発光を、60,000 個の細胞を  $1 \mu\text{g}$  の各 RNA 種でエレクトロポレーションしてから 24 時間後に測定した。発光は、ヒト初代マクロファージをエレクトロポレーションしてから 4 日後にも測定し、培地は 24 時間毎に交換した (図 8C)。発光における差異は、いずれの場合も統計的に有意であった ( $p < 0.05$ )。

10

#### 【0423】

##### 実施例 12

初代 T 細胞における IRES による発現及び機能安定性。

アナベナイントロン/エクソン領域、ガウシアルシフェラーゼ発現配列、及び以前に試験した IRES のサブセットを含む構築物を環状化し、反応産物をサイズ排除 HPLC によって精製した。150,000 個の初代ヒト CD3+T 細胞を、 $1 \mu\text{g}$  の各 circRNA でエレクトロポレーションした。エレクトロポレーションから 24 時間後に、上清中の分泌されたガウシアルシフェラーゼからの発光を測定した (図 9A)。アイチウイルス及び CVB3 IRES 構築物は、24 時間で最も多く発現した。

20

#### 【0424】

発光はまた、各構築物の機能安定性を比較するために、エレクトロポレーション後 24 時間毎に 3 日間にわたって測定した (図 9B)。サリウイルス A SZ1 IRES を伴う構築物が最も安定していた。

#### 【0425】

##### 実施例 13

初代 T 細胞及び PBMC における環状及び直鎖状 RNA の発現及び機能安定性。

アナベナイントロン/エクソン領域、ガウシアルシフェラーゼ発現配列、及びサリウイルス A SZ1 IRES またはサリウイルス FHB IRES を含む構築物を環状化した。ガウシアルシフェラーゼ発現配列及び約 150 nt ポリ A テールを含む mRNA、ならびに 100% のウリジンを 5-メトキシウリジン (5moU) に置き換えるように修飾されたものは、Trilink から購入した。サリウイルス A SZ1 IRES HPLC 精製環状及び修飾 mRNA の発現を、ヒト初代 CD3+T 細胞において測定した。サリウイルス FHB HPLC 精製環状、未精製環状及び修飾 mRNA の発現を、ヒト PBMC において測定した。上清中の分泌されたガウシアルシフェラーゼからの発光を、150,000 個の細胞を  $1 \mu\text{g}$  の各 RNA 種でエレクトロポレーションしてから 24 時間後に測定した。初代ヒト T 細胞に関するデータは、図 10A 及び 10B 中にあり、PBMC に関するデータは、図 10C 中にある。精製環状 RNA 及び未精製環状 RNA または直鎖状 RNA 間の発現における差異は、いずれの場合も有意であった ( $p < 0.05$ )。

40

#### 【0426】

初代 T 細胞上清中の分泌されたガウシアルシフェラーゼからの発光を、構築物の機能安定性を比較するために、エレクトロポレーション後 24 時間毎に 3 日間にわたって測定した。データを、図 10B に示す。精製環状 RNA と直鎖状 RNA との間の 1 日目の測定からの相対発光における差異は、初代 T 細胞に関して 2 日目及び 3 日目の両方で有意であった。

50

## 【0427】

## 実施例14

アナベナイントロンにおける順列置換部位による環状化効率。

CVB3 IRES、ガウシアルシフェラーゼ発現配列、アナベナイントロン/エクソン領域、スパーサー、内部二重鎖形成領域、及び相同アームを含むRNA構築物を産生した。従来のアナベナイントロン順列置換部位及びP9における5つの連続した順列置換部位を使用した構築物の環状化効率を、HPLCによって測定した。P9における5つの連続した順列置換部位に関するHPLCクロマトグラムを、図11Aに示す。

## 【0428】

環状化効率は、様々な順列置換部位で測定した。環状化効率は、 $\text{circRNA} / (\text{circRNA} + \text{前駆体RNA})$ のそれぞれに関するHPLCクロマトグラム曲線下面積として定義する。各順列置換部位での環状化効率のランク付けされた定量化を、図11Bに示す。3つの順列置換部位(図11Bに示している)を、更なる調査のために選択した。

## 【0429】

この実施例における環状RNAは、インビトロ転写(IVT)によって環状化し、次にスピнкаラムを介して精製した。環状化効率は、全ての構築物に関して、 $\text{Mg}^{2+}$ 及びグアノシヌクレオチドとのインキュベーションの追加ステップを含めると、高くなる可能性があり得る；ただし、このステップの除去は、環状RNA構築物間の比較、及び環状RNA構築物の最適化を可能にした。このレベルの最適化は、キメラ抗原受容体をコードするものなどの大きなRNA構築物で高い環状化効率を維持するのに特に有用である。

## 【0430】

## 実施例15

代替イントロンの環状化効率。

様々な種起源の順列置換グループ1イントロンまたは順列置換部位及び、CVB3 IRES、ガウシアルシフェラーゼ発現配列、スパーサー、内部二重鎖形成領域、及び相同アームを含むいくつかの定常エレメントを含有する前駆体RNAを作製した。環状化データは、図12に見出すことができる。図12Aは、前駆体、circRNA及びイントロンを分解するクロマトグラムを示す。図12Bは、イントロン構築物の関数として、図12Aに示されるクロマトグラムに基づいて、環状化効率のランク付けされた定量化を提供する。

## 【0431】

この実施例における環状RNAは、インビトロ転写(IVT)によって環状化し、次にスピнкаラム精製を行った。環状化効率は、全ての構築物に関して、 $\text{Mg}^{2+}$ 及びグアノシヌクレオチドとのインキュベーションの追加ステップを含めると、高くなる可能性があり得る；ただし、このステップの除去は、環状RNA構築物間の比較、及び環状RNA構築物の最適化を可能にする。このレベルの最適化は、キメラ抗原受容体をコードするものなどの大きなRNA構築物で高い環状化効率を維持するのに特に有用である。

## 【0432】

## 実施例16

相同アームの存在または長さによる環状化効率。

CVB3 IRES、ガウシアルシフェラーゼ発現配列、アナベナイントロン/エクソン領域、スパーサー、内部二重鎖形成領域を含むRNA構築物を産生した。3つのアナベナイントロン順列置換部位を表す構築物を、30nt、25%GC相同アームを用いて、または相同アームを用いずに(「NA」)試験した。これらの構築物は、 $\text{Mg}^{2+}$ インキュベーションステップを伴わずに環状化することが可能であった。環状化効率を測定し、比較した。データは、図13に見出すことができる。環状化効率は、相同アームを欠く各構築物でより高かった。図13Aは、環状化効率のランク付けされた定量化を提供する；図13Bは、前駆体、circRNA及びイントロンを分解するクロマトグラムを提供する。

## 【0433】

10

20

30

40

50

3つの順列置換部位のそれぞれについて、構築物を、10 nt、20 nt、及び30 ntのアーム長ならびに25%、50%、及び75% GCで作製した。これらの構築物のスプライシング効率を測定し、相同アームを伴わない構築物と比較した(図14)。スプライシング効率は、スプライシング反応物における総RNAに対する遊離イントロンの割合として定義する。

【0434】

図15A(左)は、スプライシング効率の改善に対する強い相同アームの寄与を示すHPLCクロマトグラムを含有する。左上:75%GC含量、10nt相同アーム。中央左:75%GC含量、20nt相同アーム。左下:75%GC含量、30nt相同アーム。

【0435】

図15A(右)は、ニッキングの増加と対になったスプライシング効率の増加を示すHPLCクロマトグラムを示し、circRNAピークのショルダーとして現れている。右上:75%GC含量、10nt相同アーム。中央右:75%GC含量、20nt相同アーム。右下:75%GC含量、30nt相同アーム。

【0436】

図15B(左)は、改善された環状化効率を実証すると仮定された順列置換部位及び相同アームの選択された組み合わせを示す。

【0437】

図15B(右)は、E.coliポリAポリメラーゼで処理された、改善された環状化効率を実証すると仮定された順列置換部位及び相同アームの選択された組み合わせを示す。

【0438】

この実施例における環状RNAは、インビトロ転写(IVT)によって環状化し、次にスピナラム精製を行った。環状化効率は、全ての構築物に関して、グアノシンヌクレオチドとの追加の $Mg^{2+}$ インキュベーションステップを含めると、高くなる可能性があり得る;ただし、このステップの除去は、環状RNA構築物間の比較、及び環状RNA構築物の最適化を可能にした。このレベルの最適化は、キメラ抗原受容体をコードするものなどの大きなRNA構築物で高い環状化効率を維持するのに特に有用である。

【0439】

実施例17

キメラ抗原受容体をコードする環状RNA。

アナペナイントロン/エクソン領域、キムリアキメラ抗原受容体(CAR)発現配列、及びCVB3 IRESを含む構築物を環状化した。100,000個のヒト初代CD3+T細胞を、500ngのcircRNAでエレクトロポレーションし、GFP及びホタルルシフェラーゼを安定して発現するRaji細胞と24時間共培養した。エフェクター対標的比(E:T比)0.75:1。100,000個のヒト初代CD3+T細胞を、モックエレクトロポレーションし、対照として共培養した(図16)。

【0440】

100,000個のヒト初代CD3+T細胞のセットを、モックエレクトロポレーションした、または1 $\mu$ gのcircRNAでエレクトロポレーションし、次にGFP及びホタルルシフェラーゼを安定して発現するRaji細胞と48時間共培養した。E:T比10:1(図17)。

【0441】

Raji標的細胞の特異的溶解の定量化は、ホタル発光の検出によって決定した(図18)。モックエレクトロポレーションした、または異なるCAR配列をコードするcircRNAでエレクトロポレーションした100,000個のヒト初代CD3+T細胞を、GFP及びホタルルシフェラーゼを安定して発現するRaji細胞と48時間共培養した。特異的溶解%を $1 - [CAR条件発光] / [モック条件発光]$ として定義した。E:T比10:1。

【0442】

10

20

30

40

50

## 実施例 18

Jurkat細胞及び休止ヒトT細胞における環状及び直鎖状RNAの発現及び機能安定性。

アナバイントロン/エクソン領域、ガウシアルシフェラーゼ発現配列、及び以前に試験したIRESのサブセットを含む構築物を環状化し、反応産物をサイズ排除HPLCによって精製した。150,000個のJurkat細胞を、1µgの環状RNAまたは5moU-mRNAでエレクトロポレーションした。エレクトロポレーションから24時間後に、上清中の分泌されたガウシアルシフェラーゼからの発光を測定した(図19A左)。150,000個の休止初代ヒトCD3+T細胞(刺激後10日)を、1µgの環状RNAまたは5moU-mRNAでエレクトロポレーションした。エレクトロポレーションから24時間後に、上清中の分泌されたガウシアルシフェラーゼからの発光を測定した(図19A右)。

## 【0443】

上清中の分泌されたガウシアルシフェラーゼからの発光は、エレクトロポレーション後24時間毎に測定し、その後完全に培地を交換した。機能安定性データを、図19Bに示す。環状RNAは、いずれの場合も直鎖状RNAよりも機能安定性が高く、Jurkat細胞においてより顕著な差異があった。

## 【0444】

## 実施例 19

直鎖状RNAまたは様々な環状RNA構築物でエレクトロポレーションした細胞のIFN-1、RIG-I、IL-2、IL-6、IFN、及びTNF転写産物誘導。

アナバイントロン/エクソン領域、ガウシアルシフェラーゼ発現配列、及び以前に試験したIRESのサブセットを含む構築物を環状化し、反応産物をサイズ排除HPLCによって精製した。150,000個のCD3+ヒトT細胞を、1µgの環状RNA、5moU-mRNA、または免疫刺激陽性対照ポリイノシン：シトシンでエレクトロポレーションした。IFN-1(図20A)、RIG-I(図20B)、IL-2(図20C)、IL-6(図20D)、IFN-(図20E)、及びTNF-(図20F)転写産物誘導を、エレクトロポレーションから18時間後に測定した。

## 【0445】

## 実施例 20

異なる量の環状または直鎖状RNAでエレクトロポレーションしたCAR発現細胞による標的細胞の特異的溶解及びIFN転写産物誘導；異なるE:T比でのCAR発現細胞による標的及び非標的細胞の特異的溶解。

アナバイントロン/エクソン領域、抗CD19CAR発現配列、及びCVB3IRESを含む構築物を環状化し、反応産物をサイズ排除HPLCによって精製した。モックエレクトロポレーションした、または抗CD19CAR配列をコードする異なる量のcircRNAでエレクトロポレーションした150,000個のヒト初代CD3+T細胞を、2:1のE:T比にて、GFP及びホタルシフェラーゼを安定して発現するRaji細胞と12時間共培養した。Raji標的細胞の特異的溶解率は、ホタル発光の検出によって決定した(図21A)。特異的溶解%を、 $1 - [\text{CAR条件発光}] / [\text{モック条件発光}]$ として定義した。IFN転写産物誘導は、エレクトロポレーションから24時間後に測定した(図21B)。

## 【0446】

150,000個のヒト初代CD3+T細胞を、モックエレクトロポレーションした、または抗CD19CAR配列をコードする500ngのcircRNAもしくはm1-mRNAでエレクトロポレーションし、次に異なるE:T比にて、ホタルシフェラーゼを安定して発現するRaji細胞と24時間共培養した。Raji標的細胞の特異的溶解をホタル発光の検出によって決定した(図22A)。特異的溶解を、 $1 - [\text{CAR条件発光}] / [\text{モック条件発光}]$ として定義した。

## 【0447】

10

20

30

40

50

CARを発現するT細胞を更に、異なるE:T比にて、ホタルルシフェラーゼを安定して発現するRajiまたはK562細胞と24時間共培養した。Raji標的細胞またはK562非標的細胞の特異的溶解は、ホタル発光の検出によって決定した(図22B)。特異的溶解%を、 $1 - [\text{CAR条件発光}] / [\text{モック条件発光}]$  として定義した。

【0448】

#### 実施例21

CARをコードする環状RNAまたは直鎖状RNAでエレクトロポレーションしたT細胞による標的細胞の特異的溶解。

アナベナイントロン/エクソン領域、抗CD19 CAR発現配列、及びCVB3 IRESを含む構築物を環状化し、反応産物をサイズ排除HPLCによって精製した。ヒト初代CD3+T細胞を、500ngの環状RNAまたは等モル量のm1-mRNAでエレクトロポレーションし、CD19を標的としたCARを各々コードした。Raji細胞をCAR-T細胞培養物に7日間にわたって10:1のE:T比にて加えた。特異的溶解%を、両方の構築物について、1、3、5、及び7日目に測定した(図23)。

10

【0449】

#### 実施例22

抗CD19 CARまたは抗BCMA CARを発現するT細胞によるRaji細胞の特異的溶解。

アナベナイントロン/エクソン領域、抗CD19または抗BCMA CAR発現配列、及びCVB3 IRESを含む構築物を環状化し、反応産物をサイズ排除HPLCによって精製した。150,000個の初代ヒトCD3+T細胞を、500ngのcircRNAでエレクトロポレーションし、次にRaji細胞と2:1のE:T比にて共培養した。特異的溶解%をエレクトロポレーションの12時間後に測定した(図24)。

20

【0450】

#### 実施例23

抗原を発現する環状及び直鎖状RNAの発現、機能安定性、及びサイトカイン転写産物誘導。

1つ以上の抗原発現配列を含む構築物を環状化し、反応産物をサイズ排除HPLCによって精製する。抗原提示細胞を、環状RNAまたはmRNAでエレクトロポレーションする。

30

【0451】

インビトロでの抗原産生は、ELISAを介して測定される。任意で、抗原産生は、エレクトロポレーション後24時間毎に測定される。サイトカイン転写産物の誘導または放出は、抗原提示細胞を抗原をコードする環状または直鎖状RNAでエレクトロポレーションしてから18時間後に測定される。試験したサイトカインは、IFN- $\gamma$ 、RIG-I、IL-2、IL-6、IFN- $\beta$ 、RANTES、及びTNF- $\alpha$  を含み得る。

【0452】

インビトロでの抗原産生及びサイトカイン誘導は、発現及び免疫刺激を最良に保存する比率を見出すために、精製されたcircRNA、精製されたcircRNAプラスアンチセンスcircRNA、及び未精製circRNAを使用して測定される。

40

【0453】

#### 実施例24

動物モデルにおけるインビボ抗原及び抗体発現。

インビボで抗原発現及び抗体産生を促進するcircRNAをコードする抗原の能力を評価するために、1つ以上の抗原をコードする漸増用量のRNAを、筋肉注射によってマウスに導入する。

【0454】

マウスに1回注射し、28日後に採血し、その後14日後に採血して再度注射する。目的の抗原に対する中和抗体は、ELISAを介して測定される。

【0455】

50



## 実施例 2 5

## 感染からの保護。

感染から保護または治癒する c i r c R N A をコードする抗原の能力を評価するために、ウイルス（インフルエンザなど）の 1 つ以上の抗原をコードする R N A を、筋肉注射を介してマウスに導入する。

【 0 4 5 6 】

マウスは、1 つ以上の抗原をコードする c i r c R N A の初期注射及びブースト注射を受ける。インフルエンザなどのウイルスからの保護は、2 週間にわたる体重減少及び死亡率によって決定される。

【 0 4 5 7 】

## 実施例 2 6

## 実施例 2 6 A : 化合物の合成

本発明の代表的なイオン化可能脂質の合成は、P C T 出願 P C T / U S 2 0 1 6 / 0 5 2 3 5 2、P C T / U S 2 0 1 6 / 0 6 8 3 0 0、P C T / U S 2 0 1 0 / 0 6 1 0 5 8、P C T / U S 2 0 1 8 / 0 5 8 5 5 5、P C T / U S 2 0 1 8 / 0 5 3 5 6 9、P C T / U S 2 0 1 7 / 0 2 8 9 8 1、P C T / U S 2 0 1 9 / 0 2 5 2 4 6、P C T / U S 2 0 1 8 / 0 3 5 4 1 9、P C T / U S 2 0 1 9 / 0 1 5 9 1 3、ならびに米国出願公開第 2 0 1 9 / 0 3 1 4 5 2 4 号、同第 2 0 1 9 / 0 3 2 1 4 8 9 号、及び同第 2 0 1 9 / 0 3 1 4 2 8 4 号に記載されており、それぞれの内容が、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

【 0 4 5 8 】

## 実施例 2 6 B : 化合物の合成

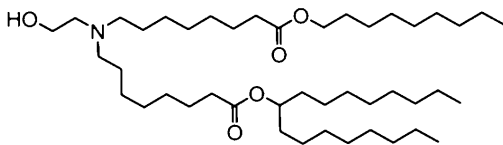
本発明の代表的なイオン化可能脂質の合成は、米国特許公開第 2 0 1 7 / 0 2 1 0 6 9 7 A 1 号に記載されており、その内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【 0 4 5 9 】

## 実施例 2 7

## 器官によるタンパク質発現

F L u c をコードする環状または直鎖状 R N A を生成し、以下の配合：



によって表される 5 0 % のイオン化可能脂質 1 0 b - 1 5、1 0 % の D S P C、1 . 5 % の P E G - D M G、3 8 . 5 % のコレステロールとともに輸送ビヒクルにロードした。C D - 1 マウスに 0 . 2 m g / k g で投薬し、発光を 6 時間（生 I V I S）及び 2 4 時間（生 I V I S 及びエクスピボ I V I S）の時点で測定した。肝臓、脾臓、腎臓、肺、及び心臓の総フラックス（目的の領域にわたる光子 / 秒）を測定した（図 2 5 及び 2 6）。

【 0 4 6 0 】

## 実施例 2 8

## 脾臓における発現の分布

G F P をコードする環状または直鎖状 R N A を生成し、以下の配合：

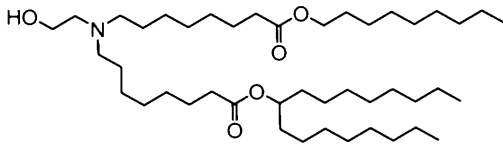
10

20

30

40

50



によって表される 50% のイオン化可能脂質 10b - 15、10% の DSPC、1.5% の PEG - DMG、38.5% のコレステロールとともに輸送ビヒクルにロードした。製剤を CD - 1 マウスに投与する。細胞タイプにわたる発現の分布を決定するために脾臓細胞についてフローサイトメトリーを実行する。

10

【0461】

実施例 29

実施例 29A : ナノ粒子組成物の産生

細胞への環状 RNA の送達に使用するための安全及び効果的なナノ粒子組成物を調査するために、一連の製剤を調製し、試験する。具体的には、ナノ粒子組成物の脂質成分中の特定の元素及びその比率を最適化する。

【0462】

ナノ粒子は、1つの流体ストリーム中で、または一方が環状 RNA を含有し、他方が脂質成分を有する2つの流体ストリームの混合プロセス、例えばマイクロフルイディクス及び T ジャンクション混合で作製できる。

20

【0463】

脂質組成物は、イオン化可能脂質、任意でヘルパー脂質（例えば Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL から入手可能な、DOPE、DSPC、またはオレイン酸）、PEG 脂質（例えば Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL から入手可能な、1,2 - ジミリスティル - sn - グリセロールメトキシポリエチレングリコール、PEG - DMG としても知られる）、及び構造脂質、例えばコレステロールを、約、例えば、溶媒、例えば、エタノール中 40 または 50 mM の濃度にて組み合わせることにより調製される。溶液は、例えば、-20 で保管するために冷蔵するべきである。脂質を組み合わせ、所望のモル比を生成し（例えば、下の表 11a 及び 11b を参照されたい）、水及びエタノールで希釈して、最終脂質濃度を、例えば、約 5.5 mM 及び約 2.5 mM 間にする。

30

【0464】

(表 11a)

40

50

製剤番号	説明
1	C12-200、DOPE、Chol、及び DMG-PEG2K(40:30:25:5)の 50mg/mL エタノール溶液のアリコートを混合し、エタノールで希釈して、最終体積を 3mL にした。別に、circRNA の緩衝水溶液(10mM クエン酸/150mM NaCl、pH4.5)を、1mg/mL のストックから調製した。脂質溶液を circRNA 水溶液に急速に注入し、振盪して、20%エタノール中の最終懸濁液を得た。得られたナノ粒子懸濁液を濾過し、1×PBS(pH7.4)で濾過し、濃縮して、2~8℃で保存した。
2	DODAP、DOPE、コレステロール、及び DMG-PEG2K(18:56:20:6)の 50mg/mL エタノール溶液のアリコートを混合し、エタノールで希釈して、最終体積を 3mL にした。別に、EPO circRNA の緩衝水溶液(10mM クエン酸/150mM NaCl、pH4.5)を、1mg/mL のストックから調製した。脂質溶液を circRNA 水溶液に急速に注入し、振盪して、20%エタノール中の最終懸濁液を得た。得られたナノ粒子懸濁液を濾過し、1×PBS(pH7.4)で濾過し、濃縮して、2~8℃で保存した。最終濃度=1.35mg/mL EPO circRNA(封入)。 Zave=75.9nm(Dv(50)=57.3nm;Dv(90)=92.1nm)。
3	HGT4003、DOPE、コレステロール、及び DMG-PEG2K(50:25:20:5)の 50mg/mL エタノール溶液のアリコートを混合し、エタノールで希釈して、最終体積を 3mL にした。別に、circRNA の緩衝水溶液(10mM クエン酸/150mM NaCl、pH4.5)を、1mg/mL のストックから調製した。脂質溶液を circRNA 水溶液に急速に注入し、振盪して、20%エタノール中の最終懸濁液を得た。得られたナノ粒子懸濁液を濾過し、1×PBS(pH7.4)で濾過し、濃縮して、2~8℃で保存した。
4	ICE、DOPE、及び DMG-PEG2K(70:25:5)の 50mg/mL エタノール溶液のアリコートを混合し、エタノールで希釈して、最終体積を 3mL にした。別に、circRNA の緩衝水溶液(10mM クエン酸/150mM NaCl、pH4.5)を、1mg/mL のストックから調製した。脂質溶液を circRNA 水溶液に急速に注入し、振盪して、20%エタノール中の最終懸濁液を得た。得られたナノ粒子懸濁液を濾過し、1×PBS(pH7.4)で濾過し、濃縮して、2~8℃で保存した。

10

20

30

40

50

5	<p>HGT5000、DOPE、コレステロール、及び DMG-PEG2K(40:20:35:5)の 50mg/mL エタノール溶液のアリコートを混合し、エタノールで希釈して、最終体積を 3mL にした。別に、EPO circRNA の緩衝水溶液(10mM クエン酸 /150mM NaCl、pH4.5)を、1mg/mL のストックから調製した。脂質溶液を circRNA 水溶液に急速に注入し、振盪して、20%エタノール中の最終懸濁液を得た。得られたナノ粒子懸濁液を濾過し、1×PBS(pH7.4)で濾過し、濃縮して、2~8°Cで保存した。最終濃度=1.82mg/mL EPO mRNA(封入)。Zave=105.6nm(Dv(50)=53.7nm;Dv(90)=157nm)。</p>	10
6	<p>HGT5001、DOPE、コレステロール、及び DMG-PEG2K(40:20:35:5)の 50mg/mL エタノール溶液のアリコートを混合し、エタノールで希釈して、最終体積を 3mL にした。別に、EPO circRNA の緩衝水溶液(10mM クエン酸 /150mM NaCl、pH4.5)を、1mg/mL のストックから調製した。脂質溶液を circRNA 水溶液に急速に注入し、振盪して、20%エタノール中の最終懸濁液を得た。得られたナノ粒子懸濁液を濾過し、1×PBS(pH7.4)で濾過し、濃縮して、2~8°Cで保存した。</p>	20
7	<p>HGT5001、DOPE、コレステロール、及び DMG-PEG2K(35:16:46.5:2.5)の 50mg/mL エタノール溶液のアリコートを混合し、エタノールで希釈して、最終体積を 3mL にした。別に、EPO circRNA の緩衝水溶液(10mM クエン酸 /150mM NaCl、pH4.5)を、1mg/mL のストックから調製した。脂質溶液を circRNA 水溶液に急速に注入し、振盪して、20%エタノール中の最終懸濁液を得た。得られたナノ粒子懸濁液を濾過し、1×PBS(pH7.4)で濾過し、濃縮して、2~8°Cで保存した。</p>	30
8	<p>HGT5001、DOPE、コレステロール、及び DMG-PEG2K(40:10:40:10)の 50mg/mL エタノール溶液のアリコートを混合し、エタノールで希釈して、最終体積を 3mL にした。別に、EPO circRNA の緩衝水溶液(10mM クエン酸 /150mM NaCl、pH4.5)を、1mg/mL のストックから調製した。脂質溶液を circRNA 水溶液に急速に注入し、振盪して、20%エタノール中の最終懸濁液を得た。得られたナノ粒子懸濁液を濾過し、1×PBS(pH7.4)で濾過し、濃縮して、2~8°Cで保存した。</p>	40

## 【 0 4 6 5 】

いくつかの実施形態では、輸送ビヒクルは、表 1 1 a に記載するような製剤を有する。

40

## 【 0 4 6 6 】

( 表 1 1 b )

組成物 (モル%)	成分
40:20:38.5:1.5	化合物：リン脂質： 植物ステロール*:PEG-DMG
45:15:38.5:1.5	化合物：リン脂質： 植物ステロール*:PEG-DMG
50:10:38.5:1.5	化合物：リン脂質： 植物ステロール*:PEG-DMG
55:5:38.5:1.5	化合物：リン脂質： 植物ステロール*:PEG-DMG

10

20

30

40

50

組成物 (モル%)	成分
60:5:33.5:1.5	化合物：リン脂質：植物ステロール*:PEG-DMG
45:20:33.5:1.5	化合物：リン脂質：植物ステロール*:PEG-DMG
50:20:28.5:1.5	化合物：リン脂質：植物ステロール*:PEG-DMG
55:20:23.5:1.5	化合物：リン脂質：植物ステロール*:PEG-DMG
60:20:18.5:1.5	化合物：リン脂質：植物ステロール*:PEG-DMG
40:15:43.5:1.5	化合物：リン脂質：植物ステロール*:PEG-DMG
50:15:33.5:1.5	化合物：リン脂質：植物ステロール*:PEG-DMG
55:15:28.5:1.5	化合物：リン脂質：植物ステロール*:PEG-DMG
60:15:23.5:1.5	化合物：リン脂質：植物ステロール*:PEG-DMG
40:10:48.5:1.5	化合物：リン脂質：植物ステロール*:PEG-DMG
45:10:43.5:1.5	化合物：リン脂質：植物ステロール*:PEG-DMG
55:10:33.5:1.5	化合物：リン脂質：植物ステロール*:PEG-DMG
60:10:28.5:1.5	化合物：リン脂質：植物ステロール*:PEG-DMG
40:5:53.5:1.5	化合物：リン脂質：植物ステロール*:PEG-DMG
45:5:48.5:1.5	化合物：リン脂質：植物ステロール*:PEG-DMG
50:5:43.5:1.5	化合物：リン脂質：植物ステロール*:PEG-DMG
40:20:40:0	化合物：リン脂質：植物ステロール*:PEG-DMG
45:20:35:0	化合物：リン脂質：植物ステロール*:PEG-DMG
50:20:30:0	化合物：リン脂質：植物ステロール*:PEG-DMG
55:20:25:0	化合物：リン脂質：植物ステロール*:PEG-DMG
60:20:20:0	化合物：リン脂質：植物ステロール*:PEG-DMG
40:15:45:0	化合物：リン脂質：植物ステロール*:PEG-DMG

10

20

30

40

## 【0467】

いくつかの実施形態では、輸送ビヒクルは、表11bに記載するような製剤を有する。

## 【0468】

circRNAを含むナノ粒子組成物の場合、脱イオン水中0.1mg/mlの濃度のcircRNAの溶液を、緩衝液、例えば、pH3~4の50mMクエン酸ナトリウム緩衝液に希釈して、ストック溶液を形成する。代替的に、脱イオン水中0.15mg/mlの濃度のcircRNAの溶液を、緩衝液、例えば、pH3~4.5の6.25mM酢酸ナトリウム緩衝液に希釈して、ストック溶液を形成する。

## 【0469】

50

環状RNA及び脂質成分を含むナノ粒子組成物を、脂質溶液を、環状RNAを約5：1～約50：1の脂質成分対circRNAの重量：重量比率にて含む溶液と組み合わせることによって調製する。脂質溶液は、例えば、NanoAssemblerマイクロ流体ベースのシステムを使用して、約10ml/分～約18ml/分または約5ml/分～約18ml/分の流速でcircRNA溶液に迅速に注射して、約1：1～約4：1間の水対エタノール比率を伴う懸濁液を産生する。

【0470】

ナノ粒子組成物を、透析によって処理して、エタノールを除去して、緩衝液交換を達成することができる。製剤を、分子量カットオフが10kDaまたは20kDaのSlide-A-Lyzerカセット(Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL)を使用して、一次生成物の200倍の容量のリン酸緩衝生理食塩水(PBS)、pH7.4に対して、2回透析する。次いで製剤を4で一晩透析した。結果得られたナノ粒子懸濁液を、0.2µmの滅菌フィルター(Sarstedt, Numbrecht, Germany)を通してガラスバイアルに濾過し、圧着クロージャーで密閉する。0.01mg/ml～0.15mg/mlのナノ粒子組成物溶液が、一般的に取得される。

【0471】

上記の方法は、ナノ沈殿及び粒子形成を誘導する。

【0472】

Tジャンクション及び直接注射を含むがこれに限定されない代替的なプロセスを使用して、同じナノ沈殿を達成し得る。B.ナノ粒子組成物の特徴評価

【0473】

Zetasizer Nano ZS(Malvern Instruments Ltd, Malvern, Worcestershire, UK)を使用して、ナノ粒子組成物の粒径、多分散性指数(PDI)及びゼータ電位を、粒径の決定においては1×PBS、及びゼータ電位の決定においては15mMのPBSで決定することができる。

【0474】

紫外可視分光法を使用して、ナノ粒子組成物中のcircRNAの濃度を決定することができる。1×PBSに希釈した100µLの製剤を4：1(v/v)のメタノール及びクロロホルムの混合物900µLに加える。混合後、溶液の吸光度スペクトルを、例えば、DU800分光光度計(Beckman Coulter, Beckman Coulter, Inc., Brea, CA)で、230nm～330nmで記録する。ナノ粒子組成物中のcircRNAの濃度は、その組成物中に使用されているcircRNAの吸光係数ならびに、波長、例えば、260nmでの吸光度及び、波長、例えば、330nmでのベースライン値間の差に基づいて計算することができる。

【0475】

QUANT-IT(商標)RIBOGREEN(登録商標)RNAアッセイ(Invitrogen Corporation Carlsbad, CA)を使用して、ナノ粒子組成物によるcircRNAの封入を評価することができる。試料を、TE緩衝液(10mMトリス-HCl、1mMEDTA、pH7.5)中およそ約5µg/mLまたは1µg/mLの濃度まで希釈する。50µLの希釈試料を、ポリスチレン96ウェルプレートに移し、50µLのTE緩衝液または50µLの2～4%Triton X-100溶液のいずれかをウェルに加える。プレートを、37の温度にて15分間インキュベートした。RIBOGREEN(登録商標)試薬を、1：100または1：200でTE緩衝液に希釈し、100µLのこの溶液を各ウェルに加える。蛍光強度は、蛍光プレートリーダー(Wallac Victor 1420 Multilabel Counter; Perkin Elmer, Waltham, MA)を使用して、励起波長、例えば、約480nm及び発光波長、例えば、約520nmにて測定することができる。試薬ブランクの蛍光値を試料の各値から引き、遊離circRNAのパーセンテージを、インタクトな試料(Triton X-100を添加しない)の蛍光強度を破壊試料(Trit

10

20

30

40

50

on X - 100の添加によって生じる)の蛍光値で除することで決定した。C .

【0476】

実施例29B：インビボ製剤試験

様々なナノ粒子組成物がどのように効果的にcircRNAを標的細胞に送達するのかをモニターするために、circRNAを含む異なるナノ粒子組成物を調製し、げっ歯類集団に投与する。マウスに、脂質ナノ粒子製剤を伴うナノ粒子組成物を含む単回用量を、静脈内、筋肉内、動脈内、または腫瘍内投与する。一部の例では、マウスに用量を吸入させ得る。用量サイズは、0.001mg/kg~10mg/kgの範囲であってよく、この場合10mg/kgは、マウスの体質量1kg毎にナノ粒子組成物に10mgのcircRNAを含む用量を説明する。PBSを含む対照組成物も採用し得る。

10

【0477】

ナノ粒子組成物をマウスに投与する際、特定の製剤及びその用量の用量送達プロファイル、用量応答、及び毒性を、酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)、生物発光イメージング、または他の方法によって測定することができる。タンパク質発現の時間経過も評価することができる。評価のためにげっ歯類から収集した試料には、血液及び組織(例えば、筋肉内注射部位からの筋肉組織及び内部組織)が含まれ得る；試料収集には、動物の犠牲が含まれ得る。

circRNAを含む組成物の投与によって誘導されるより高いレベルのタンパク質発現は、より高いcircRNA翻訳及び/またはナノ粒子組成物circRNA送達効率を示すだろう。非RNA成分は翻訳機構自体に影響を与えたと考えられていないため、タンパク質発現のレベルが高いことは、他のナノ粒子組成物またはその非存在と比べて、所与のナノ粒子組成物によるcircRNAの送達効率が高いことを示している可能性が高い。

20

【0478】

実施例30

ナノ粒子組成物の特徴評価

Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, Malvern, Worcestershire, UK)を使用して、輸送ビヒクル組成物の粒径、多分散性指数(PDI)及びゼータ電位を、粒径の決定においては1xPBS、及びゼータ電位の決定においては15mMのPBSで決定することができる。

30

【0479】

紫外可視分光法を使用して、輸送ビヒクル組成物中の治療剤及び/または予防剤(例えば、RNA)の濃度を決定することができる。1xPBSに希釈した100µLの製剤を4:1(v/v)のメタノール及びクロロホルムの混合物900µLに加える。混合後、溶液の吸光度スペクトルを、例えば、DU 800分光光度計(Beckman Coulter, Beckman Coulter, Inc., Brea, CA)で、230nm~330nmで記録する。輸送ビヒクル組成物中の治療剤及び/または予防剤の濃度は、その組成物中に使用されている治療剤及び/または予防剤の吸光係数、ならびに、波長、例えば、260nmでの吸光度及び、波長、例えば、330nmでのベースライン値間の差に基づいて計算することができる。

40

【0480】

RNAを含む輸送ビヒクル組成物の場合、QUANT-IT(商標)RIBOGREEN(登録商標)RNAアッセイ(Invitrogen Corporation Carlsbad, CA)を使用して、輸送ビヒクル組成物によるRNAの封入を評価することができる。試料を、TE緩衝液(10mMトリス-HCl、1mMEDTA、pH7.5)中およそ約5µg/mLまたは1µg/mLの濃度まで希釈する。50µLの希釈試料を、ポリスチレン96ウェルプレートに移し、50µLのTE緩衝液または50µLの2~4%Triton X-100溶液のいずれかをウェルに加える。プレートを、37の温度にて15分間インキュベートした。RIBOGREEN(登録商標)試薬を、1:100または1:200でTE緩衝液に希釈し、100µLのこの溶液を各ウェルに

50



加える。蛍光強度は、蛍光プレートリーダー（Wallac Victor 1420 Multilabel Counter; Perkin Elmer, Waltham, MA）を使用して、励起波長、例えば、約480nm及び発光波長、例えば、約520nmにて測定することができる。試薬ブランクの蛍光値を試料の各値から引き、遊離RNAのパーセンテージを、インタクトな試料（Triton X-100を添加しない）の蛍光強度を破壊試料（Triton X-100の添加によって生じる）の蛍光値で除することで決定した。

【0481】

### 実施例31

#### T細胞ターゲティング

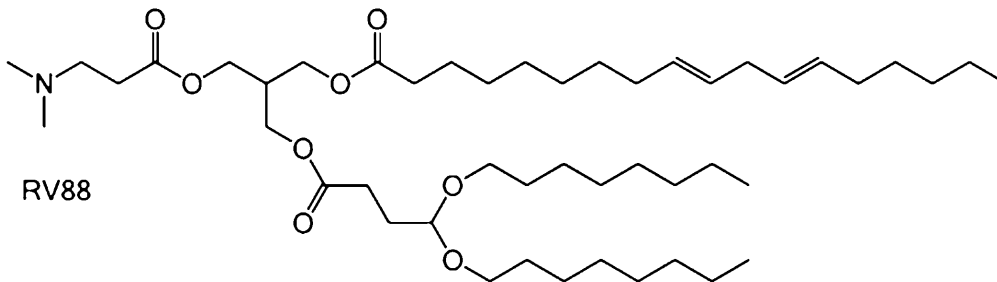
輸送ビヒクルをT細胞に標的するために、T細胞抗原結合剤、例えば、抗CD8抗体を、輸送ビヒクルの表面にカップリングする。抗T細胞抗原抗体は、PBS中のEDTAの存在下で過剰なDTTにより穏やかに還元され、遊離ヒンジ領域チオールを露出させる。DTTを除去するために、抗体を、脱塩カラムに通過させる。ヘテロ二官能性クロスリンカーSM(PEG)24を使用して、抗体を、circRNAをロードした輸送ビヒクルの表面に係留する（アミン基は、PEG脂質の頭部基に存在し、抗体上の遊離チオール基は、DTTによって作製され、SM(PEG)24は、アミン及びチオール基間で架橋する）。輸送ビヒクルを最初に過剰のSM(PEG)24とインキュベートし、遠心分離して、未反応のクロスリンカーを除去する。次いで、活性化輸送ビヒクルを、過剰の還元抗T細胞抗原抗体とともにインキュベートした。未結合抗体は、遠心濾過デバイスを使用して除去した。

【0482】

### 実施例32

RV88を使用するRNA含有輸送ビヒクル。

この実施例では、RNA含有輸送ビヒクルを、circRNAの送達のためにカチオン性脂質RV88を含む2-Dボルテックスマイクロ流体チップを使用して合成した。



【0483】

(表12a)

10

20

30

40

50

物質及び装置	製造供給元	カタログ番号
1M Tris-HCl, pH 8.0、滅菌	Teknova	T1080
5M 塩化ナトリウム溶液	Teknova	S0250
QB クエン酸塩緩衝剤, pH 6.0 (100 mM)	Teknova	Q2446
ヌクレアーゼフリー水	Ambion	AM9937
Triton X-100	Sigma-Aldrich	T8787-100ML
RV88	GVK bio	
DSPC	Lipoid	556500
コレステロール	Sigma	C3045-5G
PEG2K	Avanti Polar Lipids	880150
エタノール	Acros Organic	615090010
5 mL ホウケイ酸ガラスバイアル	Thermo Scientific	ST5-20
PD MiniTrap G-25 脱塩カラム	GE Healthcare	VWR カタログ 番号95055-984
Quant-iT RiboGreen RNA アッセイキット	Molecular Probes/ Life Technologies	R11490
黒色 96 ウェルマイクロプレート	Greiner	655900

10

20

## 【 0 4 8 4 】

RV88、DSPC、及びコレステロールを全て、ホウケイ酸バイアル中 10 mg / ml の濃度にてエタノール中で調製する。脂質 14 : 0 - PEG2K PE は、ホウケイ酸ガラスバイアル中 4 mg / ml の濃度にて調製する。ストック濃度での脂質の溶解は、脂質をエタノール中で 2 分間超音波処理することによって達成した。次に、溶液を、170 rpm に設定したオービタル傾斜シェーカー上で、37 °C にて 10 分間加熱した。次に、バイアルを 26 °C で最低 45 分間平衡化した。次に、表 12 b に示される量のストック脂質を添加することによって脂質を混合した。次に、溶液をエタノールで調整して、最終脂質濃度を 7.92 mg / ml とした。

30

## 【 0 4 8 5 】

( 表 1 2 b )

40

50

組成物	MW	%	nmol	mg	ストック (mg/ml)	ul	エタノール (ul)
RV88	794.2	40%	7200	5.72	10	571.8	155.3
DSPC	790.15	10%	1800	1.42	10	142.2	
コレステロール	386.67	48%	8640	3.34	10	334.1	
PEG2K	2693.3	2%	360	0.97	4	242.4	

10

## 【0486】

RNAを、pH6.0の75mMクエン酸緩衝液を用いて、RNAの濃度は1.250mg/mlで、ストック溶液として調製する。次に、RNAの濃度を、pH6.0の75mMクエン酸緩衝液を用いて0.1037mg/mlに調整し、26に平衡化する。次に、溶液を、26にて最低25分間インキュベートする。

## 【0487】

20

マイクロ流体チャンバーを、エタノールで洗浄し、neMYSISシリンジポンプを、シリンジにRNA溶液をロードし、別のシリンジにエタノール脂質をロードすることによって調製する。両方のシリンジはロードされ、neMESYSソフトウェアの制御下にある。次に、溶液を、2の水相対有機相比率で、22ml/分の総流速(RNAに関しては14.67ml/分及び脂質溶液に関しては7.33ml/分で、混合チップに適用する。両方のポンプを同期して起動した。マイクロ流体チップから流出したミキサー溶液は、4x1ml画分で収集し、最初の画分は廃棄物として廃棄する。RNA-リポソームを含有する残りの溶液は、G-25ミニ脱塩カラムを使用して、10mMトリス-HCl、1mMEDTA、pH7.5に交換する。緩衝液の交換後、物質を、サイズ及びRNA捕捉について、それぞれ、DLS分析及びRibogreenアッセイを通して特徴評価する。

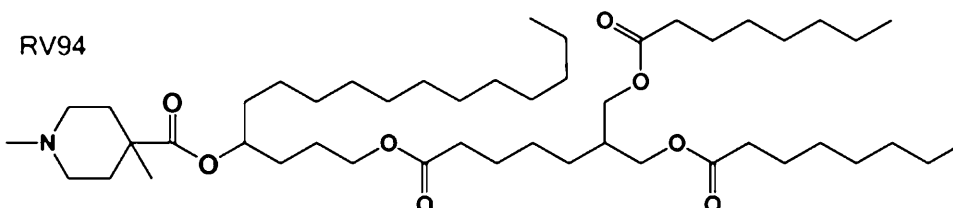
30

## 【0488】

## 実施例33

RV94を使用するRNA含有輸送ビヒクル。

この実施例では、RNA含有リポソームを、circRNAの送達のためにカチオン性脂質RV94を含む2-Dボルテックスマイクロ流体チップを使用して合成する。



40

## 【0489】

(表13)

50

物質及び装置	製造供給元	カタログ番号
1M Tris-HCl, pH 8.0、滅菌	Teknova	T1080
5M 塩化ナトリウム溶液	Teknova	S0250
QB クエン酸塩緩衝剤, pH 6.0 (100 mM)	Teknova	Q2446
ヌクレアーゼフリー水	Ambion	AM9937
Triton X-100	Sigma-Aldrich	T8787-100ML
RV94	GVKbio	
DSPC	Lipoid	556500
コレステロール	Sigma	C3045-5G
PEG2K	Avanti Polar Lipids	880150
エタノール	Acros Organic	615090010
5 mL ホウケイ酸ガラスバイアル	Thermo Scientific	ST5-20
PD MiniTrap G-25 脱塩カラム	GE Healthcare	VWR カタログ 番号 95055-984
Quant-IT RiboGreen RNA アッセイキット	Molecular Probes/Life Technologies	R11490
黒色 96 ウェルマイクロプレート	Greiner	655900

10

20

30

40

50

## 【 0 4 9 0 】

脂質は、実施例 29 と同様に調製し、表 14 に挙げた物質量を使用して、最終脂質濃度を 7.92 mg/ml とした。

## 【 0 4 9 1 】

(表 14)

組成物	MW	%	nmol	mg	ストック (mg/ml)	ul	エタノール(ul)
RV94	808.22	40%	2880	2.33	10	232.8	155.3
DSPC	790.15	10%	720	0.57	10	56.9	
コレステロール	386.67	48%	3456	1.34	10	133.6	
PEG2K	2693.3	2%	144	0.39	4	97.0	

## 【 0 4 9 2 】

circRNA の水溶液を、pH 6.0 の 75 mM クエン酸緩衝液を用いて、circRNA は 1.250 mg/ml で、ストック溶液として調製する。次に、RNA の濃度を

、 pH 6 . 0 の 7 5 m M クエン酸緩衝液を用いて 0 . 1 0 3 7 m g / m l に調整し、 2 6 に平衡化する。次に、溶液を、 2 6 にて最低 2 5 分間インキュベートする。

【 0 4 9 3 】

マイクロ流体チャンバーを、エタノールで洗浄し、 n e M Y S I S シリンジポンプを、シリンジに R N A 溶液をロードし、別のシリンジにエタノール脂質をロードすることによって調製する。両方のシリンジはロードされ、 n e M E S Y S ソフトウェアの制御下にある。次に、溶液を、 2 の水相対有機相比率で、 2 2 m l / 分の総流速 ( R N A に関しては 1 4 . 6 7 m l / 分及び脂質溶液に関しては 7 . 3 3 m l / 分で、混合チップに適用する。両方のポンプを同期して起動した。マイクロ流体チップから流出したミキサー溶液は、 4 x 1 m l 画分で収集し、最初の画分は廃棄物として廃棄する。 c i r c R N A 輸送ビヒクルを含有する残りの溶液は、 G - 2 5 ミニ脱塩カラムを使用して、上記のように、 1 0 m M トリス - H C I 、 1 m M E D T A 、 pH 7 . 5 に交換する。緩衝液の交換後、物質を、サイズ及び R N A 捕捉について、それぞれ、 D L S 分析及び R i b o g r e e n A ッセイを通して特徴評価する。リポソームの生物物理学的分析を、表 1 5 に示す。

