(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7065036号
(P7065036)

(45)発行日　令和4年5月11日(2022.5.11)

(24)登録日　令和4年4月27日(2022.4.27)

(51)国際特許分類

Ａ６１Ｋ　48/00　(2006.01)		Ａ６１Ｋ	48/00
Ａ６１Ｋ　38/50　(2006.01)		Ａ６１Ｋ	38/50
Ａ６１Ｋ　47/18　(2006.01)		Ａ６１Ｋ	47/18
Ａ６１Ｐ　3/00　(2006.01)		Ａ６１Ｐ	3/00

ＦＩ

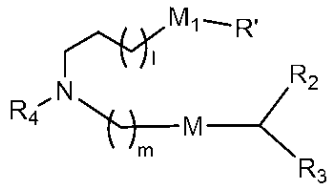
請求項の数　16　（全351頁）

(21)出願番号　特願2018-551890(P2018-551890)
(86)(22)出願日　平成28年12月16日(2016.12.16)
(65)公表番号　特表2019-500430(P2019-500430A)
(43)公表日　平成31年1月10日(2019.1.10)
(86)国際出願番号　PCT/US2016/067393
(87)国際公開番号　WO2017/106799
(87)国際公開日　平成29年6月22日(2017.6.22)
審査請求日　令和1年12月5日(2019.12.5)
(31)優先権主張番号　62/269,089
(32)優先日　平成27年12月17日(2015.12.17)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　62/269,092
(32)優先日　平成27年12月17日(2015.12.17)
最終頁に続く

(73)特許権者　518216249
モダーナティエックス・インコーポレイテッド
ＭｏｄｅｒｎａＴＸ，Ｉｎｃ．
アメリカ合衆国０２１３９マサチューセッツ州ケンブリッジ、テクノロジー・スクエア２００番
(74)代理人　100145403
弁理士　山尾 憲人
(74)代理人　100150500
弁理士　森本 靖
(74)代理人　100176474
弁理士　秋山 信彦
(72)発明者　パオロ・マルティーニ
アメリカ合衆国０２１３９マサチューセ
最終頁に続く

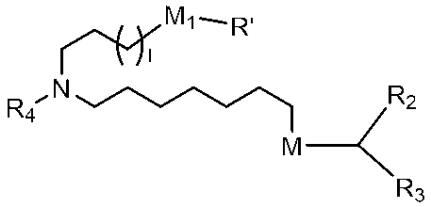
(54)【発明の名称】　メチルマロニルＣｏＡムターゼをコードするポリヌクレオチド

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
メチルマロニルＣｏＡムターゼ（ＭＣＭ）ポリペプチドをコードするオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）を含むポリヌクレオチドと、送達剤を含む医薬組成物であって、該送達剤が、式（ＩＡ）
【化１】

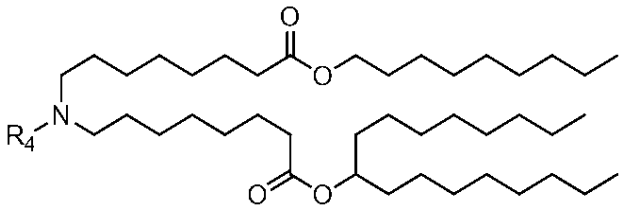


（ＩＡ）
（式中、
ｌは、１、２、３、４及び５から選択され、
ｍは、５、６、７、８、及び９から選択され、
Ｍ１は、単結合またはＭ’であり、
Ｒ４は、無置換Ｃ１～３アルキルまたは－（ＣＨ２）ｎＱであり、ここで、ｎは、１、２、３、４または５であり、Ｑは、ＯＨ、－ＮＨＣ（Ｓ）Ｎ（Ｒ）２、または－ＮＨＣ（Ｏ）Ｎ（Ｒ）２であり、

