(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2024-519715
(P2024-519715A)
(43)公表日　令和6年5月21日(2024.5.21)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ	*31/7088(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/7088		４Ｂ０６３
Ｃ０７Ｋ	*14/00 (2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	14/00		４Ｃ０７６
Ｃ１２Ｎ	*15/09 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/09	１００	４Ｃ０８４
Ｃ１２Ｑ	*1/02 (2006.01)*	Ｃ１２Ｑ	1/02		４Ｃ０８６
Ａ６１Ｐ	*37/04 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	37/04		４Ｈ０４５

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全121頁）　最終頁に続く

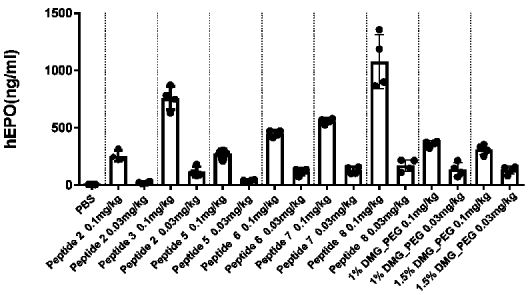
(21)出願番号　特願2023-567914(P2023-567914)
(86)(22)出願日　令和4年5月5日(2022.5.5)
(85)翻訳文提出日　令和5年12月27日(2023.12.27)
(86)国際出願番号　PCT/US2022/027926
(87)国際公開番号　WO2022/235972
(87)国際公開日　令和4年11月10日(2022.11.10)
(31)優先権主張番号　63/184,584
(32)優先日　令和3年5月5日(2021.5.5)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,
最終頁に続く

(71)出願人　513269893
アークトゥラス・セラピューティクス・インコーポレイテッド
Ａｒｃｔｕｒｕｓ　Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ，Ｉｎｃ．
アメリカ合衆国９２１２１カリフォルニア州サンディエゴ、サイエンス・センター・ドライブ１０６２８、スウィート２５０
(74)代理人　100145403
弁理士　山尾 憲人
(74)代理人　100156144
弁理士　落合 康
(72)発明者　ラジャッパン，クマール
アメリカ合衆国９２１２１カリフォルニア
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　ペプチド－脂質コンジュゲートを含む脂質組成物

(57)【要約】
核酸を含有する脂質組成物であって、ペプチド－脂質コンジュゲートを含む、脂質組成物が提供される。ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチドは、４～５２アミノ酸長とすることができる。核酸のインビボ送達において脂質組成物を使用する方法が、さらに提供される。

FIG. 1



【特許請求の範囲】
【請求項１】
核酸を含有する脂質組成物であって、ペプチド－脂質コンジュゲートを含む、脂質組成物。
【請求項２】
前記ペプチド－脂質コンジュゲートの前記ペプチドが、約４個～約５２個のアミノ酸からなる、請求項１に記載の脂質組成物。
【請求項３】
前記ペプチド－脂質コンジュゲートの前記ペプチドが、約８～約５０アミノ酸長である、請求項１に記載の脂質組成物。
【請求項４】
前記ペプチド－脂質コンジュゲートの前記ペプチドが、約８～約４４アミノ酸長である、請求項１に記載の脂質組成物。
【請求項５】
前記ペプチド－脂質コンジュゲートの前記ペプチドが、約８～約４０アミノ酸長である、請求項１に記載の脂質組成物。
【請求項６】
前記ペプチド－脂質コンジュゲートの前記ペプチドが、約８～約３６アミノ酸長である、請求項１に記載の脂質組成物。
【請求項７】
前記ペプチド－脂質コンジュゲートの前記ペプチドが、約８～約３２アミノ酸長である、請求項１に記載の脂質組成物。
【請求項８】
前記ペプチド－脂質コンジュゲートの前記ペプチドが、約８～約２８アミノ酸長である、請求項１に記載の脂質組成物。
【請求項９】
前記ペプチド－脂質コンジュゲートの前記ペプチドが、約８～約２４アミノ酸長である、請求項１に記載の脂質組成物。
【請求項１０】
前記ペプチド－脂質コンジュゲートの前記ペプチドが、約８～約２０アミノ酸長である、請求項１に記載の脂質組成物。
【請求項１１】
前記ペプチド－脂質コンジュゲートの前記ペプチドが、１２個のアミノ酸からなる、請求項１に記載の脂質組成物。
【請求項１２】
前記ペプチド－脂質コンジュゲートの前記ペプチドが、１６個のアミノ酸からなる、請求項１に記載の脂質組成物。
【請求項１３】
前記ペプチド－脂質コンジュゲートの前記ペプチドが、２０個のアミノ酸からなる、請求項１に記載の脂質組成物。
【請求項１４】
前記ペプチド－脂質コンジュゲートの前記ペプチドが、２４個のアミノ酸からなる、請求項１に記載の脂質組成物。
【請求項１５】
前記ペプチド－脂質コンジュゲートの前記ペプチドが、３２個のアミノ酸からなる、請求項１に記載の脂質組成物。
【請求項１６】
前記ペプチド－脂質コンジュゲートの前記ペプチド中の前記アミノ酸の少なくとも約１４％がプロリンである、請求項１に記載の脂質組成物。
【請求項１７】

前記ペプチド中の前記アミノ酸が、約１４％～約６０％がプロリンである、請求項１５に記載の脂質組成物。
【請求項１８】
前記ペプチド中の前記アミノ酸が、約２０％～約６０％がプロリンである、請求項１５に記載の脂質組成物。
【請求項１９】
前記ペプチド中の前記アミノ酸が、約２５％～約６０％がプロリンである、請求項１５に記載の脂質組成物。
【請求項２０】
前記ペプチド－脂質コンジュゲートの前記ペプチド中の前記アミノ酸の少なくとも約２８％～約８０％が親水性側鎖を有する、請求項１に記載の脂質組成物。
【請求項２１】
前記ペプチド中の前記アミノ酸の約３５％～約８５％が親水性側鎖を有する、請求項１に記載の脂質組成物。
【請求項２２】
前記ペプチド中の前記アミノ酸の約３５％～約８０％が親水性側鎖を有する、請求項１に記載の脂質組成物。
【請求項２３】
前記ペプチド中の前記アミノ酸の約４０％～約７５％が親水性側鎖を有する、請求項１に記載の脂質組成物。
【請求項２４】
前記ペプチド中の前記アミノ酸の約４５％～約８５％が親水性側鎖を有する、請求項１に記載の脂質組成物。
【請求項２５】
前記ペプチド中の前記アミノ酸の約５０％～約７５％が親水性側鎖を有する、請求項１に記載の脂質組成物。
【請求項２６】
親水性側鎖を有する前記アミノ酸が、グルタミン、グルタミン酸、アスパラギン、アスパラギン酸、セリン、Ｏ－Ｃ$_{1-6}$アルキルセリン、トレオニン、およびＯ－Ｃ$_{1-6}$アルキルトレオニンから選択される、請求項１に記載の脂質組成物。
【請求項２７】
前記ペプチド－脂質コンジュゲートの前記ペプチド中の前記アミノ酸の約４３％未満がグリシンである、請求項１に記載の脂質組成物。
【請求項２８】
前記ペプチド中の前記アミノ酸の約３０％未満がグリシンである、請求項２７に記載の脂質組成物。
【請求項２９】
前記ペプチド中の前記アミノ酸の約２０％未満がグリシンである、請求項２７に記載の脂質組成物。
【請求項３０】
前記ペプチド中の前記アミノ酸の約１０％未満がグリシンである、請求項２７に記載の脂質組成物。
【請求項３１】
前記ペプチド中の前記アミノ酸の約５％未満がグリシンである、請求項２７に記載の脂質組成物。
【請求項３２】
前記ペプチドがグリシンを有しない、請求項１に記載の脂質組成物。
【請求項３３】
前記脂質組成物が、リポプレックス、リポソーム、脂質ナノ粒子、ポリマー系担体、エクソソーム、層状体、ミセル、およびエマルションから選択される、請求項１に記載の脂

質組成物。
【請求項３４】
前記リポソームが、カチオン性リポソーム、ナノリポソーム、プロテオリポソーム、単層リポソーム、多層リポソーム、セラミド含有ナノリポソーム、および多小胞リポソームから選択される、請求項３３に記載の脂質組成物。
【請求項３５】
前記脂質組成物が、脂質ナノ粒子である、請求項３３に記載の脂質組成物。
【請求項３６】
前記脂質ナノ粒子が、約２００ｎｍ未満のサイズを有する、請求項３５に記載の脂質組成物。
【請求項３７】
前記脂質組成物が、１つ以上のカチオン性脂質、１つ以上のヘルパー脂質、およびステロールを含む、請求項１に記載の脂質組成物。
【請求項３８】
前記ペプチド－脂質コンジュゲートが、前記脂質組成物中の全ての脂質の約０．１ｍｏｌ％～約１０ｍｏｌ％を含む、請求項１に記載の脂質組成物。
【請求項３９】
前記ペプチド－脂質コンジュゲートが、前記脂質組成物中の全ての脂質の約０．５ｍｏｌ％～約５ｍｏｌ％を含む、請求項３８に記載の脂質組成物。
【請求項４０】
前記ペプチド－脂質コンジュゲートが、前記脂質組成物中の全ての脂質の約１．０ｍｏｌ％～約３ｍｏｌ％を含む、請求項３８に記載の脂質組成物。
【請求項４１】
前記脂質組成物が、前記核酸を封入する、請求項１に記載の脂質組成物。
【請求項４２】
前記脂質組成物が、前記核酸に複合体化される、請求項１に記載の脂質組成物。
【請求項４３】
前記ペプチド－脂質コンジュゲートの前記脂質が、リンカーを介してペプチドにコンジュゲートされる、請求項１に記載の脂質組成物。
【請求項４４】
前記リンカーが、アミド（－Ｃ（Ｏ）ＮＨ－）、アミノ（－ＮＲ^{Ｎ}－）から選択される基を含む構造を有し、式中、Ｒ^{Ｎ}が、Ｈ、Ｃ$_{1-6}$アルキル、カルボニル（－Ｃ（Ｏ）－）、カルバメート（－ＮＨＣ（Ｏ）Ｏ－）、尿素（－ＮＨＣ（Ｏ）ＮＨ－）、ジスルフィド（－Ｓ－Ｓ－）、エーテル（－Ｏ－）、スクシニル（－（Ｏ）ＣＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｃ（Ｏ）－）、スクシンアミジル（－ＮＨＣ（Ｏ）ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｃ（Ｏ）ＮＨ－）、エーテル、カーボネート（－ＯＣ（Ｏ）Ｏ－）、スクシノイル、リン酸エステル（－Ｏ－（Ｏ）ＰＯＨ－Ｏ－）、およびスルホン酸エステルから選択される、請求項４３に記載の脂質組成物。
【請求項４５】
前記ペプチド－脂質コンジュゲートの前記脂質が、ジデシルオキシプロピル（Ｃ$_{10}$）、ジラウリルオキシプロピル（Ｃ$_{12}$）、ジミリスチルオキシプロピル（Ｃ$_{14}$）、ジパルミチルオキシプロピル（Ｃ$_{16}$）、またはジステアリルオキシプロピル（Ｃ$_{18}$）、１，２－ジパルミチルオキシプロピル－３－アミン（ＤＯＭＧ）、１，２－ジミリスチルオキシプロピルアミン（ＤＭＧ）、１，２－ジラウロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホリルエタノールアミン（ＤＬＰＥ）、ジミリストイル－ホスファチジルエタノールアミン（ＤＭＰＥ）、ジパルミトイル－ホスファチジルエタノールアミン（ＤＰＰＥ）、ジパルミトイルホスファチジルコリン（ＤＰＰＣ）、ジオレオイル－ホスファチジルエタノールアミン（ＤＯＰＥ）、ジステアロイル－ホスファチジルエタノールアミン（ＤＳＰＥ）、およびコレステロールまたはコレステロール誘導体から選択される、請求項１に記載の脂質組成物。
【請求項４６】

前記ペプチドが、そのＣ末端において前記ペプチド－脂質コンジュゲートの前記脂質にコンジュゲートされ、かつ前記ペプチドの前記Ｎ末端の前記アミノ基が、１つまたは２つのC_{1-6}アルキル基またはアミド基で置換される、請求項１に記載の脂質組成物。

【請求項４７】

前記ペプチドが、そのＮ末端において前記ペプチド－脂質コンジュゲートの前記脂質にコンジュゲートされ、かつ前記ペプチドの前記Ｃ末端における前記アミノ酸が、アルキル化されてC_{1-6}アルキルエステルを形成するか、またはアミド化される、請求項１に記載の脂質組成物。

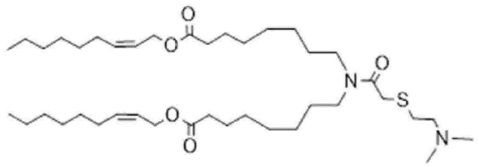
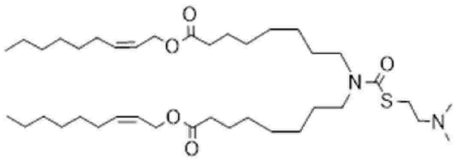
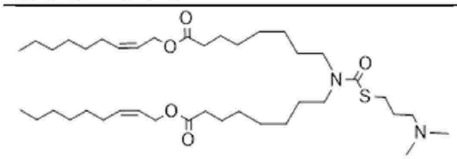
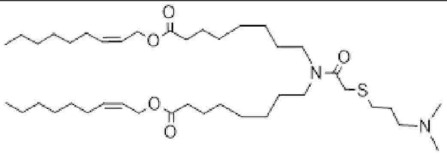
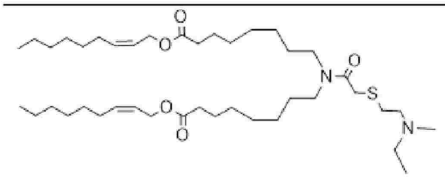
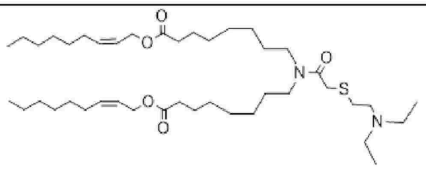
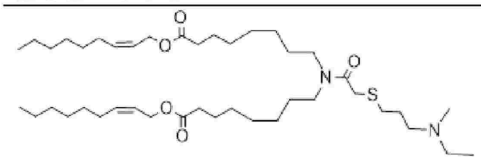
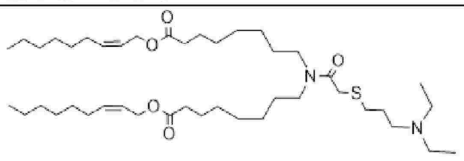
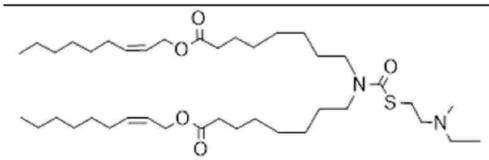
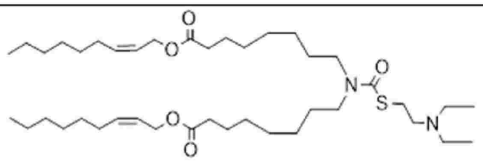
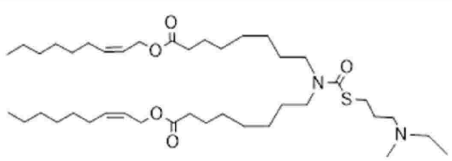
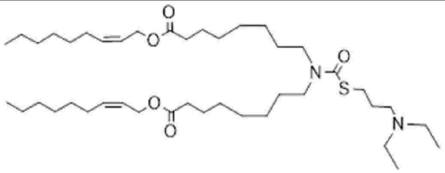
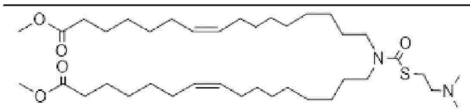
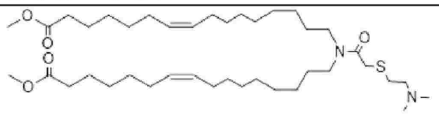
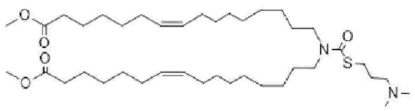
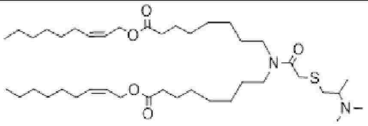
【請求項４８】

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（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（ＤＯＳＰＡ）、１，２－ジオレオイル－３－ジメチルアンモニウムプロパン－（ＤＯＤＡＰ）、１，２－ジオレオイル－３－トリメチルアンモニウム－プロパン（ＤＯＴＡＰ）、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（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（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（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（ＤＬｅｎＤＭＡ）、Ｎ－ジオレイル－Ｎ，Ｎ－ジメチルアンモニウムクロリド（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（ＤＤＡＢ）、Ｎ－（１，２－ジミリチルオキシプロパ－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（ＤＭＲＩＥ）、３－ジメチルアミノ－２－（コレスト－５－エン－３－ベーター－オキシブタン－４－オキシ）－１－（シス，シス－９，１２－ｏｃ－タデカジエンオキシ）プロパン（ＣＬｉｎＤＭＡ）、２－［５’－（コレスト－５－エン－３－ベーター－オキシ）－３’－オキサペントキシ）－３－ジメチル１－１－（シス，シス－９’，１－２’－オクタデカジエンオキシ）プロパン（ＣｐＬｉｎＤＭＡ）、Ｎ，Ｎ－ジメチル－３，４－ジオレイルオキシベンジルアミン（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（ＤＯｃａｒｂＤＡＰ）、２，３－ジリノレオイルオキシ－Ｎ，Ｎ－ジメチルプロピルアミン（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（ＤＬｉｎｃａｒｂＤＡＰ）、１，２－ジリノレオイルカルバミル－３－ジメチルアミノプロパン（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（ＤＬｉｎ－Ｋ－ＤＭＡ）、および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）から選択される、１つ以上のカチオン性脂質をさらに含む、請求項３７に記載の脂質組成物。

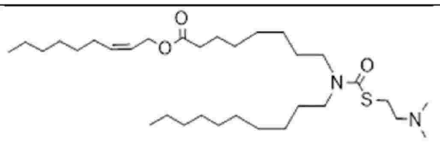
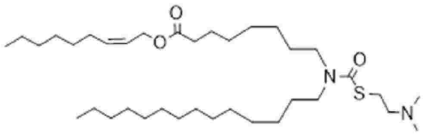
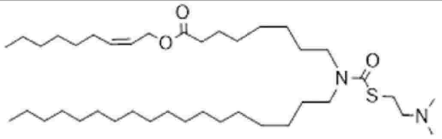
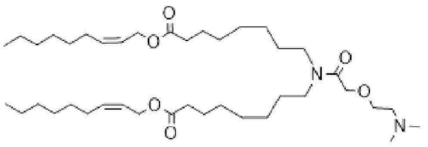
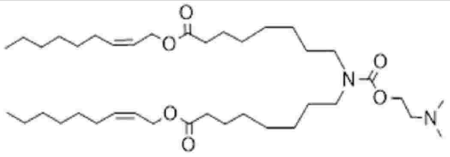
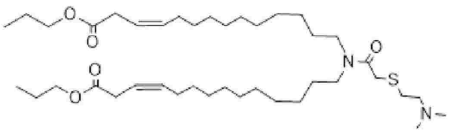
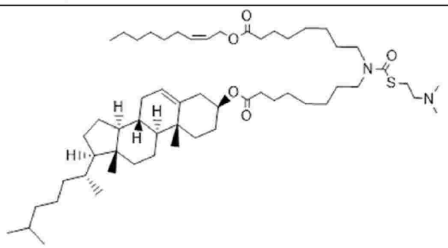
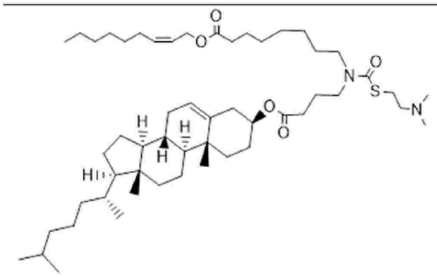
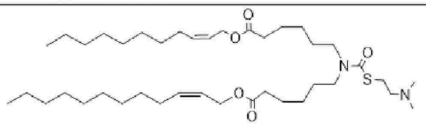
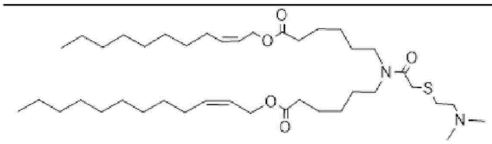
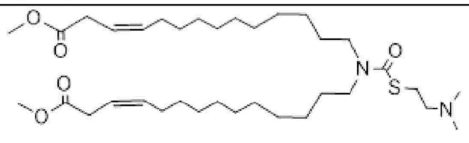
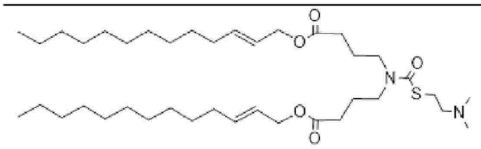
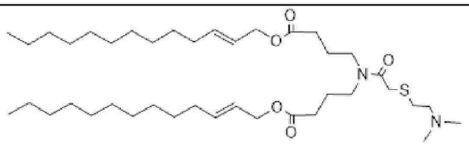
【請求項４９】

以下

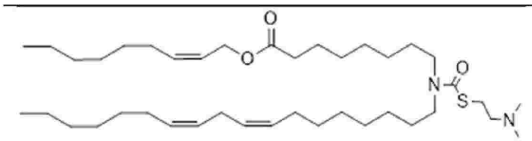
【化１－１】

	
ＡＴＸ－００１	ＡＴＸ－００２
	
ＡＴＸ－００３	ＡＴＸ－００４
	
ＡＴＸ－００５	ＡＴＸ－００６
	
ＡＴＸ－００７	ＡＴＸ－００８
	
ＡＴＸ－００９	ＡＴＸ－０１０
	
ＡＴＸ－０１１	ＡＴＸ－０１２
	
ＡＴＸ－０１３	ＡＴＸ－０１４
	
ＡＴＸ－０１５	ＡＴＸ－０１６

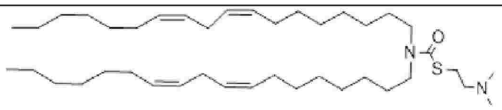
【化１－２】

	
	ＡＴＸ－０１８
	
ＡＴＸ－０１９	ＡＴＸ－０２０
	
ＡＴＸ－０２１	ＡＴＸ－０２２
	
ＡＴＸ－０２３	ＡＴＸ－０２４
	
ＡＴＸ－０２５	ＡＴＸ－０２６
	
ＡＴＸ－０２７	ＡＴＸ－０２８
	
ＡＴＸ－０２９	ＡＴＸ－０３０

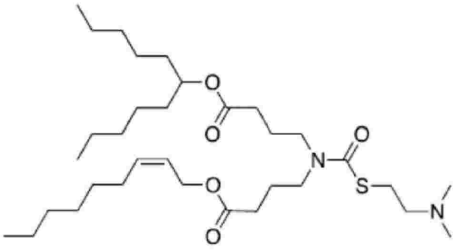
【化１－３】



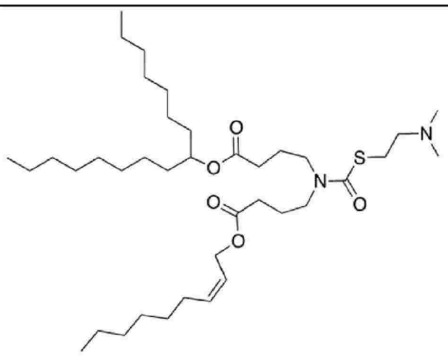
ＡＴＸ－０３１



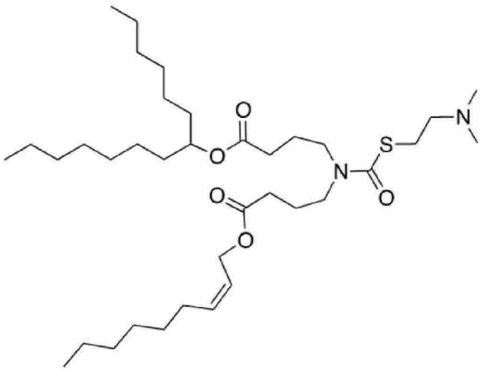
ＡＴＸ－０３２



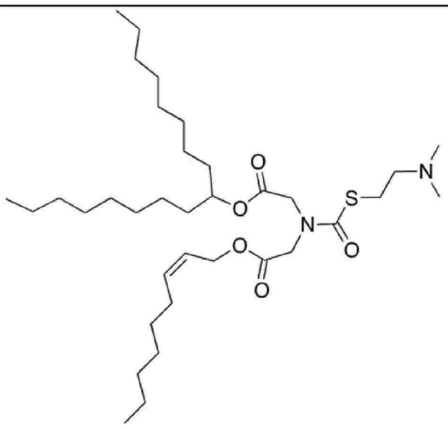
ＡＴＸ－４３



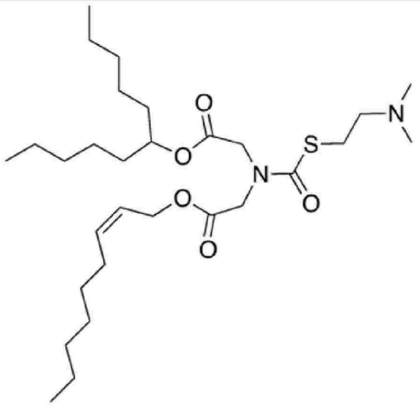
ＡＴＸ－０５７



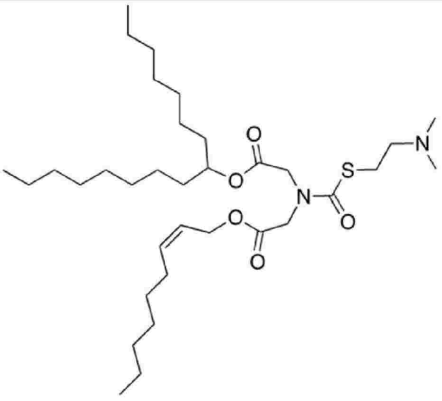
ＡＴＸ－０５８



ＡＴＸ－０６１

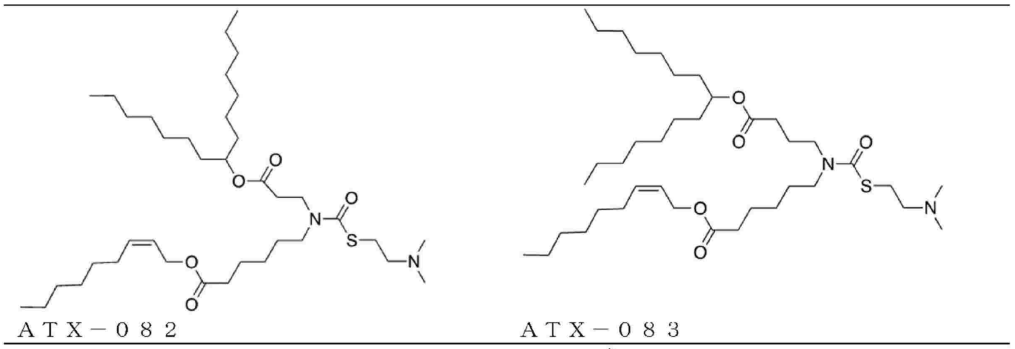


ＡＴＸ－０６３

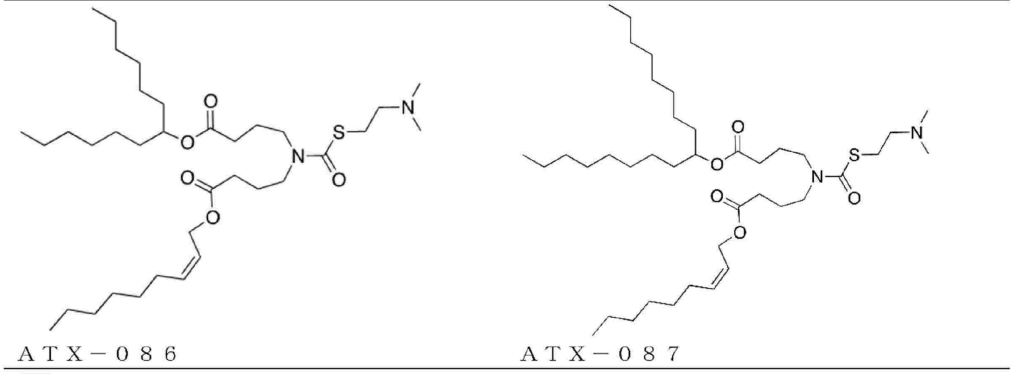


ＡＴＸ－０６４

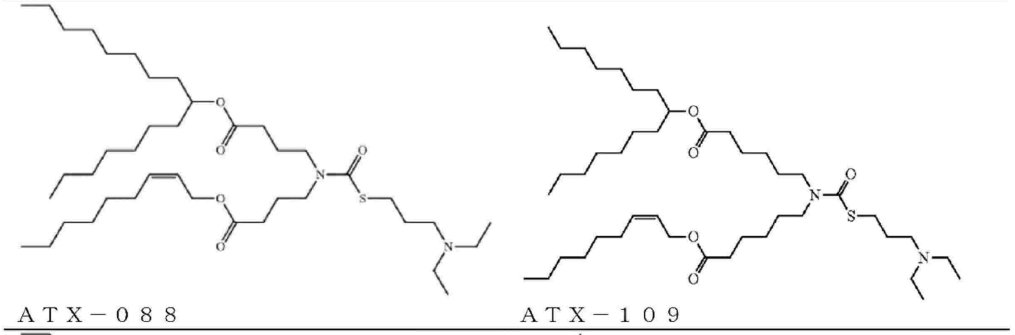
【化１－４】


ＡＴＸ－０８２

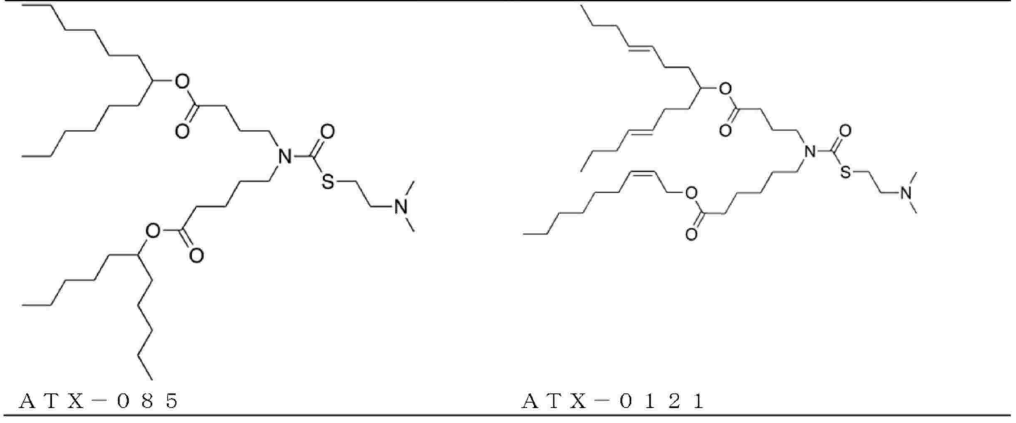
ＡＴＸ－０８３


ＡＴＸ－０８６

ＡＴＸ－０８７

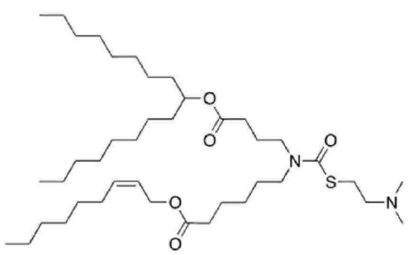

ＡＴＸ－０８８

ＡＴＸ－１０９

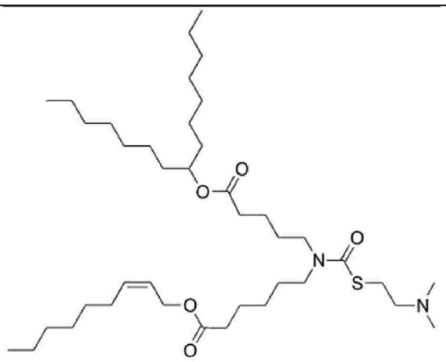

ＡＴＸ－０８５

ＡＴＸ－０１２１

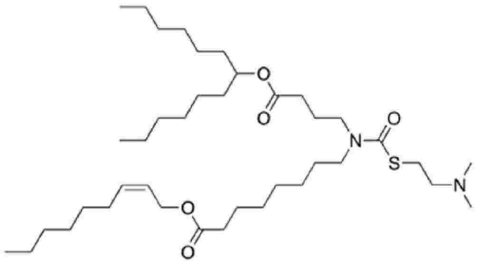
【化１－５】



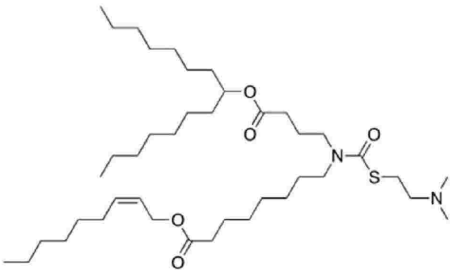
ＡＴＸ－０９１



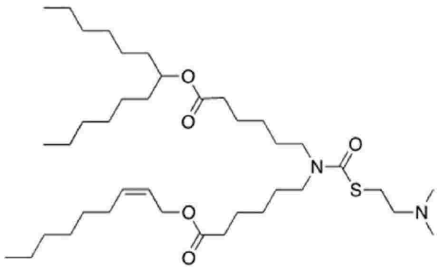
ＡＴＸ－０１０２



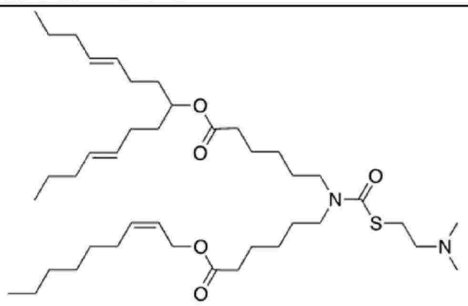
ＡＴＸ－０９８



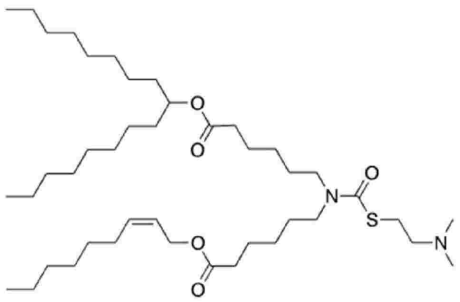
ＡＴＸ－０９２



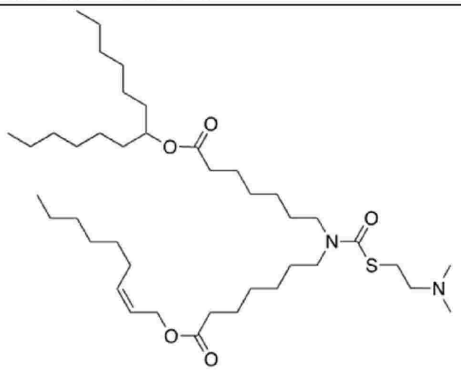
ＡＴＸ－０８４



ＡＴＸ－０１２５

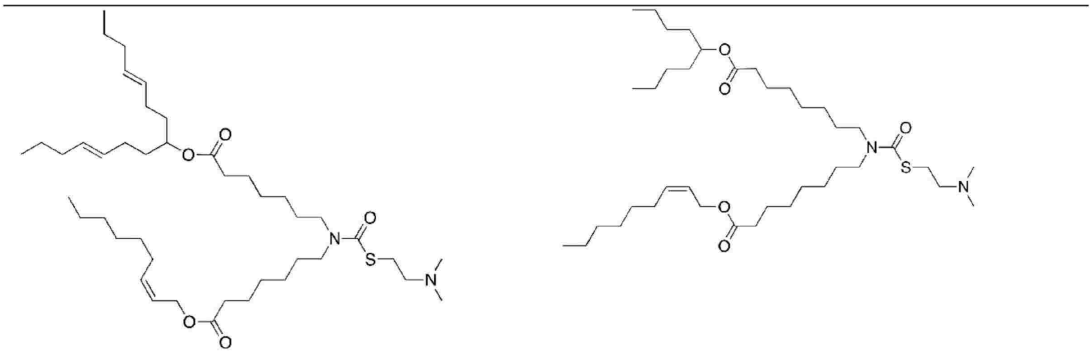


ＡＴＸ－０９４

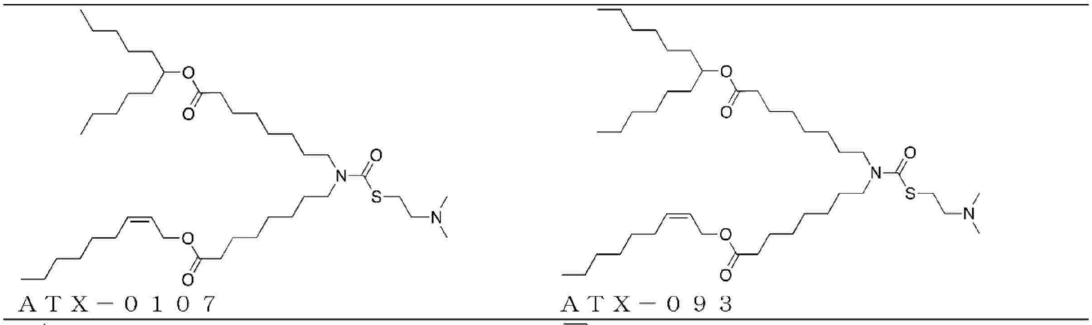


ＡＴＸ－０１１０

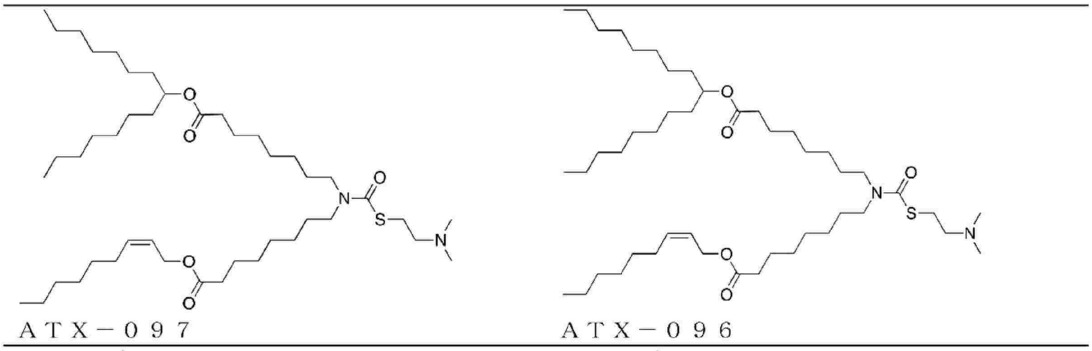
【化１－６】


ＡＴＸ－０１１８

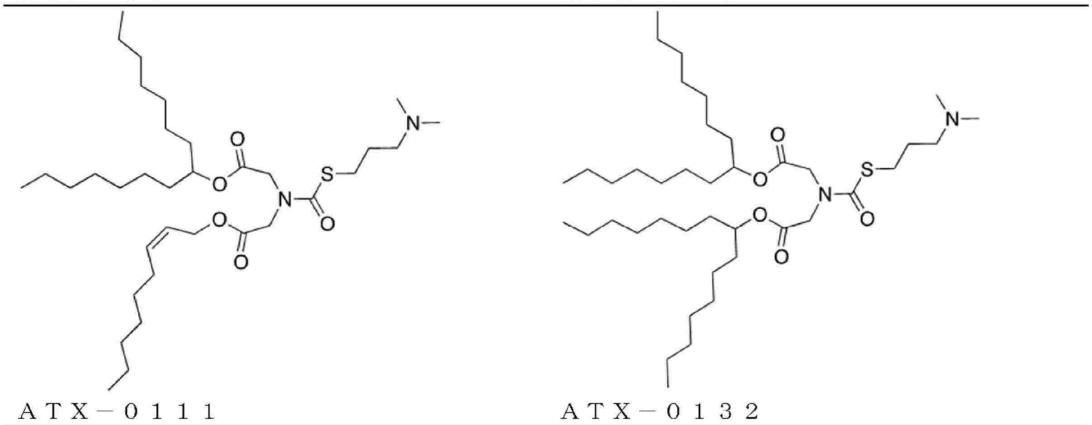
ＡＴＸ－０１０８


ＡＴＸ－０１０７

ＡＴＸ－０９３

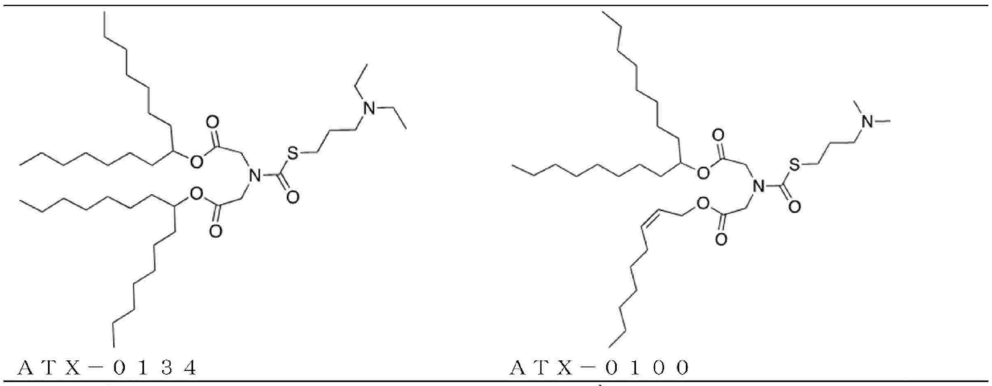

ＡＴＸ－０９７

ＡＴＸ－０９６

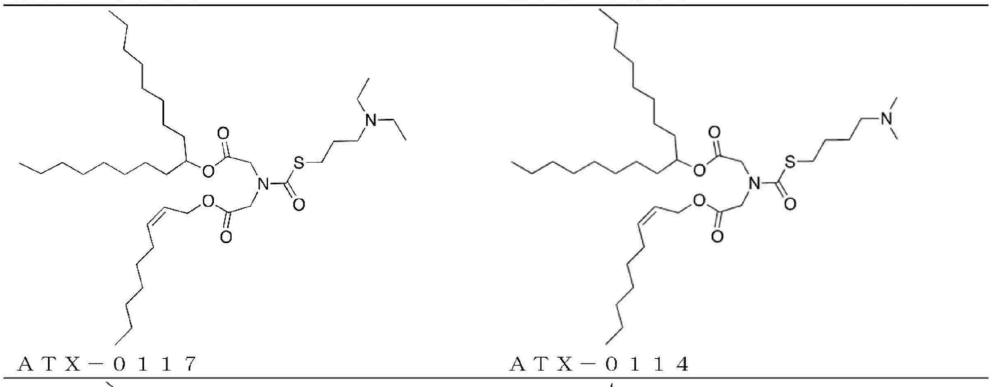

ＡＴＸ－０１１１

ＡＴＸ－０１３２

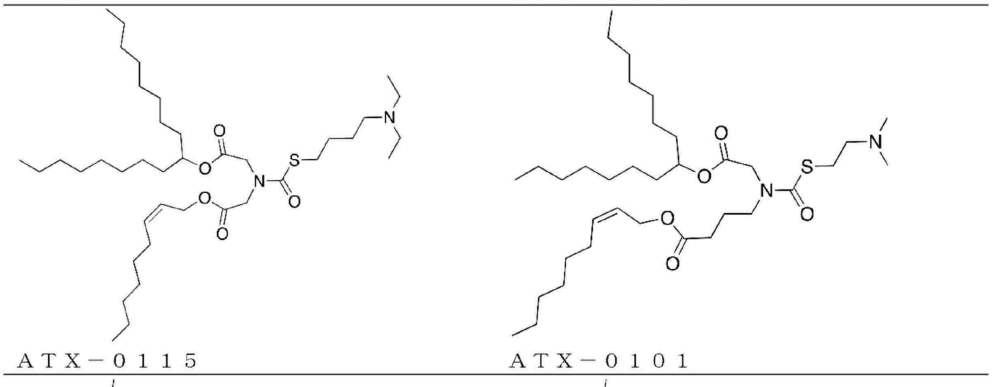
【化１－７】


ＡＴＸ－０１３４

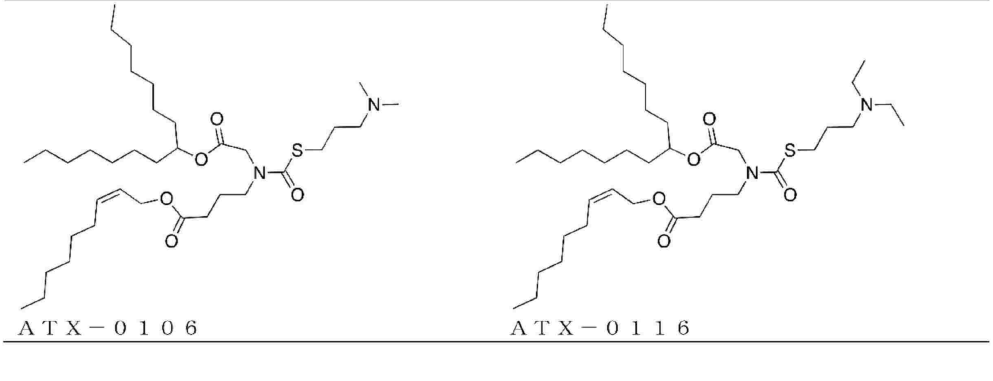
ＡＴＸ－０１００


ＡＴＸ－０１１７

ＡＴＸ－０１１４

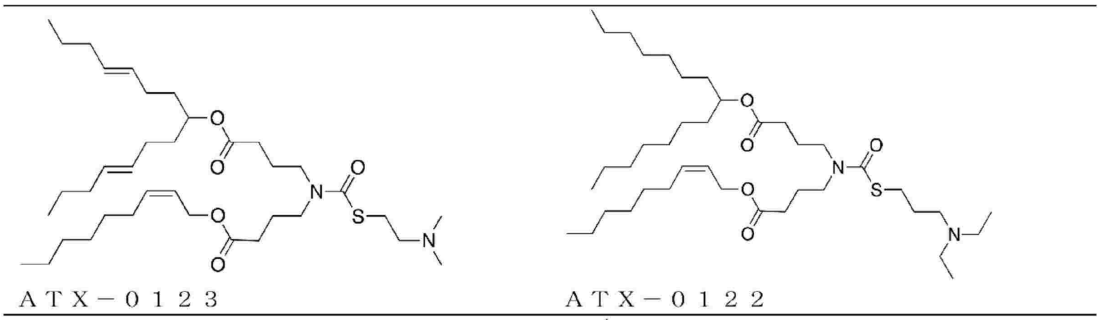

ＡＴＸ－０１１５

ＡＴＸ－０１０１

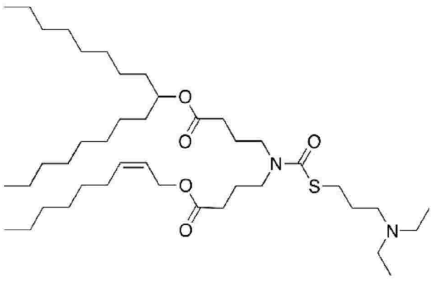

ＡＴＸ－０１０６

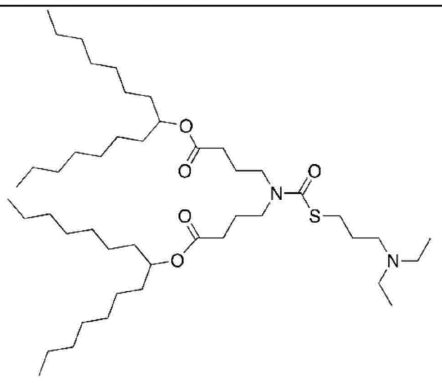
ＡＴＸ－０１１６

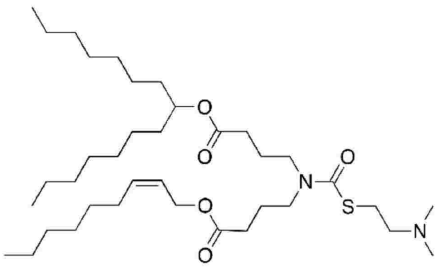
【化１－８】

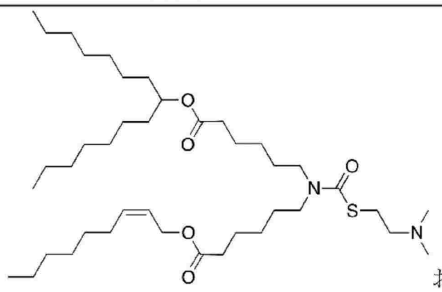

ＡＴＸ－０１２３

ＡＴＸ－０１２２

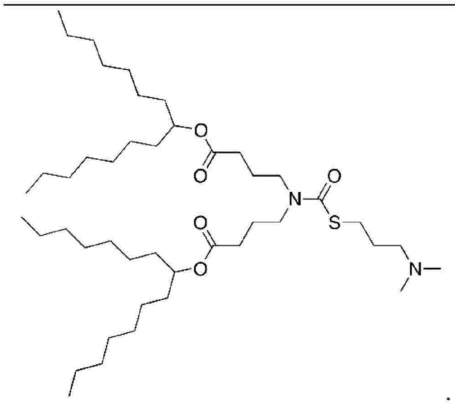

ＡＴＸ－０１２４


ＡＴＸ－０１２９


ＡＴＸ－０８１


ＡＴＸ－０９５

および


ＡＴＸ－０１２６

から選択されるイオン性カチオン性脂質をさらに含む、請求項３７に記載の脂質組成物。

【請求項５０】

１つ以上のヘルパー脂質をさらに含む、請求項１に記載の脂質組成物。

【請求項５１】

ペプチド－脂質コンジュゲートおよび核酸を含む脂質組成物であって、

ａ．ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチドは、約４個～約５２個のアミノ酸からなり、

ｂ．ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチド中のアミノ酸の少なくとも約１４％がプロリンであり、

ｃ．ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチド中のアミノ酸の約２８％～約８０％が親水性側鎖を有し、
ｄ．ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチド中のアミノ酸の約４３％未満がグリシンであり、
ｅ．脂質組成物は、１つ以上のカチオン性脂質、１つ以上のヘルパー脂質、およびステロールを含み、
ｆ．ペプチド－脂質コンジュゲートは、脂質組成物中の全ての脂質の約０．１ｍｏｌ％～約１０ｍｏｌ％を含む、脂質組成物。
【請求項５２】
前記核酸が、ｓｉＲＮＡ、アンチセンスオリゴヌクレオチド、ＵＮＡオリゴマー、ｍＲＮＡ、マイクロＲＮＡ、およびＤＮＡから選択される、請求項１に記載の脂質組成物。
【請求項５３】
前記核酸がｍＲＮＡである、請求項５２に記載の脂質組成物。
【請求項５４】
前記ｍＲＮＡが自己複製ｍＲＮＡである、請求項５３に記載の脂質組成物。
【請求項５５】
前記核酸がｓｉＲＮＡである、請求項５２に記載の脂質組成物。
【請求項５６】
前記ペプチドが、１２個のアミノ酸からなる、請求項５１に記載の脂質組成物。
【請求項５７】
前記ペプチドが、１６個のアミノ酸からなる、請求項５１に記載の脂質組成物。
【請求項５８】
前記ペプチドが、２０個のアミノ酸からなる、請求項５１に記載の脂質組成物。
【請求項５９】
前記ペプチドが、２４個のアミノ酸からなる、請求項５１に記載の脂質組成物。
【請求項６０】
前記ペプチドが、２８個のアミノ酸からなる、請求項５１に記載の脂質組成物。
【請求項６１】
前記ペプチドが、３２個のアミノ酸からなる、請求項５１に記載の脂質組成物。
【請求項６２】
それを必要とする対象において疾患を治療する方法であって、請求項１に記載の脂質組成物を投与することを含む、方法。
【請求項６３】
細胞を請求項５３に記載の脂質組成物と接触させることを含む、前記細胞において興味のあるタンパク質またはポリペプチドを発現する方法。
【請求項６４】
請求項５３に記載の脂質組成物を含むワクチン。
【請求項６５】
請求項６４に記載のワクチンを対象に投与することを含む、前記対象において免疫応答を誘発する方法。
【請求項６６】
細胞を請求項５５に記載の脂質組成物と接触させることを含む、前記細胞において興味のある遺伝子またはメッセンジャーＲＮＡの発現を阻害する方法。
【請求項６７】
請求項５３に記載の脂質組成物を対象に投与することを含む、興味のあるタンパク質またはポリペプチドが欠損している前記対象において前記興味のあるタンパク質またはポリペプチドを発現する方法であって、前記ｍＲＮＡが前記対象のタンパク質またはポリペプチドをコードする、方法。
【請求項６８】
細胞を請求項５３に記載の脂質組成物と接触させることを含む、前記細胞中の遺伝子を

編集する方法であって、前記ｍＲＮＡが、遺伝子編集酵素をコードする、方法。
【請求項６９】
前記遺伝子編集酵素がＴＡＬＥＮ酵素である、請求項６８に記載の方法。
【請求項７０】
細胞を請求項１に記載の脂質組成物と接触させることを含む、前記細胞に核酸を送達する方法。
【請求項７１】
請求項１に記載の脂質組成物を対象に投与することを含む、前記対象における疾患を予防する方法。
【請求項７２】
前記投与が静脈内または筋肉内である、請求項６２に記載の方法。
【請求項７３】
細胞を請求項１に記載の脂質組成物と接触させることを含む、細胞を撮像する方法であって、前記核酸が検出可能なタンパク質をコードする、方法。
【請求項７４】
ｉ）前記脂質核酸を前記ペプチド－脂質コンジュゲートと接触させることと、
ｉｉ）前記ペプチド－脂質コンジュゲートが前記核酸を封入することを可能にすることと、を含む、請求項１に記載の脂質組成物を作製する方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願の相互参照
本出願は、２０２１年５月５日に出願された米国仮特許出願第６３／１８４，５８４号に対する優先権を主張するものであり、参照によりその全体があらゆる目的のために本明細書に組み込まれる。
【０００２】
本開示は、脂質コンジュゲートに関する。より具体的には、本開示は、脂質送達技術に有用なペプチド－脂質コンジュゲートに関する。
【背景技術】
【０００３】
ヒト対象の細胞または組織への治療剤の送達は、その治療効果のために重要であり、通常、標的細胞および組織に到達する化合物の限定的な能力によって阻害される。正味のイオン電荷を有する多くの巨大分子および分子は、細胞に入る際に複数の障壁に直面しており、そのような薬剤を特定の興味のある細胞型に送達しなければならない場合、問題はさらに複雑になる。小分子薬剤とは異なり、これらのタイプの分子は、細胞膜にわたる受動拡散を受けない。免疫グロブリンなどの生物学的に活性なタンパク質、ならびにゲノムＤＮＡ、ｃＤＮＡ、ｍＲＮＡ、およびｓｉＲＮＡなどのポリヌクレオチドクラスの潜在的治療薬、アンチセンスオリゴヌクレオチド、ならびに特定の低分子量ペプチド、ペプチドホルモン、および抗生物質さえも、患者の組織への効果的な標的化が達成されないことが多い生物学的に活性な分子の例の一部である。
【０００４】
いくつかの遺伝子療法は、ウイルス送達ベクター（例えば、ＡＡＶ）を首尾よく利用することができるが、脂質系製剤は、その生体適合性および大規模な生産の簡単さに起因して、ＲＮＡおよび他の核酸化合物のための最も有望な送達システムの１つとしてますます認識されている。脂質系の核酸療法の最も重要な進歩の１つは、パチシラン（ＡＬＮ－ＴＴＲ０２）が最初のｓｉＲＮＡ治療薬として米国食品医薬品局（ＦＤＡ）および欧州委員会（ＥＣ）から承認された２０１８年８月に生じた。ＡＬＮ－ＴＴＲ０２は、いわゆる安定した核酸脂質粒子（ＳＮＡＬＰ）トランスフェクション技術に基づくｓｉＲＮＡ製剤である。パチシランの成功にもかかわらず、脂質製剤を介した核酸治療薬の送達は、依然として開発中である。

【０００５】
脂質系製剤は、多くの場合、成分の一つとしてポリエチレングリコール（ＰＥＧ）系化合物を有する。ＰＥＧは、脂質、コレステロール、カチオン性ポリマー、または他の化合物とコンジュゲートされて、脂質系製剤への統合を容易にすることができる。典型的に、ＰＥＧは、ＰＥＧ化と呼ばれる技法である被覆または表面リガンドとして脂質製剤中に含まれ、これは脂質粒子、リポソーム、ミセルなどの凝集を防止し、免疫系から脂質系製剤を保護し、かつそれらの細網内皮系（ＲＥＳ）の取り込みから逃れるのに役立つ（Ｎａｎｏｍｅｄｉｃｉｎｅ（Ｌｏｎｄ）２０１１　Ｊｕｎ；６（４）：７１５－２８）。ＰＥＧ化は、物理的、化学的、および生物学的機構を介して脂質製剤およびそのペイロードを安定化させるために広く使用されている。洗剤様ＰＥＧ脂質（例えば、ＰＥＧ－ＤＳＰＥ）は、脂質製剤に入り、表面上に水和層および立体バリアを形成することができる。ＰＥＧ化の程度に基づいて、表面層は、概して、ブラシ様層およびキノコ様層という二つのタイプに分割することができる。ＰＥＧ化の増加は、脂質製剤の循環半減期の有意な増加につながることが示されている（Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｂｉｏｍｅｄ．Ｅｎｇ．２０１１　Ａｕｇ　１５；１３：５０７－３０；Ｊ．Ｃｏｎｔｒｏｌ　Ｒｅｌｅａｓｅ．２０１０　Ａｕｇ　３；１４５（３）：１７８－８１）。