10

【 0 4 9 4 】

( 表 1 5 )

試料名	N:P 比	TFR ml/分	比 (水性/ o r g 相)	RNA 封入量	RNA 封入収率	サイズ	
				(µg/ml)	%	d.nm	PDI
SAM- RV94	8	22	2	31,46	86,9	113,1	0,12

20

【 0 4 9 5 】

実施例 3 4

インライン混合の一般的プロトコル。

個々及び別個のストック溶液を調製する - 1 つは脂質を含有し、他方は c i r c R N A を含有する。所望の脂質または脂質混合物、 D S P C 、コレステロール及び P E G 脂質を含有する脂質ストックを、 9 0 % エタノールに可溶化することによって調製する。残りの 1 0 % は、低 pH クエン酸緩衝液である。脂質ストックの濃度は、 4 m g / m L である。このクエン酸緩衝液の pH は、採用する脂質の種類に応じて、 pH 3 ~ pH 5 の範囲であることができる。 c i r c R N A も、 4 m g / m L の濃度にてクエン酸緩衝液に可溶化する。 5 m L の各ストック溶液を調製する。

30

【 0 4 9 6 】

c i r c R N A と組み合わせる前、ストック溶液は完全に透明であり、脂質は完全に可溶化されることが確認されている。ストック溶液を加熱して、脂質を完全に可溶化し得る。このプロセスで使用される c i r c R N A は、未修飾または修飾オリゴヌクレオチドであってよく、コレステロールなどの親油性部分と複合し得る。

40

【 0 4 9 7 】

個々のストックは、各溶液を T ジャンクションにポンプで送り込むことによって組み合わされる。デュアルヘッドの W a t s o n - M a r l o w ポンプを使用して、 2 つのストリームの開始と停止を同時に制御した。 1 . 6 m m ポリプロピレンチューブを、線流速を増加させるために、 0 . 8 m m チューブに更にサイズを小さくする。ポリプロピレンライン ( I D = 0 . 8 m m ) を、 T ジャンクションのいずれかの側に取り付ける。ポリプロピレン T は、 1 . 6 m m の直鎖状先端を有して、 4 . 1 m m <sup>3</sup> の容量を結果得る。ポリプロ

50

ピレンラインの大きい端 (1.6 mm) の各々を、可溶化脂質ストックまたは可溶化 *circRNA* のいずれかを含有する。試験管の中に入れる T ジャンクションの後に、組み合わされたストリームが流れ出る単一のチューブを配置する。次に、チューブを、2 × 容量の PBS を含有する容器に伸ばし入れ、これを急速攪拌する。ポンプの流速は、300 rpm または 110 mL / 分の設定とする。エタノールを除去し、透析によって PBS に交換する。次に、脂質製剤を、遠心分離またはダイアフィルトレーションを使用して、適切な作業濃度に濃縮する。

【0498】

C57BL/6 マウス (Charles River Labs, MA) に、尾静脈注射を介して生理食塩水または製剤化された *circRNA* のいずれかを与える。投与後の様々な時点で、血清試料を後眼窩採血によって収集する。第 VII 因子タンパク質の血清レベルは、発色アッセイ (Biophen FVTI, Aniara Corporation, OH) を使用して試料中で決定する。第 VII 因子の肝臓 RNA レベルを決定するために、動物を犠牲にし、肝臓を採取して液体窒素で瞬間凍結する。組織溶解物を、凍結組織から調製し、第 VII 因子の肝臓 RNA レベルを分岐 DNA アッセイ (Quant iGene Assay, Panomics, CA) を使用して定量化する。

10

【0499】

FVII 活性を、C57BL/6 マウスにおける静脈内 (ポラス) 注射から 48 時間後に、FVTI *siRNA* 処理動物において評価する。FVII は、マイクロプレートスケールで、製造元の指示に従って、血清または組織中のタンパク質レベルを決定するための市販のキットを使用して測定する。FVII の低下を、未処置対照マウスに対して決定し、結果を残存 FVII 率 (%) として表す。2 つの用量レベル (0.05 及び 0.005 mg / kg FVII *siRNA*) を、各新規リポソーム組成物のスクリーニングに使用する。

20

【0500】

実施例 36

予形成ベシクルを使用する *circRNA* 製剤。

カチオン性脂質含有輸送ベシクルを、予形成ベシクル法を使用して作製する。カチオン性脂質、DSPC、コレステロール及び PEG-脂質を、エタノールに、それぞれ、40 / 10 / 40 / 10 のモル比にて可溶化する。脂質混合物を、水性緩衝液 (50 mM クエン酸塩、pH 4) に混合しながら加えて、それぞれ、最終エタノール濃度が 30% (容量 / 容量)、最終脂質濃度が 6.1 mg / mL になるようにし、室温で 2 分間平衡化してから押し出す。Nicomp 分析によって決定して、ベシクルの直径が 70 ~ 90 nm になるまで、Lipex Extruder (Northern Lipids, Vancouver, BC) を使用して、22 にて、ポアサイズ 80 nm のフィルター (Nucleopore) を 2 枚積み重ねたものに水和脂質を通して押し出し、取得する。小ベシクルを形成しないカチオン性脂質混合物では、脂質混合物を低 pH 緩衝液 (50 mM クエン酸塩、pH 3) で水和させて、DSPC 頭部基上のホスフェート基をプロトン化することによって、安定的な 70 ~ 90 nm のベシクルの形成を助ける。

30

【0501】

FVII *circRNA* (50 mM クエン酸塩に可溶化した、30% エタノールを含有する pH 4 水溶液) を、混合しながら、35 に予め平衡化したベシクルに、約 5 mL / 分の速度で加える。最終的な標的 *circRNA* / 脂質比 0.06 (wt wt) を達成した後、混合物を更に 30 分間、35 にてインキュベートして、ベシクルの再構成及び FVII RNA の封入を可能にする。次に、エタノールを除去し、透析またはタンジェンシャルフローダイアフィルトレーションのいずれかによって、外部緩衝液を PBS (155 mM NaCl、3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、pH 7.5) と置き換える。サイズ排除スピンカラムまたはイオン交換スピンカラムを使用して、非封入 RNA を除去した後、封入 *circRNA* 対脂質の最終的な比率を決定する。

40

【0502】

50

## 実施例 37

## 実施例 37A：操作された環状RNAからの三重特異性抗原結合タンパク質の発現

環状RNAを、(1)3'スプライシング後グループイントロンフラグメント；(2)配列内リボソーム進入部位(IRES)；(3)三重特異性抗原結合タンパク質コード領域；及び(4)3'相同性領域を含むように設計する。三重特異性抗原結合タンパク質領域を、標的抗原、例えば、GPC3に結合する例示的な三重特異性抗原結合タンパク質を産生するように構築する。

## 【0503】

## 実施例 37B：scFv CD3 結合ドメインの生成

ヒトCD3イプシロン鎖標準配列は、Uniprotアクセッション番号P07766である。ヒトCD3ガンマ鎖標準配列は、Uniprotアクセッション番号P09693である。ヒトCD3デルタ鎖標準配列は、Uniprotアクセッション番号P043234である。CD3イプシロン、CD3ガンマ、またはCD3デルタに対する抗体を、親和性成熟などの既知の技術を介して生成する。ネズミ抗CD3抗体を出発物質として使用する場合、マウス特異的残基が、本明細書に記載の三重特異性抗原結合タンパク質の処置を受けた対象においてヒト-抗マウス抗原(HAMA)反応を誘導し得る場合、ネズミ抗CD3抗体のヒト化が臨床環境のために所望である。ヒト化は、適切なヒト生殖系列アクセプターフレームワークに対するネズミ抗CD3抗体からのCDR領域のグラフト化(任意でCDR及び/またはフレームワーク領域に対する他の修飾を含む)によって達成される。

## 【0504】

したがって、ヒトまたはヒト化抗CD3抗体を使用して、三重特異性抗原結合タンパク質のCD3結合ドメインのためのscFv配列を生成する。ヒトまたはヒト化VL及びVHドメインをコードするDNA配列を得て、構築物のためのコドン、ホモサピエンスからの細胞における発現のために任意で最適化する。scFvにおいてVL及びVHドメインが現れる順序は様々であり(すなわち、VL-VH、またはVH-VL配向)、3コピーの「G4S」または「G4S」サブユニット(G4S)<sub>3</sub>が可変ドメインを接続させてscFvドメインを生成する。抗CD3scFvプラスミド構築物は、任意のFlag、Hisまたは他の親和性タグを有し得、HEK293または他の好適なヒトまたは哺乳動物細胞株にエレクトロポレーションし、精製する。バリデーションアッセイには、FACSによる結合分析、Proteonを使用する動態分析、及びCD3を発現する細胞の染色が含まれる。

## 【0505】

## 実施例 37C：scFvグリピカン-3(GPC3)結合ドメインの生成

グリピカン-3(GPC3)は、肝細胞癌に存在するが、健康な正常な肝臓組織には存在しない細胞表面タンパク質の1つである。それは肝細胞癌において上昇することが頻繁に観察され、HCC患者にとって予後不良に関連する。それは、Wntシグナル伝達を活性化することが知られている。MDX-1414、HN3、GC33、及びYP7を含むGPC3抗体が生成されている。

## 【0506】

GPC-3または別の標的抗原に結合するscFvは、CD3に対するscFv結合ドメインの生成のための上記方法と同様に生成される。

## 【0507】

## 実施例 37D：インビトロでの三重特異性抗原結合タンパク質の発現

CHO-K1チャイニーズハムスター卵巣細胞(ATCC, CCL-61)(Ka and Puck, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1968; 60(4): 1275-81)の誘導体であるCHO細胞発現システム(Flp-In(登録商標), Life Technologies)を使用する。Life Technologiesによって提供される標準的な細胞培養プロトコルに従って接着細胞を継代培養する。

10

20

30

40

50

## 【0508】

懸濁液における成長に対する適合のため、細胞を組織培養フラスコから脱着させ、無血清培地に入れる。10% DMSOを有する培地中で懸濁液適合細胞を凍結保存する。

## 【0509】

分泌される三重特異性抗原結合タンパク質を安定的に発現する組換えCHO細胞株を、懸濁液適合細胞のトランスフェクションによって生成する。抗生物質ハイグロマイシンBでの選択中に生存細胞密度を週2回測定し、細胞を遠心分離し、新たな選択培地に $0.1 \times 10^6$  生存細胞/mLの最大密度で再懸濁する。三重特異性抗原結合タンパク質を安定的に発現する細胞プールを選択から2~3週間後に回収し、その時点で細胞を振盪フラスコ中の標準培地に移す。組換え分泌タンパク質の発現は、タンパク質ゲル電気泳動または

10

## 【0510】

三重特異性抗原結合タンパク質を、安定的にトランスフェクトされたCHO細胞株の10日流加培養物において細胞培養上清への分泌によって産生する。細胞培養上清を10日後に典型的には>75%の培養生存率で採取する。試料を産生培養物から1日おきに収集し、細胞密度及び生存率を評価する。採取の日に、細胞培養上清を、更なる使用の前に遠心分離及び真空濾過によって清浄化する。

## 【0511】

細胞培養上清におけるタンパク質発現力価及び産物全体性をSDS-PAGEによって

20

## 【0512】

実施例37E：三重特異性抗原結合タンパク質の精製

三重特異性抗原結合タンパク質を、2ステップの手順でCHO細胞培養上清から精製する。構築物を、第1のステップにおけるアフィニティークロマトグラフィーと、第2のステップにおけるSuperdex 200での分取サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)に共する。試料を緩衝液交換し、限外濾過によって>1mg/mLの純度の典型的な濃度まで濃縮し、最終試料の均一性(典型的には>90%)を還元及び非還元条件下でSDS-PAGEによって評価し、続いて抗(半減期延長ドメイン)または抗イディオタイプ抗体を使用した免疫プロット及び分析的SECをそれぞれを行う。精製されたタンパク質を、使用するまで一定分量で-80℃で保存する。

30

## 【0513】

実施例38

半減期延長ドメインを有する操作された環状RNAの発現は、半減期延長ドメインを有さないものと比べて改善した薬物動態パラメータを有する。

実施例23のcircRNA分子でコードされた三重特異性抗原結合タンパク質を、0.5mg/kgボラス注射としてカニクイザルに筋肉内投与する。別のカニクイザル群に、CD3及びGPC-3に対する結合ドメインを有するが半減期延長ドメインを欠くサイズのcircRNA分子でコードされる同等のタンパク質を与える。第3及び第4の群に、CD3及び半減期延長ドメイン結合ドメインを有するcircRNA分子でコードされるタンパク質及びGPC-3及び半減期延長ドメインを有するタンパク質をそれぞれ与える。circRNAによってコードされる両方のタンパク質は、サイズが三重特異性抗原結合タンパク質と同等である。各試験群は、5匹のサルからなる。血清試料を示された時点で採取し、段階希釈し、タンパク質の濃度を、CD3及び/またはGPC-3に対する結合ELISAを使用して決定する。

40

## 【0514】

薬物動態分析を、試験品血漿濃度を使用して実施する。各試験品についての群平均血漿データは、投薬後の時間に対してプロットした場合、多指数プロファイルに適合する。データを、ボラスインプットならびに分配相及び排泄相についての一次速度定数を用いて標準的な2コンパートメントモデルによってフィッティングさせる。静脈内投与について

50



のデータの最良当てはめのための一般方程式は、 $c(t) = A e^{-a t} + B e^{-p t}$  (式中、 $c(t)$  は時間  $t$  における血漿濃度であり、 $A$  及び  $B$  は  $Y$  軸上の切片であり、 $a$  及び  $p$  は、各々、分布相及び消失相の見かけの一次速度定数である) である。相はクリアランスの初期相であり、動物の全ての細胞外液へのタンパク質の分布を反映する一方で、減衰曲線の第 2 または 相の部分は真の血漿クリアランスを表す。かかる方式を当てはめるための方法は、当該技術分野で周知である。例えば、 $A = D / V (a - k_{21}) / (a - p)$ 、 $B = D / V (p - k_{21}) / (a - p)$ 、 $a$  及び  $p$  (  $a > p$  の場合 ) は、二次方程式： $r^2 + (k_{12} + k_{21} + k_{10}) r + k_{21} k_{10} = 0$  の根であり、 $V$  = 分布容積、 $k_{10}$  = 排出速度、 $k_{12}$  = コンパートメント 1 からコンパートメント 2 への移動速度及び  $k_{21}$  = コンパートメント 2 からコンパートメント 1 への移動速度、及び  $D$  = 投与された用量の推定されるパラメータを使用する。

10

## 【0515】

データ分析：濃度対時間プロファイルのグラフを Kaleida Graph (Kaleida Graph (商標) V. 3. 09 Copyright 1986 - 1997. Synergy Software. Reading, Pa.) を使用して作製する。報告可能ではない (LTR) ものとして報告された値は、PK 分析に含めず、グラフで表されない。薬物動態パラメータは、WinNonlin ソフトウェア (WinNonlin (登録商標) Professional V. 3. 1 WinNonlin (商標) Copyright 1998 - 1999. Pharsight Corporation. Mountain View, Calif) を使用してコンパートメント分析によって決定する。薬物動態パラメータは、Ritschel W A and Kearns G L, 1999, EST: Handbook Of Basic Pharmacokinetics Including Clinical Applications, 5th edition, American Pharmaceutical Assoc., Washington, D C 記載されているように計算する。

20

## 【0516】

実施例 23 の circRNA 分子でコードされる三重特異性抗原結合タンパク質は、半減期延長ドメインを欠くタンパク質と比較して、消失半減期の延長などの改善した薬物動態パラメータを有することが予期される。

## 【0517】

実施例 39

三重特異性抗原結合タンパク質の細胞傷害

実施例 23 の circRNA 分子でコードされる三重特異性抗原結合タンパク質を、GPC-3+ 標的細胞に対する T 細胞依存性細胞傷害のその仲介についてインビトロで評価する。

30

## 【0518】

蛍光標識された GPC3 標的細胞を、実施例 23 の三重特異性抗原結合タンパク質の存在下で、エフェクター細胞としてのランダムドナーの単離された PBMC または T 細胞とインキュベートする。加湿インキュベーター内での 37 °C で 4 時間のインキュベーション後、標的細胞から上清への蛍光色素の放出を蛍光光度計で決定する。実施例 23 の三重特異性抗原結合タンパク質を用いずにインキュベートされた標的細胞及びインキュベーションの最後にサポニンの添加によって全体的に溶解した標的細胞は、それぞれ陰性対照及び陽性対照として機能する。

40

## 【0519】

測定された残存する生存標的細胞に基づいて、特異的細胞溶解のパーセンテージを、以下の式： $[1 - (\text{生存標的の数 (試料)} / \text{生存標的の数 (自発)})] \times 100\%$  に従って計算する。シグモイド用量反応曲線及び EC50 値を、GraphPad Software を使用して非線形回帰 / 4 パラメータロジスティックフィットによって計算する。所与の抗体濃度について得られた溶解値を使用して、Prism ソフトウェアを使用して 4 パラメータロジスティックフィット分析によってシグモイド用量 - 反応曲線を計算する。

50

## 【0520】

## 実施例40

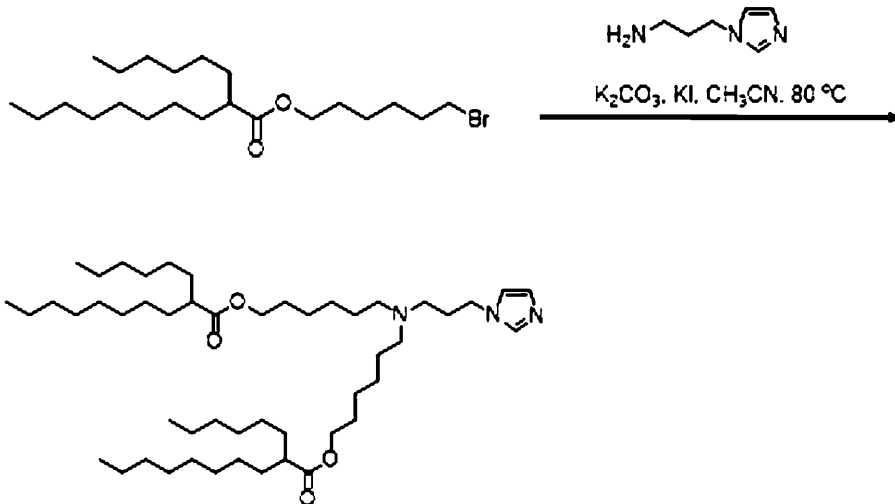
## イオン化可能脂質の合成

40.1 ((3-(2-メチル-1H-イミダゾール-1-イル)プロピル)アザネジル)ビス(ヘキサン-6,1-ジイル)ビス(2-ヘキシルデカノエート)(脂質10a-27)及び((3-(1H-イミダゾール-1-イル)プロピル)アザネジル)ビス(ヘキサン-6,1-ジイル)ビス(2-ヘキシルデカノエート)(脂質10a-26)の合成

凝縮器と接続された100mLの丸底フラスコ内で、3-(1H-イミダゾール-1-イル)プロパン-1-アミン(100mg、0.799mmol)または3-(2-メチル-1H-イミダゾール-1-イル)プロパン-1-アミン(0.799mmol)、6-ブロモヘキシル2-ヘキシルデカノエート(737.2mg、1.757mmol)、炭酸カリウム(485mg、3.515mmol)及びヨウ化カリウム(13mg、0.08mmol)をアセトニトリル(30mL)中で混合し、反応混合物を80℃に48時間加熱した。混合物を室温に冷却し、セライトのパッドを介して濾過した。濾液を酢酸エチルで希釈した。水、ブラインで洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。溶媒を蒸発させ、粗残渣をフラッシュクロマトグラフィー(SiO<sub>2</sub>:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>=CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>中の100%~10%のメタノール)によって精製し、無色の油生成物が得られた(92mg、15%)。((3-(1H-イミダゾール-1-イル)プロピル)アザネジル)ビス(ヘキサン-6,1-ジイル)ビス(2-ヘキシルデカノエート)の分子式はC<sub>50</sub>H<sub>95</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>であり、分子量(M<sub>w</sub>)は801.7である。

## 【0521】

((3-(1H-イミダゾール-1-イル)プロピル)アザネジル)ビス(ヘキサン-6,1-ジイル)ビス(2-ヘキシルデカノエート)(脂質10a-26)の合成のための反応スキーム。



## 【0522】

脂質10a-26の特徴評価をLC-MSによって実施した。図27A~Cは、脂質10a-26の特徴評価を示す。図27Aは、脂質10a-26について観察されたプロトンNMRを示す。図27Bは、示される総イオン及びUVクロマトグラムを伴う脂質10a-26についての代表的なLC/MSトレースである。

## 【0523】

## 40.2 脂質22-S14の合成

## 40.2.1 2-(テトラデシルチオ)エタン-1-オール

アセトニトリル(200mL)中の2-スルファニルエタノール(5.40g、69.50mmol)と

11 mmol、4.82 mL、0.871 eq)の混合物に1-プロモテトラデカン(22 g、79.34 mmol、23.66 mL、1 eq)及び炭酸カリウム(17.55 g、126.95 mmol、1.6 eq)を25 で添加した。反応混合物を40 に加熱し、12時間攪拌した。TLC(酢酸エチル/石油エーテル=25/1、 $R_f$ =0.3、 $I_2$ によって染色)は、出発物質が完全に消費され、新たな主要なスポットが生成されたことを示した。反応混合物を濾過し、フィルターケーキをアセトニトリル(50 mL)で洗浄し、次いで濾液を真空下で濃縮して残渣を得、これをシリカゲル上のカラム(酢酸エチル/石油エーテル=1/100~1/25)によって精製して2-(テトラデシルチオ)エタン-1-オール(14 g、収率64.28%)を白色の固体として得た。

## 【0524】

$^1\text{H NMR}$  (ET36387-45-P1A, 400 MHz, クロロホルム-d)  
0.87 - 0.91 (m, 3 H) 1.27 (s, 20 H) 1.35 - 1.43 (m, 2 H) 1.53 - 1.64 (m, 2 H) 2.16 (br s, 1 H) 2.49 - 2.56 (m, 2 H) 2.74 (t,  $J$  = 5.93 Hz, 2 H) 3.72 (br d,  $J$  = 4.89 Hz, 2 H). 図28は、対応する核磁気共鳴(NMR)スペクトルを示している。

## 【0525】

## 40.2.2 2-(テトラデシルチオ)エチルアクリレートの合成

ジクロロメタン(240 mL)中の2-(テトラデシルチオ)エタン-1-オール(14 g、51.00 mmol、1 eq)の溶液にトリエチルアミン(7.74 g、76.50 mmol、10.65 mL、1.5 eq)及びプロブ-2-エノイルクロリド(5.54 g、61.20 mmol、4.99 mL、1.2 eq)を0 で窒素下で滴下して添加した。反応混合物を25 に温め、12時間攪拌した。TLC(酢酸エチル/石油エーテル=25/1、 $R_f$ =0.5、 $I_2$ によって染色)は、出発物質が完全に消費され、新たな主要なスポットが生成されたことを示した。反応溶液を真空下で濃縮して残渣を得、これをシリカゲル上のカラム(酢酸エチル/石油エーテル=1/100~1/25)によって精製して2-(テトラデシルチオ)エチルアクリレート(12 g、収率71.61%)を無色の油として得た。

## 【0526】

$^1\text{H NMR}$  (ET36387-49-P1A, 400 MHz, クロロホルム-d)  
0.85 - 0.93 (m, 3 H) 1.26 (s, 19 H) 1.35 - 1.43 (m, 2 H) 1.53 - 1.65 (m, 2 H) 2.53 - 2.62 (m, 2 H) 2.79 (t,  $J$  = 7.03 Hz, 2 H) 4.32 (t,  $J$  = 7.03 Hz, 2 H) 5.86 (dd,  $J$  = 10.39, 1.47 Hz, 1 H) 6.09 - 6.19 (m, 1 H) 6.43 (dd,  $J$  = 17.30, 1.41 Hz, 1 H). 図29は、対応する核磁気共鳴(NMR)スペクトルを示している。

## 【0527】

40.2.3 ビス(2-(テトラデシルチオ)エチル)3,3'-((3-(2-メチル-1H-イミダゾール-1-イル)プロピル)アザネジル)ジプロピオネート(脂質22-S14)の合成

フラスコに3-(2-メチル-1H-イミダゾール-1-イル)プロパン-1-アミン(300 mg、2.16 mmol)及び2-(テトラデシルチオ)エチルアクリレート(1.70 g、5.17 mmol)を入れた。そのままの反応混合物を80 に加熱し、48時間攪拌した。TLC(酢酸エチル、 $R_f$ =0.3、 $I_2$ によって染色、1滴の水酸化アンモニウムを添加)は、出発物質が完全に消費され、新たな主要なスポットが形成されたことを示した。反応混合物をジクロロメタン(4 mL)で希釈し、シリカゲル上のカラム(石油エーテル/酢酸エチル=3/1~0/1、0.1%水酸化アンモニウムを添加)によって精製してビス(2-(テトラデシルチオ)エチル)3,3'-((3-(2-メチル-1H-イミダゾール-1-イル)プロピル)アザネジル)ジプロピオネート(50

10

20

30

40

50

1 mg、収率 29.1%) を無色の油として得た。

【0528】

$^1\text{H}$  NMR (ET36387-51-PIA, 400 MHz, クロロホルム-d)  
 0.87 (t, J = 6.73 Hz, 6 H) 1.25 (s, 40 H) 1.33 - 1.40 (m, 4 H) 1.52 - 1.61 (m, 4 H) 1.81 - 1.90 (m, 2 H) 2.36 (s, 3 H) 2.39 - 2.46 (m, 6 H) 2.53 (t, J = 7.39 Hz, 4 H) 2.70 - 2.78 (m, 8 H) 3.84 (t, J = 7.17 Hz, 2 H) 4.21 (t, J = 6.95 Hz, 4 H) 6.85 (s, 1 H) 6.89 (s, 1 H)。図 30 は、対応する核磁気共鳴 (NMR) スペクトルを示している。

10

【0529】

40.3 ビス(2-(テトラデシルチオ)エチル)3,3'-((3-(1H-イミダゾール-1-イル)プロピル)アザネジル)ジプロピオネート(脂質93-S14)の合成

フラスコに3-(1H-イミダゾール-1-イル)プロパン-1-アミン(300 mg、2.40 mmol、1 eq)及び2-(テトラデシルチオ)エチルアクリレート(1.89 g、5.75 mmol、2.4 eq)を入れた。そのままの反応混合物を80 に加熱し、48時間攪拌した。TLC(酢酸エチル、 $R_f = 0.3$ 、 $I_2$ によって染色、1滴の水酸化アンモニウムを添加)は、出発物質が完全に消費され、新たな主要なスポットが形成されたことを示した。反応混合物をジクロロメタン(4 mL)で希釈し、シリカゲル上のカラム(石油エーテル/酢酸エチル = 1/20 ~ 0/100、0.1%水酸化アンモニウムを添加)によって精製してビス(2-(テトラデシルチオ)エチル)3,3'-((3-(1H-イミダゾール-1-イル)プロピル)アザネジル)ジプロピオネート(512 mg、収率27.22%)を無色の油として得た。

20

【0530】

$^1\text{H}$  NMR (ET36387-54-PIA, 400 MHz, クロロホルム-d)  
 0.89 (t, J = 6.84 Hz, 6 H) 1.26 (s, 40 H) 1.34 - 1.41 (m, 4 H) 1.58 (br t, J = 7.50 Hz, 4 H) 1.92 (t, J = 6.62 Hz, 2 H) 2.36 - 2.46 (m, 6 H) 2.55 (t, J = 7.50 Hz, 4 H) 2.75 (q, J = 6.84 Hz, 8 H) 3.97 (t, J = 6.95 Hz, 2 H) 4.23 (t, J = 6.95 Hz, 4 H) 6.95 (s, 1 H) 7.06 (s, 1 H) 7.51 (s, 1 H)。図 31 は、対応する核磁気共鳴 (NMR) スペクトルを示している。

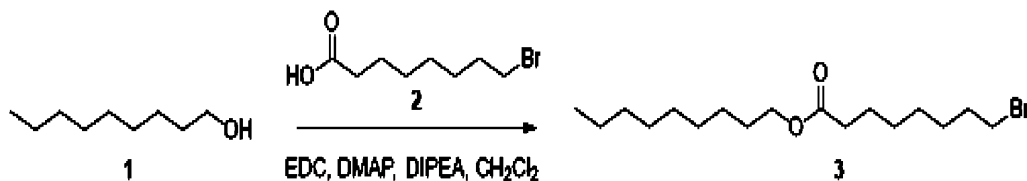
30

【0531】

40.4 ヘプタデカン-9-イル8-((3-(2-メチル-1H-イミダゾール-1-イル)プロピル)(8-(ノニルオキシ)-8-オキソオクチル)アミノ)オクタノエート(脂質10a-54)の合成

40.4.1 ノニル8-プロモオクタノエート(3)の合成

40



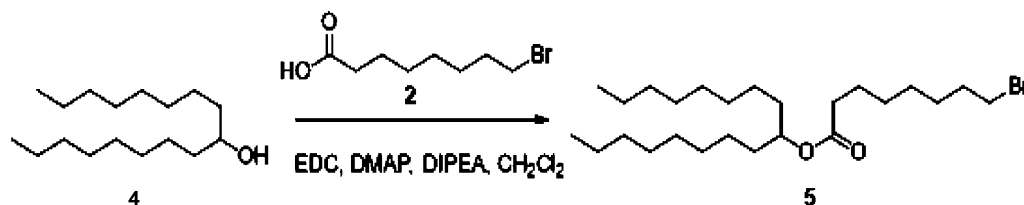
$\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (500 mL) 中の8-プロモオクタン酸(2)(18.6 g、83.18 mmol)及びノナン-1-オール(1)(10 g、69.32 mmol)の混合物に DMAP (1.7 g、13.86 mmol)、DIPEA (48 mL、277.3 mmol)

50

1) 及び EDC (16 g、83.18 mmol) を添加した。反応物を室温で一晩撹拌した。反応混合物の濃縮後、粗残渣を酢酸エチル (500 mL) に溶解し、1 N の HCl、飽和 NaHCO<sub>3</sub>、水及びブラインで洗浄した。有機層を無水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で乾燥させた。溶媒を蒸発させ、粗残渣をフラッシュクロマトグラフィー (SiO<sub>2</sub> : ヘキサン = ヘキサン中の 100% ~ 30% の EtOAc) によって精製し、無色の油生成物 3 が得られた (9 g、37%)。

## 【0532】

40.4.2 ヘプタデカン-9-イル8-プロモオクタノエート (5) の合成



10

CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (300 mL) 中の 8-プロモオクタン酸 (2) (10 g、44.82 mmol) 及びヘプタデカン-9-オール (4) (9.6 g、37.35 mmol) の混合物に DMAP (900 mg、7.48 mmol)、DIPEA (26 mL、149.7 mmol) 及び EDC (10.7 g、56.03 mmol) を添加した。反応物を室温で一晩撹拌した。反応混合物の濃縮後、粗残渣を酢酸エチル (300 mL) に溶解し、1 N の HCl、飽和 NaHCO<sub>3</sub>、水及びブラインで洗浄した。有機層を無水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で乾燥させた。溶媒を蒸発させ、粗残渣をフラッシュクロマトグラフィー (SiO<sub>2</sub> : ヘキサン = ヘキサン中の 100% ~ 30% の EtOAc) によって精製し、無色の油生成物 5 が得られた (5 g、29%)。

20

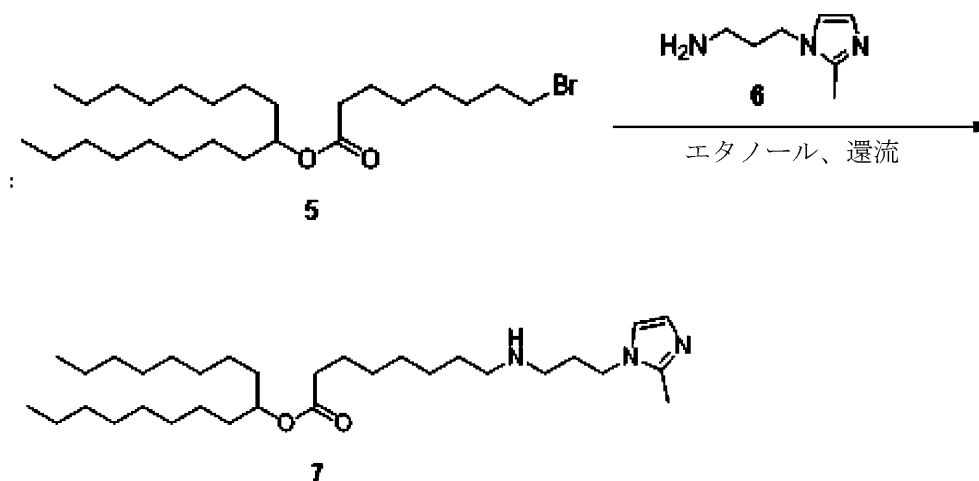
## 【0533】

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): ppm 4.86 (m, 1H), 3.39 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 2.27 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 1.84 (m, 2H), 1.62 (m, 2H), 1.5 - 1.4 (m, 8H), 1.35 - 1.2 (m, 26H) 0.87 (t, J = 6.7 Hz, 6H)。

30

## 【0534】

40.4.3 ヘプタデカン-9-イル8-((3-(2-メチル-1H-イミダゾール-1-イル)プロピル)アミノ)オクタノエート (7) の合成



40

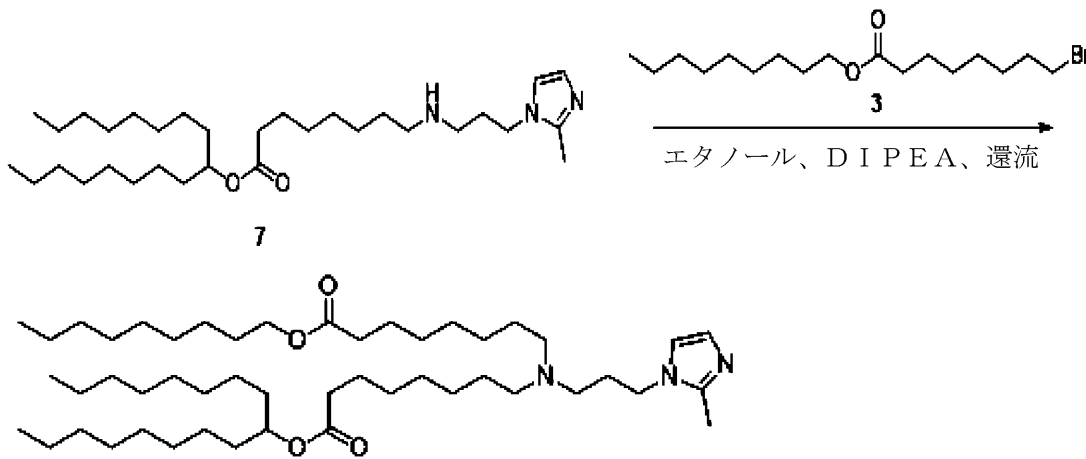
凝縮器に接続された 100 mL の丸底フラスコ内で、ヘプタデカン-9-イル8-プロ

50

モオクタノエート(5)(860mg、1.868mmol)及び3-(2-メチル-1H-イミダゾール-1-イル)プロパン-1-アミン(6)(1.3g、9.339mmol)をエタノール(10mL)中で混合した。反応混合物を一晩加熱して還流した。MS(APCI)は、予期された生成物を示した。混合物を室温に冷却し、濃縮した。粗残渣をフラッシュクロマトグラフィー(SiO<sub>2</sub>:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>=CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>中の100%~10%のメタノール+1%NH<sub>4</sub>OH)によって精製し、無色の油生成物7が得られた(665mg、69%)。

【0535】

40.4.4 ヘプタデカン-9-イル8-((3-(2-メチル-1H-イミダゾール-1-イル)プロピル)(8-(ノニルオキシ)-8-オキソオクチル)アミノ)オクタノエート(脂質10a-54)の合成 10



20

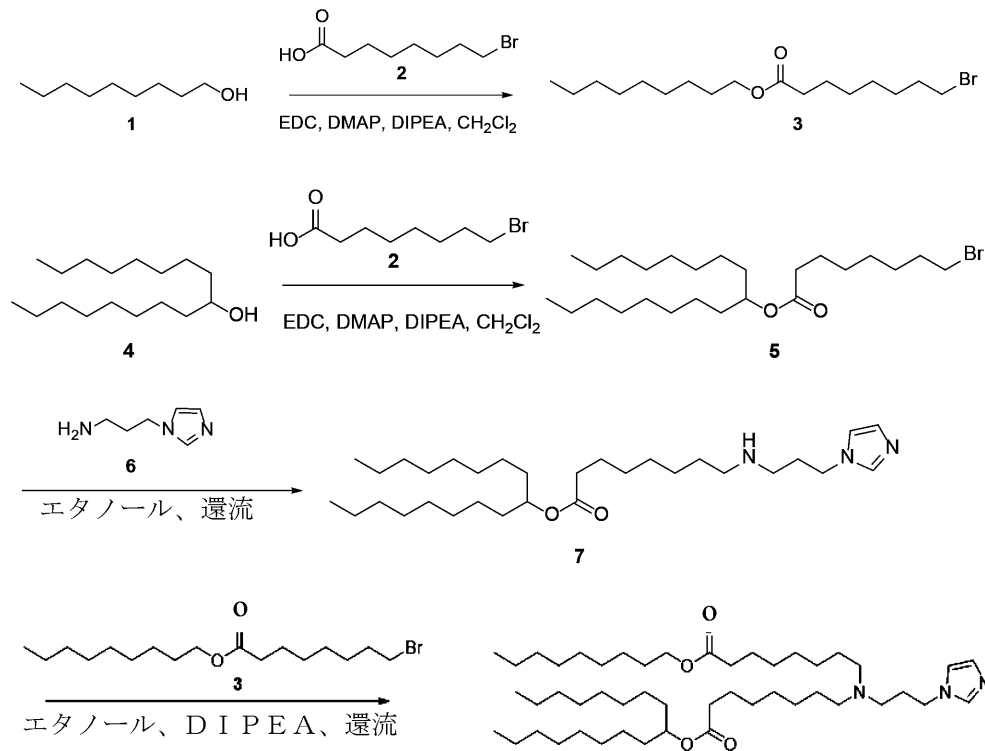
凝縮器に接続された100mLの丸底フラスコ内で、ヘプタデカン-9-イル8-((3-(2-メチル-1H-イミダゾール-1-イル)プロピル)アミノ)オクタノエート(7)(665mg、1.279mmol)及びノニル8-ブロモオクタノエート(3)(536mg、1.535mmol)をエタノール(10mL)中で混合し、次いでDIPEA(0.55mL、3.198mmol)を添加した。反応混合物を一晩加熱して還流した。MS(APCI)及びTLC(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>中の10%MeOH+1%NH<sub>4</sub>OH)はいずれも、生成物及びいくつかの未反応出発物質を示した。混合物を室温に冷却し、濃縮した。粗残渣をフラッシュクロマトグラフィー(SiO<sub>2</sub>:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>=CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>中の100%~10%のメタノール+1%NH<sub>4</sub>OH)によって精製し、無色の油が得られた(170mg、17%)。

30

【0536】

40.5 ヘプタデカン-9-イル8-((3-(1H-イミダゾール-1-イル)プロピル)(8-(ノニルオキシ)-8-オキソオクチル)アミノ)オクタノエート(脂質10a-53)の合成 40

50



10

20

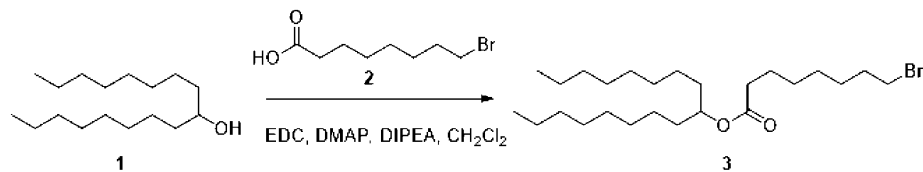
脂質 10 a - 53 を上のスキームに従って合成する。反応条件は、イミダゾールアミンとしての 3 - ( 1 H - イミダゾール - 1 - イル ) プロパン - 1 - アミンを除き、脂質 10 a - 54 と同一である。

【 0537 】

40.6 ヘプタデカン - 9 - イル 8 - ( ( 3 - ( 1 H - イミダゾール - 1 - イル ) プロピル ) ( 8 - ( ノニルオキシ ) - 8 - オキソオクチル ) アミノ ) オクタノエート ( 脂質 10 a - 45 ) の合成

30

40.6.1 ヘプタデカン - 9 - イル 8 - プロモオクタノエート ( 3 ) の合成



CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ( 300 mL ) 中の 8 - プロモオクタン酸 ( 2 ) ( 10 g、44.82 mmol ) 及びヘプタデカン - 9 - オール ( 1 ) ( 9.6 g、37.35 mmol ) の混合物に DMAP ( 900 mg、7.48 mmol )、DIPEA ( 26 mL、149.7 mmol ) 及び EDC ( 10.7 g、56.03 mmol ) を添加した。反応物を室温で一晩攪拌した。反応混合物の濃縮後、粗残渣を酢酸エチル ( 300 mL ) に溶解し、1 N の HCl、飽和 NaHCO<sub>3</sub>、水及びブラインで洗浄した。有機層を無水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で乾燥させた。溶媒を蒸発させ、粗残渣をフラッシュクロマトグラフィー ( SiO<sub>2</sub> : ヘキサン = ヘキサン中の 100% ~ 30% の EtOAc ) によって精製し、無色の油生成物 3 が得られた ( 5 g、29% )。

40

【 0538 】

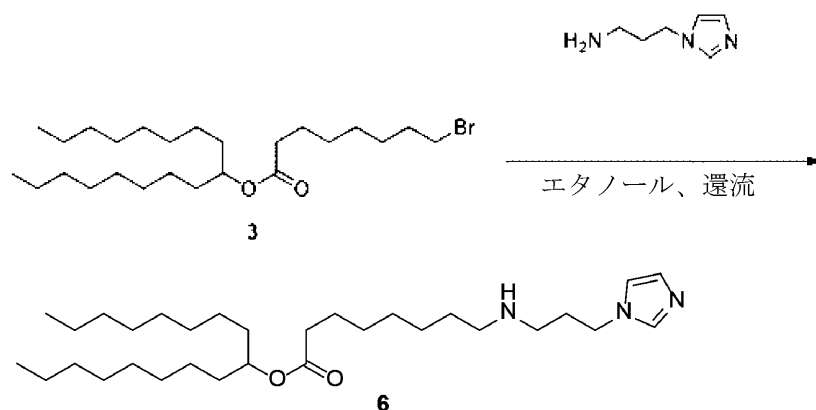
<sup>1</sup>H NMR ( 300 MHz, CDCl<sub>3</sub> ) : ppm 4.86 ( m, 1 H ) , 3.39 ( t, J = 7.0 Hz, 2 H ) , 2.27 ( t, J = 7.6 H

50

z, 2 H), 1.84 (m, 2 H), 1.62 (m, 2 H), 1.5 - 1.4 (m, 8 H), 1.35 - 1.2 (m, 26 H) 0.87 (t, J = 6.7 Hz, 6 H).

【0539】

40.6.2 ヘプタデカン-9-イル8-(3-(1H-イミダゾール-1-イル)プロピル)アミノ)オクタノエート(6)の合成



10

凝縮器に接続された100 mLの丸底フラスコ内で、ヘプタデカン-9-イル8-プロモオクタノエート(3)(1 g、2.167 mmol)及び3-(1H-イミダゾール-1-イル)プロパン-1-アミン(4)(1.3 mL、10.83 mmol)をエタノール(10 mL)中で混合した。反応混合物を一晩加熱して還流した。MS(APCI)は、予期された生成物を示した。混合物を室温に冷却し、濃縮した。粗残渣をフラッシュクロマトグラフィー(SiO<sub>2</sub>:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>=CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>中の100%~10%のメタノール+1%NH<sub>4</sub>OH)によって精製し、無色の油生成物6が得られた(498 mg、45%)。

20

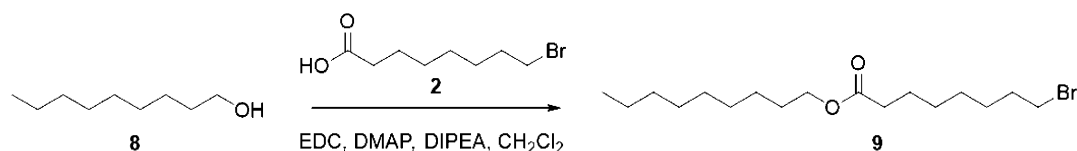
【0540】

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): ppm 7.47 (s, 1 H), 7.04 (s, 1 H), 6.91 (s, 1 H), 4.85 (m, 1 H), 4.03 (t, J = 7.0 Hz, 2 H), 2.56 (dd, J = 14.5, 7.4 Hz, 4 H), 2.27 (t, J = 7.4 Hz, 2 H), 1.92 (m, 2 H), 1.60 (m, 2 H), 1.48 (m, 6 H), 1.30 - 1.20 (m, 31 H), 0.86 (t, J = 6.6 Hz, 6 H). MS(APCI<sup>+</sup>): 506.4 (M+1).