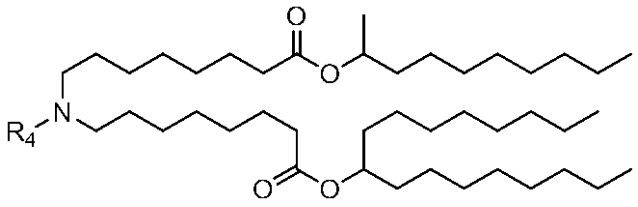
Ｍ及びＭ’は、Ｃ（Ｏ）Ｏ、ＯＣ（Ｏ）、Ｃ（Ｏ）Ｎ（Ｒ’）、Ｐ（Ｏ）（ＯＲ’）Ｏ、アリール基及びヘテロアリール基から独立して選択され、
Ｒ２及びＲ３は、Ｈ、Ｃ１～１４アルキル及びＣ２～１４アルケニルからなる群から独立して選択され、
各Ｒは、Ｃ１～３アルキル、Ｃ２～３アルケニル及びＨからなる群から独立して選択され、
各Ｒ’は、Ｃ１～１８アルキル、Ｃ２～１８アルケニル、－Ｒ＊ＹＲ”、－ＹＲ”、及びＨからなる群から独立して選択され、
各Ｒ”は、Ｃ３～１４アルキル及びＣ３～１４アルケニルからなる群から独立して選択され、
各Ｒ＊は、Ｃ１～１２アルキル及びＣ２～１２アルケニルからなる群から独立して選択され、
各Ｙは、独立して、Ｃ３～６炭素環である）
で示される化合物またはその塩を含む、医薬組成物。
【請求項２】
化合物が、式（ＩＩ）
【化２】



（ＩＩ）
（式中、
Ｒ４は、無置換Ｃ１～３アルキルまたは－（ＣＨ２）ｎＱであり、ここで、ｎは、２、３または４であり、Ｑは、ＯＨ、－ＮＨＣ（Ｓ）Ｎ（Ｒ）２、または－ＮＨＣ（Ｏ）Ｎ（Ｒ）２である）
で示される化合物またはその塩である、請求項１に記載の医薬組成物。
【請求項３】
化合物が、下記式（ＩＩａ）、（ＩＩｂ）、（ＩＩｃ）、または（ＩＩｅ）：
【化３】

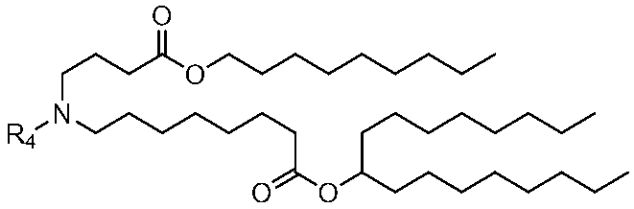


（ＩＩａ）
【化４】

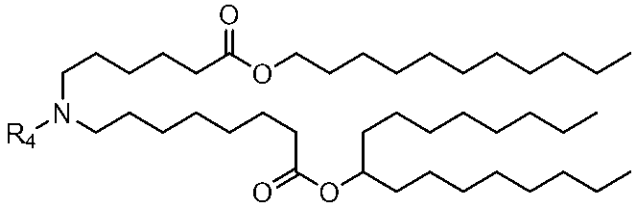


（ＩＩｂ）

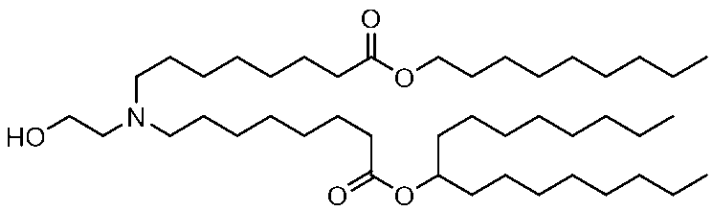
【化５】



（ＩＩｃ）
または
【化６】



（ＩＩｅ）
で示される化合物またはその塩である、請求項１に記載の医薬組成物
【請求項４】
Ｍ及びＭ’が独立して－Ｃ（Ｏ）Ｏ－または－ＯＣ（Ｏ）－である、請求項１に記載の医薬組成物。
【請求項５】
（ｉ）Ｒ２及びＲ３が、同じであり、Ｒ２及びＲ３が、Ｃ８アルキルであるか；または
（ｉｉ）Ｒ２及びＲ３が、異なる；
請求項１に記載の医薬組成物。
【請求項６】
（ｉ）ｎが、２である；
（ｉｉ）Ｒ’が、C4アルキル及びＣ４アルケニル、Ｃ５アルキル及びＣ５アルケニル、Ｃ６アルキル及びＣ６アルケニル、Ｃ７アルキル及びＣ７アルケニル、Ｃ９アルキル及びＣ９アルケニル、Ｃ１１アルキル及びＣ１１アルケニル、Ｃ１２アルキル、Ｃ１２アルケニル、Ｃ１３アルキル、Ｃ１３アルケニル、Ｃ１４アルキル、Ｃ１４アルケニル、Ｃ１５アルキル、Ｃ１５アルケニル、Ｃ１６アルキル、Ｃ１６アルケニル、Ｃ１７アルキル、Ｃ１７アルケニル、Ｃ１８アルキル及びＣ１８アルケニルから選択される；および/または
（ｉｉｉ）ｌが、３、４及び５から選択される；
請求項２に記載の医薬組成物。
【請求項７】
化合物が、式
【化７】