【０００６】
脂質系製剤におけるＰＥＧコンジュゲートの利点および使用にもかかわらず、ＰＥＧの使用もまた、いくつかの問題と関連している。例えば、Ｓｏｎｇらによる核酸の細胞内送達に関する研究では、ＰＥＧ脂質が活性核酸の移送および細胞質内へのアンチセンスオリゴデオキシヌクレオチドのエンドソーム放出を重度に阻害したことが見出された（Ｓｏｎｇ，Ｌ．Ｙ．，ｅｔ　ａｌ．Ｂｉｏｃｈｉｍｉｃａ　ｅｔ　Ｂｉｏｐｈｙｓｉｃａ　Ａｃｔａ（ＢＢＡ）－Ｂｉｏｍｅｍｂｒａｎｅｓ．２００２　１５５８（１）：１－１３）。さらに、生体系に天然に存在しない分子としてのＰＥＧは、望ましくない免疫原性応答と関連している（Ｇａｒａｙ　ａｎｄ　Ｌａｂａｕｎｅ．Ｔｈｅ　Ｏｐｅｎ　Ｃｏｎｆｅｒｅｎｃｅ　Ｐｒｏｃｅｅｄｉｎｇｓ　Ｊｏｕｒｎａｌ．Ｖｏｌ．２．Ｎｏ．１．２０１１）。ヒト治療薬にＰＥＧ化薬剤を数十年使用した後、ＰＥＧ化薬剤で患者を治療することは、ＰＥＧ（抗ＰＥＧ抗体）を特異的に認識し、かつ結合する抗体の形成につながることができることが観察されている。抗ＰＥＧ抗体は、ＰＥＧ化薬剤で治療されたことはないがＰＥＧを含有する産物を消費した患者においても見出された（Ｈｏａｎｇ　Ｔｈｉ　ｅｔ　ａｌ．Ｐｏｌｙｍｅｒｓ１２（２）：２９８．２０２０）。したがって、ＰＥＧ化薬剤を用いて抗ＰＥＧ抗体を産生する患者を治療することにより、血中クリアランスの加速、薬剤有効性の低下、過敏症、および場合によっては生命を脅かす副作用が生じる。

【０００７】
いくつかの代替ポリマーが、医薬組成物中のＰＥＧ化の潜在的な代替物として調査されている。そのうちのいくつかには、ポリオキサゾリン、ポリ（Ｎ－ビニルピロリドン）、ポリ（グリセロール）、およびポリアクリルアミドなどの親水性ポリマー、脂質、炭水化物、およびタンパク質（例えば、血清アルブミン）などの天然ポリマー、ならびにポリアミノ酸、またはポリ（カルボキシベタイン）、ポリ（スルホベタイン）、およびホスホベタイン系ポリマーなどの双性イオンポリマーの調査が含まれる（Ｈｏａｎｇ　Ｔｈｉ　ｅｔ　ａｌ．２０１１）。これらのポリマーの多くは、日常の製品または他の医薬組成物中に見出され、そして免疫原性応答を生成するリスクがある。ある程度の関心を集めた一つのタンパク質は、ＸＴＥＮペプチド技術であり、これは、１４４、２８８、４３２、５７６、および８６４アミノ酸残基の長さのペプチドサイズで利用され、治療用ペプチドおよびタンパク質と融合してインビボ半減期を増加させる（Ｐｏｄｕｓｔ　ｅｔ　ａｌ．Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ　Ｒｅｌｅａｓｅ２４０（２０１６）：５２－６６）。ＰＥＧ化組成物の代替物を見出す上で有意な開発がなされてきたが、ＸＴＥＮおよび他の試験されたポリマーは、インビボ半減期を増加させるその能力、および核酸脂質送達用途には大きすぎる傾向で主に特徴付けられた。さらに、核酸脂質送達のための任意のＰＥＧ化代替物は、望ましいインビボ半減期だけでなく、標的細胞取り込み、および脂

質製剤からの許容可能な脱落率も達成することができる好適な脂質とコンジュゲートすることができる必要がある。したがって、核酸脂質送達組成物の固有のニーズに特に好適な新しいＰＥＧ代替物が必要である。

【発明の概要】

【０００８】

主題技術の追加的な特徴および利点は以下の説明に記載され、部分的には、説明から明らかになるか、または主題技術の実施によって学習され得る。主題技術の利点は、本明細書の書面による説明および実施形態、ならびに添付図面で具体的に指摘される構造によって実現および達成されるであろう。

【０００９】

前述の一般的な説明および以下の詳細な説明の両方は、例示的かつ説明的であり、また主題技術のさらなる説明を提供することが意図されていることが理解されるべきである。

【００１０】

本開示は、リボ核酸およびデオキシリボ核酸などのオリゴヌクレオチド薬剤を含む、薬剤分子を封入する脂質製剤の製剤に使用することができるペプチド、ペプチド模倣体の組成物、およびそれらのコンジュゲートを提供する。これらのペプチド、ペプチド模倣体、およびそれらのコンジュゲートは、インビボでの核酸治療薬の送達においてＰＥＧコンジュゲートより優れた能力を示すことができる。ペプチドは、テトラペプチドとしてセリン、トレオニン、グルタミン酸、およびプロリンの繰り返し単位（ＳＴＥＰペプチド）を含んでもよいが、こうした繰り返し配列は、ＰＥＧ脂質コンジュゲートの優れた能力の結果を達成することができる唯一の配置ではない。具体的には、閾値量の親水性アミノ酸またはその誘導体を含むことは、アミノ酸側鎖との水素結合相互作用を介して、脂質粒子の周りに「水の檻」を潜在的に形成することができる。さらに、ペプチドの構造に剛性を与えるアミノ酸である閾値量のプロリンを含むことは、水の檻の形成を促進することができるペプチド－脂質コンジュゲートのペプチド部分の好ましい立体構造をさらに提供する。こうした水の層は、ＬＮＰと血液成分との相互作用に対する立体的なバリアとして作用し、ＬＮＰが循環している間のオプソニン化、補体活性化、および早期クリアランスを防止する可能性が高い。さらに、ペプチドコンジュゲーションのこのアプローチおよび製剤技法により、調整可能な特性を有する様々なペプチドをＬＮＰマトリックスに組み込むことができ、その結果、その機能、細胞および組織の特異性、ならびに薬物動態的および毒性学的特性を、異なる用途の要件を満たすように調節および最適化することができる。

【００１１】

一実施形態では、核酸を含有する脂質組成物が提供され、脂質組成物はペプチド－脂質コンジュゲートを含む。

【００１２】

一実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートおよび核酸を含む脂質組成物が提供され、

ｉ．ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチドは、約４個～約５２個のアミノ酸からなり、

ｉｉ．ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチド中のアミノ酸の少なくとも約１４％がプロリンであり、

ｉｉｉ．ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチド中のアミノ酸の約２８％～約８０％が親水性側鎖を有し、

ｉｖ．ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチド中のアミノ酸の約４３％未満がグリシンであり、

ｖ．脂質組成物は、１つ以上のカチオン性脂質、１つ以上のヘルパー脂質、およびステロールを含み、

ｖｉ．ペプチド－脂質コンジュゲートは、脂質組成物中の全ての脂質の約０．１ｍｏｌ％～約１０ｍｏｌ％を含む。

【００１３】

一部の実施形態では、本開示の脂質組成物を標的に送達するための方法が提供される。一部の実施形態では、対象において疾患を治療する方法が提供され、方法は、本開示の脂質組成物を投与することを含む。

【００１４】

本発明の例示的実施形態の様々な特徴を、図面を参照しながら以下に説明する。図示した実施形態は、本発明を例示することを意図するが、限定することを意図するものではない。図面は、以下の図を含む。

【図面の簡単な説明】

【００１５】

【図１】図１は、実施例７に記載されるヒトエリスロポエチン（ｈＥＰＯ）発現レベル（ｎｇ／ｍｌ）のインビボ発現に対するＰＥＧと比較した、脂質ナノ粒子製剤中の本明細書に記載のペプチド－脂質コンジュゲートの使用の効果を示す。

【図２】図２は、実施例８に記載されるリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）ベースラインに対して正規化された第ＶＩＩ因子（ＦＶＩＩ）のインビボノックダウンに対するＰＥＧと比較した、脂質ナノ粒子製剤中の本明細書に記載のペプチド脂質コンジュゲートの使用の効果を示す。

【図３】図３は、ｔｄＴｏｍａｔｏタンパク質発現の検出のために染色された肝臓および脾臓切片の代表的な画像を示す。ｔｄＴｏｍａｔｏ発現を可能にするｍＲＮＡは、実施例５に記載されるように、ペプチド７またはＤＭＧ－ＰＥＧコンジュゲートを含む脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）製剤の注入によって器官に送達された。

【発明を実施するための形態】

【００１６】

主題技術の様々な構成は、本開示から当業者には容易に明らかになり、主題技術の様々な構成は、例示として示され、かつ説明されることが理解される。当然のことながら、主題技術は、その他の構成および異なる構成の能力を有し、そしてそのいくつかの詳細は全て、主題技術の範囲から逸脱することなく、様々な他の点で修正することができる。したがって、発明の概要、図面の簡単な説明、および発明を実施するための形態は、本質的に例示とみなされ、制限的とみなされるべきではない。

【００１７】

以下に記載される発明を実施するための形態は、主題技術の様々な構成の説明として意図されており、主題技術が実践され得る唯一の構成を表すことを意図していない。添付図面は本明細書に組み込まれ、発明を実施するための形態の一部を構成する。発明を実施するための形態には、主題技術の完全な理解を提供する目的での具体的な詳細が含まれる。しかしながら、当業者には、主題技術がこれらの具体的な詳細なしに実施され得ることが明らかであろう。一部の事例では、周知の構造および構成要素は、主題技術の概念を不明瞭にすることを回避するために、ブロック図の形態で示されている。同様の構成要素は、理解の簡単のために同一の要素番号でラベル付けされる。

【００１８】

一実施形態では、核酸を含有する脂質組成物が提供され、脂質組成物はペプチド－脂質コンジュゲートを含む。

【００１９】

一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチドは、約４個～約５２個のアミノ酸からなる。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチドは、約８～約５２アミノ酸長である。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチドは、約１２～約５２のアミノ酸長である。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチドは、約１６～約５２のアミノ酸長である。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチドは、約２０～約５２のアミノ酸長である。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチドは、約２４～約５２のアミノ酸長である。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチドは、約２８～約５２のアミノ酸長である。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲート

のペプチドは、約３２～約５２のアミノ酸長である。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチドは、約３６～約５２アミノ酸長である。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチドは、約４０～約５２アミノ酸長である。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチドは、約４４～約５２アミノ酸長である。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチドは、約４８～約５２アミノ酸長である。

【００２０】

一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチドは、約４～約４８アミノ酸長である。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチドは、約４～約４４アミノ酸長である。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチドは、約４～約４０アミノ酸長である。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチドは、約４～約３６アミノ酸長である。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチドは、約４～約３２アミノ酸長である。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチドは、約４～約２８アミノ酸長である。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチドは、約４～約２４アミノ酸長である。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチドは、約４～約２０アミノ酸長である。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチドは、約４～約１６アミノ酸長である。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチドは、約４～約１２アミノ酸長である。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチドは、約４～約８アミノ酸長である。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチドは、約４アミノ酸長、８アミノ酸長、１２アミノ酸長、１６アミノ酸長、２０アミノ酸長、２４アミノ酸長、２８アミノ酸長、３２アミノ酸長、３６アミノ酸長、４０アミノ酸長、４４アミノ酸長、４８アミノ酸長、または５２アミノ酸長である。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチドは、約１２アミノ酸長である。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチドは、１２アミノ酸長である。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチドは、約１６アミノ酸長である。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチドは、１６アミノ酸長である。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチドは、約２０アミノ酸長である。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチドは、２０アミノ酸長である。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチドは、約２４アミノ酸長である。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチドは、２４アミノ酸長である。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチドは、約２８アミノ酸長である。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチドは、２８アミノ酸長である。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチドは、約３２アミノ酸長である。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチドは、３２アミノ酸長である。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチドは、約３６アミノ酸長である。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチドは、３６アミノ酸長である。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチドは、約４０アミノ酸長である。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチドは、４０アミノ酸長である。

【００２１】

一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチドは、約８～約５０アミノ酸長である。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチドは、約８～約４４アミノ酸長である。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチドは、約８～約４０アミノ酸長である。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチドは、約８～約３６アミノ酸長である。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチドは、約８～約３２アミノ酸長である。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチドは、約８～約２８アミノ酸長である。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチドは、約８～約２４アミノ酸長で

ある。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチドは、約８～約２０アミノ酸長である。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチドは、約４アミノ酸長、８アミノ酸長、１２アミノ酸長、１６アミノ酸長、２０アミノ酸長、２４アミノ酸長、２８アミノ酸長、３２アミノ酸長、３６アミノ酸長、４０アミノ酸長、４４アミノ酸長、４８アミノ酸長、または５２アミノ酸長である。

【００２２】

一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチド中のアミノ酸の少なくとも約１４％は、プロリンである。一部の実施形態では、ペプチド中のアミノ酸の約１４％～約６０％は、プロリンである。一部の実施形態では、ペプチド中のアミノ酸の約２０％～約６０％は、プロリンである。一部の実施形態では、ペプチド中のアミノ酸の約２５％～約６０％は、プロリンである。

【００２３】

一部の実施形態では、ペプチド中のアミノ酸の約１４％～約６０％は、プロリンである。一部の実施形態では、ペプチド中のアミノ酸の約２０％～約６０％は、プロリンである。一部の実施形態では、ペプチド中のアミノ酸の約２５％～約６０％は、プロリンである。一部の実施形態では、ペプチド中のアミノ酸の約３０％～約６０％は、プロリンである。一部の実施形態では、ペプチド中のアミノ酸の約３５％～約６０％は、プロリンである。一部の実施形態では、ペプチド中のアミノ酸の約４０％～約６０％は、プロリンである。一部の実施形態では、ペプチド中のアミノ酸の約４５％～約６０％は、プロリンである。一部の実施形態では、ペプチド中のアミノ酸の約５０％～約６０％は、プロリンである。一部の実施形態では、ペプチド中のアミノ酸の約５５％～約６０％は、プロリンである。

【００２４】

一部の実施形態では、ペプチド中のアミノ酸の約１４％～約６０％は、プロリンである。一部の実施形態では、ペプチド中のアミノ酸の約１４％～約５５％は、プロリンである。一部の実施形態では、ペプチド中のアミノ酸の約１４％～約５０％は、プロリンである。一部の実施形態では、ペプチド中のアミノ酸の約１４％～約４５％は、プロリンである。一部の実施形態では、ペプチド中のアミノ酸の約１４％～約４０％は、プロリンである。一部の実施形態では、ペプチド中のアミノ酸の約１４％～約３５％は、プロリンである。一部の実施形態では、ペプチド中のアミノ酸の約１４％～約３０％は、プロリンである。一部の実施形態では、ペプチド中のアミノ酸の約１４％～約２５％は、プロリンである。一部の実施形態では、ペプチド中のアミノ酸の約１４％～約２０％は、プロリンである。一部の実施形態では、ペプチド中のアミノ酸の約１４％～約１５％は、プロリンである。一部の実施形態では、ペプチド中のアミノ酸の約１４％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、または６０％は、プロリンである。

【００２５】

一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチド中のアミノ酸の約２８％～約８５％は、親水性側鎖を有する。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチド中のアミノ酸の約３５％～約８５％は、親水性側鎖を有する。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチド中のアミノ酸の約４０％～約８５％は、親水性側鎖を有する。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチド中のアミノ酸の約４５％～約８５％は、親水性側鎖を有する。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチド中のアミノ酸の約５０％～約８５％は、親水性側鎖を有する。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチド中のアミノ酸の約５５％～約８５％は、親水性側鎖を有する。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチド中のアミノ酸の約６０％～約８５％は、親水性側鎖を有する。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチド中のアミノ酸の約６５％～約８５％は、親水性側鎖を有する。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチド中のアミノ酸の約７０％～約８５％は、親水性側鎖を有する。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチド中のアミノ酸の約７５％～約８５％は

、親水性側鎖を有する。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチド中のアミノ酸の約８０％～約８５％は、親水性側鎖を有する。

【００２６】

一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチド中のアミノ酸の約２８％～約８０％は、親水性側鎖を有する。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチド中のアミノ酸の約７５％～約８５％は、親水性側鎖を有する。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチド中のアミノ酸の約２８％～約７０％は、親水性側鎖を有する。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチド中のアミノ酸の約２８％～約６５％は、親水性側鎖を有する。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチド中のアミノ酸の約２８％～約６０％は、親水性側鎖を有する。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチド中のアミノ酸の約２８％～約５５％は、親水性側鎖を有する。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチド中のアミノ酸の約２８％～約５０％は、親水性側鎖を有する。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチド中のアミノ酸の約２８％～約４５％は、親水性側鎖を有する。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチド中のアミノ酸の約２８％～約４０％は、親水性側鎖を有する。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチド中のアミノ酸の約２８％～約３５％は、親水性側鎖を有する。

【００２７】

一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチド中のアミノ酸の約２８％～約８０％は、親水性側鎖を有する。一部の実施形態では、ペプチド中のアミノ酸の約３５％～約８５％は、親水性側鎖を有する。一部の実施形態では、ペプチド中のアミノ酸の約３５％～約８０％は、親水性側鎖を有する。一部の実施形態では、ペプチド中のアミノ酸の約４０％～約７５％は、親水性側鎖を有する。一部の実施形態では、ペプチド中のアミノ酸の約４５％～約８５％は、親水性側鎖を有する。一部の実施形態では、ペプチド中のアミノ酸の約５０％～約７５％は、親水性側鎖を有する。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチド中のアミノ酸の約２８％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、または８０％は、親水性側鎖を有する。

【００２８】

一部の実施形態では、親水性側鎖を有するアミノ酸は、独立して、グルタミン、グルタミン酸、アスパラギン、アスパラギン酸、セリン、Ｏ－Ｃ$_{1-6}$アルキルセリン、トレオニン、およびＯ－Ｃ$_{1-6}$アルキルトレオニンから選択される。一部の実施形態では、親水性側鎖を有するアミノ酸は、グルタミン、グルタミン酸、アスパラギン、アスパラギン酸、セリン、Ｏ－Ｃ$_{1-6}$アルキルセリン、トレオニン、およびＯ－Ｃ$_{1-6}$アルキルトレオニンを含む。一部の実施形態では、親水性側鎖を有するアミノ酸は、グルタミンを含む。一部の実施形態では、親水性側鎖を有するアミノ酸は、グルタミン酸を含む。一部の実施形態では、親水性側鎖を有するアミノ酸は、アスパラギンを含む。一部の実施形態では、親水性側鎖を有するアミノ酸は、アスパラギン酸を含む。一部の実施形態では、親水性側鎖を有するアミノ酸は、セリンを含む。一部の実施形態では、親水性側鎖を有するアミノ酸は、Ｏ－Ｃ$_{1-6}$アルキルセリンを含む。一部の実施形態では、親水性側鎖を有するアミノ酸は、トレオニンを含む。一部の実施形態では、親水性側鎖を有するアミノ酸は、Ｏ－Ｃ$_{1-6}$アルキルトレオニンを含む。

【００２９】

一部の実施形態では、Ｏ－Ｃ$_{1-6}$アルキルセリンは、Ｏ－Ｃ$_{1}$アルキルセリンである。一部の実施形態では、Ｏ－Ｃ$_{1-6}$アルキルセリンは、Ｏ－Ｃ$_{2}$アルキルセリンである。一部の実施形態では、Ｏ－Ｃ$_{1-6}$アルキルセリンは、Ｏ－Ｃ$_{3}$アルキルセリンである。一部の実施形態では、Ｏ－Ｃ$_{1-6}$アルキルセリンは、Ｏ－Ｃ$_{4}$アルキルセリンである。一部の実施形態では、Ｏ－Ｃ$_{1-6}$アルキルセリンは、Ｏ－Ｃ$_{5}$アルキルセリンである。一部の実施形態では、Ｏ－Ｃ$_{1-6}$アルキルセリンは、Ｏ－Ｃ$_{6}$アルキルセリンである

。

【００３０】

一部の実施形態では、Ｏ－Ｃ$_{1-6}$アルキルトレオニンは、Ｏ－Ｃ$_{1}$アルキルトレオニンである。一部の実施形態では、Ｏ－Ｃ$_{1-6}$アルキルトレオニンは、Ｏ－Ｃ$_{2}$アルキルトレオニンである。一部の実施形態では、Ｏ－Ｃ$_{1-6}$アルキルトレオニンは、Ｏ－Ｃ$_{3}$アルキルトレオニンである。一部の実施形態では、Ｏ－Ｃ$_{1-6}$アルキルトレオニンは、Ｏ－Ｃ$_{4}$アルキルトレオニンである。一部の実施形態では、Ｏ－Ｃ$_{1-6}$アルキルトレオニンは、Ｏ－Ｃ$_{5}$アルキルトレオニンである。一部の実施形態では、Ｏ－Ｃ$_{1-6}$アルキルトレオニンは、Ｏ－Ｃ$_{6}$アルキルトレオニンである。

【００３１】

一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチド中のアミノ酸の約４３％未満は、グリシンである。一部の実施形態では、ペプチド中のアミノ酸の約３０％未満は、グリシンである。一部の実施形態では、ペプチド中のアミノ酸の約２０％未満は、グリシンである。一部の実施形態では、ペプチド中のアミノ酸の約１０％未満は、グリシンである。一部の実施形態では、ペプチド中のアミノ酸の約５％未満は、グリシンである。一部の実施形態では、ペプチド中のアミノ酸の約４％未満は、グリシンである。一部の実施形態では、ペプチド中のアミノ酸の約３％未満は、グリシンである。一部の実施形態では、ペプチド中のアミノ酸の約２％未満は、グリシンである。一部の実施形態では、ペプチドは、グリシンを有しない。

【００３２】

一部の実施形態では、脂質組成物は、リポプレックス、リポソーム、脂質ナノ粒子、ポリマー系担体、エクソソーム、層状体、ミセル、およびエマルションから選択される。一部の実施形態では、脂質組成物は、リポプレックスである。一部の実施形態では、脂質組成物は、リポソームである。一部の実施形態では、脂質組成物は、ポリマー系担体である。一部の実施形態では、脂質組成物は、エクソソームである。一部の実施形態では、脂質組成物は、層状体である。一部の実施形態では、脂質組成物は、ミセルである。一部の実施形態では、脂質組成物は、エマルションである。一部の実施形態では、脂質組成物は、脂質ナノ粒子である。

【００３３】

一部の実施形態では、リポソームは、カチオン性リポソーム、ナノリポソーム、プロテオリポソーム、単層リポソーム、多層リポソーム、セラミド含有ナノリポソーム、および多小胞リポソームから選択される。一部の実施形態では、リポソームは、カチオン性リポソーム、ナノリポソーム、プロテオリポソーム、単層リポソーム、多層リポソーム、セラミド含有ナノリポソーム、および多小胞リポソームである。一部の実施形態では、リポソームは、カチオン性リポソームである。一部の実施形態では、リポソームは、ナノリポソームである。一部の実施形態では、リポソームは、プロテオリポソームである。一部の実施形態では、リポソームは、単層リポソームである。一部の実施形態では、リポソームは、多層リポソームである。一部の実施形態では、リポソームは、セラミド含有ナノリポソームである。一部の実施形態では、リポソームは、多小胞リポソームである。

【００３４】

一部の実施形態では、脂質ナノ粒子は、約２００ｎｍ未満のサイズを有する。

【００３５】

一部の実施形態では、脂質組成物は、１つ以上のカチオン性脂質、１つ以上のヘルパー脂質、およびステロールを含む。

【００３６】

一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートは、脂質組成物中の全ての脂質の約０．１ｍｏｌ％～約１０ｍｏｌ％を含む。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートは、脂質組成物中の全ての脂質の約０．４ｍｏｌ％～約１０ｍｏｌ％を含む。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートは、脂質組成物中の全ての脂質の約０．７ｍｏｌ％～約１０ｍｏｌ％を含む。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲ

ートは、脂質組成物中の全ての脂質の約１ｍｏｌ％～約１０ｍｏｌ％を含む。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートは、脂質組成物中の全ての脂質の約１．３ｍｏｌ％～約１０ｍｏｌ％を含む。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートは、脂質組成物中の全ての脂質の約１．６ｍｏｌ％～約１０ｍｏｌ％を含む。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートは、脂質組成物中の全ての脂質の約１．９ｍｏｌ％～約１０ｍｏｌ％を含む。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートは、脂質組成物中の全ての脂質の約２．２ｍｏｌ％～約１０ｍｏｌ％を含む。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートは、脂質組成物中の全ての脂質の約２．５ｍｏｌ％～約１０ｍｏｌ％を含む。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートは、脂質組成物中の全ての脂質の約２．８ｍｏｌ％～約１０ｍｏｌ％を含む。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートは、脂質組成物中の全ての脂質の約３．１ｍｏｌ％～約１０ｍｏｌ％を含む。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートは、脂質組成物中の全ての脂質の約３．４ｍｏｌ％～約１０ｍｏｌ％を含む。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートは、脂質組成物中の全ての脂質の約３．７ｍｏｌ％～約１０ｍｏｌ％を含む。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートは、脂質組成物中の全ての脂質の約４ｍｏｌ％～約１０ｍｏｌ％を含む。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートは、脂質組成物中の全ての脂質の約４．３ｍｏｌ％～約１０ｍｏｌ％を含む。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートは、脂質組成物中の全ての脂質の約４．６ｍｏｌ％～約１０ｍｏｌ％を含む。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートは、脂質組成物中の全ての脂質の約４．９ｍｏｌ％～約１０ｍｏｌ％を含む。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートは、脂質組成物中の全ての脂質の約５．２ｍｏｌ％～約１０ｍｏｌ％を含む。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートは、脂質組成物中の全ての脂質の約５．５ｍｏｌ％～約１０ｍｏｌ％を含む。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートは、脂質組成物中の全ての脂質の約５．８ｍｏｌ％～約１０ｍｏｌ％を含む。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートは、脂質組成物中の全ての脂質の約６．１ｍｏｌ％～約１０ｍｏｌ％を含む。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートは、脂質組成物中の全ての脂質の約６．４ｍｏｌ％～約１０ｍｏｌ％を含む。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートは、脂質組成物中の全ての脂質の約６．７ｍｏｌ％～約１０ｍｏｌ％を含む。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートは、脂質組成物中の全ての脂質の約７ｍｏｌ％～約１０ｍｏｌ％を含む。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートは、脂質組成物中の全ての脂質の約７．３ｍｏｌ％～約１０ｍｏｌ％を含む。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートは、脂質組成物中の全ての脂質の約７．６ｍｏｌ％～約１０ｍｏｌ％を含む。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートは、脂質組成物中の全ての脂質の約７．９ｍｏｌ％～約１０ｍｏｌ％を含む。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートは、脂質組成物中の全ての脂質の約８．２ｍｏｌ％～約１０ｍｏｌ％を含む。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートは、脂質組成物中の全ての脂質の約８．５ｍｏｌ％～約１０ｍｏｌ％を含む。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートは、脂質組成物中の全ての脂質の約８．８ｍｏｌ％～約１０ｍｏｌ％を含む。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートは、脂質組成物中の全ての脂質の約９．１ｍｏｌ％～約１０ｍｏｌ％を含む。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートは、脂質組成物中の全ての脂質の約９．４ｍｏｌ％～約１０ｍｏｌ％を含む。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートは、脂質組成物中の全ての脂質の約９．７ｍｏｌ％～約１０ｍｏｌ％を含む。

【００３７】

一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートは、脂質組成物中の全ての脂質の約０．１ｍｏｌ％～約９．７ｍｏｌ％を含む。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートは、脂質組成物中の全ての脂質の約０．１ｍｏｌ％～約９．４ｍｏｌ％を含む。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートは、脂質組成物中の全ての脂質の約０．１ｍｏｌ％～約９．１ｍｏｌ％を含む。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コン

ジュゲートは、脂質組成物中の全ての脂質の約０．１ｍｏｌ％～約８．８ｍｏｌ％を含む。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートは、脂質組成物中の全ての脂質の約０．１ｍｏｌ％～約８．５ｍｏｌ％を含む。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートは、脂質組成物中の全ての脂質の約０．１ｍｏｌ％～約８．２ｍｏｌ％を含む。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートは、脂質組成物中の全ての脂質の約０．１ｍｏｌ％～約７．９ｍｏｌ％を含む。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートは、脂質組成物中の全ての脂質の約０．１ｍｏｌ％～約７．６ｍｏｌ％を含む。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートは、脂質組成物中の全ての脂質の約０．１ｍｏｌ％～約７．３ｍｏｌ％を含む。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートは、脂質組成物中の全ての脂質の約０．１ｍｏｌ％～約７ｍｏｌ％を含む。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートは、脂質組成物中の全ての脂質の約０．１ｍｏｌ％～約６．７ｍｏｌ％を含む。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートは、脂質組成物中の全ての脂質の約０．１ｍｏｌ％～約６．４ｍｏｌ％を含む。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートは、脂質組成物中の全ての脂質の約０．１ｍｏｌ％～約６．１ｍｏｌ％を含む。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートは、脂質組成物中の全ての脂質の約０．１ｍｏｌ％～約５．８ｍｏｌ％を含む。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートは、脂質組成物中の全ての脂質の約０．１ｍｏｌ％～約５．５ｍｏｌ％を含む。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートは、脂質組成物中の全ての脂質の約０．１ｍｏｌ％～約５．２ｍｏｌ％を含む。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートは、脂質組成物中の全ての脂質の約０．１ｍｏｌ％～約４．９ｍｏｌ％を含む。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートは、脂質組成物中の全ての脂質の約０．１ｍｏｌ％～約４．６ｍｏｌ％を含む。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートは、脂質組成物中の全ての脂質の約０．１ｍｏｌ％～約４．３ｍｏｌ％を含む。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートは、脂質組成物中の全ての脂質の約０．１ｍｏｌ％～約４ｍｏｌ％を含む。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートは、脂質組成物中の全ての脂質の約０．１ｍｏｌ％～約３．７ｍｏｌ％を含む。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートは、脂質組成物中の全ての脂質の約０．１ｍｏｌ％～約３．４ｍｏｌ％を含む。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートは、脂質組成物中の全ての脂質の約０．１ｍｏｌ％～約３．１ｍｏｌ％を含む。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートは、脂質組成物中の全ての脂質の約０．１ｍｏｌ％～約２．８ｍｏｌ％を含む。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートは、脂質組成物中の全ての脂質の約０．１ｍｏｌ％～約２．５ｍｏｌ％を含む。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートは、脂質組成物中の全ての脂質の約０．１ｍｏｌ％～約２．２ｍｏｌ％を含む。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートは、脂質組成物中の全ての脂質の約０．１ｍｏｌ％～約１．９ｍｏｌ％を含む。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートは、脂質組成物中の全ての脂質の約０．１ｍｏｌ％～約１．６ｍｏｌ％を含む。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートは、脂質組成物中の全ての脂質の約０．１ｍｏｌ％～約１．３ｍｏｌ％を含む。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートは、脂質組成物中の全ての脂質の約０．１ｍｏｌ％～約１ｍｏｌ％を含む。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートは、脂質組成物中の全ての脂質の約０．１ｍｏｌ％～約０．７ｍｏｌ％を含む。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートは、脂質組成物中の全ての脂質の約０．１ｍｏｌ％～約０．４ｍｏｌ％を含む。一部の実施形態では、ペプチド脂質コンジュゲートは、脂質組成物中の全ての脂質の約０．１ｍｏｌ％、０．４ｍｏｌ％、０．７ｍｏｌ％、１ｍｏｌ％、１．３ｍｏｌ％、１．６ｍｏｌ％、１．９ｍｏｌ％、２．２ｍｏｌ％、２．５ｍｏｌ％、２．８ｍｏｌ％、３．１ｍｏｌ％、３．４ｍｏｌ％、３．７ｍｏｌ％、４ｍｏｌ％、４．３ｍｏｌ％、４．６ｍｏｌ％、４．９ｍｏｌ％、５．２ｍｏｌ％、５．５ｍｏｌ％、５．８ｍｏｌ％、６．１ｍｏｌ％、６．４ｍｏｌ％、６．７ｍｏｌ％、７ｍｏｌ％、７．３ｍｏｌ％、７．６ｍｏｌ％、７．９ｍｏｌ％、８．２ｍｏｌ％、８．５ｍｏｌ％、８．８ｍｏｌ％、９．１ｍｏｌ％、９．４ｍ

ｏｌ％、９．７ｍｏｌ％、または１０ｍｏｌ％を含む。

【００３８】

一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートは、脂質組成物中の全ての脂質の約０．５ｍｏｌ％～約５ｍｏｌ％を含む。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートは、脂質組成物中の全ての脂質の約１．０ｍｏｌ％～約３ｍｏｌ％を含む。

【００３９】

一部の実施形態では、脂質組成物は、核酸を封入する。

【００４０】

一部の実施形態では、脂質組成物は、核酸と複合体化される。

【００４１】

一部の実施形態では、ペプチド脂質コンジュゲートの脂質は、リンカーを介してペプチドにコンジュゲートされる。一部の実施形態では、リンカーは、結合、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリールである。実施形態では、リンカーは、置換または非置換アルキル（例えば、C_1～C_8、C_1～C_6、またはC_1～C_4）、置換または非置換ヘテロアルキル、置換または非置換シクロアルキル（例えば、２～８員、２～６員、または２～４員）、置換または非置換ヘテロシクロアルキル（例えば、３～８員、３～６員、または５～６員）、置換または非置換アリール（例えば、C_6－C_{10}またはフェニル）、または置換もしくは非置換ヘテロアリール（例えば、５～１０員、５～９員、または５～６員）である。一部の実施形態では、リンカーは、置換または非置換アルキルである。一部の実施形態では、リンカーは、置換または非置換ヘテロアルキルである。一部の実施形態では、リンカーは、置換または非置換シクロアルキルである。一部の実施形態では、リンカーは、置換または非置換ヘテロシクロアルキルである。一部の実施形態では、リンカーは、置換または非置換アリールである。一部の実施形態では、リンカーは、置換または非置換ヘテロアリールである。

【００４２】

一部の実施形態では、リンカーは、－Ｓ－，－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、アミド（－Ｃ（Ｏ）ＮＨ－）またはアミノ（－ＮＲ^N－）から選択される基を含む構造を有し、式中、Ｒ^{N}は、Ｈ、C_{1-6}アルキル、カルボニル（－Ｃ（Ｏ）－）、カルバメート（－ＮＨＣ（Ｏ）Ｏ－）、尿素（－ＮＨＣ（Ｏ）ＮＨ－）、ジスルフィド（－Ｓ－Ｓ－）、エーテル（－Ｏ－）、スクシニル（－（Ｏ）ＣＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｃ（Ｏ）－）、スクシンアミジル（－ＮＨＣ（Ｏ）ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｃ（Ｏ）ＮＨ－）、エーテル、カーボネート（－ＯＣ（Ｏ）Ｏ－）、スクシノイル、リン酸エステル（－Ｏ－（Ｏ）ＰＯＨ－Ｏ－）、およびスルホン酸エステルから選択される。一部の実施形態では、リンカーは、－Ｓ－を含む。一部の実施形態では、リンカーは、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－を含む。一部の実施形態では、リンカーは、アミド（－Ｃ（Ｏ）ＮＨ－）を含む構造を有する。一部の実施形態では、リンカーは、アミノ（－ＮＲ^N－）を含む構造を有し、式中、Ｒ^{N}は、Ｈ、C_{1-6}アルキル、カルボニル（－Ｃ（Ｏ）－）、カルバメート（－ＮＨＣ（Ｏ）Ｏ－）、尿素（－ＮＨＣ（Ｏ）ＮＨ－）、ジスルフィド（－Ｓ－Ｓ－）、エーテル（－Ｏ－）、スクシニル（－（Ｏ）ＣＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｃ（Ｏ）－）、スクシンアミジル（－ＮＨＣ（Ｏ）ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｃ（Ｏ）ＮＨ－）、エーテル、カーボネート（－ＯＣ（Ｏ）Ｏ－）、スクシノイル、リン酸エステル（－Ｏ－（Ｏ）ＰＯＨ－Ｏ－）、およびスルホン酸エステルから選択される。一部の実施形態では、Ｒ^{N}は、Ｈである。一部の実施形態では、Ｒ^{N}は、C_{1-6}アルキルである。一部の実施形態では、Ｒ^{N}は、C_1アルキルである。一部の実施形態では、Ｒ^{N}は、C_2アルキルである。一部の実施形態では、Ｒ^{N}は、C_3アルキルである。一部の実施形態では、Ｒ^{N}は、C_4アルキルである。一部の実施形態では、Ｒ^{N}は、C_5アルキルである。一部の実施形態では、Ｒ^{N}は、C_6アルキルである。一部の実施形態では、Ｒ^{N}は、カルボニル（－Ｃ（Ｏ）－）である。一部の実施形態では、Ｒ^{N}は、カルバメート（－ＮＨＣ（Ｏ）Ｏ－）である。一部の実施形態では、Ｒ^{N}は、尿素（－ＮＨＣ（Ｏ）ＮＨ－）である。一部の実施形態

では、R^Nは、ジスルフィド（－Ｓ－Ｓ－）である。一部の実施形態では、R^Nは、エーテル（－Ｏ－）である。一部の実施形態では、R^Nは、スクシニル（－（Ｏ）ＣＣH_2ＣH_2Ｃ（Ｏ）－）である。一部の実施形態では、R^Nは、スクシンアミジル（－ＮＨＣ（Ｏ）ＣH_2ＣH_2Ｃ（Ｏ）ＮＨ－）である。一部の実施形態では、R^Nはエーテルである。一部の実施形態では、R^Nは、炭酸塩（－ＯＣ（Ｏ）Ｏ－）である。一部の実施形態では、R^Nは、スクシノイルである。一部の実施形態では、R^Nは、リン酸エステル（－Ｏ－（Ｏ）ＰＯＨ－Ｏ－）である。一部の実施形態では、R^Nは、スルホン酸エステルである。

【００４３】

一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートの脂質は、ジデシルオキシプロピル（Ｃ１０）、ジラウリルオキシプロピル（Ｃ１２）、ジミリスチルオキシプロピル（Ｃ１４）、ジパルミチルオキシプロピル（Ｃ１６）、またはジステアリルオキシプロピル（Ｃ１８）、１，２－ジパルミチルオキシプロピル－３－アミン（ＤＯＭＧ）、１，２－ジミリスチルオキシプロピルアミン（ＤＭＧ）、１，２－ジラウロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホリルエタノールアミン（ＤＬＰＥ）、ジミリストイル－ホスファチジルエタノールアミン（ＤＭＰＥ）、ジパルミトイル－ホスファチジルエタノールアミン（ＤＰＰＥ）、ジパルミトイルホスファチジルコリン（ＤＰＰＣ）、ジオレオイル－ホスファチジルエタノールアミン（ＤＯＰＥ）、およびジステアロイル－ホスファチジルエタノールアミン（ＤＳＰＥ）から選択される。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートの脂質は、ジデシルオキシプロピル（Ｃ１０）である。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートの脂質は、ジラウリルオキシプロピル（Ｃ１２）である。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートの脂質は、ジミリスチルオキシプロピル（Ｃ１４）である。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートの脂質は、ジパルミチルオキシプロピル（Ｃ１６）である。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートの脂質は、ジステアリルオキシプロピル（Ｃ１８）である。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートの脂質は、１，２－ジミリスチルオキシプロピル－３－アミン（ＤＯＭＧ）である。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートの脂質は、１，２－ジミリスチルオキシプロピルアミン（ＤＭＧ）である。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートの脂質は、１，２－ジラウロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホリルエタノールアミン（ＤＬＰＥ）である。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートの脂質は、ジミリストイル－ホスファチジルエタノールアミン（ＤＭＰＥ）である。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートの脂質は、ジパルミトイル－ホスファチジルエタノールアミン（ＤＰＰＥ）である。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートの脂質は、ジパルミトイルホスファチジルコリン（ＤＰＰＣ）である。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートの脂質は、ジオレオイル－ホスファチジルエタノールアミン（ＤＯＰＥ）である。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートの脂質は、ジステアロイル－ホスファチジルエタノールアミン（ＤＳＰＥ）である。一部の実施形態では、ペプチド－脂質コンジュゲートの脂質は、コレステロールまたはコレステロール誘導体である。

【００４４】

一部の実施形態では、ペプチドは、そのＣ末端でペプチド－脂質コンジュゲートの脂質にコンジュゲートされ、ペプチドのＮ末端のアミノ基は、１つまたは２つのC_{1-6}アルキル基またはアミド基で置換される。一部の実施形態では、ペプチドのＮ末端は、１つまたは２つのアミド基で置換される。一部の実施形態では、ペプチドのＮ末端は、１つまたは２つのC_{1-6}アルキル基で置換される。一部の実施形態では、ペプチドのＮ末端は、１つまたは２つのC_1アルキル基で置換される。一部の実施形態では、ペプチドのＮ末端は、１つまたは２つのC_2アルキル基で置換される。一部の実施形態では、ペプチドのＮ末端は、１つまたは２つのC_3アルキル基で置換される。一部の実施形態では、ペプチドのＮ末端は、１つまたは２つのC_4アルキル基で置換される。一部の実施形態では、ペプチドのＮ末端は、１つまたは２つのC_5アルキル基で置換される。一部の実施形態では、

ペプチドのＮ末端は、１つまたは２つのＣ$_6$アルキル基で置換される。

【００４５】

一部の実施形態では、ペプチドは、そのＮ末端でペプチド－脂質コンジュゲートの脂質にコンジュゲートされ、ペプチドのＣ末端におけるアミノ酸は、アルキル化されてＣ$_{1-6}$アルキルエステルを形成するか、またはアミド化される。一部の実施形態では、ペプチドのＣ末端におけるアミノ酸はアミド化される。一部の実施形態では、ペプチドのＣ末端におけるアミノ酸は、アルキル化されて、Ｃ$_{1-6}$アルキルエステルを形成する。一部の実施形態では、ペプチドのＣ末端におけるアミノ酸は、アルキル化されて、Ｃ$_1$アルキルエステルを形成する。一部の実施形態では、ペプチドのＣ末端におけるアミノ酸は、アルキル化されて、Ｃ$_2$アルキルエステルを形成する。一部の実施形態では、ペプチドのＣ末端におけるアミノ酸は、アルキル化されて、Ｃ$_3$アルキルエステルを形成する。一部の実施形態では、ペプチドのＣ末端におけるアミノ酸は、アルキル化されて、Ｃ$_4$アルキルエステルを形成する。一部の実施形態では、ペプチドのＣ末端におけるアミノ酸は、アルキル化されて、Ｃ$_5$アルキルエステルを形成する。一部の実施形態では、ペプチドのＣ末端におけるアミノ酸は、アルキル化されて、Ｃ$_6$アルキルエステルを形成する。

【００４６】

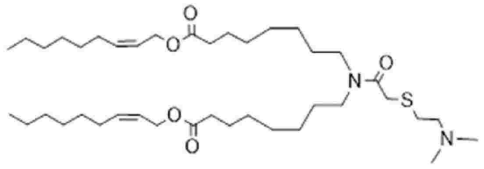
一部の実施形態では、脂質組成物は、５－カルボキシスペルミルグリシンジオクタデシルアミド（ＤＯＧＳ）、２，３－ジオレイルオキシ－Ｎ［２（スペルミン－カルボキサミド）エチル］－Ｎ，Ｎ－ジメチル－１－プロパンアミニウム（ＤＯＳＰＡ）、１，２－ジオレオイル－３－ジメチルアンモニウムプロパン－（ＤＯＤＡＰ）、１，２－ジオレオイル－３－トリメチルアンモニウム－プロパン（ＤＯＴＡＰ）、１，２－ジステアリルオキシ－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－アミノプロパン（ＤＳＤＭＡ）、１，２－ジオレイルオキシ－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－アミノプロパン（ＤＯＤＭＡ）、１，２－ジリノレイルオキシ－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－アミノプロパン（ＤＬｉｎＤＭＡ）、１，２－ジリノレニルオキシ－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－アミノプロパン（ＤＬｅｎＤＭＡ）、Ｎ－ジオレイル－Ｎ，Ｎ－ジメチルアンモニウムクロリド（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（ＤＤＡＢ）、Ｎ－（１，２－ジミリチルオキシプロパ－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（ＤＭＲＩＥ）、３－ジメチルアミノ－２－（コレスト－５－エン－３－ベーター－オキシブタン－４－オキシ）－１－（シス，シス－９，１２－ｏｃ－タデカジエンオキシ）プロパン（ＣＬｉｎＤＭＡ）、２－［５’－（コレスト－５－エン－３－ベーター－オキシ）－３’－オキサペントキシ）－３－ジメチル１－１－（シス，シス－９’，１－２’－オクタデカジエンオキシ）プロパン（ＣｐＬｉｎＤＭＡ）、Ｎ，Ｎ－ジメチル－３，４－ジオレイルオキシベンジルアミン（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（ＤＯｃａｒｂＤＡＰ）、２，３－ジリノレオイルオキシ－Ｎ，Ｎ－ジメチルプロピルアミン（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（ＤＬｉｎｃａｒｂＤＡＰ）、１，２－ジリノレオイルカルバミル－３－ジメチルアミノプロパン（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（ＤＬｉｎ－Ｋ－ＤＭＡ）、および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）から選択される、１つ以上のカチオン性脂質をさらに含む。一部の実施形態では、脂質組成物は、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（ＤＯＧＳ）をさらに含む。一部の実施形態では、脂質組成物は、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（ＤＯＳＰＡ）をさらに含む。一部の実施形態では、脂質組成物は、１，２－ジオレオイル－３－ジメチルアンモニウム－プロパン（ＤＯＤＡＰ）をさらに含む。一部の実施形態では、脂質組成物は、１，２－ジオレオイル－３－トリメチルアンモニウム－プロパン（ＤＯＴＡＰ）をさらに含む。一部の実施形態では、脂質組成物は、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（ＤＳＤＭＡ）をさらに含む。一部の実施形態では、脂質組成物は、１，２－ジオレイルオキシ－Ｎ

，Ｎ－ジメチル－３－アミノプロパン（ＤＯＤＭＡ）をさらに含む。一部の実施形態では、脂質組成物は、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（ＤＬｉｎＤＭＡ）をさらに含む。一部の実施形態では、脂質組成物は、Ｎ－ジオレイル－Ｎ，Ｎ－ジメチルアンモニウムクロリド（ＤＯＤＡＣ）をさらに含む。一部の実施形態では、脂質組成物は、Ｎ，Ｎ－ジステアリル－Ｎ，Ｎ－ジメチルアンモニウムブロミド（ＤＤＡＢ）をさらに含む。一部の実施形態では、脂質組成物は、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（ＤＭＲＩＥ）をさらに含む。一部の実施形態では、脂質組成物は、３－ジメチルアミノ－２－（コレスト－５－エン－３－ベーター－オキシブタン－４－オキシ）－１－（シス，シス－９，１２－ｏｃ－タデカジエンオキシ）プロパン（ＣＬｉｎＤＭＡ）をさらに含む。一部の実施形態では、脂質組成物は、Ｎ，Ｎ－ジメチル－３，４－ジオレイルオキシベンジルアミン（ＤＭＯＢＡ）をさらに含む。一部の実施形態では、脂質組成物は、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（ＤＯｃａｒｂＤＡＰ）をさらに含む。一部の実施形態では、脂質組成物は、２，３－ジリノレオイルオキシ－－Ｎ，Ｎ－ジメチルプロピルアミン（ＤＬｉｎＤＡＰ）をさらに含む。一部の実施形態では、脂質組成物は、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（ＤＬｉｎｃａｒｂＤＡＰ）をさらに含む。一部の実施形態では、脂質組成物は、１，２－ジリノレオイルカルバミル－３－ジメチルアミノプロパン（ＤＬｉｎＣＤＡＰ）をさらに含む。一部の実施形態では、脂質組成物は、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（ＤＬｉｎ－Ｋ－ＤＭＡ）をさらに含む。一部の実施形態では、脂質組成物は、２，２－ジリノレイル－４－ジメチルアミノエチル－［１，３］－ジオキソランをさらに含む。一部の実施形態では、脂質組成物は、２，２－ジリノレイル－４－ジメチルアミノエチル－［１，３］－ジオキソランまたは（ＤＬｉｎ－Ｋ－ＸＴＣ２－ＤＭＡ）をさらに含む。

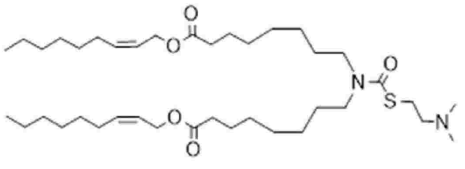
【００４７】

一部の実施形態では、脂質組成物は、イオン性カチオン性脂質を含む。一部の実施形態では、１つ以上のイオン性カチオン性脂質は、以下から選択される。

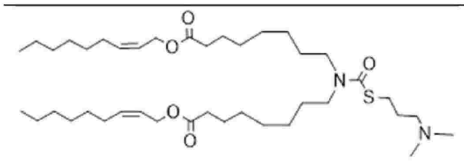
【化１－１】



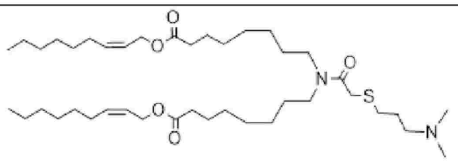
ＡＴＸ－００１



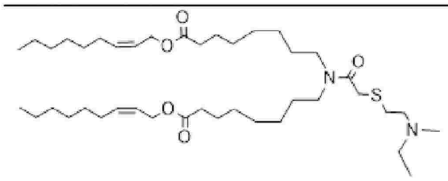
ＡＴＸ－００２



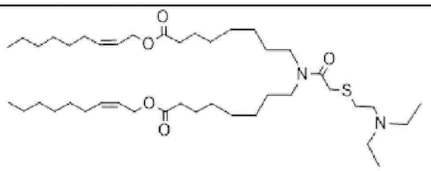
ＡＴＸ－００３



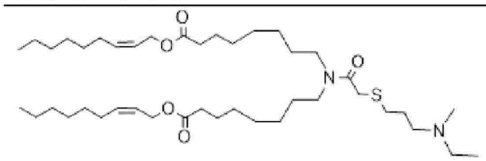
ＡＴＸ－００４



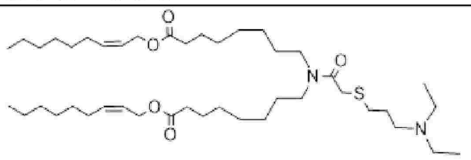
ＡＴＸ－００５



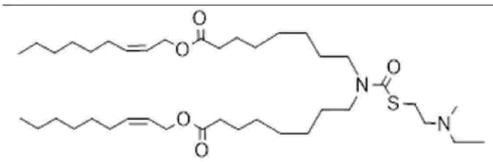
ＡＴＸ－００６



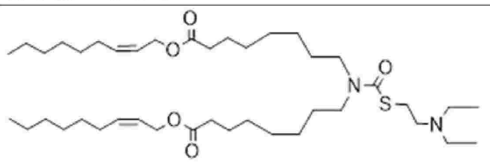
ＡＴＸ－００７



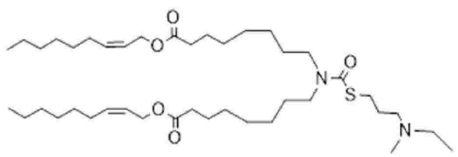
ＡＴＸ－００８



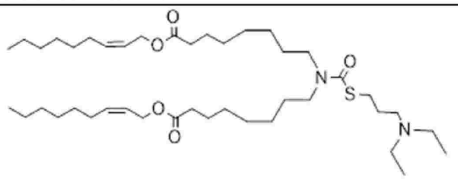
ＡＴＸ－００９



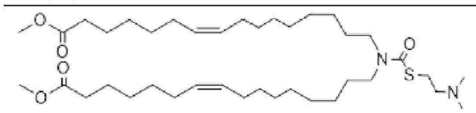
ＡＴＸ－０１０



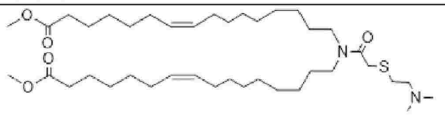
ＡＴＸ－０１１



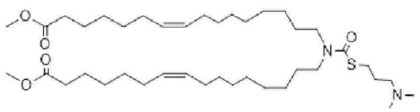
ＡＴＸ－０１２



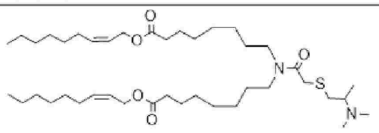
ＡＴＸ－０１３



ＡＴＸ－０１４

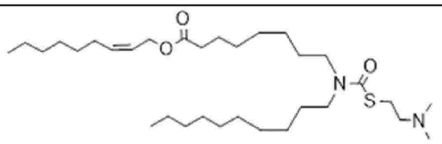
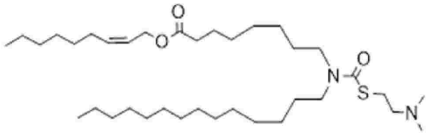
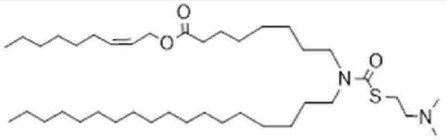
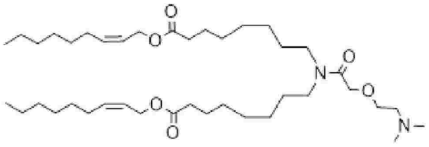
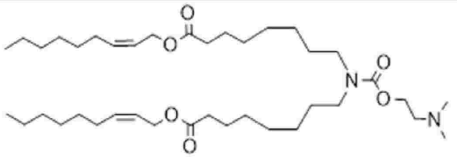
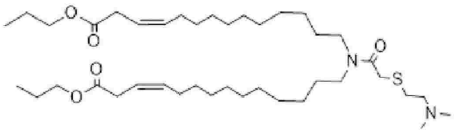
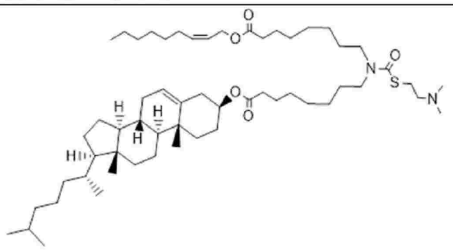
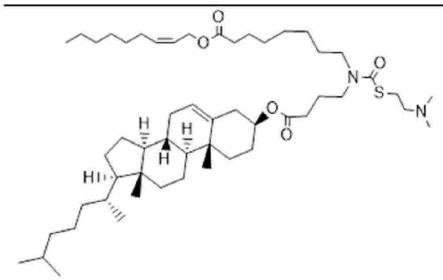
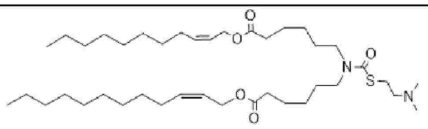
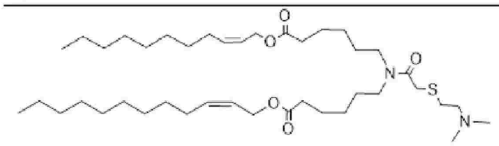
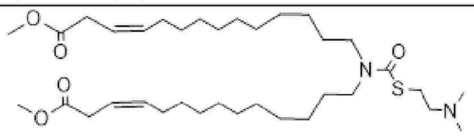
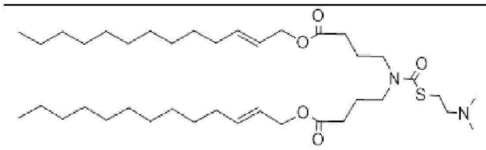
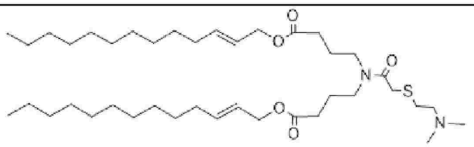