30

【0541】

40.6.3 ノニル8-プロモオクタノエート(9)の合成



40

CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(500 mL)中の8-プロモオクタン酸(2)(18.6 g、83.18 mmol)及びノナン-1-オール(8)(10 g、69.32 mmol)の混合物に、DMAP(1.7 g、13.86 mmol)、DIPEA(48 mL、277.3 mmol)、及びEDC(16 g、83.18 mmol)を添加した。反応物を室温で一晩攪拌した。反応混合物の濃縮後、粗残渣を酢酸エチル(500 mL)に溶解し、1 NのHCl、飽和NaHCO<sub>3</sub>、水及びブラインで洗浄した。有機層を無水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で乾燥さ

50



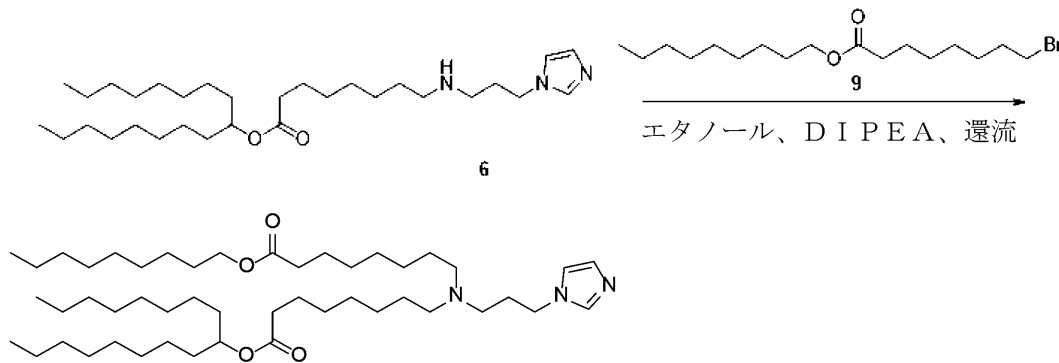
せた。溶媒を蒸発させ、粗残渣をフラッシュクロマトグラフィー（ $\text{SiO}_2$ ：ヘキサン＝ヘキサン中の100%～30%のEtOAc）によって精製し、無色の油生成物9が得られた（9 g、37%）。

【0542】

$^1\text{H NMR}$ （300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ）： ppm 4.05（t,  $J = 7.0$  Hz, 2H）, 3.39（t,  $J = 7.0$  Hz, 2H）, 2.29（t,  $J = 7.6$  Hz, 2H）, 1.84（m, 2H）, 1.62 - 1.56（m, 6H）, 1.40 - 1.20（m, 16H）, 0.87（t,  $J = 6.7$  Hz, 3H）。

【0543】

40.6.4 ヘプタデカン-9-イル8-（（3-（1H-イミダゾール-1-イル）プロピル）（8-（ノニルオキシ）-8-オキソオクチル）アミノ）オクタノエートの合成



凝縮器に接続された100 mLの丸底フラスコ内で、ヘプタデカン-9-イル8-（（3-（1H-イミダゾール-1-イル）プロピル）アミノ）オクタノエート（6）（242 mg、0.478 mmol）及びノニル8-プロモオクタノエート9（200 mg、0.574 mmol）をエタノール（10 mL）中で混合し、次いでDIPEA（0.2 mL、1.196 mmol）を添加した。反応混合物を一晩加熱して還流した。MS（APCI）及びTLC（ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 中の10% MeOH + 1%  $\text{NH}_4\text{OH}$ ）はいずれも、生成物及びいくつかの未反応出発物質を示した。混合物を室温に冷却し、濃縮した。粗残渣をフラッシュクロマトグラフィー（ $\text{SiO}_2$ ： $\text{CH}_2\text{Cl}_2 = \text{CH}_2\text{Cl}_2$ 中の100%～10%のメタノール + 1%  $\text{NH}_4\text{OH}$ ）によって精製し、無色の油が得られた（35 mg、10%）。

【0544】

$^1\text{H NMR}$ （300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ）： ppm 7.46（s, 1H）, 7.05（s, 1H）, 6.90（s, 1H）, 4.85（m, 1H）, 4.04（t,  $J = 6.6$  Hz, 2H）, 4.01（t,  $J = 6.6$  Hz, 2H）, 2.38（m, 6H）, 2.27（t,  $J = 3.8$  Hz, 4H）, 1.89（m, 2H）, 1.60 - 1.58（m, 12H）, 1.48（m, 6H）, 1.30 - 1.20（m, 47H）, 0.87（t,  $J = 7.1$  Hz, 9H）。MS（APCI+）：774.6（ $M+1$ ）。

【0545】

40.7 ヘプタデカン-9-イル8-（（3-（2-メチル-1H-イミダゾール-1-イル）プロピル）（8-（ノニルオキシ）-8-オキソオクチル）アミノ）オクタノエート（脂質10a-46）の合成

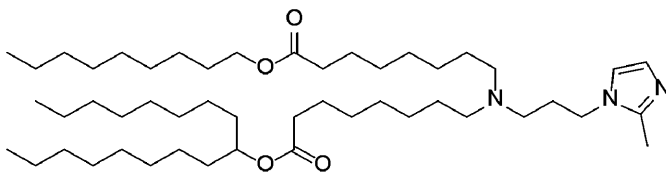
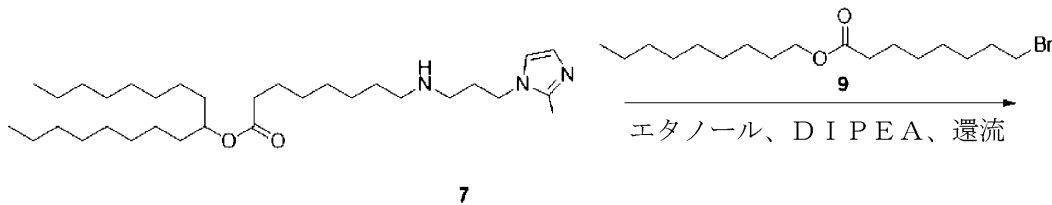
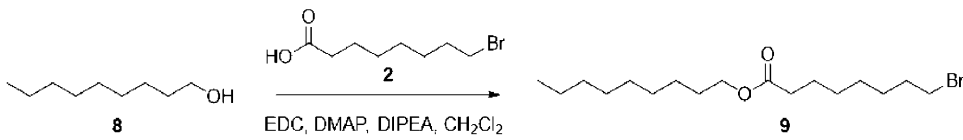
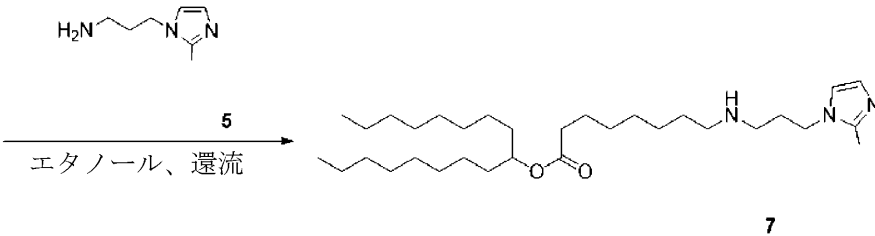
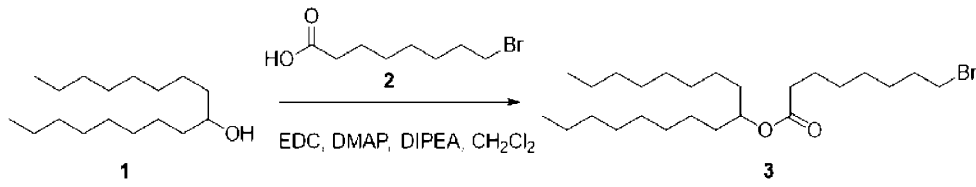
10

20

30

40

50



脂質 10 a - 46 を上のスキームに従って合成する。反応条件は、イミダゾールアミンとしての 3 - ( 2 - メチル - 1 H - イミダゾール - 1 - イル ) プロパン - 1 - アミンを除き、脂質 10 a - 45 と同一である。

【 0 5 4 6 】

<sup>1</sup>H NMR ( 3 0 0 M H z , C D C l <sub>3</sub> ) : p p m 6 . 8 9 ( s , 1 H ) , 6 . 8 1 ( s , 1 H ) , 4 . 8 6 ( m , 1 H ) , 4 . 0 4 ( t , J = 6 . 8 H z , 2 H ) , 3 . 8 5 ( t , J = 7 . 4 H z , 2 H ) , 2 . 3 8 - 2 . 3 6 ( m , 9 H ) , 2 . 2 8 ( m , 4 H ) , 1 . 8 2 ( m , 2 H ) , 1 . 7 2 - 1 . 5 6 ( m , 1 2 H ) , 1 . 4 8 ( m , 4 H ) , 1 . 3 0 - 1 . 2 0 ( m , 4 6 H ) , 0 . 8 6 ( t , J = 6 . 6 H z , 9 H ) . M S ( A P C I <sup>+</sup> ) : 7 8 9 . 7 ( M + 1 ) .

【 0 5 4 7 】

4 0 . 8 ヘプタデカン - 9 - イル 8 - ( ( 3 - ( 1 H - イミダゾール - 1 - イル ) プロピル ) ( 8 - オキソ - 8 - ( ウンデカン - 3 - イルオキシ ) オクチル ) アミノ ) オクタノエート ( 脂質表 1 0 a - 1 3 7 ) の合成

4 0 . 8 . 1 ヘプタデカン - 9 - イル 8 - プロモオクタノエート ( 3 ) の合成

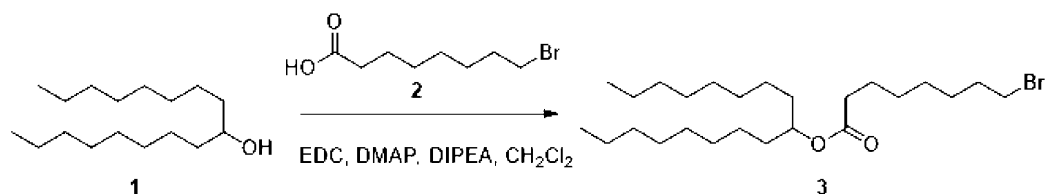
10

20

30

40

50



CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (300 mL) 中の 8 - ブロモオクタン酸 (2) (10 g、44.82 mmol) 及びヘプタデカン - 9 - オール (1) (9.6 g、37.35 mmol) の混合物に、DMAP (900 mg、7.48 mmol)、DIPEA (26 mL、149.7 mmol)、及び EDC (10.7 g、56.03 mmol) を添加した。反応物を室温で一晩攪拌した。反応混合物の濃縮後、粗残渣を酢酸エチル (300 mL) に溶解し、1 N の HCl、飽和 NaHCO<sub>3</sub>、水及びブラインで洗浄した。有機層を無水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で乾燥させた。溶媒を蒸発させ、粗残渣をフラッシュクロマトグラフィー (SiO<sub>2</sub>:ヘキサン = ヘキサン中の 100% ~ 30% の EtOAc) によって精製し、無色の油生成物 3 が得られた (5 g、29%)。

10

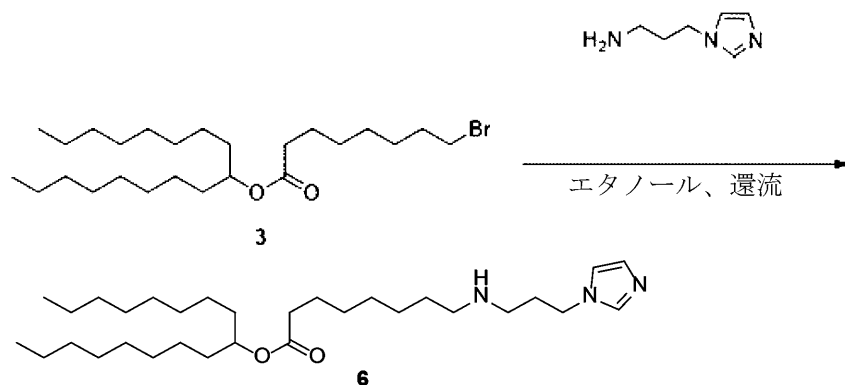
【0548】

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): ppm 4.86 (m, 1H), 3.39 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 2.27 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 1.84 (m, 2H), 1.62 (m, 2H), 1.5 - 1.4 (m, 8H), 1.35 - 1.2 (m, 26H) 0.87 (t, J = 6.7 Hz, 6H)。

20

【0549】

40.8.2 ヘプタデカン - 9 - イル 8 - ((3 - (1H - イミダゾール - 1 - イル) プロピル) アミノ) オクタノエート (6) の合成



30

凝縮器に接続された 100 mL の丸底フラスコ内で、ヘプタデカン - 9 - イル 8 - ブロモオクタノエート (3) (1 g、2.167 mmol) 及び 3 - (1H - イミダゾール - 1 - イル) プロパン - 1 - アミン (4) (1.3 mL、10.83 mmol) をエタノール (10 mL) 中で混合した。反応混合物を一晩加熱して還流した。MS (APCI) は、予期された生成物を示した。混合物を室温に冷却し、濃縮した。粗残渣をフラッシュクロマトグラフィー (SiO<sub>2</sub>:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> = CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 中の 100% ~ 10% のメタノール + 1% NH<sub>4</sub>OH) によって精製し、無色の油生成物 6 が得られた (498 mg、45%)。

40

【0550】

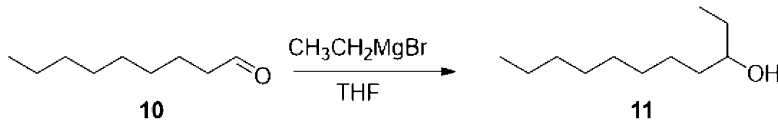
<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): ppm 7.47 (s, 1H), 7.04 (s, 1H), 6.91 (s, 1H), 4.85 (m, 1H), 4.03 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 2.56 (dd, J = 14.5, 7.4 Hz, 4H), 2.27 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 1.92 (m, 2H)

50

), 1.60 (m, 2H), 1.48 (m, 6H), 1.30 - 1.20 (m, 31H), 0.86 (t, J = 6.6 Hz, 6H). MS (APCI<sup>+</sup>): 506.4 (M+1).

## 【0551】

## 40.8.3 ウンデカン-3-オール(11)の合成



10

ノナール(10)(5g、35.2mmol)の混合物に、0の氷水浴中の無水THF(100mL)中で、臭化エチルマグネシウム(47mL、42.2mmol、THF中で0.9M)を滴加した。反応物を室温で一晩攪拌した。反応物を氷でクエンチし、酢酸エチル(500mL)に溶解し、1NのHCl、飽和NaHCO<sub>3</sub>、水、及びブラインで洗浄した。有機層を無水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で乾燥させた。溶媒を蒸発させ、粗残渣をフラッシュクロマトグラフィー(SiO<sub>2</sub>:ヘキサン=ヘキサン中の100%~50%のEtOAc)によって精製し、無色の油生成物11が得られた(4g、66%)。

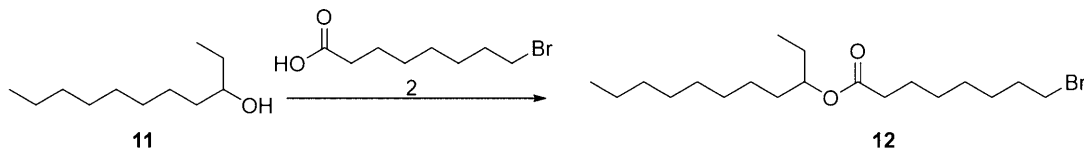
## 【0552】

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): ppm 3.52 (m, 1H), 1.56 - 1.3 (m, 4H), 1.3 - 1.20 (m, 12H), 0.93 (t, J = 7.4 Hz, 3H), 0.87 (t, J = 7.4 Hz, 3H).

20

## 【0553】

## 40.8.4 ウンデカン-3-イル8-ブロモオクタノエート(12)の合成



30

CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(100mL)中の8-ブロモオクタン酸(2)(6.2g、27.9mmol)及びウンデカン-3-オール(11)(4g、23.2mmol)の混合物に、DMAP(567.2mg、4.64mmol)、DIPEA(16.2mL、92.9mmol)、及びEDC(6.7g、34.8mmol)を添加した。反応物を室温で一晩攪拌した。反応混合物の濃縮後、粗残渣を酢酸エチル(500mL)に溶解し、1NのHCl、飽和NaHCO<sub>3</sub>、水及びブラインで洗浄した。有機層を無水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で乾燥させた。溶媒を蒸発させ、粗残渣をフラッシュクロマトグラフィー(SiO<sub>2</sub>:ヘキサン=ヘキサン中の100%~30%のEtOAc)によって精製し、無色の油生成物12

40

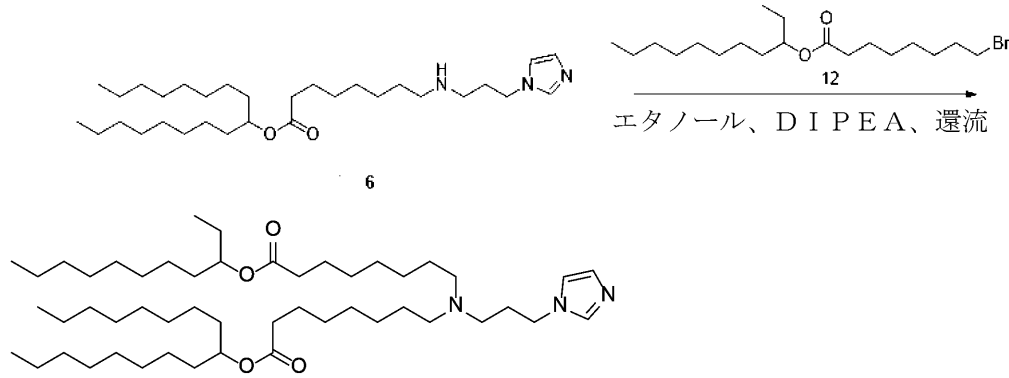
## 【0554】

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): ppm 4.80 (m, 1H), 3.39 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 2.28 (t, J = 7.7 Hz, 2H), 1.84 (m, 2H), 1.6 - 1.35 (m, 8H), 1.35 - 1.2 (m, 16H), 0.87 (t, J = 7.4 Hz, 6H).

## 【0555】

40.8.4 ヘプタデカン-9-イル8-((3-(1H-イミダゾール-1-イル)プロピル)(8-(ノニルオキシ)-8-オキソオクチル)アミノ)オクタノエートの合成

50



凝縮器に接続された100 mLの丸底フラスコ内で、ヘプタデカン-9-イル8-((3-(1H-イミダゾール-1-イル)プロピル)アミノ)オクタノエート(6)(242 mg、0.478 mmol)及びウンデカン-3-イル8-ブロモオクタノエート(12)(200 mg、0.574 mmol)をエタノール(10 mL)中で混合し、次いでDIPEA(0.2 mL、1.196 mmol)を添加した。反応混合物を一晩加熱して還流した。MS(APCI)及びTLC(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>中の10% MeOH + 1% NH<sub>4</sub>OH)はいずれも、生成物及びいくつかの未反応出発物質を示した。混合物を室温に冷却し、濃縮した。粗残渣をフラッシュクロマトグラフィー(SiO<sub>2</sub>: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> = CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>中の100% ~ 10%のメタノール + 1% NH<sub>4</sub>OH)によって精製し、無色の油が得られた(35 mg、10%)。

20

## 【0556】

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): ppm 7.45 (s, 1H), 7.04 (s, 1H), 6.90 (s, 1H), 4.82 (m, 2H), 3.97 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 2.35 (m, 6H), 2.27 (t, J = 3.8 Hz, 4H), 1.89 (m, 2H), 1.60 - 1.48 (m, 14H), 1.30 - 1.20 (m, 50H), 0.87 (m, 12H). MS(APCI+): 802.8

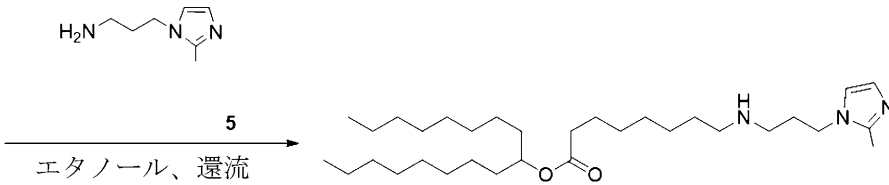
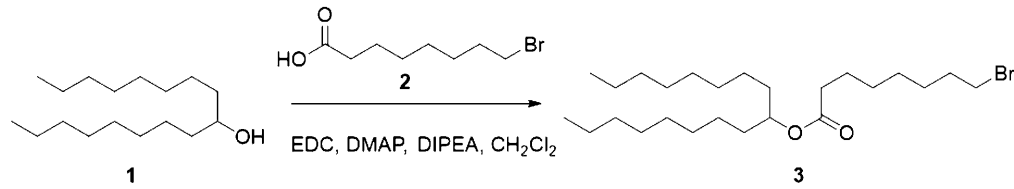
30

## 【0557】

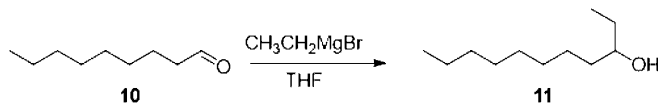
40.9 ヘプタデカン-9-イル8-((3-(2-メチル-1H-イミダゾール-1-イル)プロピル)(8-(ノニルオキシ)-8-オキソオクチル)アミノ)オクタノエート(脂質10a-138)の合成

40

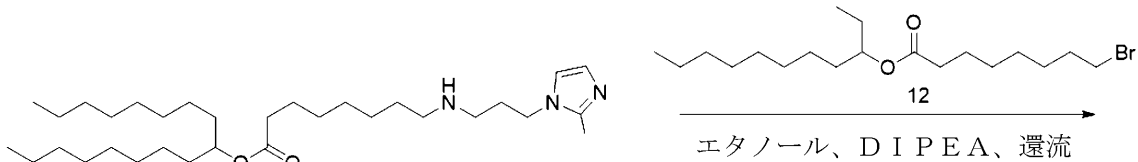
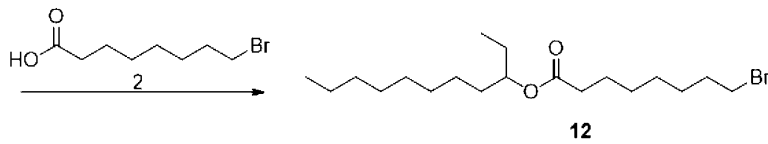
50



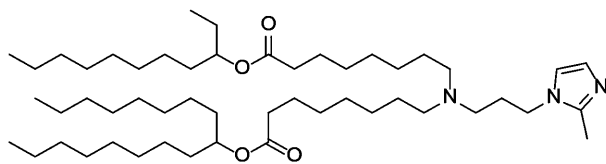
10



20



30



脂質 10 a - 138 を上のスキームに従って合成する。反応条件は、イミダゾールアミンとしての 3 - ( 2 - メチル - 1 H - イミダゾール - 1 - イル ) プロパン - 1 - アミンを除き、脂質 10 a - 137 と同一である。

40

【 0 5 5 8 】

<sup>1</sup>H NMR ( 300 MHz, CDCl<sub>3</sub> ) : ppm 6.89 ( s, 1 H ), 6.81 ( s, 1 H ), 4.82 ( m, 2 H ), 3.86 ( t, J = 7.1 Hz, 2 H ), 2.38 - 2.3 ( m, 9 H ), 2.27 ( t, J = 3.8 Hz, 4 H ), 1.84 ( m, 2 H ), 1.60 - 1.37 ( m, 14 H ), 1.30 - 1.20 ( m, 50 H ), 0.87 ( m, 12 H ). MS ( APCI + ) : 816.8 ( M + 1 ).

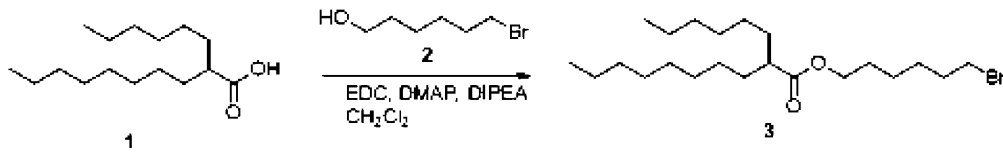
【 0 5 5 9 】

40.10 ( ( ( 2 - ( 2 - メチル - 1 H - イミダゾール - 1 - イル ) エチル ) アザネ

50

ジル)ビス(ヘキサン-6,1-ジイル)ビス(2-ヘキシルデカノエート(脂質10a-139)の合成

40.10.1 6-ブロモヘキシル2-ヘキシルデカノエート(3)の合成



10

CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1 L) 中の 2-ヘキシルデカン酸 (1) (102 g、0.398 mmol) 及び 6-ブロモ-1-ヘキサノール (2) (60 g、0.331 mmol) の混合物に、DMAP (8.1 g、66 mmol)、DIPEA (230 mL、1.325 mmol)、及び EDC (76 g、0.398 mmol) を添加した。反応物を室温で一晩撹拌した。反応混合物の濃縮後、粗残渣を酢酸エチル (1 L) に溶解し、1 N の HCl、飽和 NaHCO<sub>3</sub>、水、及びブラインで洗浄した。有機層を無水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で乾燥させた。溶媒を蒸発させ、粗残渣をフラッシュクロマトグラフィー (SiO<sub>2</sub>:ヘキサン=ヘキサン中の100%~30%のEtOAc) によって精製し、無色の油生成物 3 が得られた (67 g、48%)。

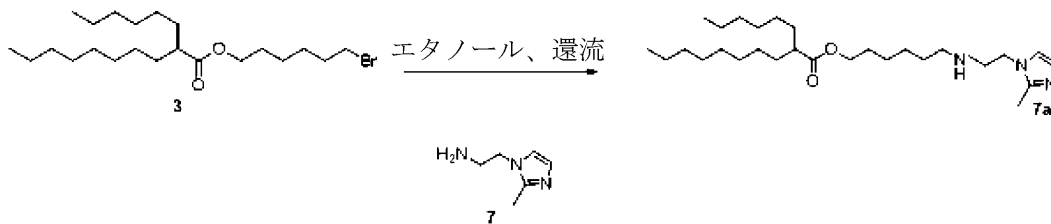
20

【0560】

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): ppm 4.06 (t, J = 6.6 Hz, 2H), 3.4 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 2.3 (m, 1H), 1.86 (m, 2H), 1.64 (m, 2H), 1.5-1.4 (m, 2H), 1.35-1.2 (m, 26H) 0.87 (t, J = 6.7 Hz, 6H).

【0561】

40.10.2 6-((3-(1H-イミダゾール-1-イル)ブチル)アミノ)ヘキシル2-ヘキシルデカノエート(7a)の合成



30

凝縮器に接続された 100 mL の丸底フラスコ内で、6-ブロモヘキシル2-ヘキシルデカノエート (3) (1.2 g、2.87 mmol) 及び 3-(1H-イミダゾール-1-イル)ブタン-1-アミン (7) (2 g、14.37 mmol) をエタノール (20 mL) 中で混合した。反応混合物を一晩加熱して還流した。MS (APCI) は、予期された生成物を示した。混合物を室温に冷却し、濃縮した。粗残渣をフラッシュクロマトグラフィー (SiO<sub>2</sub>:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>=CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>中の100%~10%のメタノール+1% NH<sub>4</sub>OH) によって精製し、無色の油生成物 7a が得られた (626 mg、46%)。

40

【0562】

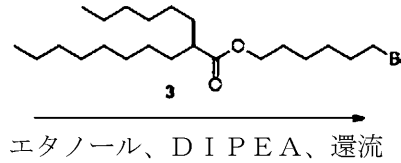
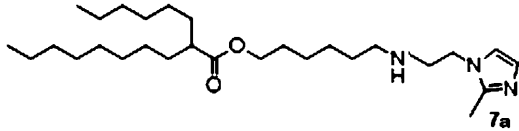
<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): ppm 7.51 (s, 1H), 7.05 (s, 1H), 6.93 (s, 1H), 4.35 (m, 1H), 4.04 (t, J = 6.6 Hz, 2H), 2.6-2.4 (m, 4H), 2.29 (m, 1H), 1.94 (td, J = 14, 6.8 Hz, 2H), 1.64-1

50

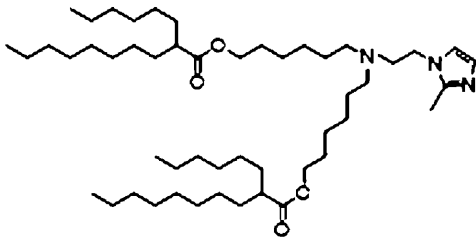
. 56 (m, 4H), 1.47 (s, 3H), 1.42 - 1.20 (m, 29H), 0.86 (m, 6H). MS (APCI<sup>+</sup>): 478.8 (M+1)

【0563】

40.10.2 ((2-(2-メチル-1H-イミダゾール-1-イル)エチル)アザンジイル)ビス(ヘキサン-6,1-ジイル)ビス(2-ヘキシルデカノエートの合成



10



20

凝縮器に接続された100mLの丸底フラスコ内で、6-(3-(1H-イミダゾール-1-イル)ブチル)アミノ)ヘキシル2-ヘキシルデカノエート(7a)(626mg、1.31mmol)及び6-プロモヘキシル2-ヘキシルデカノエート(3)(550mg、1.31mmol)をエタノール(20mL)中で混合し、次いでDIPEA(0.6mL、3.276mmol)を添加した。反応混合物を一晩加熱して還流した。MS(APCI)及びTLC(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>中の10%MeOH+1%NH<sub>4</sub>OH)はいずれも、生成物及び未反応出発物質7aを示した。混合物を室温に冷却し、濃縮した。粗残渣をフラッシュクロマトグラフィー(SiO<sub>2</sub>:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>=CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>中の100%~10%のメタノール+1%NH<sub>4</sub>OH)によって精製し、得られた生成物をC18逆相クロマトグラフィー(CH<sub>3</sub>CN中のH<sub>2</sub>O=95%~0.1% TFA=100%)によって更に精製し、無色の油(TFA塩)が得られた(140mg、13%)。

30

【0564】

<sup>1</sup>H-NMR(300MHz,CDCl<sub>3</sub>): 6.87(s,1H), 6.83(s,1H), 4.05(t,J=6.7Hz,4H), 3.84(t,J=6.9Hz,2H), 2.66(t,J=6.9Hz,2H), 2.45-2.20(m,6H), 2.37(s,3H), 1.65-1.50(m,8H), 1.5-1.1(m,56H), 0.86(t,J=6.5Hz,12H). MS(APCI<sup>+</sup>): 802.6(M+1).

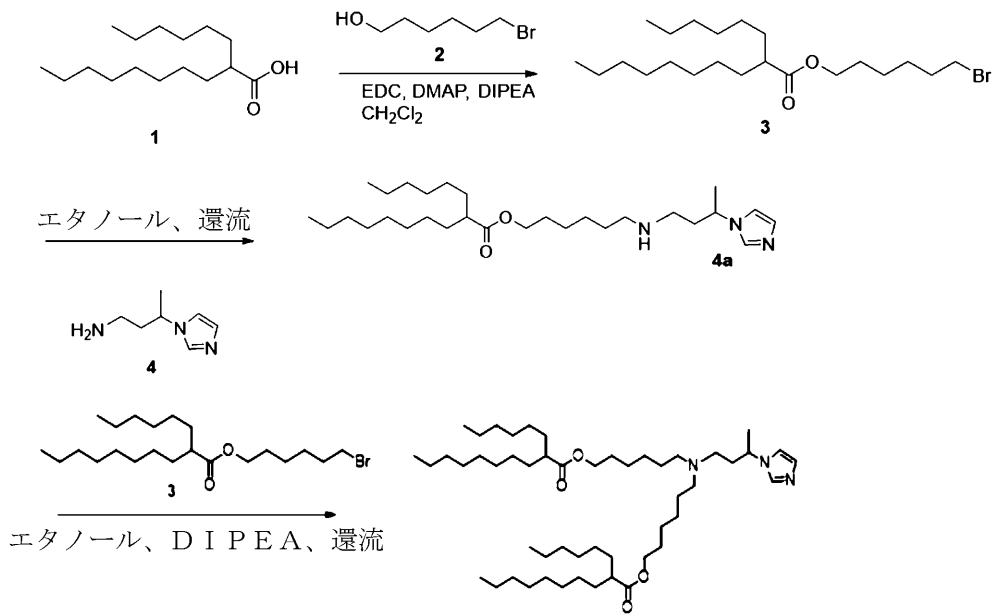
40

【0565】

40.11(((1-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)メチル)アザンジイル)ビス(ヘキサン-6,1-ジイル)ビス(2-ヘキシルデカノエート)(脂質10a-130)の合成

50





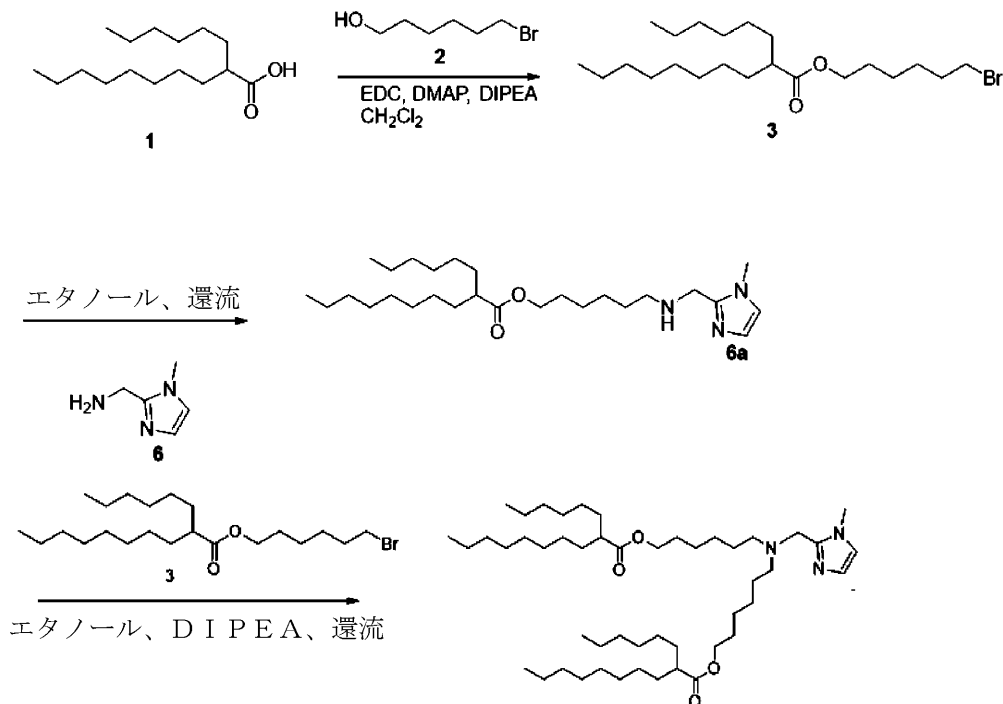
10

20

脂質 10 a - 130 を、上のスキームに従って合成する。反応条件は、イミダゾールアミンとしての 3 - ( 1 H - イミダゾール - 1 - イル ) ブチルアミンを除き、脂質 10 a - 139 と同一である。

【 0 5 6 6 】

40 . 12 ( ( ( 1 - メチル - 1 H - イミダゾール - 2 - イル ) メチル ) アザンジール ) ビス ( ヘキサン - 6 , 1 - ジイル ) ビス ( 2 - ヘキシルデカノエート ) ( 脂質 10 a - 128 ) の合成



30

40

脂質 10 a - 128 を上のスキームに従って合成する。反応条件は、イミダゾールアミンとしての 1 - メチル - 1 H - イミダゾール - 2 - イル ) メチルアミンを除き、脂質 10

50

a - 139 と同一である。

【0567】

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 6.89 (d,  $J = 1.4$  Hz, 1H), 6.81 (d,  $J = 1.4$  Hz, 1H), 4.03 (t,  $J = 6.7$  Hz, 4H), 3.68 (s, 3H), 3.62 (s, 2H), 2.45 - 2.20 (m, 6H), 1.65 - 1.50 (m, 8H), 1.5 - 1.35 (m, 8H), 1.35 - 1.10 (m, 48H), 0.86 (t,  $J = 6.5$  Hz, 12H). MS (APCI<sup>+</sup>): 787.6 (M+1).

【0568】

実施例 41

環状RNAを有する脂質ナノ粒子製剤

脂質ナノ粒子 (LNP) を「NextGen」混合チャンバーを有する Precision Nanosystems Ignite 装置を使用して形成した。イオン化可能脂質 10a-26、DSPC、コレステロール、及び DSPE-PEG 2000 (Avanti Polar Lipids Inc.) を 16:1:4:1 の重量比または 62:4:33:1 のモル比で含有していたエタノール相を、環状RNA及び25mM酢酸ナトリウム緩衝液を含有する水相と pH 5.2 で組み合わせた。3:1 の水対エタノールの混合比を使用した。次いで製剤化された LNP を 1 L の水で透析し、18 時間にわたって 2 回交換した。透析した LNP を 0.2  $\mu\text{m}$  フィルターで濾過した。インビボ投薬の前に、LNP を PBS に希釈した。LNP サイズは、動的光散乱によって決定した。1 mL の PBS (pH 7.4) 中の 20  $\mu\text{g/mL}$  の LNP を有するキュベットを Malvern Panalytical Zetasizer Pro を使用して Z 平均について測定した。Z 平均及び多分散性指数を記録した。

【0569】

41.1 脂質 10a-26 及び 10a-27 の製剤

脂質ナノ粒子 (LNP) を「NextGen」混合チャンバーを有する Precision Nanosystems Ignite 装置を使用して形成した。イオン化可能脂質 10a-26 または脂質 10a-27、DOPE、コレステロール、及び DSPE-PEG 2000 (Avanti Polar Lipids Inc.) を 16:1:4:1 の重量比または 62:4:33:1 のモル比で含有していたエタノール相を、環状RNA及び25mM酢酸ナトリウム緩衝液を含有する水相と pH 5.2 で組み合わせた。3:1 の水対エタノールの混合比を使用した。次いで製剤化された LNP を 1 L の水で透析し、18 時間にわたって 2 回交換した。透析した LNP を 0.2  $\mu\text{m}$  フィルターで濾過した。インビボ投薬の前に、LNP を PBS に希釈した。LNP サイズは、動的光散乱によって決定した。1 mL の PBS (pH 7.4) 中の 20  $\mu\text{g/mL}$  の LNP を有するキュベットを Malvern Panalytical Zetasizer Pro を使用して Z 平均について測定した。Z 平均及び多分散性指数を記録した。

【0570】

39.2 脂質 10a-53 及び 10a-54 の製剤

脂質ナノ粒子 (LNP) を「NextGen」混合チャンバーを有する Precision Nanosystems Ignite 装置を使用して形成した。イオン化可能脂質 10a-53 または 10a-54、DOPE、コレステロール、及び DSPE-PEG 2000 (Avanti Polar Lipids Inc.) を 50:10:38.5:1.5 のモル比で含有していたエタノール相を、環状RNA及び25mM酢酸ナトリウム緩衝液を含有する水相と pH 5.2 で組み合わせた。3:1 の水対エタノールの混合比を使用した。次いで製剤化された LNP を 1 L の 1x PBS で透析し、18 時間にわたって 2 回交換した。透析した LNP を 0.2  $\mu\text{m}$  フィルターで濾過した。インビボ投薬の前に、LNP を PBS に希釈した。LNP サイズは、動的光散乱によって決定した。1 mL の PBS (pH 7.4) 中の 20  $\mu\text{g/mL}$  の LNP を有するキュベットを Malvern Panalytical Zetasizer Pro を使用して Z 平均について

10

20

30

40

50

測定した。Z平均及び多分散性指数を記録した。

【0571】

LNPのゼータ電位は、Malvern Panalytical Zetasizer Proを使用して測定した。水中の200 $\mu$ Lの粒子溶液及び800 $\mu$ Lの蒸留したRNAse非含有水を含む混合物(400 $\mu$ g/mLの最終粒子濃度を有する)を分析のためのゼータサイザーキャピラリーセルにロードした。

【0572】

RNA封入をRibogreenアッセイを使用して決定した。ナノ粒子溶液を2 $\mu$ g/mLの理論的circRNA濃度でトリス-エチレンジアミン四酢酸(TE)緩衝液に希釈した。2 $\mu$ g/mL~0.125 $\mu$ g/mLの範囲の、TE緩衝液に希釈された標準circRNA溶液を作製した。粒子及び標準を全てのウェルに添加し、第2のインキュベーションを実施した(3分間350rpmで37 $^{\circ}$ )。蛍光を、SPECTRAMAX(登録商標)GEMINI XSマイクロプレート蛍光光度計を使用して測定した。各粒子溶液中の環状RNAの濃度を標準曲線を使用して計算した。封入効率を、溶解した粒子と溶解していない粒子の間で検出されたcircRNAの比から計算した。

【0573】

(表16a) LNPの特徴評価

イオン化可能脂質	サイズ (nm)	PDI	封入化効率 (%)	ゼータデータ 電位 (mV)
22-S14	88	0.09	96	3.968
93-S14	119	0.02	96	-6.071
脂質10a-26	86	0.08	92	-15.24

【0574】

(表16b) LNPの特徴評価

イオン化可能脂質	Z平均 (nm)	PDI	RNA封入 (%)
22-S14	64	0.05	97
93-S14	74	0.04	95
脂質10a-26	84	0.04	96

【0575】

実施例42

インビボ分析

22~25gの範囲の雌CD-1または雌c57BL/6Jマウスに、0.5mg/kgのRNAを静脈内に投薬した。注射から6時間後、マウスに200 $\mu$ LのD-ルシフェ

リンを 15 mg/mL 濃度で腹腔内に注射した。注射から 5 分後、マウスをイソフルランを使用して麻酔し、IVIS Spectrum インビボ Imaging System (Perkin Elmer) 内に背面を上にして入れた。脂質 22-S14、93-S14、脂質 10a-26 の全身総 IVIS フラックスを、図 32A に示す。注射から 10 分後、マウスを発光についてスキャンした。マウスを安楽死させ、器官をルシフェリン注射から 25 分以内に抽出して肝臓、脾臓、腎臓、肺、及び心臓における発光についてスキャンした。画像 (図 33A~B、34A~B、35A~B) を Living Images (Perkin Elmer) ソフトウェアを使用して分析した。目的の領域を描画してフラックス及び平均輝度を得、タンパク質発現の生体内分布について分析した (図 32A~B)。

10

#### 【0576】

図 32A は、脂質 22-S14 及び 93-S14 を用いて作製された LNP と比較して、脂質 10a-26 LNP でルシフェラーゼ circRNA から観察された増加した全身総フラックスを示している。図 32B は、発現を改善するために設計された有意な構造変化にもかかわらず、脂質 22-S14 及び 93-S14 で観察された所望の脾臓対肝臓比を維持しながら、脂質 10a-26 を用いて増加した全体的発現を更に強調する組織のエクスピボ IVIS 分析を示している。これらのデータは、先行して報告された脂質と比較して、脂質 10a-26 によって得られた改善を強調する。

#### 【0577】

脂質 10b-15 または脂質 10a-53 もしくは 10a-54 を用いて形成された LNP に封入された circRNA で上述した同様の分析も実施した。図 36A~C は、発現を改善するために設計された有意な構造変化にもかかわらず、所望の脾臓対肝臓比を維持しながら、脂質 10b-15、10a-53、及び 10a-54 を用いて全体的発現をそれぞれ強調する組織のエクスピボ IVIS 分析を示している。図 36D は、PBS 対照についての結果を示している。これらのデータは、93-S14 及び 22-S14 などの先行して報告された脂質と比較した、脂質 10b-15、10a-53、及び 10a-54 によって得られる改善を実証している。

20

#### 【0578】

##### 実施例 43

##### ルシフェラーゼの送達

ヒト末梢血単核細胞 (PBMC) (Stemcell Technologies) を、ホタルルシフェラーゼ (f.luc) 環状 RNA を封入している脂質ナノ粒子 (LNP) でトランスフェクトし、ルシフェラーゼ発現について試験した。2 人の異なるドナーからの PBMC を、RPMI、2% ヒト血清、IL-2 (10 ng/mL)、及び 50 uM の BME 中で 37 °C で、ホタルルシフェラーゼをコードする環状 RNA (200 ng) を含有する 5 つの異なる LNP 組成物とインキュベートした。LNP を用いずにインキュベートされた PBMC を陰性対照として使用した。24 時間後、細胞を溶解し、生物発光 (Promega BrightGlo) に基づいてホタルルシフェラーゼ発現について分析した。

30

#### 【0579】

代表的なデータが図 37A 及び 37B に示されており、試験された LNP は、初代ヒト免疫細胞へ環状 RNA を送達し、タンパク質発現をもたらすことが可能であることを示している。

40

#### 【0580】

##### 実施例 44

##### 緑色蛍光タンパク質 (GFP) またはキメラ抗原受容体 (CAR) のインビトロ送達

ヒト PBMC (Stemcell Technologies) を GFP を封入している LNP でトランスフェクトし、フローサイトメトリーによって試験した。5 人の異なるドナーからの PBMC (PBMC A~E) を、RPMI、2% ヒト血清、IL-2 (10 ng/mL)、及び 50 uM の BME 中で 37 °C で、GFP または CD19-CAR の

50

いずれかをコードする環状RNA (200 ng) を含有する1つのLNP組成物とインキュベートした。LNPを用いずにインキュベートされたPBMCを陰性対照として使用した。LNPインキュベーションから24、48、または72時間後、細胞をCD3、CD19、CD56、CD14、CD11b、CD45、固定可能ライブデッド (live dead)、及びペイロード (GFPまたはCD19-CAR) について分析した。

【0581】

代表的なデータが図38A及び38Bに示されており、試験されたLNPは、初代ヒト免疫細胞へ環状RNAを送達し、タンパク質発現をもたらすことが可能であることを示している。

【0582】

実施例45

複数のIRESバリエーションは、インビトロでネズミCD19 CARの発現を仲介し得る抗ネズミCD19 CARをコードする複数の環状RNA構築物は、独自のIRES配列を含有し、これを1C1C7細胞株にリポトランスフェクトした。リポトランスフェクションの前に、1C1C7細胞を完全RPMIで数日間増殖させ、細胞が適切な数に増殖したら、1C1C7細胞を4つの異なる環状RNA構築物でリポトランスフェクトした (Invitrogen RNAiMAX)。24時間後、1C1C7細胞をHisタグ化組換えネズミCD19 (Sino Biological) タンパク質とインキュベートし、次いで二次抗His抗体で染色した。その後、細胞をフローサイトメトリーで分析した。

【0583】

代表的なデータが図39に示されており、示されたウイルス (セズジネズミピコルナウイルス、ヤギコブウイルス、パラボウイルス、及びサリウイルス) に由来するIRESは、ネズミT細胞において抗マウスCD19 CARの発現を誘導することが可能であることを示している。

【0584】

実施例46

ネズミCD19 CARは、インビトロで腫瘍細胞殺傷を仲介する

抗マウスCD19 CARをコードする環状RNAをネズミT細胞にエレクトロポレーションしてCAR仲介細胞傷害を評価した。エレクトロポレーションのため、ThermoFisherのNeon Transfection Systemを使用してT細胞を抗マウスCD19 CARをコードする環状RNAでエレクトロポレーションし、次いで一晩放置した。細胞傷害アッセイのため、エレクトロポレーションされたT細胞を、10% FBS、IL-2 (10 ng/mL)、及び50 uMのBMEを含有する完全RPMI中でFluc+ 標的及び非標的細胞と1:1の比で共培養し、37°Cで一晩インキュベートした。Fluc+ 標的及び非標的細胞の溶解を検出するために、共培養から24時間後にルシフェラーゼアッセイシステム (Promega Bright-glo Luciferase System) を使用して細胞傷害を測定した。示された値は、トランスフェクトされていないモックシグナルと比べて計算される。

【0585】

代表的なデータが図40に示されており、環状RNAから発現した抗マウスCD19 CARは、インビトロでネズミT細胞において機能的であることを示している。

【0586】

実施例47

ネズミCD19 CARをコードする脂質封入された環状RNAでのB細胞の機能的枯渇 C57BL/6Jマウスに、抗ネズミCD19 CARをコードする環状RNAを封入している、脂質10b-15を用いて形成されたLNPを注射した。対照として、ホタルルシフェラーゼ (fLuc) をコードする環状RNAを封入している脂質10b-15を異なる群のマウスに注射した。20~25gの範囲の雌のC57BL/6Jに、0.5 mg/kgのLNPの5用量を1日おきに静脈内に注射した。注射間で、採血物を固定可