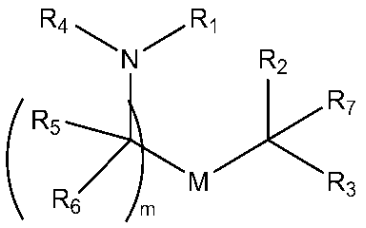


（化合物１８）
で示される化合物またはその塩である、請求項１に記載の医薬組成物。
【請求項８】

送達剤が、リン脂質、構造脂質、及びＰＥＧ脂質を更に含む、請求項１～７のいずれか一項に記載の医薬組成物。
【請求項９】
（ｉ）リン脂質が、１，２－ジリノレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＬＰＣ）、１，２－ジミリストイル－ｓｎ－グリセロ－ホスホコリン（ＤＭＰＣ）、１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＯＰＣ）、１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＰＰＣ）、１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＳＰＣ）、１，２－ジウンデカノイル－ｓｎ－グリセロ－ホスホコリン（ＤＵＰＣ）、１－パルミトイル－２－オレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＰＯＰＣ）、１，２－ジ－Ｏ－オクタデセニル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（１８：０　ジエーテル　ＰＣ）、１－オレオイル－２－コレステリルヘミスクシノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＯＣｈｅｍｓＰＣ）、１－ヘキサデシル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（Ｃ１６　Ｌｙｓｏ　ＰＣ）、１，２－ジリノレノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン、１，２－ジアラキドノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン、１，２－ジドコサヘキサエノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン、１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＯＰＥ）、１，２－ジフィタノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＭＥ１６：０　ＰＥ）、１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン、１，２－ジリノレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン、１，２－ジリノレノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン、１，２－ジアラキドノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン、１，２－ジドコサヘキサエノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン、１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホ－ｒａｃ－（１－グリセロール）ナトリウム塩（ＤＯＰＧ）、スフィンゴミエリン及びこれらの任意の混合物からなる群から選択される；
（ｉｉ）構造脂質が、コレステロール、フェコステロール、シトステロール、エルゴステロール、カンペステロール、スチグマステロール、ブラシカステロール、トマチジン、トマチン、ウルソル酸、α－トコフェロールまたはこれらの混合物である；および/または
（ｉｉｉ）ＰＥＧ脂質が、ＰＥＧ修飾化ホスファチジルエタノールアミン、ＰＥＧ修飾化ホスファチジン酸、ＰＥＧ修飾化セラミド、ＰＥＧ修飾化ジアルキルアミン、ＰＥＧ修飾化ジアシルグリセロール、ＰＥＧ修飾化ジアルキルグリセロールまたはこれらの任意の混合物である；
請求項８に記載の医薬組成物。
【請求項１０】
ＭＣＭポリペプチドが、配列番号２０８に対して、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、少なくとも約９９％または約１００％同一であるアミノ酸配列を含み、当該ＭＣＭポリペプチドが、メチルマロニルＣｏＡムターゼ活性を保持する、請求項１～９のいずれか一項に記載の医薬組成物。
【請求項１１】
ＭＣＭポリペプチドが、配列番号２０８、配列番号２０９、配列番号２１０、配列番号２１１、配列番号２１２、または配列番号２１３のアミノ酸配列を含む、請求項１～９のいずれか一項に記載の医薬組成物。
【請求項１２】
ＯＲＦが、配列番号７３２のヌクレオチド１～ヌクレオチド２２５０に対して、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％の配列同一性を有する、請求項１～１１のいずれか一項に記載の医薬組成物。
【請求項１３】
ポリヌクレオチドが、メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）である、請求項１～１２のいずれか一項に記載の医薬組成物。
【請求項１４】
（ｉ）ｍＲＮＡが、配列番号２１５のヌクレオチド配列を含む５'非翻訳領域（ＵＴＲ）を