ＡＴＸ－０１５

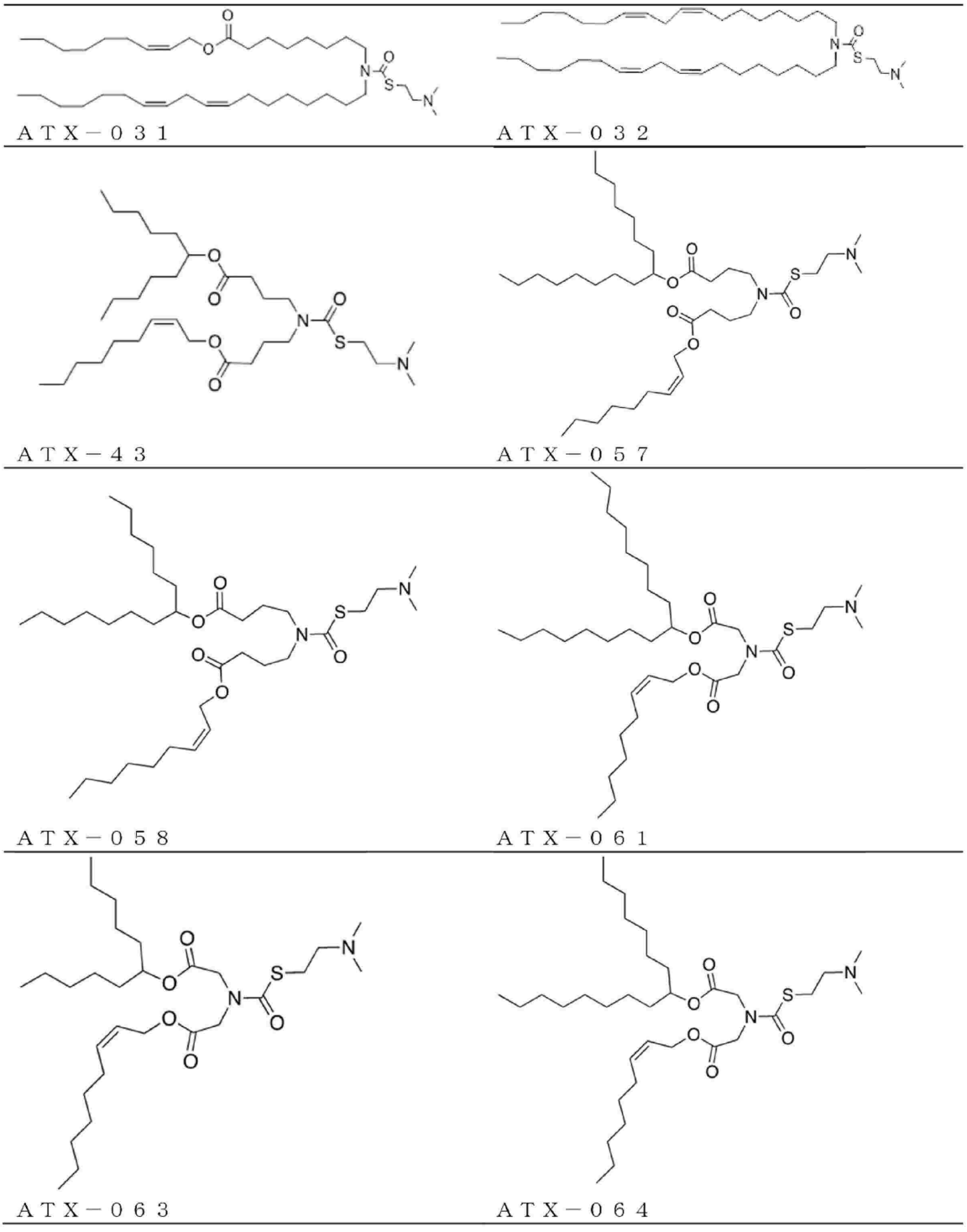


ＡＴＸ－０１６

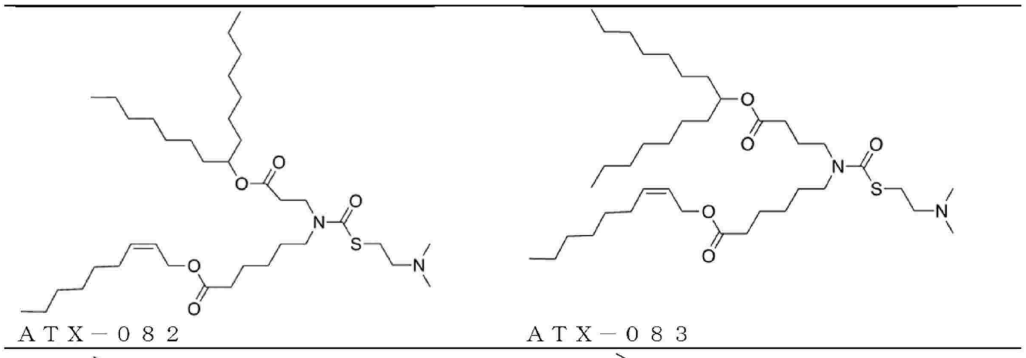
【化１－２】

	 ＡＴＸ－０１８
 ＡＴＸ－０１９	 ＡＴＸ－０２０
 ＡＴＸ－０２１	 ＡＴＸ－０２２
 ＡＴＸ－０２３	 ＡＴＸ－０２４
 ＡＴＸ－０２５	 ＡＴＸ－０２６
 ＡＴＸ－０２７	 ＡＴＸ－０２８
 ＡＴＸ－０２９	 ＡＴＸ－０３０

【化１－３】

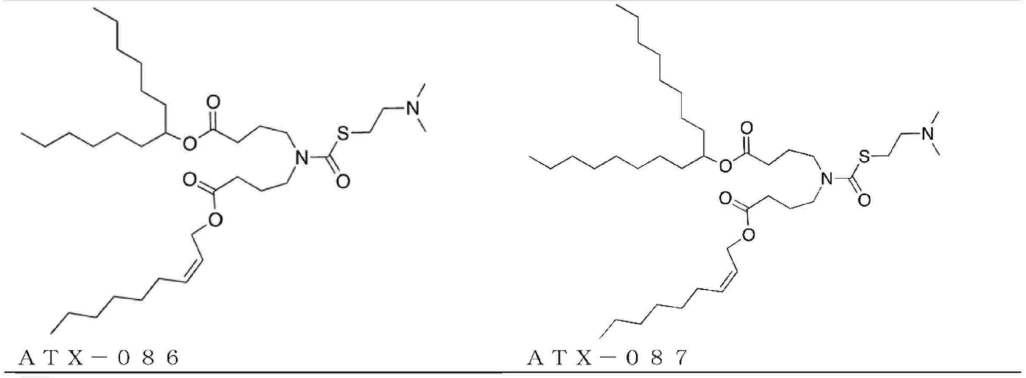


【化１－４】



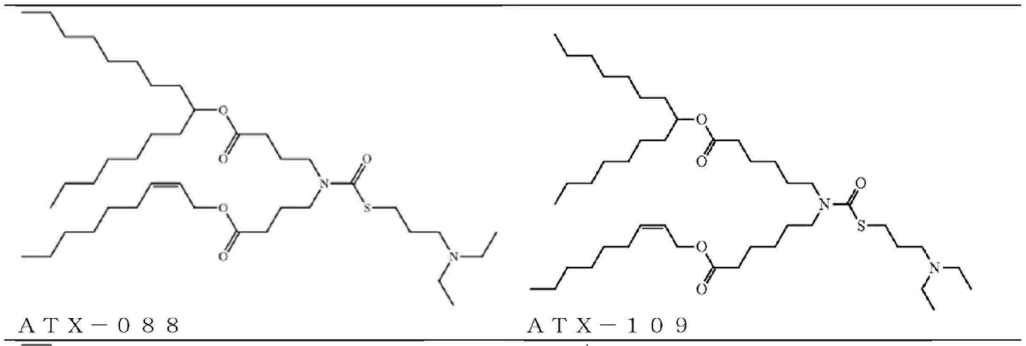
ＡＴＸ－０８２

ＡＴＸ－０８３



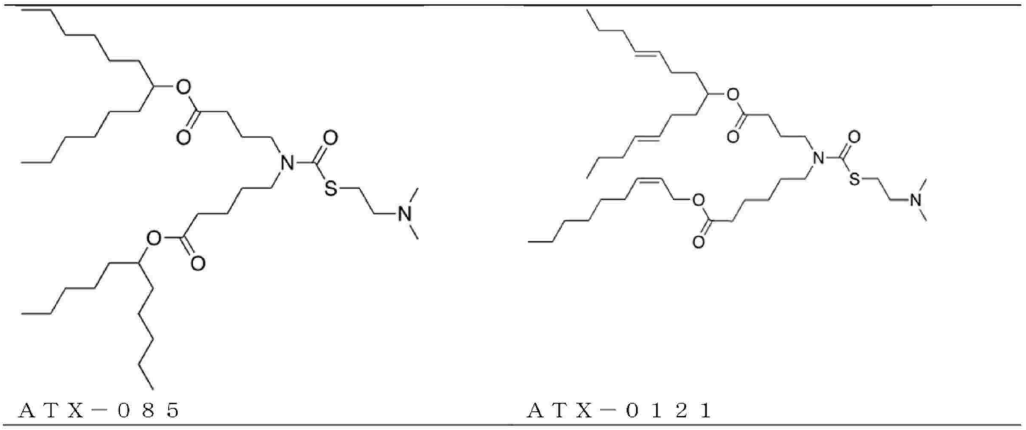
ＡＴＸ－０８６

ＡＴＸ－０８７



ＡＴＸ－０８８

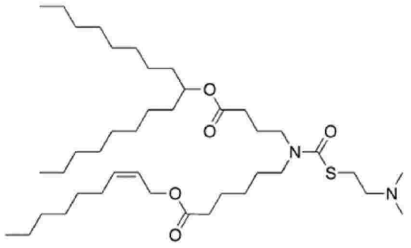
ＡＴＸ－１０９



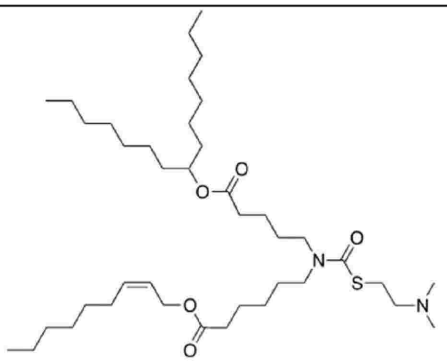
ＡＴＸ－０８５

ＡＴＸ－０１２１

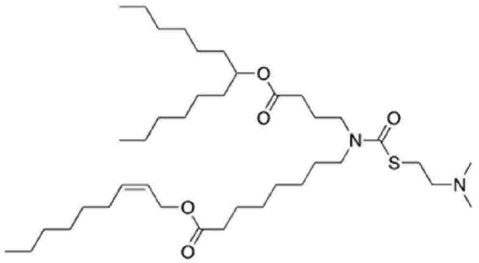
【化１－５】



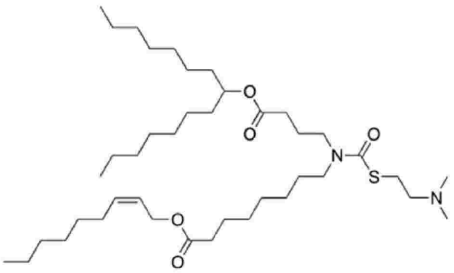
ＡＴＸ－０９１



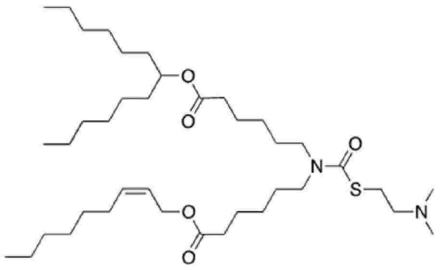
ＡＴＸ－０１０２



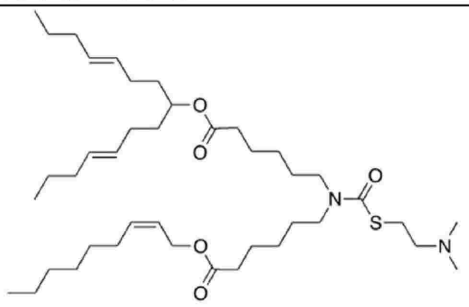
ＡＴＸ－０９８



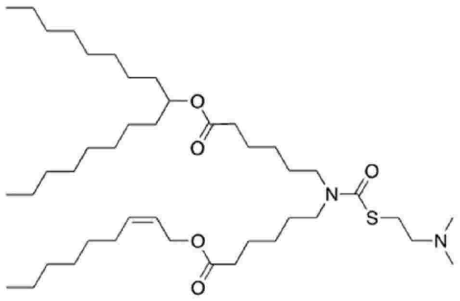
ＡＴＸ－０９２



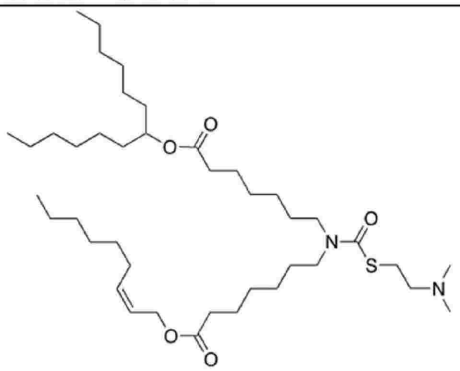
ＡＴＸ－０８４



ＡＴＸ－０１２５

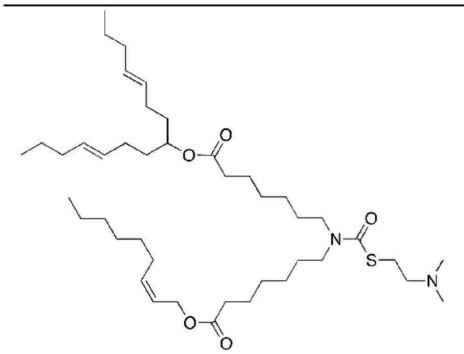


ＡＴＸ－０９４

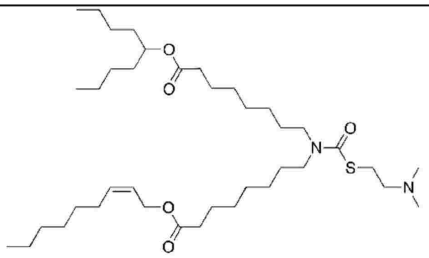


ＡＴＸ－０１１０

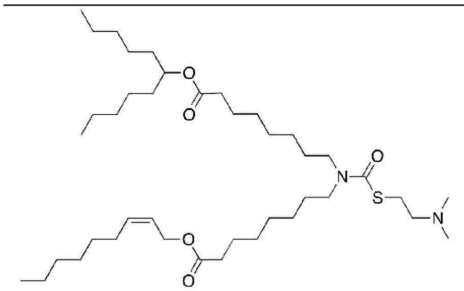
【化１－６】



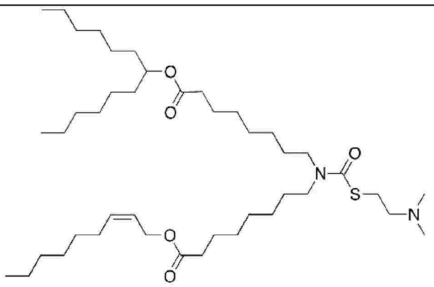
ＡＴＸ－０１１８



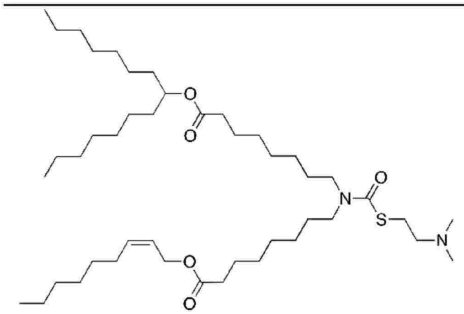
ＡＴＸ－０１０８



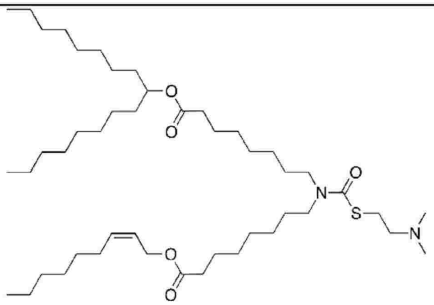
ＡＴＸ－０１０７



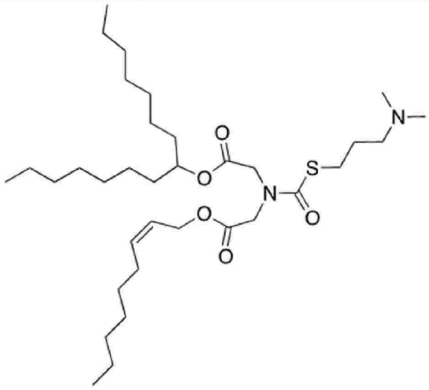
ＡＴＸ－０９３



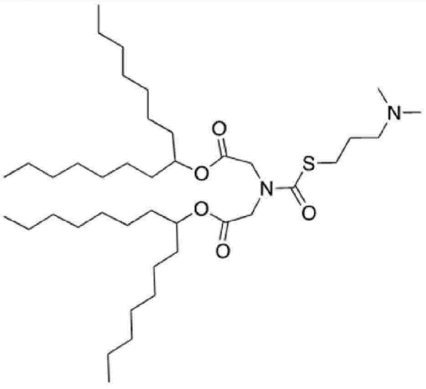
ＡＴＸ－０９７



ＡＴＸ－０９６

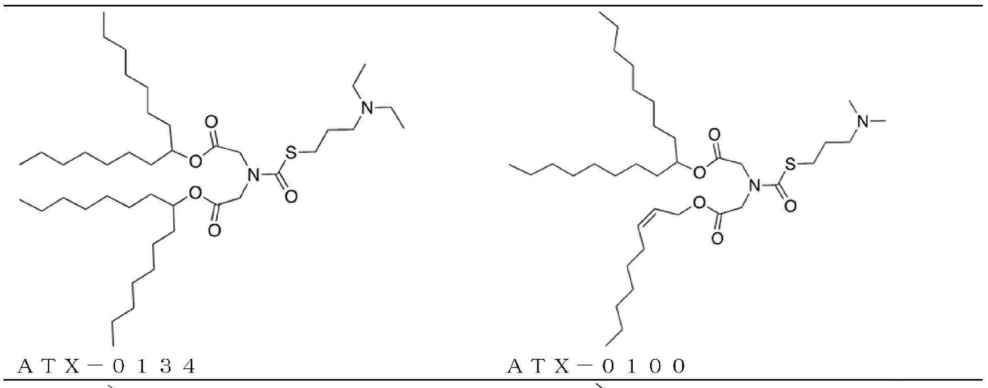


ＡＴＸ－０１１１

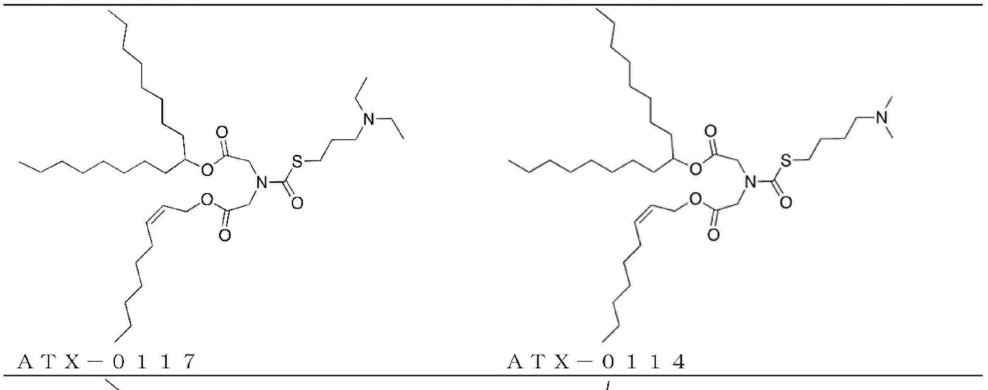


ＡＴＸ－０１３２

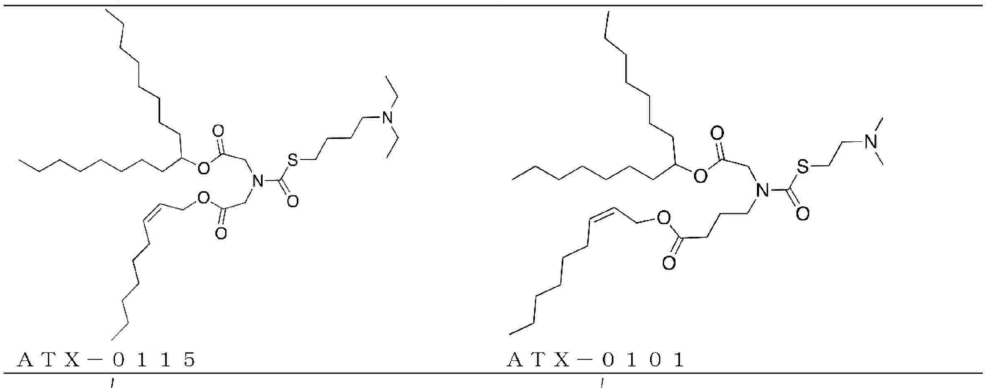
【化１－７】


ＡＴＸ－０１３４

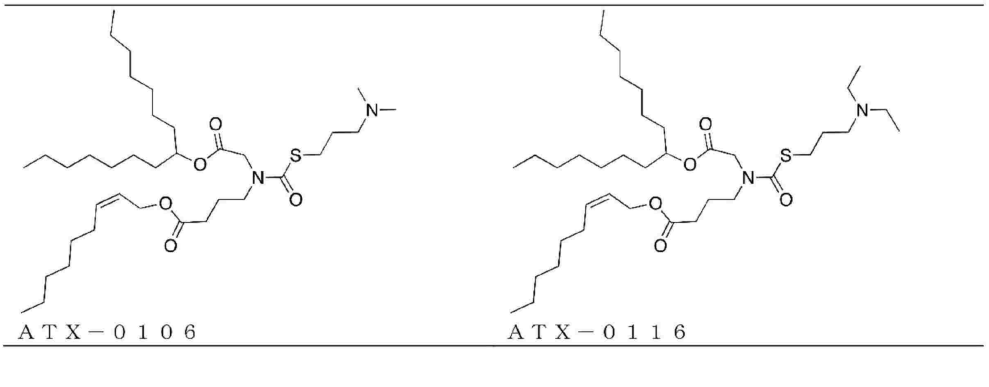
ＡＴＸ－０１００


ＡＴＸ－０１１７

ＡＴＸ－０１１４

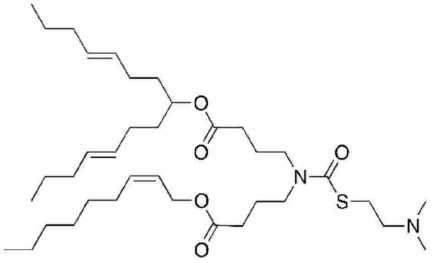

ＡＴＸ－０１１５

ＡＴＸ－０１０１

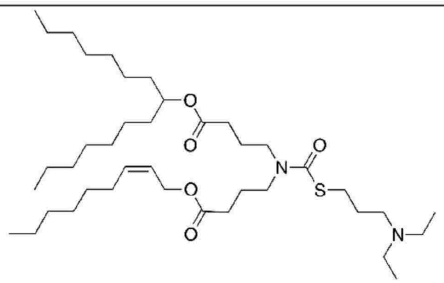

ＡＴＸ－０１０６

ＡＴＸ－０１１６

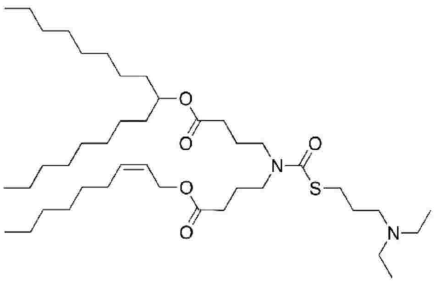
【化１－８】



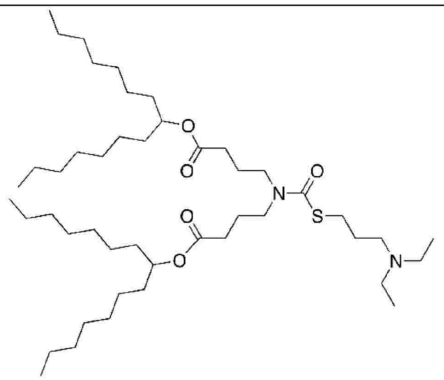
ＡＴＸ－０１２３



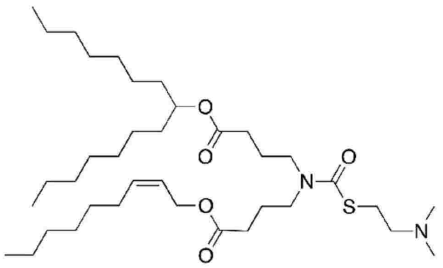
ＡＴＸ－０１２２



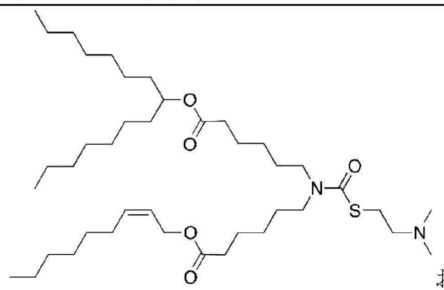
ＡＴＸ－０１２４



ＡＴＸ－０１２９

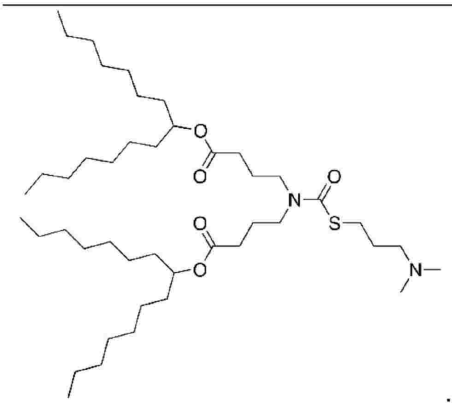


ＡＴＸ－０８１



ＡＴＸ－０９５

および



ＡＴＸ－０１２６

【００４８】

一部の実施形態では、脂質組成物は、１つ以上のヘルパー脂質をさらに含む。

【００４９】

一部の実施形態では、脂質組成物は、ステロールをさらに含む。一部の実施形態では、ステロールはコレステロールである。

【００５０】

一実施形態では、本明細書に提供されるペプチド－脂質コンジュゲートを含む脂質組成物が提供され、またその実施形態および核酸を含み、

ｉ．ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチドは、約４～約５２個のアミノ酸からなり

、
ｉｉ．ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチド中のアミノ酸の少なくとも約１４％は、プロリンであり、
ｉｉｉ．ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチド中のアミノ酸の約２８％～約８０％は、親水性側鎖を有し、
ｉｖ．ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチド中のアミノ酸の約４３％未満は、グリシンであり、
ｖ．脂質組成物は、１つ以上のカチオン性脂質、１つ以上のヘルパー脂質、およびステロールを含み、
ｖｉ．ペプチド－脂質コンジュゲートは、脂質組成物中の全ての脂質の約０．１ｍｏｌ％～約１０ｍｏｌ％を含む。
【００５１】
一部の実施形態では、核酸は、ｓｉＲＮＡ、アンチセンスオリゴヌクレオチド、ＵＮＡオリゴマー、ｍＲＮＡ、マイクロＲＮＡ、およびＤＮＡから選択される。一部の実施形態では、核酸は、ｓｉＲＮＡである。一部の実施形態では、核酸は、アンチセンスオリゴヌクレオチドである。一部の実施形態では、核酸はＵＮＡオリゴマーである。一部の実施形態では、核酸はマイクロＲＮＡである。一部の実施形態では、核酸はＤＮＡである。一部の実施形態では、核酸はｍＲＮＡである。一部の実施形態では、ｍＲＮＡは、自己複製ｍＲＮＡである。一部の実施形態では、核酸は、ｓｉＲＮＡである。
【００５２】
一部の実施形態では、それを必要とする対象において疾患を治療する方法が提供され、方法は、先行する請求項のいずれか１つの脂質組成物を投与することを含む。疾患は、がんであってもよい。疾患は、自己免疫疾患であってもよい。疾患は、炎症性疾患であってもよい。疾患は、感染性疾患であってもよい。一部の実施形態では、疾患は、オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症（ＯＴＣ欠損症）である。一部の実施形態では、疾患は、嚢胞性繊維症（ＣＦ）である。一部の実施形態では、疾患は自己免疫性肝炎である。一部の実施形態では、疾患は、肝ウイルス疾患（例えば、Ａ型肝炎、Ｂ型肝炎、Ｃ型肝炎、Ｄ型肝炎、Ｅ型肝炎）である。一部の実施形態では、疾患は、Ｂ型肝炎である。一部の実施形態では、疾患は、非アルコール性脂肪性肝炎（ＮＡＳＨ）である。一部の実施形態では、細胞を本開示の脂質組成物と接触させることを含む、細胞において興味のあるタンパク質またはポリペプチドを発現する方法が提供される。
【００５３】
一部の実施形態では、本開示の請求項の脂質組成物を含むワクチンが提供される。一部の実施形態では、ワクチンはＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ワクチンである。一部の実施形態では、ワクチンはインフルエンザワクチンである。一部の実施形態では、ワクチンはＨＩＶワクチンである。一部の実施形態では、ワクチンはエボラワクチンである。一部の実施形態では、ワクチンはがんワクチンである。
【００５４】
一実施形態では、対象において免疫応答を誘発する方法が提供され、対象にワクチンを投与することを含む。したがって、一部の実施形態では、対象における疾患を予防する方法が提供され、方法は、その実施形態を含む、本明細書に提供される脂質組成物を対象に投与することを含む。
【００５５】
一部の実施形態では、細胞において興味のある遺伝子またはメッセンジャーＲＮＡの発現を阻害する方法が提供され、細胞を本開示の脂質組成物と接触させることを含む。
【００５６】
一部の実施形態では、興味のあるタンパク質またはポリペプチドが欠損している対象において興味のあるタンパク質またはポリペプチドを発現する方法が提供され、本開示の脂質組成物を対象に投与することを含み、脂質組成物は、興味のあるタンパク質またはポリペプチドをコードするｍＲＮＡを含む。

【００５７】
本明細書で提供される方法について、一部の実施形態では、脂質組成物は、静脈内または筋肉内投与される。一部の実施形態では、脂質組成物は、静脈内投与される。一部の実施形態では、脂質組成物は、筋肉内投与される。
【００５８】
一部の実施形態では、細胞中の遺伝子を編集する方法は、細胞をｍＲＮＡを含む本開示の脂質組成物と接触させることを含み、ｍＲＮＡは、遺伝子編集酵素をコードする。一部の実施形態では、遺伝子編集酵素は、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ）、転写活性因子様エフェクターヌクレアーゼ（ＴＡＬＥＮ）、メガヌクレアーゼ、またはクラスター化され規則的に間隔を置いた短い回文反復配列システム（ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ）による遺伝子編集に必要な１つ以上の構成要素を含む。一部の実施形態では、遺伝子編集酵素は、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ）、転写活性因子様エフェクターヌクレアーゼ（ＴＡＬＥＮ）、メガヌクレアーゼ、またはクラスター化され規則的に間隔を置いた短い回文反復配列システム（ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ）である。一部の実施形態では、遺伝子編集酵素はＴＡＬＥＮ酵素である。
【００５９】
一部の実施形態では、細胞に核酸へと送達する方法が提供され、方法は、細胞を、その実施形態を含む、本明細書に提供される脂質組成物と接触させることを含む。
【００６０】
一部の実施形態では、細胞を撮像する方法が提供され、方法は、細胞を、その実施形態を含む本明細書に提供される脂質組成物と接触させることを含み、核酸は、検出可能なタンパク質をコードする。
【００６１】
実施形態では、本明細書に提供される脂質組成物を作製する方法は、その実施形態を含み、方法は、ｉ）脂質核酸をペプチド－脂質コンジュゲートと接触させることと、ｉｉ）ペプチド－脂質コンジュゲートが核酸を封入することを可能にすることと、を含む。
【００６２】
脂質系製剤
標的細胞への核酸の細胞内送達に基づく療法は、細胞外バリアおよび細胞内バリアの両方に直面する。実際に、裸の核酸材料は、それらの毒性、血清中での低い安定性、急速な腎クリアランス、標的細胞による取り込みの低減、食細胞の取り込み、および免疫応答を活性化するそれらの能力、それらの臨床開発を妨げる全ての特徴に起因して、簡単に全身投与することができない。外因性核酸材料（例えば、ｍＲＮＡ）がヒト生物系に入るとき、それは、細網内皮系（ＲＥＳ）によって外来病原体として認識され、そして血管系内または血管系外の標的細胞に遭遇する機会を有する前に血液循環から除去される。血流中の裸の核酸の半減期は、おおよそ数分であることが報告されている（Ｋａｗａｂａｔａ Ｋ，Ｔａｋａｋｕｒａ Ｙ，Ｈａｓｈｉｄａ ＭＰｈａｒｍ Ｒｅｓ．１９９５ Ｊｕｎ；１２（６）：８２５－３０）。化学修飾および適正な送達方法は、ＲＥＳによる取り込みを低減し、かつ遍在するヌクレアーゼによる分解から核酸を保護することができ、これは核酸ベースの療法の安定性および有効性を増加させる。加えて、ＲＮＡまたはＤＮＡは、細胞による取り込みについては好ましくない、表面でもアニオン性であるアニオン性親水性ポリマーである。したがって、核酸ベースの療法の成功は、主に、遺伝子材料を標的細胞へと効率的かつ効果的に送達し、かつ最小限の毒性かつインビボで十分なレベルの発現を得ることができるビヒクルまたはベクターの開発に依存する。
【００６３】
さらに、標的細胞への内部移行時に、核酸送達ベクターは、細胞内バリアによって、エンドソームの取り込み、リソソーム分解、ベクターからの核酸の開梱、核膜を横切る移行（ＤＮＡについて）、および細胞質での放出（ＲＮＡについて）を含む課題を突き付けられる。したがって、順調な核酸ベースの療法は、遺伝子の発現などの十分なレベルの望ましい活性を得るために、ベクターが核酸を細胞内側の標的部位に送達する能力に依存する

。

【００６４】

いくつかの遺伝子療法は、ウイルス送達ベクター（例えば、ＡＡＶ）を首尾よく利用することができるが、脂質系製剤は、その生体適合性および大規模な生産の簡単さに起因して、ＲＮＡおよび他の核酸化合物のための最も有望な送達システムの１つとしてますます認識されている。脂質系の核酸療法の最も重要な進歩の１つは、パチシラン（ＡＬＮ－ＴＴＲ０２）が最初のｓｉＲＮＡ治療薬として米国食品医薬品局（ＦＤＡ）および欧州委員会（ＥＣ）から承認された２０１８年８月に生じた。ＡＬＮ－ＴＴＲ０２は、いわゆる安定した核酸脂質粒子（ＳＮＡＬＰ）トランスフェクション技術に基づくｓｉＲＮＡ製剤である。パチシランの成功にもかかわらず、脂質製剤を介した、ｍＲＮＡを含む核酸治療薬の送達は、依然として開発中である。

【００６５】

核酸治療薬のための一部の当技術分野で認識されている脂質製剤送達ビヒクルとしては、様々な実施形態による、ポリマー系担体、（ポリエチレンイミン（ＰＥＩ）、脂質ナノ粒子およびリポソームなど）、ナノリポソーム、セラミド含有ナノリポソーム、多小胞リポソーム、プロテオリポソーム、天然および合成の両方に由来するエクソソーム、天然、合成および半合成の層状体、ナノ粒子、ミセル、およびエマルションが挙げられる。これらの脂質製剤は、それらの構造および組成物が異なることが可能であり、また急速に発展する分野で期待することができるため、当該技術分野では、単一のタイプの送達ビヒクルを説明するためにいくつかの異なる用語が使用されている。同時に、脂質製剤の用語は、科学文献全体を通してそれらの意図される意味に関して変化しており、この一貫性のない使用は、脂質製剤のいくつかの用語の正確な意味に関して混乱を引き起こしている。いくつかの潜在的な脂質製剤の中でも、リポソーム、カチオン性リポソーム、および脂質ナノ粒子は、本開示の目的のために詳細に具体的に記載され、かつ本明細書で定義される。

【００６６】

リポソーム

従来のリポソームは、少なくとも１つの二重層および内部水性区画からなる小胞である。リポソームの二重層膜は、典型的に、空間的に分離された親水性ドメインおよび疎水性ドメインを含む合成起源または天然起源の脂質などの両親媒性分子によって形成される（Ｌａｓｉｃ，Ｔｒｅｎｄｓ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．，１６：３０７－３２１，１９９８）。リポソームの二重層膜はまた、両親媒性ポリマーおよび界面活性剤（例えば、ポリメロソーム（ｐｏｌｙｍｅｒｏｓｏｍｅ）、ニオソームなど）によっても形成することができる。それらは、一般的に球状小胞として存在し、２０ｎｍ～数ミクロンのサイズの範囲である可能性がある。リポソーム製剤は、コロイド分散体として調製することができ、または安定性リスクを低減し、かつリポソーム系薬剤の貯蔵寿命を改善するために凍結乾燥することができる。リポソーム組成物を調製する方法は、当技術分野で知られており、当業者の技能範囲内である。

【００６７】

１つの二重層のみを有するリポソームは、単層と称され、２つ以上の二重層を有するリポソームは、多層と称される。リポソームの最も一般的なタイプは、小型単層小胞（ＳＵＶ）、大型単層小胞（ＬＵＶ）、および多層小胞（ＭＬＶ）である。リポソームとは対照的に、リソソーム、ミセル、および逆ミセルは、脂質の単層から構成される。一般的に、リポソームは、単一の内部区画を有すると考えられるが、一部の製剤は、いくつかの非同心性脂質二重層によって分離された多数の不連続な内部水性区画からなる、多小胞リポソーム（ＭＶＬ）とすることができる。

【００６８】

リポソームは、リポソームが基本的には生体膜の類似体であり、また天然リン脂質および合成リン脂質の両方から調製することができることを考慮して、その優れた生体適合性のために、リポソームは薬剤送達ビヒクルとして長い間認識されてきた（Ｉｎｔ．Ｊ．Ｎａｎｏｍｅｄｉｃｉｎｅ．２０１４；９：１８３３－１８４３）。薬剤送達ビヒクルとし

てのそれらの使用では、リポソームは疎水性膜によって囲まれた水溶液コアを有するため、コアに溶解した親水性溶質は、二重層を容易に通過することができず、疎水性化合物は二重層と会合する。したがって、リポソームには、疎水性分子および／または親水性分子を搭載することができる。ＲＮＡなどの核酸を担持するためにリポソームが使用される場合、核酸は水相においてリポソーム区画内に含有される。

【００６９】

カチオン性リポソーム

リポソームは、カチオン性脂質、アニオン性脂質、および／または中性脂質から構成することができる。リポソームの重要なサブクラスとして、カチオン性リポソームは、正に荷電した脂質、すなわちより具体的には、カチオン性基および親油性部分の両方を含む脂質から全体的または部分的に作製されるリポソームである。リポソームについて上記で描かれた一般的な特性に加えて、カチオン性リポソームで使用されるカチオン性脂質の正に荷電した部分は、いくつかの利点およびいくつかの固有の構造的特徴を提供する。例えば、カチオン性脂質の親油性部分は疎水性であり、したがって、リポソームの水性内部から離れるようにそれ自体を方向付け、そして他の非極性種および疎水性種と会合する。反対に、カチオン性部分は、水性媒体と、そしてより重要なことに、カチオン性リポソームの水性内部で複合体化することができる極性分子および種と会合する。これらの理由から、カチオン性リポソームは、静電相互作用を介して負に荷電した核酸に対するそれらの好ましさにより、遺伝子治療での使用についてますます研究され、生体適合性、低毒性、およびインビボ臨床用途に必要とされる大規模な生産の可能性を提供する複合体をもたらす。カチオン性リポソームでの使用のために好適なカチオン性脂質は、以下にリストされている。

【００７０】

脂質ナノ粒子

リポソームおよびカチオン性リポソームとは対照的に、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）は、固相で化合物を封入する脂質の単一の単層または二重層を含む構造を有する。したがって、リポソームとは異なり、脂質ナノ粒子は、その内部に水相または他の液相を有しないが、むしろ、二重層シェルまたは単層シェルからの脂質は、内部化合物に直接的に複合体化され、それによって固体コア内にそれを封入する。脂質ナノ粒子は典型的に、形状およびサイズの比較的均一な分散を有する球状小胞である。脂質粒子をナノ粒子として認定するサイズに関しては情報源によって異なるが、脂質ナノ粒子が１０ｎｍ～１０００ｎｍの範囲の直径を有することができることで、いくらかの重複した一致がみられる。しかしながら、より一般的には、それらは１２０ｎｍよりも小さい、または１００ｎｍよりも小さいと考えられる。

【００７１】

脂質ナノ粒子核酸送達システムについては、脂質シェルは、核酸コアの負に荷電した骨格と複合体化しかつ会合することができるイオン性カチオン性脂質を含むように製剤化することができる。約７未満の見かけのｐＫａ値を有するイオン性カチオン性脂質は、核酸の負に荷電した骨格と複合体化し、それが正に荷電したイオン化脂質のｐＫａ未満のｐＨ値で脂質ナノ粒子に搭載するためのカチオン性脂質を提供する、という利点を有する。次いで、生理的ｐＨ値では、脂質ナノ粒子は、比較的中性の外部を適合することができ、静脈内投与後の粒子の循環半減期の有意な増加を可能にする。核酸送達の文脈において、脂質ナノ粒子は、高い核酸封入効率、強力なトランスフェクション、治療薬を送達するための組織への浸透の改善、および細胞毒性および免疫原性の低いレベルを含む、他の脂質系核酸送達システムよりも多くの利点を提供する。

【００７２】

核酸用の脂質ナノ粒子送達システムの開発に先立ち、カチオン性脂質が、核酸医薬品の送達のための合成材料として広く研究されてきた。これらの早期の取り組みでは、生理的ｐＨで一緒に混合した後、核酸をカチオン性脂質によって凝縮して、リポプレックスとして知られる脂質－核酸複合体を形成した。しかしながら、リポプレックスは不安定である

ことが証明され、またサブミクロンスケールから数ミクロンの範囲の幅広いサイズ分布によって特徴解析された。Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ（登録商標）試薬などのリポプレックスは、インビトロトランスフェクションに対するかなりの有用性を見出した。しかしながら、これらの第一世代リポプレックスがインビボで有用であることは証明されていない。大きな粒子サイズおよび正電荷（カチオン性脂質によって付与される）は、急速な血漿クリアランス、溶血性、および他の毒性、ならびに免疫系活性化をもたらす。

【００７３】

脂質－核酸製剤

核酸またはその薬学的に許容可能な塩は、脂質製剤（すなわち、脂質系送達ビヒクル）に組み込むことができる。

【００７４】

本開示の文脈では、脂質系送達ビヒクルは、典型的に、所望の核酸（ｓｉＲＮＡ、プラスミドＤＮＡ、ｍＲＮＡ、自己複製ＲＮＡなど）を標的細胞または標的組織に輸送するように機能する。脂質系送達ビヒクルは、当技術分野で知られている任意の好適な脂質系送達ビヒクルとすることができる。一部の実施形態では、脂質系送達ビヒクルは、リポソーム、カチオン性リポソーム、または核酸を含有する脂質ナノ粒子である。一部の実施形態では、脂質系送達ビヒクルは、脂質分子および核酸のナノ粒子または二重層を含む。一部の実施形態では、脂質二重層は、中性脂質またはポリマーをさらに含むことが好ましい。一部の実施形態では、脂質製剤は、液体媒体を含むことが好ましい。一部の実施形態では、製剤は、好ましくは、核酸をさらに封入する。一部の実施形態では、脂質製剤は、好ましくは、核酸および中性脂質またはポリマーをさらに含む。一部の実施形態では、脂質製剤は、好ましくは、核酸を封入する。

【００７５】

本明細書は、脂質製剤内に封入された１つ以上の治療用核酸分子を含む脂質製剤を提供する。一部の実施形態では、脂質製剤は、リポソームを含む。一部の実施形態では、脂質製剤は、カチオン性リポソームを含む。一部の実施形態では、脂質製剤は、脂質ナノ粒子を含む。

【００７６】

一部の実施形態では、核酸は、脂質製剤の脂質部分内に完全に封入され、これにより脂質製剤中の核酸はヌクレアーゼ分解に対して水溶液中で耐性である。他の実施形態では、本明細書に記載の脂質製剤は、ヒトなどの哺乳類に対して実質的に非毒性である。

【００７７】

本開示の脂質製剤はまた、典型的に、約１：１～約１００：１、約１：１～約５０：１、約２：１～約４５：１、約３：１～約４０：１、約５：１～約３８：１、約６：１～約４０：１、約７：１～約３５：１、約８：１～約３０：１、約１０：１～約２５：１、約８：１～約１２：１、約１３：１～約１７：１、約１８：１～約２４：１、または約２０：１～約３０：１の総脂質：核酸比（質量／質量比）も有する。一部の好ましい実施形態では、総脂質：核酸比（質量／質量比）は、約１０：１～約２５：１である。比は、端点を含む、列挙された範囲内の任意の値またはサブ値であってもよい。

【００７８】

本開示の脂質製剤は、典型的に、約３０ｎｍ～約１５０ｎｍ、約４０ｎｍ～約１５０ｎｍ、約５０ｎｍ～約１５０ｎｍ、約６０ｎｍ～約１３０ｎｍ、約７０ｎｍ～約１１０ｎｍ、約７０ｎｍ～約１００ｎｍ、約８０ｎｍ～約１００ｎｍ、約９０ｎｍ～約１００ｎｍ、約７０～約９０ｎｍ、約８０ｎｍ～約９０ｎｍ、約７０ｎｍ～約８０ｎｍ、または約３０ｎｍ、約３５ｎｍ、約４０ｎｍ、約４５ｎｍ、約５０ｎｍ、約５５ｎｍ、約６０ｎｍ、約６５ｎｍ、約７０ｎｍ、約７５ｎｍ、約８０ｎｍ、約８５ｎｍ、約９０ｎｍ、約９５ｎｍ、約１００ｎｍ、約１０５ｎｍ、約１１０ｎｍ、約１１５ｎｍ、約１２０ｎｍ、約１２５ｎｍ、約１３０ｎｍ、約１３５ｎｍ、約１４０ｎｍ、約１４５ｎｍ、または約１５０ｎｍの平均直径を有し、また実質的に非毒性である。直径は、端点を含めて、列挙された範囲内の任意の値またはサブ値であってもよい。加えて、核酸は、本開示の脂質ナノ粒子中に

存在する場合、ヌクレアーゼによる分解に対して水溶液中で耐性である。

【００７９】

好ましい実施形態では、脂質製剤は、核酸、カチオン性脂質（例えば、本明細書に記載の１つ以上のカチオン性脂質またはその塩）、リン脂質、および粒子の凝集を阻害するコンジュゲートされた脂質（例えば、本開示の１つ以上のＰＥＧ脂質コンジュゲートおよび／またはペプチド脂質コンジュゲート）を含む。脂質製剤はまた、コレステロールも含むことができる。

【００８０】

核酸脂質製剤では、核酸は製剤の脂質部分内に完全に封入されてもよく、それによって核酸をヌクレアーゼ分解から保護する。好ましい実施形態では、核酸を含む脂質製剤は、脂質製剤の脂質部分内に完全に封入され、それによって核酸をヌクレアーゼ分解から保護する。ある特定の事例では、脂質製剤中の核酸は、粒子を３７℃で少なくとも２０、３０、４５、または６０分間ヌクレアーゼに曝露した後、実質的に分解されない。ある特定の他の事例では、脂質製剤中の核酸は、３７℃で少なくとも３０、４５、もしくは６０分間、または少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１２、１４、１６、１８、２０、２２、２４、２６、２８、３０、３２、３４、もしくは３６時間の間、血清中の製剤のインキュベーション後、実質的に分解されない。他の実施形態では、核酸は、製剤の脂質部分と複合体化される。

【００８１】

核酸との文脈では、完全な封入は、核酸と会合したときに蛍光が強化された染料を使用する、膜不透過性蛍光染料除外アッセイを実施することによって決定され得る。封入は、脂質製剤に染料を添加し、結果として生じる蛍光を測定し、そして少量の非イオン性洗剤の添加時に観察される蛍光と比較することによって決定される。脂質層の洗剤媒介性破壊は、封入された核酸を放出し、膜不透過性染料と相互作用することを可能にする。核酸封入は、Ｅ＝（Ｉ０－Ｉ）／Ｉ０として計算されてもよく、式中、ＩおよびＩ０は、洗剤の添加前後の蛍光強度を指す。

【００８２】

他の実施形態では、本開示は、複数の核酸－リポソーム、核酸－カチオン性リポソーム、または核酸－脂質ナノ粒子を含む核酸－脂質組成物を提供する。一部の実施形態では、核酸脂質組成物は、複数の核酸－リポソームを含む。一部の実施形態では、核酸脂質組成物は、複数の核酸－カチオン性リポソームを含む。一部の実施形態では、核酸脂質組成物は、複数の核酸－脂質ナノ粒子を含む。

【００８３】

一部の実施形態では、脂質製剤は、製剤の脂質部分内に完全に封入された核酸を含み、これにより、粒子の約３０％～約１００％、約４０％～約１００％、約５０％～約１００％、約６０％～約１００％、約７０％～約１００％、約８０％～約１００％、約９０％～約１００％、約３０％～約９５％、約４０％～約９５％、約５０％～約９５％、約６０％～約９５％、約７０％～約９５％、約８０％～約９５％、約８５％～約９５％、約９０％～約９５％、約３０％～約９０％、約４０％～約９０％、約５０％～約９０％、約６０％～約９０％、約７０％～約９０％、約８０％～約９０％、または少なくとも約３０％、約３５％、約４０％、約４５％、約５０％、約５５％、約６０％、約６５％、約７０％、約７５％、約８０％、約８５％、約９０％、約９１％、約９２％、約９３％、約９４％、約９５％、約９６％、約９７％、約９８％、または約９９％（またはその任意の画分もしくはその中の範囲）が、その中に封入された核酸を有する。量は、端点を含めて、列挙された範囲内の任意の値またはサブ値であってもよい。

【００８４】

脂質製剤の意図される使用に応じて、構成成分の比率を変化させることができ、また当技術分野で知られているアッセイを使用して、特定の製剤の送達効率を測定することができる。

【００８５】

一部の実施形態によると、発現可能なポリヌクレオチド、核酸活性剤、およびｍＲＮＡ構築物は、脂質製剤化することができる。脂質製剤は、好ましくは、リポソーム、カチオン性リポソーム、および脂質ナノ粒子から選択されるが、これらに限定されない。好ましい一実施形態では、脂質製剤は、カチオン性リポソームまたは脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）であり、

（ａ）核酸（ｍＲＮＡ、ｓｉＲＮＡなど）と、

（ｂ）カチオン性脂質と、

（ｃ）本開示のペプチド－脂質コンジュゲートと、

（ｄ）任意選択的に、非カチオン性脂質（中性脂質など）と、

（ｅ）任意選択的に、ステロールと、を含む。

【００８６】

１つの一部の実施形態では、カチオン性脂質は、イオン性カチオン性脂質である。一実施形態では、脂質ナノ粒子製剤は、（ｉ）少なくとも１つのカチオン性脂質と、（ｉｉ）ヘルパー脂質と、（ｉｉｉ）ステロール（例えば、コレステロール）と、（ｉｖ）本開示のペプチド脂質コンジュゲートと、からなり、約２０％～約４０％のイオン性カチオン性脂質：約２５％～約４５％のヘルパー脂質：約２５％～約４５％のステロール；約０．５～５％のペプチド脂質コンジュゲートのモル比である。カチオン性脂質（イオン性カチオン性脂質を含む）、ヘルパー脂質（例えば、中性脂質）、およびステロールの例を以下に記載する。

【００８７】

カチオン性脂質

脂質製剤は、好ましくは、カチオン性リポソームまたは脂質ナノ粒子を形成するために好適なカチオン性脂質を含む。カチオン性脂質は、負に荷電した膜に結合し、かつ取り込みを誘導することができるため、核酸送達について幅広く研究されている。一般的に、カチオン性脂質は、正の親水性頭部基、２つ（またはそれ以上）の親油性尾部、またはステロイド部分、およびこれらの２つのドメイン間のコネクタとを含有する両親媒性物質である。好ましくは、カチオン性脂質は、ほぼ生理的ｐＨにおいて正味の正電荷を担持する。カチオン性リポソームは、従来、プラスミドＤＮＡ、アンチセンスオリゴ、およびｓｉＲＮＡ／小ヘアピンＲＮＡ－ｓｈＲＮＡを含むオリゴヌクレオチドに最も一般的に使用される非ウイルス送達システムであった。ＤＯＴＡＰ（１，２－ジオレオイル－３－トリメチルアンモニウム－プロパン）およびＤＯＴＭＡ（Ｎ－［ｌ－（２，３－ジオレオイルオキシ）プロピル］－Ｎ，Ｎ，Ｎ－トリメチル－硫酸メチルアンモニウム）などのカチオン性脂質は、静電相互作用によって負に荷電した核酸と複合体またはリポプレックスを形成し、高いインビトロトランスフェクション効率を提供することができる。

【００８８】

本開示の脂質製剤において、カチオン性脂質は、例えばＮ、Ｎ－ジオレイル－Ｎ、Ｎ－ジメチルアンモニウムクロリド（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（ＤＤＡＢ）、１，２－ジオレオイルトリメチルアンモニウムプロパンクロリド（ＤＯＴＡＰ）（Ｎ－（２，３－ジオレオイルオキシ）プロピル）－Ｎ，Ｎ，Ｎ－トリメチルアンモニウムクロリドおよびｌ，２－ジオレイルオキシ－３－トリメチルアミノプロパンクロリド塩としても知られる）、Ｎ－（ｌ－（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クロリド（ＤＯＴＭＡ）、Ｎ，Ｎ－ジメチル－２，３－ジオレイルオキシ）プロピルアミン（ＤＯＤＭＡ）、ｌ，２－ジリノレイルオキシ－Ｎ，Ｎ－ジメチルアミノプロパン（ＤＬｉｎＤＭＡ）、ｌ，２－ジリノレニルオキシ－Ｎ，Ｎ－ジメチルアミノプロパン（ＤＬｅｎＤＭＡ）、ｌ，２－ジ－ｙ－リノレニルオキシ－Ｎ，Ｎ－ジメチルアミノプロパン（γ－ＤＬｅｎＤＭＡ）、１，２－ジリノレイルカルバモイルオキシ－３－ジメチルアミノプロパン（ＤＬｉｎ－Ｃ－ＤＡＰ）、ｌ，２－ジリノレイオキシ－３－（ジメチルアミノ）アセトキシプロパン（ＤＬｉｎ－ＤＡＣ）、ｌ，２－ジリノレイルオキシ－３－モルホリノプロパン（ＤＬｉｎ－ＭＡ）、ｌ，２－ジリノレオイル－３－ジメチルアミノプロパン（ＤＬｉｎＤＡＰ）、ｌ，２

－ジリノレイルチオ－３－ジメチルアミノプロパン（ＤＬｉｎ－Ｓ－ＤＭＡ）、ｌ－リノレオイル－２－リノレイルオキシ－３－ジメチルアミノプロパン（ＤＬｉｎ－２－ＤＭＡＰ）、ｌ，２－ジリノレイルオキシ－３－トリメチルアミノプロパンクロリド塩（ＤＬｉｎ－ＴＭＡ．Ｃｌ）、ｌ，２－ジリノレオイル－３－トリメチルアミノプロパンクロリド塩（ＤＬｉｎ－ＴＡＰ．Ｃｌ）、ｌ，２－ジリノレイルオキシ－３－（Ｎ－メチルピペラジノ）プロパン（ＤＬｉｎ－ＭＰＺ）、または３－（Ｎ，Ｎ－ジリノレイルアミノ）－ｌ，２－プロパンジオール（ＤＬｉｎＡＰ）、３－（Ｎ，Ｎ－ジオレイルアミノ）－ｌ，２－プロパンジオール（ＤＯＡＰ）、ｌ，２－ジリノレイルオキソ－３－（２－Ｎ，Ｎ－ジメチルアミノ）エトキシプロパン（ＤＬｉｎ－ＥＧ－ＤＭＡ）、２，２－ジリノレイル－４－ジメチルアミノメチル－［ｌ，３］－ジオキソラン（ＤＬｉｎ－Ｋ－ＤＭＡ）またはその類似体、（３ａＲ，５ｓ，６ａＳ）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－２，２－ジ（（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエニル）テトラヒドロ－３ａＨ－シクロペンタ［ｄ］［ｌ、３］ジオキソル－５－アミン、（６Ｚ，９Ｚ，２８Ｚ，３１Ｚ）－ヘプタトリアコンタ－６，９，２８，３１－テトラエン－１９－イル４－（ジメチルアミノ）ブタノエート（ＭＣ３）、ｌ，ｌ’－（２－（４－（２－（（２－（ビス（２－ヒドロキシドデシル）アミノ）エチル）（２－ヒドロキシドデシル）アミノ）エチル）ピペラジン－１－イル）エチルアザンジイル）ジドデカン－２－オール（Ｃ１２－２００）、２，２－ジリノレイル－４－（２－ジメチルアミノエチル）－［ｌ，３］－ジオキソラン（ＤＬｉｎ－Ｋ－Ｃ２－ＤＭＡ）、２，２－ジリノレイル－４－ジメチルアミノメチル－［ｌ，３］－ジオキソラン（ＤＬｉｎ－Ｋ－ＤＭＡ）、（６Ｚ，９Ｚ，２８Ｚ，３１Ｚ）－ヘプタトリアコンタ－６，９，２８　３１－テトラエン－１９－イル　４－（ジメチルアミノ）ブタノエート（ＤＬｉｎ－Ｍ－Ｃ３－ＤＭＡ），３－（（６Ｚ，９Ｚ，２８Ｚ，３１Ｚ）－ヘプタトリアコンタ－６，９，２８，３ｌ－テトラエン－１９－イルオキシ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルプロパン－ｌ－アミン（ＭＣ３エーテル）、４－（（６Ｚ，９Ｚ，２８Ｚ，３１Ｚ）－ヘプタトリアコンタ－６，９，２８，３１－テトラエン－１９－イルオキシ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルブタン－ｌ－アミン（ＭＣ４エーテル）、またはそれらの任意の組み合わせであってもよい。他のカチオン性脂質としては、Ｎ，Ｎ－ジステアリル－Ｎ，Ｎ－ジメチルアンモニウムブロミド（ＤＤＡＢ）、３Ｐ－（Ｎ－（Ｎ’、Ｎ’－ジメチルアミノエタン）－カルバモイル）コレステロール（ＤＣ－Ｃｈｏｉ）、Ｎ－（ｌ－（２，３－ジオレイルオキシ）プロピル）－Ｎ－２－（スペルミンカルボキサミド）エチル）－Ｎ，Ｎ－ジメチルアンモニウムトリフルオロアセテート（ＤＯＳＰＡ）、ジオクタデシルアミドグリシルカルボキシスペルミン（ＤＯＧＳ）、ｌ，２－ジレオイル－ｓｎ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＯＰＥ）、ｌ，２－ジオレオイル－３－ジメチルアンモニウムプロパン（ＤＯＤＡＰ）、Ｎ－（ｌ，２－ジミリスチルオキシプロプ－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（ＤＭＲＩＥ）、および２，２－ジリノレイル－４－ジメチルアミノエチル－［ｌ，３］－ジオキソラン（ＸＴＣ）が挙げられるが、これらに限定されない。加えて、カチオン性脂質の市販調製物、例えば、リポフェクチン（ＧＩＢＣＯ／ＢＲＬから入手可能なＤＯＴＭＡおよびＤＯＰＥを含む）、およびリポフェクタミン（ＧＩＢＣＯ／ＢＲＬから入手可能なＤＯＳＰＡおよびＤＯＰＥを含む）を使用することができる。

【００８９】

他の好適なカチオン性脂質は、国際公報第ＷＯ０９／０８６５５８号、ＷＯ０９／１２７０６０号、ＷＯ１０／０４８５３６号、ＷＯ１０／０５４４０６号、ＷＯ１０／０８８５３７号、ＷＯ１０／１２９７０９号、およびＷＯ２０１１／１５３４９３号、米国特許公開第２０１１／０２５６１７５号、第２０１２／０１２８７６０号、および第２０１２／００２７８０３号、米国特許第８，１５８，６０１号、ならびにＬｏｖｅ　ｅｔ　ａｌ．，ＰＮＡＳ，１０７（５），１８６４－６９，２０１０に記載されており、その内容は参照により本明細書に組み込まれる。