10

20

30

40

50

能ライブ/デッド、CD45、TCR $\alpha$ b、B220、CD11b、及び抗ネズミCARについてフローサイトメトリーを介して分析した。最後の注射から2日後、脾臓を採取し、フローサイトメトリー分析のために処理した。脾細胞を固定可能ライブ/デッド、CD45、TCR $\alpha$ b、B220、CD11b、NK1.1、F4/80、CD11c、及び抗ネズミCARで染色した。抗ネズミCD19 CAR LNPを注射したマウスからのデータを、fLuc LNPを摂取したマウスに対して正規化した。

#### 【0587】

代表的なデータが図41A、41B、及び41Cに示されており、LNPを用いてインビボで送達された環状circRNAから発現した抗マウスCD19 CARは、インビボでネズミT細胞において機能的であることを示している。

10

#### 【0588】

##### 実施例48

環状RNAから発現したCD19 CARは、mRNAから発現したものと比較してより高い収率及び高い細胞傷害効果を有する。

N末端からC末端まで、FMC63由来scFv、CD8膜貫通ドメイン、4-1BB共刺激ドメイン、及びCD3細胞内ドメインを含む、抗CD19キメラ抗原受容体をコードする環状RNAをヒト末梢T細胞にエレクトロポレーションして、表面発現及びCAR仲介細胞傷害を評価した。比較のため、環状RNAがエレクトロポレーションされたT細胞を、この実験ではmRNAがエレクトロポレーションされたT細胞と比較した。エレクトロポレーションのため、ドナーヒトPBMCから市販のT細胞単離キット(Miltenyi Biotec)を使用してCD3+T細胞をヒトPBMCから単離した。単離後、T細胞を抗CD3/抗CD28(Stemcell Technologies)で刺激し、10%FBS、IL-2(10ng/mL)、及び50uMのBMEを含有する完全RPMI中で37°Cで5日にわたって増殖させた。刺激から5日後、T細胞を、ThermoFisherのNeon Transfection Systemを使用して抗ヒトCD19 CARをコードする環状RNAでエレクトロポレーションし、次いで一晩放置した。細胞傷害アッセイのため、エレクトロポレーションされたT細胞を、10%FBS、IL-2(10ng/mL)、及び50uMのBMEを含有する完全RPMI中でFluc+標的及び非標的細胞と1:1の比で共培養し、37°Cで一晩インキュベートした。Fluc+標的及び非標的細胞の溶解を検出するために、共培養から24時間後にルシフェラーゼアッセイシステム(Promega Brightgluciferase System)を使用して細胞傷害を測定した。更に、エレクトロポレーションされたT細胞の一定分量を採取し、分析の日ライブ/デッド固定可能染色、CD3、CD45、及びキメラ抗原受容体(FMC63)を染色した。

20

30

#### 【0589】

代表的なデータが図42及び43に示されている。図42A及び42Bは、環状RNAから発現した抗ヒトCD19 CARが、直鎖状mRNAから発現した抗ヒトCD19 CARより高いレベル及び長いレベルで発現することを示している。図43A及び43Bは、環状RNAから発現した抗ヒトCD19 CARが、直鎖状mRNAから発現した抗ヒトCD19 CARと比べて高い細胞傷害効果を発揮することを示している。

40

#### 【0590】

##### 実施例49

単一の環状RNAからの2つのCARの機能的発現

キメラ抗原受容体をコードする環状RNAをヒト末梢T細胞にエレクトロポレーションして表面発現及びCAR仲介細胞傷害を評価した。この試験の目的は、2つのCARをコードする環状RNAが、2A(P2A)またはIRES配列で確率的に発現し得るかどうかを評価することである。エレクトロポレーションのため、CD3+T細胞を商業的に購入し(Cellero)、抗CD3/抗CD28(Stemcell Technologies)で刺激し、10%FBS、IL-2(10ng/mL)、及び50uMのBMEを含有する完全RPMI中で37°Cで5日にわたって増殖させた。刺激から4日後、T

50

細胞を、ThermoFisherのNeon Transfection Systemを使用して抗ヒトCD19 CAR、抗ヒトCD19 CAR-2A-抗ヒトBCMA CAR、及び抗ヒトCD19 CAR-IRES-抗ヒトBCMA CARをコードする環状RNAでエレクトロポレーションし、次いで一晩放置した。細胞傷害アッセイのため、エレクトロポレーションされたT細胞を、10% FBS、IL-2 (10 ng/mL)、及び50 µMのBMEを含有する完全RPMI中でヒトCD19またはBCMA抗原を発現するFluc+K562細胞と1:1の比で共培養し、37 °Cで一晩インキュベートした。Fluc+標的細胞の溶解を検出するために、共培養から24時間後にルシフェラーゼアッセイシステム(Promega Bright-Glo Luciferase System)を使用して細胞傷害を測定した。

10

## 【0591】

代表的なデータが図44に示されており、2つのCARが、同じ環状RNA構築物から機能的に発現し、細胞傷害性エフェクター機能を発揮し得ることを示している。

## 【0592】

## 実施例50

Creレポーターマウスを使用したインビボ環状RNAトランスフェクション

Creリコンビナーゼ(Cre)をコードする環状RNAを前述したように脂質ナノ粒子に封入する。雌の6~8週齢のB6.Cg-Gt(ROSA)26Sortm9(CAG-tdTomato)Hz/J(Ai9)マウスに脂質ナノ粒子を0.5 mg/kgのRNAで静脈内に投薬した。蛍光tdTomatoタンパク質は、Cre組換えによりAi9マウスにおいて転写及び翻訳され、これは、環状RNAがtdTomato+細胞に送達され、そこで翻訳されたことを意味する。48時間後、マウスを安楽死させ、脾臓を採取し、シングルセル懸濁液へと処理し、フローサイトメトリーによるイムノフェノタイピングのための様々なフルオロフォアが複合された抗体で染色した。

20

## 【0593】

図45Aは、脂質10a-27もしくは10a-26または脂質10b-15を用いて形成されたLNPでの処置後の総骨髄(CD11b+)、B細胞(CD19+)、及びT細胞(TCR-B+)を含む様々な脾臓免疫細胞(CD45+、生)サブセットにおけるtdTomato発現の頻度とともに代表的なFACSプロットを示している。PBSが注射されたAi9マウスは、バックグラウンドのtdTomato蛍光を表していた。図45Bは、tdTomatoを発現する骨髄細胞、B細胞、及びT細胞の割合を定量し(平均+標準偏差、n=3)、これは、Cre環状RNAで成功裏にトランスフェクトされた各細胞集団の割合と同等である。脂質10a-27及び10a-26で作製されたLNPは、脂質93-S14と比較して有意に高い骨髄及びT細胞トランスフェクションを示し、脂質構造修飾によって付与される改善を強調している。

30

## 【0594】

図45Cは、脂質10a-27及び10a-26とともにtdTomatoを発現する追加の脾臓免疫細胞集団の割合を示しており(平均+標準偏差、n=3)、それにはまた、NK細胞(NKp46+、TCR-B-)、古典的単球(CD11b+、Ly-6G-、Ly-6C<sup>hi</sup>)、非古典的単球(CD11b+、Ly-6G-、Ly-6C<sup>lo</sup>)、好中球(CD11b+、Ly-6G+)、及び樹状細胞(CD11c+、MHC-I+)が含まれる。これらの実験は、脂質10a-27及び10a-26ならびに脂質10b-15で作製されたLNPが、マウスにおいて環状RNAを多くの脾臓免疫細胞サブセットに送達するのに有効であり、それらの細胞において環状RNAからの成功したタンパク質発現をもたらすことを実証している。

40

## 【0595】

## 実施例51

実施例51A:免疫抑制環状RNAを産生するためのビルトインポリA配列及びアフィニティー精製

ポリA配列(20~30 nt)をRNA構築物(イントロンにおいてビルトインポリA

50

配列を有する前駆体RNA)の5'及び3'末端に挿入した。前駆体RNA及びイントロンは、代替的に、例えば、E coli、ポリAポリメラーゼまたは酵母ポリAポリメラーゼを使用して転写後にポリアデニル化され得、これは追加の酵素の使用を必要とする。

#### 【0596】

この実施例における環状RNAは、インビトロ転写(IVT)によって環状化し、市販のオリゴ-dT樹脂で洗浄することによってアフィニティー精製して、スプライシング反応からポリAタグ化配列(フリーのイントロン及び前駆体RNAを含む)を選択的に取り除いた。IVTは、市販のIVTキット(New England Biolabs)またはカスタマイズされたIVTミックス(Orna Therapeutics)(グアノシン-リン酸(GMP)及びグアノシン三リン酸(GTP)を異なる比(GMP:GTP = 8、12.5、または13.75)で含有する)を用いて実施した。いくつかの実施形態では、高いGMP:GTP比のGMPが第1のヌクレオチドとして優先的に含まれ、大多数の-リン酸でキャップされた前駆体RNAを生成し得る。比較として、環状RNA産物を代替的に、Xrn1、Rnase R、及びDnase Iでの処置(酵素精製)によって精製した。

10

#### 【0597】

次いでアフィニティー精製または酵素精製プロセスを使用して調製された環状RNAの免疫原性を評価した。簡潔には、調製された環状RNAをA549細胞にトランスフェクトした。24時間後、細胞を溶解し、モック試料に対するインターフェロンベータ-1誘導をqPCRによって測定した。三リン酸化RNAである3p-hpRNAを陽性対照として使用した。

20

#### 【0598】

図46B及び46Cは、スプライシング中に取り除かれ、スプライシングされていない前駆体分子に存在するエレメントにポリA配列が含まれる場合、ネガティブセレクションアフィニティー精製がスプライシング反応から非環状産物を取り除くことを示している。図46Dは、試験されたIVT条件及び精製方法で調製された環状RNAが全て免疫不活性であることを示す。これらの結果は、ネガティブセレクションアフィニティー精製が、環状RNA精製のための酵素精製と同等または優れていること、及びカスタマイズされた環状RNA合成条件(IVT条件)がGMP余剰に対する依存性を低下させて、最大の免疫不活性を達成し得ることを示唆している。

30

#### 【0599】

実施例51B:環状RNA産生のための特殊結合部位及びアフィニティー精製

ポリAタグの代わりに、特殊設計配列(DBS、専用結合部位)を含めることができる。

#### 【0600】

ポリAタグの代わりに、樹脂に結合し得る特殊設計された相補性オリゴヌクレオチドなどの専用結合部位(DBS)を使用して、前駆体RNA及びフリーのイントロンを選択的に枯渇させ得る。この実施例では、DBS配列(30nt)を前駆体RNAの5'及び3'末端に挿入した。RNAを転写し、転写された産物を樹脂に連結されたカスタム相補性オリゴヌクレオチド上で洗浄した。

40

#### 【0601】

図47B及び47Cは、スプライシング中に除去されるエレメントに設計されたDBS配列を含めることにより、ネガティブアフィニティー精製を介して、スプライシング反応においてスプライシングされていない前駆体RNA及びフリーのイントロン成分を取り除くことが可能になることを実証している。

#### 【0602】

実施例51C:ジストロフィンをコードする環状RNAの産生

ジストロフィンをコードする12kb12,000nt環状RNAを、前駆体RNAのインビトロ転写と、それに続く、残存する直鎖状成分を分解するためのXrn1、Dnase 1、及びRnase Rの混合物を使用する酵素精製によって産生した。図48は

50



、ジストロフィンをコードする環状RNAが成功裏に産生されたことを示している。

【0603】

実施例52

3'イントロンフラグメントとIRESとの間の5'スペーサーは、環状RNA発現を改善する

Jurkat細胞における3'イントロンフラグメントとIRESとの間に異なる5'スペーサーを有する精製されたcircRNAの発現レベルを比較した。簡潔には、250ngの各RNA種での60,000細胞の電ポレーションから24時間後に上清において分泌されたガウシアルシフェラーゼからの発光を測定した。

【0604】

また、Jurkat細胞における3'イントロンフラグメントとIRESとの間に異なる5'スペーサーを有する精製されたcircRNAの安定性を比較した。簡潔には、250ngの各RNA種での60,000細胞の電ポレーションから2日にわたって上清において分泌されたガウシアルシフェラーゼからの発光を測定し、1日目の発現に対して正規化した。

【0605】

結果が図49A及び49Bに示されており、スペーサーの付加が、IRES機能ならびに付加されたスペーサーの配列同一性及び長さの重要性を向上させ得ることを示している。スペーサーは、IRESの直前に付加され、おそらく、IRESがイントロンフラグメントなどの他の構造化エレメントから孤立して折り畳まれることを可能にすることによって機能するということが潜在的な説明である。

【0606】

実施例53

この実施例は、ヤギコブウイルスIRESの5'または3'末端からの欠失スキンを説明する。IRESボダーは通常、十分に特性化されておらず、経験的分析を必要とし、この実施例は、翻訳を誘導するために必要とされるコアの機能的配列を突き止めるために使用され得る。簡潔には、環状RNA構築物を、ガウシアルシフェラーゼをコードする配列に機能可能に連結された切断されたIRESエレメントを用いて生成した。切断されたIRESエレメントは、5'または3'末端から除去された示された長さのヌクレオチド配列を有していた。RNAでの初代ヒトT細胞の電ポレーションから24及び48時間後に上清において分泌されたガウシアルシフェラーゼからの発光を測定した。発現の安定性を、24時間の時点における発現レベルに対する48時間時点における発現レベルの比として計算した。

【0607】

図50に示されているように、IRESの5'末端からの40超のヌクレオチドの欠失は、発現を減少させ、IRES機能を崩壊させた。発現の安定性は、IRESエレメントの切断によって比較的影響を受けなかったが、発現レベルは、IRESの3'末端から141ヌクレオチドの欠失によって実質的に低下した一方で、3'末端からの57または122ヌクレオチドの欠失は、発現レベルに対して良好な影響を及ぼした。

【0608】

6ヌクレオチドプレ開始配列の欠失は、ルシフェラーゼレポーターの発現レベルを低下させることも観察された。その6ヌクレオチド配列の古典的コザック配列(GCCACC)での置き換えは、有意な影響を有さなかったが、少なくとも発現は維持した。

【0609】

実施例54

この実施例は、ヤギコブウイルス(CKV)IRES、パラポウイルスIRES、アポデムスピコルナウイルス(AP)IRES、コブウイルスSZAL6 IRES、クロヒウイルスB(CrVB)IRES、CVB3 IRES、及びSAFV IRESを含む、選択された選択されたIRES配列の修飾(例えば、切断)を記載する。IRESエレメントの配列は、配列番号348~389に提供されている。簡潔には、環状RNA構築

10

20

30

40

50

物を、ガウシアルシフェラーゼをコードする配列に機能可能に連結された切断された I R E S エlementを用いて生成した。H e p G 2 細胞を環状 R N A でトランスフェクトした。上清における発光をトランスフェクションから 2 4 及び 4 8 時間後に評価した。発現の安定性を、2 4 時間の時点における発現レベルに対する 4 8 時間時点における発現レベルの比として計算した。

【 0 6 1 0 】

図 5 1 に示されているように、切断は、I R E S の同一性に応じて多様な効果を有し、これは、I R E S 間でしばしば異なる、翻訳に使用される開始メカニズム及びタンパク質因子に依存し得る。5 ' 及び 3 ' 欠失は、例えば、C K V I R E S との関連で有効に組み合わされ得る。標準的なコザック配列の付加は、いくつかの場合では、有意に発現を改善し ( S A F V における F u l l 対 F u l l + K のように )、または発現を減弱させた ( C K V における 5 d 4 0 / 3 d 1 2 2 対 5 d 4 0 / 3 d 1 2 2 + K のように )。

10

【 0 6 1 1 】

実施例 5 5

この実施例は、変異代替翻訳開始部位を含む、C K - 7 3 9、A P - 7 4 8、及び P V - 7 4 3 I R E S 配列の修飾を記載する。簡潔には、環状 R N A 構築物を、ガウシアルシフェラーゼをコードする配列に機能可能に連結された修飾された I R E S エlementを用いて生成した。R N A での 1 C 1 C 7 細胞のトランスフェクションから 2 4 及び 4 8 時間後に上清において分泌されたガウシアルシフェラーゼからの発光を測定した。

【 0 6 1 2 】

20

C U G は、最も一般的に見られる代替開始部位であるが、他の多くのものも特徴評価した。これらのトリプレットは、開始コドンの前の I R E S スキャニングトラクトに存在し得、正確なポリペプチドの翻訳に影響を及ぼし得る。配列番号 3 7 8 ~ 3 8 0 に提供される I R E S 配列を用いて、4 つの代替開始部位変異を生成した。図 5 2 に示されているように、C K - 7 3 9 I R E S における代替翻訳開始部位の変異は、正確なポリペプチドの翻訳に、いくつかの例では正の、他の例では負の影響を及ぼした。全ての代替翻訳開始部位の変異は、翻訳のレベルを低下させた。

【 0 6 1 3 】

開始コドンの前の 6 ヌクレオチドの代替コザック配列も発現レベルに影響を及ぼし得る。開始コドンの上流の 6 ヌクレオチド配列は、C K - 7 3 9 I R E S 及び「6 n t プレ開始」群における試料番号 1 ~ 5 においてそれぞれ、g T c a c G、a a a g t c、g T c a c G、g t c a t g、g c a a a c、及び a c a a c c であった。図 5 2 に示されているように、開始コドンの前の所定の 6 ヌクレオチド配列の置換は、翻訳に影響を及ぼした。

30

【 0 6 1 4 】

A P - 7 4 8 及び P V - 7 4 3 I R E S 配列における 5 ' 及び 3 ' 末端欠失が発現を減少させたことも観察された。しかしながら、長いスキャニングトラクトを有していた C K - 7 3 9 I R E S では、翻訳は、スキャニングトラクトにおける欠失によって比較的影響を受けなかった。

【 0 6 1 5 】

40

実施例 5 6

この実施例は、5 ' 及び / または 3 ' 非翻訳領域 ( U T R ) を挿入し、I R E S ハイブリッドを生成することによる選択された I R E S 配列の修飾を記載する。簡潔には、環状 R N A 構築物を、ガウシアルシフェラーゼをコードする配列に機能可能に連結された修飾された I R E S エlementを用いて生成した。R N A での H e p G 2 細胞のトランスフェクションから 2 4 及び 4 8 時間後に上清において分泌されたガウシアルシフェラーゼからの発光を測定した。

【 0 6 1 6 】

挿入された U T R を有する I R E S 配列は、配列番号 3 9 0 ~ 4 0 1 に提供されている。図 5 3 に示されているように、I R E S の 3 ' 末端の直後かつ開始コドンの前の 5 ' U T 50

Rの挿入は、ヤギコブウイルス（CK）IRESからの翻訳をわずかに増加させたが、いくつかの例では、サリウイルスSZ1 IRESからの翻訳を阻害した。終止カセットの直後の3' UTRの挿入は、いずれのIRES配列にも影響を有さなかった。

【0617】

ハイブリッドCK IRES配列は、配列番号390～401に提供されている。CK IRESをベースとして使用し、CK IRESの特定の領域を、他のIRES配列、例えば、SZ1及びAV（アイチウイルス）からの同様の外観の構造で置き換えた。図53に示されているように、所定のハイブリッド合成IRES配列は機能的であり、ハイブリッドIRESが、同様の予測される構造を示す異なるIRES配列に由来する部分を使用して構築され得る一方で、これらの構造の欠失はIRES機能を完全に停止させたことを示している。

10

【0618】

実施例57

この実施例は、終止コドンまたはカセットバリエーションを導入することによる環状RNAの修飾を記載する。簡潔には、環状RNA構築物を、ガウシアルシフェラーゼをコードする配列に機能可能に連結されたIRESエレメントと、それに続く可変終止コドンカセットを用いて生成し、その可変終止コドンカセットは、各フレームにおける終止コドン及びガウシアルシフェラーゼをコードする配列のリーディングフレームにおける2つの終始コドンを含んでいた。1C1C7細胞を環状RNAでトランスフェクトした。上清における発光をトランスフェクションから24及び48時間後に評価した。

20

【0619】

終止コドンカセットの配列は、配列番号406～412に示されている。図54に示されているように、所定の終止コドンカセットは、発現レベルを改善したが、それらは、発現安定性に対してほとんど影響を有さなかった。特に、2つのフレーム1（ガウシアルシフェラーゼをコードする配列のリーディングフレーム）終止コドン（1つ目はTAAである）と、それに続くフレーム2終止コドン及びフレーム3終止コドンを有する終止カセットは、機能的翻訳を促進するのに有効である。

【0620】

実施例58

この実施例は、5' UTRバリエーション挿入することによる環状RNAの修飾を記載する。簡潔には、環状RNA構築物を、IRESの3'末端と開始コドンとの間に挿入された5' UTRバリエーションを有するIRESエレメントを用いて生成した（IRESは、ガウシアルシフェラーゼをコードする配列に機能可能に連結されている）。1C1C7細胞を環状RNAでトランスフェクトした。上清における発光をトランスフェクションから24及び48時間後に評価した。

30

【0621】

5' UTRバリエーションの配列は、配列番号402～405に示されている。図55に示されているように、標準コザック配列（UTR4）を有するCK IRESは、36ヌクレオチドの非構造化/低GCスペーサー配列が付加された場合（UTR2）、より有効であり、GCリッチのコザック配列が、コアのIRESの折り畳みと干渉し得ることを示唆している。コザック配列を有するより高いGC/構造化スペーサーを使用すると、同じ利益を示さず（UTR3）、これはおそらく、スペーサー自体によるIRESの折り畳みとの干渉に起因する。コザック配列のgTc a c Gへの変異（UTR1）は、スペーサーを必要とせずにコザック+スペーサー代替物と同じレベルまで翻訳を向上させた。

40

【0622】

実施例59

この実施例は、発現レベルに対する環状RNAにおけるmiRNA標的部位の影響を記載する。簡潔には、環状RNA構築物を、ヒトエリスロポエチン（hEPO）をコードする配列に機能可能に連結されたIRESエレメントを用いて生成し、2つのタンデムmiR-122標的部位が構築物に挿入された。miR-122を発現するHuh7細胞に環

50

状RNAをトランスフェクトした。上清中のhEPO発現を、トランスフェクションの24時間後及び48時間後にサンドイッチELISAによって評価した。

【0623】

図56に示されているように、hEPO発現レベルは、miR-122標的部位が環状RNAに挿入された場合に阻止された。この結果は、環状RNAからの発現がmiRNAによって制御され得ることを実証している。このように、細胞タイプまたは組織特異的発現は、組換えタンパク質の発現が望ましくない細胞タイプにおいて発現するmiRNAの標的部位を組み込むことによって達成され得る。

【0624】

実施例60

この実施例は、インビトロでのLNPによるヒト腫瘍細胞のトランスフェクションを示す。SupT1細胞(ヒトT細胞腫瘍株)及びMV4-11細胞(ヒトマクロファージ腫瘍株)を、96ウェルプレート中で一晚、それぞれ、100,000細胞/ウェル及び100,000細胞/ウェルでプレATINGした。次いで、ホタルルシフェラーゼ(FLuc)をコードするcircRNAを含有するLNPを、200ngのRNA/ウェルで細胞に添加した。24時間インキュベーションした後、製造業者の指示に従ってBright-Gloルシフェラーゼアッセイシステム(Promega)を使用して発光を定量化し、LNPで処理していない細胞からのバックグラウンド発光を減じた。図57は、測定されたホタル発光を定量化し、脂質10a-27(10a-27(4.5D)LNP、実施例70を参照されたい)または脂質10a-26(10a-26(4.5D)LNP、実施例70を参照されたい)を含むLNPが、インビトロでヒトT細胞及びマクロファージ腫瘍株の両方においてcircRNAをトランスフェクション及び発現することができることを示す。10a-27(4.5D)LNPは、10a-26(4.5D)LNPよりも高い発光をもたらし、ヒト腫瘍細胞へのLNPのトランスフェクションのレベルが製剤によって影響され得ることを示した。

【0625】

実施例61

この実施例は、インビトロでの初代ヒト活性化T細胞のトランスフェクションを示す。独立したドナーからの初代ヒトT細胞をaCD3/aCD28で刺激し、ヒト血清及びIL-2の存在下で6日間増殖させた。次いで、100,000個の細胞を、96ウェルプレートにプレATINGし、ホタルルシフェラーゼ(FLuc)をコードするcircRNAを含有するLNPを、アポリポタンパク質E3(ApoE3)の有無にかかわらず、200ng RNA/ウェルで細胞に添加した。24時間インキュベーションした後、製造業者の指示に従ってBright-Gloルシフェラーゼアッセイシステム(Promega)を使用して発光を定量化し、LNPで処理していない細胞からのバックグラウンド発光を減じた。図58は、4つの独立したドナーから測定されたホタル発光を示し、試験した全てのLNPがインビトロで初代ヒトT細胞をトランスフェクトしたことを実証する。脂質10a-27を含有するLNPは、概して、脂質10a-26を含有するLNPよりも高い発光を生じた。更に、ApoE3の添加は、一般に、10a-27(4.5D)及び10a-26(4.5D)(それぞれ、3.1倍及び2.6倍)と比較して、10a-27(5.7A)及び10a-26(5.7A)(それぞれ、4人のドナーから4.4倍及び9.3倍の平均)のルシフェラーゼの発現を、より増加させた。これは、ヘルパー脂質、PEG脂質、及びイオン化可能脂質：リン酸比が、全て、同じイオン化可能脂質で作製された異なる製剤のApoE依存性に寄与することを示唆している。(LNP製剤手順、例えば、10a-27(5.7A)、10a-26(5.7A)、10a-27(4.5D)、及び10a-26(4.5D)LNPについては、実施例70を参照されたい。)

【0626】

実施例62

この実施例は、LNPの異なる尾部の化学的性質が、T細胞への異なる取り込み機構を

10

20

30

40

50

もたらしことを示す。circRNAを発現するヒトT細胞のパーセントを定量化するために、eGFP circRNAを含有するLNPを、ApoE3を伴ってまたは伴わずに200ng RNA/ウェルで活性化された初代ヒトT細胞（実施例61において上記されるように調製した）に添加した。24時間インキュベーションした後、細胞をフローサイトメトリーによって分析し、生細胞（GFP+T細胞）のパーセンテージを定量化した。図59は、2人の独立したドナーについてのGFP%+T細胞をグラフ化し、細胞の5~10%が、脂質10a-27を含有する（containing）LNPについてのGFP+（10a-27（4.5D）LNP、実施例70を参照されたい）であり、脂質10a-46を含有する（containing）LNPについてのGFP+（10a-46（5.7A）LNP、実施例70を参照されたい）である。ApoE3添加は、10a-27（4.5D）LNPについてのトランスフェクションの増加をもたらしたが、10a-46（5.7A）LNPについてのトランスフェクションの増加をもたらさなかったようであり、脂質10a-27と10a-46との間の異なる尾部の化学的性質が、T細胞への異なる取り込み機構を仲介し得ることを示唆している。

10

【0627】

実施例63

この実施例は、CreレポーターマウスモデルにおけるCreの免疫細胞発現を記載する。

【0628】

Ai9マウス（B6.Cg-Gt(ROSA)26Sortm9(CAG-tdTomato)Hze/J、雌、6~8週齢、n=3/群）に、0.5mg/kgのCre circRNA LNPまたはPBSを静脈内に注射した。Ai9マウスは、Cre組換え時に蛍光レポーターtdTomatoを転写及び翻訳し、tdTomato+である細胞がCre circRNAで成功裏にトランスフェクトされたことを意味する。48時間後、マウスを殺処分し、その脾臓を採取し、単一細胞懸濁液に手で処理した。脾細胞は、死細胞（LiveDead Fixable Aqua, Thermo）を染色し、抗マウス抗体（TCR-B鎖、BV421、H57-597；CD45、BV711、30-F11；CD11b、BV785、ICRF44；NKp46、AF647、29A1.4；CD19、APC/750、6D5；TruStain FcX、93；全ての抗体はBiolegend製）で1:200の比率で染色した。フローサイトメトリーを、Attune NxTフローサイトメーター（Thermo）を使用して実施した。

20

30

【0629】

脾臓骨髄細胞（CD11b+）、B細胞（CD19+）、及びT細胞（TCR-B+）におけるtdTomato+細胞のパーセンテージを、図60に示す。脂質10a-27及び脂質10a-46は、それらの尾部の化学的性質によってのみ異なり、脂質10a-27で作製された製剤は、脂質10a-46で作製されたものよりも有意に多くの脾臓免疫細胞をトランスフェクトする。加えて、Cre circRNAで製剤化された10a-27（4.5D）LNP（実施例70を参照されたい）は、Cre直鎖状mRNAで製剤化されたものよりも約2倍多くのT細胞にトランスフェクトされており、このことは、Cre circRNAが、直鎖状mRNAと比較して、脾臓T細胞におけるタンパク質発現の改善をもたらし得ることを示唆している。

40

【0630】

（表17）LNPの特徴評価

製剤	Z平均 (nm)	PDI	RNA封入化効率 (%)
10a-27 (4.5D)、研究1	65	0.07	96
10a-26 (4.5D)、研究1	74	0.06	94
10a-27 (4.5D)、mCreeを用いた、研究1	75	0.05	93
10a-46 (5.7A)、研究2	86	0.01	94

10

## 【0631】

## 実施例64

この実施例は、野生型マウスにおけるmOX40L circRNAの免疫細胞発現を示す。

## 【0632】

C57BL/6マウス(雌、6~8週齢、n=3または4/群)に、0.5mg/kgのmOX40L circRNA LNPまたはPBSを静脈内に注射した。24時間後、マウスを殺処分し、その脾臓を採取し、単一細胞懸濁液に手動で処理した。脾細胞は、死細胞(LiveDead Fixable Aqua, Thermo)を染色し、抗マウス抗体(TCR-B鎖、PacBlue、H57-597; CD11b、FITC、ICRF44; B220、PE、RA3-6B2; CD45、PerCP、30-F11; mOX40L、AF647、RM134L; NK1.1、APC/750、PK136; TruStain FcX、93; 全ての抗体はBiolegend製)で1:200の比率で染色した。フローサイトメトリーを、Attune NxTフローサイトメーター(Thermo)を使用して実施した。

20

## 【0633】

脾骨髄(CD11b+)、T細胞(TCR-B+)、及びNK細胞(NK1.1+)におけるmOX40L+細胞のパーセントを、図61に示す。注目すべきことに、異なる緩衝液(低張性PBS、等張性PBS、及び等張性TBS)中に静脈内に注射した同じ製剤間で、有意に異なるトランスフェクション効率が観察される。低張性PBSにおける10a-27 4.5D LNPは、脾臓における約14%の骨髄細胞のトランスフェクション、6%のT細胞のトランスフェクション、及び21%のNK細胞のトランスフェクションをもたらす。等張緩衝液中に注射した製剤のうち、10a-27 DSPC 5.7A LNPは、脾臓において骨髄、T細胞、及びNK細胞のトランスフェクションを示す(それぞれ、9%、3%、及び8%)。(LNP製剤手順、例えば、10a-27(4.5D) LNP及び10a-27 DSPC(5.7A) LNPについては、実施例70を参照されたい。)

30

40

## 【0634】

(表18) LNPの特徴評価

50

製剤	Z平均 (nm)	PDI	RNA封入化効率 (%)
10a-27 (4.5D)	63	0.02	93
10a-26 (4.5D)	67	0.07	94
10a-27 DSPC (5.7A)	82	0.05	96

10

## 【0635】

## 実施例65

この実施例は、野生型マウスにおけるmOX40L circRNA-LNPの単回用量漸増を示す。

## 【0636】

57BL/6マウス(雌、6~8週齢、n=3/群)に、1mg/kgまたは3mg/kgのmOX40L circRNA LNPまたは緩衝液対照を静脈内に注射した。24時間後、マウスを殺処分し、その脾臓を採取し、単一細胞懸濁液に手動で処理した。脾細胞は、死細胞(LiveDead Fixable Blue, Thermo)を染色し、抗マウス抗体(TCR-B鎖、BV421、H57-597; CD19、BV605、6D5; CD45、BV711、30-F11; CD11b、BV785、ICRF44; CD11c、FITC、N418; CD8a、PerCP、53-6.7; mOX40L、PE、RM134L; NKp46、AF647、29A1.4; CD4、APC/750、GK1.5; TruStain FcX、93; 全ての抗体はBiolegend製)で1:200の比率で染色した。フローサイトメトリーを、BD FACSSymphonyフローサイトメーターを使用して実施した。

20

## 【0637】

脾臓T細胞(全てのTCR-B+)、CD4+T細胞(TCR-B+、CD4+)、CD8+T細胞(TCR-B+、CD8a+)、B細胞(CD19+)、NK細胞(NKp46+)、樹状細胞(CD11c+)、及び他の骨髄細胞(CD11b+、CD11c-)におけるmOX40L+細胞のパーセントを、図62A及び図62Bに示し、図62Cに示した24時間後の対応するマウス重量変化を伴う。免疫細胞サブセットトランスフェクションの用量依存的増加は、1mg/kg及び3mg/kgにわたって、10a-27(4.5D)LNP 1xPBS群を除き、全ての群において観察される。3mg/kg用量において、3つの異なるLNP(TBS中の10a-27(4.5D)、PBS中の10a-26(4.5D)、及びTBS中の10a-27 DSPC(5.7A); 製剤手順については、実施例70を参照されたい)は、脾臓T細胞において10~20%のmOX40Lトランスフェクションを達成し、CD4+及びCD8+サブセット間で同様のトランスフェクション率が観察される。これらの3つの製剤はまた、3mg/kgで脾臓における約20%のB細胞、60~70%の樹状細胞、60~70%のNK細胞、及び30~40%の他の骨髄系細胞mOX40Lトランスフェクションをもたらす。これらの3つの製剤は、報告された臨床観察なしに、3mg/kgの単回用量で24時間でマウスのわずかな(0~3%)体重減少をもたらす。

30

40

## 【0638】

(表19)LNPの特徴評価

50

製剤	Z平均 (nm)	PDI	RNA封入化効率 (%)
10a-27 (4.5D)	76	0.06	91
10a-26 (4.5D)	67	0.01	88
10a-27 DSPC (5.7A)	77	0.01	93

10

## 【0639】

## 実施例66

この実施例は、マウスにおける circRNA-LNP CAR 仲介性 B 細胞の枯渇を示す。

## 【0640】

0日目、2日目、5日目、7日目、及び9日目に、C57BL/6マウス(雌、6~8週齢、n=5/群)に、0.5mg/kgのCD19-CAR circRNA LNP または対照 FLuc circRNA LNP を静脈内に注射した。-1日目、1日目、8日目、及び12日目に、顎下腺出血を行い、血液を採取した。30µLの血液を、ACK溶解緩衝液で溶解し、MACS緩衝液で洗浄して、免疫細胞を単離した。12日目に、マウスを殺処分し、その脾臓を採取し、単一細胞懸濁液に手で処理した。血液及び脾臓におけるB細胞の頻度を評価するために、これらの単一細胞懸濁液は、死細胞(Live Dead Fixable Aqua, Thermo)を染色し、抗マウス抗体(TCR-B鎖、PacBlue、H57-597; CD11b、FITC、ICRF44; B220、PE、RA3-6B2; CD45、PerCP、30-F11; TruStain FcX、93; 全ての抗体はBiolegend製)で1:200の比率で染色した。フローサイトメトリーを、Attune Nextフローサイトメーター(Thermo)を使用して実施した。

20

30

## 【0641】

図63Aは、生存するCD45+免疫細胞のB220+B細胞の割合によって定義される、本試験で観察されるB細胞の枯渇を定量化する。aCD19-CAR circRNA LNP群におけるB細胞の枯渇を、8日目及び12日目(血液用)及び12日目(脾臓用)におけるそれぞれのFLuc circRNA LNP対照と比較した。血液において、CD19-CAR 10a-27(4.5D)及び10a-26(4.5D)LNPは、FLuc対照と比較して、8日目に生存するCD45+のB220+(%)において、それぞれ、約28%及び17%の低下をもたらした。脾臓において、CD19-CAR 10a-27(4.5D)及び10a-26(4.5D)LNPは、図63Bに示されるように、FLuc対照と比較して、12日目に生存するCD45+のB220+(%)において、約5%及び9%の低下をもたらした。全体で、これらの結果は、CAR 仲介性B細胞の枯渇が、脂質10a-27(4.5D)及び脂質10a-26(4.5D)におけるCD19-CAR circRNA LNPで処理したマウスにおいて生じていることを示唆している。

40

## 【0642】

加えて、図63Cは、この試験におけるマウスの体重増加パーセントを示す。10a-27 4.5Dまたは10a-26 4.5D LNPで処置したマウス(9日間にわたって5x0.5mg/kg)からの平均的な有意な体重減少はなく、これらのLNPがこの用量及びスケジュールでマウスにおいて良好に耐容性であり得ることを示唆した。

50



## 【 0 6 4 3 】

(表 2 0 ) L N P の 特 徴 評 価

製剤	Z平均 (nm)	PDI	RNA封入化効率 (%)
1 0 a - 2 7 ( 4 . 5 D ) 、 o L u c	6 5	0 . 0 3	9 3
1 0 a - 2 7 ( 4 . 5 D ) 、 o a C D 1 9 - C A R	7 4	0 . 0 2	9 6
1 0 a - 2 6 ( 4 . 5 D ) 、 o L u c	7 1	0 . 0 4	9 1
1 0 a - 2 6 、 ( 4 . 5 D ) 、 o a C D 1 9 - C A R	7 1	0 . 0 4	9 3

10

20

## 【 0 6 4 4 】

## 実施例 6 7

抗 C D 1 9 C A R を 含 む L N P 及 び 環 状 R N A 構 築 物 は、イ ン ビ ボ で 血 液 及 び 脾 臓 に お け る B 細 胞 を 低 減 す る。

抗 C D 1 9 C A R 発 現 を コー ド す る 環 状 R N A 構 築 物 を、上 述 し た よ う に 脂 質 ナ ノ 粒 子 内 に 封 入 し た。比 較 の た め、ル シ フ ェ ラ ー ゼ 発 現 を コー ド す る 環 状 R N A を 別 の 脂 質 ナ ノ 粒 子 内 に 封 入 し た。

## 【 0 6 4 5 】

6 ~ 8 週 齢 の C 5 7 B L / 6 マ ウ ス に、1 日 お き に い ず れ か の L N P 溶 液 を 注 射 し、各 マ ウ ス 内 に 合 計 4 回 の L N P 注 射 を 行 っ た。最 後 の L N P 注 射 か ら 2 4 時 間 後、マ ウ ス の 脾 臓 及 び 血 液 を 採 取 し、染 色 し、フ ロー サ イ ト メ ト リ ー を 介 し て 分 析 し た。図 6 4 A 及 び 図 6 4 B に 示 さ れ る よ う に、抗 C D 1 9 C A R を コー ド す る L N P - 環 状 R N A 構 築 物 を 含 む マ ウ ス は、ル シ フ ェ ラ ー ゼ を コー ド す る L N P - 環 状 R N A で 処 理 し た マ ウ ス と 比 較 し て、末 梢 血 及 び 脾 臓 に お け る C D 1 9 + B 細 胞 の 統 計 的 に 有 意 な 減 少 を も た ら し た。

30

## 【 0 6 4 6 】

## 実施例 6 8

C A R を コー ド す る 環 状 R N A 内 に 含 ま れ る I R E S 配 列 は、C A R 発 現 及 び T 細 胞 の 細 胞 毒 性 を 改 善 す る。

活 性 化 さ れ た ネ ズ ミ T 細 胞 を、固 有 の I R E S 及 び マ ウ ス 抗 C D 1 9 1 D 3 C A R 発 現 配 列 を 含 む 2 0 0 n g の 環 状 R N A 構 築 物 で エ レ ク ト ロ ポ レ シ ョ ン し た。こ れ ら の 構 築 物 に 含 ま れ る I R E S は、全 体 的 ま た は 部 分 的 に、ヤ ギ コ ブ ウ イ ル ス、ア ポ デ ム ス ピ コ ル ナ ウ イ ル ス、パ ラ ボ ウ イ ル ス、ま た は サ リ ウ イ ル ス の い ず れ か に 由 来 し た。ヤ ギ コ ブ ウ イ ル ス 由 来 I R E S を 更 に コド ン 最 適 化 し た。対 照 と し て、I R E S を 有 し な い 野 生 型 ゼ ー タ マ ウ ス C A R を 含 む 環 状 R N A を 比 較 の た め に 使 用 し た。T 細 胞 は、エ レ ク ト ロ ポ レ シ ョ ン の 2 4 時 間 後 に C D - 1 9 C A R を 染 色 し て 表 面 発 現 を 評 価 し、次 い で A 2 0 F l u c 標 的 細 胞 と 共 培 養 し た。次 い で、T 細 胞 を 標 的 細 胞 と 共 培 養 し た 2 4 時 間 後 の F l u c + A 2 0 細 胞 の 細 胞 傷 害 性 殺 傷 に つ い て ア ッ セ イ を 評 価 し た。

40

## 【 0 6 4 7 】

図 6 5 A、6 5 B、6 5 C、及 び 6 6 に 見 ら れ る よ う に、固 有 の I R E S は、T 細 胞 が C A R タ ン パ ク 質 を 発 現 す る 頻 度 及 び 細 胞 の 表 面 で の C A R 発 現 の レ ベ ル を 増 加 さ せ る こ

50

とができた。細胞表面でのCARタンパク質の発現頻度及びCAR発現レベルの増加は、改善された抗腫瘍応答をもたらす。

【0648】

#### 実施例69

初代ヒトT細胞において環状RNA構築物から発現した細胞質及び表面タンパク質。

環状RNA構築物は、蛍光細胞質レポーターまたは表面抗原レポーターのいずれかをコードする配列が含まれた。蛍光レポーターには、緑色蛍光タンパク質、mCitrine、mWasabi、Tsapphireが含まれた。表面レポーターには、CD52及びThy1.1<sup>bio</sup>が含まれた。初代ヒトT細胞を抗CD3/抗CD28抗体で活性化し、レポーター配列を含む環状RNAの活性化の6日後にエレクトロポレーションした。T細胞を収集し、エレクトロポレーションの24時間後にフローサイトメトリーで分析した。表面抗原は、市販の抗体（例えば、Biolegend、Miltenyi、及びBD）で染色した。

10

【0649】

図67A及び図67Bに見られるように、細胞質及び表面タンパク質は、初代ヒトT細胞内のタンパク質をコードする環状RNAから発現することができる。

【0650】

#### 実施例70

固有のIRES配列を含有する環状RNAは、直鎖状mRNAよりも改善された翻訳発現を有する。

20

環状RNA構築物は、ホタルルシフェラーゼ(FLuc)の発現配列とともに、固有のIRESが含まれた。

【0651】

2人のドナー由来のヒトT細胞を濃縮し、抗CD3/抗CD28抗体で刺激した。数日間の増殖後、活性化T細胞を採取し、等モルのmRNAまたはFLucペイロードを発現する環状RNAのいずれかでエレクトロポレーションした。ヤギコブウイルス、アポデムスピコルナウイルス、及びパラボウイルスに由来するものを含む様々なIRES配列を試験し、7日間にわたるペイロード発現レベル及び耐久性を評価した。7日間にわたって、T細胞をPromega Bright-gloで溶解して、生物発光について評価した。

【0652】

30

図68C、68D、68E、68F、及び68Gに示されるように、環状RNA内のIRESの存在は、細胞質タンパク質の翻訳及び発現を数桁増加させることができ、直鎖状mRNAと比較して発現を改善することができる。これは、複数のヒトT細胞ドナーにわたって一致することが見出された。

【0653】

#### 実施例71

実施例71A：抗CD19をコードするLNP環状RNAは、K562細胞のヒトT細胞死を仲介する。

環状RNA構築物は、抗CD19抗体をコードする配列が含まれた。次に、環状RNA構築物を脂質ナノ粒子(LNP)内に封入した。

40

【0654】

ヒトT細胞を抗CD3/抗CD28で刺激し、例えば、最大6日間増殖させた。6日目に、LNP環状RNA及びApoe3(1µg/mL)をT細胞と共培養してトランスフェクションを仲介した。24時間後、Fluc+K562細胞を、抗CD19抗体をコードする200ngの環状RNAでエレクトロポレーションした後に7日目に共培養した。共培養から48時間後、アッセイをFluc発現を通じてK562細胞のCAR発現及び細胞傷害性殺傷について評価した。

【0655】

図69A及び図69Bに示されているように、T細胞へのインビトロでのCARのLNP仲介送達からの抗CD19 CARのT細胞発現、及び操作K562細胞において特異

50

的な抗原依存的な方法で腫瘍細胞を溶解するその能力が存在する。

【0656】

実施例71B：抗BCMA抗体をコードするLNP環状RNAは、K562細胞のヒトT細胞死を仲介する。

環状RNA構築物は、抗BCMA抗体をコードする配列が含まれた。次に、環状RNA構築物を脂質ナノ粒子(LNP)内に封入した。

【0657】

ヒトT細胞を抗CD3/抗CD28で刺激し、例えば、最大6日間増殖させた。6日目に、LNP環状RNA及びApoE3(1 $\mu$ g/mL)をT細胞と共培養してトランスフェクションを仲介した。24時間後、Fluc+K562細胞を、抗BCMA抗体をコードする200ngの環状RNAでエレクトロポレーションした後に7日目に共培養した。共培養から48時間後、アッセイをFluc発現を通じてK562細胞のCAR発現及び細胞傷害性殺傷について評価した。

10

【0658】

図69Bに示されているように、T細胞へのインビトロでのCARのLNP仲介送達からの抗BCMA CARのT細胞発現、及び操作K562細胞において特異的な抗原依存的な方法で腫瘍細胞を溶解するその能力が存在する。

【0659】

実施例72

抗CD19 CAR T細胞は、インビトロで抗腫瘍活性を示す。

20

ヒトT細胞を抗CD3/抗CD28で活性化し、200ngの抗CD19 CAR発現環状RNAで1回エレクトロポレーションした。エレクトロポレーションしたT細胞を、Fluc+Nalm6標的細胞及び非標的Fluc+K562細胞と共培養して、CAR仲介死滅を評価した。共培養の24時間後、T細胞を溶解し、標的及び非標的細胞による残存Fluc発現を調査し、合計8日間にわたる発現及び発現の安定性を評価した。

【0660】

図70A及び70Bに示されるように、T細胞は、抗原依存的に特異的に環状RNA CAR構築物を発現する。結果は、CARをコードする直鎖状mRNAと比較して、CARをコードする環状RNAの細胞傷害性の改善、及び機能的な表面受容体の送達も示す。

【0661】

30

実施例73

ApoE3を介した環状RNAの効果的なLNPトランスフェクション

ヒトT細胞を抗CD3/抗CD28で刺激し、例えば、最大6日間増殖させた。6日目に、脂質ナノ粒子(LNP)、及びApoE3(1 $\mu$ g/mL)を含むまたは含まずに環状RNAを発現する緑色蛍光タンパク質溶液をT細胞と共培養した。24時間後、T細胞は、生/死T細胞を染色し、生T細胞をフローサイトメーターでGFP発現について分析した。

【0662】

図71A、71B、71C、71D、及び71Eに示されるように、効率的なLNPトランスフェクションは、活性化されたT細胞上でApoE3によって仲介され、その後に有意なペイロード発現が続き得る。これらの結果は、複数のドナーにわたって示された。

40

【0663】

実施例74

実施例74A：脂質ナノ粒子製剤手順

Zetasizer Nano ZS(Malvern Instruments Ltd, Malvern, Worcestershire, UK)を使用して、輸送ビヒクル組成物の粒径、多分散性指数(PDI)及びゼータ電位を、粒径の決定においては1 $\times$ PBS、及びゼータ電位の決定においては15mMのPBSで決定することができる。

【0664】

紫外可視分光法を使用して、輸送ビヒクル組成物中の治療剤及び/または予防剤(例え

50

ば、RNA)の濃度を決定することができる。1×PBSに希釈した100μLの製剤を4:1(v/v)のメタノール及びクロロホルムの混合物900μLに加える。混合後、溶液の吸光度スペクトルを、例えば、DU 800分光光度計(Beckman Coulter, Beckman Coulter, Inc., Brea, CA)で、230nm~330nmで記録する。輸送ビヒクル組成物中の治療剤及び/または予防剤の濃度は、その組成物中に使用されている治療剤及び/または予防剤の吸光係数、ならびに、波長、例えば、260nmでの吸光度及び、波長、例えば、330nmでのベースライン値間の差に基づいて計算することができる。

#### 【0665】

RNAを含む輸送ビヒクル組成物の場合、QUANT-IT(商標)RIBOGREEN(登録商標)RNAアッセイ(Invitrogen Corporation Carlsbad, CA)を使用して、輸送ビヒクル組成物によるRNAの封入を評価することができる。試料を、TE緩衝液(10mMトリス-HCl、1mMEDTA、pH7.5)中でおよそ5μg/mLまたは1μg/mLの濃度まで希釈する。50μLの希釈試料を、ポリスチレン96ウェルプレートに移し、50μLのTE緩衝液または50μLの2~4%Triton X-100溶液のいずれかをウェルに加える。プレートを、37の温度にて15分間インキュベートした。RIBOGREEN(登録商標)試薬を、1:100または1:200でTE緩衝液に希釈し、100μLのこの溶液を各ウェルに加える。蛍光強度は、蛍光プレートリーダー(Wallac Victor 1420 Multilablel Counter; Perkin Elmer, Waltham, MA)を使用して、励起波長、例えば、約480nm及び発光波長、例えば、約520nmにて測定することができる。試薬ブランクの蛍光値を試料の各値から引き、遊離RNAのパーセンテージを、インタクトな試料(Triton X-100を添加しない)の蛍光強度を破壊試料(Triton X-100の添加によって生じる)の蛍光値で除することで決定する。

#### 【0666】

実施例74B:62:4:33:1のイオン化可能脂質:DOPE:コレステロール:DSPE-PEG(2000)製剤比におけるRNAカプセル化、全フラックス、及びインビトロでの発現パーセント。

脂質ナノ粒子は、脂質10a-27、10a-26、10a-46、または10a-45を用いて、62:4:33:1モル%のイオン化可能脂質:DOPE:コレステロール:DSPE-PEG(2000)製剤比で製剤化し、RNA分子を、4.5の脂質-窒素-リン酸塩比(N:P)でカプセル化した。RNAの発現は、全ての製剤に存在した。それぞれ、図72A及び72Bに示すように、脾臓内に、より大きな総フラックス及び発現パーセントがあった。

10

20

30

40

50

製剤	イオン化可能脂質	ヘルパー脂質	PEG-脂質	イオン化可能脂質:ヘルパー脂質:コレステロール:PEG 脂質(モル%)	Z 平均 (nm)	PDI	RNA 封入化効率(%)
10a-27(4.5D)	脂質 10a-27	DOPE	DSPE-PEG(2000)	62:4:33:1	71	0.02	94
10a-26(4.5D)	脂質 10a-26	DOPE	DSPE-PEG(2000)	62:4:33:1	71	0.04	92
10a-46(4.5D)	脂質 10a-26	DOPE	DSPE-PEG(2000)	62:4:33:1	110	0.1	93
10a-45(4.5D)	脂質 10a-25	DOPE	DSPE-PEG(2000)	62:4:33:1	157	0.13	83

10

## 【 0 6 6 7 】

20

実施例 7 4 C : 5 0 : 1 0 : 3 8 . 5 : 1 . 5 のイオン化可能脂質 : D O P E : コレステロール : D M G - P E G ( 2 0 0 0 ) 製剤比の RNA カプセル化、総フラックス、及びインビトロでの発現パーセント。

脂質ナノ粒子は、脂質 1 0 a - 4 6 または 1 0 a - 4 5 を用いて、5 0 : 1 0 : 3 8 . 5 : 1 . 5 モル%のイオン化可能脂質 : D O P E : コレステロール : D M G - P E G ( 2 0 0 0 ) 製剤比で製剤化し、RNA 分子を、5 . 7 の脂質 - 窒素 - リン酸塩比 ( N : P ) でカプセル化した。RNA の発現は、全ての製剤に存在した。それぞれ、図 7 2 C 及び 7 2 D に示すように、脾臓内に、より大きな総フラックス及び発現パーセントがあった。

製剤	イオン化可能脂質	ヘルパー脂質	PEG 脂質	イオン化可能脂質:DOPE:コレステロール:PEG 脂質(モル%)	Z 平均 (nm)	PDI	RNA 封入化効率(%)
10a-45(5.7A)	脂質 10a-45	DOPE	DMG-PEG(2000)	50:10:38.5:1.5	74	0.04	95
10a-46(5.7A)	脂質 10a-46	DOPE	DMG-PEG(2000)	50:10:38.5:1.5	84	0.04	96

30

## 【 0 6 6 8 】

40

実施例 7 4 D : 5 0 : 1 0 : 3 8 . 5 : 1 . 5 のイオン化可能脂質 : D O P E : コレステロール : D M G - P E G ( 2 0 0 0 ) 製剤比または 3 5 : 1 6 : 4 6 . 2 . 5 のイオン化可能脂質 : D S P C : コレステロール : C 1 4 - P E G ( 2 0 0 0 ) 製剤比の RNA カプセル化、総フラックス、及びインビトロでの発現パーセント。

脂質ナノ粒子は、脂質 1 0 a - 4 5 または 1 0 a - 4 6 を用いて、5 0 : 1 0 : 3 8 . 5 : 1 . 5 モル%のイオン化可能脂質 : D O P E : コレステロール : D M G - P E G ( 2 0 0 0 ) 製剤比または 3 5 : 1 6 : 4 6 . 2 . 5 モル%のイオン化可能脂質 : D S P C : コレステロール : C 1 4 - P E G ( 2 0 0 0 ) 製剤比で製剤化され、RNA 分子を、5 .