含むか；または
（ｉｉ）ｍＲＮＡが、配列番号７２２中のｍｉＲ－１４２－３ｐ結合部位を含む；
請求項１３に記載の医薬組成物。
【請求項１５】
医薬組成物が、脂質ナノ粒子として製剤化される、請求項１～１４のいずれか一項に記載の医薬組成物。
【請求項１６】
ヒト患者のメチルマロン酸血症の治療及び／または予防における使用のための、請求項１～１５のいずれか一項に記載の医薬組成物。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
背景技術
メチルマロン酸血症（ＭＭＡ）は、代謝副産物のメチルマロン酸が患者において異常に蓄積することを特徴とする代謝障害である。ＭＭＡは、発達遅滞、知的障害、腎疾患、昏睡または更には死を引き起こす。ＭＭＡは、メチルマロン酸尿症とも称される。推定頻度は、５万～１０万人に１名である。ＭＭＡの現在の治療法は、主に、メチルマロン酸の生成をもたらす代謝経路の使用を制限する食事制限による。重症の場合、メチルマロン酸を適切に代謝し、除去することができる新しい細胞の貯蔵所を提供するために、腎移植及び肝移植も行われている。しかしながら、これらの治療のいずれも、完全にまたは確実にこの疾患を制御しない。したがって、ＭＭＡを治療するための改善された治療法が必要とされている。
【０００２】
ＭＭＡに関連する主な遺伝子は、メチルマロニルＣｏＡムターゼ（ＮＭ＿０００２５５、ＮＰ＿０００２４６、ＭＣＭまたはＭＵＴとも称される）である。ＭＣＭは、様々なアミノ酸、脂肪酸及びコレステロールの異化作用において重要な役割を果たす代謝酵素（Ｅ．Ｃ．５．４．９９．２）である。ＭＣＭの生物学的機能は、Ｌ－メチルマロニルＣｏＡをクレブス回路の中間体であるスクシニルＣｏＡに異性化することである。ＭＣＭは、細胞のミトコンドリアに局在し、その天然形態でホモ二量体として存在し、アデノシルコバラミン依存性である。ヒトＭＣＭの前駆体形態は７５０アミノ酸であるが、その成熟形態は、ミトコンドリア輸入及びプロセシング機構によって３２アミノ酸のリーダー配列が切断されるため、７１８アミノ酸である。このリーダー配列は、ＭＣＭのミトコンドリア標的ペプチド、ミトコンドリア標的配列またはミトコンドリア輸送ペプチドと様々に称される。
【０００３】
ＭＣＭ機能の完全な損失または部分的損失は、メチルマロン酸、プロピオニルカルニチン、アセチルカルニチン、プロピオニルＣｏＡ、Ｄ－メチルマロニルＣｏＡ及びＬ－メチルマロニルＣｏＡなどの異常代謝産物及びＭＣＭ上流の代謝中間体の蓄積をもたらす。例えば、ＭＣＭの欠損は、メチルマロン酸の１０００倍の増加をもたらすことが報告されている。それにもかかわらず、現在利用可能なＭＭＡ治療薬は存在しない。
【発明の概要】
【０００４】
本開示は、対象におけるメチルマロン酸血症を治療する方法であって、ＭＣＭポリペプチドをコードするｍＲＮＡを含む、有効量のポリヌクレオチドを対象に投与することを含み、当該投与により、対象におけるメチルマロン酸血症の症状が軽減する、方法を提供する。本開示はまた、ＭＣＭポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含む組成物を提供する。いくつかの実施形態において、組成物は、送達剤を含む。
【０００５】
いくつかの実施形態において、組成物は、ＭＣＭポリペプチドをコードするオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）を含むポリヌクレオチドと、送達剤とを含み、当該送達剤は、式（Ｉ）

【化１】



（Ｉ）

を有する化合物またはその塩もしくは立体異性体を含み、

式中、

Ｒ１は、Ｃ５～２０アルキル、Ｃ５～２０アルケニル、－Ｒ＊ＹＲ”、－ＹＲ”、及び－Ｒ”Ｍ’Ｒ’からなる群から選択され、

Ｒ２及びＲ３は、Ｈ、Ｃ１～１４アルキル、Ｃ２～１４アルケニル、－Ｒ＊ＹＲ”、－ＹＲ”、及び－Ｒ＊ＯＲ”からなる群から独立して選択されるか、Ｒ２及びＲ３は、それらが結合している原子とともに、複素環または炭素環を形成し、