【００９０】

他の好適なカチオン性脂質としては、アルキル置換基が異なるもの（例えば、Ｎ－エチ

ル－Ｎ－メチルアミノ－、およびＮ－プロピル－Ｎ－エチルアミノ－）を含む、代替的な脂肪酸基および他のジアルキルアミノ基を有するものが挙げられる。これらの脂質は、アミノ脂質と呼ばれるカチオン性脂質のサブカテゴリーの一部である。本明細書に記載の脂質製剤の一部の実施形態では、カチオン性脂質は、アミノ脂質である。一般に、飽和度が低いアルキル鎖を有するアミノ脂質は、フィルター滅菌の目的で、特に複合体が約０．３ミクロン未満にサイズ設定されなければならない場合に、より簡単にサイズ設定される。Ｃ１４～Ｃ２２の範囲の炭素鎖長を有する不飽和脂肪酸を含有するアミノ脂質が使用されてもよい。他の足場を使用して、アミノ基と、アミノ脂質の脂肪酸または脂肪アルキル部分を分離することもできる。

【００９１】

一部の実施形態では、脂質製剤は、特許出願ＰＣＴ／ＥＰ２０１７／０６４０６６号に記載の式Ｉを有するカチオン性脂質を含む。この文脈では、ＰＣＴ／ＥＰ２０１７／０６４０６６号の開示もまた、参照により本明細書に組み込まれる。

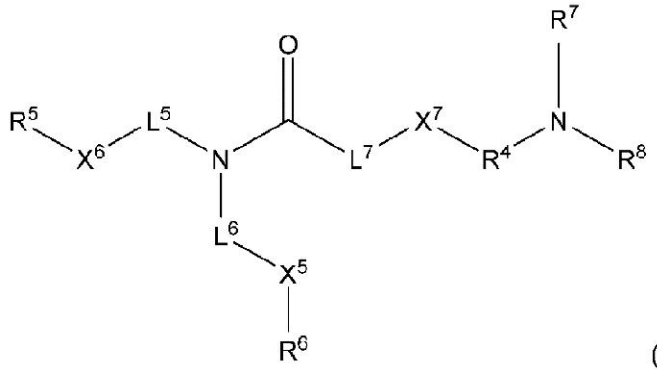
【００９２】

一部の実施形態では、本開示のアミノまたはカチオン性脂質は、イオン化可能であり、また脂質が生理的ｐＨ（例えば、ｐＨ７．４）以下のｐＨで正に荷電し、かつ第二のｐＨ、好ましくは生理的ｐＨ以上の中性であるように、少なくとも１つのプロトン化可能または脱プロトン化可能な基を有する。当然のことながら、ｐＨの関数としてのプロトンの付加または除去は平衡プロセスであり、また荷電脂質または中性脂質への言及は、優勢種の性質を指し、脂質の全てが荷電形態または中性型で存在する必要はない。２つ以上のプロトン化可能基もしくは脱プロトン化可能基を有するか、または双性イオン性である脂質は、本開示での使用から除外されない。ある特定の実施形態では、プロトン化可能な脂質は、約４～約１１の範囲のプロトン化可能な基のｐＫａを有する。一部の実施形態では、イオン性カチオン性脂質は、約５～約７のｐＫａを有する。一部の実施形態では、イオン性カチオン性脂質のｐＫａは、約６～約７である。

【００９３】

一部の実施形態では、脂質製剤は、式（Ｉ）のイオン性カチオン性脂質

【化２】



(I)

またはその薬学的に許容可能な塩もしくは溶媒和物を含み、式中、R^5およびR^6は、直鎖または分枝鎖C_1－C_{31}アルキル、C_2－C_{31}アルケニルまたはC_2－C_{31}アルキニルおよびコレステリルからなる群から各々独立して選択され、L^5およびL^6は、直鎖C_1－C_{20}アルキルおよびC_2－C_{20}アルケニルからなる群から各々独立して選択され、X^5は、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－であり、これによって、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－R^6が形成されるか、または－ＯＣ（Ｏ）－であり、これによって－ＯＣ（Ｏ）－R^6が形成され、X^6は、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－であり、これによって－Ｃ（Ｏ）Ｏ－R^5が形成されるか、または－ＯＣ（Ｏ）－であり、これによって－ＯＣ（Ｏ）－R^5が形成され、X^7は、ＳまたはＯであり、L^7は、存在しないか、または低級アルキルであり、R^4は、直鎖または分岐鎖C_1－C_6アルキルであり、またR^7およびR^8は、水素および直鎖または分枝鎖C_1－C_6アルキルからなる群から各々独立して選択される。

【００９４】
一部の実施形態では、X^7は、Ｓである。
【００９５】
一部の実施形態では、X^5は、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－であり、それによって－Ｃ（Ｏ）Ｏ－R^6が形成され、またX^6は、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－であり、それによって－Ｃ（Ｏ）Ｏ－R^5が形成される。
【００９６】
一部の実施形態では、R^7およびR^8は、メチル、エチル、およびイソプロピルからなる群から各々独立して選択される。
【００９７】
一部の実施形態では、L^5およびL^6は、各々独立して、C_1－C_{10}アルキルである。一部の実施形態では、L^5は、C_1－C_3アルキルであり、またＬ６は、C_1－C_5アルキルである。一部の実施形態では、L^6は、C_1－C_2アルキルである。一部の実施形態では、L^5およびL^6は、各々直鎖C_7アルキルである。一部の実施形態では、L^5およびL^6は、各々直鎖C_9アルキルである。
【００９８】
一部の実施形態では、R^5およびR^6は、各々独立して、アルケニルである。一部の実施形態では、R^6は、アルケニルである。一部の実施形態では、R^6は、C_2－C_9アルケニルである。一部の実施形態では、アルケニルは、単一の二重結合を含む。一部の実施形態では、R^5およびR^6は、各々アルキルである。一部の実施形態では、R^5は、分岐鎖アルキルである。一部の実施形態では、R^5およびR^6は、C_9アルキル、C_9アルケニル、およびC_9アルキニルからなる群から各々独立して選択される。一部の実施形態では、R^5およびR^6は各々独立して、C_{11}アルキル、C_{11}アルケニル、およびC_{11}アルキニルからなる群から選択される。一部の実施形態では、R^5およびR^6は、C_7アルキル、C_7アルケニル、およびC_7アルキニルからなる群から各々独立して選択される。一部の実施形態では、R^5は、－ＣＨ（（CH_2）$_p$$CH_3$）$_2$または－ＣＨ（（$CH_2$）$_p$$CH_3$）（（$CH_2$）$_{p-1}$$CH_3$）であり、式中、ｐは、４～８である。一部の実施形態では、ｐは、５であり、またL^5は、C_1－C_3アルキルである。一部の実施形態では、ｐは、６であり、またL^5は、C_3アルキルである。一部の実施形態では、ｐは、７である。一部の実施形態では、ｐは、８であり、またL^5は、C_1－C_3アルキルである。一部の実施形態では、R^5は、－ＣＨ（（CH_2）$_p$$CH_3$）（（$CH_2$）$_{p-1}$$CH_3$）からなり、式中、ｐは、７または８である。
【００９９】
一部の実施形態では、R^4は、エチレンまたはプロピレンである。一部の実施形態では、R^4は、ｎ－プロピレンまたはイソブチレンである。
【０１００】
一部の実施形態では、L^7は、存在せず、R^4は、エチレンであり、X^7は、Ｓであり、またR^7およびR^8は、各々メチルである。一部の実施形態では、L^7は、存在せず、R^4は、ｎ－プロピレンであり、X^7は、Ｓであり、またR^7およびR^8は、各々メチルである。一部の実施形態では、L^7は、存在せず、R^4は、エチレンであり、X^7は、Ｓであり、またR^7およびR^8は、各々エチルである。
【０１０１】
一部の実施形態では、X^7はＳであり、X^5は－Ｃ（Ｏ）Ｏ－であり、それによって－Ｃ（Ｏ）Ｏ－R^6が形成され、X^6は－Ｃ（Ｏ）Ｏ－であり、それによって－Ｃ（Ｏ）Ｏ－R^5が形成され、L^5およびL^6は各々独立して直鎖C_3－C_7アルキルであり、L^7は存在せず、R^5は－ＣＨ（CH_2）$_p$$CH_3$）$_2$であり、また$R^6$は$C_7$－$C_{12}$アルケニルである。一部のさらなる実施形態では、ｐは６であり、R^6はC_9アルケニルである。
【０１０２】
一部の実施形態では、脂質製剤は、本明細書上記で開示されるＡＴＸ脂質の群から選択

されるイオン性カチオン性脂質を含む。

【０１０３】

一部の実施形態では、本明細書に列挙される任意の１つ以上の脂質は、明示的に除外される場合がある。

【０１０４】

ヘルパー脂質およびステロール

本開示のｍＲＮＡ脂質製剤は、ヘルパー脂質を含むことができ、これは、中性脂質、中性ヘルパー脂質、非カチオン性脂質、非カチオン性ヘルパー脂質、アニオン性脂質、アニオン性ヘルパー脂質、または双性イオン性脂質と称することができる。脂質製剤、特にカチオン性リポソームおよび脂質ナノ粒子は、ヘルパー脂質が製剤中に存在する場合、細胞取り込みが増加していることが見出されている。（Ｃｕｒｒ．Ｄｒｕｇ　Ｍｅｔａｂ．２０１４；１５（９）：８８２－９２）。例えば、一部の研究は、カチオン性脂質よりも融合性が高い（すなわち、融合を促進する）中性脂質および双性イオン性脂質、例えば、１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスファチジルコリン（ＤＯＰＣ）、ジ－オレオイル－ホスファチジル－エタノアラミン（ＤＯＰＥ）および１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＳＰＣ）は、カチオン性脂質より融合性（すなわち、融合を容易にする）であることを示しており、脂質－核酸複合体の多型の特徴に影響を与える可能性があり、ラメラ相から六方相への移行を促進し、それ故に細胞膜の融合および破壊を誘発する。（Ｎａｎｏｍｅｄｉｃｉｎｅ（Ｌｏｎｄ）．２０１４　Ｊａｎ；９（１）：１０５－２０）。加えて、ヘルパー脂質の使用は、毒性および免疫原性などの多くの一般的なカチオン性脂質を使用することによるあらゆる潜在的な有害作用を低減するのに役立つ可能性がある。

【０１０５】

本開示の脂質製剤のために好適な非カチオン性脂質の非限定的な例としては、レシチンなどのリン脂質、ホスファチジルエタノールアミン、リゾレシチン、リゾホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、スフィンゴミエリン、卵スフィンゴミエリン（ＥＳＭ）、セファリン、カルジオリピン、ホスファチジン酸、セレブロシド、リン酸ジセチル、ジステアロイルホスファチジルコリン（ＤＳＰＣ）、ジオレオイルホスファチジルコリン（ＤＯＰＣ）、ジパルミトイルホスファチジルコリン（ＤＰＰＣ）、ジオレオイルホスファチジルグリセロール（ＤＯＰＧ）、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール（ＤＰＰＧ）、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＯＰＥ）、パルミトイルオレオイル－ホスファチジルコリン（ＰＯＰＣ）、パルミトイルオレオイル－ホスファチジルエタノールアミン（ＰＯＰＥ）、パルミトイルオレイル－ホスファチジルグリセロール（ＰＯＰＧ）、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン４－（Ｎ－マレイミドメチル）－シクロヘキサン－１－カルボキシレート（ＤＯＰＥ－ｍａｌ）、ジパルミトイル－ホスファチジルエタノールアミン（ＤＰＰＥ）、ジミリストイル－ホスファチジルエタノールアミン（ＤＭＰＥ）、ジステアロイル－ホスファチジルエタノールアミン（ＤＳＰＥ）、モノメチル－ホスファチジルエタノールアミン、ジメチル－ホスファチジルエタノールアミン、ジエライドイル－ホスファチジルエタノールアミン（ＤＥＰＥ）、ステアロイルオレオイル－ホスファチジルエタノールアミン（ＳＯＰＥ）、リゾホスファチジルコリン、ジリノレオイルホスファチジルコリン、およびそれらの混合物が挙げられる。他のジアシルホスファチジルコリンおよびジアシルホスファチジルエタノールアミンのリン脂質も使用することができる。これらの脂質中のアシル基は、好ましくは、C_{10}－C_{24}炭素鎖を有する脂肪酸、例えば、ラウロイル、ミリストイル、パルミトイル、ステアロイル、またはオレオイルに由来するアシル基である。

【０１０６】

非カチオン性脂質の追加的な例としては、コレステロールなどのステロールおよびその誘導体が挙げられる。ある研究は、ヘルパー脂質として、コレステロールは、核酸と調和する脂質層の電荷の間隔を増加させ、電荷分布を核酸の電荷分布とより密接に一致させると結論付けた。（Ｊ．Ｒ．Ｓｏｃ．Ｉｎｔｅｒｆａｃｅ．２０１２　Ｍａｒ　７；９（６

８）：５４８－５６１）。コレステロール誘導体の非限定的な例としては、５α－コレスタノール、５α－コプロスタノール、コレステリル－（２’－ヒドロキシ）－エチルエーテル、コレステリル－（４’－ヒドロキシ）－ブチルエーテル、および６－ケトコレスタノールなどの極性類似体、５α－コレスタン、コレステノン、５α－コレスタノン、５α－コレスタノン、およびデカン酸コレステリルなどの非極性類似体、ならびにそれらの混合物が挙げられる。好ましい実施形態では、コレステロール誘導体は、コレステリル－（４’－ヒドロキシ）－ブチルエーテルなどの極性類似体である。

【０１０７】

一部の実施形態では、脂質製剤中に存在するヘルパー脂質は、１つ以上のリン脂質およびコレステロールまたはその誘導体の混合物を含むか、またはそれからなる。他の実施形態では、脂質製剤中に存在するヘルパー脂質は、１つ以上のリン脂質、例えば、コレステロールを含まない脂質製剤を含むか、またはそれからなる。なおも他の実施形態では、脂質製剤中に存在するヘルパー脂質は、コレステロールまたはその誘導体、例えば、リン脂質を含まない脂質製剤を含むか、またはそれからなる。

【０１０８】

ヘルパー脂質の他の例としては、例えば、ステアリルアミン、ドデシルアミン、ヘキサデシルアミン、パルミチン酸アセチル、リシノール酸グリセロール、ステアリン酸ヘキサデシル、ミリスチン酸イソプロピル、両性アクリルポリマー、トリエタノールアミン－ラウリル硫酸、アルキル－アリール硫酸ポリエチルオキシル化脂肪酸アミド、ジオクタデシルジメチルアンモニウムブロミド、セラミド、およびスフィンゴミエリンなどの脂質を含有する非リン性が挙げられる。

【０１０９】

一部の実施形態では、ヘルパー脂質は、脂質製剤中に存在する総脂質の約２０ｍｏｌ％～約５０ｍｏｌ％、約２２ｍｏｌ％～約４８ｍｏｌ％、約２４ｍｏｌ％～約４６ｍｏｌ％、約２５ｍｏｌ％～約４４ｍｏｌ％、約２６ｍｏｌ％～約４２ｍｏｌ％、約２７ｍｏｌ％～約４１ｍｏｌ％、約２８ｍｏｌ％～約４０ｍｏｌ％、または約２９ｍｏｌ％、約３０ｍｏｌ％、約３１ｍｏｌ％、約３２ｍｏｌ％、約３３ｍｏｌ％、約３４ｍｏｌ％、約３５ｍｏｌ％、約３６ｍｏｌ％、約３７ｍｏｌ％、約３８ｍｏｌ％、もしくは約３９ｍｏｌ％（もしくはその任意の画分もしくはその範囲）を含む。

【０１１０】

一部の実施形態では、製剤中のヘルパー脂質の合計は、２つ以上のヘルパー脂質を含み、またヘルパー脂質の総量は、脂質製剤中に存在する総脂質の約２０ｍｏｌ％～約５０ｍｏｌ％、約２２ｍｏｌ％～約４８ｍｏｌ％、約２４ｍｏｌ％～約４６ｍｏｌ％、約２５ｍｏｌ％～約４４ｍｏｌ％、約２６ｍｏｌ％～約４２ｍｏｌ％、約２７ｍｏｌ％～約４１ｍｏｌ％、約２８ｍｏｌ％～約４０ｍｏｌ％、または約２９ｍｏｌ％、約３０ｍｏｌ％、約３１ｍｏｌ％、約３２ｍｏｌ％、約３３ｍｏｌ％、約３４ｍｏｌ％、約３５ｍｏｌ％、約３６ｍｏｌ％、約３７ｍｏｌ％、約３８ｍｏｌ％、もしくは約３９ｍｏｌ％（もしくはその任意の画分もしくはその範囲）を含む。一部の実施形態では、ヘルパー脂質は、ＤＳＰＣとＤＯＴＡＰの組み合わせである。一部の実施形態では、ヘルパー脂質は、ＤＳＰＣとＤＯＴＭＡの組み合わせである。

【０１１１】

脂質製剤中のコレステロールまたはコレステロール誘導体は、脂質製剤中に存在する総脂質の最大約４０ｍｏｌ％、約４５ｍｏｌ％、約５０ｍｏｌ％、約５５ｍｏｌ％、または約６０ｍｏｌ％を含んでもよい。一部の実施形態では、コレステロールまたはコレステロール誘導体は、脂質製剤中に存在する総脂質の約１５ｍｏｌ％～約４５ｍｏｌ％、約２０ｍｏｌ％～約４０ｍｏｌ％、約３０ｍｏｌ％～約４０ｍｏｌ％、または約３５ｍｏｌ％、約３６ｍｏｌ％、約３７ｍｏｌ％、約３８ｍｏｌ％、約３９ｍｏｌ％、もしくは約４０ｍｏｌ％を含む。

【０１１２】

脂質製剤中に存在するヘルパー脂質の割合は、標的量であり、また製剤中に存在するヘ

ルパー脂質の実際の量は、例えば、±５ｍｏｌ％変化する場合がある。
【０１１３】
カチオン性脂質化合物またはイオン性カチオン性脂質化合物を含有する脂質製剤は、ｍｏｌ基準で、約２０～４０％のカチオン性脂質化合物、約２５～４０％のコレステロール、約２５～５０％のヘルパー脂質、および約０．５～５％の本開示のペプチド－脂質コンジュゲートであってもよく、パーセントは、製剤中に存在する総脂質のものである。一部の実施形態では、組成物は、約２２～３０％のカチオン性脂質化合物、約３０～４０％のコレステロール、約３０～４０％のヘルパー脂質、および約０．５～３％の本開示のペプチド－脂質コンジュゲートであり、パーセントは、製剤中に存在する総脂質のものである。
【０１１４】
脂質コンジュゲート
一部の実施形態では、本開示の１つ以上のペプチド－脂質コンジュゲートは、脂質製剤中に存在する総脂質の約０．１ｍｏｌ％～約２ｍｏｌ％、約０．５ｍｏｌ％～約２ｍｏｌ％、約１ｍｏｌ％～約２ｍｏｌ％、約０．６ｍｏｌ％～約１．９ｍｏｌ％、約０．７ｍｏｌ％～約１．８ｍｏｌ％、約０．８ｍｏｌ％～約１．７ｍｏｌ％、約０．９ｍｏｌ％～約１．６ｍｏｌ％、約０．９ｍｏｌ％～約１．８ｍｏｌ％、約１ｍｏｌ％～約１．８ｍｏｌ％、約１ｍｏｌ％～約１．７ｍｏｌ％、約１．２ｍｏｌ％～約１．８ｍｏｌ％、約１．２ｍｏｌ％～約１．７ｍｏｌ％、約１．３ｍｏｌ％～約１．６ｍｏｌ％、または約１．４ｍｏｌ％～約１．６ｍｏｌ％（またはその任意の画分もしくはその範囲）を含む。他の実施形態では、１つ以上のペプチド－脂質コンジュゲートは、脂質製剤中に存在する総脂質の約０．５％、０．６％、０．７％、０．８％、０．９％、１．０％、１．２％、１．３％、１．４％、１．５％、１．６％、１．７％、１．８％、１．９％、２．０％、２．５％、３．０％、３．５％、４．０％、４．５％、もしくは５％（またはその任意の画分もしくはその範囲）を含む。量は、端点を含めて、列挙された範囲内の任意の値またはサブ値であってもよい。
【０１１５】
本開示の脂質製剤中に存在するペプチド－脂質コンジュゲートの割合は、標的量であり、また製剤中に存在するペプチド－脂質コンジュゲートの実際の量は、例えば、±０．５ｍｏｌ％変化する場合がある。当業者であれば、脂質コンジュゲートの濃度は、用いられる脂質コンジュゲート、および脂質製剤が融合性になる速度に応じて変化する可能性があることを理解するであろう。
【０１１６】
脂質製剤の細胞取り込みのための作用機序
核酸の細胞内送達のための脂質製剤、特にリポソーム、カチオン性リポソーム、および脂質ナノ粒子は、脂質送達ビヒクルの内容物が標的細胞のサイトゾルに送達される標的細胞のエンドサイトーシス機構を利用することによって標的細胞に浸透することによって、細胞取り込みのために設計される。（Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ，２８（３）：１４６－１５７，２０１８）。具体的には、本明細書に記載される核酸脂質製剤の場合、脂質製剤は、受容体介在性エンドサイトーシスを介して細胞に入る。エンドサイトーシスの前に、脂質送達ビヒクルの表面における本開示のペプチド－脂質コンジュゲートなどの官能化リガンドを表面から脱落させることができ、これは標的細胞への内部移行を誘発する。エンドサイトーシスの間、細胞の原形質膜の一部はベクターを囲み、それを小胞の中へと飲み込み、次いで小胞を挟んで細胞膜から挟み出し、サイトゾルに入り、最終的にエンドリソソーム経路を経る。イオン性カチオン性脂質を含有する送達ビヒクルについては、エンドソームが老化するにつれて酸性度が増加すると、表面上に強い正電荷を有するビヒクルがもたらされる。次いで、送達ビヒクルとエンドソーム膜との間の相互作用は、ペイロードの細胞質性の送達につながる膜融合事象をもたらす。ｍＲＮＡまたは自己複製ＲＮＡペイロードについては、細胞自身の内部翻訳プロセスが次にＲＮＡをコードされたタンパク質に翻訳する。コードされたタンパク質は、標的の細胞小器官

への輸送または細胞内の位置を含む、翻訳後処理をさらに受けることができる。

【０１１７】

脂質コンジュゲートの組成物および濃度を制御することによって、脂質コンジュゲートが脂質製剤から交換する速度、および次に脂質製剤が融合性になる速度を制御することができる。加えて、例えば、ｐＨ、温度、またはイオン強度を含む他の可変要素を使用して、脂質製剤が融合性になる速度を変化および／または制御することができる。脂質製剤が融合性になる速度を制御するために使用することができる他の方法は、本開示を読むと当業者には明らかになるであろう。また、脂質コンジュゲートの組成物および濃度を制御することによっても、リポソームまたは脂質粒子サイズを制御することができる。

【０１１８】

脂質製剤製造

核酸を含む脂質製剤の調製のためには、多くの異なる方法がある。（Ｃｕｒｒ．Ｄｒｕｇ Ｍｅｔａｂｏｌ．２０１４，１５，８８２－８９２；Ｃｈｅｍ．Ｐｈｙｓ．Ｌｉｐｉｄｓ ２０１４，１７７，８－１８；Ｉｎｔ．Ｊ．Ｐｈａｒｍ．Ｓｔｕｄ．Ｒｅｓ．２０１２，３，１４－２０）。薄膜水和、二重エマルション、逆相蒸発、マイクロ流体調製、二重非対称遠心分離、エタノール注入、洗剤透析、エタノール希釈による自発的な小胞形成、および予め形成されたリポソームへの封入の技法を、本明細書において簡潔に説明する。

【０１１９】

薄膜水和

薄膜水和法（ＴＦＨ）またはバンガム法では、脂質は有機溶媒中に溶解され、次いでロータリーエバポレータの使用を通して蒸発して、薄い脂質層の形成をもたらす。搭載される化合物を含有する水性緩衝溶液による層水和の後、多層小胞（ＭＬＶ）が形成され、これは、膜を通して押出成形することによって、または開始ＭＬＶの超音波処理によって、サイズを減少させて、小型単層小胞（ＬＵＶ）または大型単層小胞（ＳＵＶ）を生成することができる。

【０１２０】

二重エマルション

脂質製剤はまた、水／有機溶媒混合物中の脂質溶解を伴う二重エマルション技法を通しても調製することができる。水滴を含有する有機溶液を過剰な水媒体と混合し、水中油中水型（Ｗ／Ｏ／Ｗ）二重エマルション形成をもたらす。機械的に激しく振とうした後、水滴の一部が崩壊し、大型単層小胞（ＬＵＶ）が得られる。

【０１２１】

逆相蒸発

逆相蒸発（ＲＥＶ）法はまた、核酸を搭載したＬＵＶを達成することもできる。この技法では、有機溶媒および水性緩衝液中のリン脂質溶解によって二相系が形成される。次いで、得られた懸濁液を、混合物が透明な一相分散液になるまで短時間超音波処理する。脂質製剤は、減圧下での有機溶媒蒸発後に達成される。この技法は、核酸を含む異なる大きい親水性分子および小さい親水性分子を封入するために使用される。

【０１２２】

マイクロ流体調製

マイクロ流体法は、他のバルク技法とは異なり、脂質水和プロセスを制御する可能性を与える。方法は、流れが操作される方法に従って、連続流マイクロ流体および液滴ベースのマイクロ流体に分類することができる。連続流モードで動作するマイクロ流体力学的集束（ＭＨＦ）法では、脂質はイソプロピルアルコール中に溶解され、イソプロピルアルコールは、２つの水性緩衝液流の間のマイクロチャネルクロスジャンクション中で流体力学的に集束される。小胞サイズは、流量を調節することによって制御することができ、したがって脂質溶液／緩衝液希釈プロセスを制御することができる。方法は、３つの入口ポートおよび１つの出口ポートからなるマイクロ流体装置を使用することによって、オリゴヌクレオチド（ＯＮ）脂質製剤を生成するために使用することができる。

【０１２３】
二重非対称遠心分離
二重非対称遠心分離（ＤＡＣ）は、それ自体の垂直軸の周りの追加の回転を使用するため、より一般的な遠心分離とは異なる。効率的な均質化は、作成された２つのオーバーレイ移動によって達成される。すなわち、試料は、通常の遠心分離器のように外向きに押され、その後、追加の回転によってバイアルの中心に向かって押される。脂質とＮａＣｌ溶液を混合することによって、粘稠な小胞リン脂質ゲル（ＶＰＣ）が達成され、次いで、これを希釈して脂質製剤分散液を得る。脂質製剤サイズは、ＤＡＣスピード、脂質濃度、および均質化時間を最適化することによって調節することができる。
【０１２４】
エタノール注入
エタノール注入（ＥＩ）法は、核酸封入のために使用することができる。この方法は、脂質が溶解されたエタノール溶液の、針の使用を通して封入される核酸を含有する水媒体の中への迅速な注入を提供する。リン脂質が媒体全体を通して分散されると、小胞が自発的に形成される。
【０１２５】
洗剤透析
洗剤透析法を使用して、核酸を封入することができる。簡潔に述べると、脂質およびプラスミドは、適切なイオン強度の洗剤溶液中で可溶化され、透析によって洗剤を除去した後、安定化された脂質製剤が形成される。次いで、封入されていない核酸をイオン交換クロマトグラフィーによって除去し、小胞をスクロース密度勾配遠心分離によって空にする。この技法は、カチオン性脂質含有量および透析緩衝液の塩濃度に非常に敏感であり、この方法の規模拡大もまた困難である。
【０１２６】
エタノール希釈による自発的な小胞形成
安定した脂質製剤はまた、エタノール希釈による自発的な小胞形成法を介して生成することができ、この方法において、段階的または滴加的なエタノール希釈は、核酸を含有する急速に混合する水性緩衝液へのエタノール中に溶解した脂質の制御された添加によって、核酸を搭載した小胞の自発的な形成を提供する。
【０１２７】
医薬組成物および送達方法
インビボでの核酸活性（例えば、ｍＲＮＡ発現、またはＡＳＯもしくはｓｉＲＮＡによるノックダウン）を促進するために、本明細書に記載の核酸脂質製剤の送達ビヒクルは、１つ以上の追加の核酸、担体、標的化リガンド、もしくは安定化試薬と、または好適な賦形剤と混合される薬理学的組成物と組み合わせることができる。薬剤の製剤化および投与の技法は、「Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ」（Ｍａｃｋ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏ．，Ｅａｓｔｏｎ，Ｐａ、最新版）に見出され得る。
【０１２８】
本開示の脂質製剤および医薬組成物は、対象の臨床状態、投与部位および投与方法、投与スケジュール、対象の年齢、性別、体重、ならびに当業者に関連する他の要因を考慮して、現在の医療行為に従って投与および投薬されてもよい。本明細書の目的のための「有効量」は、実験臨床研究、薬理学、臨床、および医療技術の当業者に公知であるような関連する考慮事項によって決定され得る。一部の実施形態では、投与される量は、当業者によって疾患進行、退行、または改善の適切な尺度として選択される症状および他の指標の少なくともいくらかの安定化、改善、または除去を達成するために有効である。例えば、適切な量および投与レジメンは、少なくとも一過性タンパク質（例えば、酵素）の産生を引き起こすものである。「有効量」の別の実施例は、疾患の症状（複数可）の治療、予防、または低減に貢献するのに十分な量であり、これは「治療有効量」とも呼ばれる可能性がある。症状（複数可）の「低減」（およびこの語句の文法的な均等物）は、症状（複数

可）の重症度または頻度の減少、または症状（複数可）の排除を意味する。薬剤の「予防有効量」は、対象に投与されたときに、意図された予防効果を有する薬剤の量であり、例えば、傷害、疾患、病理、もしくは状態の発症（または再発）を防止もしくは遅延させるか、または傷害、疾患、病理、もしくは状態、またはそれらの症状の発症（または再発）の可能性を低減する。完全な予防効果は、必ずしも１回の用量の投与によって生じるものではなく、一連の用量の投与後にのみ生じる場合がある。したがって、予防有効量は、１回以上の投与で投与されてもよい。

【０１２９】

本明細書に記載の医薬組成物は、吸入可能な組成物とすることができる。好適な投与経路としては、例えば、気管内、吸入、または鼻腔内が挙げられる。一部の実施形態では、投与は、肺上皮細胞への核酸の送達をもたらす。一部の実施形態では、投与は、他のタイプの肺細胞および気道の細胞よりも肺上皮細胞に対する選択性を示す。

【０１３０】

本明細書に開示される医薬組成物は、１つ以上の賦形剤を使用して、（１）安定性を増加させる、（２）細胞トランスフェクションを増加させる、（３）徐放性または遅延放出（例えば、核酸のデポ製剤から）を許容する、（４）生体内分布を変更する（例えば、核酸を特定の組織または細胞型に標的化する）、（５）インビボで、それらから発現される核酸またはタンパク質の活性を増加させる、および／または（６）インビボで、核酸またはコードされたタンパク質の放出プロファイルを変化させるように製剤化することができる。

【０１３１】

好ましくは、脂質製剤は、全身的ではなく局所的な様態で投与されてもよい。局所送達は、標的とされる組織に応じて、様々な方法で影響を与えることができる。例えば、本開示の組成物を含有するエアロゾルは、（鼻、気管、または気管支送達のために）吸入することができる。

【０１３２】

医薬組成物は、任意の所望の組織に投与され得る。一部の実施形態では、本開示の脂質製剤または組成物によって送達される核酸は、脂質製剤および／または組成物が投与された組織において活性である。一部の実施形態では、核酸は、脂質製剤および／または組成物が投与された組織とは異なる組織で活性である。核酸が送達され得る組織の例としては、肺、気管、および／または鼻腔、筋肉、肝臓、眼、または中枢神経系が挙げられるが、これらに限定されない。

【０１３３】

本明細書に記載の医薬組成物は、薬理学の技術分野で公知または今後開発される任意の方法によって調製されてもよい。一般に、こうした調製方法は、活性成分（すなわち、核酸）を賦形剤および／または１つ以上の他の副成分と会合させる工程を含む。本開示による医薬組成物は、単回単位用量として、および／または複数の単回単位用量として、バルクで調製、包装、および／または販売されてもよい。

【０１３４】

医薬組成物は、薬学的に許容可能な賦形剤を追加的に含んでもよく、これは、本明細書で使用される場合、望ましい特定の剤形に適したありとあらゆる溶媒、分散媒、希釈剤、または他の液体ビヒクル、分散剤または懸濁補助剤、表面活性剤、等張剤、増粘剤または乳化剤、保存剤などが挙げられるが、これらに限定されない。

【０１３５】

ありとあらゆる溶媒、分散媒、希釈剤、またはその他の液体ビヒクル、分散剤もしくは懸濁補助剤、表面活性剤、等張剤、増粘剤または乳化剤、保存剤などの従来の賦形剤に加えて、本開示の賦形剤としては、リポソーム、脂質ナノ粒子、ポリマー、リポプレックス、コアシェルナノ粒子、ペプチド、タンパク質、一次ＤＮＡ構築物でトランスフェクトされた細胞、またはｍＲＮＡ（例えば、対象への移植のための）、ヒアルロニダーゼ、ナノ粒子模倣体およびそれらの組み合わせを挙げることができるが、これらに限定されない。

【０１３６】
したがって、本明細書に記載の製剤は、各々が脂質製剤中の核酸の安定性を一緒に増加させる量、核酸（例えば、ｍＲＮＡまたはｓｉＲＮＡ）による細胞トランスフェクションを増加させる量、コードされたタンパク質の発現を増加させる量、および／またはコードされたタンパク質の放出プロファイルを変更する量、または標的天然核酸のノックダウンを増加させる量で、１つ以上の賦形剤を含むことができる。さらに、核酸は、自己組織化核酸ナノ粒子を使用して製剤化されてもよい。
【０１３７】
医薬組成物を製剤化するための様々な賦形剤、および組成物を調製するための技法は、当該技術分野で公知である（Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ：Ｔｈｅ Ｓｃｉｅｎｃｅ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｙ，２１ｓｔ Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ａ．Ｒ．Ｇｅｎｎａｒｏ，Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ，Ｗｉｌｌｉａｍｓ ＆ Ｗｉｌｋｉｎｓ，Ｂａｌｔｉｍｏｒｅ，Ｍｄ．，２００６を参照のこと、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）。従来の賦形剤媒体の使用は、本開示の実施形態の範囲内で企図され得るが、任意の従来の賦形剤媒体が、何らかの望ましくない生物学的効果を生じさせること、または別の方法で医薬組成物の任意の他の成分（複数可）と有害な様態で相互作用することなどによって、物質またはその誘導体と不適合であり得る場合を除く。
【０１３８】
本開示の組成物の剤形は、投与前に液体中で再構成することができる、固体とすることができる。固体は、粉末として投与することができる。一部の実施形態では、医薬組成物は、凍結乾燥された核酸脂質製剤を含む。
【０１３９】
好ましい実施形態では、本明細書に記載の医薬組成物の剤形は、本明細書に記載の核酸脂質ナノ粒子の液体懸濁液とすることができる。一部の実施形態では、液体懸濁液は、緩衝溶液中にある。一部の実施形態では、緩衝溶液は、ＨＥＰＥＳ、ＭＯＰＳ、ＴＥＳ、およびＴＲＩＳからなる群から選択される緩衝液を含む。一部の実施形態では、緩衝液は、約７．４のｐＨを有する。一部の好ましい実施形態では、緩衝液はＨＥＰＥＳである。一部のさらなる実施形態では、緩衝溶液は、凍結保護剤をさらに含む。一部の実施形態では、凍結保護剤は、糖およびグリセロール、または糖およびグリセロールの組み合わせから選択される。一部の実施形態では、糖は二量体糖である。一部の実施形態では、糖はスクロースである。一部の好ましい実施形態では、緩衝液は、７．４のｐＨでＨＥＰＥＳ、スクロース、およびグリセロールを含む。一部の実施形態では、懸濁液は、保存中は凍結され、そして投与前に解凍される。一部の実施形態では、懸濁液は、約－７０℃未満の温度で凍結される。一部の実施形態では、懸濁液は、吸入可能な投与の前に滅菌水で希釈される。一部の実施形態では、吸入可能な投与は、懸濁液を約１体積～約４体積の滅菌水で希釈することを含む。一部の実施形態では、凍結乾燥された核酸－脂質ナノ粒子製剤は、本明細書に記載される緩衝液中で再懸濁することができる。
【０１４０】
本開示の組成物および方法は、鼻腔内および／または肺内を含む様々な粘膜投与モードによって対象に投与されてもよい。本開示の一部の態様では、粘膜組織層は上皮細胞層を含む。上皮細胞は、肺、気管、気管支、肺胞、鼻腔、および／または口腔とすることができる。本開示の組成物は、機械的スプレー装置などの従来のアクチュエータ、ならびに加圧、電気的に作動する、または他のタイプのアクチュエータを使用して投与することができる。
【０１４１】
本開示の組成物は、鼻腔スプレーまたは肺スプレーとして水溶液中で投与されてもよく、当業者に公知の様々な方法によってスプレー形態で分注されてもよい。本開示の組成物の肺送達は、例えば、エアロゾル化、霧化、または噴霧化することができる、液滴、粒子、またはスプレーの形態で組成物を投与することによって達成される。組成物、スプレー、またはエアロゾルの粒子は、液体または固体形態のいずれか、例えば、凍結乾燥された

脂質製剤とすることができる。鼻腔スプレーとして液体を分注するための好ましいシステムは、米国特許 第４，５１１，０６９号に開示される。こうした製剤は、本開示による組成物を水中に溶解して水溶液を生成し、当該溶液を滅菌することによって好都合に調製され得る。製剤は、例えば、米国特許で開示されるシールされた分注システムでの多剤容器で示される場合がある。第４，５１１，０６９号に開示される。他の好適な鼻腔スプレー送達システムは、ＴＲＡＮＳＤＥＲＭＡＬ ＳＹＳＴＥＭＩＣ ＭＥＤＩＣＡＴＩＯＮ，Ｙ．Ｗ．Ｃｈｉｅｎ ｅｄ．，Ｅｌｓｅｖｉｅｒ Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，１９８５および米国特許 第４，７７８，８１０号に記載されている。追加のエアロゾル送達形態は、例えば、圧縮空気式、ジェット式、超音波式、および圧電式のネブライザーを含んでもよく、これは、核酸脂質製剤を送達するか、または薬学的溶媒、例えば、水、エタノール、またはそれらの混合物中に懸濁される。

【０１４２】

本開示の鼻腔および肺スプレー溶液は、典型的に、非イオン性界面活性剤（例えば、ポリソルベート－８０）などの表面活性剤、および１つ以上の緩衝液で任意選択的に製剤化された核酸を含むが、ただし、界面活性剤の含有は脂質製剤の構造を破壊しないことを条件とする。本開示の一部の実施形態では、鼻腔スプレー溶液は、噴射剤をさらに含む。鼻腔スプレー溶液のｐＨは、ｐＨ６．８～７．２であってもよい。用いられる医薬溶媒はまた、ｐＨ４～６のわずかに酸性の水性緩衝液とすることもできる。保存剤、界面活性剤、分散剤、またはガスを含む他の成分を添加して、化学的安定性を強化または維持してもよい。

【０１４３】

一部の実施形態では、本開示は、本開示の組成物を含有する溶液と、肺、粘膜、または鼻腔内スプレーまたはエアロゾル用のアクチュエータとを含む医薬品を提供する。

【０１４４】

本開示の組成物の剤形は、液体、液滴もしくはエマルションの形態、またはエアロゾルの形態とすることができる。

【０１４５】

本開示の組成物の剤形は、投与前に液体中で再構成することができる、固体とすることができる。固体は、粉末として投与することができる。固体は、カプセル、錠剤、またはゲルの形態とすることができる。

【０１４６】

本開示内の肺送達のための組成物を製剤化するために、核酸脂質製剤は、様々な薬学的に許容可能な添加剤、ならびに核酸脂質製剤（複数可）の分散のための塩基または担体と組み合わせることができる。添加剤の例としては、アルギニン、水酸化ナトリウム、グリシン、塩酸、クエン酸、およびそれらの混合物などのｐＨ調整剤が挙げられる。他の添加剤としては、局所麻酔薬（例えば、ベンジルアルコール）、等張剤（例えば、塩化ナトリウム、マンニトール、ソルビトール）、吸着阻害剤（例えば、Ｔｗｅｅｎ ８０）、溶解性促進剤（例えば、シクロデキストリンおよびその誘導体）、安定剤（例えば、血清アルブミン）、および還元剤（例えば、グルタチオン）が挙げられる。粘膜送達のための組成物が液体である場合、１として取られる０．９％（ｗ／ｖ）生理食塩水溶液の張性を参照して測定される製剤の張性は、典型的に、投与部位で粘膜に実質的に不可逆的な組織損傷を誘発しない値に調整される。一般的に、溶液の張性は、１／３～３、より典型的には１／２～２、ほとんどの場合は３／４～１．７の値に調整される。

【０１４７】

核酸脂質製剤は、核酸脂質製剤および任意の所望の添加剤を分散する能力を有する親水性化合物を含む場合がある、塩基またはビヒクル中に分散されてもよい。塩基は、幅広い範囲の好適な担体から選択されてもよく、ポリカルボン酸またはその塩のコポリマー、他のモノマー（例えば、メチル（メタ）アクリレート、アクリル酸など）とのカルボン酸無水物（例えば、無水マレイン酸）、ポリ酢酸ビニル、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドンなどの親水性ビニルポリマー、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシプロ

ピルセルロースなどのセルロース誘導体、およびキトサン、コラーゲン、アルギン酸ナトリウム、ゼラチン、ヒアルロン酸およびそれらの非毒性金属塩などの天然ポリマーが挙げられるが、これらに限定されない。生分解性ポリマーは、しばしば、例えば、ポリ乳酸、ポリ（乳酸－グリコール酸）コポリマー、ポリヒドロキシ酪酸、ポリ（ヒドロキシ酪酸－グリコール酸）コポリマー、およびそれらの混合物などの塩基または担体として選択される。別の方法としてまたは追加的に、ポリグリセリン脂肪酸エステル、スクロース脂肪酸エステルなどの合成脂肪酸エステルを担体として用いることができる。親水性ポリマーおよび他の担体は、単独でまたは組み合わせて使用することができ、構造的完全性の向上は、部分結晶化、イオン結合、架橋などによって担体に付与することができる。担体は、鼻粘膜に直接適用するための流体または粘性溶液、ゲル、ペースト、粉末、マイクロスフェア、およびフィルムを含む、様々な形態で提供する子。この文脈における選択された担体の使用は、核酸脂質製剤の吸収の促進をもたらす場合がある。

【０１４８】

あるいは、本開示の組成物は、ｐＨ調整剤および緩衝剤、張性調整剤、ならびに湿潤剤、例えば、酢酸ナトリウム、乳酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、ソルビタンモノラウレート、オレイン酸トリエタノールアミン、およびそれらの混合物などの生理学的条件に近似させるために必要とされる薬学的に許容可能な担体物質を含有してもよい。固体組成物については、例えば、医薬品グレードのマンニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、タルク、セルロース、グルコース、スクロース、炭酸マグネシウムなどを含む、従来の非毒性の薬学的に許容可能な担体を使用することができる。

【０１４９】

本開示のある特定の実施形態では、核酸脂質製剤は、時間放出製剤、例えば、徐放性ポリマーを含む組成物で投与されてもよい。核酸脂質製剤は、急速放出から保護する担体、例えばポリマー、マイクロカプセル化送達システム、または生体接着ゲルなどの制御放出ビヒクルを用いて調製することができる。本開示の様々な組成物における核酸脂質製剤の長期間送達は、例えば、モノステアリン酸アルミニウムハイドロゲルおよびゼラチンなどの吸収を遅延させる組成物剤中に含むことによってもたらすことができる。

【０１５０】

核酸は、核酸組成物の液体懸濁液の気管内投与、および液体ネブライザーによって生成されるエアロゾルミストの吸入、または米国特許第５，７８０，０１４号に記載されるものなどの乾燥粉末設備の使用によって肺へと送達することができ、この特許は、参照により本明細書に組み込まれる。

【０１５１】

ある特定の実施形態では、本開示の組成物は、対象への投与前または投与時にエアロゾル化されるか、または別の方法で微粒子液体もしくは固体として送達されてもよいように製剤化されてもよい。こうした組成物は、こうした固体または液体微粒子組成物（例えば、エアロゾル化した水溶液または懸濁液など）を投与して、対象によって簡単に呼吸可能または吸入可能な粒子を発生させるための１つ以上の好適な装置の助けを借りて投与されてもよい。一部の実施形態では、こうした装置（例えば、定量吸入器、ジェット式ネブライザー、超音波式ネブライザー、乾燥粉末吸入器、噴射剤ベースの吸入器、または気腹装置）は、対象への所定の質量、体積、または用量（例えば、用量当たり約０．０１０～約０．５ｍｇ／ｋｇの核酸）の組成物の投与を容易にする。例えば、ある特定の実施形態では、本開示の組成物は、組成物および好適な噴射剤を含む懸濁液または溶液を含有する定量吸入器を使用して対象に投与される。ある特定の実施形態では、本開示の組成物は、吸入のために意図された微粒子粉末（例えば、呼吸に適した乾燥粒子）として製剤化されてもよい。ある特定の実施形態では、呼吸に適した粒子として製剤化された本開示の組成物は、対象によって呼吸に適する場合があるか、または好適な装置を使用して送達されてもよいように、適切にサイズ決めされる（例えば、約５００μｍ、４００μｍ、３００μｍ、２５０μｍ、２００μｍ、１５０μｍ、１００μｍ、７５μｍ、５０μｍ、２５μｍ、

２０μｍ、１５μｍ、１２．５μｍ、１０μｍ、５μｍ、２．５μｍまたはそれ未満の平均Ｄ５０またはＤ９０粒子サイズ）。さらに他の実施形態では、本開示の組成物は、１つ以上の肺界面活性剤（例えば、層状体）を含むように製剤化される。一部の実施形態では、本開示の組成物は、体重１ｋｇ当たり少なくとも０．０１０ｍｇ／ｋｇ、少なくとも０．０１５ｍｇ／ｋｇ、少なくとも０．０２０ｍｇ／ｋｇ、少なくとも０．０２５ｍｇ／ｋｇ、少なくとも０．０３０ｍｇ／ｋｇ、少なくとも０．０３５ｍｇ／ｋｇ、少なくとも０．０４０ｍｇ／ｋｇ、少なくとも０．０４５ｍｇ／ｋｇ、少なくとも０．０５ｍｇ／ｋｇ、少なくとも０．１ｍｇ／ｋｇ、少なくとも０．５ｍｇ／ｋｇ、少なくとも１．０ｍｇ／ｋｇ、少なくとも２．０ｍｇ／ｋｇ、少なくとも３．０ｍｇ／ｋｇ、少なくとも４．０ｍｇ／ｋｇ、少なくとも５．０ｍｇ／ｋｇ、少なくとも６．０ｍｇ／ｋｇ、少なくとも７．０ｍｇ／ｋｇ、少なくとも８．０ｍｇ／ｋｇ、少なくとも９．０ｍｇ／ｋｇ、少なくとも１０ｍｇ／ｋｇ、少なくとも１５ｍｇ／ｋｇ、少なくとも２０ｍｇ／ｋｇ、少なくとも２５ｍｇ／ｋｇ、少なくとも３０ｍｇ／ｋｇ、少なくとも３５ｍｇ／ｋｇ、少なくとも４０ｍｇ／ｋｇ、少なくとも４５ｍｇ／ｋｇ、少なくとも５０ｍｇ／ｋｇ、少なくとも５５ｍｇ／ｋｇ、少なくとも６０ｍｇ／ｋｇ、少なくとも６５ｍｇ／ｋｇ、少なくとも７０ｍｇ／ｋｇ、少なくとも７５ｍｇ／ｋｇ、少なくとも８０ｍｇ／ｋｇ、少なくとも８５ｍｇ／ｋｇ、少なくとも９０ｍｇ／ｋｇ、少なくとも９５ｍｇ／ｋｇ、または少なくとも１００ｍｇの濃度が単回投与で投与されるように、対象に投与される。一部の実施形態では、本開示の組成物は、少なくとも０．１ｍｇ、少なくとも０．５ｍｇ、少なくとも１．０ｍｇ、少なくとも２．０ｍｇ、少なくとも３．０ｍｇ、少なくとも４．０ｍｇ、少なくとも５．０ｍｇ、少なくとも６．０ｍｇ、少なくとも７．０ｍｇ、少なくとも８．０ｍｇ、少なくとも９．０ｍｇ、少なくとも１０ｍｇ、少なくとも１５ｍｇ、少なくとも２０ｍｇ、少なくとも２５ｍｇ、少なくとも３０ｍｇ、少なくとも３５ｍｇ、少なくとも４０ｍｇ、少なくとも４５ｍｇ、少なくとも５０ｍｇ、少なくとも５５ｍｇ、少なくとも６０ｍｇ、少なくとも６５ｍｇ、少なくとも７０ｍｇ、少なくとも７５ｍｇ、少なくとも８０ｍｇ、少なくとも８５ｍｇ、少なくとも９０ｍｇ、少なくとも９５ｍｇまたは少なくとも１００ｍｇの総量の核酸が一回以上の用量で投与されるように、対象に投与される。

【０１５２】

一部の実施形態では、本開示の医薬組成物は、月に１回対象に投与される。一部の実施形態では、本開示の医薬組成物は、月に２回対象に投与される。一部の実施形態では、本開示の医薬組成物は、月に３回対象に投与される。一部の実施形態では、本開示の医薬組成物は、月に４回対象に投与される。

【０１５３】

本開示によれば、提供される組成物の治療的に有効な用量は、定期的に投与される場合、治療前のベースライン活性レベルと比較して、対象における核酸活性レベルの増加をもたらす。典型的に、活性レベルは、血液、血漿もしくは血清、尿、または固形組織抽出物などの対象から得られた生体試料中で測定される。ベースラインレベルは、治療直前に測定することができる。一部の実施形態では、本明細書に記載の医薬組成物を投与することにより、生体試料（例えば、血漿／血清または肺上皮スワブ）中の核酸活性レベルは、治療前のベースラインレベルと比較して、少なくとも約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、または９５％増加する結果をもたらす。一部の実施形態では、提供される組成物を投与することにより、生体試料（例えば、血漿／血清または肺上皮スワブ）の核酸活性レベルは、治療前のベースラインレベルと比較して、少なくとも約２４時間、少なくとも約４８時間、少なくとも約７２時間、少なくとも約４日間、少なくとも約５日間、少なくとも約６日間、少なくとも約７日間、少なくとも約８日間、少なくとも約９日間、少なくとも約１０日間、少なくとも約１１日間、少なくとも約１２日間、少なくとも約１３日間、少なくとも約１４日間、または少なくとも約１５日間、少なくとも約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、または９５％増加する結果をもたらす。

【０１５４】

定義

本明細書の様々な箇所で、本開示の化合物の置換基が、群または範囲で開示される。本開示は、こうした群および範囲の一員のありとあらゆる個々の部分組み合わせを含むことが特に意図される。例えば、「C_{1-6}アルキル」という用語は、メチル、エチル、C_3アルキル、C_4アルキル、C_5アルキル、およびC_6アルキルを個々に開示することを特に意図している。

【０１５５】

「～と組み合わせて投与する」または「～と組み合わせた投与」という語句は、２つ以上の薬剤が、患者に対する各薬剤の効果の重複があってもよいように、同時にまたは間隔内で対象に投与されることを意味する。一部の実施形態では、それらは、互いに約６０、３０、１５、１０、５、または１分以内に投与される。一部の実施形態では、薬剤の投与は、組み合わせ効果（例えば、相乗効果）が達成されるように、相互十分に近い間隔が置かれる。

【０１５６】

本明細書で使用される場合、「投与」という用語は、経口投与、座薬としての投与、局所接触、静脈内、非経口、腹腔内、筋肉内、病変内、くも膜下腔内、鼻腔内、もしくは皮下投与、または徐放性デバイス、例えば、ミニ浸透圧ポンプの対象への移植を意味する。投与は、非経口および経粘膜（例えば、口腔、舌下、口蓋、歯肉、鼻、膣、直腸、または経皮）を含む任意の経路による。非経口投与としては、例えば、静脈内、筋肉内、動脈内、真皮内、皮下、腹腔内、脳室内、および頭蓋内が挙げられる。他の送達方法としては、リポソーム製剤、静脈内注入、経皮パッチの使用などが挙げられるが、これらに限定されない。複数の実施形態では、投与は、列挙された活性剤以外のいかなる活性剤の投与も含まない。

【０１５７】

本明細書で使用される場合、「動物」という用語は、動物界の任意の一員を指す。一部の実施形態では、「動物」とは、任意の成長段階のヒトを指す。一部の実施形態では、「動物」とは、任意の成長段階の非ヒト動物を指す。ある特定の実施形態では、非ヒト動物は、哺乳類（例えば、齧歯類、マウス、ラット、ウサギ、サル、イヌ、ネコ、ヒツジ、ウシ、霊長類、またはブタ）である。一部の実施形態では、動物としては、哺乳類、鳥類、爬虫類、両生類、魚類、および蠕虫が挙げられるが、これらに限定されない。一部の実施形態では、動物は、トランスジェニック動物、遺伝子操作された動物、またはクローンである。

【０１５８】

１つ以上の興味のある値に適用される「およそ」または「約」という用語は、記載された参照値と類似した値を指す。ある特定の実施形態では、「およそ」または「約」という用語は、別段の記載がない限り、または別の方法で文脈から明らかでない限り、記載された基準値のいずれかの方向（その値から超または未満）において、２５％、２０％、１９％、１８％、１７％、１６％、１５％、１４％、１３％、１２％、１１％、１０％、９％、８％、７％、６％、５％、４％、３％、２％、１％、またはそれ未満内に収まる値の範囲を指す（ただし、そのような数が可能性のある値の１００％を超えることになる場合を除く）。

【０１５９】

「会合」、「コンジュゲート」、「結合」、「付着」、および「テザリング」という用語は、２つ以上の部分に関して使用される場合、部分が、直接的に、または連結剤として機能する１つ以上の追加の部分を介して、互いに物理的に会合または結合されて、例えば生理学的条件などの構造が使用される条件下でその部分が物理的に会合したままであるように十分に安定な構造を形成することを意味する。「会合」は、必ずしも厳密に直接の化学的な共有結合である必要はない。また、イオン結合もしくは水素結合、またはハイブリダイゼーションベースの接続も、「会合」する実体が物理的に関連付けられたままであるように十分に安定していることを示唆する場合がある。

【０１６０】
特許請求の範囲において、「ａ（１つの）」、「ａｎ（１つの）」、および「ｔｈｅ（その）」などの冠詞は、相反することが示されない限り、または文脈から明らかでない限り、１つ以上を意味する場合がある。１つ以上の群のメンバーの間に「または」を含む特許請求の範囲または説明は、群のメンバーの１つ、２つ以上、または全てが、相反することが示されない限り、または別の方法で文脈から明白でない限り、所与の生成物またはプロセスに存在するか、採用されるか、または別の方法で関連する場合に、充足されるとみなされる。本開示は、群の厳密に１つのメンバーが所与の生成物またはプロセスに存在するか、採用されるか、または別の方法で関連する実施形態を含む。本開示は、群のメンバーの２つ以上または全てが所与の生成物またはプロセスに存在するか、採用されるか、または別の方法で関連する実施形態を含む。

【０１６１】
本明細書で使用される場合、「アシル」という用語は、本明細書に定義される水素またはアルキル基（例えば、ハロアルキル基）を表し、これは、本明細書に定義されるカルボニル基を介して親分子基に結合され、ホルミル（すなわち、カルボキシアルデヒド基）、アセチル、トリフルオロアセチル、プロピオニル、ブタノイルなどによって例示される。非置換アシル基の例としては、１～７個、１～１１個、または１～２１個の炭素が挙げられる。一部の実施形態では、アルキル基は、本明細書に記載される１、２、３、または４個の置換基でさらに置換される。

【０１６２】
本明細書で使用される場合、「アルケニル」という用語は、別段の指定がない限り、一つ以上の炭素－炭素二重結合を含有する２～２０個の炭素（例えば、２～６個または２～１０個の炭素）の一価の直鎖基または分岐鎖基を表し、エテニル、１－プロペニル、２－プロペニル、２－メチル－１－プロペニル、１－ブテニル、２－ブテニルなどによって例示される。アルケニルは、シス異性体およびトランス異性体の両方を含む。アルケニル基は、本明細書に定義されるアミノ、アリール、シクロアルキル、もしくはヘテロシクリル（例えば、ヘテロアリール）、または本明細書に記載される例示的なアルキル置換基のいずれかから独立して選択される１、２、３、または４個の置換基で任意選択的に置換されてもよい。

【０１６３】
「アルコキシ」という用語は、式－ＯＲの化学置換基を表し、式中、Ｒは、別段の指定のない限り、$Ｃ_{1}$－２０アルキル基（例えば、$Ｃ_{1-6}$または$Ｃ_{1-10}$アルキル）である。アルコキシ基の例としては、メトキシ、エトキシ、プロポキシ（例えば、ｎ－プロポキシおよびイソプロポキシ）、ｔ－ブトキシなどが挙げられる。一部の実施形態では、アルキル基は、本明細書に定義される１、２、３、または４個の置換基（例えば、ヒドロキシまたはアルコキシ）でさらに置換することができる。

【０１６４】
「アルコキシアルキル」という用語は、アルコキシ基で置換されたアルキル基を表す。非置換アルコキシアルキル基の例としては、２～４０個の炭素（例えば、２～１２個または２～２０個の炭素、例えば$Ｃ_{1-6}$アルコキシ－$Ｃ_{1-6}$アルキル、$Ｃ_{1-10}$アルコキシ－$Ｃ_{1-10}$アルキル、または$Ｃ_{1-20}$アルコキシ－$Ｃ_{1-20}$アルキル）が挙げられる。一部の実施形態では、アルキルおよびアルコキシは各々は、それぞれの群について本明細書に定義される１、２、３、または４個の置換基でさらに置換することができる。