50

7 または 4 . 5 の脂質 - 窒素 - リン酸塩比 ( N : P ) でカプセル化した。RNA の発現は、全ての製剤に存在した。それぞれ、図 7 2 E 及び 7 2 F に示すように、脾臓内に、より大きな総フラックス及び発現パーセントがあった。

製剤	イオン化可能脂質	ヘルパー脂質	PEG-脂質	イオン化可能脂質:ヘルパー脂質:コレステロール:PEG 脂質(モル%)	Z 平均 (nm)	PDI	RNA 封入化効率(%)
10a-45 DSPC(5.7E)	脂質 10a-45	DSPC	C <sub>14</sub> - PEG(2000)	35:16:46.2.5	56	0.22	94
10a-46 DSPC(5.7E)	脂質 10a-46	DSPC	C <sub>14</sub> - PEG(2000)	35:16:46.2.5	68	0.02	95
10a-46(4.5A)	脂質 10a-46	DOPE	DMG- PEG(2000)	50:10:38.5:1.5	91	0.13	93
10a-46(5.7A)	脂質 10a-46	DOPE	DMG- PEG(2000)	50:10:38.5:1.5	76	0.06	93

10

## 【 0 6 6 9 】

20

実施例 7 4 E : 6 2 : 4 : 3 3 : 1 のイオン化可能脂質 : D O P E : コレステロール : D S P E - P E G ( 2 0 0 0 ) 製剤比、または 5 0 : 1 0 : 3 8 . 5 : 1 . 5 のイオン化可能脂質 : D S P C : コレステロール : D M G - P E G ( 2 0 0 0 ) 製剤比の RNA カプセル化、総フラックス、及びインビトロでの発現パーセント。

脂質ナノ粒子は、脂質 1 0 a - 2 6 または 1 0 a - 2 7 を用いて、6 2 : 4 : 3 3 : 1 モル%のイオン化可能脂質 : D O P E : コレステロール : D S P E - P E G ( 2 0 0 0 ) 製剤比で ( RNA 分子を 4 . 5 の N : P 比でカプセル化する )、または 5 0 : 1 0 : 3 8 . 5 : 1 . 5 モル%のイオン化可能脂質 : D S P C : コレステロール : D M G - P E G ( 2 0 0 0 ) 製剤比で ( RNA 分子を 5 . 7 の N : P 比でカプセル化する ) 製剤化した。RNA の発現は、全ての製剤に存在した。それぞれ、図 7 2 G 及び 7 2 H に示すように、脾臓内に、より大きな総フラックス及び発現パーセントがあった。

30

製剤	イオン化可能脂質	ヘルパー脂質	PEG 脂質	イオン化可能脂質:ヘルパー脂質:コレステロール:PEG 脂質(モル%)	Z 平均 (nm)	PDI	封入化効率(EE)(%)
10a-27(4.5D)	脂質 10a-27	DOPE	DSPE- PEG(2000)	62:4:33:1	82	0.06	94
10a-26(4.5D)	脂質 10a-26	DOPE	DSPE- PEG(2000)	62:4:33:1	68	0.08	91
10a-27 DSPC(5.7A)	脂質 10a-27	DSPC	DMG- PEG(2000)	50:10:38.5:1.5	79	0.06	96
10a-26 DSPC(5.7A)	脂質 10a-26	DSPC	DMG- PEG(2000)	50:10:38.5:1.5	79	0.05	93

40

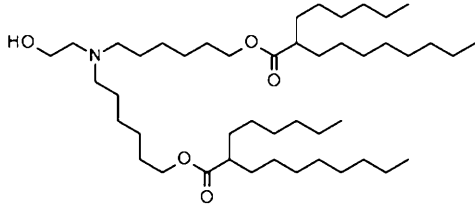
## 【 0 6 7 0 】

実施例 7 4 F : 5 0 : 1 0 : 3 8 . 5 : 1 . 5 のイオン化可能脂質 : D O P E : コレステ

50

ロール：DMG-PEG(2000)製剤比のRNAカプセル化、総フラックス、及びインビトロでの発現パーセント。

脂質ナノ粒子は、脂質10a-26、10a-27、もしくは10a-130及び/または脂質：3-III-1(



10

によって表される)を用いて、50:10:38.5:1.5モル%のイオン化可能脂質：DSPC：コレステロール：DMG-PEG(2000)製剤比で製剤比され、5.7のN:P比でRNA分子をカプセル化する。RNAの発現は、全ての製剤に存在した。それぞれ、図72I及び72Jに示すように、肝臓内に、より大きな総フラックス及び発現パーセントがあった。

【0671】

TNS及び粒子の $pK_a$ も計算した。5 $\mu$ Lの60 $\mu$ g/mLの2-(p-トルイジノ)ナフタレン-6-スルホン酸(TNS)及び5 $\mu$ Lの30 $\mu$ g/mLのRNA/mLの脂質ナノ粒子を、pH2~12の範囲のHEPES緩衝液を用いてウェルに添加した。次いで、混合物を室温で5分間振盪し、プレートリーダーを使用して蛍光(励起322nm、発光431nm)について読み取った。蛍光シグナルの収束点を計算して、粒子の $pK_a$ を決定した。

20

30

40

50

製剤	イオン化可能脂質	ヘルパー脂質	PEG 脂質	イオン化可能脂質:ヘルパー脂質:コレステロール:PEG 脂質(モル%)	Z 平均	PDI	EE(%)	濃度(ug/mL)	pKa
10a-27/III-1(5.7A)	脂質 10a-27/脂質 3-III-1 3:1 比	DOPE	DMG-PEG(2000)	50:10:38.5:1.5	74	0	96	55.8	7.4
10a-27III-1(5.7A)	脂質 10a-27/脂質 3-III-11:3 比	DOPE	DMG-PEG(2000)	50:10:38.5:1.5	85	0.1	93	51.9	6.3
10a-26/III-1(5.7A)	脂質 10a-26/脂質 3-III-13:1 比	DOPE	DMG-PEG(2000)	50:10:38.5:1.5	87	0.1	94	51.7	6.8
10a-26/III-1(5.7A)	脂質 10a-26/脂質 3-III-11:3 比	DOPE	DMG-PEG(2000)	50:10:38.5:1.5	97	0.1	90	53.1	6.2
10a-130(5.7A)	脂質 10a-130	DOPE	DMG-PEG(2000)	50:10:38.5:1.5	60	0.1	89	53.8	6.7

10

20

## 【 0 6 7 2 】

30

実施例 7 4 G : 6 2 : 4 : 3 3 : 1 のイオン化可能脂質 : D O P E : コレステロール : D S P E - P E G ( 2 0 0 0 ) 製剤比、または 5 0 : 1 0 : 3 8 . 5 : 1 . 5 のイオン化可能脂質 : D S P C : コレステロール : D M G - P E G ( 2 0 0 0 ) 製剤比の R N A カプセル化、総フラックス、及びインビトロでの発現パーセント。

脂質ナノ粒子は、脂質 1 0 a - 1 3 9 を用いて、6 2 : 4 : 3 3 : 1 モル%のイオン化可能脂質 : D O P E : コレステロール : D S P E - P E G ( 2 0 0 0 ) 製剤比で ( R N A 分子を 4 . 5 の N : P 比でカプセル化する )、または 5 0 : 1 0 : 3 8 . 5 : 1 . 5 モル%のイオン化可能脂質 : D O P E : コレステロール : D M G - P E G ( 2 0 0 0 ) 製剤比で ( R N A 分子を 5 . 7 の N : P 比でカプセル化する ) 製剤化した。R N A の発現は、全ての製剤に存在した。それぞれ、図 7 2 K 及び 7 2 L に示すように、肝臓内に、より大きな総フラックス及び発現パーセントがあった。

40

50



製剤	イオン化可能脂質	ヘルパー脂質	PEG 脂質	イオン化可能脂質:ヘルパー脂質:コレステロール:PEG 脂質 (モル%)	Z 平均 (nm)	PDI	EE(%)
10a-139(4.5D)	脂質 10a-139	DOPE	DSPE-PEG(2000)	62:4:33:1	93	0.01	79
10a-139(5.7A)	脂質 10a-139	DSPC	DMG-PEG(2000)	50:10:38.5:1.5	122	0.02	95

10

## 【0673】

## 実施例 75

この実施例は、インビトロでの SARS-CoV2 スパイクタンパク質発現の発現を例示する。環状 RNA をコードする SARS-CoV2 安定化スパイクタンパク質を、Messenger Max トランスフェクション試薬を使用して 293 個の細胞にトランスフェクトした。トランスフェクションから 24 時間後、293 個の細胞は、CR3022 抗スパイク一次抗体及び APC 標識二次抗体で染色した。

## 【0674】

図 73A は、インビトロ転写反応から生じる約 4.5 kb の SARS-CoV2 安定化スパイクタンパク質をコードする RNA の環化効率を示す。図 73B 及び図 73C は、偽トランスフェクト細胞と比較して、メッセンジャー Max トランスフェクション試薬による環状 RNA トランスフェクション後の 293 個の細胞における SARS-CoV2 安定化スパイクタンパク質の発現を示す。

20

## 【0675】

図 77A 及び図 77B は、メッセンジャー Max トランスフェクション試薬を用いて、可変 IRES 配列、コドン最適化コード領域、及び安定化 SARS-CoV2 スパイクタンパク質を含有する環状 RNA のパネルのトランスフェクション後の 293 個の細胞における細胞及び gMFI のパーセンテージによる SARS-CoV2 安定化スパイクタンパク質発現を示す。図 77C は、MFI とパーセンテージとの関係を示す。

30

## 【0676】

## 実施例 76

この実施例は、脂質ナノ粒子製剤に封入された 0.2 mg/kg の circRNA 調製物の IV 注射後のインビボでのサイトカイン応答を示す。GTP を前駆体 RNA 開始剤として合成した circRNA スプライシング反応物及びスプライシングヌクレオチドは、スプライシング反応物中の三リン酸化 5' 末端の存在により、精製された circRNA 及び直鎖状 m1-mRNA よりも大きなサイトカイン応答を誘発した。IL-1、IL-6、IL-10、IL-12p70、RANTES、TNF のレベルを、LNP 製剤の circRNA 調製物の静脈内注射の 6 時間後に採取した血液から測定した。PBS を注射したマウスを、対照として使用した。

40

## 【0677】

図 74 に見られるように、GTP を前駆体 RNA 開始剤として合成した circRNA スプライシング反応物及びスプライシングヌクレオチドは、スプライシング反応物中の三リン酸化 5' 末端の存在により、精製した circRNA 及び直鎖状 m1-mRNA よりも大きなサイトカイン応答を誘発する。

## 【0678】

## 実施例 77

この実施例は、環状 RNA を含有する様々な用量の脂質ナノ粒子の筋肉内投与を示す。マウスに、脂質ナノ粒子に配合された 0.1 µg、1 µg、または 10 µg の circRNA

50

NAのいずれかを投与した。ルシフェリンの注射の6時間後に全身IVISイメージングを実施した(図75A及び図75B)。エキスピボIVISイメージングを24時間で実施した。肝臓、四肢、及びふくらはぎのフラックス値を、図75Cに示す。図76B及び図76Cは、環状RNAの発現がマウスの筋肉組織に存在することを示す。

【0679】

実施例78

この実施例は、LNP製剤における複数の環状RNAの発現を示す。hEPOまたはfLucのいずれかをコードする環状RNA構築物を、単一及び混合したセットのLNP中で投与した。血清中のhEPO濃度(図76A)及びIVISイメージングによる総フラックス(図76B)を決定した。結果は、個々に製剤化された、または共製剤化された環状RNA hEPOまたはfLuc構築物が、タンパク質を効率的に発現することを示す。

10

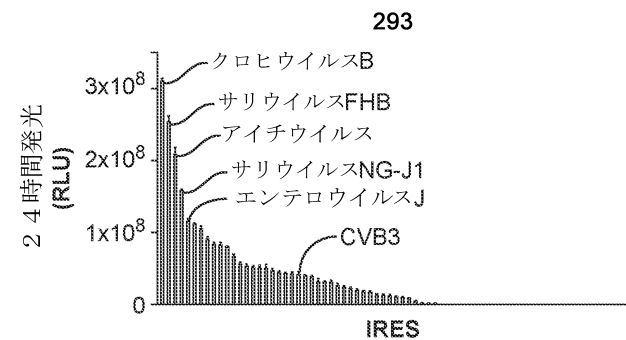
【0680】

参照による組み込み

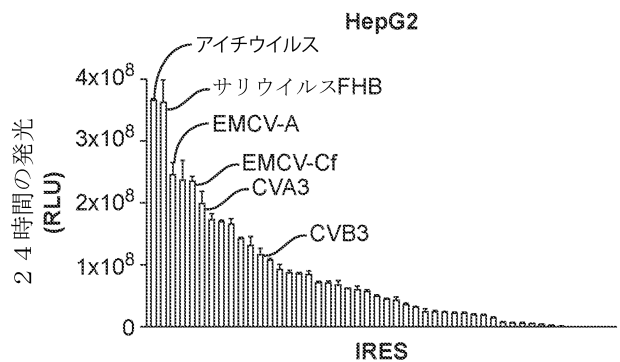
この本明細書に言及される全ての刊行物、特許及び特許出願は、各個別の刊行物、特許、または特許出願が、明確かつ個別に参照により本明細書に組み込まれることが示されていると同程度に、参照により本明細書に組み込まれる。