Ｒ４は、Ｃ３～６炭素環、－（ＣＨ２）ｎＱ、－（ＣＨ２）ｎＣＨＱＲ、－ＣＨＱＲ、－ＣＱ（Ｒ）２、及び無置換Ｃ１～６アルキルからなる群から選択され、ここで、Ｑは、炭素環、複素環、－ＯＲ、－Ｏ（ＣＨ２）ｎＮ（Ｒ）２、－Ｃ（Ｏ）ＯＲ、－ＯＣ（Ｏ）Ｒ、－ＣＸ３、－ＣＸ２Ｈ、－ＣＸＨ２、－ＣＮ、－Ｎ（Ｒ）２、－Ｃ（Ｏ）Ｎ（Ｒ）２、－Ｎ（Ｒ）Ｃ（Ｏ）Ｒ、－Ｎ（Ｒ）Ｓ（Ｏ）２Ｒ、－Ｎ（Ｒ）Ｃ（Ｏ）Ｎ（Ｒ）２、－Ｎ（Ｒ）Ｃ（Ｓ）Ｎ（Ｒ）２、及び－Ｃ（Ｒ）Ｎ（Ｒ）２Ｃ（Ｏ）ＯＲから選択され、各ｎは、１、２、３、４及び５から独立して選択され、

各Ｒ５は、Ｃ１～３アルキル、Ｃ２～３アルケニル及びＨからなる群から独立して選択され、

各Ｒ６は、Ｃ１～３アルキル、Ｃ２～３アルケニル及びＨからなる群から独立して選択され、

Ｍ及びＭ’は、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－ＯＣ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｏ）Ｎ（Ｒ’）－、－Ｎ（Ｒ’）Ｃ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｓ）－、－Ｃ（Ｓ）Ｓ－、－ＳＣ（Ｓ）－、－ＣＨ（ＯＨ）－、－Ｐ（Ｏ）（ＯＲ’）Ｏ－、－Ｓ（Ｏ）$_2$－、アリール基及びヘテロアリール基から独立して選択され、

Ｒ７は、Ｃ１～３アルキル、Ｃ２～３アルケニル及びＨからなる群から選択され、

各Ｒは、Ｃ１～３アルキル、Ｃ２～３アルケニル及びＨからなる群から独立して選択され、

各Ｒ’は、Ｃ１～１８アルキル、Ｃ２～１８アルケニル、－Ｒ＊ＹＲ”、－ＹＲ”、及びＨからなる群から独立して選択され、

各Ｒ”は、Ｃ３～１４アルキル及びＣ３～１４アルケニルからなる群から独立して選択され、

各Ｒ＊は、Ｃ１～１２アルキル及びＣ２～１２アルケニルからなる群から独立して選択され、

各Ｙは、独立して、Ｃ３～６炭素環であり、

各Ｘは、Ｆ、Ｃｌ、Ｂｒ及びＩからなる群から独立して選択され、

ｍは、５、６、７、８、９、１０、１１、１２及び１３から選択され、

ただし、Ｒ４が－（ＣＨ２）ｎＱ、－（ＣＨ２）ｎＣＨＱＲ、－ＣＨＱＲ、または－ＣＱ（Ｒ）２である場合、（ｉ）ｎが１、２、３、４または５であるとき、Ｑは、－Ｎ（Ｒ）２ではないか、（ｉｉ）ｎが１または２であるとき、Ｑは、５、６または７員ヘテロシクロアルキルではない。

【０００６】

いくつかの実施形態において、送達剤は、リン脂質、構造脂質、ＰＥＧ脂質またはこれらの任意の組み合わせを更に含む。

【０００７】

いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、配列番号１～２０７、７３２～７６５及び７７２からなる群から選択されるポリヌクレオチドに対して、かなりの配列類似性を有するＯＲＦを含み、当該ＯＲＦは、ＭＣＭポリペプチドをコードする。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、配列番号１５１、１５２、１５３、１５４、７３２、７３３及び７３４（図９～１５）からなる群から選択されるポリヌクレオチドに対して、かなりの配列類似性を有するＯＲＦを含み、当該ＯＲＦは、ＭＣＭポリペプチドをコードする。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、配列番号７３４（図１１）に対して、かなりの配列類似性を有するＯＲＦを含み、当該ＯＲＦは、ＭＣＭポリペプチドをコードする。

【０００８】

いくつかの実施形態において、本開示は、配列番号７３４のヌクレオチド９７～ヌクレオチド２２５０に対して、少なくとも９９％または１００％の配列同一性を有するＯＲＦを含み、当該ＯＲＦは、ＭＣＭポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチドに関する。

【０００９】

いくつかの実施形態において、本開示は、配列番号７３２のヌクレオチド９７～ヌクレオチド２２５０に対して、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％の配列同一性を有するＯＲＦ配列を含み、当該ＯＲＦは、ＭＣＭポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチドに関する。

【００１０】

いくつかの実施形態において、本開示は、配列番号１８２、７３３及び７４１のヌクレオチド９７～ヌクレオチド２２５０からなる群から選択される配列に対して、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％の配列同一性を有するＯＲＦを含み、当該ＯＲＦは、ＭＣＭポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチドに関する。