【０１６５】
本明細書で使用される場合、「アルコキシカルボニル」という用語は、本明細書で定義されるアルコキシを表し、カルボニル原子（例えば、－Ｃ（Ｏ）－ＯＲ、式中、ＲはＨ、または任意選択的に置換される$Ｃ_{1-6}$、$Ｃ_{1-10}$、もしくは$Ｃ_{1-20}$アルキル基）を介して親分子基に結合される。非置換アルコキシカルボニルの例としては、１～２１個の炭素（例えば、１～１１個または１～７個の炭素）が挙げられる。一部の実施形態では、アルコキシ基は、本明細書に記載される１、２、３、または４個の置換基でさらに置換さ

れる。

【０１６６】

本明細書で使用される場合、「アルコキシカルボニルアルキル」という用語は、本明細書で定義されるアルキル基を表し、本明細書で定義されるアルコキシカルボニル基で置換される（例えば、－アルキル－Ｃ（Ｏ）－ＯＲ、式中、Ｒは、任意選択的に置換されるＣ$_{1-20}$、Ｃ$_{1-10}$、またはＣ$_{1-6}$アルキル基である）。非置換アルコキシカルボニルアルキル基の例としては、３～４１個の炭素（例えば、３～１０個、３～１３個、３～１７個、３～２１個、または３～３１個の炭素、例えばＣ$_{1-6}$アルコキシカルボニル－Ｃ$_{1-6}$アルキル、Ｃ$_{1-10}$アルコキシカルボニル－Ｃ$_{1-10}$アルキル、またはＣ$_{1-20}$アルコキシカルボニル－Ｃ$_{1-20}$アルキル）が挙げられる。一部の実施形態では、各アルキル基およびアルコキシ基は、本明細書に記載される１、２、３、または４個の置換基（例えば、ヒドロキシ基）でさらに独立して置換される。

【０１６７】

本明細書で使用される場合、「アルコキシカルボニルアルケニル」という用語は、本明細書で定義されるアルケニル基を表し、本明細書で定義されるようなアルコキシカルボニル基（例えば、－アルケニル－Ｃ（Ｏ）－ＯＲ、式中、Ｒは、任意選択的に置換されるＣ$_{1-20}$、Ｃ$_{1-10}$、またはＣ$_{1-6}$アルキル基である）で置換される。非置換アルコキシカルボニルアルケニルの例としては、４～４１個の炭素（例えば、４～１０個、４～１３個、４～１７個、４～２１個、または４～３１個の炭素、例えばＣ$_{1-6}$アルコキシカルボニル－Ｃ$_{2-6}$アルケニル、Ｃ$_{1-10}$アルコキシカルボニル－Ｃ$_{2-10}$アルケニル、またはＣ$_{1-20}$アルコキシカルボニル－Ｃ$_{2-20}$アルケニル）が挙げられる。一部の実施形態では、各アルキル基、アルケニル基、およびアルコキシ基は、本明細書に記載される１、２、３、または４個の置換基（例えば、ヒドロキシ基）でさらに独立して置換される。

【０１６８】

本明細書で使用される場合、「アルキル」は、完全に飽和している（すなわち、二重結合または三重結合を含有しない）直鎖または分岐鎖の炭化水素鎖を指す。アルキル基は、１～２０個の炭素原子を有してもよい（本明細書に現れるときは常に、「１～２０」などの数値範囲は、所与の範囲内の各整数を指し、例えば、「１～２０個の炭素原子」は、アルキル基が、１個の炭素原子、２個の炭素原子、３個の炭素原子などから成ってもよく、最大２０個の炭素原子を含むが、本定義は、数値範囲が指定されていない「アルキル」という用語の発生も包含することを意味する）。アルキル基はまた、１～９個の炭素原子を有する中サイズのアルキルであってもよい。アルキル基はまた、１～６個の炭素原子を有する低級アルキルとすることも可能である。アルキル基は、「Ｃ$_{1-4}$アルキル」または類似の指定として指定されてもよい。一例としてのみであるが、「Ｃ$_{1-4}$アルキル」は、アルキル鎖に１～４個の炭素原子が存在することを示し、すなわち、アルキル鎖は、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ｎ－ブチル、イソ－ブチル、ｓｅｃ－ブチル、およびｔ－ブチルからなる群から選択される。典型的なアルキル基としては、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、三級ブチル、ペンチル、ヘキシルなどが挙げられるが、これらにいかなるやり方でも限定されない。

【０１６９】

「低級アルキル」という用語は、鎖が直鎖または分岐鎖であってもよい鎖内に１～６個の炭素を有する基を意味する。好適なアルキル基の非限定的な例としては、メチル、エチル、ｎ－プロピル、イソプロピル、ｎ－ブチル、ｔ－ブチル、ｎ－ペンチル、およびヘキシルが挙げられる。

【０１７０】

本明細書で使用される場合、「アルキルスルフィニル」という用語は、－Ｓ（Ｏ）－基を介して親分子基に結合したアルキル基を表す。非置換アルキルスルフィニル基の例は、１～６個、１～１０個、または１～２０個の炭素である。一部の実施形態では、アルキル基は、本明細書に定義される１、２、３、または４個の置換基でさらに置換することがで

きる。

【０１７１】

本明細書で使用される場合、「アルキルスルフィニルアルキル」という用語は、アルキルスルフィニル基によって置換される、本明細書で定義されるアルキル基を表す。非置換アルキルスルフィニルアルキル基の例は、２～１２個、２～２０個、または２～４０個の炭素である。一部の実施形態では、各アルキル基は、本明細書に定義される１、２、３、または４個の置換基でさらに置換することができる。

【０１７２】

本明細書で使用される場合、「アルキニル」という用語は、炭素－炭素三重結合を含有する２～２０個の炭素原子（例えば、２～４個、２～６個、または２～１０個の炭素）の一価の直鎖又は分岐鎖基を表し、エチニル、１－プロピニルなどによって例示される。アルキニル基は、本明細書に定義されるアリール、シクロアルキル、もしくはヘテロシクリル（例えば、ヘテロアリール）、または本明細書に記載される例示的なアルキル置換基のいずれかから独立して選択される１、２、３、または４個の置換基で任意選択的に置換されてもよい。

【０１７３】

本明細書で使用される場合、「アミジン」という用語は、－Ｃ（＝ＮＨ）ＮＨ$_2$基を表す。

【０１７４】

本明細書で使用される場合、「アミノ」という用語は、－Ｎ（R^{N1}）$_2$を表し、式中、各R^{N1}は、独立して、Ｈ、ＯＨ、NO_2、Ｎ（R^{N2}）$_2$、SO_2OR^{N2}、SO_2R^{N2}、SOR^{N2}、Ｎ保護基、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、アリール、アルカリル、シクロアルキル、アルキルシクロアルキル、カルボキシアルキル（例えば、Ｏ－保護基で任意選択的に置換された、例えば、任意選択的に置換されたアリールアルコキシカルボニル基または本明細書に記載の任意のもの）、スルホアルキル、アシル（例えば、アセチル、トリフルオロアセチル、または本明細書に記載の他のもの）、アルコキシカルボニルアルキル（例えば、Ｏ－保護基で任意選択的に置換された、例えば、任意選択的に置換されたアリールアルコキシカルボニル基または本明細書に記載の任意のもの）、ヘテロシクリル（例えば、ヘテロアリール）、またはアルキルヘテロシクリル（例えば、アルキルヘテロアリール）であり、式中、これらの列挙されたR^{N1}基の各々は、各基について本明細書に定義されるように、任意選択的に置換することができ、または２つのR^{N1}を組み合わせてヘテロシクリルまたはＮ保護基を形成することができ、式中、各R^{N2}は、独立して、Ｈ、アルキル、またはアリールである。本開示のアミノ基は、非置換アミノ（すなわち、－ＮＨ２）または置換アミノ（すなわち、－Ｎ（Ｒ’）$_2$）とすることができる。好ましい実施形態では、アミノは、－ＮＨ２または－ＮＨR^{N1}であり、式中、R^{N1}は独立して、ＯＨ、NO_2、NH_2、$NR^{N2}{}_2$、SO_2OR^{N2}、SO_2R^{N2}、SOR^{N2}、アルキル、カルボキシアルキル、スルホアルキル、アシル（例えば、アセチル、トリフルオロアセチル、または本明細書に記載の他のもの）、アルコキシカルボニルアルキル（例えば、ｔ－ブトキシカルボニルアルキル）またはアリールであり、各R^{N2}は、Ｈ、Ｃ１－２０アルキル（例えば、C_{1-6}アルキル）、またはC_{1-10}アリールとすることができる。

【０１７５】

本明細書に記載される場合、「アミノ酸」という用語は、側鎖、アミノ基、および酸基（例えば、－CO_2Ｈのカルボキシ基または－SO_3Ｈのスルホ基）を有する分子を指し、アミノ酸は、側鎖、アミノ基、または酸基（例えば、側鎖）によって親分子基に結合される。一部の実施形態では、アミノ酸は、カルボニル基によって親分子基に結合し、側鎖またはアミノ基はカルボニル基に結合している。例示的な側鎖としては、任意選択的に置換されたアルキル、アリール、ヘテロシクリル、アルキルアリール、アルキルヘテロシクリル、アミノアルキル、カルバモイルアルキル、およびカルボキシアルキルが挙げられる。アミノ酸の例としては、アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、シス

テイン、グルタミン酸、グルタミン、グリシン、ヒスチジン、ヒドロキシノルバリン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、ノルバリン、オルニチン、フェニルアラニン、プロリン、ピロリジン、セレノシステイン、セリン、タウリン、トレオニン、トリプトファン、チロシン、およびバリンが挙げられる。アミノ酸基は、以下からなる群から独立して選択される、１、２、３個の置換基、または２個以上の炭素のアミノ酸基の場合には４個の置換基で、任意選択的に置換されてもよい。（１）C_{1-6}アルコキシ、（２）C_{1-6}アルキルスルフィニル、（３）本明細書に定義されるアミノ（例えば、非置換アミノ（すなわち、－NH_2）または置換アミノ（すなわち、－N（R^{N1}）$_2$、式中、R^{N1}は、アミノについて定義されるとおり）、（４）C_{6-10}アリール－C_{1-6}アルコキシ、（５）アジド、（６）ハロ、（７）（C_{2-9}ヘテロシクリル）オキシ、（８）ヒドロキシ、（９）ニトロ、（１０）オキソ（例えば、カルボキシアルデヒドまたはアシル）、（１１）C_{1-7}スピロシクリル、（１２）チオアルコキシ、（１３）チオール、（１４）－$CO_2R^{A'}$、式中、$R^{A'}$は、（ａ）C_{1-20}アルキル（例えば、C_{1-6}アルキル）、（ｂ）C_{2-20}アルケニル（例えば、C_{2-6}アルケニル）、（ｃ）C_{6-10}アリール、（ｄ）水素、（ｅ）C_{1-6}アルキル－C_{6-10}アリール、（ｆ）アミノ－C_{1-20}アルキル、（ｇ）－（CH_2）$_{s2}$（OCH_2CH_2）$_{s1}$（CH_2）$_{s3}$OR’のポリエチレングリコール、式中、ｓ１は、１～１０の整数であり（例えば、１～６または１～４）、ｓ２およびｓ３の各々は、独立して、０～１０の整数（例えば、０～４、０～６、１～４、１～６、または１～１０）であり、R’は、HまたはC_{1-20}アルキルであり、（ｈ）－NR^{N1}（CH_2）$_{s2}$（CH_2CH_2O）$_{s1}$（CH_2）$_{s3}$$NR^{N1}$のアミノ－ポリエチレングリコール、式中、ｓ１は、１～１０の整数（例えば、１～６または１～４）であり、ｓ２およびｓ３の各々は、独立して、０～１０の整数（例えば、０～４、０～６、１～４、１～６、または１～１０）であり、各R^{N1}が、独立して、水素または任意で置換されるC_{1-6}アルキルであり、（１５）－C（O）$NR^{B'}R^{C'}$、式中、$R^{B'}$および$R^{C'}$の各々は、独立して、（ａ）水素、（ｂ）C_{1-6}アルキル、（ｃ）C_{6-10}アリール、（ｄ）C_{1-6}アルキル－C_{6-10}アリール、（１６）－$SO_2R^{D'}$、式中、$R^{D'}$は、（ａ）C_{1-6}アルキルからなる群から選択され、（ｂ）C_{6-10}アリール、（ｃ）C_{1-6}アルキル－C_{6-10}アリール、および（ｄ）ヒドロキシ、（１７）－$SO_2NR^{E'}R^{F'}$、式中、$R^{E'}$および$R^{F'}$の各々は、独立して、（ａ）水素、（ｂ）C_{1-6}アルキル、（ｃ）C_{6-10}アリールおよび（ｄ）C_{1-6}アルキル－C_{6-10}アリール、（１８）－C（O）$R^{G'}$、式中、$R^{G'}$は、（ａ）C_{1-20}アルキル（例えば、C_{1-6}アルキル）、（ｂ）C_{2-20}アルケニル（例えば、C_{2-6}アルケニル）、（ｃ）$C_{6\sim10}$アリール、（ｄ）水素、（ｅ）C_{1-6}アルキル－C_{6-10}アリール、（ｆ）アミノ－C_{1-20}アルキル、（ｇ）｛ｕｔ｝－（CH_2）$_{s2}$（OCH_2CH_2）$_{s1}$（CH_2）$_{s3}$OR’のポリエチレングリコール、式中、ｓ１は、１～１０の整数（例えば、１～６または１～４）であり、ｓ２およびｓ３の各々は、独立して、０～１０の整数（例えば、０～４、０～６、１～４、１～６、または１～１０）であり、R’は、HまたはC_{1-20}アルキルであり、（ｈ）－NR^{N1}（CH_2）$_{s2}$（CH_2CH_2O）$_{s1}$（CH_2）$_{s3}$$NR^{N1}$のアミノ－ポリエチレングリコール、式中、ｓ１は、１～１０の整数（例えば、１～６または１～４）であり、ｓ２およびｓ３の各々は、独立して、０～１０の整数（例えば、０～４、０～６、１～４、１～６、または１～１０）であり、各R^{N1}は、独立して、水素または任意で置換されるC_{1-6}アルキル、（１９）－$NR^{H'}$C（O）$R^{I'}$、式中、$R^{H'}$は、（ａ１）水素および（ｂ１）C_{1-6}アルキルからなる群から選択され、および$R^{I'}$は、（ａ２）C_{1-20}アルキル（例えば、$C_{1\sim6}$アルキル）、（ｂ２）C_{2-20}アルケニル（例えば、C_{2-6}アルケニル）、（ｃ２）C_{6-10}アリール、（ｄ２）水素、（ｅ２）C_{1-6}アルキル－C_{6-10}アリール、（ｆ２）アミノ－C_{1-20}アルキル、（ｇ２）－（CH２）$_{s2}$（OCH_2CH_2）$_{s1}$（CH_2）$_{s3}$OR’のポリエチレングリコール、式中、ｓ１は、１～１０の整数（例えば、１～６または１～４）であり、ｓ２およびｓ３の各々は、独立して、０～１０の整数（例えば、０～４、０～６、１～４、１～６、または１～１０）であり、R’は、HまたはC_{1-20}

アルキルであり、（ｈ$_2$）－ＮＲ^{Ｎ１}（ＣＨ$_2$）$_{ｓ２}$（ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｏ）$_{ｓ１}$（ＣＨ$_2$）$_{ｓ３}$ＮＲ^{Ｎ１}のアミノ－ポリエチレングリコール、式中、ｓ１は、１～１０の整数（例えば、１～６または１～４）であり、ｓ２およびｓ３の各々は、０～１０の整数（例えば、０～４、０～６、１～４、１～６、または１～１０）であり、各Ｒ^{Ｎ１}が、独立して、水素または任意選択的に置換されるＣ$_{1-6}$アルキル、（２０）－ＮＲ$^{Ｊ’}$Ｃ（Ｏ）ＯＲ$^{Ｋ’}$、式中、Ｒ$^{Ｊ’}$は、（ａ１）水素および（ｂ１）Ｃ$_{1-6}$アルキルからなる群から選択され、およびＲ$^{Ｋ’}$は、（ａ２）Ｃ$_{1-20}$アルキル（例えば、Ｃ$_{1-6}$アルキル）、（ｂ２）Ｃ$_{2-20}$アルケニル（例えば、Ｃ$_{2-6}$アルケニル）、（ｃ２）Ｃ$_{6-10}$アリール、（ｄ２）水素、（ｅ２）Ｃ$_{1-6}$アルキル－Ｃ$_{6-10}$アリール、（ｆ２）アミノ－Ｃ$_{1-20}$アルキル、（ｇ２）－（ＣＨ２）$_{ｓ２}$（ＯＣＨ$_2$ＣＨ$_2$）$_{ｓ１}$（ＣＨ$_2$）$_{ｓ３}$ＯＲ’のポリエチレングリコール、式中、ｓ１は、１～１０の整数（例えば、１～６または１～４）であり、ｓ２およびｓ３の各々は、独立して、０～１０の整数（例えば、０～４、０～６、１～４、１～６、または１～１０）であり、Ｒ’は、ＨまたはＣ$_{1-20}$アルキルであり、（ｈ$_2$）－ＮＲ^{Ｎ１}（ＣＨ）$_{ｓ２}$（ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｏ）ｓ１（ＣＨ$_2$）$_{ｓ３}$ＮＲ^{Ｎ１}のアミノ－ポリエチレングリコール、式中、ｓ１は、１～１０の整数（例えば、１～６または１～４）であり、ｓ２およびｓ３の各々は、独立して、０～１０の整数（例えば、０～４、０～６、１～４、１～６、または１～１０）であり、各Ｒ^{Ｎ１}は、独立して、水素または任意選択的に置換されるＣ$_{1-6}$アルキル、および（２１）アミジンを含む。一部の実施形態では、これらの基の各々は、本明細書に記載されるようにさらに置換することができる。

【０１７６】

本明細書で使用される場合、「アミノアルキル」という用語は、本明細書で定義されるアミノ基によって置換される、本明細書で定義されるアルキル基を表す。アルキルおよびアミノは各々、それぞれの基について本明細書に記載される１、２、３、または４個の置換基（例えば、ＣＯ$_2$Ｒ$^{Ａ’}$、式中、Ｒ$^{Ａ’}$は、（ａ）Ｃ$_{1-6}$アルキル、（ｂ）Ｃ$_{6-10}$アリール、（ｃ）水素、および（ｄ）Ｃ$_{1-6}$アルキル－Ｃ$_{6-10}$アリール、例えば、カルボキシ、および／またはＮ保護基からなる群から選択される）でさらに置換することができる。

【０１７７】

本明細書で使用される場合、「アミノアルケニル」という用語は、本明細書で定義されるアミノ基によって置換される、本明細書で定義されるアルケニル基を表す。アルケニルおよびアミノは各々、それぞれの基について本明細書に記載される１、２、３、または４個の置換基（例えば、ＣＯ$_2$Ｒ$^{Ａ’}$、式中、Ｒ$^{Ａ’}$は、（ａ）Ｃ$_{1-6}$アルキル、（ｂ）Ｃ$_{6-10}$アリール、（ｃ）水素、および（ｄ）Ｃ$_{1-6}$アルキル－Ｃ$_{6-10}$アリール、例えば、カルボキシ、および／またはＮ保護基からなる群から選択される）でさらに置換することができる。

【０１７８】

「アニオン性脂質」という用語は、生理的ｐＨで負に荷電した脂質を意味する。これらの脂質としては、ホスファチジルグリセロール、カルジオリピン、ジアシルホスファチジルセリン、ジアシルホスファチジン酸、Ｎ－ドデカノイルホスファチジルエタノールアミン、Ｎ－スクシニルホスファチジルエタノールアミン、Ｎ－グルタリルホスファチジルエタノールアミン、リシルホスファチジルグリセロール、パルミトイルオレイオルホスファチジルグリセロール（ＰＯＰＧ）、および中性脂質に結合された他のアニオン性修飾基が挙げられるが、これらに限定されない。

【０１７９】

一連の項目の前に置かれ、項目のいずれかを分離する「および（ａｎｄ）」または「または（ｏｒ）」という用語をともなう「少なくとも１つの」という語句は、リストの各メンバー（すなわち、各項目）ではなく、全体としてリストを修飾する。「少なくとも１つの」という語句は、列挙された各項目のうちの少なくとも１つの選択を必要とせず、むしろ、この語句は、項目のうちのいずれか１つ、および／または項目の任意の組み合わせの

うちの少なくとも１つ、および／または項目の各々のうちの少なくとも１つのうちの少なくとも１つを含む意味を可能にする。一例として、「Ａ、ＢおよびＣのうちの少なくとも１つ」または「Ａ、ＢまたはＣのうちの少なくとも１つ」という語句は各々、Ａのみ、Ｂのみ、またはＣのみ、Ａ、Ｂ、およびＣの任意の組み合わせ、ならびに／またはＡ、Ｂ、およびＣの各々のうちの少なくとも１つを指す。

【０１８０】

「含む（ｉｎｃｌｕｄｅ）」、「有する（ｈａｖｅ）」、またはそれに類する用語が記載または特許請求の範囲で使用され、こうした用語は、「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅ）」という用語が特許請求の範囲の移行語として用いられる場合、「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅ）」という用語と同様の様態で包括的であることが意図される。

【０１８１】

単数形の要素への言及は、特に明記されない限り、「１つのみ」を意味することを意図するものではなく、むしろ「１つ以上」を意味することを意図する。男性の代名詞（例えば、彼の）には、女性および中性の性別（例えば、彼女のおよびその）が含まれ、その逆も同様である。「一部の」という用語は、１つ以上を指す。下線付きおよび／または斜体の見出しおよび小見出しは、便宜上のみ使用され、主題技術を限定せず、また主題技術の記載の解釈に関連しては言及されない。当業者に公知であるか、または後に公知となる、本開示全体を通して記載される様々な構成の要素に対する全ての構造的および機能的均等物は、参照により本明細書に明示的に組み込まれ、主題技術によって包含されることが意図される。さらに、本明細書に開示されるいかなる開示も、かかる開示が上記の記載に明示的に列挙されているか否かにかかわらず、一般公衆専用であることを意図するものではない。

【０１８２】

生体適合性という用語は、免疫系による傷害、毒性、または拒絶のリスクをほとんどまたは全くもたらさない、生きた細胞、組織、器官、または系と適合性があることを意味する。

【０１８３】

「生分解性」という用語は、生物の作用によって無害な製品に分解することができることを意味する。

【０１８４】

「生物学的に活性」という語句は、生物系および／または生命体において活性を有する任意の物質の特性を指す。例えば、生命体に投与されるとき、その生命体に生物学的効果を有する物質は、生物学的に活性であると考えられる。特定の実施形態では、本開示のポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチドの一部分が生物学的に活性であるか、または生物学的に関連性があると考えられる活性を模倣する場合でさえも、生物学的に活性であると考えられる場合がある。

【０１８５】

本明細書で使用される場合、「炭素環式」および「カルボシクリル」という用語は、芳香族または非芳香族であってもよい環が炭素原子によって形成される、任意選択的に置換されたC_{3-12}単環式、二環式、または三環式構造を指す。炭素環式構造としては、シクロアルキル基、シクロアルケニル基、およびアリール基が挙げられる。

【０１８６】

本明細書で使用される場合、「カルバモイル」という用語は、－Ｃ（Ｏ）－Ｎ（R^{N1}）$_2$を表し、式中、各R^{N1}の意味は、本明細書で提供される「アミノ」の定義に見出される。

【０１８７】

本明細書で使用される場合、「カルバモイルアルキル」という用語は、本明細書で定義されるカルバモイル基によって置換される、本明細書で定義されるアルキル基を表す。アルキル基は、本明細書に記載される１、２、３、または４個の置換基でさらに置換することができる。

【０１８８】
本明細書で使用される場合、「カルバミル」という用語は、構造－ＮＲ^{Ｎ１}Ｃ（＝Ｏ）ＯＲまたは－ＯＣ（＝Ｏ）Ｎ（Ｒ^{Ｎ１}）$_2$を有するカルバメート基を指し、式中、各Ｒ^{Ｎ１}の意味は、本明細書で提供される「アミノ」の定義に見出され、Ｒは、本明細書で定義されるアルキル、シクロアルキル、アルキルシクロアルキル、アリール、アルキルアリール、ヘテロシクリル（例えば、ヘテロアリール）、またはアルキルヘテロシクリル（例えば、アルキルヘテロアリール）である。
【０１８９】
本明細書で使用される場合、「カルボニル」という用語は、Ｃ（Ｏ）基を表し、Ｃ＝Ｏとしても表すことができる。
【０１９０】
「カルボキシアルデヒド」という用語は、構造－Ｃ（Ｏ）Ｈを有するアシル基を表す。
【０１９１】
本明細書で使用される場合、「カルボキシ」という用語は、－ＣＯ$_2$Ｈを意味する。
【０１９２】
「カチオン性脂質」という用語は、正の親水性頭部基、１つ、２つ、３つ以上の疎水性脂肪酸または脂肪アルキル鎖、およびこれら２つのドメイン間のコネクタを有する両親媒性脂質およびその塩を意味する。イオン性カチオン性脂質またはプロトン化可能なカチオン性脂質は、典型的に、そのｐＫａを下回るｐＨでプロトン化（すなわち、正に荷電）され、ｐＫａを上回るｐＨで実質的に中性である。好ましいイオン性カチオン性脂質は、生理的ｐＨよりも低いｐＫａを有する脂質であり、典型的に約７．４である。本開示のカチオン性脂質はまた、滴定可能なカチオン性脂質と称されてもよい。カチオン性脂質は、プロトン化可能な三級アミン（例えば、ｐＨ滴定可能な）頭部基を有する「アミノ脂質」とすることができる。一部のアミノ例示的なアミノ脂質は、Ｃ１８アルキル鎖を含むことができ、各アルキル鎖は、独立して、０～３個（例えば、０、１、２、または３個）の二重結合、および頭部基とアルキル鎖との間にエーテル結合、エステル結合、またはケタール結合を有する。かかるカチオン性脂質としては、ＤＳＤＭＡ、ＤＯＤＭＡ、ＤＬｉｎＤＭＡ、ＤＬｅｎＤＭＡ、γ－ＤＬｅｎＤＭＡ、ＤＬｉｎ－Ｋ－ＤＭＡ、ＤＬｉｎ－Ｋ－Ｃ２－ＤＭＡ（ＤＬｉｎ－Ｃ２Ｋ－ＤＭＡ、ＸＴＣ２、およびＣ２Ｋとしても知られる）、ＤＬｉｎ－Ｋ－Ｃ３－ＤＭ　Ａ、ＤＬｉｎ－Ｋ－Ｃ４－ＤＭＡ，　ＤＬｅｎ－Ｃ２Ｋ－ＤＭＡ、ｙ－ＤＬｅｎ－Ｃ２Ｋ－ＤＭＡ、ＤＬｉｎ－Ｍ－Ｃ２－ＤＭＡ（ＭＣ２としても知られる）、ＤＬｉｎ－Ｍ－Ｃ３－ＤＭＡ（ＭＣ３としても知られる）、および（ＤＬｉｎ－ＭＰ－ＤＭＡ）（１－Ｂｌ　１としても知られる）が挙げられるが、これらに限定されない。
【０１９３】
「含む」という用語は、開かれたものであることが意図され、追加の要素または工程を含むことを許容するが、必要とはしない。本明細書において「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」という用語が使用されるときは、それゆえに「からなる（ｃｏｎｓｉｓｔｉｎｇ　ｏｆ）」という用語も包含され、かつ開示される。
【０１９４】
「組成物」という用語は、特定される量で特定される成分を含む生成物、ならびに特定される量の特定される成分の組み合わせから直接的または間接的にもたらされる任意の生成物を意味する。
【０１９５】
「と組み合わせて」という用語は、本開示の脂質製剤化されたｍＲＮＡを、本開示の治療方法において他の薬剤とともに投与することを意味し、本開示の脂質製剤化されたｍＲＮＡおよび他の薬剤が、別個の剤形で逐次的にまたは同時に投与される、または同じ剤形で同時に投与されることを意味する。
【０１９６】
本明細書に記載される実施例で使用される「市販の化学物質」という用語および化学物

質は、標準的な商業的供給源から得られてもよく、そのような供給源としては、例えば、Ａｃｒｏｓ Ｏｒｇａｎｉｃｓ（ペンシルバニア州ピッツバーグ）、Ｓｉｇｍａ－Ａｄｒｉｃｈ Ｃｈｅｍｉｃａｌ（ウィスコンシン州ミルウォーキー）、Ａｖｏｃａｄｏ Ｒｅｓｅａｒｃｈ（英国ランカシャー）、Ｂｉｏｎｅｔ（英国コーンウォール）、Ｂｒｏｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ（ノースカロライナ州リサーチトライアングルパーク）、Ｃｏｍｂｉ－Ｂｌｏｃｋｓ（カリフォルニア州サンディエゴ）、Ｅａｓｍａｎ Ｏｒｇａｎｉｃ Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ、Ｅａｓｔｏｎ Ｋｏｄａｋ Ｃｏｍｐａｎｙ（ニューヨーク州ローチェスター）、Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ Ｃｏ．（ペンシルバニア州ピッツバーグ）、Ｆｒｏｎｔｉｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ（ユタ州ローガン）、ＩＣＮ Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌｓ，Ｉｎｃ．（カリフォルニア州コスタメサ）、Ｌａｎｃａｓｔｅｒ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ（ニューハンプシャー州ウィンダム）、Ｍａｙｂｒｉｄｇｅ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｃｏ．（英国コーンウォール）、Ｐｉｅｒｃｅ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｃｏ．（イリノイ州ロックフォード）、Ｒｉｅｄｅｌ ｄｅ Ｈａｅｎ（ドイツ・ハノーバー）、Ｓｐｅｃｔｒｅｎｃｅ Ｑｕａｌｉｔｙ Ｐｒｏｄｕｃｔ，Ｉｎｃ．（ニュージャージー州ニューブランズウィック）、ＴＣＩ Ａｍｅｒｉｃａ（オレゴン州ポートランド）、およびＷａｋｏ Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ ＵＳＡ，Ｉｎｃ．（バージニア州リッチモンド）が挙げられる。

【０１９７】

「化学文献に記載される化合物」という語句は、当業者には公知のように、化学化合物および化学反応を対象とする参考書およびデータベースを介して特定され得る。本明細書に開示される化合物の調製に有用な反応物質の合成を詳述する、または本明細書に開示される化合物の調製を記載する記事への参照を提供する適切な参考書および論文としては、例えば、“Ｓｙｎｔｈｅｔｉｃ Ｏｒｇａｎｉｃ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ”，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ａｎｄ Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ．Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ；Ｓ．Ｒ．Ｓａｎｄｌｅｒ ｅｔ ａｌ，“Ｏｒｇａｎｉｃ Ｆｕｎｃｔｉｏｎａｌ Ｇｒｏｕｐ Ｐｒｅｐａｒａｔｉｏｎｓ，”２ｎｄ Ｅｄ．，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，１９８３；Ｈ．Ｏ．Ｈｏｕｓｅ，“Ｍｏｄｅｒｎ Ｓｙｎｔｈｅｔｉｃ Ｒｅａｃｔｉｏｎｓ，”２ｎｄ Ｅｄ．，Ｗ．Ａ．Ｂｅｎｊａｍｉｎ，Ｉｎｃ．Ｍｅｎｌｏ Ｐａｒｋ，Ｃａｌｉｆ．，１９７２；Ｔ．Ｌ．Ｇｌｉｃｈｒｉｓｔ，“Ｈｅｔｅｒｏｃｙｃｌｉｃ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，”２ｎｄ Ｅｄ． Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ａｎｄ Ｓｏｎｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，１９９２；Ｊ．Ｍａｒｃｈ，“Ａｄｖａｎｃｅｄ Ｏｒｇａｎｉｃ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ：ｒｅａｃｔｉｏｎｓ，Ｍｅｃｈａｎｉｓｍｓ ａｎｄ Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ，”５ｔｈ Ｅｄ．，Ｗｉｌｅｙ Ｉｎｔｅｒｓｃｉｅｎｃｅ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，２００１；が挙げられ、特異的および類似の反応物質はまた、大半の公立図書や大学図書館だけでなく、オンラインデータベースでも利用できる、米国化学会のＣｈｅｍｉｃａｌ Ａｂｓｔｒａｃｔ Ｓｅｒｖｉｃｅによって作成される公知の化学物質のインデックスを通しても特定することができる（より詳細については、米国化学会（ワシントンＤＣ）に連絡されたい）。公知であるがカタログで市販されていない化学物質は、カスタム化学合成企業によって調製されてもよく、ここで、標準化学物質供給企業の多く（上記に列挙したものなど）は、カスタム合成サービスを提供する。

【０１９８】

本明細書で使用される場合、「シクロアルキル」という用語は、別段の指定がない限り、３～８個の炭素の一価の飽和または不飽和の非芳香族環状炭化水素基を表し、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、二環ヘプチルなどによって例示される。シクロアルキル基が１つの炭素－炭素二重結合を含む場合、シクロアルキル基は、「シクロアルケニル」基と称することができる。例示的なシクロアルケニル基としては、シクロペンテニル、シクロヘキセニルなどが挙げられる。本開示のシクロアルキル基は、（１）C_{1-7}アシル（例えば、カルボキシアルデヒド）、（２）C_{1-20}アルキル（例えば、C_{1-6}アルキル、C_{1-6}アルコキシ－C_{1-6}アルキル、C_{1-6}アルキルスルフィニル－C_{1-6}アルキル、アミノ－C_{1-6}アルキル、アジド

－Ｃ$_{1-6}$アルキル、（カルボキシアルデヒド）－Ｃ$_{1-6}$アルキル、ハロ－Ｃ$_{1-6}$アルキル（例えば、ペルフルオロアルキル）、ヒドロキシ－Ｃ$_{1-6}$アルキル、ニトロ－Ｃ$_{1-6}$アルキル、またはＣ$_{1-6}$チオアルコキシ－Ｃ$_{1-6}$アルキル）、（３）Ｃ$_{12}$アルコキシ（例えば、Ｃ$_{1-6}$アルコキシ、例えば、ペルフルオロアルコキシ）、（４）Ｃ$_{1-6}$アルキルスルフィニル、（５）Ｃ$_{6-10}$アリール、（６）アミノ、（７）Ｃ$_{1-6}$アルキル－Ｃ$_{6-10}$アリール、（８）アジド、（９）Ｃ$_{3-8}$シクロアルキル、（１０）Ｃ$_{1-6}$アルキル－Ｃ$_{3-8}$シクロアルキル、（１１）ハロ、（１２）Ｃ$_{1-12}$ヘテロシクリル（例えば、Ｃ$_{1-12}$ヘテロアリール）、（１３）（Ｃ$_{1-12}$ヘテロシクリル）オキシ、（１４）ヒドロキシ、（１５）ニトロ、（１６）Ｃ$_{1-20}$チオアルコキシ（例えば、Ｃ$_{1-6}$チオアルコキシ）、（１７）－（ＣＨ$_2$）$_q$ ＣＯ$_2$Ｒ$^{A'}$、式中、ｑは、ゼロ～４の整数であり、Ｒ$^{A'}$は、（ａ）Ｃ$_{1-6}$アルキル、（ｂ）Ｃ$_{6-10}$アリール、（ｃ）水素、（ｄ）Ｃ$_{1-6}$アルキル－Ｃ$_{6-10}$アリールからなる群から独立して選択され、（１８）－（ＣＨ$_2$）$_q$ＣＯＮＲ$^{B'}$Ｒ$^{C'}$、式中、ｑは、ゼロ～４の整数であり、式中、Ｒ$^{B'}$およびＲ$^{C'}$は、（ａ）水素、（ｂ）Ｃ$_{6-10}$アルキル、（ｃ）Ｃ$_{6-10}$アリール、（ｄ）Ｃ$_{1-6}$アルキル－Ｃ$_{6-10}$アリールからなる群から独立して選択され、（１９）－（ＣＨ$_2$）$_q$ ＳＯ$_2$Ｒ$^{D'}$、式中、ｑは、ゼロ～４の整数であり、Ｒ$^{D'}$は、（ａ）Ｃ$_{6-10}$アルキルからなる群から選択され、（ｂ）Ｃ$_{6-10}$アリール、（ｃ）Ｃ$_{1-6}$アルキル－Ｃ$_{6-10}$アリール、（２０）－（ＣＨ$_2$）$_q$ ＳＯ$_2$ＮＲ$^{E'}$Ｒ$^{F'}$からなる群から独立して選択され、式中、ｑは、ゼロ～４の整数であり、Ｒ$^{E'}$およびＲ$^{F'}$の各々は、（ａ）水素、（ｂ）Ｃ$_{6-10}$アルキル、（ｃ）Ｃ$_{6-10}$アリール、（ｄ）Ｃ$_{1-6}$アルキル－Ｃ$_{1-10}$アリールからなる群から独立して選択され、（２１）チオール、（２２）Ｃ$_{6-10}$アリールオキシ、（２３）Ｃ$_{3-8}$シクロアルコキシ、（２４）Ｃ$_{6-10}$アリール－Ｃ$_{1-6}$アルコキシ、（２５）Ｃ$_{1-6}$アルキル－Ｃ$_{1-12}$ヘテロシクリル（例えば、Ｃ$_{1-6}$アルキル－Ｃ$_{1-12}$ヘテロアリール）、（２６）オキソ、（２７）Ｃ$_{2-20}$アルケニル、および（２８）Ｃ$_{2-20}$アルキニルによって任意選択的に置換され得る。一部の実施形態では、これらの基の各々は、本明細書に記載されるようにさらに置換することができる。例えば、Ｃ$_1$－アルカリルまたはＣ$_1$－アルキルヘテロシクリルのアルキル基は、オキソ基でさらに置換されて、それぞれのアリーロイルおよび（ヘテロシクリル）オイル置換基を得ることができる。

【０１９９】

本明細書で使用される場合、「ジアステレオマー」という用語は、互いに鏡像ではなく、互いの上に重ね合わせることができない立体異性体を意味する。

【０２００】

「ジアシルグリセロール」または「ＤＡＧ」という用語は、２つの脂肪アシル鎖、Ｒ^{1}およびＲ^{2}を有する化合物を含み、それらの両方が独立して、エステル結合によってグリセロールの１位および２位に結合された２～３０個の炭素を有する。アシル基は飽和とすることができ、または様々な程度の不飽和を有することができる。好適なアシル基としては、ラウロイル（Ｃ１２）、ミリストイル（Ｃ１４）、パルミトイル（Ｃ１６）、ステアロイル（Ｃ１８）、およびイコソイル（Ｃ２０）が挙げられるが、これらに限定されない。好ましい実施形態では、Ｒ^{1}およびＲ^{2}は同じであり、すなわち、Ｒ^{1}およびＲ^{2}は両方ともミリストイル（すなわち、ジミリストイル）であり、Ｒ^{1}およびＲ^{2}は両方ともステアロイル（すなわち、ジステアロイル）である。

【０２０１】

「ジアルキルオキシプロピル」または「ＤＡＡ」という用語は、２つのアルキル鎖ＲおよびＲ’を有する化合物を含み、それらの両方は、独立して２～３０個の炭素を有する。アルキル基は飽和とすることができ、または様々な程度の不飽和を有することができる。

【０２０２】

本明細書で使用される場合、薬剤の「有効量」という用語は、有益なまたは所望の結果、例えば、臨床結果をもたらすのに十分な量であり、そのため、「有効量」はそれが適用される状況に依存する。例えば、がんを治療する薬剤を投与する文脈にでは、薬剤の有効

量は、例えば、薬剤の投与なく得られた応答と比較して、本明細書に定義されるようながんの治療を達成するのに十分な量である。

【０２０３】

本明細書で使用される場合、「エナンチオマー」という用語は、少なくとも８０％（すなわち、１つのエナンチオマーの少なくとも９０％、および他のエナンチオマーの最大１０％）、好ましくは少なくとも９０％、より好ましくは少なくとも９８％の光学純度または鏡像体過剰率（当該技術分野で標準の方法によって決定）を有する、本開示の化合物の各個々の光学活性形態を意味する。

【０２０４】

「完全に封入された」という用語は、核酸脂質粒子中の核酸（例えば、ｍＲＮＡ）が、遊離ＲＮＡを有意に分解するであろう血清またはヌクレアーゼアッセイへの曝露後に有意に分解されないことを意味する。完全に封入されると、通常では遊離核酸の１００％を分解するであろう処理で、好ましくは粒子中の核酸の２５％未満が分解され、より好ましくは１０％未満が分解され、最も好ましくは５％未満が分解される。「完全に封入された」は、核酸脂質粒子が、インビボ投与時にその成分部分へと急速に分解しないことも意味する。

【０２０５】

本明細書で使用される場合、「ハロ」および「ハロゲン」という用語は、臭素、塩素、ヨウ素、またはフッ素から選択されるハロゲンを表す。

【０２０６】

本明細書で使用される場合、「ハロアルキル」という用語は、ハロゲン基（すなわち、Ｆ、Ｃｌ、Ｂｒ、またはＩ）によって置換される、本明細書で定義されるアルキル基を表す。ハロアルキルは、１，２、３個、または２つ以上の炭素のアルキル基の場合には４個のハロゲンで置換されてもよい。ハロアルキル基としては、ペルフルオロアルキル（例えば、－CF_3）、－CHF_2、－CH_2F、－CCl_3、－CH_2CH_2Br、－$CH_2CH(CH_2CH_2Br)CH_3$、および－ＣＨＩＣＨ$_3$が挙げられる。一部の実施形態では、ハロアルキル基は、アルキル基について本明細書に記載される１、２、３、または４個の置換基でさらに置換することができる。

【０２０７】

本明細書で使用される場合、「ヘテロアルキル」という用語は、構成炭素原子のうちの１つまたは２つが各々、窒素、酸素、または硫黄によって置き換えられた、本明細書で定義されるアルキル基を指す。一部の実施形態では、ヘテロアルキル基は、アルキル基について本明細書に記載される１、２、３、または４個の置換基でさらに置換することができる。

【０２０８】

本明細書で使用される場合、「炭化水素」という用語は、炭素原子および水素原子のみからなる基を表す。

【０２０９】

本明細書で使用される場合、「ヒドロキシ」という用語は、－ＯＨ基を表す。一部の実施形態では、ヒドロキシ基は、アルキルについて本明細書に定義される１、２、３、または４個の置換基（例えば、Ｏ－保護基）でさらに置換することができる。

【０２１０】

本明細書で使用される場合、「ヒドロキシアルケニル」という用語は、１～３個のヒドロキシ基で置換された、本明細書で定義されるアルケニル基を表すが、但し、１個以下のヒドロキシ基がアルキル基の単一の炭素原子に結合してもよく、ジヒドロキシプロペニル、ヒドロキシイソペンテニルなどによって例示される。一部の実施形態では、ヒドロキシアルケニル基は、アルキルについて本明細書に定義される１、２、３、または４個の置換基（例えば、Ｏ－保護基）でさらに置換することができる。

【０２１１】

本明細書で使用される場合、「ヒドロキシアルキル」という用語は、１～３個のヒドロ

キシ基で置換された、本明細書で定義されるアルキル基を表すが、但し、１個以下のヒドロキシ基がアルキル基の単一の炭素原子に結合してもよく、ジヒドロキシプロペニル、ヒドロキシイソペンテニルなどによって例示される。一部の実施形態では、ヒドロキシアルキル基は、アルキルについて本明細書に定義される１、２、３、または４個の置換基（例えば、Ｏ－保護基）でさらに置換することができる。
「水和物」という用語は、溶媒分子がH_2Oである溶媒和物を意味する。
【０２１２】
本明細書で使用される場合、「異性体」という用語は、本開示の任意の化合物の任意の互変異性体、立体異性体、エナンチオマー、またはジアステレオマーを意味する。本開示の化合物は、１つ以上のキラル中心および／または二重結合を有することができ、したがって、二重結合異性体（すなわち、幾何学的Ｅ／Ｚ異性体）またはジアステレオマー（例えば、エナンチオマー（すなわち、（＋）または（－））またはシス／トランス異性体）などの立体異性体として存在することが認識される。本開示によれば、本明細書に図示される化学構造、したがって本開示の化合物は、対応する立体異性体の全て、すなわち、立体異性的に純粋な形態（例えば、幾何学的に純粋、鏡像異性的に純粋、またはジアステレオマー的に純粋）、ならびにエナンチオマー混合物および立体異性混合物、例えば、ラセミ体を包含する。本開示の化合物のエナンチオマー混合物および立体異性混合物は、典型的に、キラル相ガスクロマトグラフィー、キラル相高速液体クロマトグラフィー、キラル塩複合体としての化合物の結晶化、またはキラル溶媒中での化合物の結晶化などの周知の方法によって、それらの成分エナンチオマーまたは立体異性体へと分解することができる。エナンチオマーおよび立体異性体はまた、周知の非対称合成方法によって、立体異性的にまたは鏡像異性的に純粋な中間体、試薬、および触媒からも得ることができる。
【０２１３】
本明細書で使用される場合、「ニトロ」という用語は、－NO_2基を表す。
【０２１４】
「核酸」という用語は、一本鎖または二本鎖形態のデオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドおよびそのポリマーを意味する。この用語は、既知のヌクレオチド類似体または修飾された骨格残基もしくは結合を含有する核酸を包含し、それらは合成、天然に存在する、および天然に存在せず、それらは参照核酸と類似の結合特性を有し、参照ヌクレオチドと類似の様態で代謝される。こうした類似体の例としては、ホスホロチオエート、ホスホロアミデート、メチルホスホネート、キラル－メチルホスホネート、２’－Ｏ－メチルリボヌクレオチド、ペプチド－核酸（ＰＮＡ）が挙げられるが、これらに限定されない。
【０２１５】
本明細書で使用される場合、「オキソ」という用語は、＝Ｏを表す。
【０２１６】
本明細書で使用される場合、「立体異性体」という用語は、化合物が有し得る全ての異なる異性体ならびに立体配座の形態（例えば、本明細書に記載される任意の式の化合物）、特に全ての可能な立体化学的および立体配座的な異性体、塩基性分子構造の全てのジアステレオマー、エナンチオマー、および／または配座異性体を指す。本開示の一部の化合物は、異なる互変異性型で存在してもよく、後者の全ては、本開示の範囲内に含まれる。
【０２１７】
本明細書で使用される場合、「スルホニル」という用語は、－Ｓ（Ｏ）$_2$－基を表す。
【０２１８】
「化合物」という用語は、示される構造の全ての立体異性体、幾何異性体、互変異性体、および同位体を含むことを意味する。
【０２１９】
「保存される」という用語は、比較される２つ以上の配列の同じ位置で変化せずに発生するものである、ポリヌクレオチド配列またはポリペプチド配列のヌクレオチドまたはアミノ酸残基をそれぞれ指す。比較的保存されたヌクレオチドまたはアミノ酸は、配列の他

の場所に現れるヌクレオチドまたはアミノ酸よりも関連性のより高い配列間で保存されるものである。

【０２２０】

「環状」という用語は、連続した輪の存在を指す。環状分子は、円形である必要はなく、結合されてサブユニットの途切れない鎖を形成するのみである。本開示のｍＲＮＡなどの環状分子は、単一単位もしくは多量体であってもよく、または複合体もしくは高次構造の１つ以上の構成要素を含んでもよい。

【０２２１】

「細胞毒性」という用語は、細胞（例えば、哺乳類細胞（例えば、ヒト細胞））、細菌、ウイルス、真菌、原虫、寄生虫、プリオン、またはそれらの組み合わせを死滅する、または傷害性、毒性、または致命的な効果を引き起こすことを指す。

【０２２２】

「送達」という用語は、化合物、物質、実体、部分、積荷、またはペイロードを送達する行為または方法を指す。

【０２２３】

「送達剤」という用語は、少なくとも部分的に、標的細胞へのポリヌクレオチドのインビボ送達を容易にする任意の物質を指す。

【０２２４】

核酸配列の「発現」という用語は、以下の事象；（１）ＤＮＡ配列からのＲＮＡ鋳型の生成（例えば、転写による）、（２）ＲＮＡ転写物の処理（例えば、スプライシング、編集、５’キャップ形成、および／または３’末端処理による）、（３）ポリペプチドまたはタンパク質へのＲＮＡの翻訳、および（４）ポリペプチドまたはタンパク質の翻訳後修飾のうちの一つ以上を指す。

【０２２５】

「特徴」という用語は、特性（ｃｈａｒａｃｔｅｒｉｓｔｉｃ）、特性（ｐｒｏｐｅｒｔｙ）、または特有の要素を指す。

【０２２６】

本明細書で使用される場合、「断片」という用語は、一部分を指す。例えば、タンパク質の断片は、培養細胞から単離された全長タンパク質を消化することによって得られたポリペプチドを含んでもよい。

【０２２７】

「機能的」生物学的分子という用語は、それが特徴付けられる特性および／または活性を呈する形態の生物学的分子である。

【０２２８】

「疎水性脂質」という用語は、長鎖飽和脂肪族炭化水素基および不飽和脂肪族炭化水素基、ならびに１つ以上の芳香族基、脂環式基、または複素環式基（複数可）によって任意選択的に置換されたかかる基が挙げられるが、これらに限定されない、無極性基を有する化合物を意味する。好適な例としては、ジアシルグリセロール、ジアルキルグリセロール、Ｎ－Ｎ－ジアルキルアミノ、ｌ，２－ジアシルオキシ－３－アミノプロパン、およびｌ，２－ジアルキル－３－アミノプロパンが挙げられるが、これらに限定されない。

【０２２９】

「脂質」という用語は、脂肪酸のエステルを含み、水に不溶性であるが、多くの有機溶媒に可溶性であることを特徴とする有機化合物を意味する。脂質は通常、少なくとも３つのクラスに分けられる：（１）脂肪および油ならびにワックスを含む「単純脂質」、（２）リン脂質および糖脂質を含む「複合脂質」、および（３）ステロイドなどの「誘導脂質」。

【０２３０】

「脂質送達ビヒクル」という用語は、治療用核酸（例えば、ｍＲＮＡ）を興味のある標的部位（例えば、細胞、組織、器官など）に送達するために使用することができる脂質製剤を意味する。脂質送達ビヒクルは、カチオン性脂質、非カチオン性脂質（例えば、リン

脂質）、粒子の凝集を防止するコンジュゲートされた脂質（例えば、ＰＥＧ脂質）、および任意選択的にコレステロールから形成することができる核酸脂質粒子とすることができる。典型的には、治療用核酸（例えば、ｍＲＮＡ）は、粒子の脂質部分に封入され、それによって酵素分解から保護されてもよい。

【０２３１】

「脂質封入」という用語は、完全封入、部分封入、またはその両方を有するｍＲＮＡなどの治療用核酸を提供する脂質粒子を意味する。好ましい実施形態では、核酸（例えば、ｍＲＮＡ）は、脂質粒子内に完全に封入される。

【０２３２】

「両親媒性脂質（ａｍｐｈｉｐａｔｈｉｃ　ｌｉｐｉｄ）」または「両親媒性脂質（ａｍｐｈｉｐｈｉｌｉｃ　ｌｉｐｉｄ）」という用語は、脂質材料の疎水性部分が疎水性相に配向する一方で、親水性部分が水相に配向する材料を意味する。親水性の特性は、極性、または炭水化物、リン酸塩、カルボン酸、スルファト、アミノ、スルフヒドリル、ニトロ、ヒドロキシル、および他の同様の基などの荷電基の存在に由来する。疎水性は、長鎖飽和脂肪族炭化水素基および不飽和脂肪族炭化水素基、ならびに１つ以上の芳香族基、脂環式基、または複素環式基（複数可）によって置換されたかかる基が挙げられるがこれらに限定されない無極性基の包含によって与えられることが可能である。両親媒性化合物の例としては、リン脂質、アミノ脂質、およびスフィンゴ脂質が挙げられるが、これらに限定されない。

【０２３３】

「リンカー」または「結合部分」という用語は、原子の群、例えば、１０～１００個の原子を指し、またそれらは、炭素、アミノ、アルキルアミノ、酸素、硫黄、スルホキシド、スルホニル、カルボニル、およびイミンなど、しかしこれらに限定されない原子または基からなることができる。リンカーは、アミノ酸配列への組み込みに干渉しない十分な長さであってもよい。リンカーに組み込むことができる化学基の例としては、アルキル、アルケニル、アルキニル、アミド、アミノ、エーテル、チオエーテル、エステル、アルキル、ヘテロアルキル、アリール、またはヘテロシクリルが挙げられるがそれらに限定されず、それらの各々は、本明細書に記載されるように、任意選択的に置換することができる。リンカーの例としては、不飽和アルカン、ポリエチレングリコール（例えば、エチレンまたはプロピレングリコール単量体単位、例えば、ジエチレングリコール、ジプロピレングリコール、トリエチレングリコール、トリプロピレングリコール、テトラエチレングリコール、またはテトラエチレングリコール）、およびデキストランポリマーが挙げられるが、これらに限定されない。その他の例としては、還元剤または光分解を使用して開裂することができる、リンカー内の開裂可能な部分、例えば、ジスルフィド結合（－Ｓ－Ｓ－）またはアゾ結合（－Ｎ＝Ｎ－）が挙げられるが、これらに限定されない。選択的に開裂可能な結合の非限定的な例としては、例えば、トリス（２－カルボキシエチル）ホスフィン（ＴＣＥＰ）、または他の還元剤の使用によって開裂することができるアミド結合、および／または光分解、ならびに、例えば、酸性加水分解もしくは塩基性加水分解によって開裂することができるエステル結合が挙げられる。

【０２３４】

哺乳類という用語は、ヒトもしくは他の哺乳類を意味するか、またはヒトを意味する。

【０２３５】

「メッセンジャーＲＮＡ」（ｍＲＮＡ）という用語は、興味のあるタンパク質またはポリペプチドをコードし、インビトロ、インビボ、インサイチューで、またはエクスビボで、コードされた興味のあるタンパク質またはポリペプチドを産生するように翻訳することができる任意のポリヌクレオチドを指す。

【０２３６】

「修飾」という用語は、本開示の分子の状態または構造の変化を指す。分子は、化学的、構造的、および機能的を含む多くの方法で修飾される場合がある。一実施形態では、核酸活性成分は、例えば、天然リボヌクレオチドＡ、Ｕ、Ｇ、およびＣに関連するため、非

天然ヌクレオシドおよび／またはヌクレオチドの導入によって修飾される。キャップ構造などの非標準ヌクレオチドは、Ａ、Ｃ、Ｇ、Ｕリボヌクレオチドの化学構造とは異なる場合があるが、「修飾」とは考えられない。

【０２３７】

「天然に存在する」という用語は、人工的な補助を有しないで自然界に存在することを意味する。

【０２３８】

「非ヒト脊椎動物」という用語は、野生種および家畜種を含むホモサピエンスを除く全ての脊椎動物を含む。非ヒト脊椎動物の例としては、哺乳類、例えばアルパカ、バンテン、バイソン、ラクダ、ネコ、ウシ、シカ、イヌ、ロバ、ガヤル、ヤギ、モルモット、ウマ、ラマ、ラバ、ブタ、モルモット、ウサギ、トナカイ、ヒツジ、水牛、およびヤクが挙げられるが、これらに限定されない。

【０２３９】

「ヌクレオチド」という用語は、当技術分野で周知の天然塩基（標準）および修飾塩基を意味する。かかる塩基は、概して、ヌクレオチド糖部分の１’位に位置する。ヌクレオチドは一般に、塩基、糖、およびリン酸基を含む。ヌクレオチドは、糖部分、リン酸部分、および／または塩基部分（ヌクレオチド類似体、修飾ヌクレオチド、非天然ヌクレオチド、非標準ヌクレオチド、およびその他とも互換的に称される。例えば、ＵｓｍａｎおよびＭｃＳｗｉｇｇｅｎの上記特許文献、Ｅｃｋｓｔｅｉｎらの国際ＰＣＴ公開第ＷＯ９２／０７０６５号、Ｕｓｍａｎらの国際ＰＣＴ公開第ＷＯ９３／１５１８７号、Ｕｈｌｍａｎ　＆　Ｐｅｙｍａｎの上記特許文献（全てが参照により本明細書に組み込まれる）を参照されたい）において非修飾とすることができる、または修飾することができる。Ｌｉｍｂａｃｈ，ｅｔ　ａｌ，Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．２２：２１８３，１９９４に要約されるように、当技術分野で公知の修飾核酸塩基のいくつかの例がある。核酸分子へと導入することができる塩基修飾の非限定的な例としては、イノシン、プリン、ピリジン－４－オン、ピリジン－２－オン、フェニル、シュードウラシル、２，４，６－トリメトキシベンゼン、３－メチルウラシル、ジヒドロウリジン、ナフチル、アミノフェニル、５－アルキルシチジン（例えば、５－メチルシチジン）、５－アルキルウリジン（例えば、リボチミジン）、５－ハロウリジン（例えば、５－ブロモウリジン）または６－アザピリミジンまたは６－アルキルピリミジン（例えば、６－メチルウリジン）、プロピン、その他（Ｂｕｒｇｉｎ，ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　３５：１４０９０，１９９６；Ｕｈｌｍａｎ　＆　Ｐｅｙｍａｎ、上記）が挙げられる。この態様における「修飾塩基」とは、１’位におけるアデニン、グアニン、シトシン、チミン、およびウラシル以外のヌクレオチド塩基、またはそれらの均等物を意味する。

【０２４０】

「動作可能に連結された」という語句は、２つ以上の分子、構築物、転写物、実体、部分等の間の機能的結合を指す。

【０２４１】

「患者」という用語は、治療を求めるか、または治療を必要とする対象、治療が必要とされる患者、治療を受けている対象、または治療を受ける予定の対象、または特定の疾患もしくは状態について訓練を受けた専門家からケアを受けている対象を指す。

【０２４２】

「任意選択的に置換されるＸ」（例えば、任意選択的に置換されるアルキル）という語句は、「Ｘが任意選択的に置換される、Ｘ」と均等であることが意図され、（例えば、「該アルキルが任意選択的に置換される、アルキル」）である。特徴「Ｘ」（例えば、アルキル）それ自体が任意選択的であることを意味することを意図するものではない。