【図面】

【図1A】



【図1B】



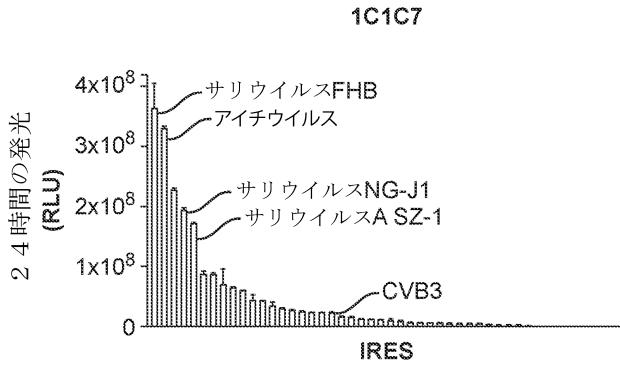
20

30

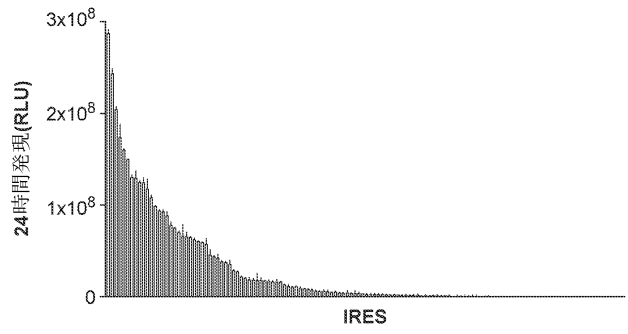
40

50

【 図 1 C 】

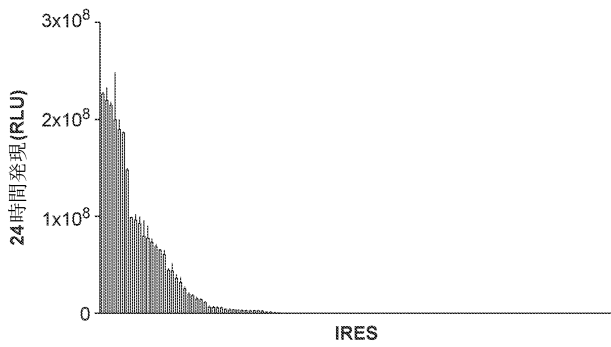


【 図 1 D 】

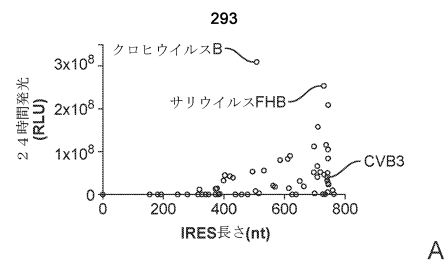


10

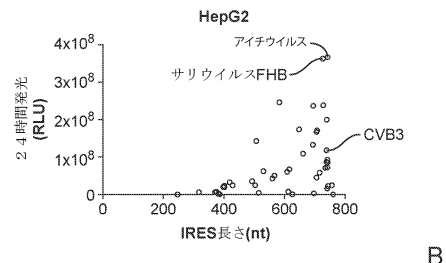
【 図 1 E 】



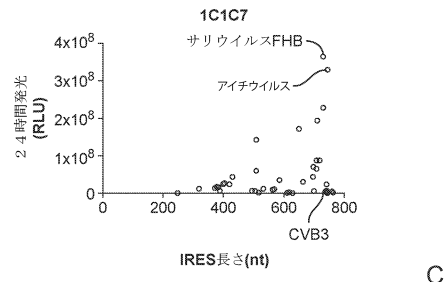
【 図 2 】



20



B



C

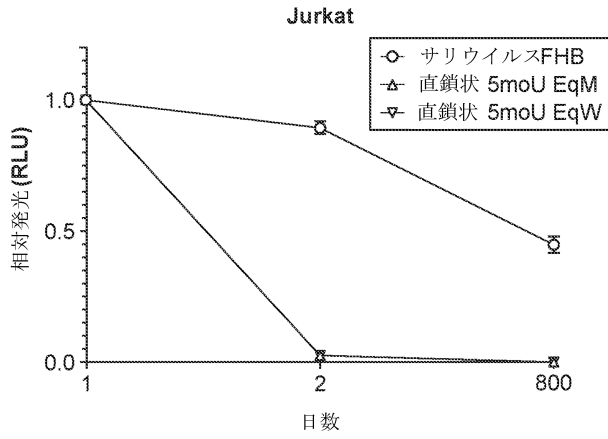
30

40

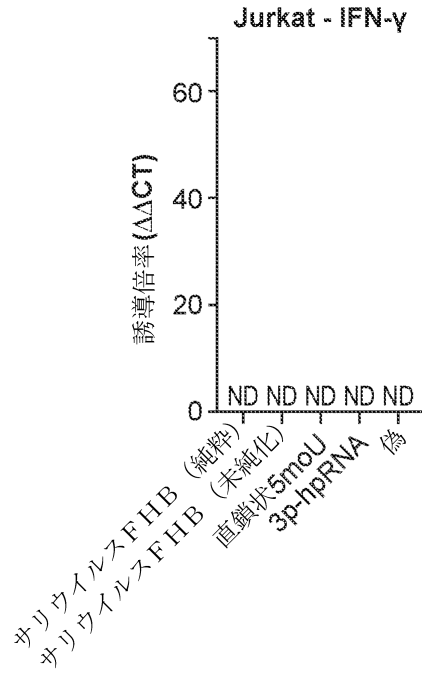
50



【 図 6 B 】



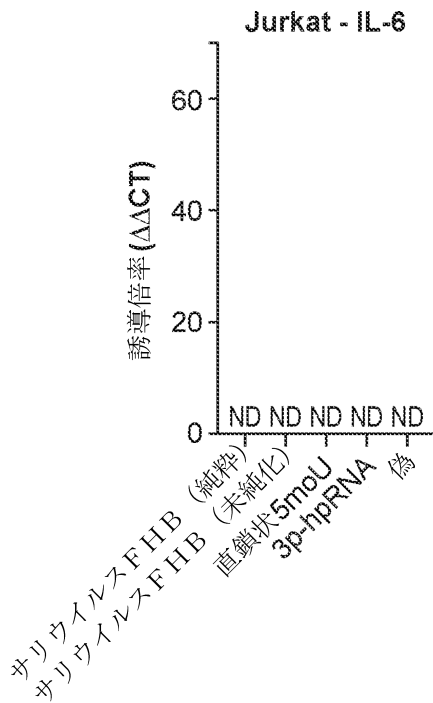
【 図 7 A 】



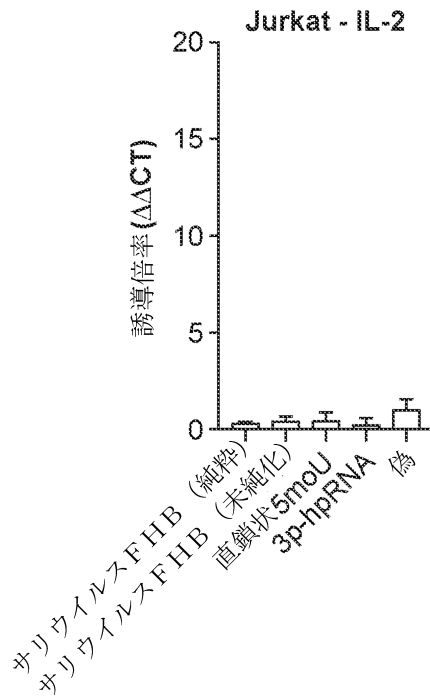
10

20

【 図 7 B 】



【 図 7 C 】

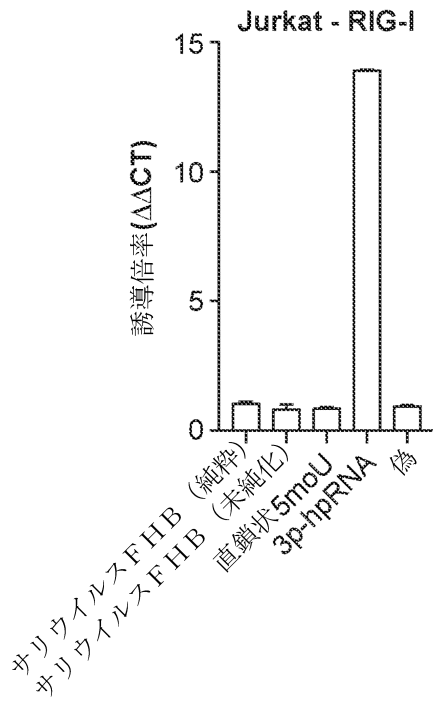


30

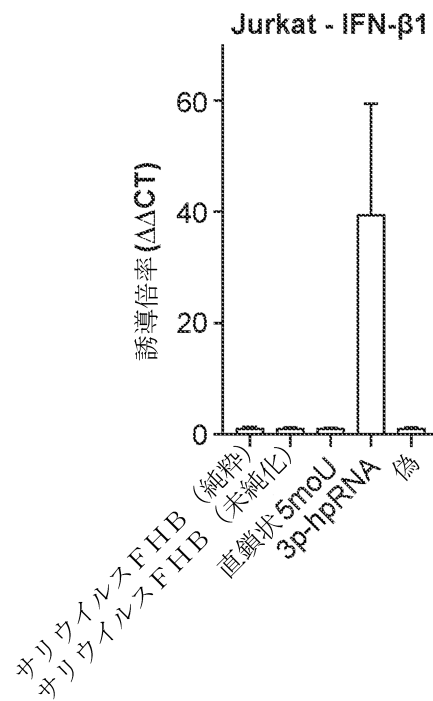
40

50

【 図 7 D 】



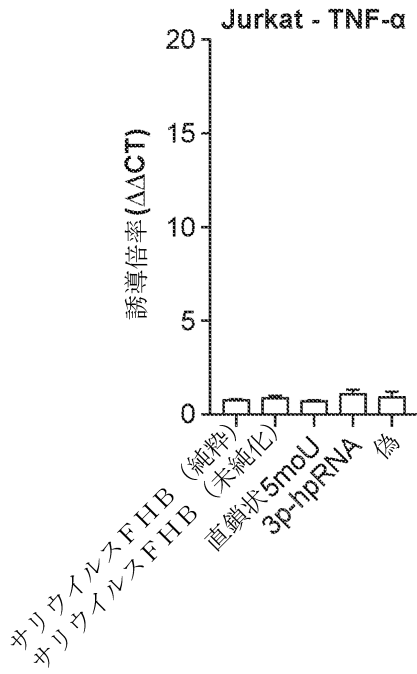
【 図 7 E 】



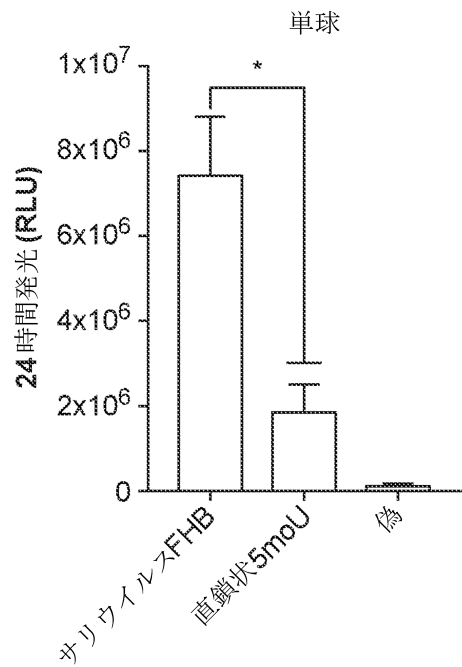
10

20

【 図 7 F 】



【 図 8 A 】

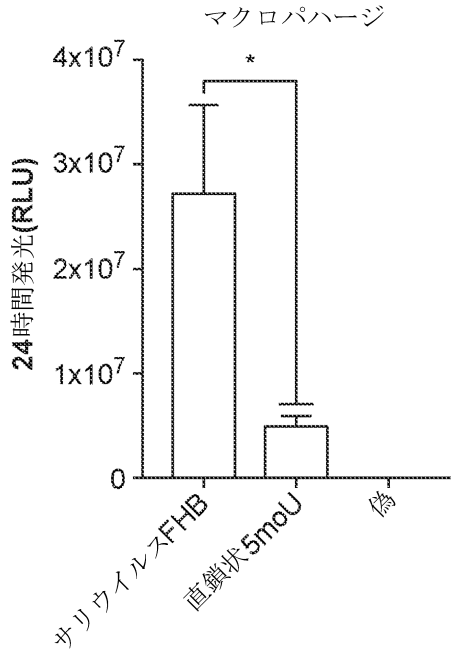


30

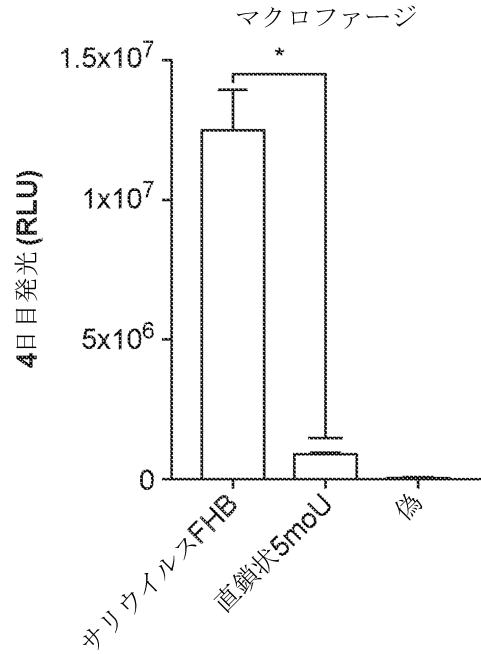
40

50

【 図 8 B 】



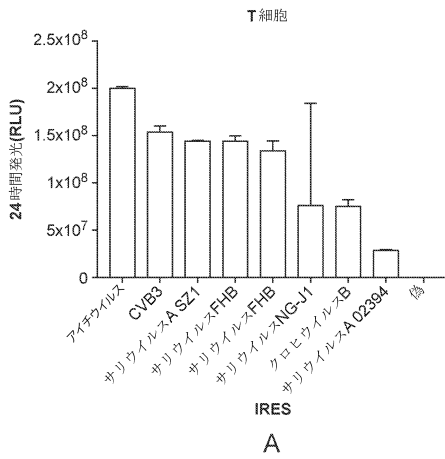
【 図 8 C 】



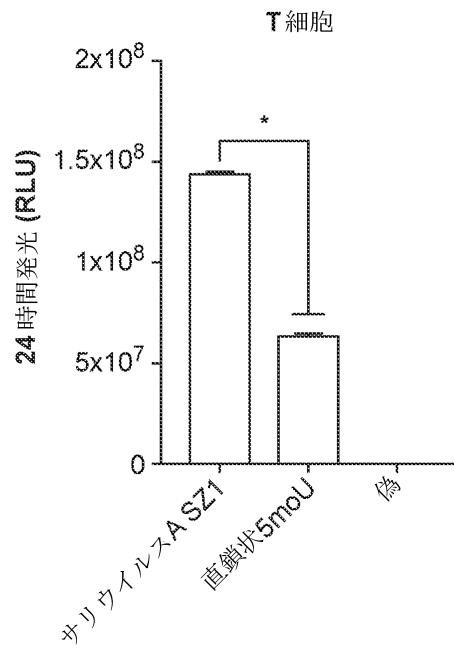
10

20

【 図 9 】

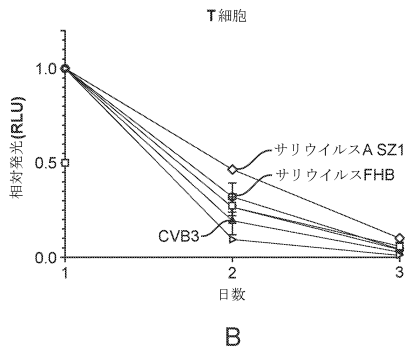


【 図 10 A 】



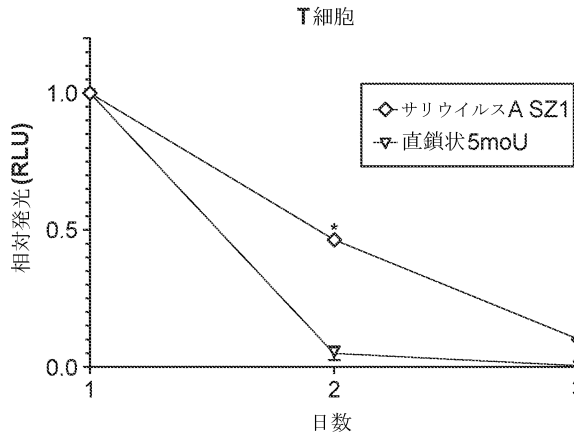
30

40

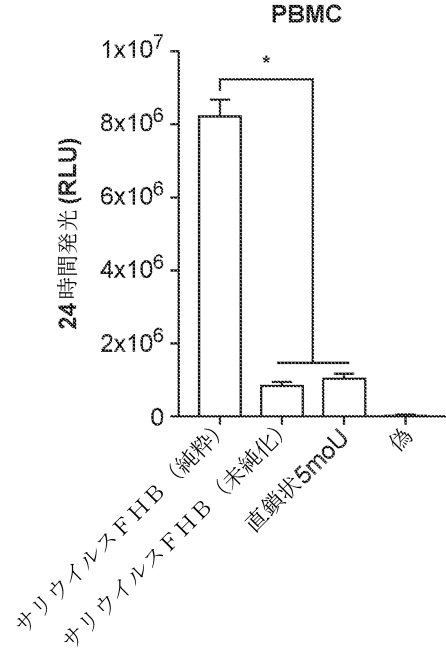


50

【図10B】



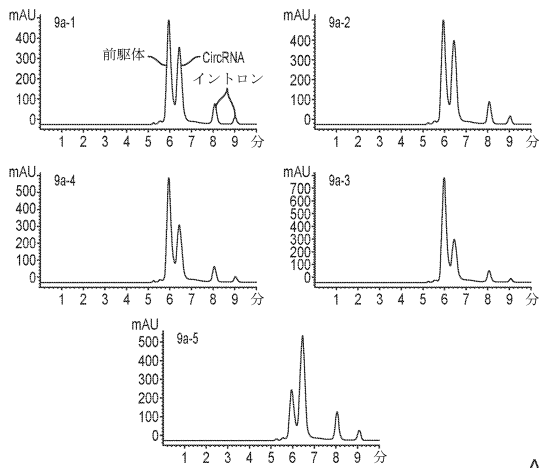
【図10C】



10

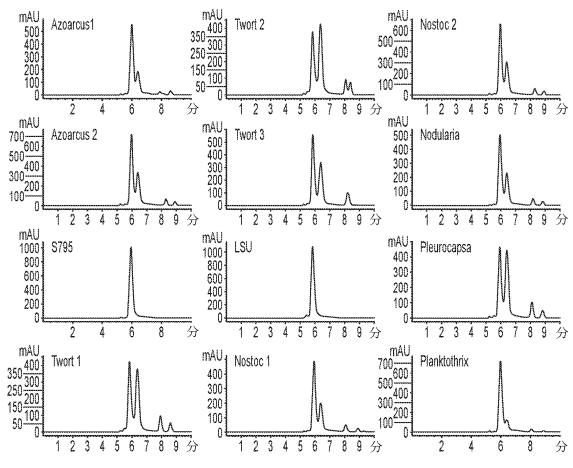
20

【図11】



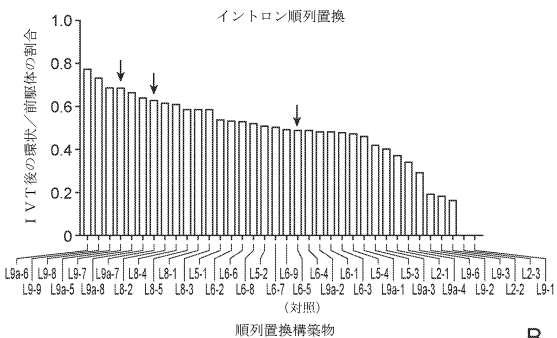
A

【図12】

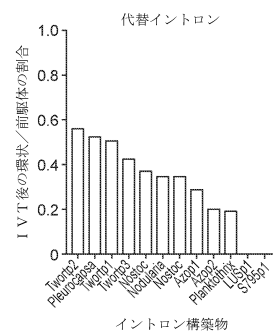


A

30



B



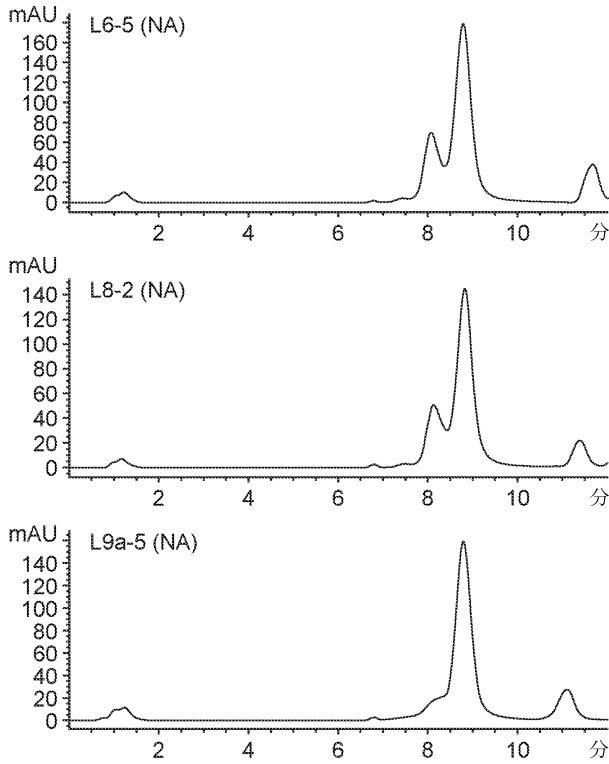
B

40

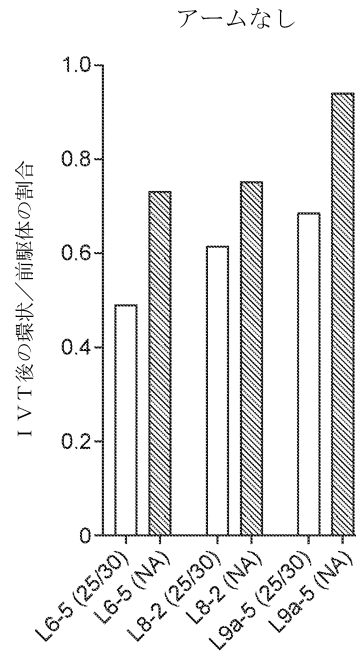
50



【 図 1 3 A 】



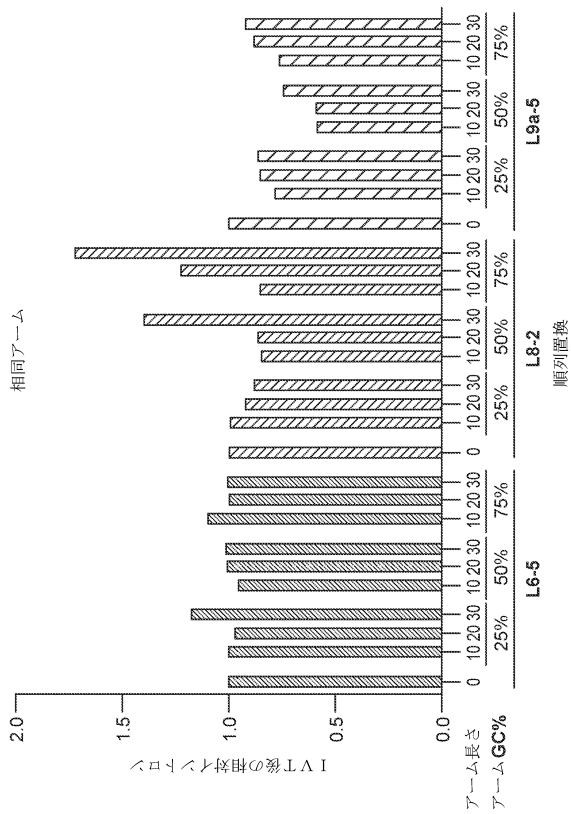
【 図 1 3 B 】



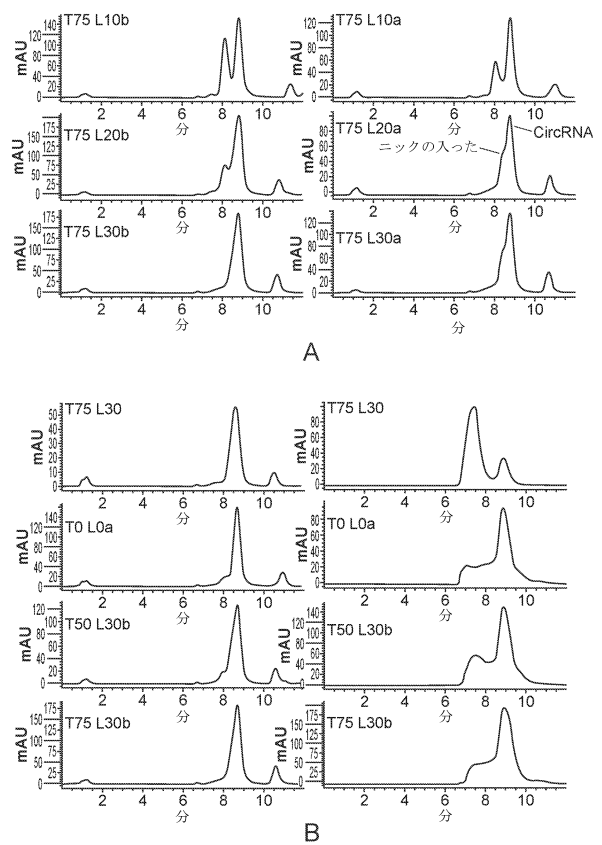
10

20

【 図 1 4 】



【 図 1 5 】

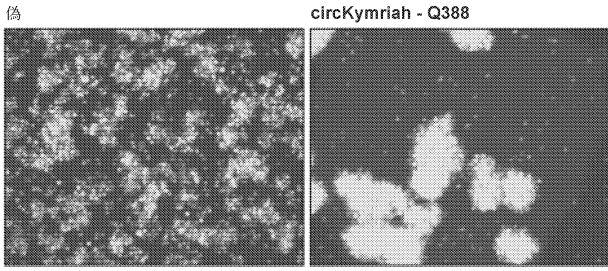


30

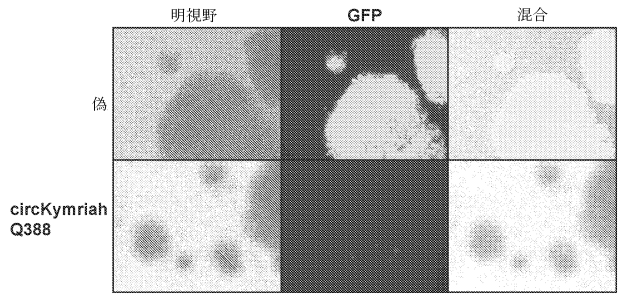
40

50

【 図 1 6 】

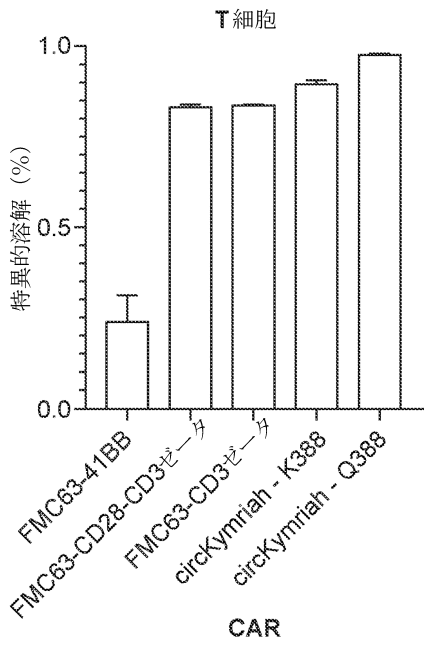


【 図 1 7 】

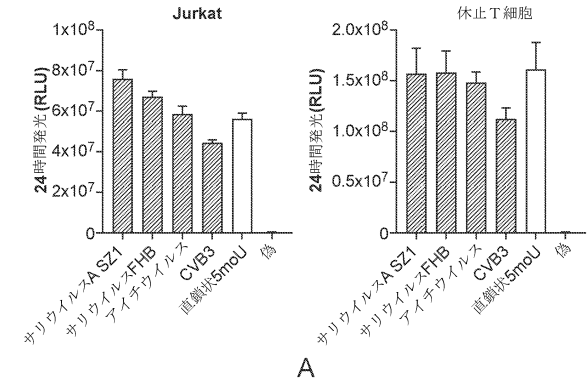


10

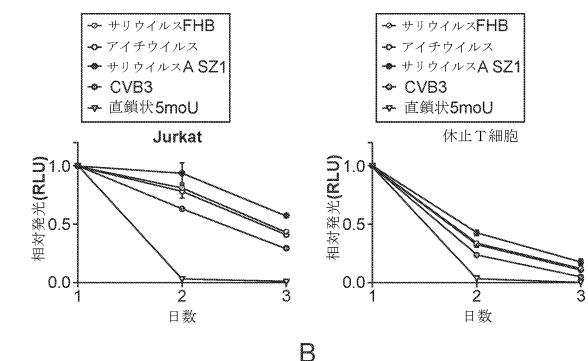
【 図 1 8 】



【 図 1 9 】



20

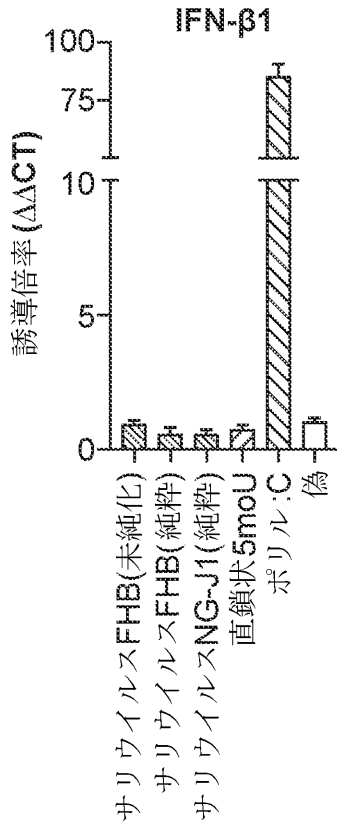


30

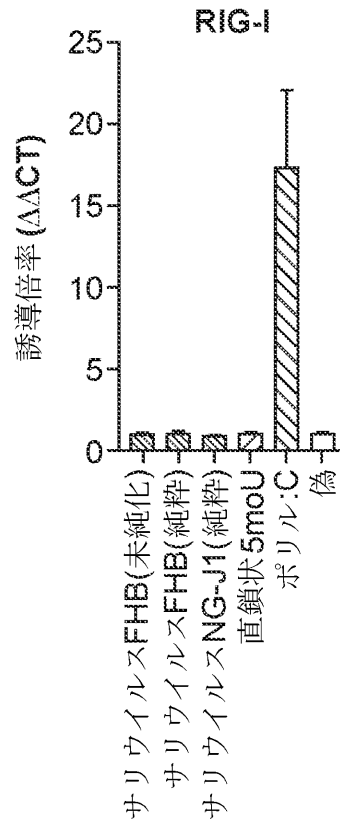
40

50

【 図 2 0 A 】



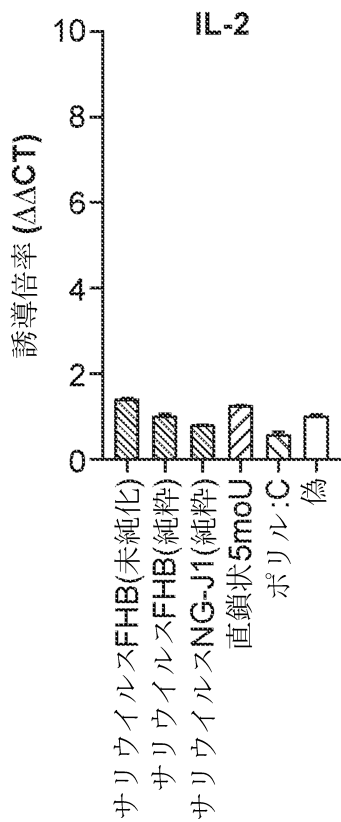
【 図 2 0 B 】



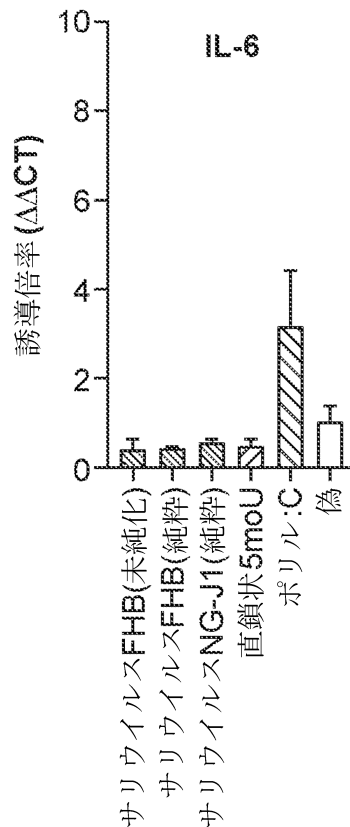
10

20

【 図 2 0 C 】



【 図 2 0 D 】

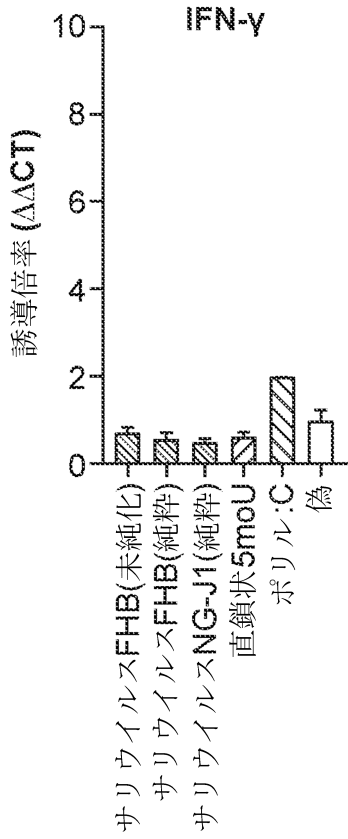


30

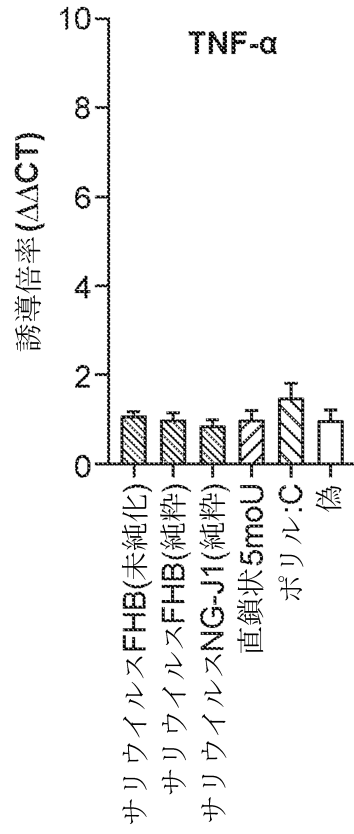
40

50

【 図 2 0 E 】



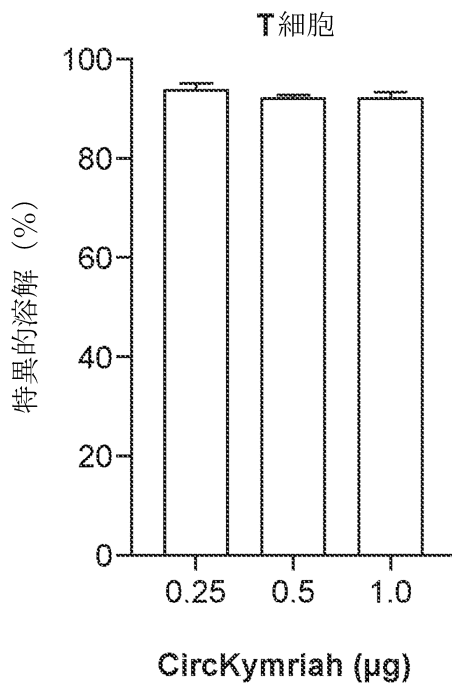
【 図 2 0 F 】



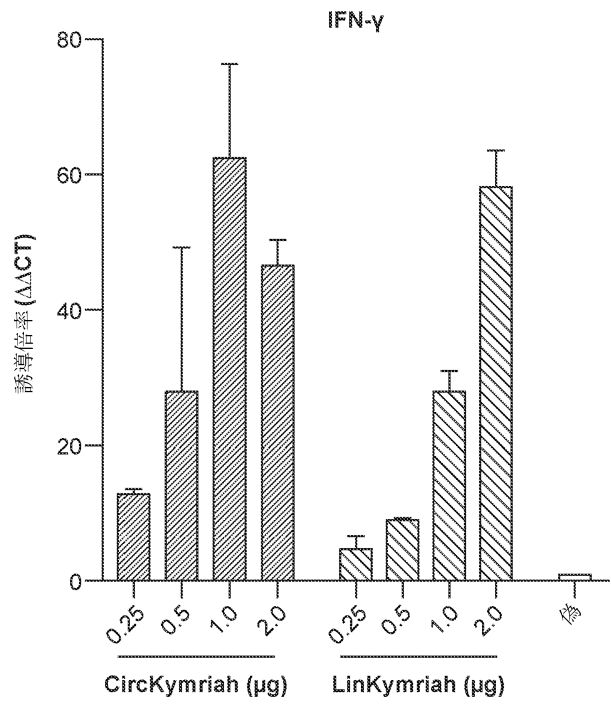
10

20

【 図 2 1 A 】



【 図 2 1 B 】

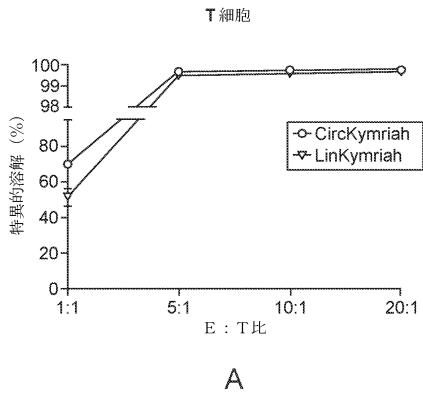


30

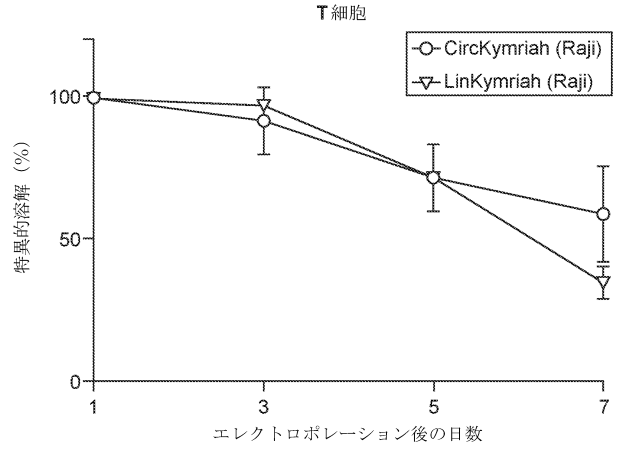
40

50

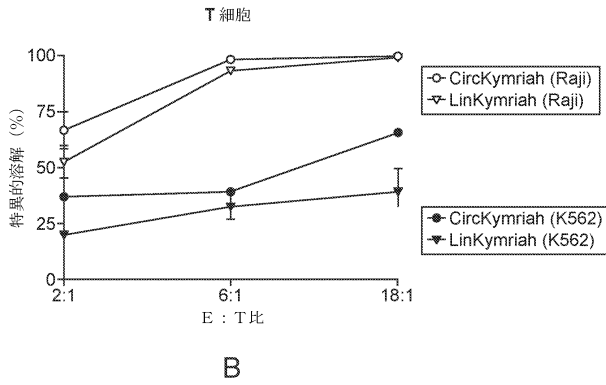
【 図 2 2 】



【 図 2 3 】

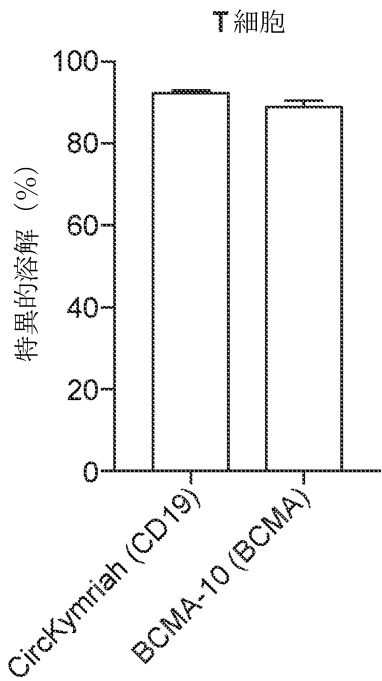


10

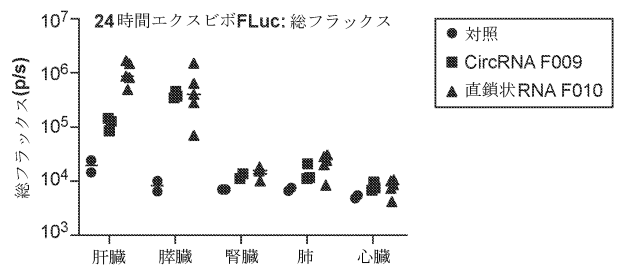


20

【 図 2 4 】



【 図 2 5 】

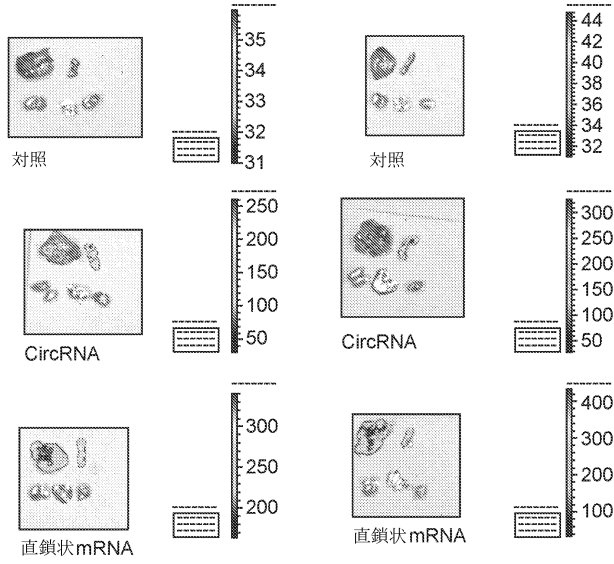


30

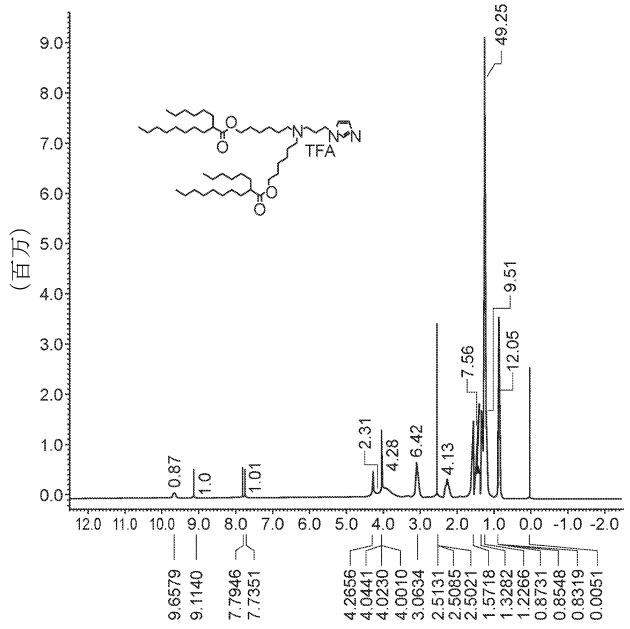
40

50

【 26 】



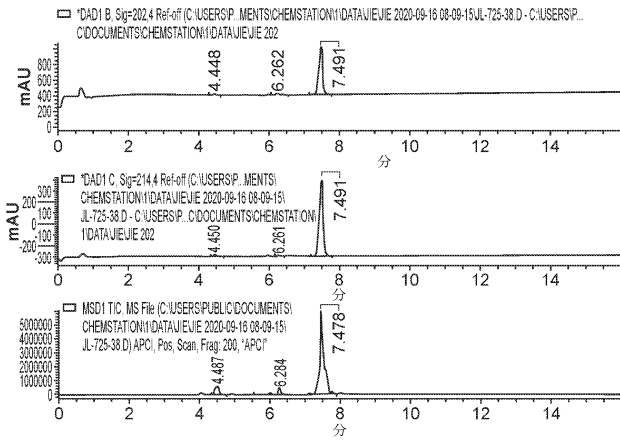
【 27 A 】



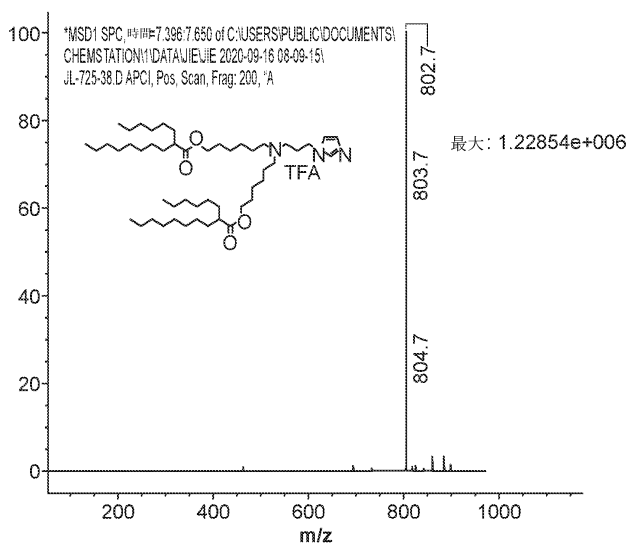
10

20

【 27 B 】



【 27 C 】

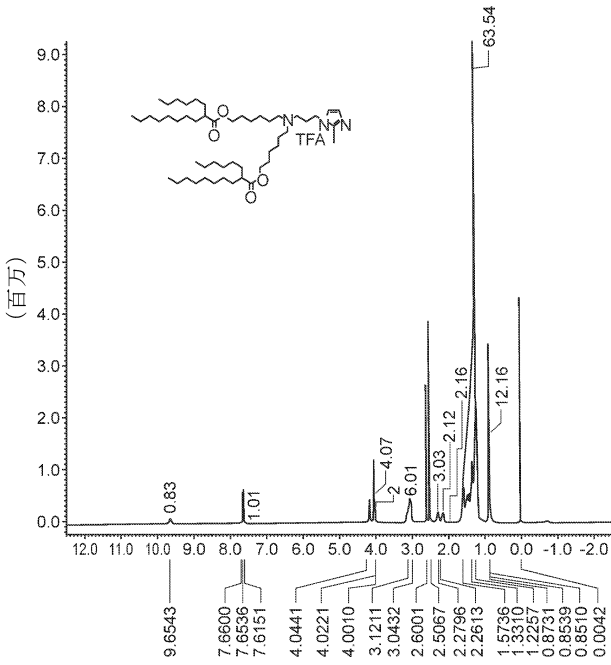


30

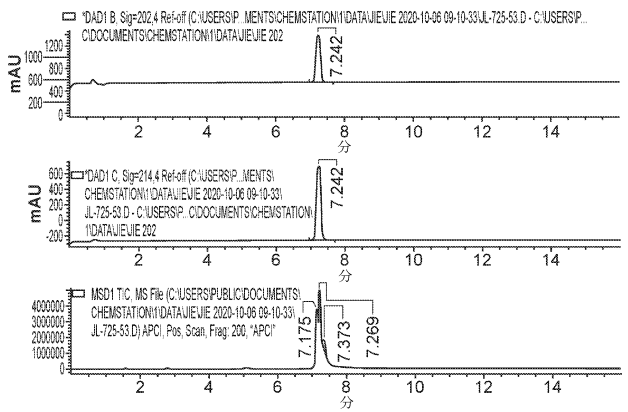
40

50

【 27 D 】



【 27 E 】



10

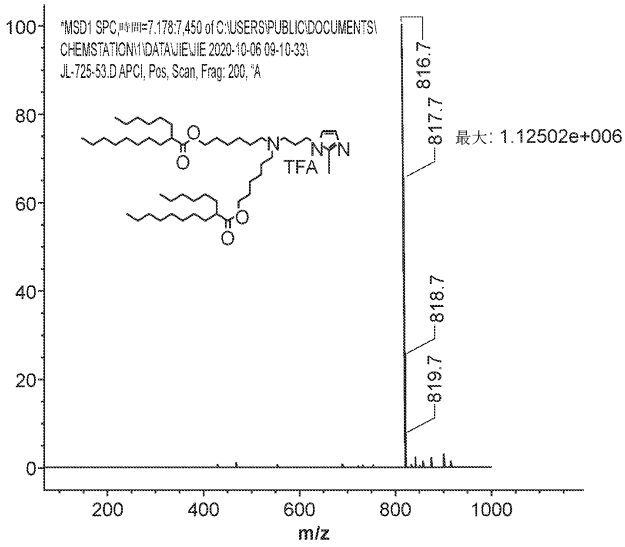
20

30

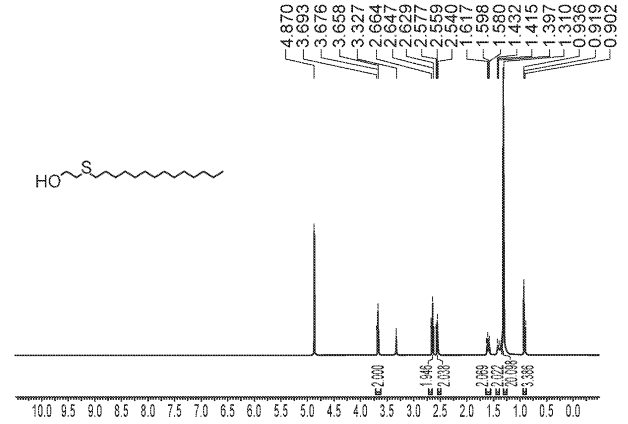
40

50

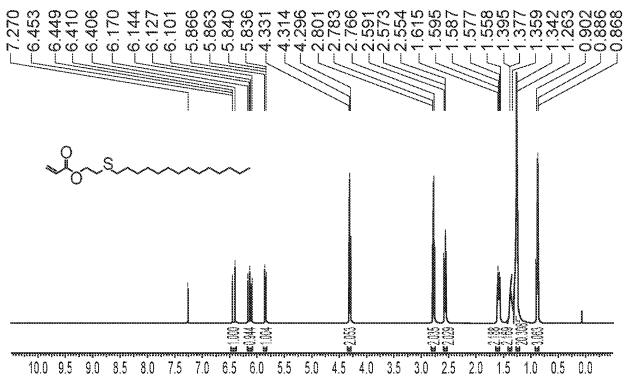
【 27 F 】



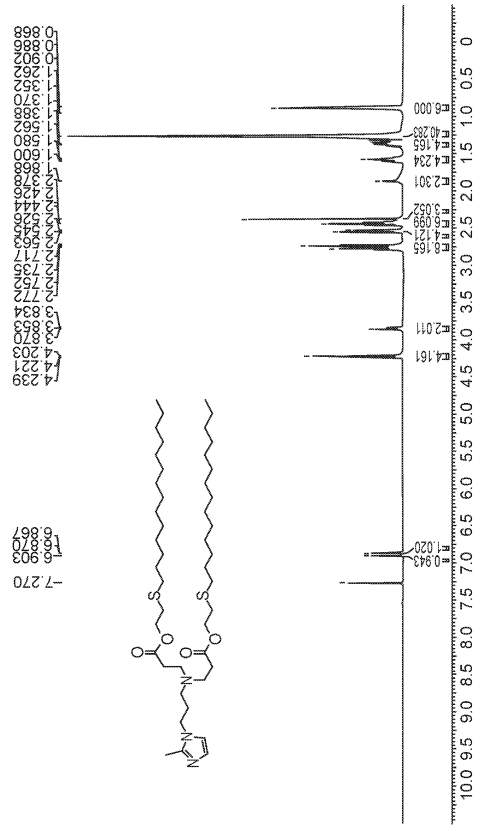
【 28 A 】



【 28 B 】



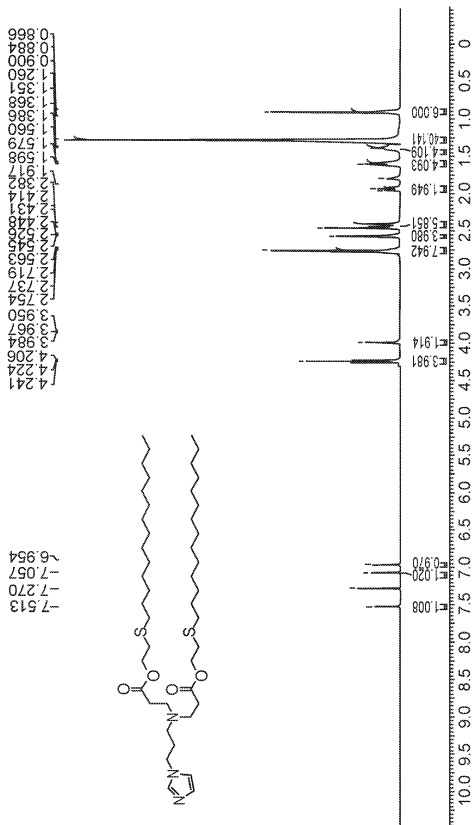
【 28 C 】



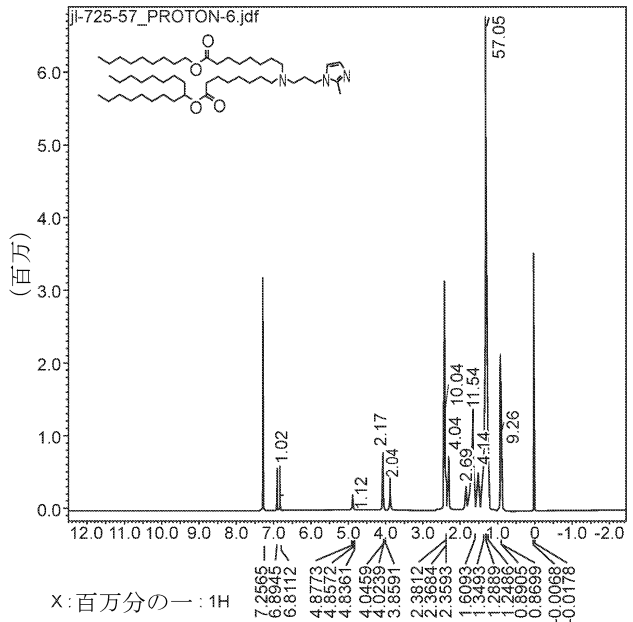
10

20

【 29 】



【 30 A 】



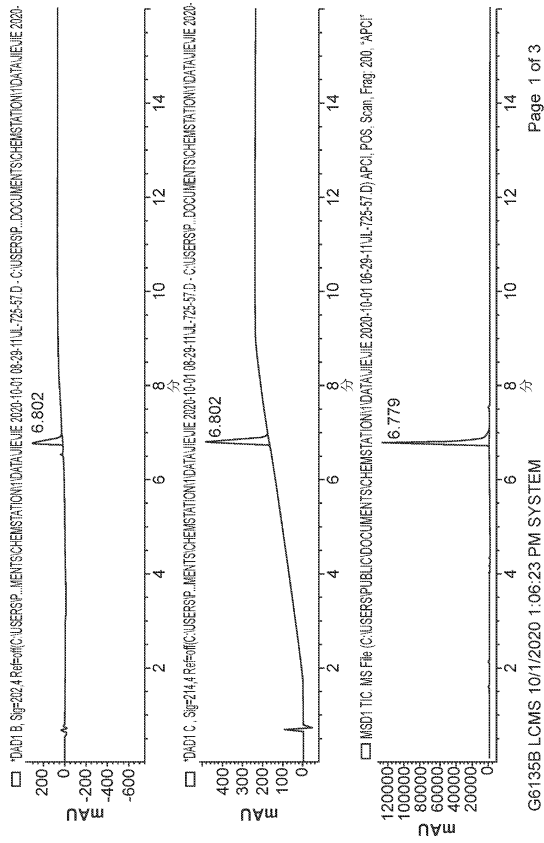
30

40

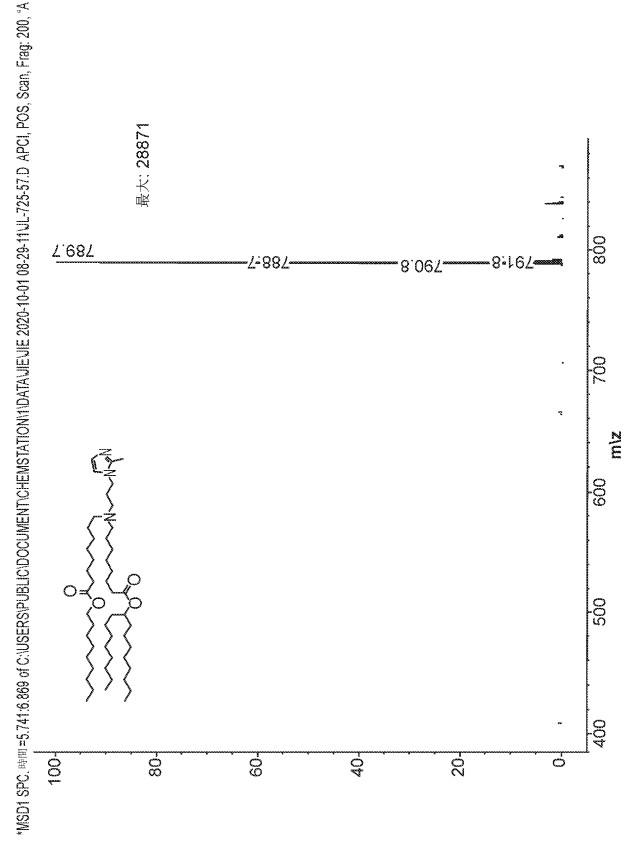
50



【 3 0 B 】



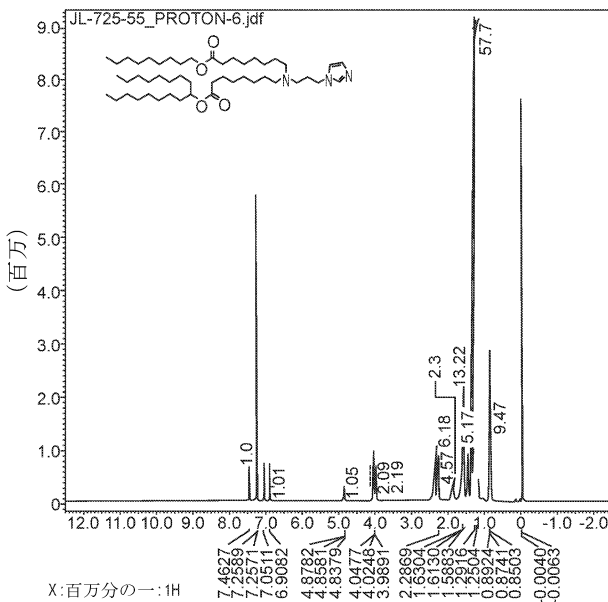
【 3 0 C 】



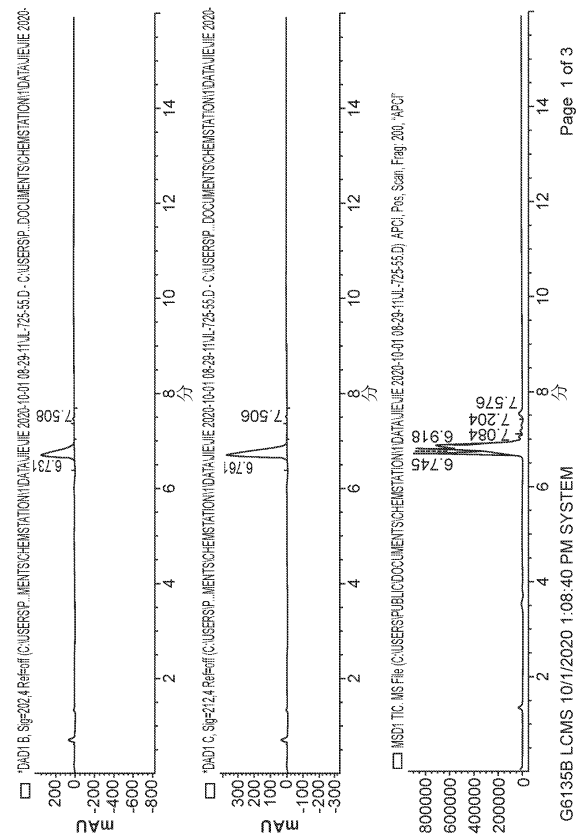
10

20

【 3 1 A 】



【 3 1 B 】

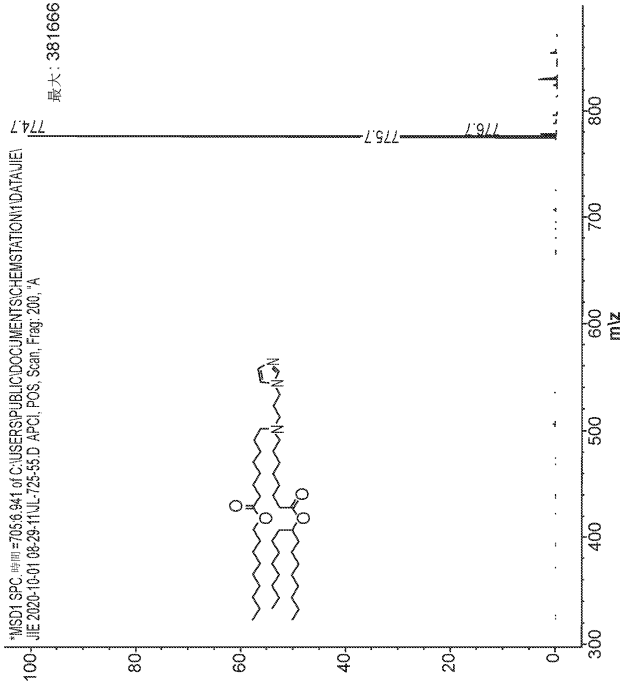


30

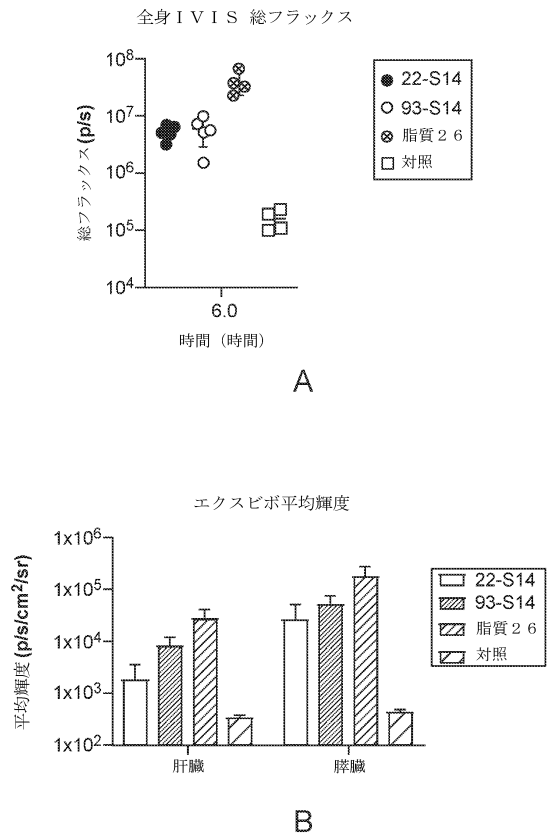
40

50

【 3 1 C 】



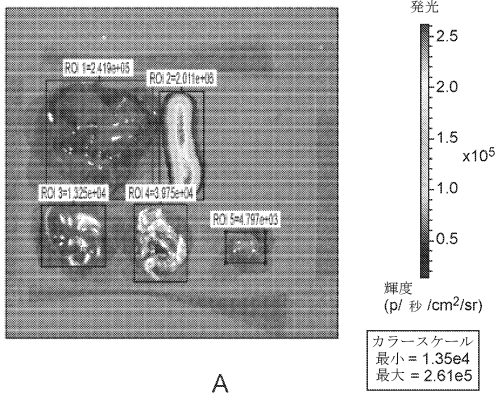
【 3 2 】



10

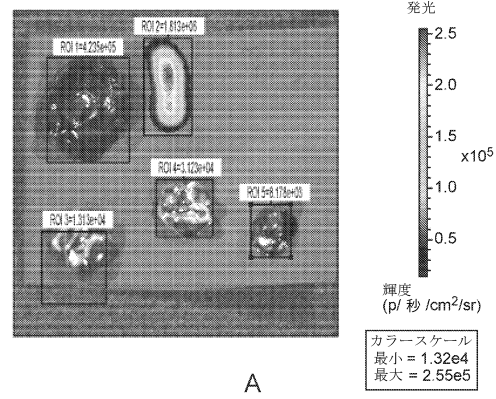
20

【 3 3 】

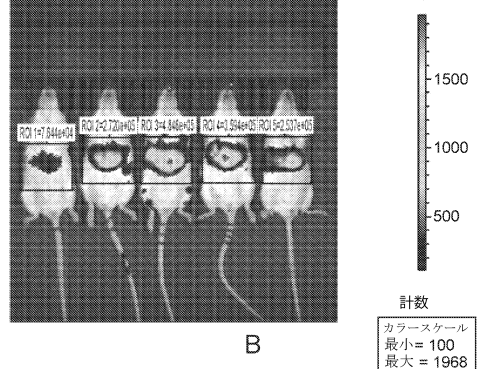
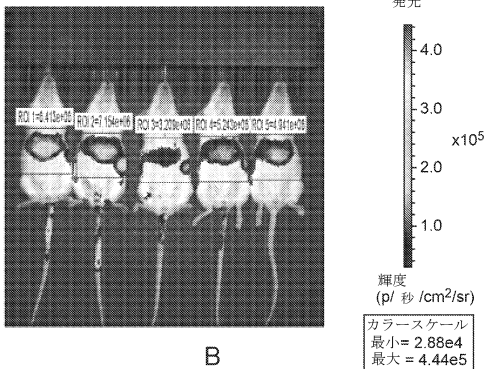


30

【 3 4 】

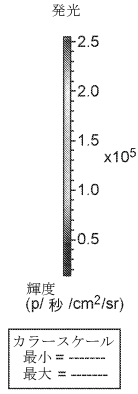
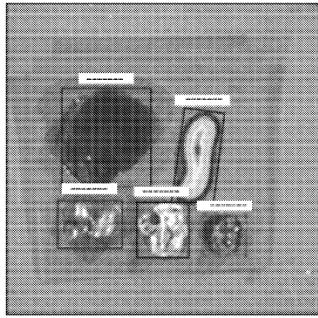


40

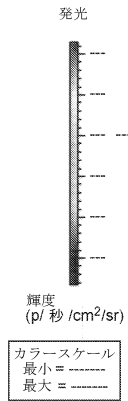
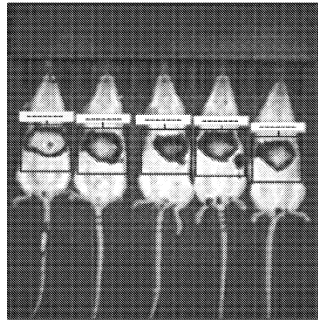


50

【 図 3 5 】

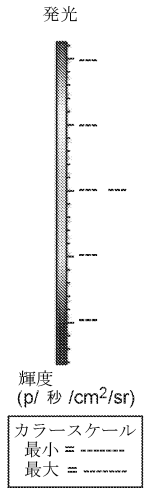
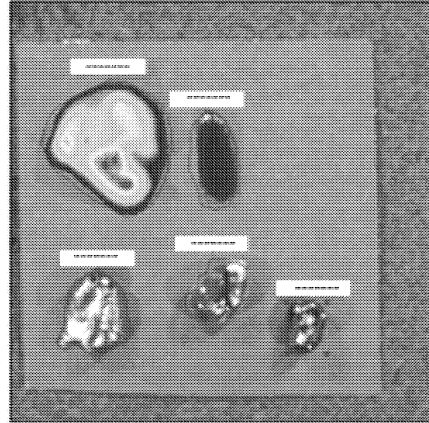


A



B

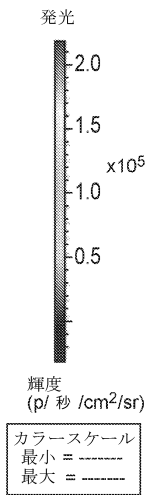
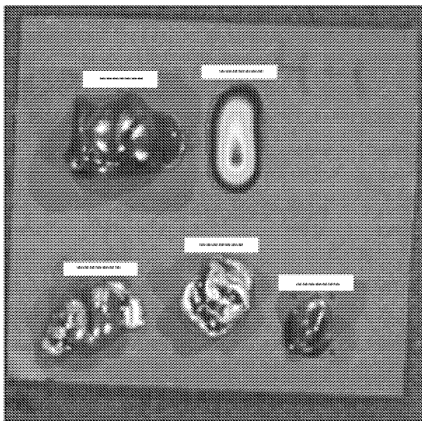
【 図 3 6 A 】



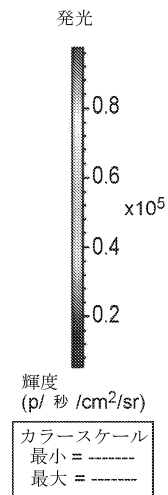
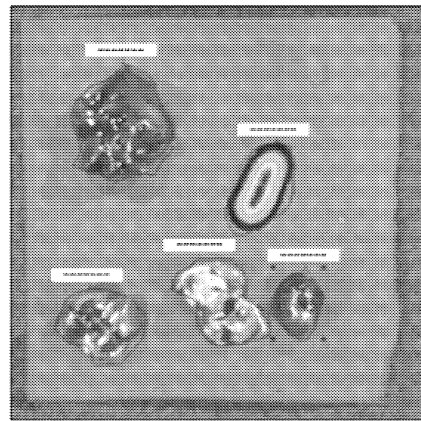
10

20

【 図 3 6 B 】



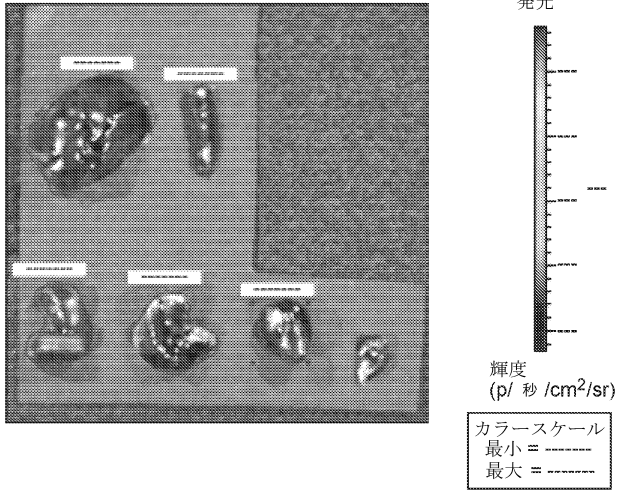
【 図 3 6 C 】



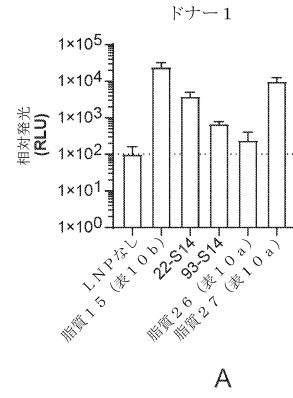
30

40

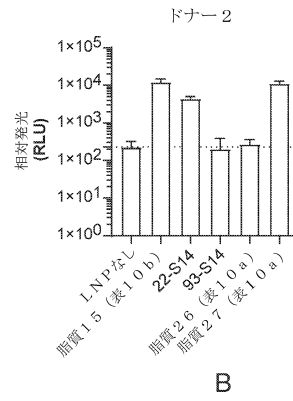
【 図 3 6 D 】



【 図 3 7 】

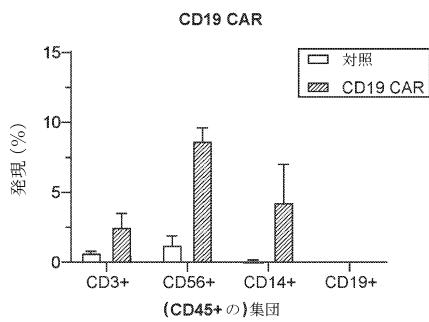
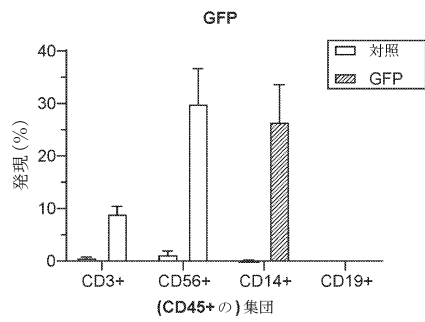