【００１１】

いくつかの実施形態において、本開示は、配列番号７３５、７３６、７３８、７４３、７４４、７４８、７４９、７５０、７５４、７５５、７５８、７６２及び７６５のヌクレオチド９７～ヌクレオチド２２５０からなる群から選択される配列に対して、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％の配列同一性を有するＯＲＦを含み、当該ＯＲＦは、ＭＣＭポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチドに関する。

【００１２】

いくつかの実施形態において、本開示は、配列番号１８０、１８７、７３７、７３９、７４０、７４２、７４５、７４６、７４７、７５１、７５２、７５３、７５７、７５９、７６０、７６１、７６３及び７６４のヌクレオチド９７～ヌクレオチド２２５０からなる群から選択される配列に対して、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％の配列同一性を有するＯＲＦ配列を含み、当該ＯＲＦは、ＭＣＭポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチドに関する。

【００１３】

いくつかの実施形態において、本開示は、配列番号１８１及び７５６のヌクレオチド９７～ヌクレオチド２２５０からなる群から選択される配列に対して、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％の配列同一性を有するＯＲＦを含み、当該ＯＲＦは、ＭＣＭポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチドに関する。

【００１４】

いくつかの実施形態において、本開示は、配列番号１５４、１６５、１７１、１７３及び１７５のヌクレオチド９７～ヌクレオチド２２５０からなる群から選択される配列に対して、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％の配列同一性を有するＯＲＦを含み、当該ＯＲＦは、ＭＣＭポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチドに関する。

【００１５】

いくつかの実施形態において、本開示は、配列番号１５１、１５２、１５３、１６３、１６４、１６６、１６７、１６８、１６９、１７０、１７２、１７７、１７８、１７９、１９５及び２０４のヌクレオチド９７～ヌクレオチド２２５０からなる群から選択される配列に対して、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％の配列同一性を有するＯＲＦを含み、当該ＯＲＦは、ＭＣＭポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチドに関する。

【００１６】

いくつかの実施形態において、本開示は、配列番号１５６、１５７、１５８、１５９、１６０、１６１、１６２、１７４及び１７６のヌクレオチド９７～ヌクレオチド２２５０からなる群から選択される配列に対して、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％の配列同一性を有するＯＲＦを含み、当該ＯＲＦは、ＭＣＭポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチドに関する。

【００１７】

いくつかの実施形態において、本開示は、配列番号１５５及び２０３のヌクレオチド９７～ヌクレオチド２２５０からなる群から選択される配列に対して、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％の配列同一性を有するＯＲＦを含み、当該ＯＲＦは、ＭＣＭポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチドに関する。

【００１８】

いくつかの実施形態において、本開示は、配列番号６４、６６、７１、９１及び１２８のヌクレオチド９７～ヌクレオチド２２５０からなる群から選択される配列に対して、少なくとも８２％、少なくとも８３％、少なくとも８４％、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％の配列同一性を有するＯＲＦを含み、当該ＯＲＦは、ＭＣＭポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチドに関する。

【００１９】

いくつかの実施形態において、本開示は、配列番号９、１１、１８、１９、２１、２２、２３、２４、３２、３３、３７、３９、４０、４４、４５、４７、５０、５１、５２、５５、５７、６１、６５、７０、７９、８４、８６、８８、９０、９２、９８、１００、１１５、１１７、１２６、１２９、１３５、１３６、１３７、１４４、１４８、１５０、１８４、１９０、１９１及び２０６のヌクレオチド９７～ヌクレオチド２２５０からなる群から選択される配列に対して、少なくとも８１％、少なくとも８２％、少なくとも８３％、少なくとも８４％、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なく

とも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％の配列同一性を有するＯＲＦを含み、当該ＯＲＦは、ＭＣＭポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチドに関する。

【００２０】

いくつかの実施形態において、本開示は、配列番号３、５、６、８、１０、１２、１４、１６、１７、２０、２７、２８、２９、３１、３４、３５、３６、３８、４１、４２、４３、４６、４８、４９、５３、５４、５６、５８、６０、６３、６８、６９、７４、７７、７８、８０、８３、８５、８７、９３、９５、９６、９７、９９、１０２、１０３、１０４、１０５、１０７、１１０、１１２、１１３、１１４、１１６、１１９、１２０、１２２、１２３、１２４、１２５、１２７、１３１、１３２、１３３、１３４、１３８、１３９、１４０、１４１、１４２、１４３、１４７、１４９、１８３、１８６、１８８、１８９、１９２、１９３、１９４、１９６、１９７、１９８、１９９、２００、２０１、２０２、２０５及び２０７のヌクレオチド９７～ヌクレオチド２２５０からなる群から選択される配列に対して、少なくとも８０％、少なくとも８１％、少なくとも８２％、少なくとも８３％、少なくとも８４％、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％の配列同一性を有するＯＲＦを含み、当該ＯＲＦは、ＭＣＭポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチドに関する。