【０２４３】

本明細書で使用される場合、「薬学的に許容可能な」という語句は、健全な医学的判断の範囲内で、合理的な利益／リスク比に匹敵する、過剰な毒性、刺激、アレルギー反応、または他の問題もしくは合併症なしに、ヒトおよび動物の組織と接触して使用するのに好

適な化合物、材料、組成物、および／または剤形を指すために使用される。

【０２４４】

本明細書で使用される場合、「薬学的に許容可能な賦形剤」という語句は、本明細書に記載される化合物以外の任意の成分（例えば、活性化合物を懸濁または溶解することができるビヒクル）を指し、患者において実質的に非毒性かつ非炎症性である特性を有する。賦形剤としては、例えば、抗接着剤、抗酸化剤、結合剤、コーティング、圧縮助剤、崩壊剤、染料（色）、軟化剤、乳化剤、充填剤（希釈剤）、フィルム形成体またはコーティング、風味剤、香味剤、滑剤（流動促進剤）、潤滑剤、保存剤、印刷インク、吸収剤、懸濁剤または分散剤、甘味料、および水和水が挙げられてもよい。例示的な賦形剤としては、ブチルヒドロキシトルエン（ＢＨＴ）、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム（二塩基性）、ステアリン酸カルシウム、クロスカルメロース、架橋ポリビニルピロリドン、クエン酸、クロスポビドン、システイン、　エチルセルロース、ゼラチン、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ラクトース、ステアリン酸マグネシウム、マルチトール、マンニトール、メチオニン、メチルセルロース、メチルパラベン、微結晶セルロース、ポリエチレングリコール、ポリビニルピロリドン、ポビドン、プレゼラチン化デンプン、プロピルパラベン、パルミチン酸レチニル、シェラック、二酸化ケイ素、カルボキシメチルセルロースナトリウム、クエン酸ナトリウム、グリコール酸デンプンナトリウム、ソルビトール、デンプン（トウモロコシ）、ステアリン酸、スクロース、タルク、二酸化チタン、ビタミンＡ、ビタミンＥ、ビタミンＣ、およびキシリトールが挙げられるが、これらに限定されない。

【０２４５】

「薬学的に許容可能な塩」という語句は、開示された化合物の誘導体を指し、親化合物は、既存の酸または塩基部分をその塩形態に変換することによって（例えば、遊離塩基基を好適な有機酸と反応させることによって）修飾される。薬学的に許容可能な塩の例としては、アミンなどの塩基性残基のミネラル塩または有機酸塩、カルボン酸などの酸性残基のアルカリ塩または有機塩などが挙げられるが、これらに限定されない。代表的な酸付加塩としては、酢酸塩、アジピン酸塩、アルギン酸塩、アスコルビン酸塩、アスパラギン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、安息香酸塩、重硫酸塩、ホウ酸塩、酪酸塩、ショウ脳酸塩、カンファースルホン酸塩、クエン酸塩、シクロペンタンプロピオン酸塩、ジグルコン酸塩、ドデシル硫酸塩、エタンスルホン酸塩、フマル酸塩、グルコヘプトン酸塩、グリセロリン酸、ヘミ硫酸塩、ヘプトン酸塩、ヘキサン酸塩、臭化水素酸塩、塩酸塩、ヨウ化水素酸塩、２－ヒドロキシ－エタンスルホン酸塩、ラクトビオン酸塩、乳酸塩、ラウリン酸塩、ラウリル硫酸塩、リンゴ酸塩、マレイン酸塩、マロン酸塩、メタンスルホン酸塩、２－ナフタレンスルホン酸塩、ニコチン酸塩、硝酸塩、オレイン酸塩、シュウ酸塩、パルミチン酸塩、パモ酸塩、ペクチン酸塩、過硫酸塩、３－フェニルプロピオン酸塩、リン酸塩、ピクリン酸塩、ピバル酸塩、プロピオン酸塩、ステアリン酸塩、コハク酸塩、硫酸塩、酒石酸塩、チオシアン酸塩、トルエンスルホン酸塩、ウンデカン酸塩、吉草酸塩が挙げられる。代表的なアルカリまたはアルカリ土類金属塩としては、ナトリウム、リチウム、カリウム、カルシウム、マグネシウムなどだけでなく、非毒性アンモニウム、四級アンモニウム、およびアミンカチオンも挙げられるが、アンモニウム、テトラメチルアンモニウム、テトラエチルアンモニウム、メチルアミン、ジメチルアミン、トリメチルアミン、トリエチルアミン、エチルアミンなどに限定されない。本開示の薬学的に許容可能な塩としては、例えば、非毒性無機酸または非毒性有機酸から形成される親化合物の従来の非毒性塩が挙げられる。本開示の薬学的に許容可能な塩は、従来の化学方法によって塩基性部分または酸性部分を含有する親化合物から合成することができる。一般的に、こうした塩は、これらの化合物の遊離酸形態または遊離塩基形態を、水中または有機溶媒中、または２つの混合物中の化学量論的な量の適切な塩基または酸と反応させることによって調製することができ、一般的に、エーテル、酢酸エチル、エタノール、イソプロパノール、またはアセトニトリルなどの非水性媒体が好ましい。好適な塩のリストは、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，１７ｔｈ ｅｄ．，Ｍａｃｋ Ｐｕ

ｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏｍｐａｎｙ，Ｅａｓｔｏｎ，Ｐａ．，１９８５，ｐ． １４１８，Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓａｌｔｓ： Ｐｒｏｐｅｒｔｉｅｓ，Ｓｅｌｅｃｔｉｏｎ，ａｎｄ Ｕｓｅ、Ｐ．Ｈ．Ｓｔａｈｌ ａｎｄ Ｃ．Ｇ．Ｗｅｒｍｕｔｈ（ｅｄｓ．），Ｗｉｌｅｙ－ＶＣＨ，２００８、およびＢｅｒｇｅ ｅｔ ａｌ．，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅ，６６，１－１９（１９７７）に見出され、それらの各々は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【０２４６】

「薬物動態」という用語は、生きている生命体に投与される物質の運命の決定に関連する際の分子または化合物の任意の１つ以上の特性を指す。薬物動態は、吸収、分布、代謝、および排泄の程度および速度を含むいくつかの領域に分けられる。これは一般的に、ＡＤＭＥと称され、以下である。（Ａ）吸収は血液循環に入る物質のプロセスであり、（Ｄ）分布は身体の流体および組織全体にわたる物質の分散または播種であり、（Ｍ）代謝（または生体内変換）は、親化合物の娘代謝産物への不可逆的な変換であり、（Ｅ）排泄（または排除）は、身体からの物質の除去を指す。まれに、一部の薬剤は身体組織に不可逆的に蓄積する。

【０２４７】

本明細書で使用される場合、「薬学的に許容可能な溶媒和物」という用語は、好適な溶媒の分子が結晶格子に組み込まれる、本開示の化合物を意味する。好適な溶媒は、投与される投与量において生理学的に忍容性がある。例えば、溶媒和物は、有機溶媒、水、またはそれらの混合物を含む溶液からの結晶化、再結晶、または沈殿によって調製されてもよい。好適な溶媒の例は、エタノール、水（例えば、一水和物、二水和物、および三水和物）、Ｎ－メチルピロリジノン（ＮＭＰ）、ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）、Ｎ，Ｎ’－ジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）、Ｎ，Ｎ’－ジメチルアセトアミド（ＤＭＡＣ）、１，３－ジメチル－２－イミダゾリジノン（ＤＭＥＵ）、１，３－ジメチル－３，４，５，６－テトラヒドロ－２－（１Ｈ）－ピリミジノン（ＤＭＰＵ）、アセトニトリル（ＡＣＮ）、プロピレングリコール、酢酸エチル、ベンジルアルコール、２－ピロリドン、安息香酸ベンジルなどである。水が溶媒である場合、溶媒和物は「水和物」と呼ばれる。

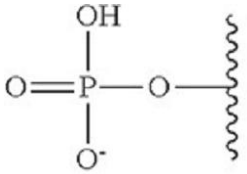
【０２４８】

「物理化学的」という用語は、物理的および／または化学的特性を意味する、または物理的および／または化学的特性に関連する。

【０２４９】

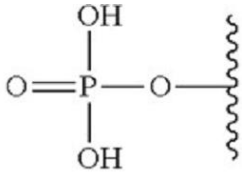
「リン酸塩」という用語は、当業者によって理解される通常の意味で使用され、そのプロトン化形態、例えば、

【化３】



および

【化４】



を含む。

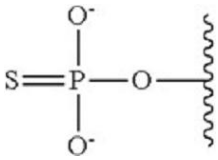
本明細書で使用される場合、「一リン酸塩」、「二リン酸塩」、および「三リン酸塩」と

いう用語は、当業者によって理解されるような、通常の意味で使用され、プロトン化形態を含む。

【０２５０】

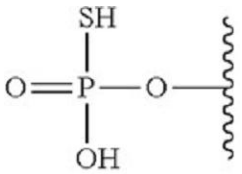
「ホスホロチオエート」という用語は、以下の一般式の化合物

【化５】



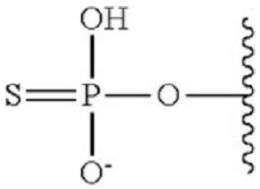
、そのプロトン化形態、例えば、

【化６】



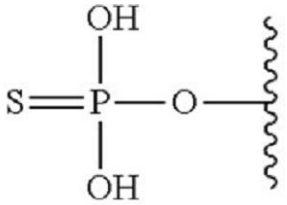
、およびその互変異性体、例えば、

【化７】



および

【化８】



を指す。

【０２５１】

「予防」という用語は、感染、疾患、障害、および／または状態の発症を部分的または完全に遅延させること、１つ以上の症状、機能、または特定の感染、疾患、障害、および／もしくは状態の臨床的な兆候の発症を部分的または完全に遅延させること、特定の感染、疾患、障害、および／もしくは状態の１つ以上の症状、機能、または兆候の発症を部分的または完全に遅延させること、感染、特定の疾患、障害および／または状態からの進行を部分的または完全に遅延させること、ならびに／または感染、疾患、障害、および／もしくは状態に関連する病理が進展するリスクを減少させることを指す。

【０２５２】

「興味のあるタンパク質」または「所望のタンパク質」という用語は、本明細書に提供されるもの、ならびにその断片、変異体、変形、および改変を含む。

【０２５３】

「精製する（ｐｕｒｉｆｙ）」、「精製した（ｐｕｒｉｆｉｅｄ）」、「精製（ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ）」という用語は、実質的に純粋にする、または望ましくない構成要素、材料剥離、混合物、または欠陥が実質的にないことを意味する。

【０２５４】
「ＲＮＡ」という用語は、少なくとも１つのリボヌクレオチド残基を含む分子を意味する。「リボヌクレオチド」とは、β－Ｄ－リボ－フラノース部分の２’位にヒドロキシル基を有するヌクレオチドを意味する。この用語は、二本鎖ＲＮＡ、一本鎖ＲＮＡ、部分的に精製されたＲＮＡなどの単離されたＲＮＡ、本質的に純粋なＲＮＡ、合成ＲＮＡ、組換え産生ＲＮＡ、ならびに１つ以上のヌクレオチドの付加、欠失、置換、および／または改変によって天然に存在するＲＮＡとは異なる改変ＲＮＡを含む。そのような改変は、干渉ＲＮＡの末端（複数可）への、または内部への、例えばＲＮＡの１つ以上のヌクレオチドにおける非ヌクレオチド材料の付加を含むことができる。本開示のＲＮＡ分子中のヌクレオチドはまた、天然に存在しないヌクレオチド、または化学的に合成されたヌクレオチドもしくはデオキシヌクレオチドなどの非標準ヌクレオチドを含むことができる。これらの改変ＲＮＡは、類似体または天然に存在するＲＮＡの類似体と称することができる。本明細書で使用される場合、「リボ核酸」および「ＲＮＡ」という用語は、ｓｉＲＮＡ、アンチセンスＲＮＡ、一本鎖ＲＮＡ、マイクロＲＮＡ、ｍＲＮＡ、非コードＲＮＡ、および多価ＲＮＡを含む、少なくとも１つのリボヌクレオチド残基を含有する分子を指す。
【０２５５】
「試料」または「生体試料」という用語は、その組織、細胞、または成分部分のサブセット（例えば、血液、粘液、リンパ液、滑液、脳脊髄液、唾液、羊水、羊膜血、尿、膣液、および精液が挙げられるがしかしこれらに限定されない体液）を指す。試料は、例えば、血漿、血清、脊髄液、リンパ液、皮膚、呼吸器、腸、および生殖器管の外部切片、涙、唾液、乳、血液細胞、腫瘍、臓器が挙げられるがしかしこれらに限定されない、全生物体、またはその組織、細胞、もしくは成分部分のサブセット、またはその画分もしくは部分から調製された均質物、溶解物、または抽出物をさらに含んでもよい。試料はさらに、タンパク質または核酸分子などの細胞成分を含有し得る栄養ブロスまたはゲルなどの培地を指す。
【０２５６】
「有意な（ｓｉｇｎｉｆｉｃａｎｔ）」または「有意に（ｓｉｇｎｉｆｉｃａｎｔｌｙ）」という用語は、「実質的に（ｓｕｂｓｔａｎｔｉａｌｌｙ）」という用語と同義で使用される。
【０２５７】
「単回単位用量」という語句は、１回の用量／一回／単一の経路／単一の接触点、すなわち、単一の投与事象で投与される任意の治療薬の用量である。
【０２５８】
「ｓｉＲＮＡ」という用語または低分子干渉ＲＮＡは、時として短干渉ＲＮＡまたはサイレンシングＲＮＡとして知られており、典型的に、ｍｉＲＮＡと類似した１８～２７塩基対の長さの二本鎖ＲＮＡ非コードＲＮＡ分子のクラスを指し、ＲＮＡ干渉（ＲＮＡｉ）経路内で作動する。これは、転写後にｍＲＮＡを分解し、それによって翻訳を防止することによって相補的ヌクレオチド配列を有する特定の遺伝子の発現と干渉する。
【０２５９】
溶媒和物という用語は、本開示の化合物と１つ以上の溶媒分子との物理的会合を意味する。この物理的会合は、水素結合を含む、様々な程度のイオン結合および共有結合を伴う。ある特定の事例では、溶媒和物は、例えば、１つ以上の溶媒分子が結晶性固体の結晶格子に組み込まれるときに、単離する能力を有する。「溶媒和物」は、溶液相および単離可能な溶媒和物の両方を包含する。好適な溶媒和物の非限定的な例としては、エタノール酸塩、メタノール酸塩などが挙げられる。
【０２６０】
「分割用量」という用語は、単回単位用量または総１日用量を２回以上の用量に分割することである。
【０２６１】
「安定」という用語は、反応混合物から有用な純度までの単離に耐えるのに十分に堅牢

であり、好ましくは有効な治療剤に製剤化することができる化合物を指す。

【０２６２】

「安定化する（ｓｔａｂｉｌｉｚｅ）」、「安定化した（ｓｔａｂｉｌｉｚｅｄ）」、「安定化領域（ｓｔａｂｉｌｉｚｅｄ　ｒｅｇｉｏｎ）」という用語は、安定させる、または安定するようになることを意味する。

【０２６３】

「置換」という用語は、水素以外の特定の基による置換、または、例えば、独立して選択される各々が同一であっても異なっていてもよい、１つ以上の基、部分、もしくはラジカルによる置換を意味する。

【０２６４】

「実質的に」という用語は、興味のある特性（ｃｈａｒａｃｔｅｒｉｓｔｉｃ）または特性（ｐｒｏｐｅｒｔｙ）の合計またはほぼ合計の範囲または程度を示す定性的条件を指す。生物学分野の当業者であれば、生物学的現象および化学的現象は、もし存在する場合であっても、完了すること、および／もしくは完全性に進むこと、または絶対的な結果を達成もしくは回避することはほとんどないことを理解するであろう。したがって、本明細書では、多くの生物学的現象および化学的現象に固有の完全性の潜在的な欠如の可能性を捕捉するために、「実質的に」という用語が使用される。

【０２６５】

「実質的に等しい」という語句は、用量間の時間差に関し、用語は、±２％を意味する。

【０２６６】

「実質的に同時に」という語句は、複数の用量に関し、用語は、２秒以内を意味する。

【０２６７】

「に罹患している（ｓｕｆｆｅｒｉｎｇ　ｆｒｏｍ）」という語句は、疾患、障害、および／または状態「に罹患している」個人が、疾患、障害、および／または状態の１つ以上の症状と診断されたか、または疾患、障害、および／または状態の１つ以上の症状を示すことに関連する。

【０２６８】

「感受性」という語句は、疾患、および／または状態に対する「感受性が高い」個人が、疾患、障害、および／または状態は診断されていない、および／または疾患、障害、および／または状態の症状を示さないが、疾患またはその症状を発症する傾向を有する個人に関する。一部の実施形態では、疾患、障害、および／または状態（例えば、がん）に対する感受性が高い個人は、以下のうちの１つ以上によって特徴解析される場合がある：（１）疾患、障害、および／または状態の発症に関連する遺伝子変異、（２）疾患、障害、および／または状態の発症に関連する遺伝子多型、（３）疾患、障害、および／または状態に関連するタンパク質および／もしくは核酸の発現ならびに／または活性の増加および／もしくは減少、（４）疾患、障害、および／または状態の発症に関連する習慣および／またはライフスタイル、（５）疾患、障害、および／または状態についての家族歴、ならびに（６）疾患、障害、および／または状態の発症に関連する微生物への曝露および／または感染。一部の実施形態では、疾患、障害、および／または状態に対して感受性が高い個人は、疾患、障害、および／または状態を発症する。一部の実施形態では、疾患、障害、および／または状態に対して感受性を有する個人は、疾患、障害、および／または状態を発症しない。

【０２６９】

「合成」という用語は、人の手によって生成、調製、および／または製造されることを意味する。本開示のポリヌクレオチドもしくはポリペプチドまたは他の分子の合成は、化学的合成または酵素的合成であってもよい。

【０２７０】

「標的細胞」という用語は、任意の１つ以上の興味のある細胞を指す。細胞は、インビトロ、インビボ、インサイチュー、または生物の組織もしくは器官において見出される場

合がある。生命体は、動物、好ましくは哺乳類、より好ましくはヒト、最も好ましくは患者であってもよい。

【０２７１】

「治療剤」という用語は、対象に投与されたとき、治療効果、診断効果、および／もしくは予防効果を有し、かつ／または所望の生物学的および／もしくは薬理学的効果を誘発する任意の薬剤を指す。

【０２７２】

「治療有効量」という用語は、感染、疾患、障害、および／または状態に罹患しているか、感染、疾患、障害、および／または状態に対して感受性が高い対象に投与された場合、感染、疾患、障害、および／または状態を治療、その症状の改善、診断、予防、および／またはその発症を遅延させるのに十分である、送達される薬剤（例えば、核酸、薬剤、治療剤、診断剤、予防剤など）の量を意味する。

【０２７３】

「治療的に有効な転帰」という用語は、感染、疾患、障害、および／または状態に罹患しているか、または感染、疾患、障害、および／または状態に対して感受性が高い対象において、感染、疾患、障害、および／または状態を治療、その症状の改善、診断、予防、および／またはその発症を遅延させるのに十分である転帰を意味する。

【０２７４】

「総１日用量」という用語は、２４時間の期間に与えられ、または処方される量である。これは、単回単位用量として投与されてもよい。

【０２７５】

「治療」という用語は、特定の感染、疾患、障害、および／または状態の１つ以上の症状または特徴の部分的または完全な軽減、軽快、改善、緩和、その発症の遅延、その進行の阻害、その重症度の低減、および／またはその発生率の低減を指す。例えば、がんの「治療」とは、腫瘍の生存、成長、および／または拡散を阻害することを指す場合がある。治療は、疾患、障害、および／または状態に関連する病理の発症リスクを減少させる目的で、疾患、障害、および／もしくは状態の徴候を示さない対象、ならびに／または疾患、障害、および／または状態の早期の徴候のみを示す対象に投与されてもよい。

【０２７６】

「非修飾」という用語は、いかなる方法であれ変更される前の任意の物質、化合物、または分子を指す。非修飾は、必ずしもではないが、野生型または天然型の生体分子を指す場合がある。分子は、一連の修飾を受けてもよく、それによって、各修飾分子は、その後の修飾のための「非修飾」開始分子として機能してもよい。

【０２７７】

本明細書に記載される化合物は、非対称であってもよい（例えば、１つ以上の立体中心を有する）。別段の指示がない限り、エナンチオマーおよびジアステレオマーなどの全ての立体異性体が意図される。非対称的に置換された炭素原子を含有する本開示の化合物は、光学的活性形態またはラセミ体において単離することができる。光学的活性出発材料から光学的活性形態を調製する方法は、ラセミ混合物の分解能または立体選択的合成によるなど、当該技術分野では公知である。オレフィン、Ｃ＝Ｎ二重結合、およびこれに類するものの多くの幾何異性体も、本明細書に記載される化合物中に存在することができ、本開示ではこのような安定した異性体の全てが意図される。本開示の化合物のシス幾何異性体およびトランス幾何異性体が記載され、異性体の混合物として、または分離された異性体形態として単離されてもよい。

【０２７８】

本開示の化合物はまた、互変異性型も含む。互変異性型は、隣接する二重結合との一重結合のスワッピングおよびプロトンの同時移動からもたらされる。互変異性型は、同じ経験式および総電荷を有する異性体プロトン化状態であるプロトトロピック互変異性体を含む。プロトトロピック互変異性体の例としては、ケトン－エノール対、アミド－イミド酸対、ラクタム－ラクチム対、アミド－イミド酸対、エナミン－イミン対、および環状形態

が挙げられ、プロトンは、１Ｈ－および３Ｈ－イミダゾール、１Ｈ－、２Ｈ－および４Ｈ－１，２，４－トリアゾール、１Ｈ－および２Ｈ－イソインドール、ならびに１Ｈ－および２Ｈ－ピラゾールなどの複素環系の２つ以上の位置を占めることができる。互変異性型は、平衡状態であってもよく、または適切な置換によって１つの形態に立体的に係止されてもよい。

【０２７９】

本開示の化合物はまた、中間化合物または最終化合物で生じる原子の同位体の全ても含む。「同位体」とは、核内の異なる数の中性子からもたらされる、同じ原子数を有するが異なる質量数を有する原子を指す。例えば、水素の同位体は、三重水素および重水素を含む。

【０２８０】

本開示の化合物および塩は、溶媒または水分子と組み合わせて調製されて、日常的な方法によって溶媒和物および水和物を形成することができる。

【０２８１】

「半減期」という用語は、核酸またはタンパク質の濃度または活性などの量が、ある期間の開始時に測定した際のその値の半分に減少するのに必要とされる時間である。

【０２８２】

「インビトロ」という用語は、生命体（例えば、動物、植物、または微生物）の中ではなく、人工的な環境内、例えば、試験管または反応容器内、細胞培養物内、シャーレ内などで生じる事象を指す。

【０２８３】

「インビボ」という用語は、生命体（例えば、動物、植物、もしくは微生物、またはその細胞もしくは組織）の中で生じる事象を指す。

【０２８４】

「モノマー」という用語は、単一の単位、例えば、同じまたは異なるタイプの別の分子と結合してオリゴマーを形成し得る単一の核酸を指す。一部の実施形態では、モノマーは、非固定核酸、すなわち、ＵＮＡモノマーであってもよい。

【０２８５】

「中性脂質」という用語は、選択されたｐＨで非荷電性または中性双性イオン性形態のいずれかで存在する脂質種を意味する。生理的ｐＨにおいて、かかる脂質としては、例えば、ジアシルホスファチジルコリン、ジアシルホスファチジルエタノールアミン、セラミド、スフィンゴミエリン、セファリン、コレステロール、セレブロシド、およびジアシルグリセロールが挙げられる。

【０２８６】

「非カチオン性脂質」という用語は、両親媒性脂質または中性脂質またはアニオン性脂質を意味し、本明細書に記載される。

【０２８７】

「対象」または「患者」という用語は、例えば、実験、診断、予防、および／または治療目的のために、本開示による組成物が投与されてもよい任意の生命体を指す。典型的な対象としては、動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、非ヒト霊長類、およびヒトなどの哺乳類）および／または植物が挙げられる。

【０２８８】

「翻訳可能」という用語は、「発現可能」という用語と互換的に使用されてもよく、宿主細胞によってポリペプチドに変換されるポリヌクレオチドまたはその一部分の能力を指す。当該技術分野で理解されるように、翻訳は、細胞の細胞質中のリボソームがポリペプチドを生成するプロセスである。翻訳では、メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）は、リボソーム複合体中のｔＲＮＡによって復号されて、特定のアミノ酸鎖またはポリペプチドを産生する。さらに、オリゴマーに関して本明細書において使用される場合、「翻訳可能」という用語は、オリゴマーの少なくとも一部分、例えばオリゴマー配列のコード領域（コード配列またはＣＤＳとしても知られる）が、タンパク質またはその断片に変換される能

力を有することを意味する。

【０２８９】

治療的に有効な転帰：本明細書で使用される場合、「治療的に有効な転帰」という用語は、感染、疾患、障害、および／または状態に罹患しているか、または感染、疾患、障害、および／または状態に対して感受性が高い対象において、感染、疾患、障害、および／または状態を治療、その症状の改善、診断、予防、および／またはその発症を遅延させるのに十分である転帰を意味する。

【０２９０】

「単位用量」という用語は、所定量の活性成分を含む医薬組成物の個別の量を指す。活性成分の量は、概して、対象に投与されることになる活性成分の用量、および／またはそのような用量の１／２または１／３が挙げられるが、しかしこれらに限定されない、そのような用量の好都合な画分と等しくてもよい。

【０２９１】

「対照」または「対照実験」は、その明白な通常の意味に従って使用され、実験の手順、試薬、または変数の省略を除いて、実験の対象または試薬が並行実験のように処理される実験を指す。一部の事例では、対照は、実験の効果を評価する際の比較の基準として使用される。

【０２９２】

本開示は、ある特定の実施形態に関連して記載されており、多くの詳細が例示の目的で説明されているが、本開示は、追加の実施形態を含み、本明細書に記載される詳細の一部は、本開示から逸脱することなく大幅に変化する場合があることが、当業者には明らかであろう。本開示は、このような追加の実施形態、修飾、および均等物を含む。特に、本開示は、様々な例示的な構成要素および実施例の特徴、用語、または要素の任意の組み合わせを含む。

【０２９３】

実施形態

実施形態１。実施形態１．核酸を含有する脂質組成物であって、ペプチド－脂質コンジュゲートを含む、脂質組成物。

実施形態２。ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチドが、約４個～約５２個のアミノ酸からなる、実施形態１に記載の脂質組成物。

実施形態３。ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチドが、約８～約５０アミノ酸長である、実施形態１に記載の脂質組成物。

実施形態４。ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチドが、約８～約４４アミノ酸長である、実施形態１に記載の脂質組成物。

実施形態５。ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチドが、約８～約４０アミノ酸長である、実施形態１に記載の脂質組成物。

実施形態６。ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチドが、約８～約３６アミノ酸長である、実施形態１に記載の脂質組成物。

実施形態７。ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチドが、約８～約３２アミノ酸長である、実施形態１に記載の脂質組成物。

実施形態８。ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチドが、約８～約２８アミノ酸長である、実施形態１に記載の脂質組成物。

実施形態９。ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチドが、約８～約２４アミノ酸長である、実施形態１に記載の脂質組成物。

実施形態１０。ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチドが、約８～約２０アミノ酸長である、実施形態１に記載の脂質組成物。

実施形態１１。ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチドが、１２個のアミノ酸からなる、実施形態１に記載の脂質組成物。

実施形態１２。ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチドが、１６個のアミノ酸からなる、実施形態１に記載の脂質組成物。

実施形態１３。ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチドが、２０個のアミノ酸からなる、実施形態１に記載の脂質組成物。
実施形態１４。ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチドが、２４個のアミノ酸からなる、実施形態１に記載の脂質組成物。
実施形態１５。ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチドが、３２個のアミノ酸からなる、実施形態１に記載の脂質組成物。
実施形態１６。ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチド中のアミノ酸の少なくとも約１４％がプロリンである、先行する実施形態のいずれか１つに記載の脂質組成物。
実施形態１７。ペプチド中のアミノ酸の約１４％～約６０％がプロリンである、実施形態１５に記載の脂質組成物。
実施形態１８。ペプチド中のアミノ酸の約２０％～約６０％がプロリンである、実施形態１５に記載の脂質組成物。
実施形態１９。ペプチド中のアミノ酸の約２５％～約６０％がプロリンである、実施形態１５に記載の脂質組成物。
実施形態２０。ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチド中のアミノ酸の少なくとも約２８％～約８０％が親水性側鎖を有する、先行する実施形態のいずれか１つに記載の脂質組成物。
実施形態２１。ペプチド中のアミノ酸の約３５％～約８５％が親水性側鎖を有する、実施形態１～１９のいずれかに記載の脂質組成物。
実施形態２２。ペプチド中のアミノ酸の約３５％～約８０％が親水性側鎖を有する、実施形態１～１９のいずれか１つに記載の脂質組成物。
実施形態２３。ペプチド中のアミノ酸の約４０％～約７５％が親水性側鎖を有する、実施形態１～１９のいずれか１つに記載の脂質組成物。
実施形態２４。ペプチド中のアミノ酸の約４５％～約８５％が親水性側鎖を有する、実施形態１～１９のいずれか１つに記載の脂質組成物。
実施形態２５。ペプチド中のアミノ酸の約５０％～約７５％が親水性側鎖を有する、実施形態１～１９のいずれか１つに記載の脂質組成物。
実施形態２６。親水性側鎖を有するアミノ酸が、グルタミン、グルタミン酸、アスパラギン、アスパラギン酸、セリン、Ｏ－C_{1-6}アルキルセリン、トレオニン、およびＯ－C_{1-6}アルキルトレオニンから選択される、先行する実施形態のいずれか１つに記載の脂質組成物。
実施形態２７。ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチド中のアミノ酸の約４３％未満がグリシンである、先行する実施形態のいずれか１つに記載の脂質組成物。
実施形態２８。ペプチド中のアミノ酸の約３０％未満がグリシンである、実施形態２７に記載の脂質組成物。
実施形態２９。ペプチド中のアミノ酸の約２０％未満がグリシンである、実施形態２７に記載の脂質組成物。
実施形態３０。ペプチド中のアミノ酸の約１０％未満がグリシンである、実施形態２７に記載の脂質組成物。
実施形態３１。ペプチド中のアミノ酸の約５％未満がグリシンである、実施形態２７に記載の脂質組成物。
実施形態３２。ペプチドが、グリシンを有しない、先行する実施形態のいずれか１つに記載の脂質組成物。
実施形態３３。脂質組成物が、リポプレックス、リポソーム、脂質ナノ粒子、ポリマー系担体、エクソソーム、層状体、ミセル、およびエマルションから選択される、先行する実施形態のいずれか１つに記載の脂質組成物。
実施形態３４。リポソームが、カチオン性リポソーム、ナノリポソーム、プロテオリポソーム、単層リポソーム、多層リポソーム、セラミド含有ナノリポソーム、および多小胞リポソームから選択される、実施形態３３に記載の脂質組成物。
実施形態３５。脂質組成物が、脂質ナノ粒子である、実施形態３３に記載の脂質組成物

。

実施形態３６。脂質ナノ粒子が、約２００ｎｍ未満のサイズを有する、実施形態３５に記載の脂質組成物。

実施形態３７。脂質組成物が、１つ以上のカチオン性脂質、１つ以上のヘルパー脂質、およびステロールを含む、先行する実施形態のいずれか１つに記載の脂質組成物。

実施形態３８。ペプチド－脂質コンジュゲートが、脂質組成物中の全ての脂質の約０．１ｍｏｌ％～約１０ｍｏｌ％を含む、先行する実施形態のいずれか１つに記載の脂質組成物。

実施形態３９。ペプチド－脂質コンジュゲートが、脂質組成物中の全ての脂質の約０．５ｍｏｌ％～約５ｍｏｌ％を含む、実施形態３８に記載の脂質組成物。

実施形態４０。ペプチド－脂質コンジュゲートが、脂質組成物中の全ての脂質の約１．０ｍｏｌ％～約３ｍｏｌ％を含む、実施形態３８に記載の脂質組成物。

実施形態４１。脂質組成物が、核酸を封入する、先行する実施形態のいずれか１つに記載の脂質組成物。

実施形態４２。脂質組成物が、核酸に複合体化される、実施形態１～４０のいずれか１つに記載の脂質組成物。

実施形態４３。ペプチド－脂質コンジュゲートの脂質が、リンカーを介してペプチドにコンジュゲートされる、先行する実施形態のいずれか１つに記載の脂質組成物。

実施形態４４。リンカーが、アミド（－Ｃ（Ｏ）ＮＨ－）、アミノ（－ＮＲ^{N}－）から選択される基を含む構造を有し、式中、Ｒ^{N}が、Ｈ、Ｃ$_{1-6}$アルキル、カルボニル（－Ｃ（Ｏ）－）、カルバメート（－ＮＨＣ（Ｏ）Ｏ－）、尿素（－ＮＨＣ（Ｏ）ＮＨ－）、ジスルフィド（－Ｓ－Ｓ－）、エーテル（－Ｏ－）、スクシニル（－（Ｏ）ＣＣＨ$_{2}$ＣＨ$_{2}$Ｃ（Ｏ）－）、スクシンアミジル（－ＮＨＣ（Ｏ）ＣＨ$_{2}$ＣＨ$_{2}$Ｃ（Ｏ）ＮＨ－）、エーテル、カーボネート（－ＯＣ（Ｏ）Ｏ－）、スクシノイル、リン酸エステル（－Ｏ－（Ｏ）ＰＯＨ－Ｏ－）、およびスルホン酸エステルから選択される、実施形態４３に記載の脂質組成物。

実施形態４５。ペプチド－脂質コンジュゲートの脂質が、ジデシルオキシプロピル（Ｃ$_{10}$）、ジラウリルオキシプロピル（Ｃ$_{12}$）、ジミリスチルオキシプロピル（Ｃ$_{14}$）、ジパルミチルオキシプロピル（Ｃ$_{16}$）、またはジステアリルオキシプロピル（Ｃ$_{18}$）、１，２－ジパルミチルオキシプロピル－３－アミン（ＤＯＭＧ）、１，２－ジミリスチルオキシプロピルアミン（ＤＭＧ）、１，２－ジラウロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホリルエタノールアミン（ＤＬＰＥ）、ジミリストイル－ホスファチジルエタノールアミン（ＤＭＰＥ）、ジパルミトイル－ホスファチジルエタノールアミン（ＤＰＰＥ）、ジパルミトイルホスファチジルコリン（ＤＰＰＣ）、ジオレオイル－ホスファチジルエタノールアミン（ＤＯＰＥ）、ジステアロイル－ホスファチジルエタノールアミン（ＤＳＰＥ）、およびコレステロールまたはコレステロール誘導体から選択される、先行する実施形態のいずれか１つに記載の脂質組成物。

実施形態４６。ペプチドが、そのＣ末端でペプチド－脂質コンジュゲートの脂質にコンジュゲートされ、かつペプチドのＮ末端のアミノ基が、１つまたは２つのＣ$_{1-6}$アルキル基またはアミド基で置換される、先行する実施形態のいずれか１つに記載の脂質組成物。

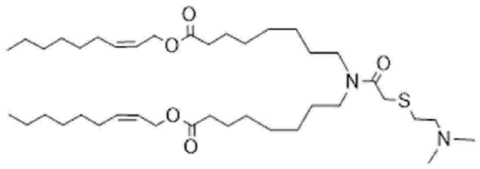
実施形態４７。ペプチドが、そのＮ末端でペプチド－脂質コンジュゲートの脂質にコンジュゲートされ、かつペプチドのＣ末端のアミノ酸が、アルキル化されてＣ$_{1-6}$アルキルエステルを形成するか、またはアミド化される、実施形態１～４５のいずれか１つに記載の脂質組成物。

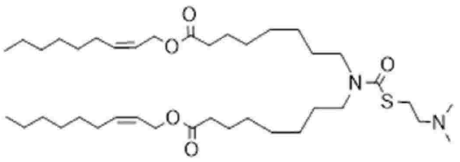
実施形態４８。５－カルボキシスペルミルグリシンジオクタデシルアミド（ＤＯＧＳ）、２，３－ジオレイルオキシ－Ｎ［２（スペルミン－カルボキサミド）エチル］－Ｎ，Ｎ－ジメチル－１－プロパンアミニウム（ＤＯＳＰＡ）、１，２－ジオレオイル－３－ジメチルアンモニウムプロパン－（ＤＯＤＡＰ）、１，２－ジオレオイル－３－トリメチルアンモニウム－プロパン（ＤＯＴＡＰ）、１，２－ジステアリルオキシ－Ｎ，Ｎ－ジメチル

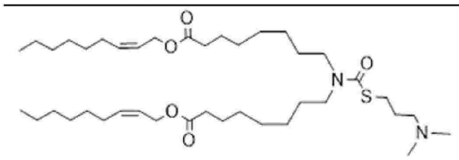
－３－アミノプロパン（ＤＳＤＭＡ）、１，２－ジオレイルオキシ－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－アミノプロパン（ＤＯＤＭＡ）、１，２－ジリノレイルオキシ－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－アミノプロパン（ＤＬｉｎＤＭＡ）、１，２－ジリノレニルオキシ－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－アミノプロパン（ＤＬｅｎＤＭＡ）、Ｎ－ジオレイル－Ｎ，Ｎ－ジメチルアンモニウムクロリド（ＤＯＤＡＣ）、Ｎ，Ｎ－ジステアリル－Ｎ，Ｎ－ジメチルアンモニウムブロミド（ＤＤＡＢ）、Ｎ－（１，２－ジミリチルオキシプロパ－３－イル）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－Ｎ－ヒドロキシエチルアンモニウムブロミド（ＤＭＲＩＥ）、３－ジメチルアミノ－２－（コレスト－５－エン－３－ベーター－オキシブタン－４－オキシ）－１－（シス，シス－９，１２－ｏｃ－タデカジエンオキシ）プロパン（ＣＬｉｎＤＭＡ）、２－［５’－（コレスト－５－エン－３－ベーター－オキシ）－３’－オキサペントキシ）－３－ジメチル１－１－（シス，シス－９’，１－２’－オクタデカジエンオキシ）プロパン（ＣｐＬｉｎＤＭＡ）、Ｎ，Ｎ－ジメチル－３，４－ジオレイルオキシベンジルアミン（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（ＤＯｃａｒｂＤＡＰ）、２，３－ジリノレオイルオキシ－Ｎ，Ｎ－ジメチルプロピルアミン（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（ＤＬｉｎｃａｒｂＤＡＰ）、１，２－ジリノレオイルカルバミル－３－ジメチルアミノプロパン（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（ＤＬｉｎ－Ｋ－ＤＭＡ）、および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）から選択される、１つ以上のカチオン性脂質をさらに含む、実施形態３７～４７のいずれか１つに記載の脂質組成物。

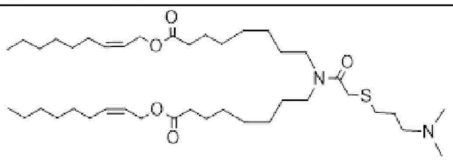
実施形態４９。以下

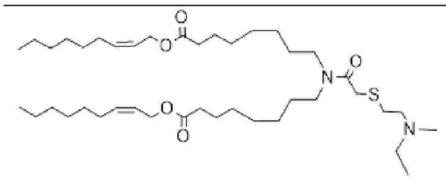
【化９－１】

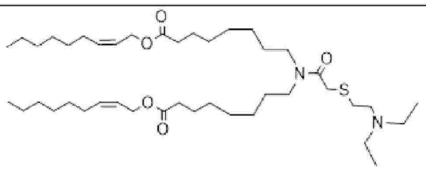

ＡＴＸ－００１

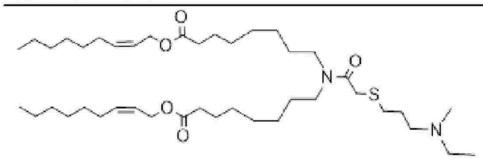

ＡＴＸ－００２

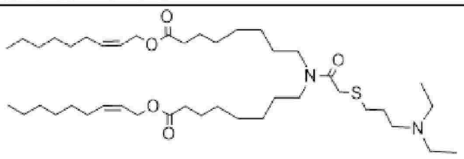

ＡＴＸ－００３

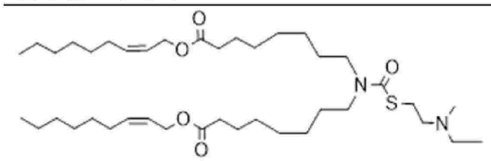

ＡＴＸ－００４

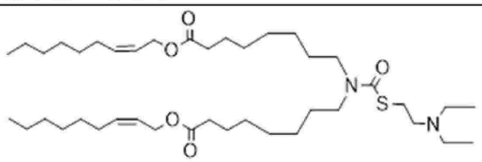

ＡＴＸ－００５

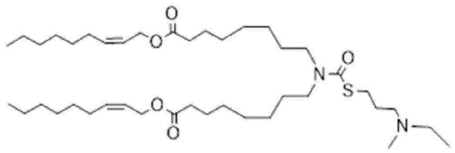

ＡＴＸ－００６

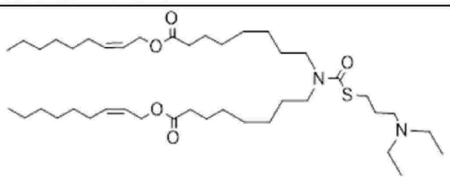

ＡＴＸ－００７

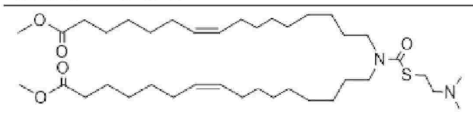

ＡＴＸ－００８

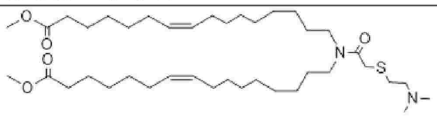

ＡＴＸ－００９

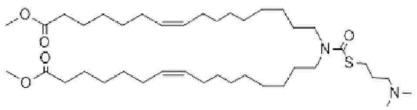

ＡＴＸ－０１０

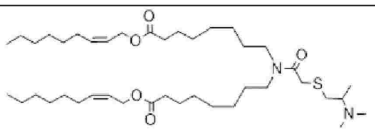

ＡＴＸ－０１１


ＡＴＸ－０１２

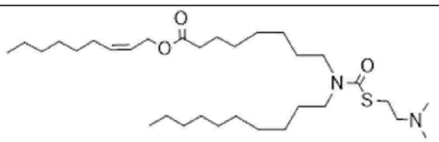
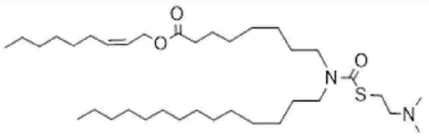
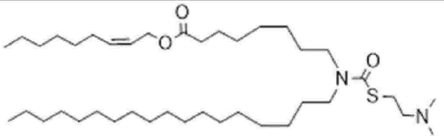
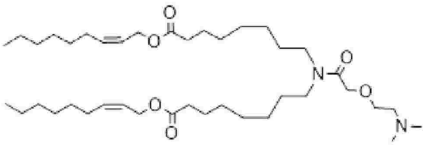
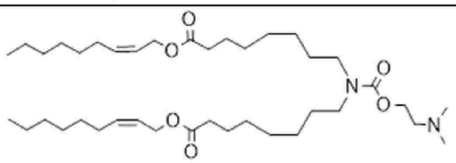
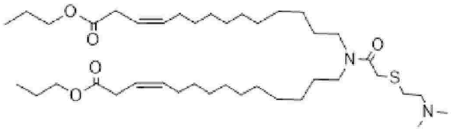
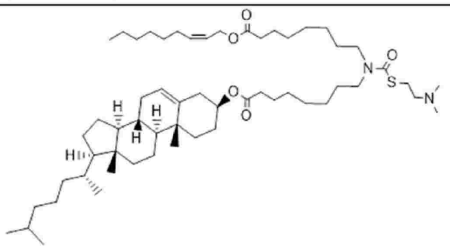
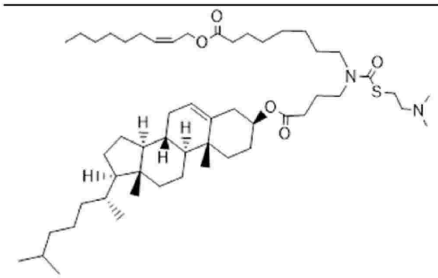
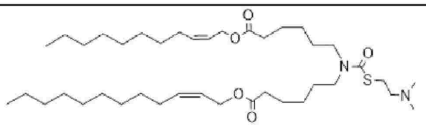
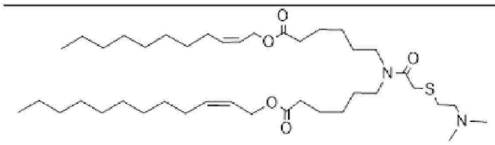
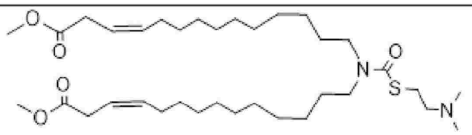
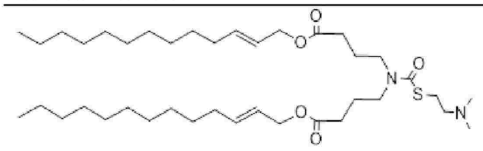
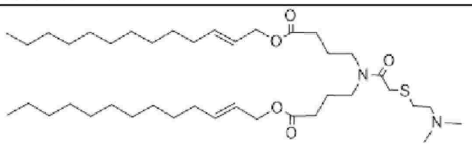

ＡＴＸ－０１３


ＡＴＸ－０１４

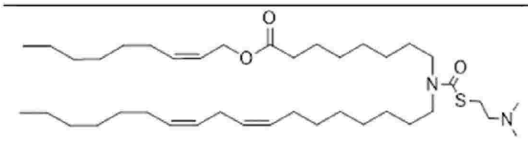

ＡＴＸ－０１５


ＡＴＸ－０１６

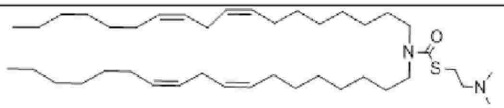
【化９－２】

	
	ＡＴＸ－０１８
	
ＡＴＸ－０１９	ＡＴＸ－０２０
	
ＡＴＸ－０２１	ＡＴＸ－０２２
	
ＡＴＸ－０２３	ＡＴＸ－０２４
	
ＡＴＸ－０２５	ＡＴＸ－０２６
	
ＡＴＸ－０２７	ＡＴＸ－０２８
	
ＡＴＸ－０２９	ＡＴＸ－０３０

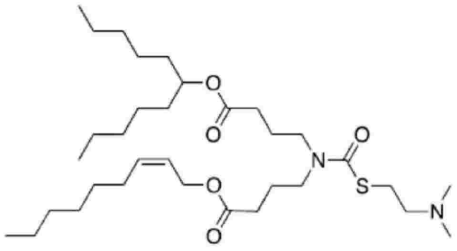
【化９－３】



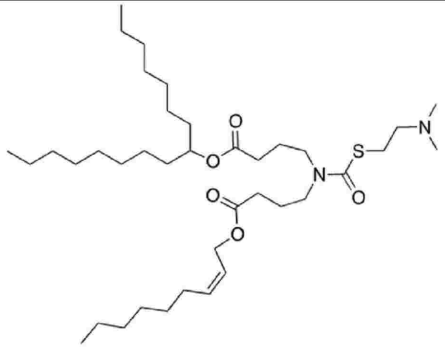
ＡＴＸ－０３１



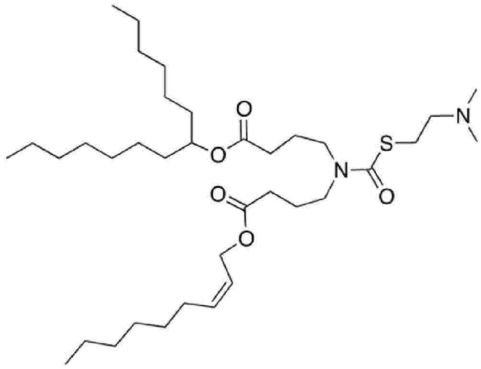
ＡＴＸ－０３２



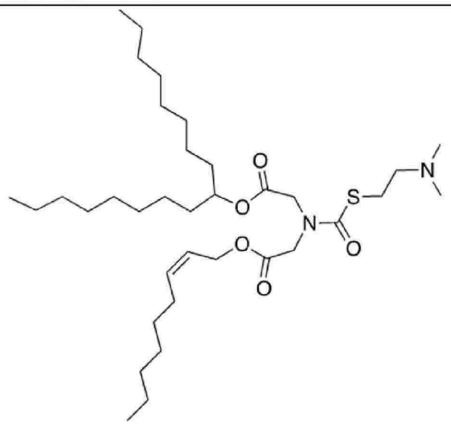
ＡＴＸ－４３



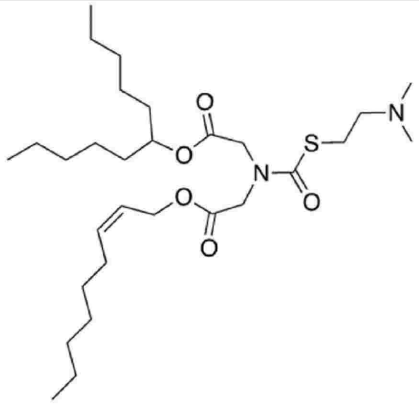
ＡＴＸ－０５７



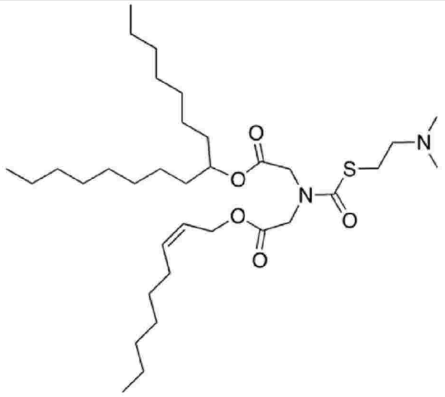
ＡＴＸ－０５８



ＡＴＸ－０６１

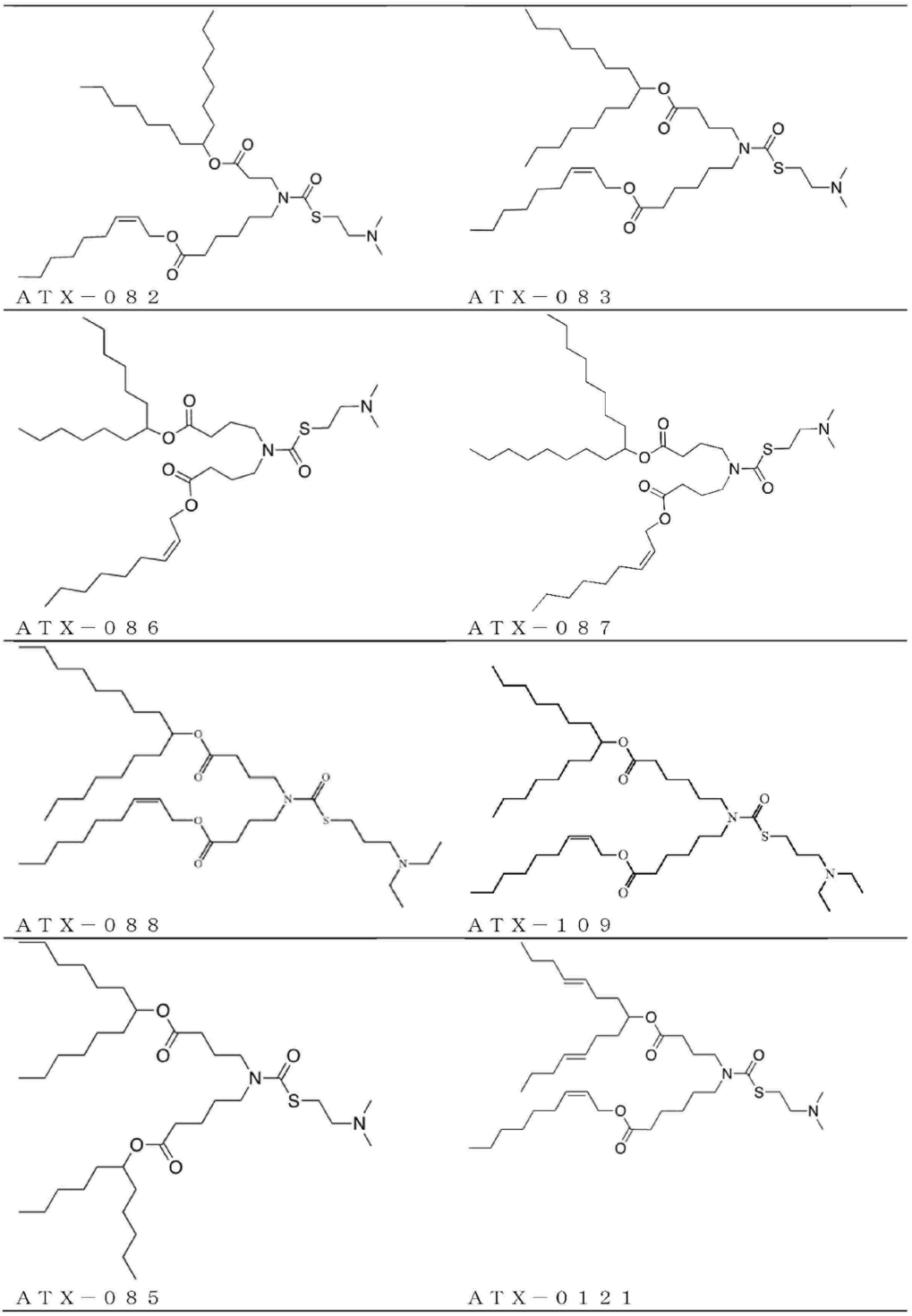


ＡＴＸ－０６３

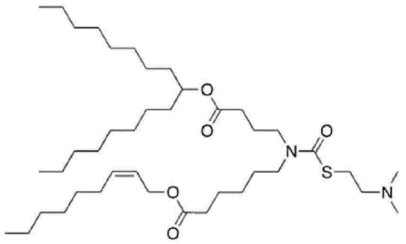
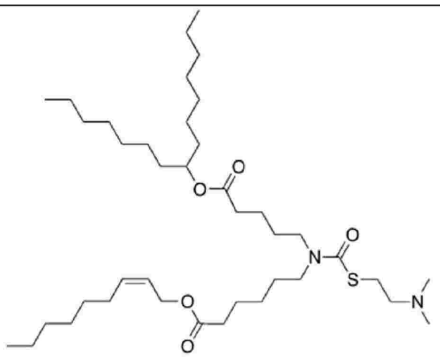
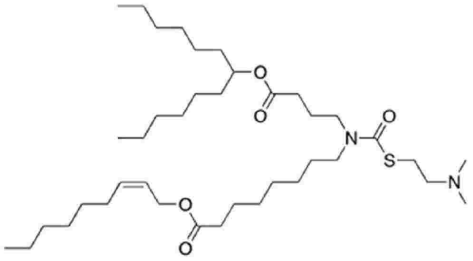
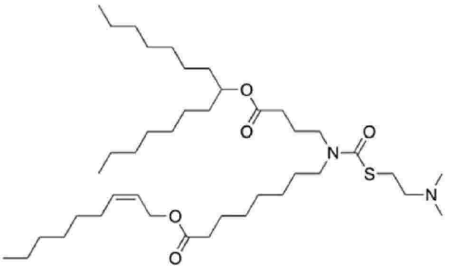
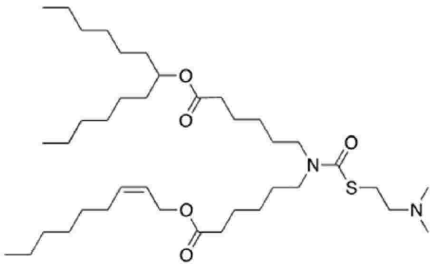
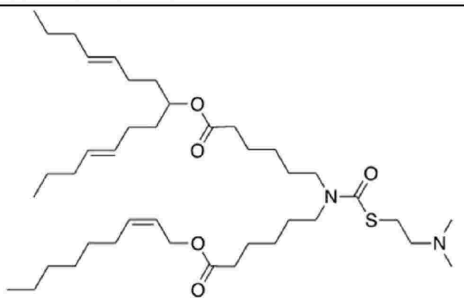
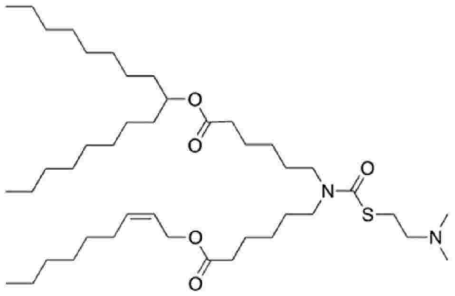
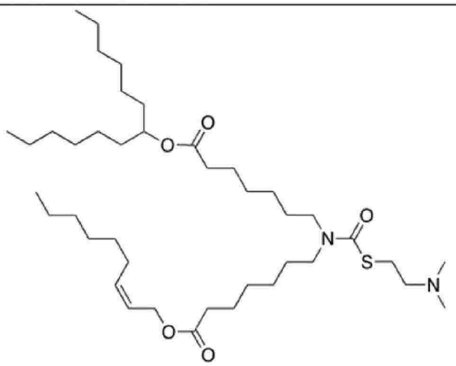