10

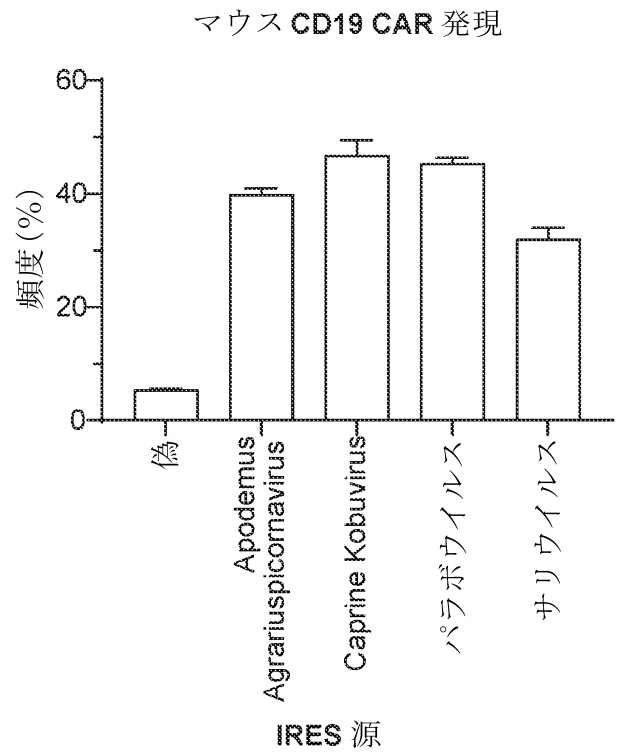


20

【 図 3 8 】



【 図 3 9 】

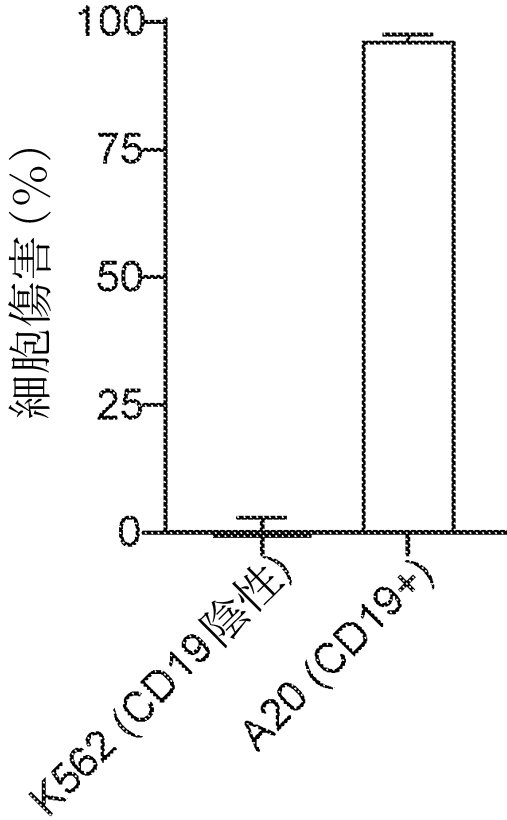


30

40

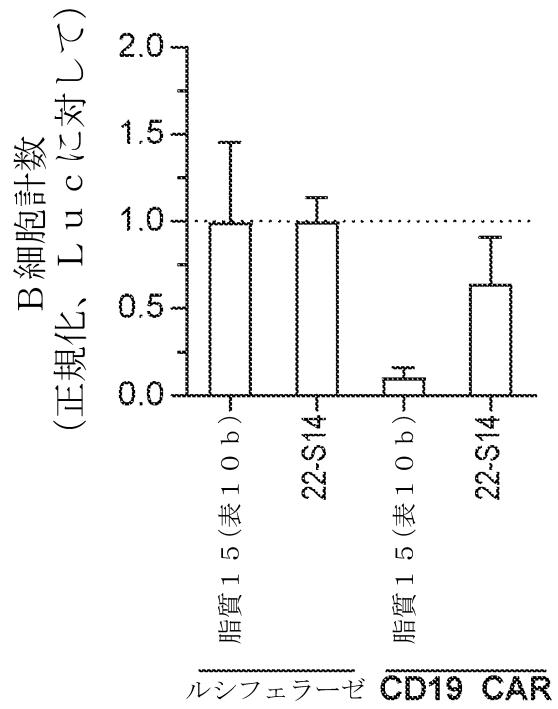
50

【図 4 0】



【図 4 1 A】

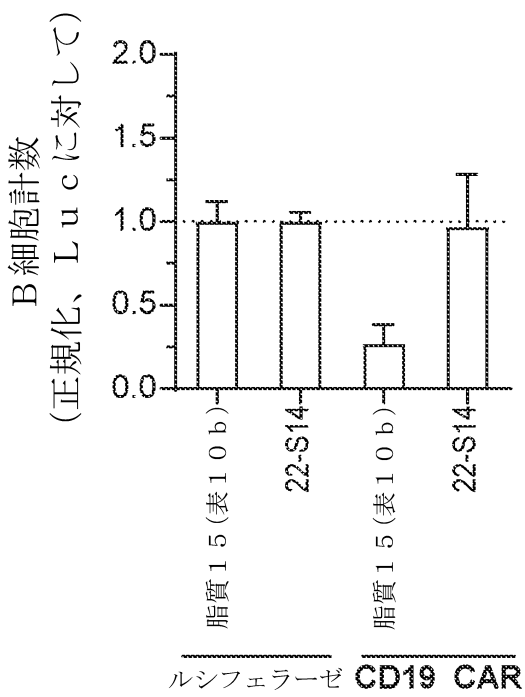
8日目末梢血中のB細胞計数



10  
20

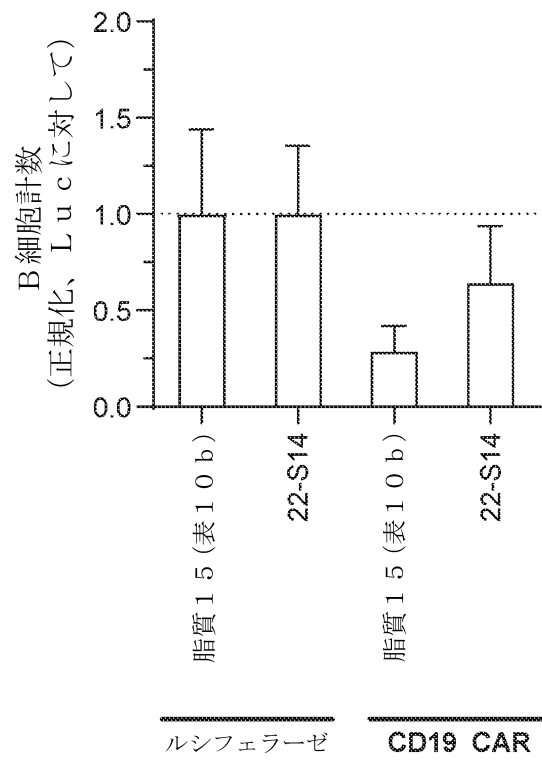
【図 4 1 B】

12日目末梢血中のB細胞計数



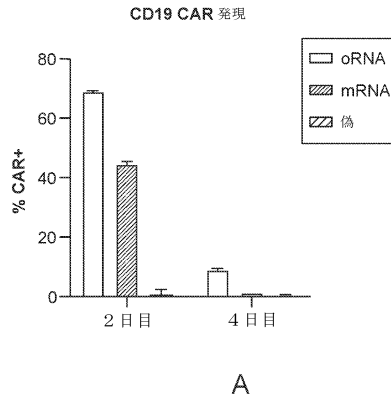
【図 4 1 C】

12日目脾臓中のB細胞計数

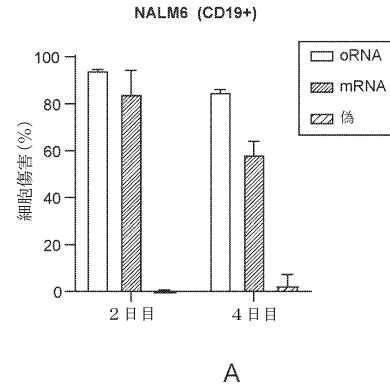


30  
40

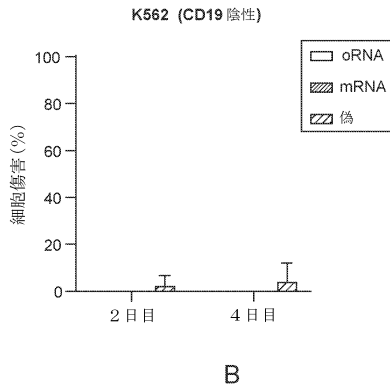
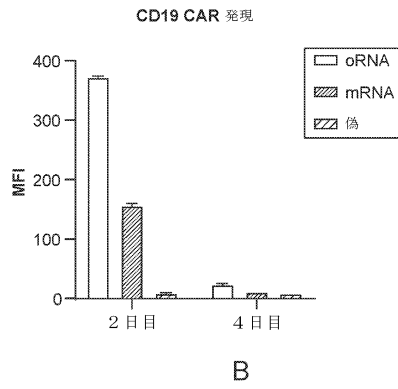
【 図 4 2 】



【 図 4 3 】

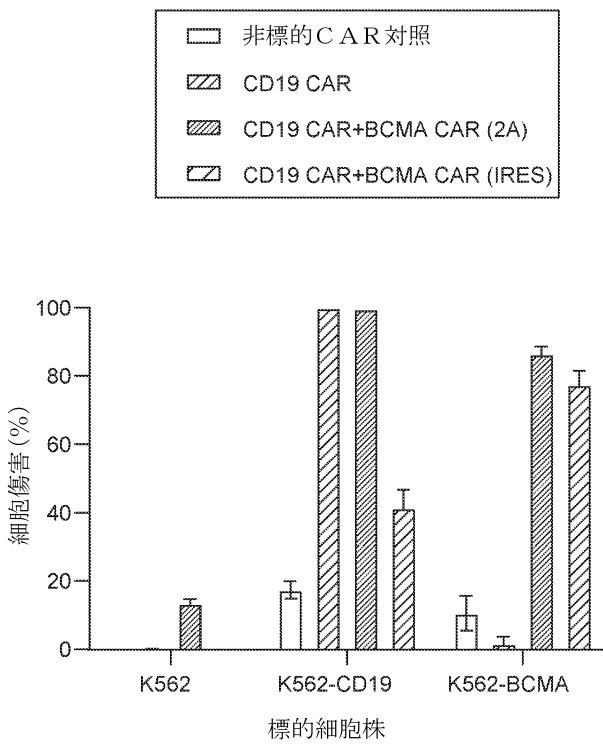


10

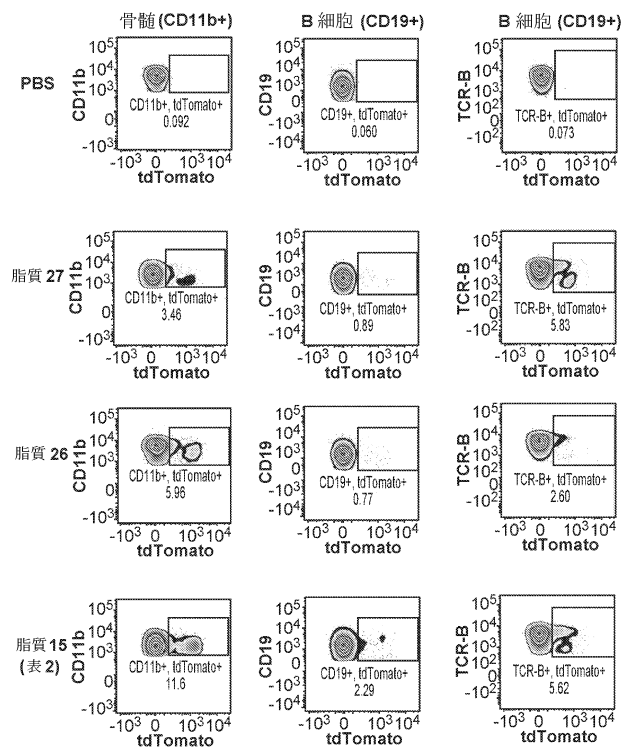


20

【 図 4 4 】



【 図 4 5 A 】

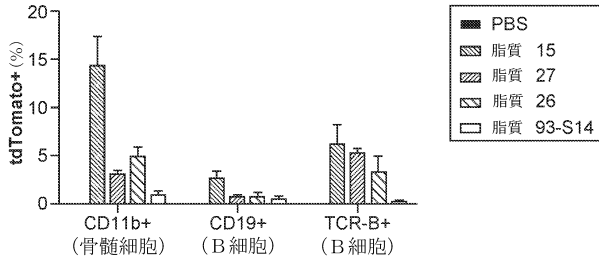


30

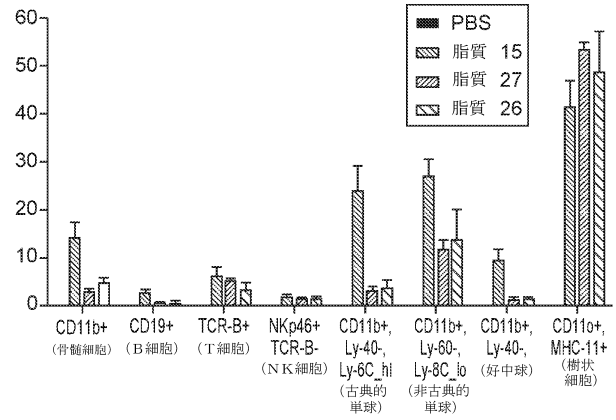
40

50

【 4 5 B 】



【 4 5 C 】

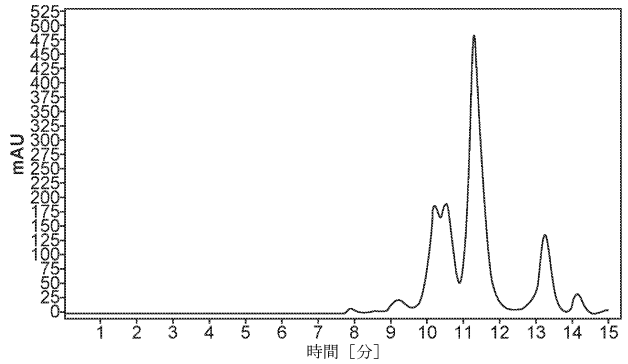


10

【 4 6 A 】



【 4 6 B 】



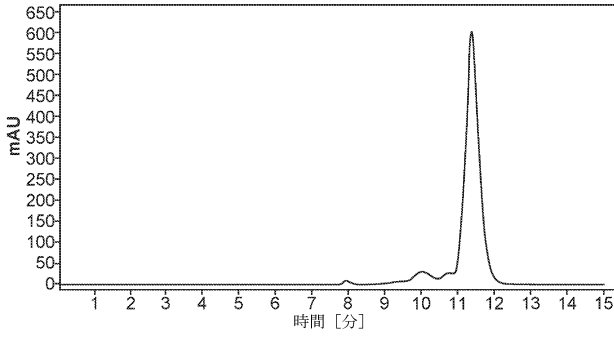
20

30

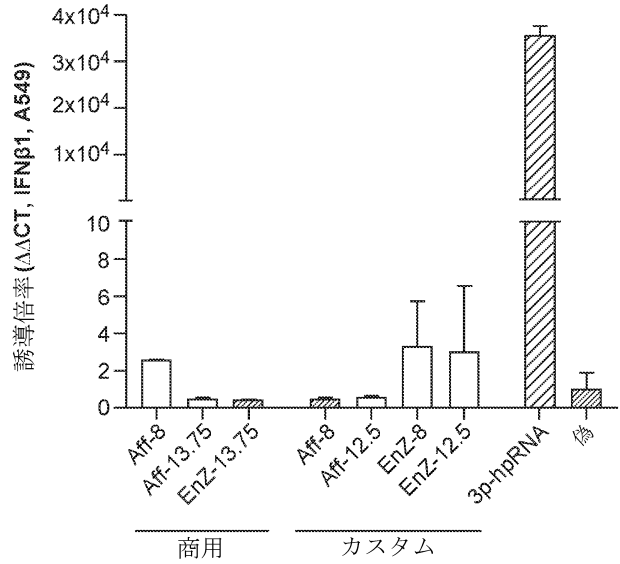
40

50

【 図 4 6 C 】

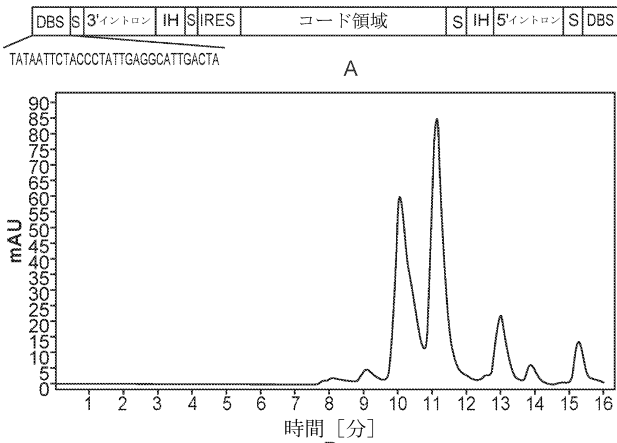


【 図 4 6 D 】



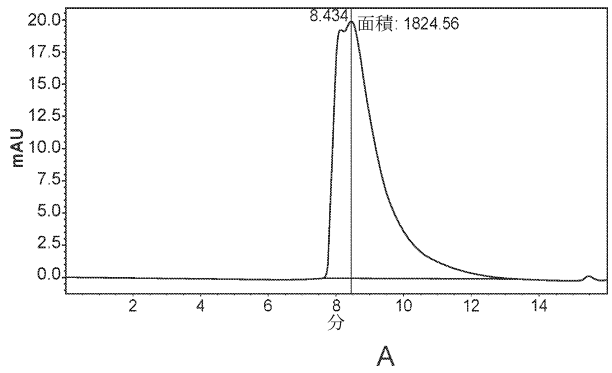
10

【 図 4 7 】

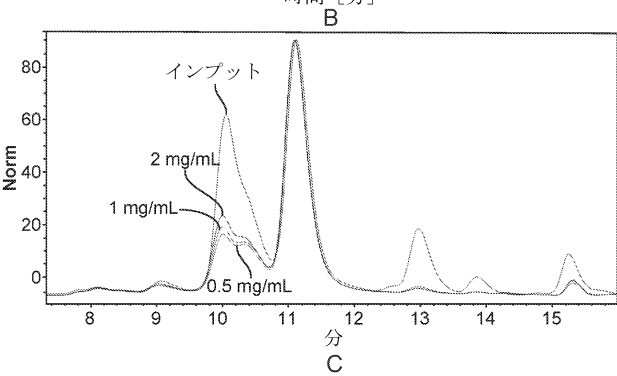


20

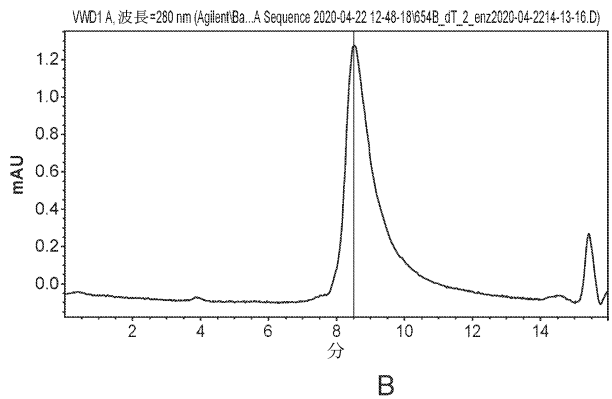
【 図 4 8 】



30



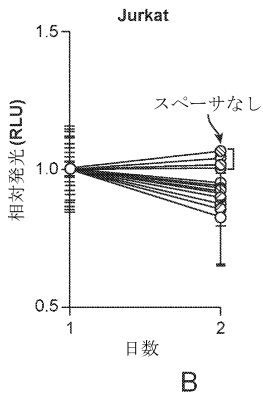
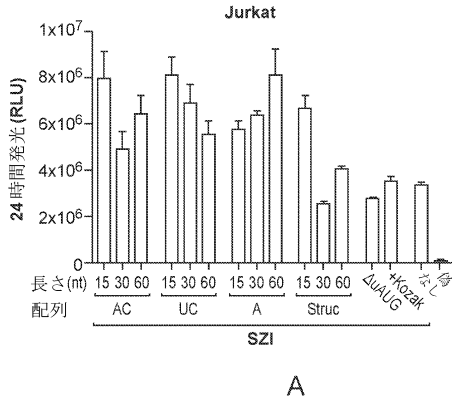
40