【００２１】

いくつかの実施形態において、本開示は、配列番号１、２、４、７、１３、１５、２５、２６、３０、５９、６２、６７、７２、７３、７５、７６、８１、８２、８９、９４、１０１、１０６、１０８、１０９、１１１、１１８、１２１、１３０、１４５、１４６及び１８５のヌクレオチド９７～ヌクレオチド２２５０からなる群から選択される配列に対して、少なくとも７９％、少なくとも８０％、少なくとも８１％、少なくとも８２％、少なくとも８３％、少なくとも８４％、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％の配列同一性を有するＯＲＦを含み、当該ＯＲＦは、ＭＣＭポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチドに関する。

【００２２】

いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、輸送ペプチド、例えば、ミトコンドリア輸送ペプチドをコードするヌクレオチド配列を更に含む。ミトコンドリア輸送ペプチドは、ＭＣＭのミトコンドリアへの運搬またはＭＣＭのミトコンドリア内の局在化を促進する任意のペプチドであってよい。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、表１に列挙される群から選択されるミトコンドリア輸送ペプチド（配列番号２５１～２６５）をコードするヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、配列番号２７０～７１９からなる群から選択されるミトコンドリア輸送ペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む。

【００２３】

いくつかの実施形態において、本開示は、配列番号７３４のヌクレオチド１～ヌクレオチド２２５０に対して、少なくとも９９％または１００％の配列同一性を有するＯＲＦを含み、当該ＯＲＦは、ＭＣＭポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチドに関する。

【００２４】

いくつかの実施形態において、本開示は、配列番号７３２のヌクレオチド１～ヌクレオチド２２５０に対して、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％の配列同一

性を有するＯＲＦを含み、当該ＯＲＦは、ＭＣＭポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチドに関する。

【００２５】

いくつかの実施形態において、本開示は、配列番号１８２及び７３３のヌクレオチド１～ヌクレオチド２２５０からなる群から選択される配列に対して、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％の配列同一性を有するＯＲＦを含み、当該ＯＲＦは、ＭＣＭポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチドに関する。

【００２６】

いくつかの実施形態において、本開示は、配列番号７３５、７４１、７４３、７４４、７４８、７５８、７６２及び７６５のヌクレオチド１～ヌクレオチド２２５０からなる群から選択される配列に対して、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％の配列同一性を有するＯＲＦを含み、当該ＯＲＦは、ＭＣＭポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチドに関する。

【００２７】

いくつかの実施形態において、本開示は、配列番号１８０、１８１、７３６、７３８、７３９、７４０、７４２、７４６、７４７、７４９、７５０、７５１、７５２、７５３、７５４、７５５、７５７、７５９、７６０、７６１及び７６３のヌクレオチド１～ヌクレオチド２２５０からなる群から選択される配列に対して、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％の配列同一性を有するＯＲＦを含み、当該ＯＲＦは、ＭＣＭポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチドに関する。

【００２８】

いくつかの実施形態において、本開示は、配列番号７４５、７５６及び７６４のヌクレオチド１～ヌクレオチド２２５０からなる群から選択される配列に対して、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％の配列同一性を有するＯＲＦを含み、当該ＯＲＦは、ＭＣＭポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチドに関する。

【００２９】

いくつかの実施形態において、本開示は、配列番号１５４、１６５、１７１、１７３及び１７５のヌクレオチド１～ヌクレオチド２２５０からなる群から選択される配列に対して、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％の配列同一性を有するＯＲＦを含み、当該ＯＲＦは、ＭＣＭポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチドに関する。

【００３０】

いくつかの実施形態において、本開示は、配列番号１５１、１５２、１５３、１６３、１６６、１６７、１６８、１６９、１７０、１７２、１７７、１７８、１７９、１８７及び２０４のヌクレオチド１～ヌクレオチド２２５０からなる群から選択される配列に対して、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％の配列同一性を有するＯＲＦを含み、当該ＯＲＦは、ＭＣＭポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチドに関する。