ＡＴＸ－０６４

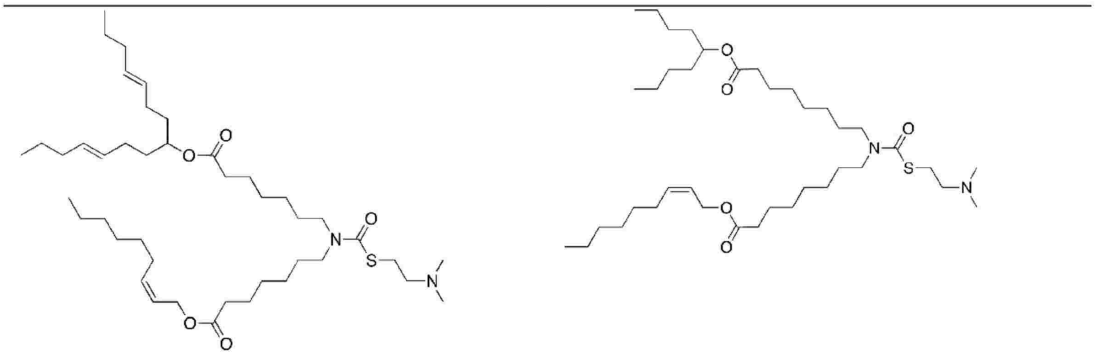
【化９－４】



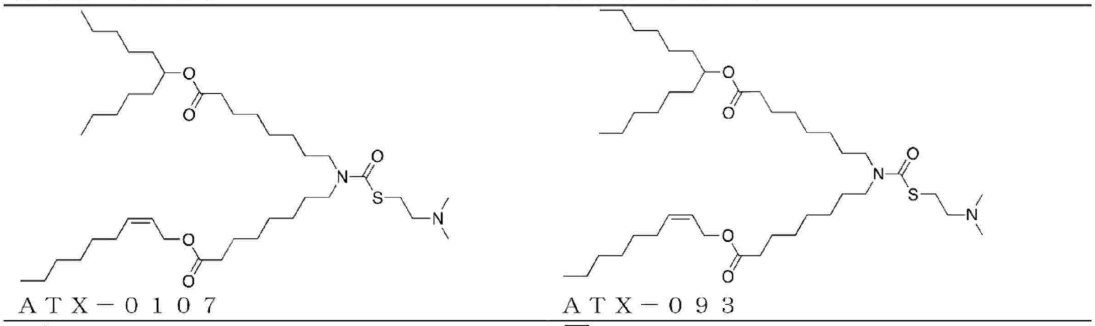
【化９－５】

	
ＡＴＸ－０９１	ＡＴＸ－０１０２
	
ＡＴＸ－０９８	ＡＴＸ－０９２
	
ＡＴＸ－０８４	ＡＴＸ－０１２５
	
ＡＴＸ－０９４	ＡＴＸ－０１１０

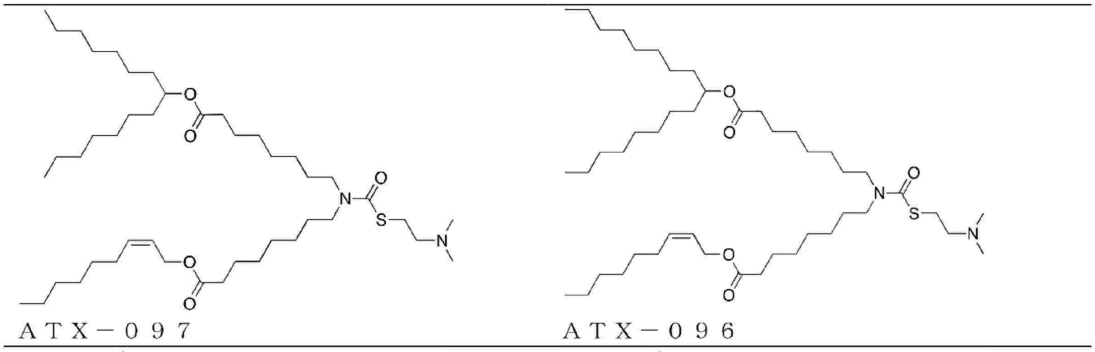
【化９－６】


ＡＴＸ－０１１８

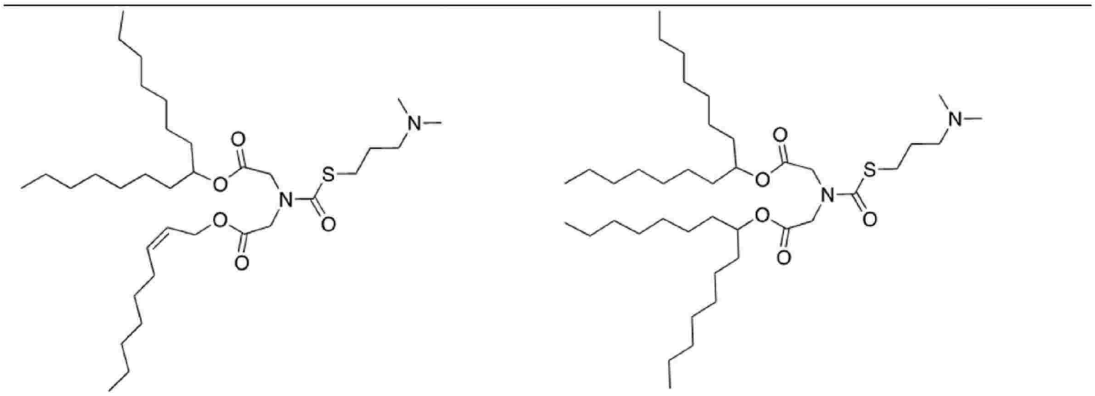
ＡＴＸ－０１０８


ＡＴＸ－０１０７

ＡＴＸ－０９３

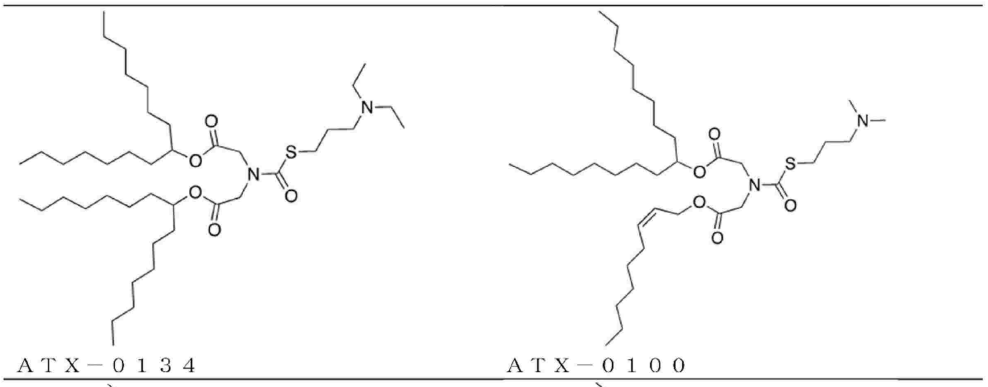

ＡＴＸ－０９７

ＡＴＸ－０９６

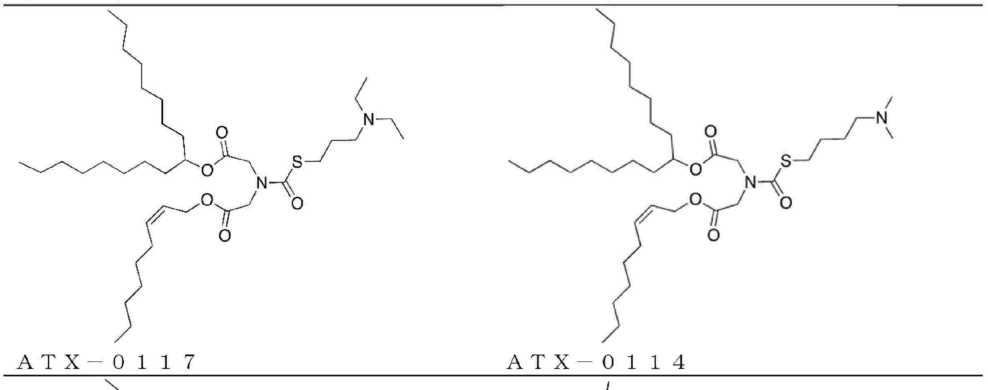

ＡＴＸ－０１１１

ＡＴＸ－０１３２

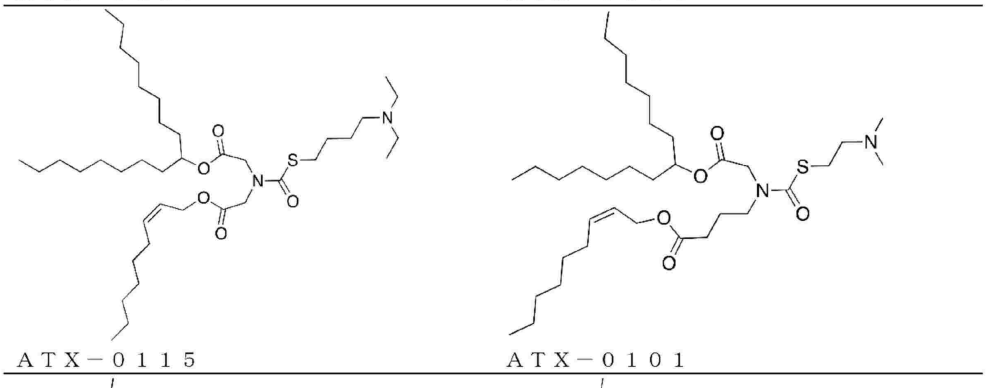
【化９－７】


ＡＴＸ－０１３４

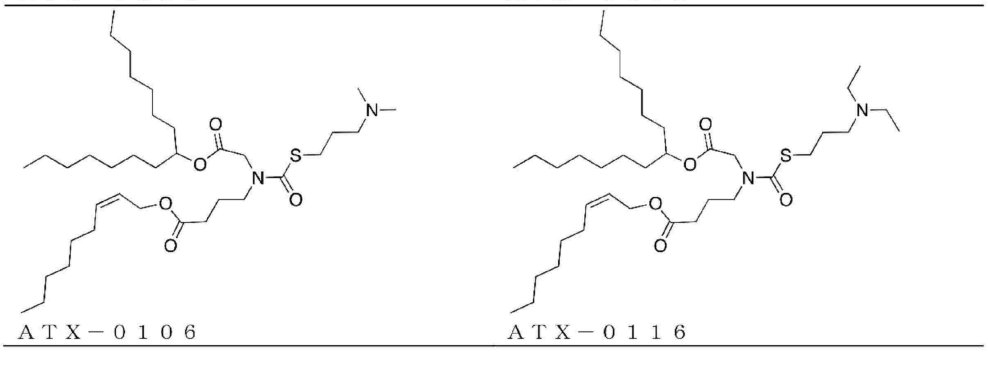
ＡＴＸ－０１００


ＡＴＸ－０１１７

ＡＴＸ－０１１４

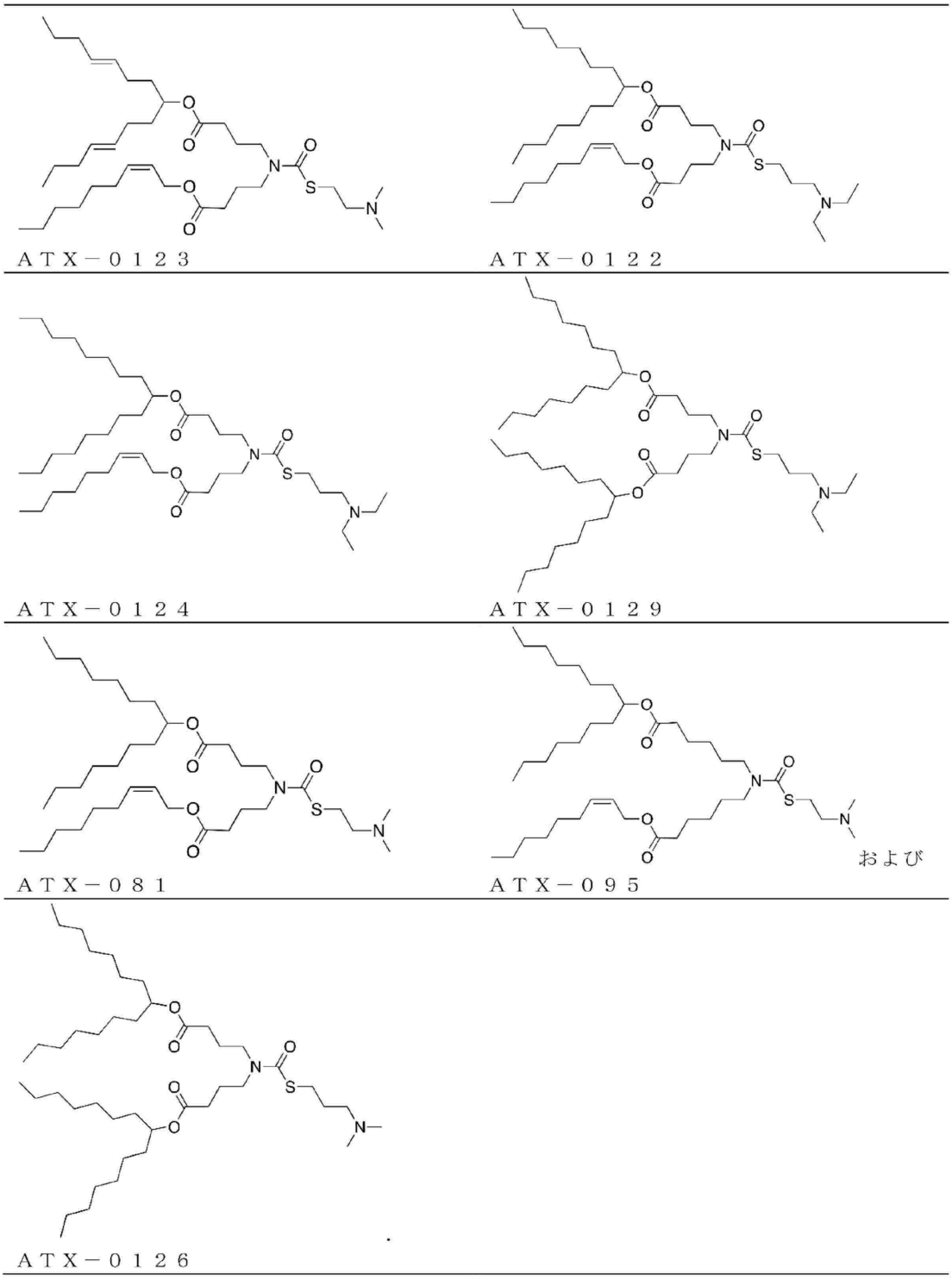

ＡＴＸ－０１１５

ＡＴＸ－０１０１


ＡＴＸ－０１０６

ＡＴＸ－０１１６

【化９－８】



から選択されるイオン性カチオン性脂質をさらに含む、実施形態３７～４７のいずれか１つに記載の脂質組成物。

実施形態５０。１つ以上のヘルパー脂質をさらに含む、実施形態１～４９のいずれか１つに記載の脂質組成物。

実施形態５１。ペプチド－脂質コンジュゲートおよび核酸を含む脂質組成物であって、

ａ．ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチドは、約４個～約５２個のアミノ酸からなり、

ｂ．ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチド中のアミノ酸の少なくとも約１４％がプロリンであり、

ｃ．ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチド中のアミノ酸の約２８％～約８０％が親水性側鎖を有し、
ｄ．ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチド中のアミノ酸の約４３％未満がグリシンであり、
ｅ．脂質組成物は、１つ以上のカチオン性脂質、１つ以上のヘルパー脂質、およびステロールを含み、
ｆ．ペプチド－脂質コンジュゲートは、脂質組成物中の全ての脂質の約０．１ｍｏｌ％～約１０ｍｏｌ％を含む、脂質組成物。
実施形態５２。核酸が、ｓｉＲＮＡ、アンチセンスオリゴヌクレオチド、ＵＮＡオリゴマー、ｍＲＮＡ、マイクロＲＮＡ、およびＤＮＡから選択される、実施形態１～５１のいずれか１つに記載の脂質組成物。
実施形態５３。核酸がｍＲＮＡである、実施形態５２に記載の脂質組成物。
実施形態５４。ｍＲＮＡが、自己複製ｍＲＮＡである、実施形態５３に記載の脂質組成物。
実施形態５５。核酸がｓｉＲＮＡである、実施形態５２に記載の脂質組成物。
実施形態５６。ペプチドが１２個のアミノ酸からなる、実施形態５１～５５のいずれか１つに記載の脂質組成物。
実施形態５７。ペプチドが１６個のアミノ酸からなる、実施形態５１～５５のいずれか１つに記載の脂質組成物。
実施形態５８。ペプチドが２０個のアミノ酸からなる、実施形態５１～５５のいずれか１つに記載の脂質組成物。
実施形態５９。ペプチドが２４個のアミノ酸からなる、実施形態５１～５５のいずれか１つに記載の脂質組成物。
実施形態６０。ペプチドが２８個のアミノ酸からなる、実施形態５１～５５のいずれか１つに記載の脂質組成物。
実施形態６１。ペプチドが３２個のアミノ酸からなる、実施形態５１～５５のいずれか１つに記載の脂質組成物。
実施形態６２。先行する実施形態のいずれか１つに記載の脂質組成物を対象に投与することを含む、それを必要とする対象における疾患を治療する方法。
実施形態６３。細胞を実施形態５３または５４に記載の脂質組成物と接触させることを含む、細胞において興味のあるタンパク質またはポリペプチドを発現する方法。
実施形態６４。実施形態５３または５４に記載の脂質組成物を含むワクチン。
実施形態６５。実施形態６４に記載のワクチンを対象に投与することを含む、対象において免疫応答を誘発する方法。
実施形態６６。細胞を実施形態５５に記載の脂質組成物と接触させることを含む、細胞において興味のある遺伝子またはメッセンジャーＲＮＡの発現を阻害する方法。
実施形態６７。実施形態５３に記載の脂質組成物を対象に投与することを含む、興味のあるタンパク質またはポリペプチドが欠損している対象において興味のあるタンパク質またはポリペプチドを発現する方法であって、ｍＲＮＡが興味のあるタンパク質またはポリペプチドをコードする、方法。
実施形態６８。細胞を実施形態５３に記載の脂質組成物と接触させることを含む、細胞中の遺伝子を編集する方法であって、ｍＲＮＡが、遺伝子編集酵素をコードする、方法。
実施形態６９。遺伝子編集酵素がＴＡＬＥＮ酵素である、実施形態６８に記載の方法。
実施形態７０。細胞を実施形態１～６１のいずれか１つに記載の脂質組成物と接触させることを含む、細胞に核酸を送達する方法。
実施形態７１。実施形態１～６１のいずれか１つに記載の脂質組成物を対象に投与することを含む、対象における疾患を予防する方法。
実施形態７２。投与が、静脈内または筋肉内である、実施形態６２、６５、６７、または７１のいずれか１つに記載の方法。
実施形態７３。細胞を実施形態１～６１のいずれか１つに記載の脂質組成物と接触させ

ることを含む、細胞を撮像する方法であって、核酸が検出可能なタンパク質をコードする、方法。
実施形態７４。
ｉ）脂質核酸をペプチド－脂質コンジュゲートと接触させることと、
ｉｉ）ペプチド－脂質コンジュゲートが核酸を封入することを可能にすることと、を含む、実施形態１～６１のいずれか１つに記載の脂質組成物を作製する方法。
【実施例】
【０２９４】
本開示は、以下の実施例でさらに記載されているが、これは特許請求の範囲に記載される本開示の範囲を限定しない。
【０２９５】
実施例１：ペプチドの合成およびペプチド－脂質コンジュゲートの例
ペプチド合成
一般的に、ペプチドは、標準的なＮ－（９－フルオレニルメトキシカルボニルオキシ）（Ｆｍｏｃ）保護基（Ｂ）化学を使用してペプチド合成装置上で合成され、ＨＰＬＣを用いてＣ１８カラム上で精製された。簡潔に述べると、Ｆｍｏｃ保護アミノ酸、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｕ（ＯｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｐｒｏ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｓｅｒ（ｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｔｈｒ（ｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｓｅｒ（Ｍｅ）－ＯＨ、ＦｍｏｃＴｈｒ（Ｍｅ）－ＯＨをビルディングブロック試薬として使用し、またＮ，Ｎ－ジメチルホルムアミド、アセトニトリル、ジエチルエーテル、およびジクロロメタンを様々な工程のための選択した溶媒として使用して、固相ペプチド合成プロトコルに従い、Ｐｒｅｌｕｄｅ　Ｘペプチド合成装置（Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｉｎｃ．、アリゾナ州ツーソン）上で直線的な様式でペプチド合成を実施した。まず、Ｆｍｏｃ－Ｐｒｏ－ＯＨを２－ＣｌＴｒｉｔｙｌ樹脂（樹脂に対して０．６当量、Ｎ，Ｎ－ジイソプロピルエチルアミン（ＤＩＥＡ）に対しては４当量）にロードした。次いで、２０％ピペリジン（２×５分間）を使用して、Ｆｍｏｃを脱保護した。続いて、７．５当量の所望のＦｍｏｃ－ＡＡ、ＨＣＴを活性化剤としてカップリングし、１５当量の　ＮＮＭを塩基としてカップリングした。２５分および２０分の間、二重カップリングアプローチを使用して、完全なカップリングを確実にした。Ｆｍｏｃ脱保護および二重カップリング工程を、全てのアミノ酸について、および所望のペプチドが合成されるまで繰り返した。樹脂上の各ペプチドを乾燥させ、体積基準で９０％ＴＦＡ、５％チオアニソール、２．５％Ｈ２Ｏ、１．５％エタンジチオール、および１％フェノールのカクテルを使用して、周囲温度で２時間、樹脂から切断した。さらに、各ペプチドを、２５０×２１．２ｍｍサイズのＪｕｐｉｔｅｒ　１０ｕ　Ｐｒｏｔｅｏカラム（Ｐｈｅｎｏｍｅｎｅｘ、カリフォルニア州トランス）を使用して逆相高速液体クロマトグラフィー（ＲＰ－ＨＰＬＣ）で精製した。Ｈ２Ｏ中の０．１％ＴＦＡの溶媒Ａおよび８０％アセトニトリル中の０．１％ＴＦＡの溶媒Ｂの移動相を、２０分以内に１８％～３８％の移動相Ｂの勾配で使用した。流量１５ｍｌ／分およびＵＶ検出波長２１４ｎｍを使用した。主要生成物含有画分を分析し、プールし、溶媒を除去して純粋なペプチドを得た。
【０２９６】
ペプチドからペプチド－脂質コンジュゲートを形成するために、各ペプチドを、Ｎ末端アミンにおいて（Ｒ）－２，３－ビス（テトラデカノイルオキシ）プロピル（２，５－ジオキソピロリジン－１－イル）コハク酸塩（以下の化合物３）とカップリングさせて、最終的なＤＭＧ－ＳＡ－ペプチドコンジュゲートを得た。簡潔に述べると、上記で得られた直鎖ペプチドおよびＤＭＧ－ＳＡ－ＮＨＳ（Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド）（式１：１．２）を、２当量のＤＩＥＡ存在下で一晩、ＤＭＦ（ジメチルホルムアミド）中に溶解する。次いで、形成された生成物（ＤＭＧ－ＳＡ－ペプチド）を冷エーテル中で沈殿させた。これらのコンジュゲートをＣ８カラムでさらに精製し、Ｌａｂｃｏｎｃｏ凍結乾燥器（ミズーリ州カンザスシティ）上で、いかなる追加的な添加物もなしで－８０℃で凍結乾燥して、純粋な生成物を白色粉末として得た。最終的な収率は約６０～８０％の範囲であっ

た。本実施例に記載されるこのカップリング反応およびコンジュゲートされた脂質は、本開示のコンジュゲートされたペプチドの概念の証明を提供するために選ばれ、また当業者であれば、本開示のペプチドとのコンジュゲーションのための当該技術分野で公知の他の好適なカップリング反応および脂質を認識するであろう。加えて、ペプチドをそのＣ末端において、またはアミノ酸側鎖のうちの１つでカップリングするための方法は、当技術分野で周知である。

【０２９７】

この研究で作製されたペプチドの例を以下の表１にリストする。

【表１】

表１：合成されたペプチドの例

ペプチド－脂質コンジュゲート参照	配列（Ｎ末端からＣ末端方向で）	分子量
ペプチド２	X-STEPSTEPSTEPSTEP-OH	2270.13
ペプチド３	X-STEPSTEPSTEPSTEPSTEP-OH	2684.55
ペプチド３	X-S(Me)T(Me)QPS(Me)T(Me)QPS(Me)T(Me)QPS(Me)T(Me)QP-OH	2378.21
ペプチド６	X-S(Me)T(Me)QPS(Me)T(Me)QPS(Me)T(Me)QPS(Me)T(Me)QPS(Me)T(Me)QP-OH	2819.65
ペプチド７	X-STEPSTEPSTEPSTEP-NH_2	2269.14
ペプチド８	X-S(Me)T(Me)QPS(Me)T(Me)QPS(Me)T(Me)QPS(Me)T(Me)QP-NH_2	2377.22

Ｘ＝下記のスキーム１の化合物３のカップリング後のコンジュゲートされた脂質
Ｓ＝セリン
Ｔ＝トレオニン
Ｅ＝グルタミン酸
Ｐ＝プロリンであり、Ｐ－ＯＨはプロリンを表し、またＰ－$ＮＨ_2$はプロリンアミドを表し、これをＣ末端において負電荷をマスキングするために使用した。
Ｓ（Ｍｅ）＝メチルセリン
Ｔ（Ｍｅ）＝メチルトレオニン
Ｑ＝グルタミン

【０２９８】

ＤＭＧ－ペプチドコンジュゲートの合成

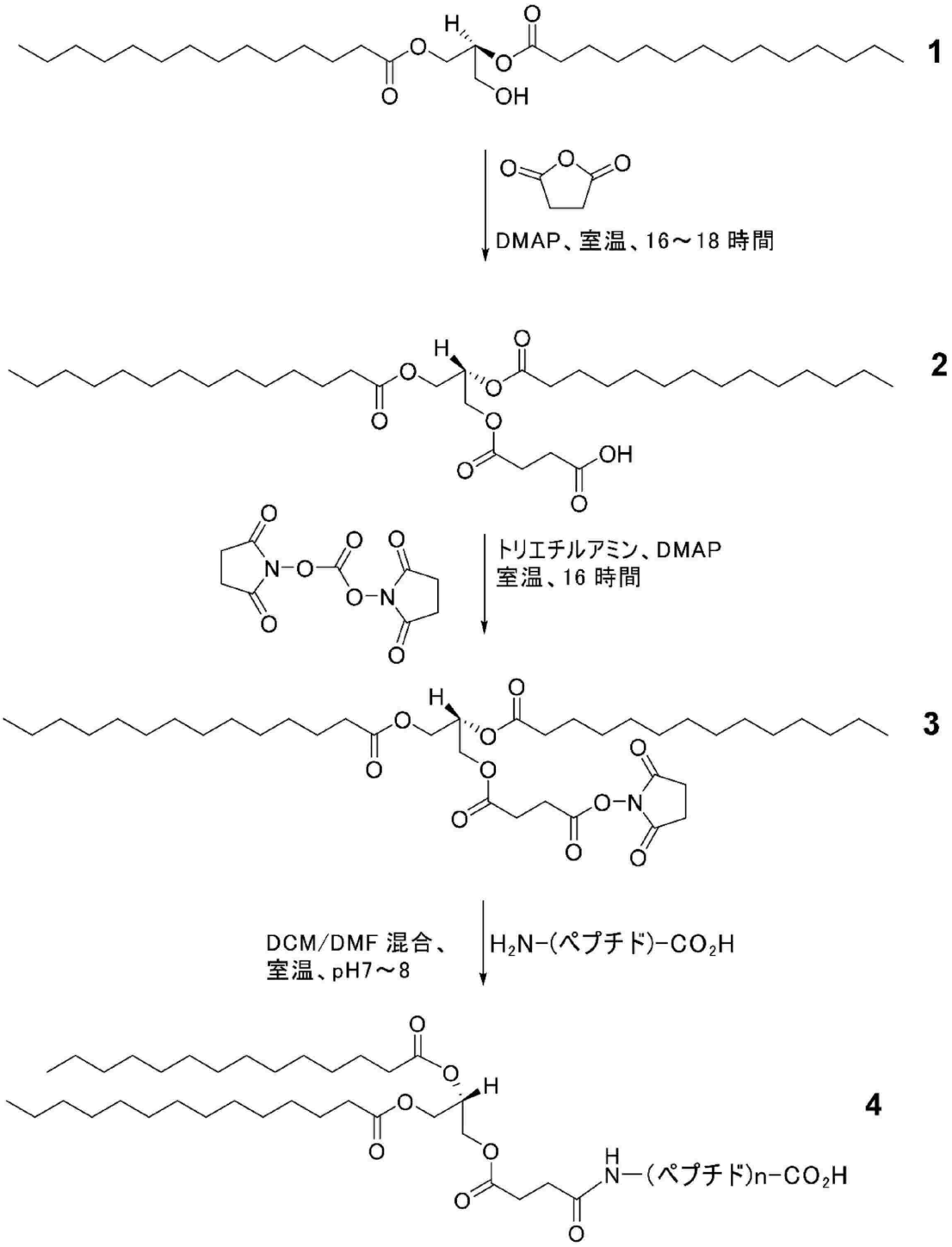
ペプチド－脂質コンジュゲートの例を、本明細書に記載の合成スキーム１に従って、脂質化合物（Ｒ）－２，３－ビス（テトラデカノイルオキシ）プロピル（２，５－ジオキソピロリジン－１－イル）コハク酸塩の例（群３）にコンジュゲートされた本明細書に記載のペプチドを使用して作製した。

【０２９９】

スキーム１

ＤＭＧ－ペプチドコンジュゲートの合成

【化１０】



【０３００】

ｉ　（Ｒ）－４－（２，３－ビス（テトラデカノイルオキシ）プロポキシ）－４－オキソブタン酸（スキーム１の化合物２）

無水コハク酸（６７０ｍｇ、６．６ｍｍｏｌ）およびＮ，Ｎ－ジメチルアミノピリジン（ＤＭＡＰ、１．０ｇ、８．３ｍｍｏｌ）を、４０ｍＬのジクロロメタン中の（Ｓ）－３－ヒドロキシプロパン－１，２－ジイルジテトラデカノアート（スキーム１の化合物１、２．０５ｇ、４ｍｍｏｌ）の溶液に室温で添加した。この混合物を周囲温度で１６～１８時間撹拌した。１Ｍ塩酸水溶液のアリコート（８．５ｍＬ）を添加して、反応物をクエンチした。混合物を２０ｍＬの水で希釈し、有機層を分離した。水層を別の４０ｍＬのジク

ロロメタンで抽出し、合わせた有機溶液を１Ｍ　ＨＣｌ水溶液（１×１００ｍＬ）で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、減圧下で、回転蒸発器上で濃縮した。得られた半固体を、五酸化リン上で、高真空下で乾燥させて、白色固体として２．４ｇの生成物を得た。ｍ／ｚ　６１２．４６（計算値）Ｍ－Ｈ　６１１．７（観察値）。

【０３０１】

ｉｉ　（Ｒ）－２，３－ビス（テトラデカノイルオキシ）プロピル（２，５－ジオキソピロリジン－１－イル）コハク酸塩（スキーム１の化合物３）

１６０ｍＬのジクロロメタン中の（Ｒ）－４－（２，３－ビス（テトラデカノイルオキシ）プロポキシ）－４－オキソブタン酸（８．８ｇ、２８．７ｍｍｏｌ）、トリエチルアミン（２．９ｇ、１９．６ｍｍｏｌ）、および８０ｍｇのＤＭＡＰの混合物に、スクシンイミジル炭酸塩（５．０４ｇ、１９．６ｍｍｏｌ）を添加し、混合物を室温で１６時間撹拌した。２当量の氷酢酸を添加して、反応物をクエンチした。混合物を、別の１００ｍＬのＤＣＭで希釈し、氷冷水（２×３００ｍＬ）、続いて、ブライン（１×３００ｍＬ）で洗浄した。有機相を分離し、乾燥させ（無水硫酸ナトリウム）、溶媒を減圧下で除去した。残渣を、ジクロロメタン：酢酸エチルの勾配を使用して、８０ｇのＴｅｌｅｄｙｎｅ　ＩＳＣＯシリカゲルカラムで精製した。１０～１２％酢酸エチル濃度で溶出した画分をプールし、減圧下で濃縮して、９ｇの生成物を白色固体として得た。ｍ／ｚ　７０９．５（計算値）Ｍ＋Ｎａ　７３２．２（観察値）。

【０３０２】

ｉｉｉ　ＤＭＧ－ＳＡ－（ペプチド）ペプチド合成（スキーム１の化合物４によって例示）

本実施例に記載される各合成ペプチドを、Ｎ末端アミンにおいて（Ｒ）－２，３－ビス（テトラデカノイルオキシ）プロピル（２，５－ジオキソピロリジン－１－イル）コハク酸塩とカップリングして、最終的なＤＭＧ－ＳＡ－（ペプチド）コンジュゲートを得た。これらのコンジュゲートをＣ８カラムでさらに精製し、凍結乾燥させて、純粋な生成物を白色粉末として得た。

【０３０３】

実施例２：脂質ナノ粒子調製のためのプロトコル

本開示のペプチド－脂質コンジュゲートを、核酸－脂質製剤中で試験した。ＦＶＩＩ　ｓｉＲＮＡまたはヒトエリスロポエチン（ｈＥＰＯ）ｍＲＮＡを封入する脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）を、Ｒａｍａｓｗａｍｙ　ｅｔ　ａｌ．（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ　Ｓ　Ａ．２０１７　Ｍａｒ　７；１１４（１０）：Ｅ１９４１－Ｅ１９５０）に記載される方法に従って、脂質のエタノール溶液をＲＮＡの水溶液と混合することによって調製した。簡潔に述べると、脂質賦形剤（本開示のイオン化脂質、ＤＳＰＣ、コレステロール、およびＰＥＧ２０００－ＤＭＧまたはペプチド－脂質コンジュゲート）は、特定のモル比でエタノール中に溶解される。ＲＮＡの水溶液は、ｐＨ３～４のクエン酸緩衝液中で調製される。次いで、脂質混合物を、Ｎａｎｏａｓｓｅｍｂｌｒマイクロ流体システム（Ｐｒｅｃｉｓｉｏｎ　ＮａｎｏＳｙｓｔｅｍｓ、カナダ、ブリティッシュコロンビア州バンクーバー）を使用して、１：３の流量比（Ｖ／Ｖ）でＲＮＡ溶液と組み合わせる。このようにして形成されたナノ粒子は、接線流濾過（ＴＦＦ）プロセスによって精製される。次いで、得られた製剤の濃度を、１００，０００　ＭＷＣＯ　Ａｍｉｃｏｎ　Ｕｌｔｒａ遠心管（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ　Ｓｉｇｍａ）を使用して最終標的ＲＮＡ濃度に調整し、続いて０．２μｍのＰＥＳ滅菌グレードフィルターを通して濾過する。濾過後、バルク製剤を無菌エッペンドルフチューブの中へと無菌的に充填し、－７０±１０℃で凍結する。脂質ナノ粒子の分析的特徴評価には、動的光散乱（ＺＥＮ３６００、Ｍａｌｖｅｒｎ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ）を使用した粒子サイズおよび多分散性の測定、ＲＮＡ含有量、ならびにＲｉｂｏＧｒｅｅｎ　ＲＮＡ試薬（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を使用した蛍光アッセイによる封入効率が含まれる。

【０３０４】

実施例３：第ＶＩＩ因子ノックダウン評価のためのプロトコル

以下にさらに説明されるＦＶＩＩ　ｓｉＲＮＡを含む脂質製剤を、本実施例のプロトコルを使用してノックダウン活性について評価した。ＦＶＩＩ評価では、７～８週齢のメスのＢａｌｂ／ＣマウスをＣｈａｒｌｅｓ　Ｒｉｖｅｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ（カリフォルニア州ホリスター）から購入した。マウスを病原体のない環境で保持し、マウスが関与する全ての手順を、動物実験委員会（ＩＡＣＵＣ）によって確立されたガイドラインに従って行った。第ＶＩＩ因子ｓｉＲＮＡを含有する脂質ナノ粒子を、１０ｍＬ／ｋｇの用量体積および２つの用量レベル（０．０３ｍｇ／ｋｇおよび０．０１ｍｇ／ｋｇ）で静脈内投与した。４８時間後、マウスをイソフルランで麻酔し、０．１０９Ｍクエン酸ナトリウム緩衝液（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、カリフォルニア州サンディエゴ）でコーティングされたＭｉｃｒｏｔａｉｎｅｒ（登録商標）チューブに後眼窩から採血し、血漿に処理した。血漿標本を、第ＶＩＩ因子レベルについて直ちに試験するか、または後の分析のために－８０℃で保存した。血漿中のＦＶＩＩタンパク質の測定を、比色分析Ｂｉｏｐｈｅｎ　ＶＩＩアッセイキット（Ａｎｉａｒａ　Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃａ、米国）を使用して決定した。吸光度を４０５ｎｍで測定し、連続希釈した対照血漿を使用して較正曲線を生成し、生理食塩水で処置した対照動物と比較して、処置した動物からの血漿中の第ＶＩＩ因子のレベルを決定した。

【０３０５】

実施例４：ｈＥＰＯ　ｍＲＮＡ発現評価のためのプロトコル

以下のｈＥＰＯ　ｍＲＮＡを含む脂質製剤を、本実施例のプロトコルに従ってインビボでｈＥＰＯを発現する能力について評価した。全ての動物実験は、機関が承認したプロトコル（ＩＡＣＵＣ）を使用して実施された。このプロトコルでは、少なくとも６～８週齢のメスのＢａｌｂ／ｃマウスをＣｈａｒｌｅｓ　Ｒｉｖｅｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙから購入した。マウスに、ｈＥＰＯ－ＬＮＰを、２つの用量レベルのｈＥＰＯ（０．１および０．０３ｍｇ／ｋｇ）のうちの一つを用いて、尾静脈を介して静脈内注射した。６時間後、血清分離チューブで血液を採取し、遠心分離によって血清を単離した。次いで、ＥＬＩＳＡアッセイ（Ｈｕｍａｎ　Ｅｒｙｔｈｒｏｐｏｉｅｔｉｎ　Ｑｕａｎｔｉｋｉｎｅ　ＩＶＤ　ＥＬＩＳＡ　Ｋｉｔ、Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ、米国ミネソタ州ミネアポリス）を使用して血清ｈＥＰＯレベルを測定した。

【０３０６】

実施例５：生体内分布および免疫染色プロトコル

本明細書に記載される製剤の生体内分布および免疫染色を評価する研究を、本実施例に記載されるプロトコルに従って行った。このプロトコルでは、トランスジェニックかつフロックス化されたｔｄＴｏｍａｔｏマウスを使用した。これらのマウスは、ｔｄＴｏｍａｔｏ蛍光レポータータンパク質をコードする遺伝子を有するように操作されたが、ＣＲＥリコンビナーゼ（ＣＲＥ）と呼ばれるタンパク質の非存在下でのｔｄＴｏｍａｔｏ遺伝子の完全な転写を防止するＣＲＥベースの停止カセット（すなわち、フロックス化カセット）も含む。フロックス化されたｔｄＴｏｍａｔｏマウスは、ＣＲＥ遺伝子がさらに欠損している。

【０３０７】

合計６匹のフロックス化したｔｄＴｏｍａｔｏマウスを、マウス２匹の３群に分けた。対照群にＰＢＳを注射し、残りの２つの群にＣＲＥ－ｔｄＴｏｍａｔｏ　ｍＲＮＡを含有するＬＮＰ製剤を注射した。ＬＮＰ製剤には、ＰＥＧ－ＤＭＧまたはペプチド７のいずれかが含まれた。各群からの一方のマウスは静脈内（ＩＶ）注射を受け、他方のマウスは筋肉内（ＩＭ）注射を受けた。動物に、１ｍｇ／ｋｇのｍＲＮＡおよび１０ｍＬ／ｋｇの体積を投与した。注射の７２時間後に、マウスを安楽死させた。ＩＶ注射によって投与されたマウスについては、肝臓、脾臓、肺、腎臓、および心臓を含む器官を除去した。ＩＭ注射により投与されたマウスについては、左大腿直筋、右大腿直筋、肝臓、および脾臓を含む注射部位を除去した。器官は、１０％の中性緩衝ホルマリン内で固定され、パラフィンブロックの中へと埋め込まれ、５μｍ切片に切断された。各切片を、ｔｄＴｏｍａｔｏ抗体を使用して、免疫組織化学による二次検出のために染色した。次いで、切片を、ビオチ

ン標識抗ウサギ（ａｂ６８０１）の１：３００の希釈でインキュベートし、ストレプトアビジン西洋ワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）（２０７７４、Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）および３，３’－ジアミノベンジジン（ＤＡＢ）基質（ＳＫ－４１００、Ｖｅｃｔｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）を使用して染色した。共焦点免疫蛍光顕微鏡を使用して、試料の画像を収集した。

【０３０８】

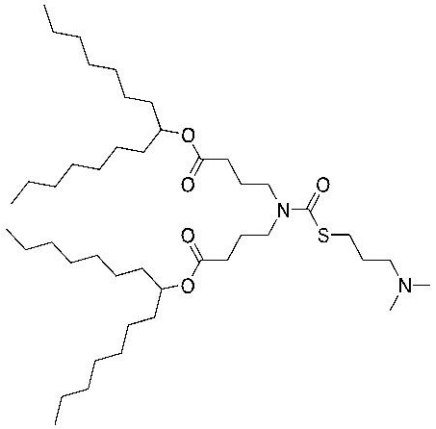
ＣＲＥ　ｍＲＮＡ脂質製剤でトランスフェクトされたマウスの治療が成功した程度は、ｔｄＴｏｍａｔｏタンパク質の発現によって示され、このように、マウスは、フロックス化カセットを除去してｔｄＴｏｍａｔｏタンパク質の発現を可能にするＣＲＥタンパク質を生成することができる。図３に示すように、本明細書に記載のペプチドを含むＬＮＰ製剤は、マウスの器官にｍＲＮＡを効率的に送達することができる。

【０３０９】

実施例６：脂質ナノ粒子製剤の例

ＦＶＩＩ　ｓｉＲＮＡまたはｈＥＰＯ　ｍＲＮＡのいずれかを封入する脂質ナノ粒子製剤を、上記の実施例２のプロトコルに記載されるように調製した。これらの脂質ナノ粒子製剤は、イオン性カチオン性脂質（Ｃａｔ）、ヘルパー脂質（ジステアロイルホスファチジルコリン、ＤＳＰＣ）、コレステロール（Ｃｈｏｌ）、および脂質－ペプチドコンジュゲートまたはＰＥＧ脂質コンジュゲートのいずれかを含んだ。これらの製剤で使用されるイオン性カチオン性脂質は、比較の基盤としての役割を果たすことができる共通脂質を提供するように選択されたが、当業者であれば、本開示の脂質－ペプチドコンジュゲートを、核酸などの活性剤の送達のための脂質ナノ粒子製剤での使用に好適な任意のカチオン性脂質と組み合わせることができることを認識するであろう。これらの製剤で使用されるイオン性カチオン性脂質は、以下の構造：

【化１１】



を有する。

【０３１０】

例示的な脂質ナノ粒子製剤を、実施例２に記載されるように調製および特徴解析し、各製剤の詳細を、結果として得られた特性とともに以下の表２に提供する。この表では、「Ｎ／Ｐ」は、封入核酸のアニオン性リン酸骨格基に対するイオン性カチオン性脂質からのカチオン性アミノ基の比を指す。結果は、本開示のペプチド－脂質コンジュゲートが、良好な粒子サイズ、多分散性、および核酸の封入パーセントを有する脂質ナノ粒子製剤に良好に統合されることを示す。

【表２】

表２：脂質ナノ粒子製剤の例

脂質組成物	核酸	直径(nm)	多分散性	封入パーセント
Cat:DSPC:Chol:ペプチド2-DMG (45:10:44:1)、N/P 9	FVII siRNA	81.16	0.074	99.28
Cat:DSPC:Chol:ペプチド3-DMG (45:10:44:1)、N/P 9	FVII siRNA	90.16	0.036	99.28
Cat:DSPC:Chol:ペプチド5-DMG (45:10:44:1)、N/P 9	FVII siRNA	76.04	0.1	98.86
Cat:DSPC:Chol:ペプチド6-DMG (45:10:44:1)、N/P 9	FVII siRNA	79.82	0.216	99.15
Cat:DSPC:Chol:ペプチド7-DMG (45:10:44:1)、N/P 9	FVII siRNA	83.87	0.07	99.30
Cat:DSPC:Chol:ペプチド8-DMG (45:10:44:1)、N/P 9	FVII siRNA	62.96	0.096	98.95
Cat:DSPC:Chol:ペプチド2-DMG (40:15:44:1)、N/P 9	hEPO mRNA	74.01	0.127	98.9
Cat:DSPC:Chol:PEG200-DMG (40:15:44:1)、N/P 9	FVII siRNA	70.71	0.3	98.8
Cat:DSPC:Chol:ペプチド3-DMG (40:15:44:1)、N/P 9	hEPO mRNA	91.31	0.207	99
Cat:DSPC:Chol:ペプチド5-DMG (40:15:44:1)、N/P 9	hEPO mRNA	85.11	0.131	93.8
Cat:DSPC:Chol:ペプチド6-DMG (40:15:44:1)、N/P 9	hEPO mRNA	65.95	0.185	92.2
Cat:DSPC:Chol:ペプチド7-DMG (40:15:44:1)、N/P 9	hEPO mRNA	73.21	0.15	95.2
Cat:DSPC:Chol:ペプチド8-DMG (40:15:44:1)、N/P 9	hEPO mRNA	81.02	0.136	98.7
Cat:DSPC:Chol:PEG200-DMG (40:15:44:1)、N/P 9	hEPO mRNA	77.77	0.26	96.3

【０３１１】

実施例７：インビボでのＥＰＯ発現

ペプチド－脂質コンジュゲートの各々を、０．１および０．０３ｍｇ／ｋｇのｍＲＮＡ濃度で、実施例４で概説したプロトコルに従って、インビボ発現のためのｈＥＰＯ ｍＲＮＡの送達におけるその有効性について評価した。ＰＥＧ２０００－ＤＭＧ製剤も、組成物の脂質部分の１％および１．５％の２つの異なるモルパーセントで試験した。この研究の結果を図１に示す。０．１ｍｇ／ｋｇレベルでは、ペプチド２およびペプチド５製剤は、ＰＥＧ２０００－ＤＭＧ製剤と同等である。ペプチド６およびペプチド７は、ＰＥＧ２０００－ＤＭＧ製剤よりも有意に高いＥＰＯ発現を示し、一方でペプチド３およびペプチド８製剤は、ＰＥＧ２０００－ＤＭＧ製剤よりもはるかに優れた発現レベルを示す。これらの結果は、本開示のペプチド－脂質コンジュゲートが、脂質ナノ粒子におけるＰＥＧコンジュゲートの使用の少なくとも好適な代替物であり、場合によっては、インビボで送達されるｍＲＮＡのタンパク質発現レベルの強化においてはるかに優れていることを示す。

【０３１２】

実施例８：インビボでのＦＶＩＩノックダウン
　ペプチド－脂質コンジュゲートを、ＦＶＩＩをノックダウンする標的ｓｉＲＮＡを封入する上述のような脂質ナノ粒子を製剤化することによって、第ＶＩＩ因子のノックダウン（ＦＶＩＩノックダウン）における有効性についてさらに評価した。これらの製剤を、０．０１ｍｇ／ｋｇおよび０．０３ｍｇ／ｋｇのＦＶＩＩ　ｓｉＲＮＡ用量レベルで試験した。脂質構造と別様に同一であるが、１．０％または１．５％のＰＥＧ２０００－ＤＭＧのいずれか、ならびにリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）の陰性対照を使用した比較製剤も試験した。ＰＢＳ発現ＦＶＩＩ発現レベルに対して正規化された結果を、図２に提供する。ペプチド２は、１％ＰＥＧ－ＤＭＧ製剤と同等の発現レベルを示すことが分かる。ペプチド３、５、６、７、および８は全て、１％ＰＥＧ－ＤＭＧ製剤よりも良好なノックダウン活性を示し、１．５％ＰＥＧ－ＤＭＧ製剤と同等であった。ペプチド７は、１．５％ＰＥＧ－ＤＭＧ製剤と比較して、０．０３ｍｇ／ｋｇ用量レベルで特に改善されたノックダウンを示した。そのため、本開示のペプチド－脂質コンジュゲートは、脂質ナノ粒子におけるＰＥＧコンジュゲートの使用の少なくとも好適な代替物であり、場合によっては、インビボでの送達およびノックダウン活性の強化においてはるかに優れていることを示す。
【０３１３】
実施例９：さらなるペプチド－脂質コンジュゲートおよびその合成
　以下の表３およびスキーム２～８に概説するように、追加のペプチド脂質コンジュゲートを設計し、本実施例に記載した。

【表３】

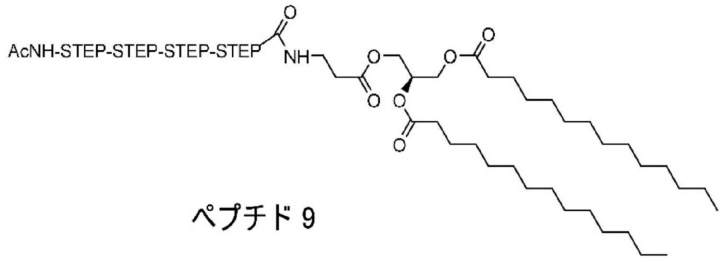
表３：追加のペプチド－脂質コンジュゲート

ペプチド－脂質コンジュゲート参照	配列（Ｎ末端からＣ末端方向で）	分子量
ペプチド９	AcNH-STEPSTEPSTEPSTEP-X（化合物ＸはＣ末端においてコンジュゲートされ、Ｎ末端はアセチル基でキャップされる）	2283.59
ペプチド１０	AcNH-S(Me)T(Me)QPS(Me)T(Me)QPS(Me)T(Me)QPS(Me)T(Me)QP-X（化合物ＸはＣ末端においてコンジュゲートされ、Ｎ末端はアセチル基でキャップされる）	2391.87
ペプチド１１	X-STEP$_{\beta}$ASTEP$_{\beta}$ASTEP$_{\beta}$ASTEP-OH	2483,79
ペプチド１２	X-S(Me)T(Me)QP$_{\beta}$AS(Me)T(Me)QP$_{\beta}$AS(Me)T(Me)QP$_{\beta}$AS(Me)T(Me)QP-OH	2592.07
ペプチド１３	X-STEPSTEPSTEPSTEP-OH	2144.40
ペプチド１４	X-S(Me)T(Me)QPS(Me)T(Me)QPS(Me)T(Me)QPS(Me)T(Me)QP-OH	2254.65
ペプチド１５	X-STEPSTEPSTEPSTEP-OH	2269,57
ペプチド１６	X-S(Me)T(Me)QPS(Me)T(Me)QPS(Me)T(Me)QPS(Me)T(Me)QP-OH	2377.85
ペプチド１７	X-STEPSTEPSTEPSTEP-OH	2314.70
ペプチド１８	X-S(Me)T(Me)QPS(Me)T(Me)QPS(Me)T(Me)QPS(Me)T(Me)QP-OH	2422.70
ペプチド１９	X-STEPSTEPSTEPSTEP-OH	2326.80
ペプチド２０	X-S(Me)T(Me)QPS(Me)T(Me)QPS(Me)T(Me)QPS(Me)T(Me)QP-OH	2434.80
ペプチド２１	X-STEPSTEPSTEPSTEP-OH	2382,90
ペプチド２２	X-S(Me)T(Me)QPS(Me)T(Me)QPS(Me)T(Me)QPS(Me)T(Me)QP-OH	2490.90

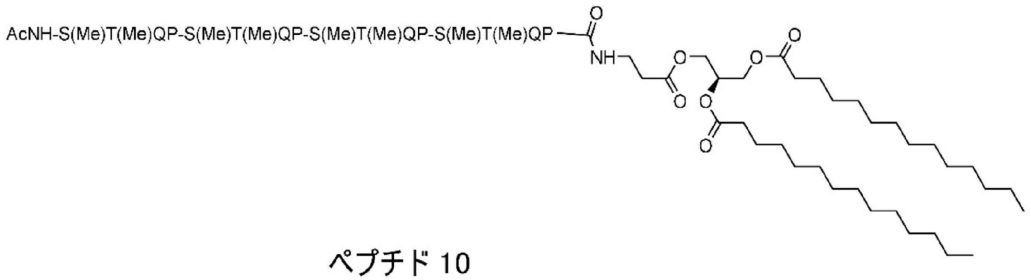
Ｘ＝以下のスキーム２～８で提供されるペプチドにコンジュゲートされた化合物（例えば、リンカーを有する脂質またはリンカーを有するコレステロールなど）である。
Ｓ＝セリン
Ｔ＝トレオニン
Ｅ＝グルタミン酸
Ｐ＝プロリンであり、Ｐ－ＯＨはプロリンを表し、またＰ－ＮＨ$_2$はプロリンアミドを表し、これをＣ末端において負電荷をマスキングするために使用した。
Ｓ（Ｍｅ）＝メチルセリン
Ｔ（Ｍｅ）＝メチルトレオニン
Ｑ＝グルタミン
$_{\beta}$Ａ＝ベーターアラニン

【０３１４】
スキーム２
ペプチド９および１０の合成

【化１２】



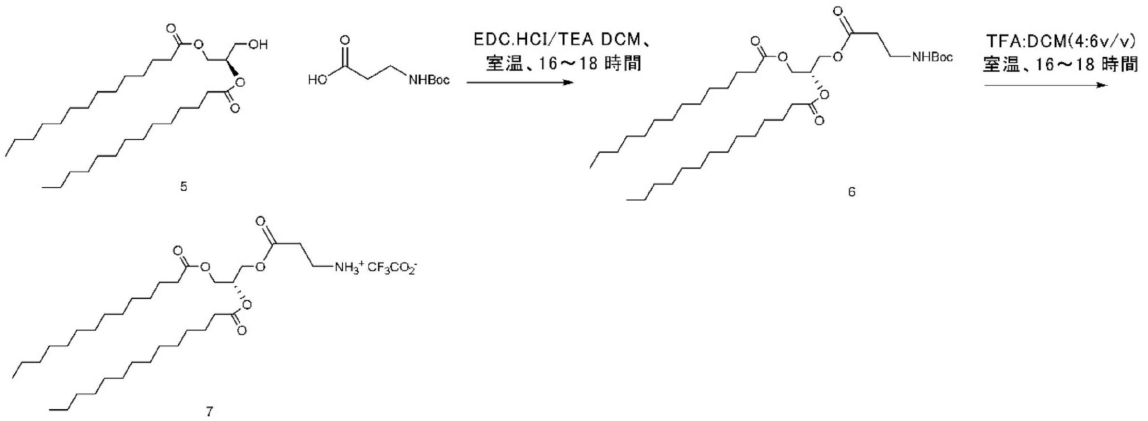
ペプチド９



ペプチド１０

ペプチド９および１０のための中間体の合成

【化１３】



【０３１５】

スキーム２、工程１：（Ｒ）－３－（（３－（（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アミノ）プロパノイル）オキシ）プロパン－１，２－ジイルジテトラデカノアート（６）。

［（２Ｒ）－３－ヒドロキシ－２－テトラデカノイルオキシ－プロピル］テトラデカノアート（５１３ｍｇ、１ｍｍｏｌ）、３－（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニルアミノ）プロパン酸（２２７ｍｇ、１．２ｍｍｏｌ）、ＥＤＣ．ＨＣｌ（２３８ｍｇ、１．３ｍｍｏｌ）、およびトリエチルアミン（０．２１ｍＬ、１．７ｍｍｏｌ）を５ｍＬのジクロロメタン中で混合し、一晩撹拌した。別の５ｍＬのジクロロメタンで希釈し、１Ｎ　ＨＣｌ（１×１０ｍＬ）、続いて水（１×１０ｍＬ）で洗浄し、乾燥させ（Na_2SO_4）、濾過し、減圧下で濃縮した。粗生成物を、ジクロロメタン／酢酸エチル勾配（１５分にわたって０～６０％）を使用してシリカゲルカラム（ＴＥＬＥＤＹＮＥ　ＩＳＣＯ金、１２ｇ）上で精製した。１５～２０％酢酸エチル濃度勾配で溶出した生成物を収集し、分析し、減圧下で濃縮して、５４０ｍｇ（７９％）の純粋な生成物を得た。ｍ／ｚ　６８４．０（計算

値）Ｍ－Ｈ＋Ｎａ　７０６．４（観察値）。

【０３１６】

スキーム２、工程２：（Ｒ）－３－（（３－アミノプロパノイル）オキシ）プロパン－１，２－ジイルジテトラデカノアート（７）。

Ｂｏｃ保護化合物［（２Ｒ）－３－［３－（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニルアミノ）プロパノイルオキシ］－２－テトラデカノイルオキシ－プロピル］テトラデカノアート（５００ｍｇ、０．７３ｍｍｏｌ）を６ｍＬのジクロロメタン中に取り込み、４ｍＬのＴＦＡを添加した。混合物を室温で一晩撹拌した。溶媒を蒸発させ、残渣を、ジクロロメタン／メタノール勾配（１５分にわたって０～６０％）を使用してシリカゲルカラムで精製した。２０％メタノールで溶出した生成物を収集し、真空下で濃縮し、乾燥させて純粋な生成物（３６０ｍｇ、８４％）を得て、これをペプチドへのカップリングに使用した。ｍ／ｚ５８３．９（計算値）Ｍ　５８４．３（観察値）。

【０３１７】

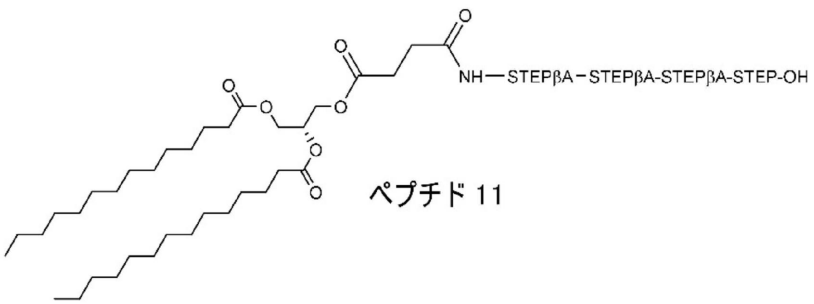
化合物７は、アセチル基とＮ末端で誘導体化される予め合成されたＳＴＥＰペプチド配列のＣ末端にカップリングすることができ、グルタミン酸側鎖カルボン酸は、ジイソプロピルカルボジミド（ＤＩＣ）および１－ヒドロキシベンゾトリアゾール（ＨＯＢｔ）試薬などの標準カップリング剤を使用して、Ｂｏｃ－Ｇｌｕ（ＯＢｚ）－ＯＨを使用したペプチド合成プロトコルで知られているベンジルエステルで保護される。Ｆｍｏｃ化学がペプチド合成で使用される場合、これらのアミノ酸側鎖は典型的に、ｔｅｒｔ－ブチルエステルＦｍｏｃ－Ｇｌｕ（ＯｔＢｕ）－ＯＨとして保護することができる。最後に、このような側鎖保護基は、水素化条件下またはギ酸もしくはトリフルオロ酢酸のいずれかを使用して除去されて、前に説明したようにＣ４カラム上で精製され得る粗ペプチド９および１０を得ることができる。