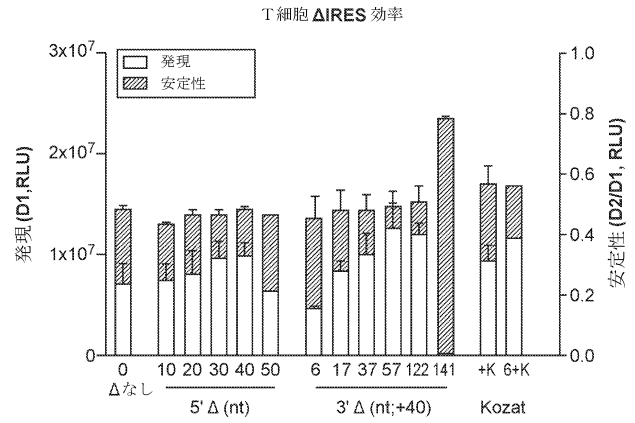
50



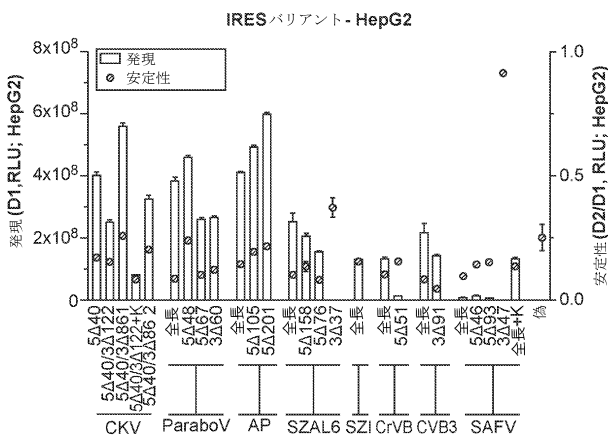
【 図 4 9 】



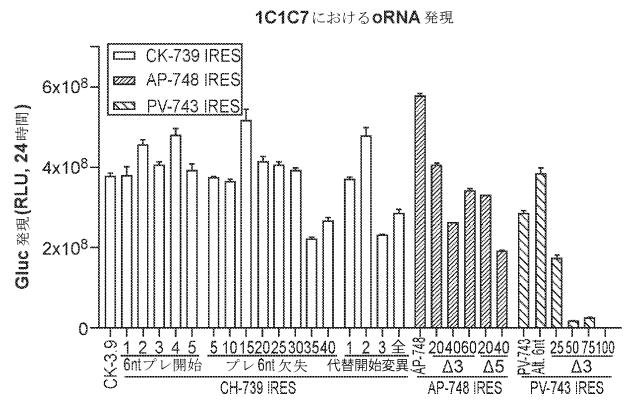
【 図 5 0 】



【 図 5 1 】



【 図 5 2 】



10

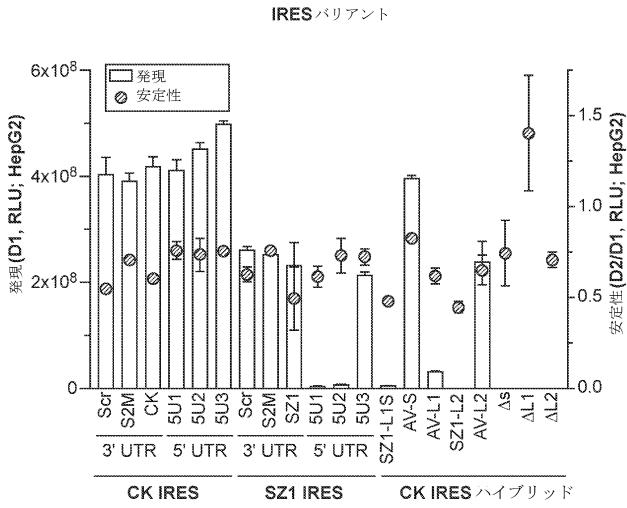
20

30

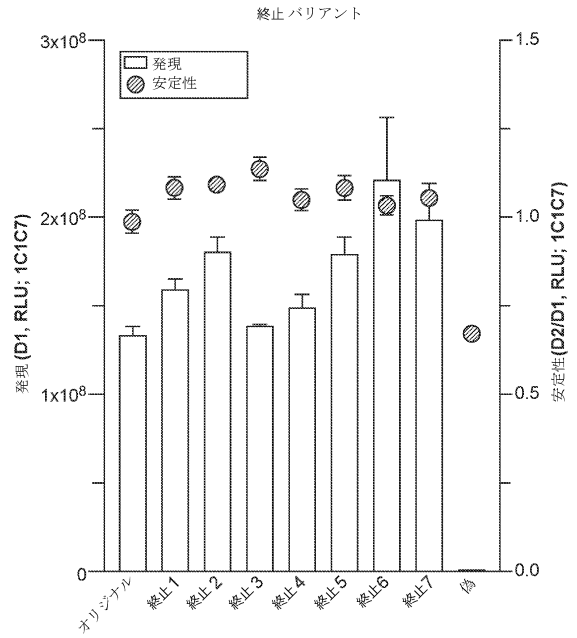
40

50

【 図 5 3 】



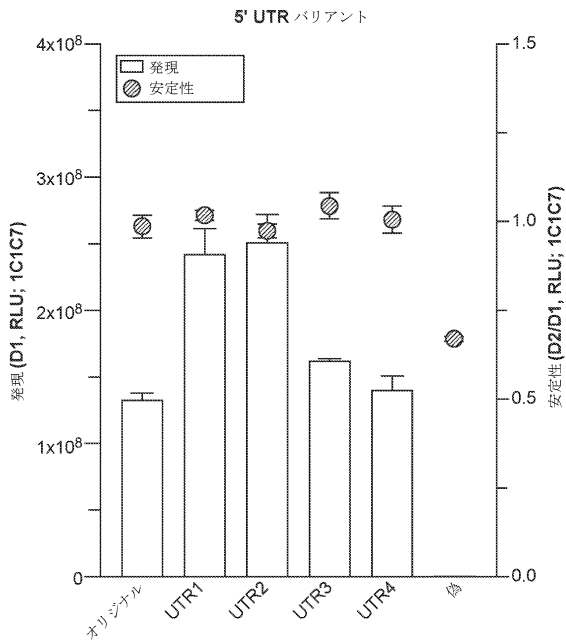
【 図 5 4 】



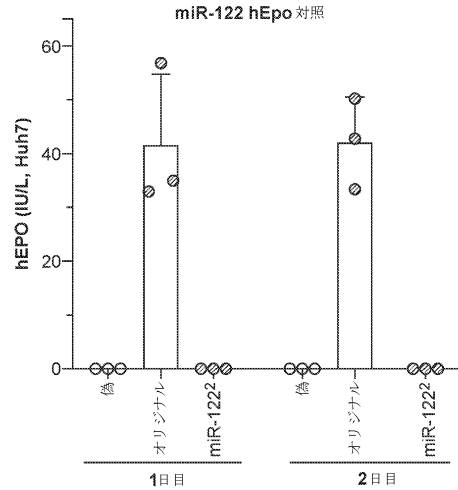
10

20

【 図 5 5 】



【 図 5 6 】

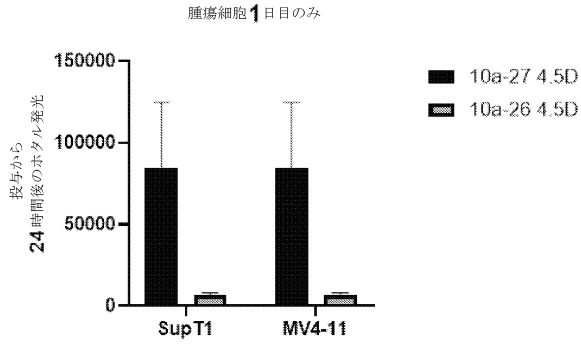


30

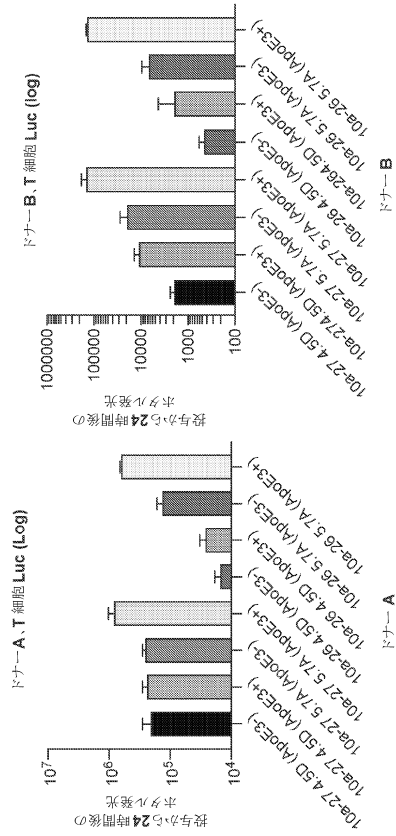
40

50

【 5 7 】



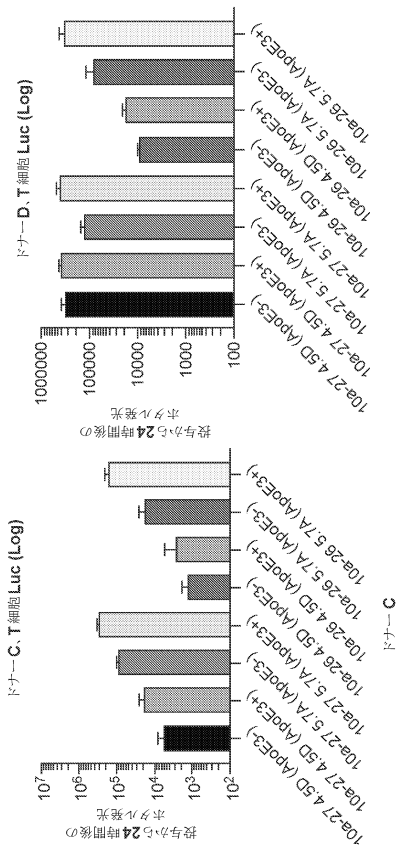
【 5 8 - 1 】



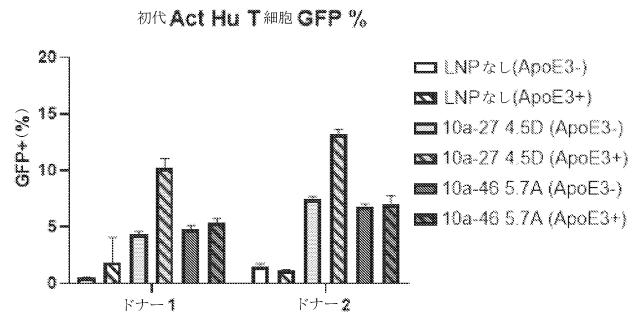
10

20

【 5 8 - 2 】



【 5 9 】



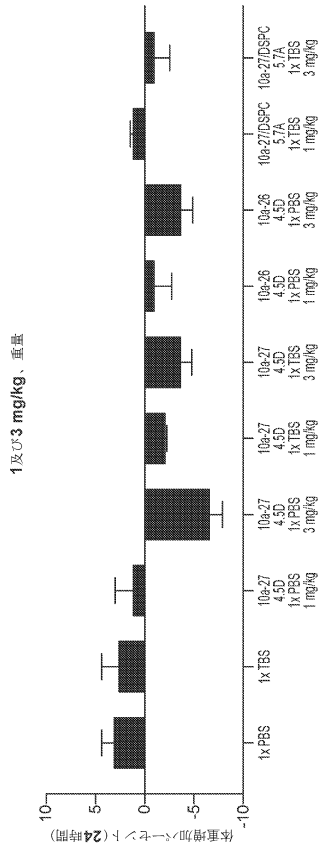
30

40

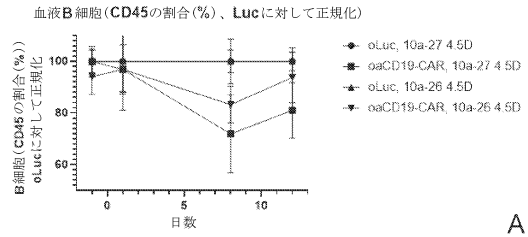
50



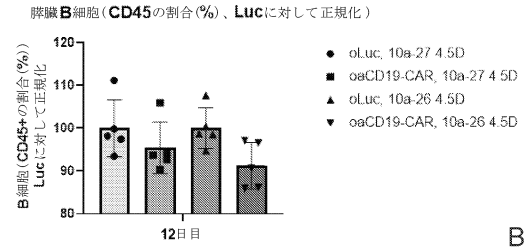
【 図 6 2 C 】



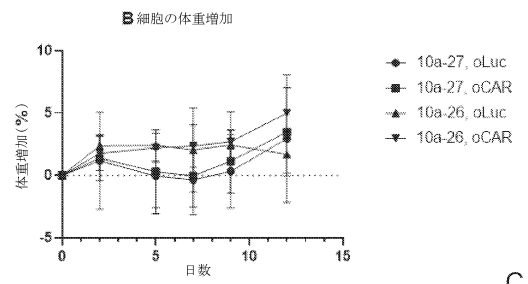
【 図 6 3 】



A



B

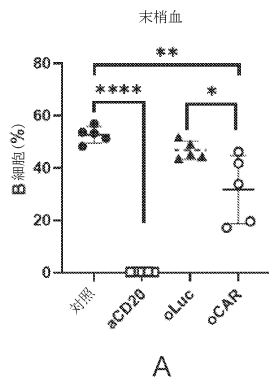


C

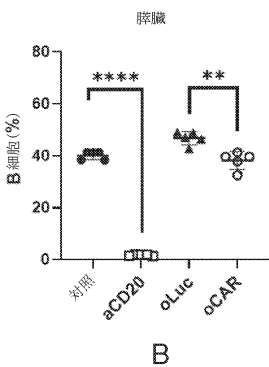
10

20

【 図 6 4 】

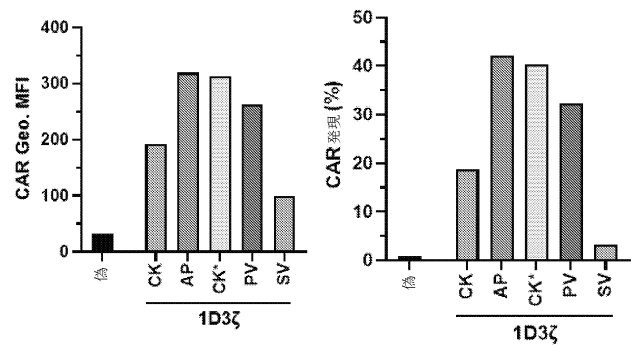


A



B

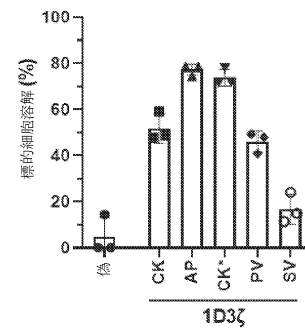
【 図 6 5 】



A

B

30

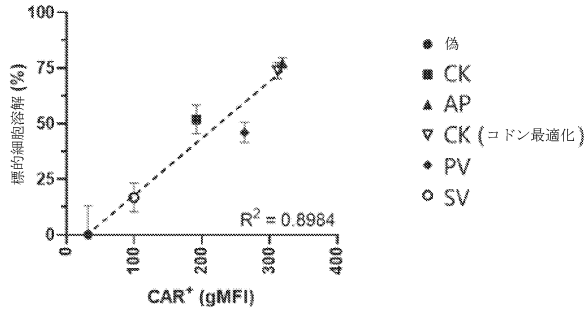


C

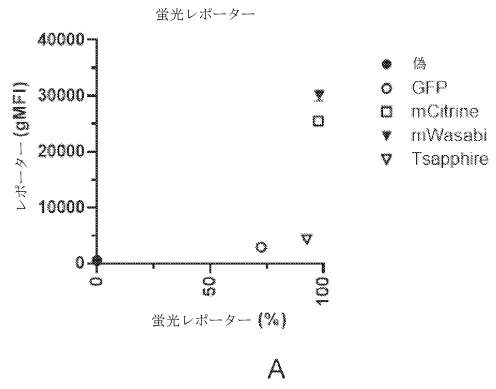
40

50

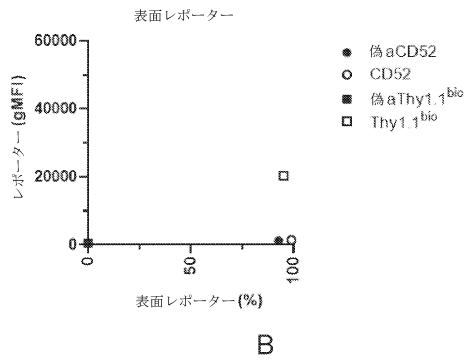
【 図 6 6 】



【 図 6 7 】

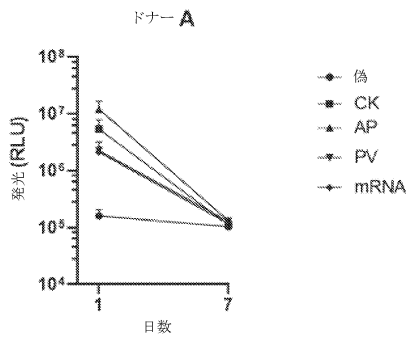


10

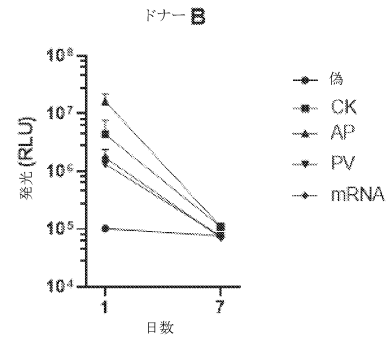


20

【 図 6 8 A 】



【 図 6 8 B 】

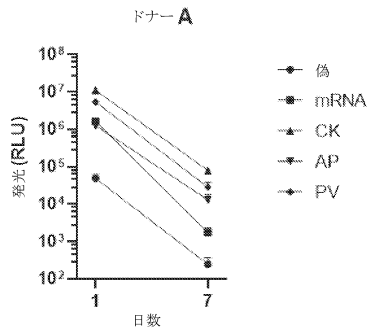


30

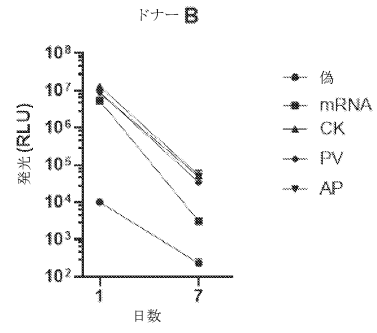
40

50

【 図 6 8 C 】

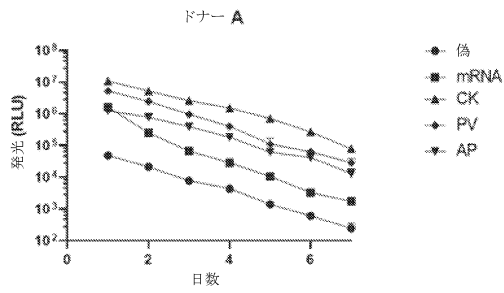


【 図 6 8 D 】

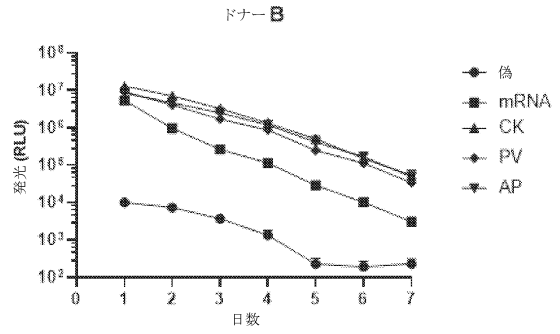


10

【 図 6 8 E 】



【 図 6 8 F 】



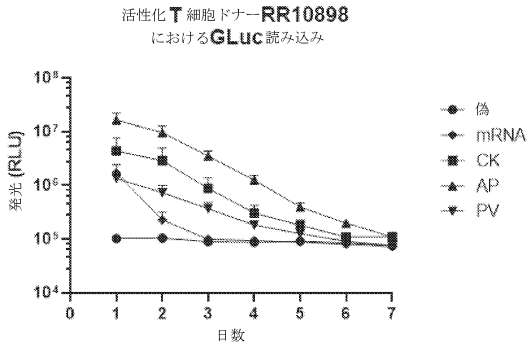
20

30

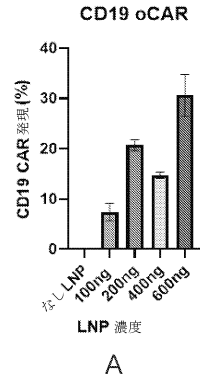
40

50

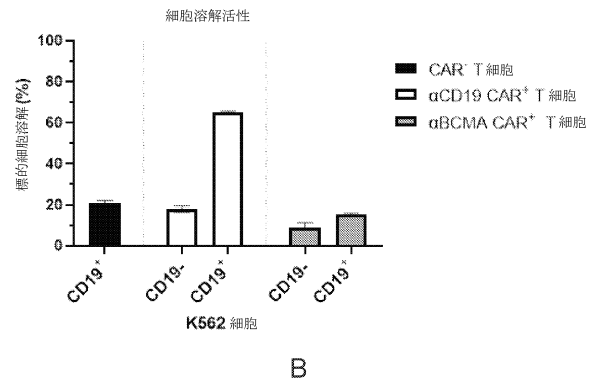
【 図 6 8 G 】



【 図 6 9 】

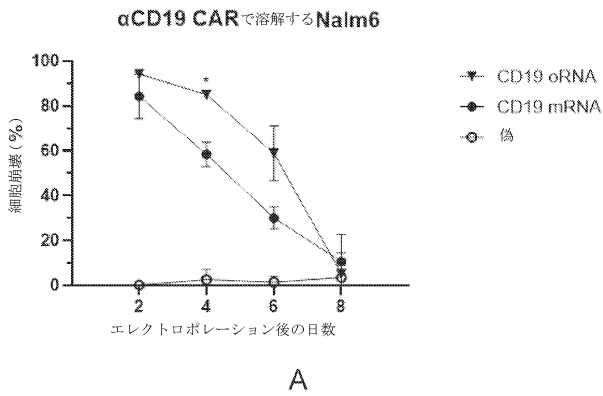


10

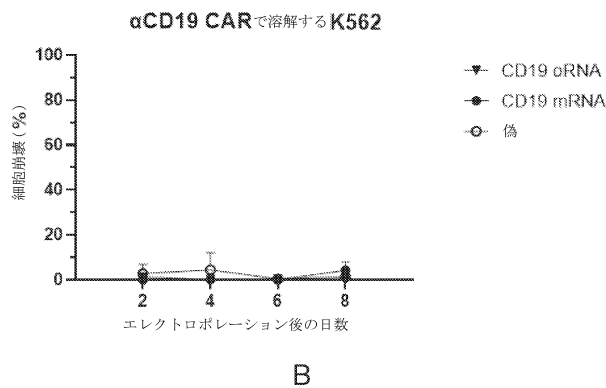


20

【 図 7 0 】

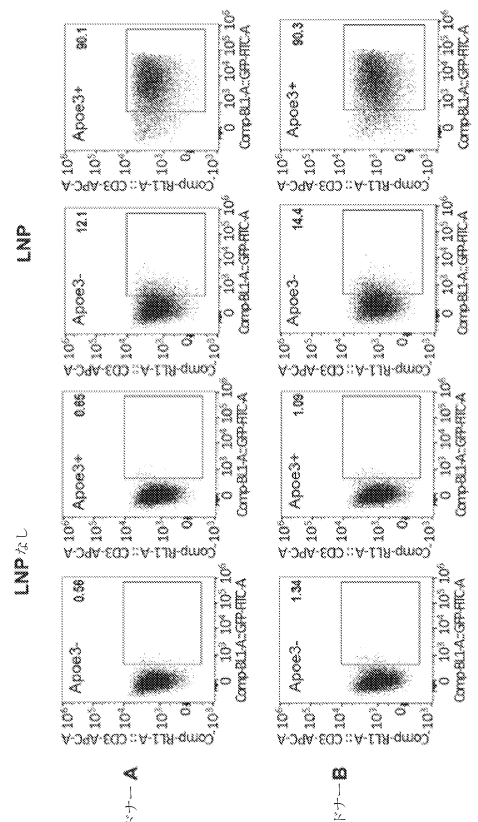


30



40

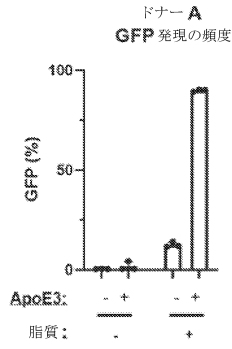
【 図 7 1 A 】



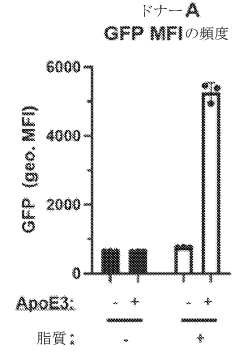
50



【 図 7 1 B 】

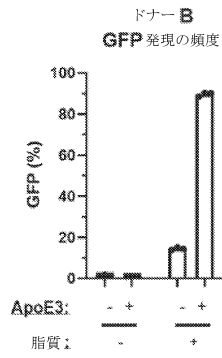


【 図 7 1 C 】

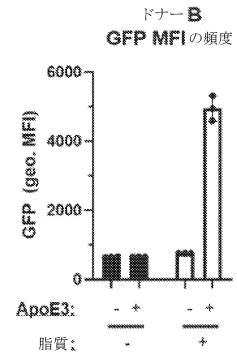


10

【 図 7 1 D 】

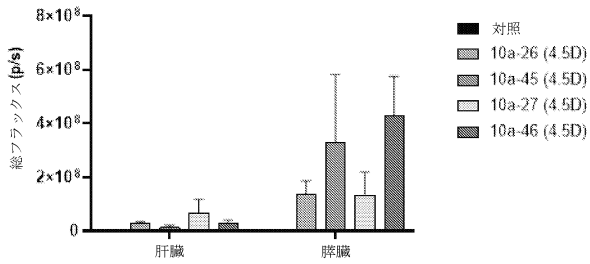


【 図 7 1 E 】

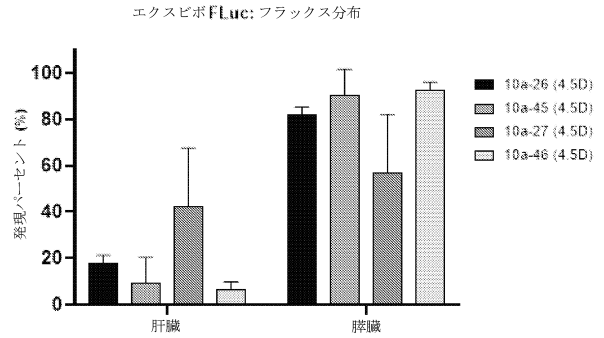


20

【 図 7 2 A 】



【 図 7 2 B 】

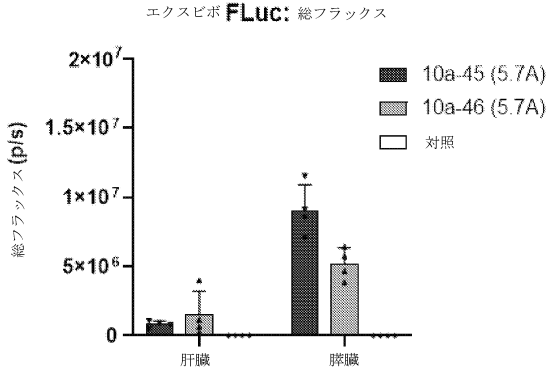


30

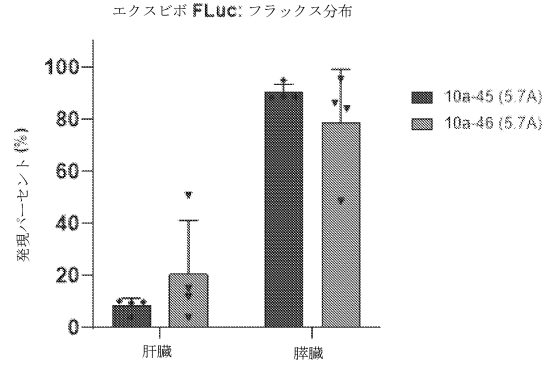
40

50

【 図 7 2 C 】

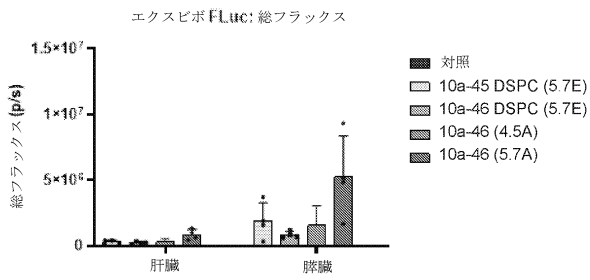


【 図 7 2 D 】

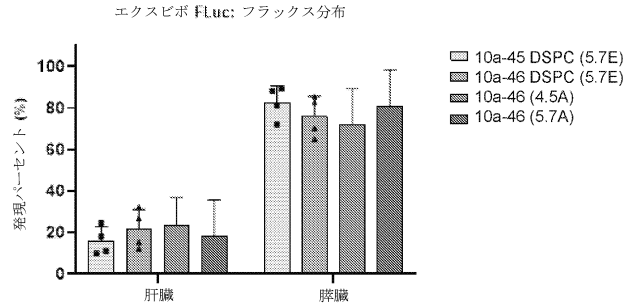


10

【 図 7 2 E 】

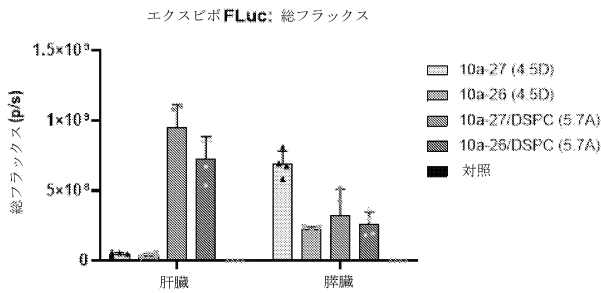


【 図 7 2 F 】

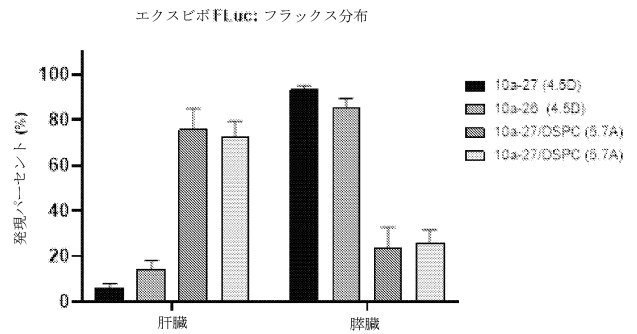


20

【 図 7 2 G 】



【 図 7 2 H 】

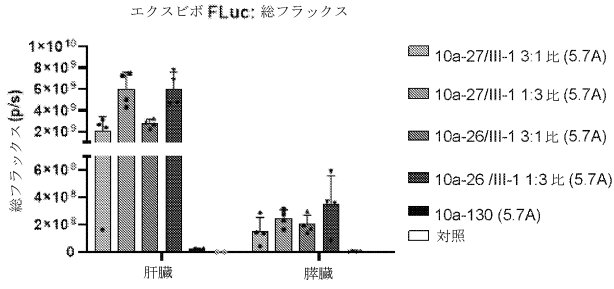


30

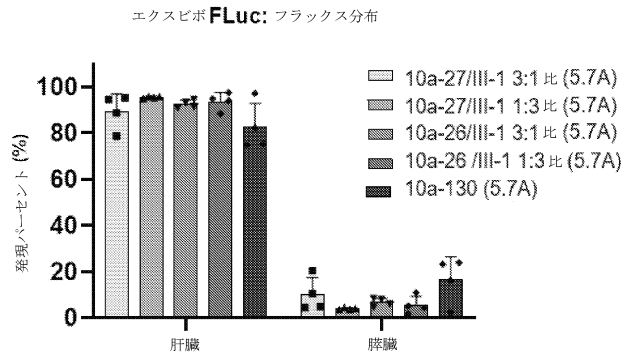
40

50

【 図 7 2 I 】

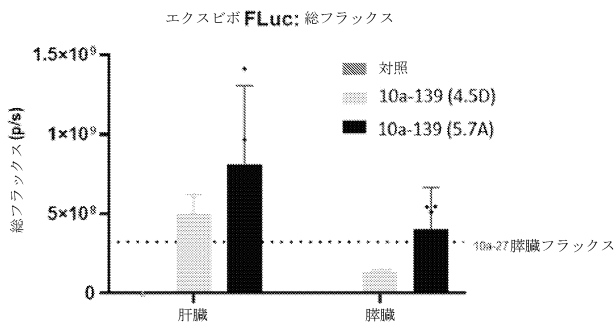


【 図 7 2 J 】

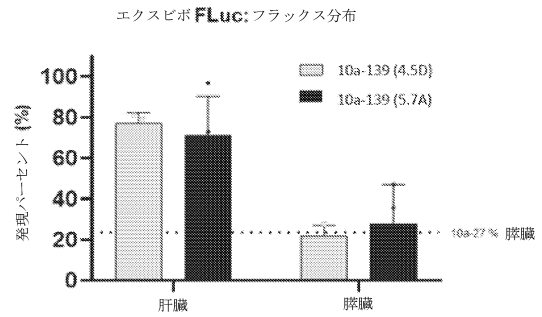


10

【 図 7 2 K 】



【 図 7 2 L 】



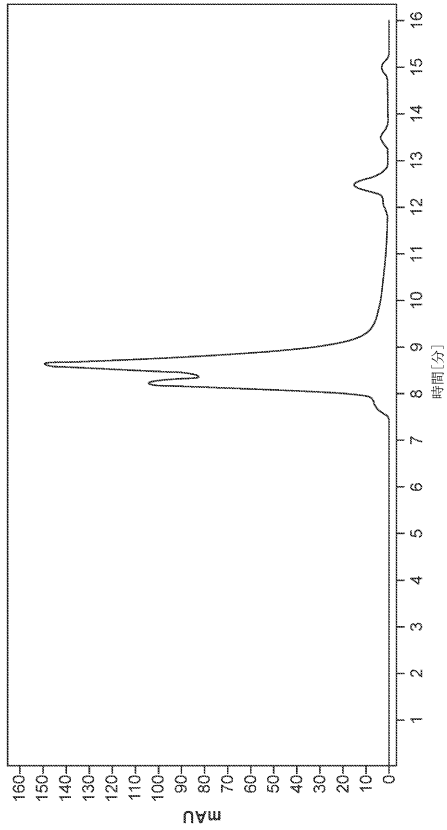
20

30

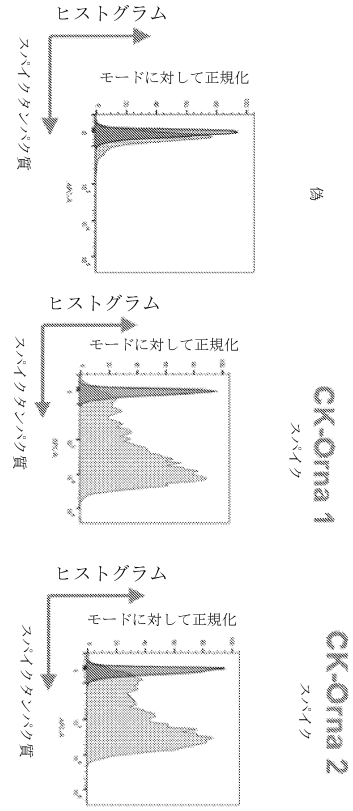
40

50

【図 7 3 A】



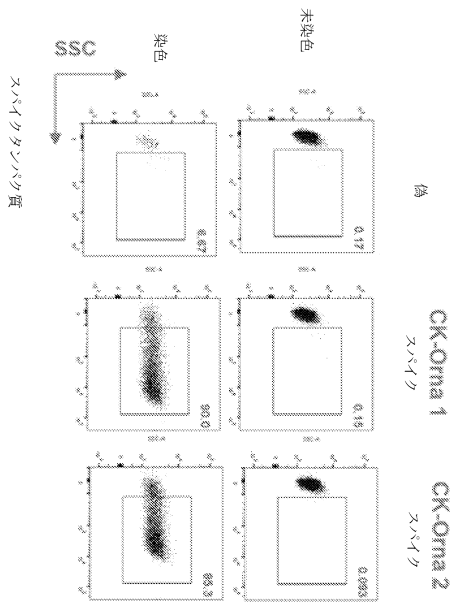
【図 7 3 B】



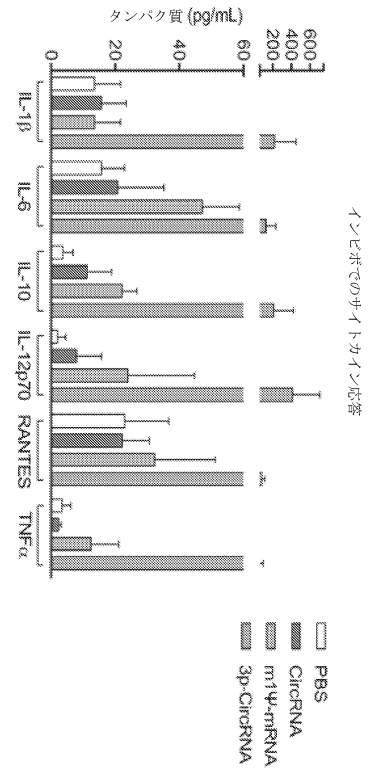
10

20

【図 7 3 C】



【図 7 4】

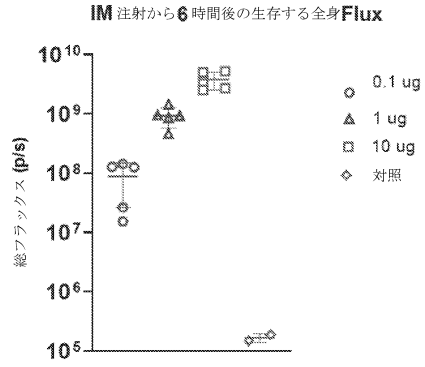


30

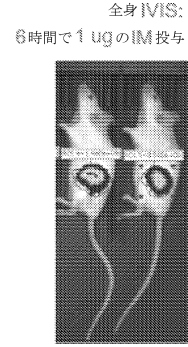
40

50

【 図 7 5 A 】

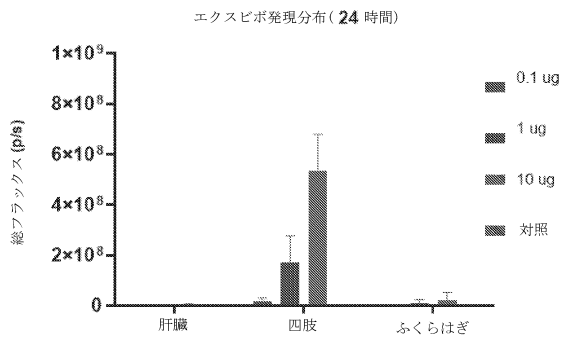


【 図 7 5 B 】

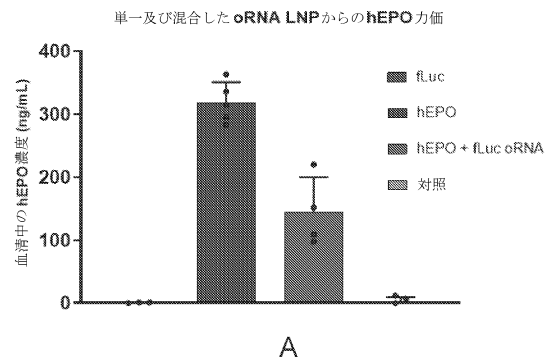


10

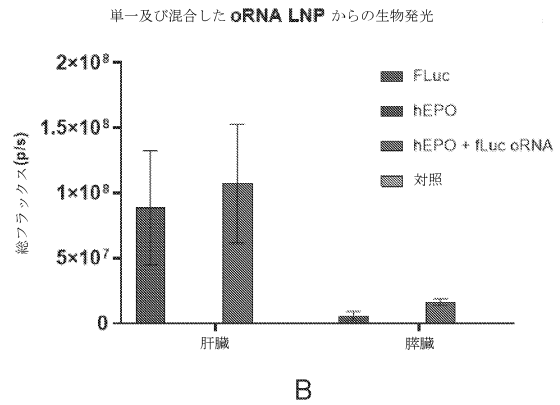
【 図 7 5 C 】



【 図 7 6 】



20

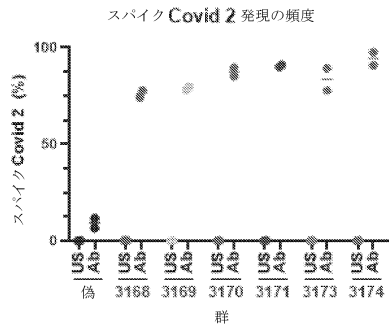


30

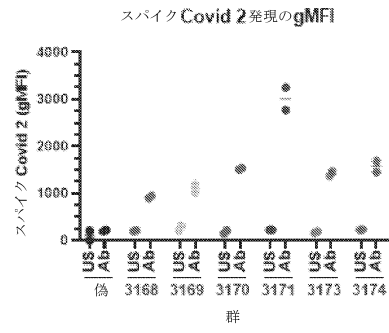
40

50

【 図 7 7 A 】

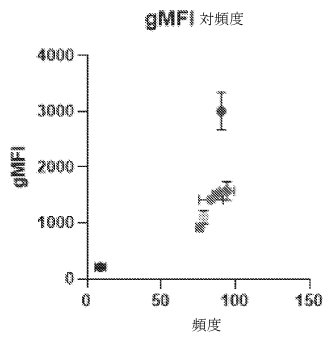


【 図 7 7 B 】



10

【 図 7 7 C 】



20

30

40

50

【 手続補正書 】

【 提出日 】 令和5年2月3日(2023.2.3)

【 手続補正1 】

【 補正対象書類名 】 明細書

【 補正対象項目名 】 配列表

【 補正方法 】 追加

【 補正の内容 】

【 配列表 】

2023527309000001.app

10

20

30

40

50

【 手続補正書 】

【 提出日 】 令和5年3月29日(2023.3.29)

【 手続補正 1 】

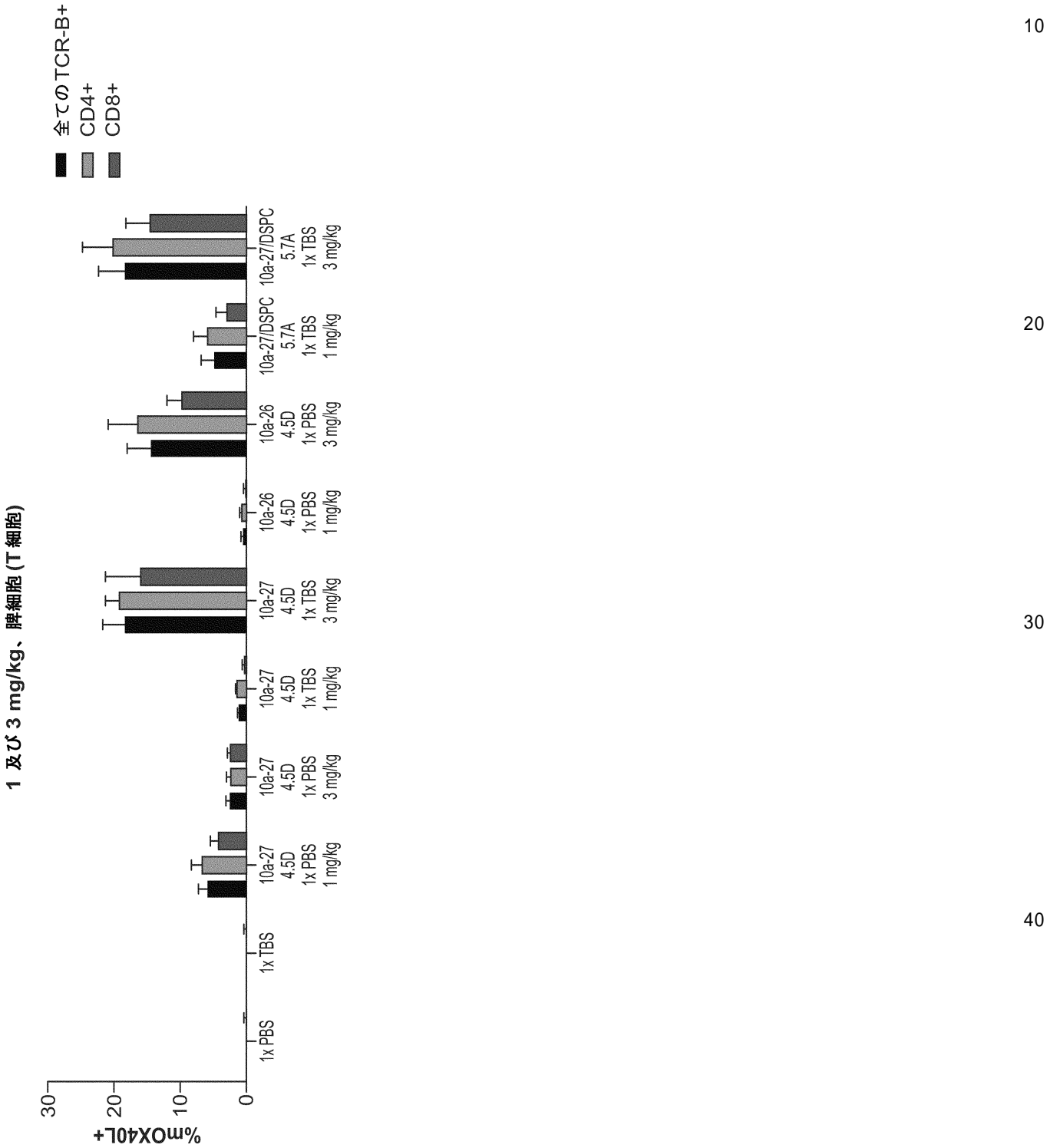
【 補正対象書類名 】 図面

【 補正対象項目名 】 図 6 2 A

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【 図 6 2 A 】



【 手続補正 2 】

【 補正対象書類名 】 図面

10

20

30

40

50

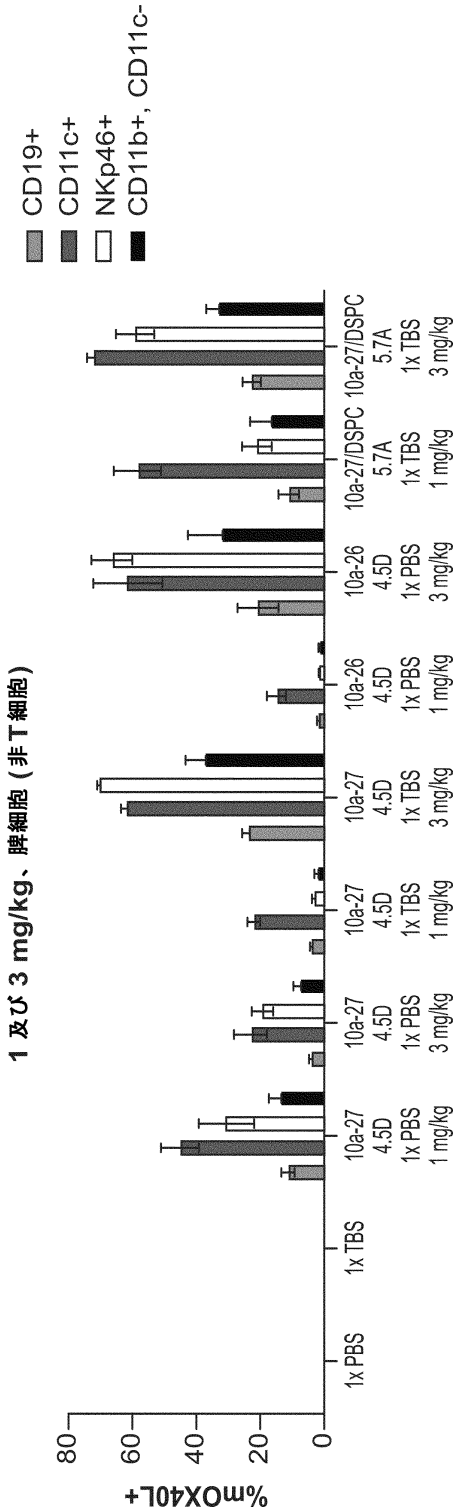


【補正対象項目名】図 6 2 B

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図 6 2 B】



10

20

30

40

【手続補正 3】

【補正対象書類名】図面

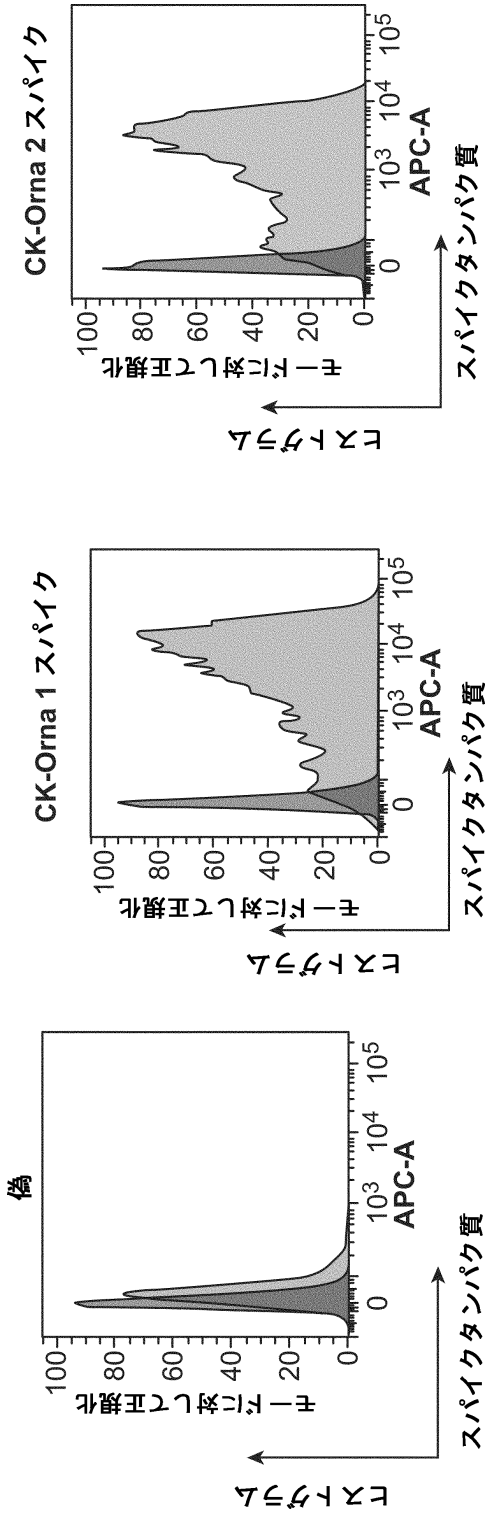
【補正対象項目名】図 7 3 B

【補正方法】変更

【補正の内容】

50

【 図 7 3 B 】



10

20

30

40

【 手続 補正 4 】

【 補正対象書類名 】 図面

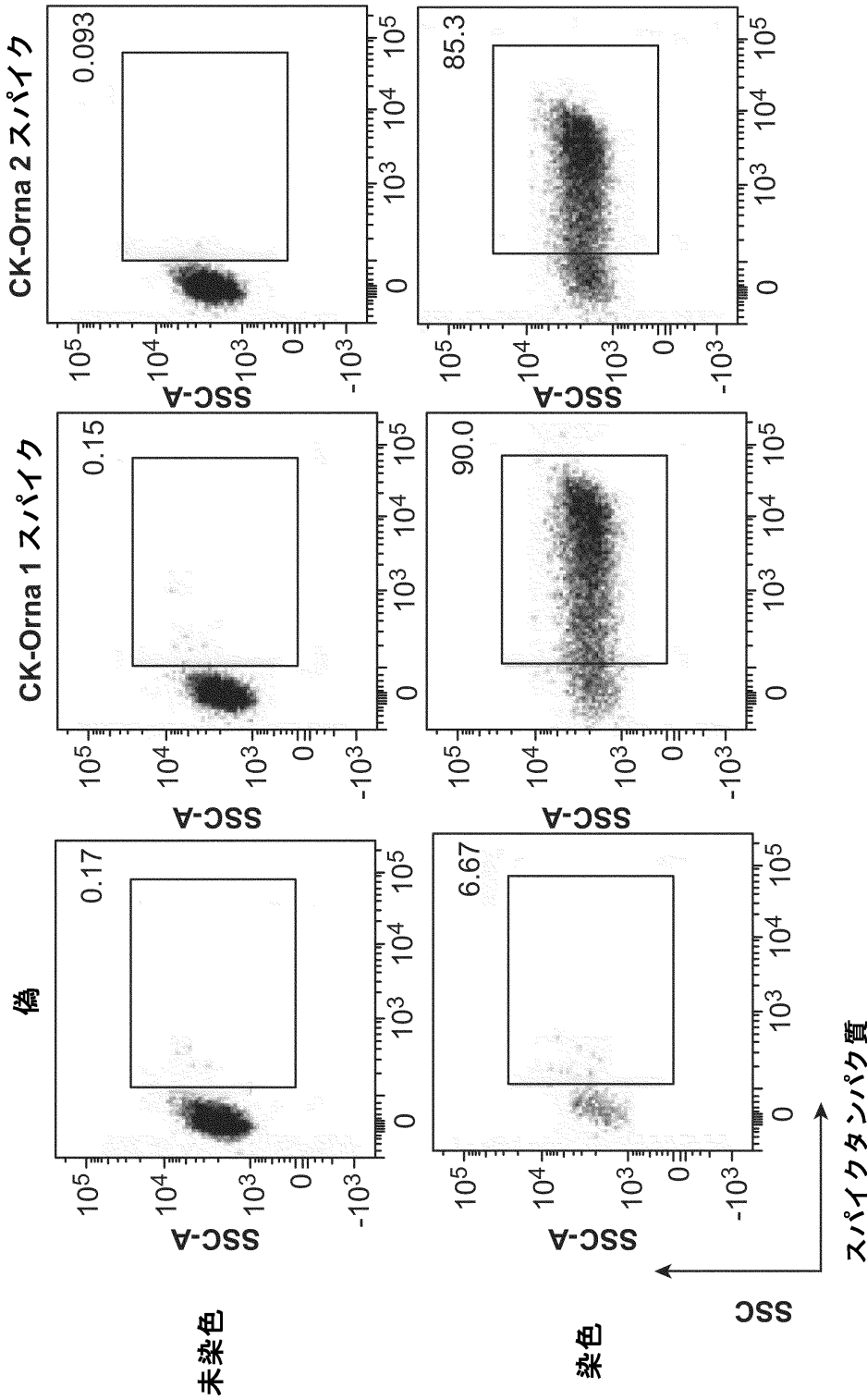
【 補正対象項目名 】 図 7 3 C

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

50

【 図 7 3 C 】



10

20

30

40

【 手続 補正 5 】

【 補正対象書類名 】 図面

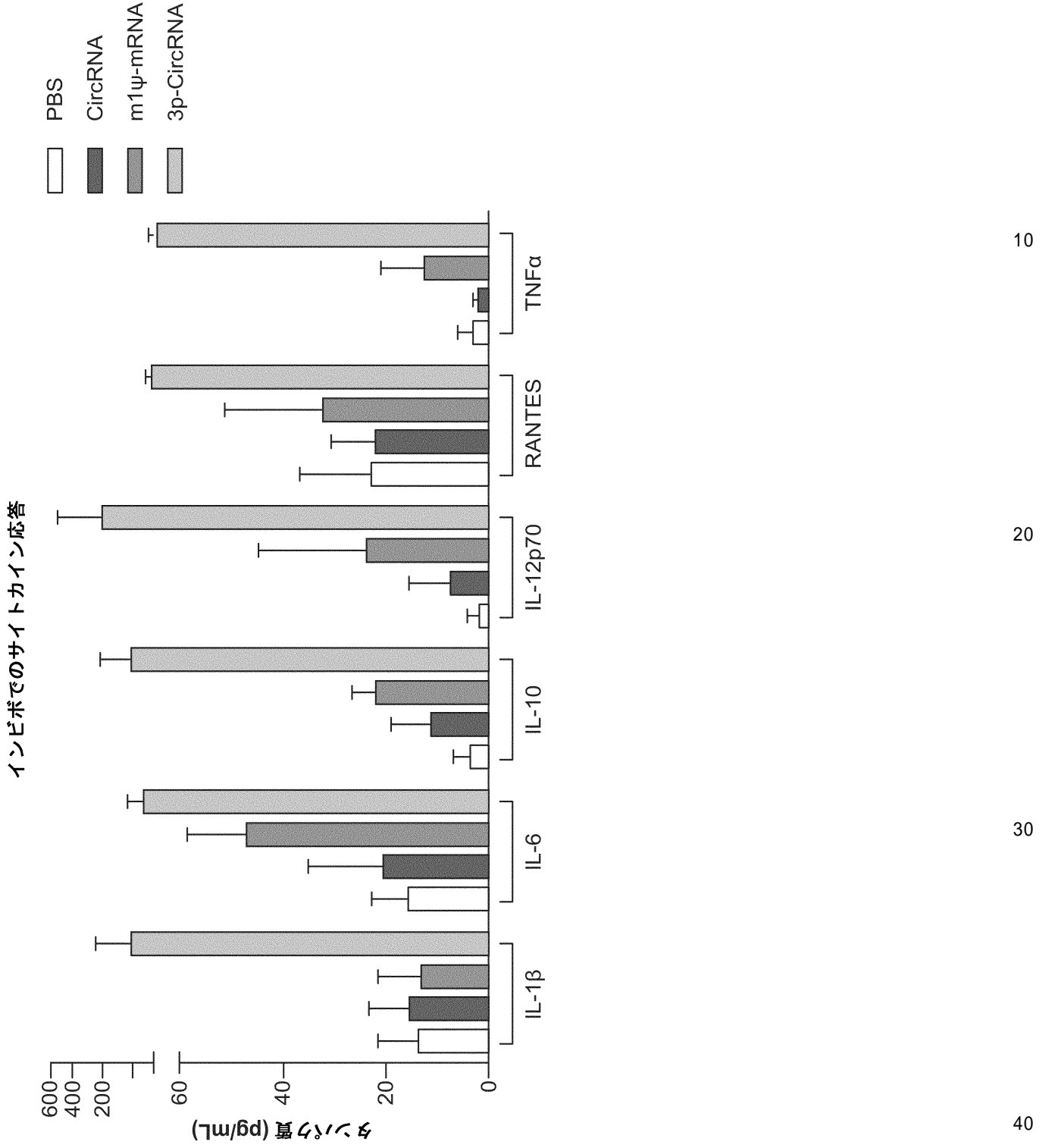
【 補正対象項目名 】 図 7 4

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

50

【 図 7 4 】



10

20

30

40

50

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2021/033276
---

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. A61K48/00 A61K31/7088 C12N15/115 C12N15/64 A61K31/7105 C07K14/725 C12N15/85 C12N15/11 ADD. According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N A61K C40B C07K A01K Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2019/118919 A1 (FLAGSHIP PIONEERING INC [US]; STEWART MORAG HELEN [US] ET AL.) 20 June 2019 (2019-06-20)  [0264,0275]; example 49; [0149-0151]; [0166-0168]; [0275-0276] ----- -/--	1,3, 5-21,32, 33, 36-69, 71-82, 84-102, 121-144
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
6 October 2021		18/10/2021
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Roscoe, Richard

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

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2021/033276
---

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	
Y	<p>WO 2020/023595 A1 (MAYO FOUND MEDICAL EDUCATION &amp; RES [US]; LIVIA CHRISTOPHER [US] ET AL.) 30 January 2020 (2020-01-30)</p> <p>e.g. p.1, 1.27-29; p.6, 1.14-25; p.5-6; Fig.1; p.5, 1.28-30</p> <p>-----</p>	<p>1,3, 5-21,32, 33, 36-69, 71-82, 84-102, 121-144</p>	10
Y	<p>WO 2019/213308 A1 (HUTCHINSON FRED CANCER RES [US]) 7 November 2019 (2019-11-07)</p> <p>para. [0056], [0066], [0069], [0090]; figures 1,2</p> <p>-----</p>	<p>1,3, 5-21,32, 33, 36-69, 71-82, 84-102, 121-144</p>	20
Y	<p>WESSELHOEFT R ALEXANDER ET AL: "RNA Circularization Diminishes Immunogenicity and Can Extend Translation Duration In Vivo", MOLECULAR CELL, vol. 74, no. 3, 15 February 2019 (2019-02-15), page 508, XP085676575, ISSN: 1097-2765, DOI: 10.1016/J.MOLCEL.2019.02.015 Whole doc., in particular p.511, col.2;p.518, col.2; p.515-516; Fig.1A, Fig5B</p> <p>-----</p>	<p>1,3, 5-21,32, 33, 36-69, 71-82, 84-102, 121-144</p>	30
A	<p>METZGAR DAVID ET AL: "Abrupt emergence of diverse species B adenoviruses at US military recruit training centers", JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES, UNIVERSITY OF CHICAGO PRESS, US, vol. 196, no. 10, 1 November 2007 (2007-11-01), pages 1465-1473, XP002534787, ISSN: 0022-1899, DOI: 10.1086/522970 the whole document</p> <p>-----</p>	<p>1,3, 5-21,32, 33, 36-69, 71-82, 84-102, 121-144</p>	
X	<p>US 2016/331828 A1 (CIARAMELLA GIUSEPPE [US] ET AL) 17 November 2016 (2016-11-17)</p> <p>Whole doc., in partic. examples 13 and 15. Tables 2-5.</p> <p>-----</p>	<p>1,3, 5-21,32, 33, 36-69, 71-82, 84-102, 121-144</p>	40
	----- -/--		

3

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

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2021/033276
---

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	
X	<p>US 2019/345503 A1 (CHANG HOWARD Y [US] ET AL) 14 November 2019 (2019-11-14)</p> <p>Whole doc., in particular p.2, 4, 23-25, 39</p> <p>-----</p>	<p>1,3, 5-21,32, 33, 36-69, 71-82, 84-102, 121-144</p>	10
X	<p>BAIL S ET AL: "Tri- to be Mono- for Bacterial mRNA Decay", STRUCTURE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 17, no. 3, 11 March 2009 (2009-03-11) , pages 317-319, XP026093376, ISSN: 0969-2126, DOI: 10.1016/J.STR.2009.02.005 [retrieved on 2009-03-10] the whole document</p> <p>-----</p>	<p>22,23, 26,27, 30,31</p>	20
X	<p>JACEK JEMIELITY ET AL: "Synthetic mRNA cap analogs with a modified triphosphate bridge - synthesis, applications and prospects", NEW JOURNAL OF CHEMISTRY, vol. 34, no. 5, 1 January 2010 (2010-01-01), page 829, XP055747726, GB ISSN: 1144-0546, DOI: 10.1039/c0nj00041h Whole doc., in partic. p.837, col.1</p> <p>-----</p>	<p>22,23, 26,27, 30,31</p>	
X	<p>US 2017/204422 A1 (NELSON JENNIFER [US] ET AL) 20 July 2017 (2017-07-20)</p> <p>Examples 3, 15 , 16 in particular.</p> <p>-----</p>	<p>22-31, 34-40, 42, 44-47, 49-57, 59-68</p>	30
X	<p>US 2019/328769 A1 (UCHIDA SATOSHI [JP] ET AL) 31 October 2019 (2019-10-31)</p> <p>[0258, 0259, 0181,0222]</p> <p>-----</p>	<p>22,23, 26,27, 30,31, 34-40, 42, 44-47, 49-57, 59-68</p>	40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US2021/033276

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

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

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

10

20

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

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

see additional sheet

- 1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
- 2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
- 3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:  
22-31, 34, 35(completely); 1, 3, 5-21, 32, 33, 36-69, 71-82, 84-102  
121-144(partially)
- 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.:

30

40

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.

50



**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/SA/ 210**

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

1. claims: 1, 3, 5-21, 32, 33, 36-69, 71-82, 84-102, 121-144(all partially)

Subject-matter relating to circular RNA comprising in order, 3' Group I intron fragment; IRES; Expression sequence for an antigen (or antigen-like peptide); 5' Group I intron fragment, optionally additionally having flanking duplex-forming regions, wherein the antigen is an adenoviral antigen.

---

2-59. claims: 1, 3, 5-21, 32, 33, 36-69, 71-82, 84-102, 121-144(all partially)

Subject-matter relating to circular RNA comprising in order, 3' Group I intron fragment; IRES; Expression sequence for an antigen (or antigen-like peptide); 5' Group I intron fragment, optionally additionally having flanking duplex-forming regions,

wherein the antigen is an antigen from the list found in claim 84: Herpes simplex, type 1; Herpes simplex, type 2; encephalitis virus, papillomavirus, Varicella-zoster virus; Epstein-barr virus; Human cytomegalovirus; Human herpes virus, type 8; Human papillomavirus; BK virus; JC virus; Smallpox; polio virus; Hepatitis B virus; Human bocavirus; Parvovirus B19; Human astrovirus; Norwalk virus, coxsackievirus; hepatitis A virus; poliovirus; rhinovirus; Severe acute respiratory syndrome virus; Hepatitis C virus; Yellow Fever virus; Dengue virus; West Nile virus; Rubella virus; Hepatitis E virus; Human Immunodeficiency virus (HIV); Influenza virus; Guanarito virus; Junin virus; Lassa virus; Machupo virus; Sabia virus; Crimean-Congo hemorrhagic fever virus; Ebola vims; Marburg virus; Measles virus; Mumps virus; Parainfluenza virus; Respiratory syncytial virus; Human metapneumo virus; Hendra vims; Nipah virus; Rabies virus; Hepatitis D; Rotavirus; Orbivirus; Coltivirus; Banna virus; Human Enterovirus; Hanta virus; Middle East Respiratory Syndrome Corona Virus; Japanese encephalitis virus; Vesicular exanthernavirus; Eastern equine encephalitis.

Note: to avoid confusion, applicant should specify which virus antigen source he is referring to if selecting to pay for any of these invention groups.

It is noted that the SARS-CoV2 aspect is removed from this list and put in the next invention group as it relates to a different group of claim.

---

60. claims: 1, 3, 5-21, 32, 33, 36-69, 71-82, 84-144(all partially)

Subject-matter relating to circular RNA comprising in order, 3' Group I intron fragment; IRES; Expression sequence for an

10

20

30

40

50

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

antigen (or antigen-like peptide); 5' Group I intron fragment, optionally additionally having flanking duplex-forming regions, wherein the antigen is an antigen from SARS-CoV2  
---

10

61. claims: 1, 3, 5-21, 32, 33, 36-69, 71-83, 87-89, 91-102, 121-144(all partially)

Subject-matter relating to circular RNA comprising in order, 3' Group I intron fragment; IRES; Expression sequence for an adjuvant (or adjuvant-like peptide); 5' Group I intron fragment, optionally additionally having flanking duplex-forming regions, It is likely that if this invention group is selected, a further breakdown into specific adjuvant-like peptides would be necessary (if a single one or generic disclosure thereof in the present context were to be found in the art). In this case, only the first example would be analysed.  
---

20

62. claims: 2, 4, 70(completely); 5-21, 32, 33, 36-69, 71-81, 122-130(partially)

Subject-matter relating to circular RNA comprising in order, 3' Group I intron fragment; IRES; non-coding expression sequence; 5' Group I intron fragment, optionally additionally having flanking duplex-forming regions.  
---

63. claims: 22-31, 34, 35(completely); 36-40, 42, 44-47, 49-57, 59-68(partially)

30

Subject-matter relating to alternative types of linear RNA polynucleotide which may or may not be intermediates or impurities in the production of circular mRNA molecules, having 3' or 5' intron fragments and mono- or tri-phosphorylated 5' termini. The exact purpose of these molecules is unclear, or indeed if they have all essential features required for splicing to create a circular RNA (which in any case is not even limited to type I)  
---

64. claims: 82-121, 123-144(all partially)

Provision of further circular RNA (generic - with the additional grouping necessary to cover non-type I intron featuring circular RNA) having an expression sequence encoding at least one viral antigenic polypeptide, adjuvant or adjuvant-like polypeptide, or an immunogenic fragment thereof. This group is in itself highly non-unitary with further formal unity objection unavoidable if paid for.  
---

40

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No  
PCT/US2021/033276

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2017204422 A1	20-07-2017	AU 2015289656 A1	16-02-2017
		CA 2955238 A1	21-01-2016
		EP 3169335 A2	24-05-2017
		JP 2017522028 A	10-08-2017
		US 2017204422 A1	20-07-2017
		WO 2016011222 A2	21-01-2016
-----			
US 2019328769 A1	31-10-2019	CN 110168090 A	23-08-2019
		EP 3564375 A1	06-11-2019
		JP 6792847 B2	02-12-2020
		JP 2021035377 A	04-03-2021
		JP WO2018124181 A1	31-10-2019
		KR 20190102041 A	02-09-2019
		US 2019328769 A1	31-10-2019
WO 2018124181 A1	05-07-2018		
-----			

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No  
PCT/US2021/033276

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2019118919 A1	20-06-2019	AU 2018385757 A1	25-06-2020
		BR 112020011670 A2	17-11-2020
		CA 3084824 A1	20-06-2019
		CN 111819185 A	23-10-2020
		EP 3724208 A1	21-10-2020
		JP 2021508490 A	11-03-2021
		KR 20200127152 A	10-11-2020
		MA 51155 A	21-10-2020
		SG 11202005060Y A	29-06-2020
		US 2019307785 A1	10-10-2019
		US 2020306286 A1	01-10-2020
		US 2021161938 A1	03-06-2021
		US 2021275565 A1	09-09-2021
		WO 2019118919 A1	20-06-2019
WO 2020023595 A1	30-01-2020	AU 2019310448 A1	11-03-2021
		CA 3107456 A1	30-01-2020
		EP 3826643 A1	02-06-2021
		KR 20210057019 A	20-05-2021
		US 2021277393 A1	09-09-2021
		WO 2020023595 A1	30-01-2020
WO 2019213308 A1	07-11-2019	AU 2019262059 A1	03-12-2020
		CA 3104034 A1	07-11-2019
		CN 112055695 A	08-12-2020
		EP 3787996 A1	10-03-2021
		JP 2021523110 A	02-09-2021
		KR 20210014638 A	09-02-2021
		US 2021128485 A1	06-05-2021
		WO 2019213308 A1	07-11-2019
US 2016331828 A1	17-11-2016	AU 2015249553 A1	10-11-2016
		AU 2021203492 A1	24-06-2021
		BR 112016024644 A2	10-10-2017
		CA 2946751 A1	29-10-2015
		CN 106659803 A	10-05-2017
		EP 3134131 A1	01-03-2017
		JP 6881813 B2	02-06-2021
		JP 2017513956 A	01-06-2017
		JP 2021091689 A	17-06-2021
		MA 39900 A	01-03-2017
		RU 2021109685 A	13-04-2021
		SG 10201912038T A	27-02-2020
		SG 11201608798Y A	29-11-2016
		US 2016317647 A1	03-11-2016
		US 2016331828 A1	17-11-2016
		US 2019000959 A1	03-01-2019
		US 2019008948 A1	10-01-2019
		US 2019015501 A1	17-01-2019
		US 2021220467 A1	22-07-2021
		WO 2015164674 A1	29-10-2015
US 2019345503 A1	14-11-2019	AU 2017280943 A1	17-01-2019
		CA 3028682 A1	28-12-2017
		EP 3472193 A1	24-04-2019
		US 2019345503 A1	14-11-2019
		WO 2017222911 A1	28-12-2017

10

20

30

40

## 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	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10
A 6 1 K	31/7088(2006.01)	A 6 1 K	31/7088
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00
A 6 1 K	47/42 (2017.01)	A 6 1 K	47/42
A 6 1 K	47/36 (2006.01)	A 6 1 K	47/36
A 6 1 K	47/34 (2017.01)	A 6 1 K	47/34
A 6 1 K	47/32 (2006.01)	A 6 1 K	47/32
A 6 1 K	9/51 (2006.01)	A 6 1 K	9/51
A 6 1 K	47/68 (2017.01)	A 6 1 K	47/68
A 6 1 P	31/04 (2006.01)	A 6 1 P	31/04
A 6 1 K	47/28 (2006.01)	A 6 1 K	47/28
A 6 1 K	47/12 (2006.01)	A 6 1 K	47/12
A 6 1 K	39/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/00
A 6 1 K	39/13 (2006.01)	A 6 1 K	39/13
A 6 1 K	39/155(2006.01)	A 6 1 K	39/155
A 6 1 K	39/145(2006.01)	A 6 1 K	39/145
A 6 1 K	39/29 (2006.01)	A 6 1 K	39/29
A 6 1 K	39/20 (2006.01)	A 6 1 K	39/20
A 6 1 K	39/12 (2006.01)	A 6 1 K	39/12
A 6 1 P	31/12 (2006.01)	A 6 1 P	31/12
A 6 1 P	31/18 (2006.01)	A 6 1 P	31/18
A 6 1 P	31/16 (2006.01)	A 6 1 P	31/16
A 6 1 K	47/22 (2006.01)	A 6 1 K	47/22
A 6 1 K	47/18 (2017.01)	A 6 1 K	47/18
A 6 1 K	39/39 (2006.01)	A 6 1 K	39/39

H

,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,D  
K,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),O  
A(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,B  
B,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD  
,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,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,Z  
W

(特許庁注：以下のものは登録商標)

## 1 . T R I T O N

弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100188433

弁理士 梅村 幸輔

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707

弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100214396

- 弁理士 塩田 真紀  
 (74)代理人 100121072  
 弁理士 川本 和弥
- (72)発明者 ベッセルヘフト ロバート アレクサンダー  
 アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチューセッツ州 ケンブリッジ メモリアル ドライブ 6 2 0 セ  
 カンド フロア内
- (72)発明者 バーンズ トーマス  
 アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチューセッツ州 ケンブリッジ メモリアル ドライブ 6 2 0 セ  
 カンド フロア内
- (72)発明者 グッドマン ブライアン  
 アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチューセッツ州 ケンブリッジ メモリアル ドライブ 6 2 0 セ  
 カンド フロア内
- (72)発明者 モッツ グレゴリー  
 アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチューセッツ州 ケンブリッジ メモリアル ドライブ 6 2 0 セ  
 カンド フロア内
- (72)発明者 ベッカー エイミー  
 アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチューセッツ州 ケンブリッジ メモリアル ドライブ 6 2 0 セ  
 カンド フロア内
- (72)発明者 ホルホタ アレン ティー .  
 アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチューセッツ州 ケンブリッジ メモリアル ドライブ 6 2 0 セ  
 カンド フロア内
- F ターム (参考) 4B065 AA90Y AA93X AA95Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA45  
 4C076 AA65 AA95 BB11 BB15 BB25 CC06 CC32 CC35 DD49 DD59  
 DD60 DD70 EE05 EE06 EE10 EE12 EE13 EE16 EE23 EE24 EE25  
 EE26 EE32 EE33 EE39 EE41 FF70  
 4C084 AA13 MA38 MA59 MA66 NA13 NA14 ZB09 ZB33 ZB35  
 4C085 AA03 BA51 BA55 BA63 BA69 BA87 BA88 BA89 FF02 FF17  
 FF20 GG03 GG05 GG10  
 4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZB09 ZB33 ZB35