【０３１８】

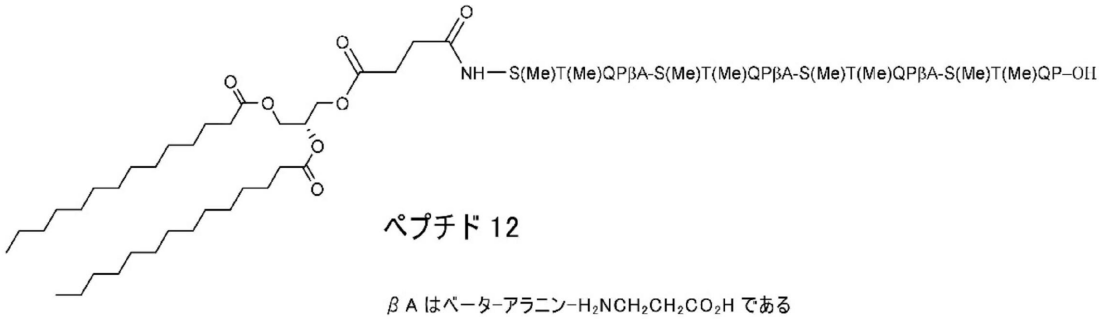
スキーム３

ペプチド１１および１２

【化１４】



ペプチド 11



ペプチド 12

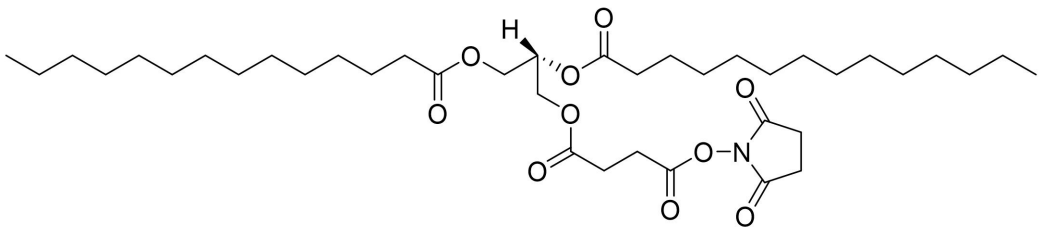
βＡはベータ−アラニン−$H_2NCH_2CH_2CO_2H$である

【０３１９】

ペプチド１１および１２のための中間体の合成

ペプチド１１および１２のための中間体は、実施例１に提供されるペプチド１～８の中間体、すなわち以下に示される中間体３と同じである。

【化１５】



3

【０３２０】

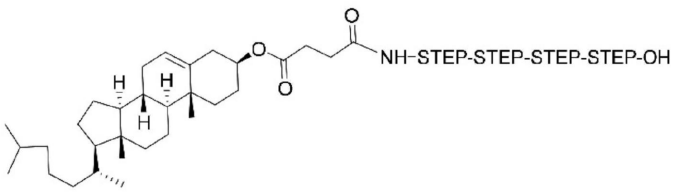
ペプチド１１および１２について示されるように、各ＳＴＥＰまたはＳ（Ｍｅ）Ｔ（Ｍｅ）ＱＰセグメントのＣ末端に追加のβ－アラニンを含有するペプチドを合成することができ、このようなペプチドのＮ末端を、実施例１のペプチド１～８について開発された３つの以下のプロトコルへとカップリングして、粗ペプチド１１および１２を得て、これを前述のようにＣ４疎水性相互作用カラム上で精製してもよい。

【０３２１】

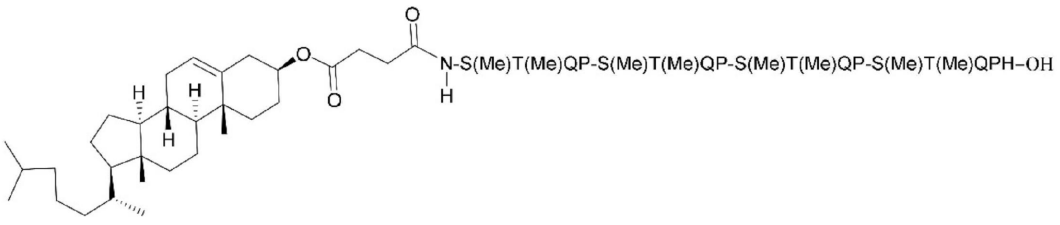
スキーム４

ペプチド１３および１４（コレステロールコンジュゲート）

【化１６】



ペプチド 13



ペプチド 14

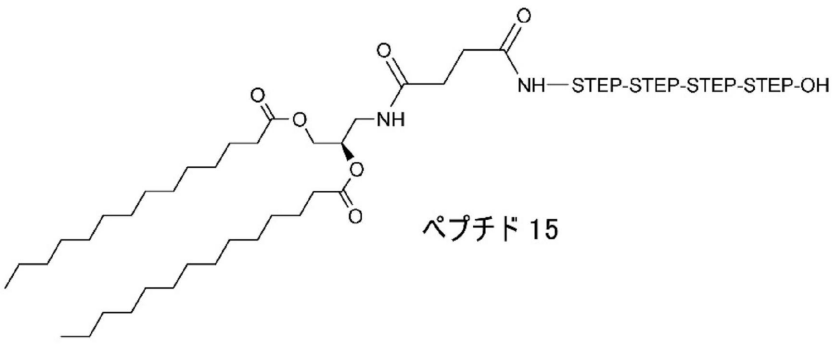
実施例１のペプチド１～８について確立されたカップリングプロトコルに従って、ペプチド１３およびペプチド１４を得るための純粋なペプチドのカップリングにおいて、市販のコレステロールＮＨＳヘミスクシナート（ＣＡＳ＃８８８４８－７９－７）をそのまま使用することができる。

【０３２２】

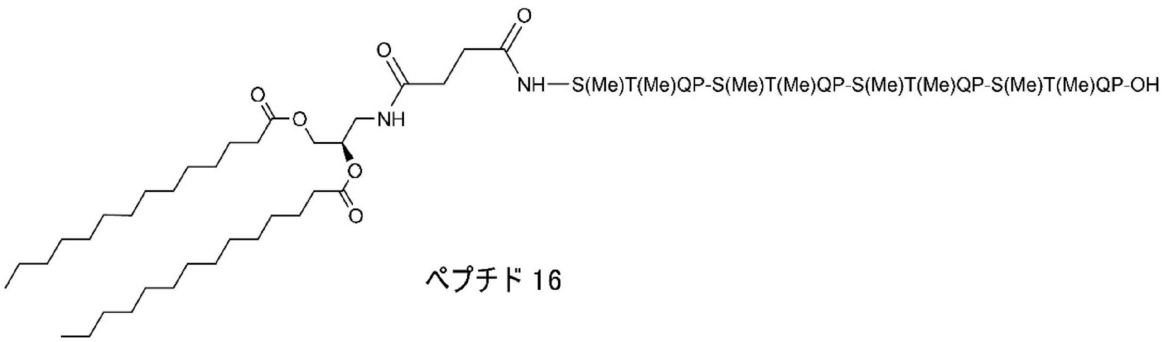
スキーム５

ペプチド１５および１６

【化１７】



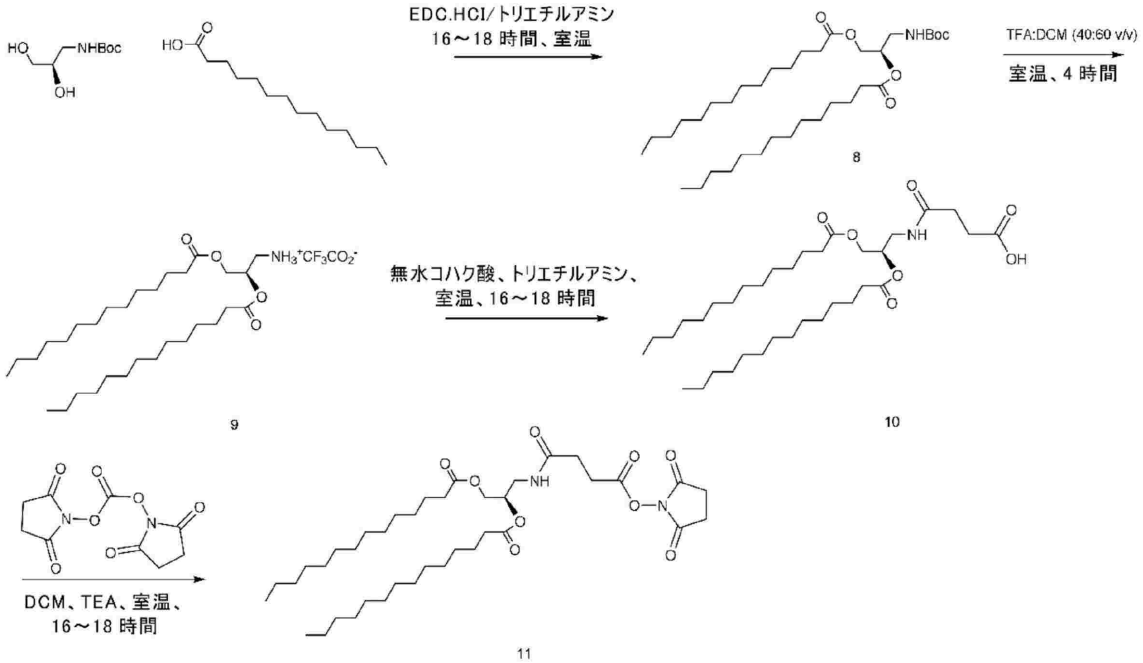
ペプチド 15



ペプチド 16

ペプチド１５および１６のための中間体の合成

【化１８】



スキーム５、工程１：（Ｒ）－３－（（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アミノ）プロパン－１，２－ジイルジテトラデカノアート（８）。

ジクロロメタン（１２ｍＬ）中のｔｅｒｔ－ブチルＮ－［（２Ｒ）－２，３－ジヒドロキシプロピル］カルバメート（０．５ｇ、２．６ｍｍｏｌ）の溶液に、テトラデカン酸（１．８ｇ、７．８ｍｍｏｌ）、ＥＤＣ（１．１ｇ、５．５ｍｍｏｌ）、続いて、トリエチ

ルアミン（０．８２ｍＬ、５．９ｍｍｏｌ）を添加した。混合物を室温で一晩撹拌した。溶液をジクロロメタン（１５ｍＬ）で希釈し、１Ｎ　ＨＣｌ（２×１５ｍＬ）、水（２×１５ｍＬ）で洗浄し、乾燥させ（Na_2SO_4）、濾過し、減圧下で蒸発させた。残渣を、ヘキサン／酢酸エチルを使用してシリカゲルカラムで精製した。生成物を、３０％酢酸エチルで溶出した。ｍ／ｚ　６１１．９（計算値）Ｍ－Ｈ＋Ｎａ　６３４．４（観察値）。

【０３２３】

スキーム５、工程２：（Ｒ）－３－アミノプロパン－１，２－ジイルジテトラデカノアート（９）。

ジクロロメタン中の４０％ＴＦＡ（Ｖ／Ｖ）中のＩＫ４７３（１．４ｇ）の溶液を、室温で４時間撹拌した。ＴＬＣ分析は、反応完了を示した。溶媒を減圧下で蒸発させ、得られた物質をさらに精製することなく、次の反応でそのまま使用した。ｍ／ｚ　５１１．８（計算値）Ｍ　５１２．４（観察値）。

【０３２４】

スキーム５、工程３：（Ｒ）－４－（（２，３－ビス（テトラデカノイルオキシ）プロピル）アミノ）－４－オキソブタン酸（１０）。

ジクロロメタン中の９の溶液に、［（２Ｒ）－３－アミノ－２－テトラデカノイルオキシ－プロピル］テトラデカノアート、続いてテトラヒドロフラン－２，５－ジオンおよびジイソプロピエチルアミンを添加し、混合物を室温で一晩撹拌した。ＴＬＣ（ジクロロメタン中１０％メタノール）は、ヨウ素／シリカゲル処理時に２つのより速い移動スポットを示した。蒸発させ、ＴＥＬＥＤＹＮＥ　ＩＳＣＯ金シリカゲルカラムにロードし、１５分間にわたってジクロロメタン中の０～６０％メタノール勾配で溶出した。溶出した画分を単離し、分析し、プールし、減圧下で蒸発させた。ｍ／ｚ　６１１．９（計算値）Ｍ－Ｈ＋Ｎａ　６３４．４（観察値）。

【０３２５】

スキーム５、工程４：（Ｒ）－３－（４－（（２，５－ジオキソピロリジン－１－イル）オキシ）－４－オキソブタンアミド）プロパン－１，２－ジイルジテトラデカノアート（１１）。

４ｍＬのジクロロメタン中の４－［［（２Ｒ）－２，３－ジ（テトラデカノイルオキシ）プロピル］アミノ］－４－オキソ－ブタン酸（４０４ｍｇ、０．６６ｍｍｏｌ）の溶液に、ビス（２，５－ジオキソピロリジン－１－イル）カーボネート（３３８ｍｇ、１．３ｍｍｏｌ）、続いて、トリエチルアミン（０．２３ｍＬ、１．７ｍｍｏｌ）を添加した。混合物を一晩撹拌し、ジクロロメタン（４ｍＬ）で希釈し、氷冷水（１０ｍＬ）で洗浄し、ジクロロメタン溶液を単離し、Na_2SO_4で乾燥させ、濾過し、減圧下で蒸発させた。粗生成物を、３ｍＬのジクロロメタンを用いて１２ｇ　Ｔｅｌｅｄｙｎｅ　ＩＳＣＯ金カラムにロードし、１５分間にわたってヘキサン中の０～６０％ＥｔＯＡｃの勾配で溶出した。画分を含有する生成物をプールし、減圧下で濃縮し、乾燥させて、白色固体として３６０ｍｇ（７７％）の生成物を得た。ｍ／ｚ　７０９（計算値）Ｍ－Ｈ　７０８．１（観察値）。

【０３２６】

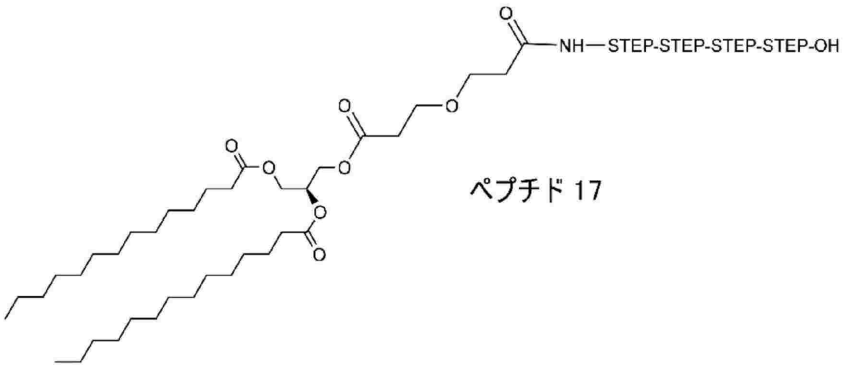
中間体１１は、ペプチド１～８用に開発されたプロトコルに従ってＮ末端でのペプチドのカップリングに使用して、ペプチド１５およびペプチド１６を得ることができる。

【０３２７】

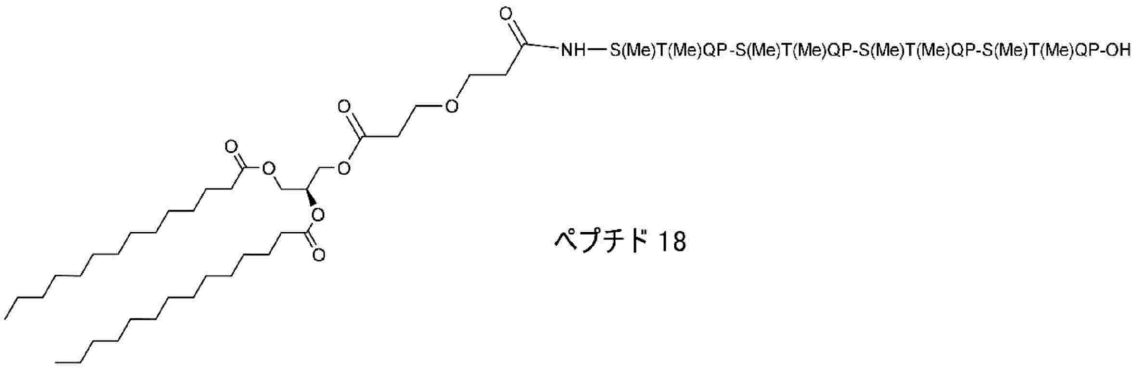
スキーム６

ペプチド１７および１８

【化１９】



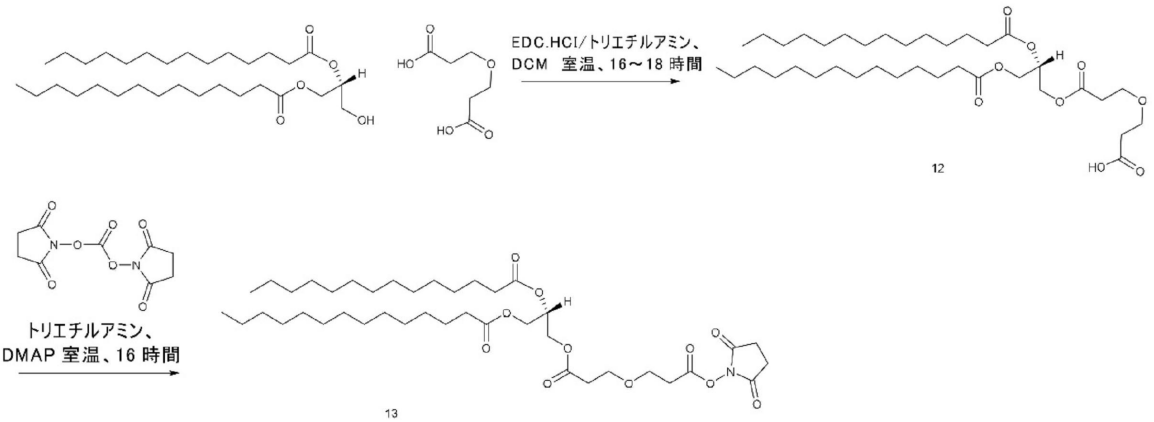
ペプチド 17



ペプチド 18

ペプチド１７および１８のための中間体の合成

【化２０】



スキーム６、工程１：（Ｓ）－３－（３－（２，３－ビス（テトラデカノイルオキシ）プロポキシ）－３－オキソプロポキシ）プロパン酸（１２）。

１０ｍＬのジクロロメタン中の２ｇ（３．９ｍｍｏｌ）の［（２Ｒ）－３－ヒドロキシ－２－テトラデカノイルオキシ－プロピル］テトラデカノアート、５６１ｍｇ（２．９ｍｍｏｌ）のＥＤＣ．ＨＣｌ、０．８２ｍＬ（１．５ｍｍｏｌ）のトリエチルアミン、および４７４ｍｇ（０．７５ｍｍｏｌ）の３－（２－カルボキシエトキシ）プロパン酸の混合物を、室温で一晩撹拌した。混合物を５ｍＬのジクロロメタンで希釈し、１０ｍＬの水、

続いてブライン（１０ｍＬ）で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過し、減圧下で濃縮した。粗生成物を、ジクロロメタン／酢酸エチル勾配（０～１００％酢酸エチル）を用いてシリカゲルカラム（Ｔｅｌｅｄｙｎｅ　ＩＳＣＯ金１２ｇ）上で精製し、４０％酢酸エチルで溶出した生成物を収集し、減圧下で濃縮して、１．２ｇ（４７％）の生成物を得た。ｍ／ｚ　６５６．４（計算値）Ｍ－Ｈ　６５５．２（観察値）。

【０３２８】

スキーム６、工程２：（Ｓ）－３－（（３－（３－（（２，５－ジオキソピロリジン－１－イル）オキシ）－３－オキソプロポキシ）プロパノイル）オキシ）プロパン－１，２－ジイルジテトラデカノアート（１３）。

３－［３－［（２Ｓ）－２，３－ジ（テトラデカノイルオキシ）プロポキシ］－３－オキソ－プロポキシ］プロパン酸（５２５ｍｇ、０．８０ｍｍｏｌ）、ビス（２，５－ジオキソピロリジン－１－イル）カーボネート（４０９ｍｇ、１．６ｍｍｏｌ）、およびトリエチルアミン（０．２８ｍＬ、２ｍｍｏｌ）の４ｍＬジクロロメタンの混合物を一晩撹拌した。反応混合物をジクロロメタン（４ｍＬ）で希釈し、氷冷水（１０ｍＬ）で洗浄し、ジクロロメタン溶液を単離し、Na_2SO_4で乾燥させ、濾過し、蒸発させた。粗生成物を、３ｍＬのジクロロメタンを用いて１２ｇ　Ｔｅｌｅｄｙｎｅ　ＩＳＣＯ金カラムにロードし、１５分間にわたってヘキサン中の０～６０％酢酸エチルの勾配で溶出した。２０～２５％酢酸エチルで溶出した生成物を収集し、減圧下で濃縮し、真空下で乾燥させて、３５０ｍｇ（５８％）の純粋な生成物を得た。ｍ／ｚ　７５４．０（計算値）Ｍ－Ｈ＋Ｎａ　７７６．２（観察値）。

【０３２９】

中間体１３を、実施例１に記載されるようにペプチド１～８に使用されるカップリングおよび精製プロトコルに従って、ペプチド１７およびペプチド１８の調製に使用した。

【０３３０】

ペプチド１７：ＨＰＬＣ純度９２％。質量：２３１４．７（計算値）、２３１４．８（観察値）。

【０３３１】

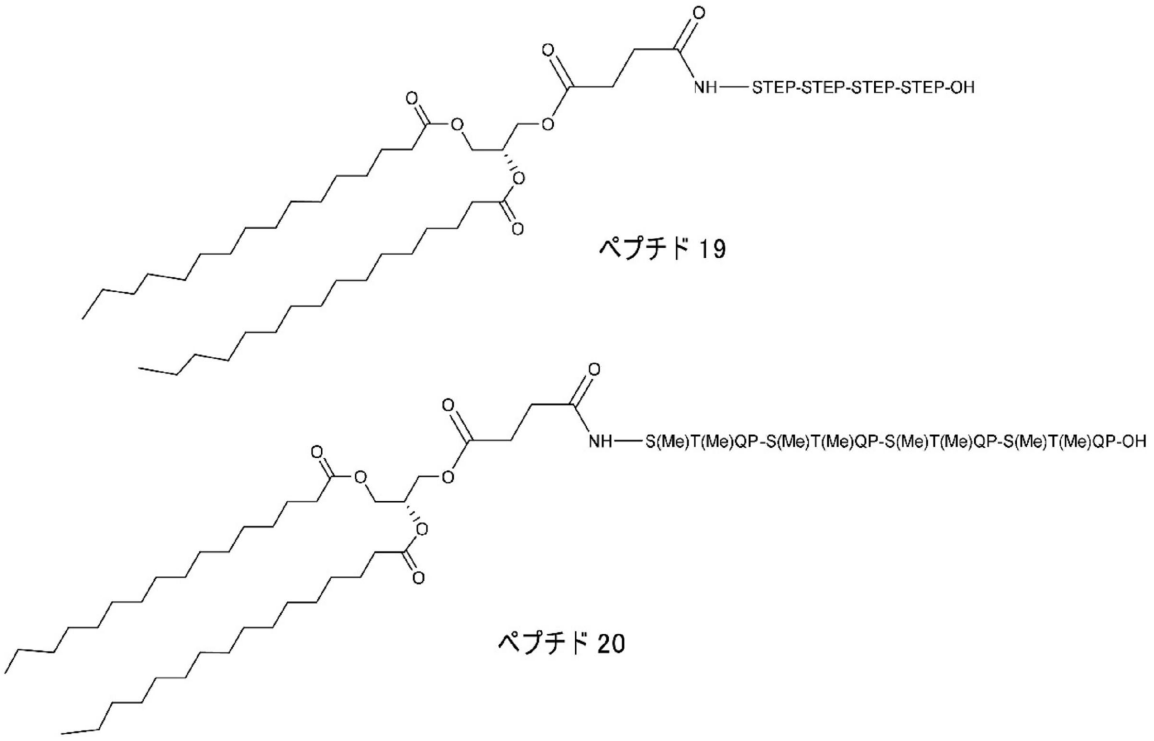
ペプチド１８：ＨＰＬＣ純度１００％。質量：２４２２．７（計算値）、２４２２．８（観察値）。

【０３３２】

スキーム７

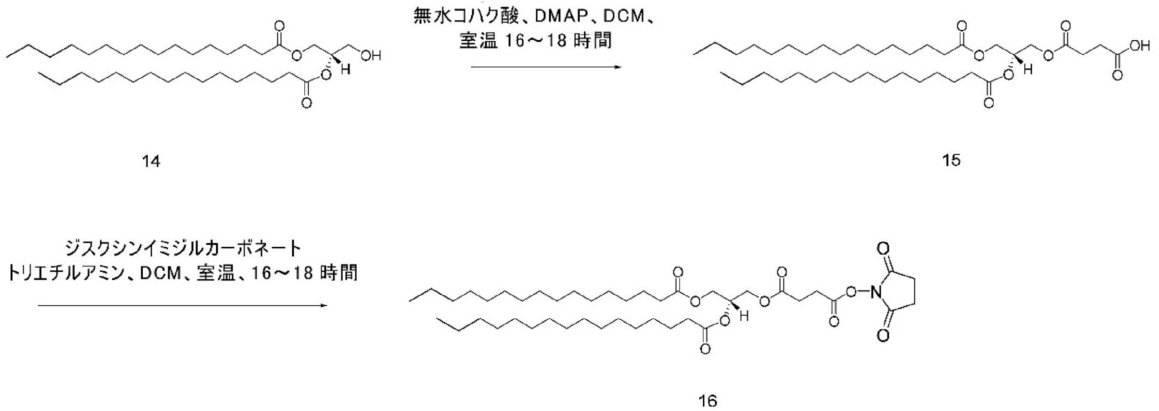
ペプチド１９および２０

【化２１】



ペプチド１９および２０のための中間体の合成

【化２２】

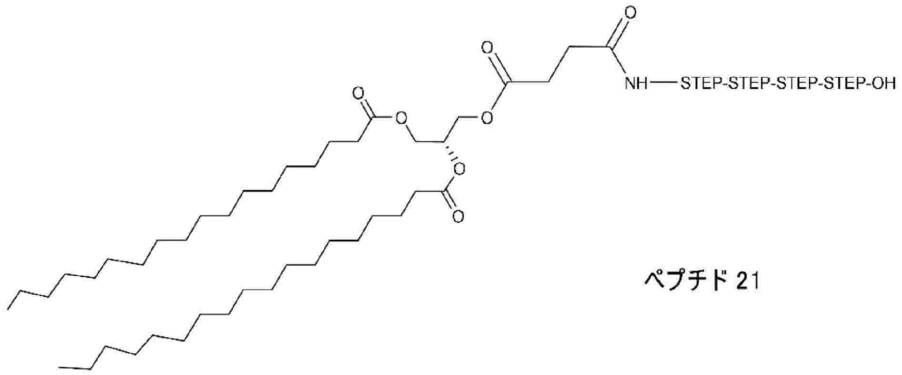


スキーム７、工程１：（Ｒ）－４－（２，３－ビス（パルミトイルオキシ）プロポキシ）－４－オキソブタン酸（１５）。

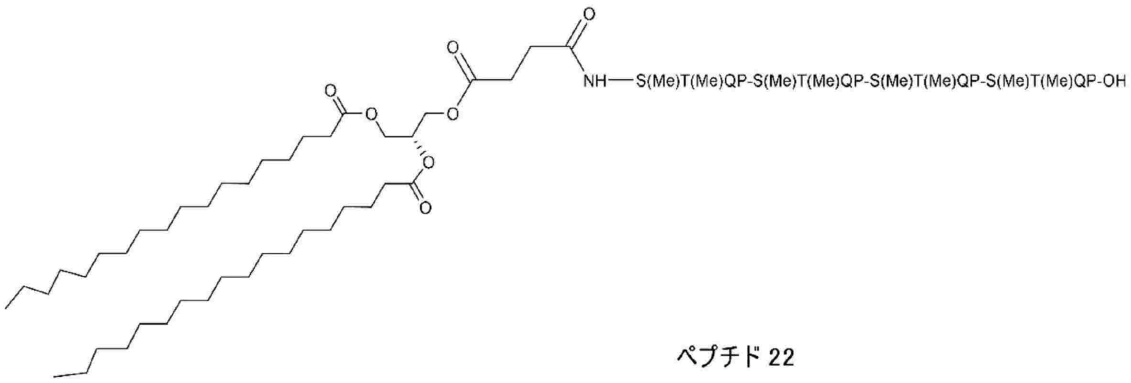
氷浴中に維持したアルゴン下で、２００ｍＬのＲＢフラスコ中の４０ｍＬの無水ジクロロメタン中の１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロール（２ｇ、３．２ｍｍｏｌ）の懸濁液に、５６３ｍｇ（５．６ｍｍｏｌ）の無水コハク酸、続いて、９０２ｍｇ（７．４ｍｍｏｌ）のＤＭＡＰを添加した。混合物を室温に到達させ、室温で一晩撹拌した。ＴＬＣ分析（１０％メタノール／ジクロロメタン）は、底部でＤＭＡＰと共により遅い移動スポットを示した。混合物を、１Ｎ　ＨＣｌ（３×３０ｍＬ）、水、およびブライン（各１００ｍＬ）で洗浄し、乾燥させ（Na_2SO_4）、濾過し、蒸発させた。１２～１５％メタノールで、メタノール／ジクロロメタン勾配溶出生成物を用いたカラム精製（Ｔｅｌｅｄｙｎｅ　ＩＳＣＯ　４０ｇ）。画分の濃縮は、白色固体として２ｇ（８５％）の生成物

を得た。ｍ／ｚ　６６８．５（計算値）Ｍ－Ｈ　６６７．５（観察値）。
【０３３３】
スキーム７、工程２：（Ｒ）－２，３－ビス（パルミトイルオキシ）プロピル（２，５－ジオキソピロリジン－１－イル）コハク酸塩（１６）。
　４０ｍＬ無水ジクロロメタン中の４－［（２Ｒ）－２，３－ジ（ヘキサデカノイルオキシ）プロポキシ］－４－オキソ－ブタン酸（２ｇ、３ｍｍｏｌ）トリエチルアミン（０．８３ｍＬ、６ｍｍｏｌ）およびＤＭＡＰ（５０ｍｇ、ｃａｔ）の混合物に、ビス（２，５－ジオキソピロリジン－１－イル）カーボネート（１．１５ｇ、４．５ｍｍｏｌ）を添加し、混合物を室温で一晩撹拌した。２当量の酢酸を添加して、反応物をクエンチした。混合物をジクロロメタンで希釈し、氷冷水（２×８０ｍＬ）、続いてブライン（８０ｍＬ）で洗浄し、乾燥させ（Na_2SO_4）、減圧下で蒸発させた。残渣を、ジクロロメタン：酢酸エチル勾配（３０分にわたって０～４０％）を使用してシリカゲルカラム（Ｔｅｌｅｄｙｎｅ　ＩＳＣＯ　４０）上で精製した。生成物を１０～１２％酢酸エチルで溶出した。溶媒をロータリーエバポレータ下で除去し、得られた白色固体を真空下で乾燥させて、１．６ｇの生成物を得た。ｍ／ｚ　７６５．５（計算値）Ｍ＋Ｈ　７８８．５（観察値）。
【０３３４】
　中間体１６を、実施例１に記載されるようにペプチド１～８のために使用されるカップリングおよび精製プロトコルに従って、ペプチド１９およびペプチド２０の調製に使用した。
【０３３５】
　ペプチド１９：質量：２３２６．８（計算値）、２３２６．０（観察値）。
【０３３６】
　ペプチド２０：質量：２４３４．８（計算値）、２４３４．０（観察値）。
【０３３７】
スキーム８
ペプチド２１および２２

【化２３】



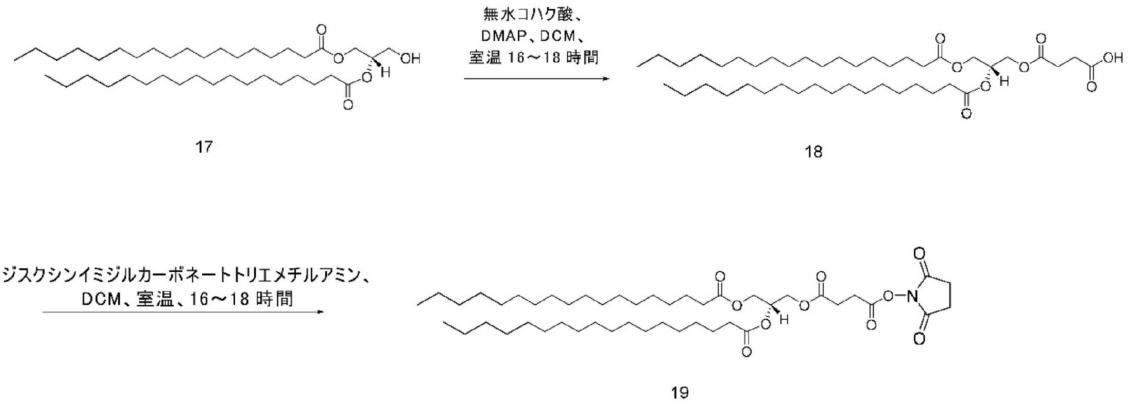
ペプチド 21



ペプチド 22

ペプチド２１および２２のための中間体の合成

【化２４】



スキーム８、工程１：（Ｒ）－４－（２，３－ビス（ステアロイルオキシ）プロポキシ）－４－オキソブタン酸（１８）。

氷浴中に維持したアルゴン下で、２００ｍＬのＲＢフラスコ中の４０ｍＬの無水ジクロロメタン中の（Ｓ）－３－ヒドロキシプロパン－１，２－ジイルジステアリン酸（２ｇ、３．２ｍｍｏｌ）の懸濁液に、５１２ｍｇ（５．６ｍｍｏｌ）の無水コハク酸、続いて、８２１ｍｇ（７．４ｍｍｏｌ）のＤＭＡＰを添加した。混合物を室温に到達させ、室温で一晩撹拌した。ＴＬＣ分析（１０％メタノール／ジクロロメタン）は、底部でＤＭＡＰと共により遅い移動スポットを示した。混合物を、１Ｎ　ＨＣｌ（３×３０ｍＬ）、水、およびブライン（１００ｍＬ酢酸エチル）で洗浄し、乾燥させ（Na_2SO_4）、濾過し、

蒸発させた。１２～１５％メタノールで、メタノール／ジクロロメタン勾配溶出生成物を用いたカラム精製（Ｔｅｌｅｄｙｎｅ　ＩＳＣＯ　８０ｇ）。画分の濃縮は、白色固体として２ｇ（８６％）の生成物を得た。ｍ／ｚ　７２４．５（計算値）Ｍ－Ｈ　７２３．５（観察値）。

【０３３８】

工程２：（Ｒ）－２，３－ビス（ステアロイルオキシ）プロピル（２，５－ジオキソピロリジン－１－イル）コハク酸塩（１９）。

３０ｍＬ無水ジクロロメタン中の（Ｒ）－４－（２，３－ビス（ステアロイルオキシ）プロポキシ）－４－オキソブタン酸（２ｇ、２．８ｍｍｏｌ）トリエチルアミン（０．７７ｍＬ、５．５ｍｍｏｌ）およびＤＭＡＰ（５０ｍｇ、ｃａｔ）の混合物に、ビス（２，５－ジオキソピロリジン－１－イル）カーボネート（１．１ｇ、４．１ｍｍｏｌ）を添加し、混合物を室温で一晩撹拌した。２当量の酢酸を添加して、反応物をクエンチした。混合物をジクロロメタンで希釈し、氷冷水（２×８０ｍＬ）、続いてブライン（８０ｍＬ）で洗浄し、乾燥させ（Na_2SO_4）、減圧下で蒸発させた。残渣を、ジクロロメタン：酢酸エチル勾配（３０分にわたって０～４０％）を使用してシリカゲルカラム（Ｔｅｌｅｄｙｎｅ　ＩＳＣＯ　４０）上で精製した。生成物を１０～１２％酢酸エチルで溶出した。溶媒をロータリーエバポレータ下で除去し、得られた白色固体を乾燥させて、１．５ｇ（６６％）の生成物を得た。ｍ／ｚ　８２２．５（計算値）Ｍ＋Ｎａ　８４５．５（観察値）。

【０３３９】

中間体１９を、実施例１に記載されるようにペプチド１～８に使用されるカップリングおよび精製プロトコルに従って、ペプチド２１およびペプチド２２の調製に使用した。

【０３４０】

ペプチド２１：質量：２３８２．９（計算値）、２３８２．０（観察値）。

【０３４１】

ペプチド２２：質量：２４９０．９（計算値）、２４９１．０（観察値）。

【０３４２】

使用する略語

ＤＣＭ：ジクロロメタン

ＤＭＡＰ：Ｎ，Ｎ－ジメチルピリジン

ＤＭＧ：ジミリストイルグリセロール

ＤＰＧ：ジパルミトイルグリセロール

ＤＳＧ：ジステアロイルグリセロール

ＥＡ：酢酸エチル

ＥＤＣ．ＨＣｌ：１－（３－ジメチルアミノプロピル）－３－エチルカルボジイミド塩酸塩

ＨＣｌ：塩酸

ＴＥＡ：トリエチルアミン

ＴＦＡ：トリフルオロ酢酸

ＴＬＣ：薄層クロマトグラフィー

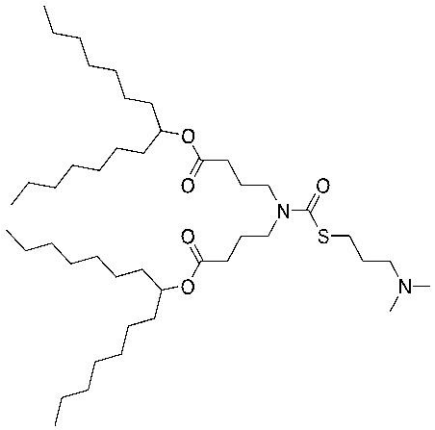
【０３４３】

実施例１０：さらなるペプチド－脂質コンジュゲートおよびその合成

実施例９から選択されたペプチド－脂質コンジュゲートを脂質ナノ粒子へと製剤化し、実施例２に記載の方法およびプロトコルに従って特徴解析した。脂質ナノ粒子は、以下の表４のデータに示されるように、良好な粒子サイズ、分散、および封入を示した。これらの脂質ナノ粒子製剤は、イオン性カチオン性脂質（「Ｃａｔ」）、ヘルパー脂質（ジステアロイルホスファチジルコリン、「ＤＳＰＣ」）、コレステロール（「Ｃｈｏｌ」）、および示される脂質－ペプチドコンジュゲートを含んだ。これらの製剤で使用されるイオン性カチオン性脂質は、比較の基盤としての役割を果たすことができる共通脂質を提供するように選択されたが、当業者であれば、本開示の脂質－ペプチドコンジュゲートを、核酸

などの活性剤の送達のための脂質ナノ粒子製剤での使用に好適な任意のカチオン性脂質と組み合わせることができることを認識するであろう。これらの製剤で使用されるイオン性カチオン性脂質は、以下の構造：

【化２５】



を有する。

【０３４４】

脂質ナノ粒子製剤を、実施例４に記載されるように調製および特徴解析し、各製剤の詳細を、結果として得られた特性とともに以下の表２に提供する。この表では、「Ｎ／Ｐ」は、封入核酸のアニオン性リン酸骨格基に対するイオン性カチオン性脂質からのカチオン性アミノ基の比を指す。結果は、本開示のペプチド－脂質コンジュゲートが、良好な粒子サイズ、多分散性、および核酸の封入パーセントを有する脂質ナノ粒子製剤に良好に統合されることを示す。

【０３４５】

製剤を、実施例７に概説したプロトコルに従って、ｈＥＰＯ発現のインビボ測定についてさらに試験する。

【表４】

表４：選択されたペプチドに対する製剤データ

脂質組成物	核酸	直径(nm)	多分散性	封入パーセント
Cat:DSPC:Chol:ペプチド１７ モル比 40:15:44:1、N/P=9	hEPO mRNA	60.19	0.194	94.6
Cat:DSPC:Chol:ペプチド１８ モル比 40:15:44:1、N/P=9	hEPO mRNA	54.26	0.25	93.5
Cat:DSPC:Chol:ペプチド１９ モル比 40:15:44:1、N/P=9	hEPO mRNA	67.22	0.179	94.8
Cat:DSPC:Chol:ペプチド２０ モル比 40:15:44:1、N/P=9	hEPO mRNA	55.37	0.211	84.4
Cat:DSPC:Chol:ペプチド２１ モル比 40:15:44:1、N/P=9	hEPO mRNA	88.29	0.174	91
Cat:DSPC:Chol:ペプチド２２ モル比 40:15:44:1、N/P=9	hEPO mRNA	55.31	0.22	89.4

【０３４６】

さらなる考慮事項

上記の実施例は、ペプチド－脂質コンジュゲートが、脂質製剤化核酸送達システムにおいてＰＥＧ－脂質に対する少なくとも適切であり、また一部の実施例では、優れた代替物であることを実証する。これらのペプチド－脂質コンジュゲートは、インビボ発現のためのｍＲＮＡおよび標的のノックダウンのためのｓｉＲＮＡの送達レベルが同等または優れていることを示した。ペプチド－脂質コンジュゲートが、上述の通りの閾値量の親水性アミノ酸をさらに含む場合、それらは、好適な形態、サイズ、および分散の水性媒体中で脂質組成物を製剤化できるというさらなる効果を提供する。これらの親水性側鎖は、組成物の外部表面における脂質コンジュゲートのペプチド部分が、ペプチドと水性媒体との会合を最大化することを可能にし、それによって、より理想的な立体構造（例えば、「水の檻」）を提供する。加えて、ペプチド脂質コンジュゲートが閾値量のプロリンを有する場合、コンジュゲートのペプチド部分に対する適正な量の構造剛性を可能にすることによって、さらなる立体構造上の利益が提供される。同様に、グリシンを最小化することにより、ペプチド－脂質コンジュゲートのペプチド部分が、全体的な立体構造における変動性が小さくなり、結果として生じる組成物の均一な形態、サイズ、および分散を維持するためにより好適な立体構造のみが生成されるという効果を提供することができる。

【０３４７】

前述の記載は、当業者が本明細書に記載される様々な構成を実施することを可能にするために提供される。主題技術を、様々な図および構成を参照しながら具体的に記載してきたが、当然のことながらこれらは例示のみを目的としており、主題技術の範囲を限定するものとして解釈されるべきではない。

【０３４８】

さらに、「含む（ｉｎｃｌｕｄｅ）」、「有する（ｈａｖｅ）」、またはそれに類する用語が記載または特許請求の範囲で使用される限り、こうした用語は、「含む（ｃｏｍｐ

ｒｉｓｅ）」という用語が特許請求の範囲の移行語として用いられる場合、「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅ）」という用語と同様の様態で包括的であることが意図される。

【０３４９】

１つ以上の態様において、「約」、「実質的に」、および「およそ」という用語は、それらの対応する用語および／または項目間の相対性に対して業界で許容される、１パーセント未満～５パーセントなどの公差を提供する場合がある。

【０３５０】

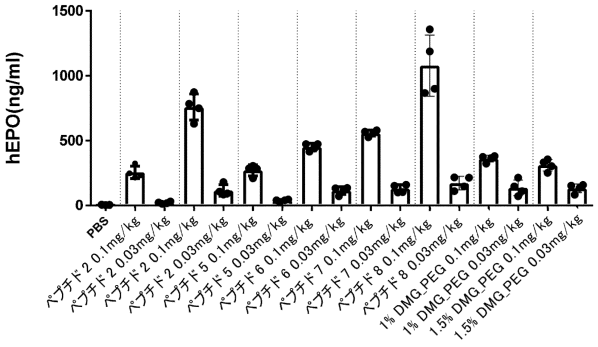
単数形の要素への言及は、特に明記されない限り、「１つのみ」を意味することを意図するものではなく、むしろ「１つ以上」を意味することを意図する。男性の代名詞（例えば、彼の）には、女性および中性の性別（例えば、彼女のおよびその）が含まれ、その逆も同様である。「一部の」という用語は、１つ以上を指す。下線付きおよび／または斜体の見出しおよび小見出しは、便宜上のみ使用され、主題技術を限定せず、また主題技術の記載の解釈に関連しては言及されない。当業者に公知であるか、または後に公知となる、本開示全体を通して記載される様々な構成の要素に対する全ての構造的および機能的均等物は、参照により本明細書に明示的に組み込まれ、主題技術によって包含されることが意図される。さらに、本明細書に開示されるいかなる開示も、かかる開示が上記の記載に明示的に列挙されているか否かにかかわらず、一般公衆専用であることを意図するものではない。

【０３５１】

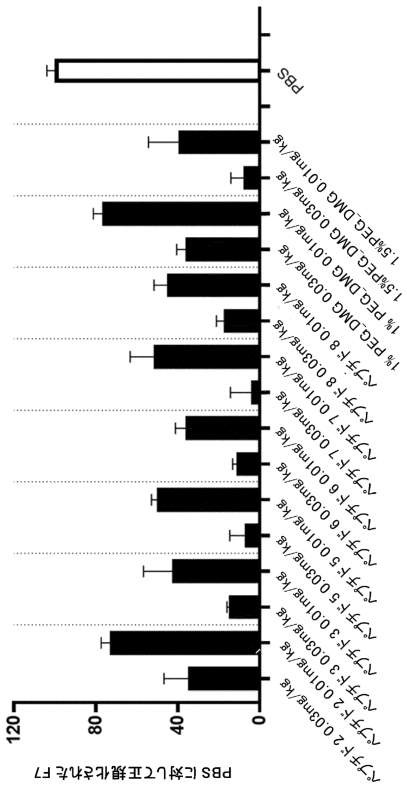
発明を実施するための形態は多くの詳細を含むが、これらは、主題技術の範囲を限定するものとして解釈されるべきではなく、単に主題技術の異なる実施例および態様を例示するものとして解釈されるべきである。当然のことながら、主題技術の範囲は、上記で詳細に考察されていない他の実施形態を含む。本開示の範囲から逸脱することなく、本明細書に開示される主題技術の方法および設備の配置、動作、および詳細において、様々な他の修正、変更、および変形がなされてもよい。別段の表現がない限り、単数形の要素への言及は、明示的に記載されない限り、「１つのみ」を意味することを意図するものではなく、むしろ「１つ以上」を意味することを意味する。加えて、組成物または方法は、本開示の範囲内を包含するために、本開示の異なる実施形態によって解決可能である（または達成可能であるあらゆる利点を有する）あらゆる問題に対処する必要はない。本明細書における「することができる（ｃａｎ）」およびその派生語の使用は、肯定的な能力とは対照的に、「おそらく（ｐｏｓｓｉｂｌｙ）」または「任意選択的に（ｏｐｔｉｏｎａｌｌｙ）」という意味で理解されるべきである。

【図面】

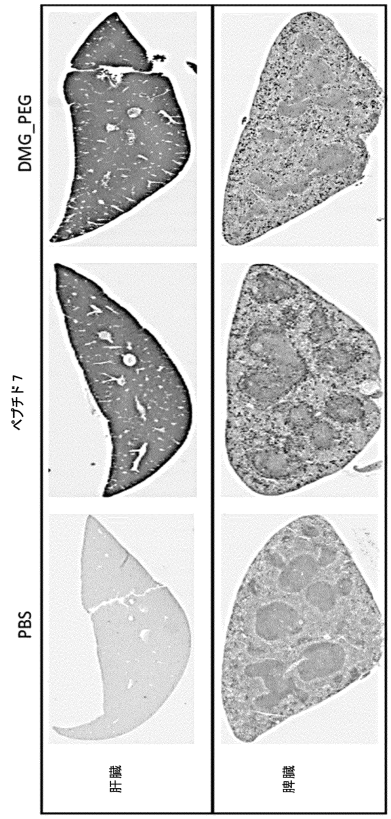
【図１】


hEPO(ng/ml)
1500
1000
500
0
PBS
ペプチド 2 0.1mg/kg
ペプチド 2 0.03mg/kg
ペプチド 2 0.1mg/kg
ペプチド 2 0.03mg/kg
ペプチド 5 0.1mg/kg
ペプチド 5 0.03mg/kg
ペプチド 6 0.1mg/kg
ペプチド 6 0.03mg/kg
ペプチド 7 0.1mg/kg
ペプチド 7 0.03mg/kg
ペプチド 8 0.1mg/kg
ペプチド 8 0.03mg/kg
1% DMG_PEG 0.1mg/kg
1% DMG_PEG 0.03mg/kg
1.5% DMG_PEG 0.1mg/kg
1.5% DMG_PEG 0.03mg/kg

【図２】


PBS
1.5%PEG_DMG 0.01mg/kg
1.5%PEG_DMG 0.03mg/kg
1% PEG_DMG 0.01mg/kg
1% PEG_DMG 0.03mg/kg
ペプチド 8 0.01mg/kg
ペプチド 8 0.03mg/kg
ペプチド 7 0.01mg/kg
ペプチド 7 0.03mg/kg
ペプチド 6 0.01mg/kg
ペプチド 6 0.03mg/kg
ペプチド 5 0.01mg/kg
ペプチド 5 0.03mg/kg
ペプチド 3 0.01mg/kg
ペプチド 3 0.03mg/kg
ペプチド 2 0.01mg/kg
ペプチド 2 0.03mg/kg
120
80
40
0
PBS に対して正規化された F7

【図３】



【配列表】

<u>20245197150000001.app</u>

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US22/27926

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC - INV. C12N 15/63; A61K 38/02; A61K 38/04; A61K 38/16; C12N 15/64 (2022.01)
ADD.
CPC - INV. C12N 15/63; A61K 38/02; A61K 38/04; A61K 38/16; C12N 15/64
ADD.
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
See Search History document

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X --- Y	US 6,051,429 A (HAWLEY-NELSON, P et al.) 18 April 2000; abstract; column 3, lines 25-30; column 4, lines 5-10; column 5, lines 57-62; column 8, lines 35-45; column 12, lines 65-67; column 13, lines 1-5; column 14, lines 40-45; column 17, lines 25-30; column 18, lines 29-45; column 19, lines 40-45; column 20, lines 55-60; column 21, lines 20-25; column 29, lines 1-40; column 33, lines 25-30; column 41, lines 20-65; column 42, lines 20-65; SEQ ID: 115	1-11, 16, 20-25, 27-34, 37, 42-45, 48, 50, 70 --- 26, 35-36, 38-41, 46-47, 49, 51-52, 55-56, 62, 66, 71-74
Y	WO 2013/024053 A1 (ASCENDIS PHARMA A/S, et al.) 21 February 2013; abstract; page 6, lines 1-5; page 20, lines 10-15; page 223, lines 20-25; page 26, lines 1-5; page 29, lines 15-25	26
Y	US 8,455,455 B1 (ROBBINS, M et al.) 4 June 2013; abstract; column 5, lines 15-35; column 6, lines 35-42; column 14, lines 55-60; column 15, lines 8-20; column 25, lines 60-65; column 123, lines 35-50; 64-67; column 125, lines 20-25	35-36, 38-41, 51-52, 55-56, 62, 66, 71-72, 74
Y	US 2019/0030115 A1 (TXP PHARMA GMBH) 31 January 2019; paragraphs [0017], [0154]-[0155], [0195]	46-47
Y	US 2018/0170865 A1 (ARCTURUS THERAPEUTICS, INC.) 21 June 2018; paragraphs [0045], [0172]-[0173]	49
Y	US 2012/0088261 A1 (CHUNG, BH et al.) 12 April 2012; abstract; paragraph [0035]	73

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

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
24 August 2022 (24.08.2022)	OCT 11 2022
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Shane Thomas Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US22/27926

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

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

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

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

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

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
-***-Please See Supplemental Page-***-

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

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

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

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Group I+, Claims 1-74

Remark on Protest

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

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

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US22/27926

-***-Continued From Box No. III: Observations where unity of invention is lacking-***-

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

Group I+, Claims 1-74, a lipid composition containing a nucleic acid siRNA (first exemplary nucleic acid), wherein the lipid composition comprises a peptide-lipid conjugate, wherein the peptide consists of 12 amino acids (first exemplary peptide); an ionizable cationic lipid ATX-001 (first exemplary cationic lipid), and methods associated therewith.

The compounds of Claims 1-11, 16, 20-52, 55-56, 62, 66 and 70-74 are believed to encompass the first named invention of Groups I+ and are the claims that will be searched to the extent that they encompass a lipid composition containing a nucleic acid siRNA (first exemplary nucleic acid), wherein the lipid composition comprises a peptide-lipid conjugate, wherein the peptide consists of 12 amino acids (first exemplary peptide); an ionizable cationic lipid ATX-001 (first exemplary cationic lipid), and methods associated therewith. This first named invention of Group I+ has been selected to encompass the first species of the genus found in claim 1 based on the guidance set forth in section 10.54 of the PCT International Search and Preliminary Examination Guidelines.

Applicant is invited to elect additional compounds, with specified substituents for each Rx, and where available as an option within at least one searchable claim, to be searched. Additional compound(s) will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the searchable claims that encompass any additionally elected compound(s). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined. An exemplary election would be a lipid composition containing a nucleic acid an antisense oligonucleotide (second exemplary nucleic acid), wherein the lipid composition comprises a peptide-lipid conjugate, wherein the peptide consists of 16 amino acids (second exemplary peptide); an ionizable cationic lipid ATX-002 (second exemplary cationic lipid), and methods associated therewith.

Groups I+ share the technical features including a lipid composition containing a nucleic acid, wherein the lipid composition comprises a peptide-lipid conjugate.

However, these shared technical features are previously disclosed by US 6,051,429 A to Hawley-Nelson, et al. (hereinafter "Nelson").

Nelson discloses a lipid composition containing a nucleic acid (compositions comprising nucleic acid complexes with peptides covalently linked to the lipid; abstract), wherein the lipid composition comprises a peptide-lipid conjugate (compositions comprising nucleic acid complexes with peptides covalently linked to, i.e., conjugated to, the lipid; abstract).

Since none of the special technical features of the Group I+ is found in more than one of the inventions, and since all of the shared technical features are previously disclosed by the Nelson reference, unity of invention is lacking.

It is noted that Claim 26 depends on claim 1 and discloses "wherein the amino acids having a hydrophilic side chain are selected from", where the preceding claim 1 does not disclose "the amino acids having a hydrophilic side chain", which renders the claim indefinite. For the purposes of this LOU, an assumption was made that claim 26 depends on claim 20.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US22/27926

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

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

   a. ☐ forming part of the international application as filed:

      ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file.

      ☐ on paper or in the form of an image file.

   b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

   c. ☒ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

      ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).

      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ	*48/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	48/00	
Ａ６１Ｋ	*9/51 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	9/51	
Ａ６１Ｋ	*47/42 (2017.01)*	Ａ６１Ｋ	47/42	
Ａ６１Ｋ	*47/28 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	47/28	
Ａ６１Ｋ	*47/18 (2017.01)*	Ａ６１Ｋ	47/18	
Ａ６１Ｋ	*47/24 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	47/24	
Ａ６１Ｋ	*47/20 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	47/20	
Ａ６１Ｋ	*31/7105(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/7105	
Ａ６１Ｋ	*31/713 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/713	
Ａ６１Ｋ	*31/711 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/711	
Ｃ０７Ｋ	*7/04 (2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	7/04	ＺＮＡ
Ｃ１２Ｎ	*15/113 (2010.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/113	Ｚ

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

（特許庁注：以下のものは登録商標）

１．ＴＷＥＥＮ

ア州サンディエゴ、サイエンス・センター・ドライブ１０６２８、スウィート２５０、アークトゥラス・セラピューティクス・インコーポレイテッド内

(72)発明者　タニス，スティーブン

アメリカ合衆国９２１２１カリフォルニア州サンディエゴ、サイエンス・センター・ドライブ１０６２８、スウィート２５０、アークトゥラス・セラピューティクス・インコーポレイテッド内

(72)発明者　ムクタバーラム，ラジェシュ

アメリカ合衆国９２１２１カリフォルニア州サンディエゴ、サイエンス・センター・ドライブ１０６２８、スウィート２５０、アークトゥラス・セラピューティクス・インコーポレイテッド内

(72)発明者　サギ，アミット

アメリカ合衆国９２１２１カリフォルニア州サンディエゴ、サイエンス・センター・ドライブ１０６２８、スウィート２５０、アークトゥラス・セラピューティクス・インコーポレイテッド内

(72)発明者　カルマリ，プリヤ プラカシュ

アメリカ合衆国９２１２１カリフォルニア州サンディエゴ、サイエンス・センター・ドライブ１０６２８、スウィート２５０、アークトゥラス・セラピューティクス・インコーポレイテッド内

(72)発明者　チブクラ，パドマナブ

アメリカ合衆国９２１２１カリフォルニア州サンディエゴ、サイエンス・センター・ドライブ１０６２８、スウィート２５０、アークトゥラス・セラピューティクス・インコーポレイテッド内

Ｆターム（参考）　4B063　QA01 QQ02 QQ08 QR01 QR32 QR35 QR45 QR84 QS39

4C076　AA65 AA95 BB13 BB15 CC07 DD49 DD52 DD55 DD63 DD70 EE41 FF31 FF68

4C084　AA13 MA05 MA41 MA65 MA66 NA10 NA13 NA14 ZB091 ZB092

4C086　AA01 AA02 EA16 MA02 MA03 MA05 MA41 MA65 MA66 NA10 NA13 NA14 ZB09

4H045　BA17 BA18 BA56 EA20 FA10