【００３１】

いくつかの実施形態において、本開示は、配列番号１５６、１５７、１５８、１５９、１

６０、１６２、１６４、１７４、１７６、１９５及び７３７のヌクレオチド１～ヌクレオチド２２５０からなる群から選択される配列に対して、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％の配列同一性を有するＯＲＦを含み、当該ＯＲＦは、ＭＣＭポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチドに関する。

【００３２】

いくつかの実施形態において、本開示は、配列番号１５５、１６１及び２０３のヌクレオチド１～ヌクレオチド２２５０からなる群から選択される配列に対して、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％の配列同一性を有するＯＲＦを含み、当該ＯＲＦは、ＭＣＭポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチドに関する。

【００３３】

いくつかの実施形態において、本開示は、配列番号７１及び１２８のヌクレオチド１～ヌクレオチド２２５０からなる群から選択される配列に対して、少なくとも８２％、少なくとも８３％、少なくとも８４％、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％の配列同一性を有するＯＲＦを含み、当該ＯＲＦは、ＭＣＭポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチドに関する。

【００３４】

いくつかの実施形態において、本開示は、配列番号４、６、８、９、１１、１９、２２、２３、２４、３２、３３、３７、４０、４４、４５、４７、５１、６１、６４、６５、６６、７９、８４、８６、９０、９１、９２、１００、１０１、１１２、１１５、１１７、１２６、１２９、１３５、１３６、１４６、１４８、１８４、１９０及び１９１のヌクレオチド１～ヌクレオチド２２５０からなる群から選択される配列に対して、少なくとも８１％、少なくとも８２％、少なくとも８３％、少なくとも８４％、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％の配列同一性を有するＯＲＦを含み、当該ＯＲＦは、ＭＣＭポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチドに関する。

【００３５】

いくつかの実施形態において、本開示は、配列番号２、３、５、７、１０、１２、１３、１４、１５、１６、１８、２０、２１、２６、２７、２８、２９、３１、３４、３６、３８、３９、４１、４２、４３、４６、４８、４９、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６２、６８、６９、７０、７２、７３、７４、７６、７７、８０、８３、８５、８８、９５、９６、９７、９８、１０２、１０４、１０５、１０６、１０７、１０８、１０９、１１０、１１３、１１４、１２０、１２１、１２２、１２３、１２４、１２７、１３１、１３２、１３３、１３４、１３７、１３８、１３９、１４０、１４１、１４２、１４４、１４５、１４７、１４９、１５０、１８６、１８８、１８９、１９２、１９３、１９４、１９６、１９８、１９９、２００、２０２、２０５、２０６及び２０７のヌクレオチド１～ヌクレオチド２２５０からなる群から選択される配列に対して、少なくとも８０％、少なくとも８１％、少なくとも８２％、少なくとも８３％、少なくとも８４％、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくと

も９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％の配列同一性を有するＯＲＦを含み、当該ＯＲＦは、ＭＣＭポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチドに関する。

【００３６】

いくつかの実施形態において、本開示は、配列番号１、１７、２５、３０、３５、５０、６３、６７、７５、７８、８１、８２、８７、８９、９３、９４、９９、１０３、１１１、１１６、１１８、１１９、１２５、１３０、１４３、１８３、１８５、１９７及び２０１のヌクレオチド１～ヌクレオチド２２５０からなる群から選択される配列に対して、少なくとも７９％、少なくとも８０％、少なくとも８１％、少なくとも８２％、少なくとも８３％、少なくとも８４％、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％の配列同一性を有するＯＲＦを含み、当該ＯＲＦは、ＭＣＭポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチドに関する。

【００３７】

いくつかの実施形態において、本開示は、機能性ＭＣＭまたはその断片をコードするポリヌクレオチドに関する。いくつかの実施形態において、本開示は、機能性ヒトＭＣＭ（配列番号２０８、配列番号２０９、配列番号２１０、配列番号２１１、配列番号２１２及び配列番号２１３）をコードするポリヌクレオチドを提供する。いくつかの実施形態において、本開示は、ＭＣＭ配列中に少なくとも１つの点変異を有するが、ＭＣＭ酵素活性を依然として保持する機能性ＭＣＭポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを提供する。いくつかの実施形態において、コードされたＭＣＭポリペプチドは、配列番号２０９、配列番号２１０、配列番号２１１、配列番号２１２及び配列番号２１３のポリペプチド配列によってそれぞれ定義されるように、点変異Ｖ６９、Ｔ４９９、Ｈ５３２、Ａ５９８及びＶ６７１のうちの１つ以上を含む。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、当該技術分野の他の分子の欠点を回避するように、完全にまたは部分的に修飾される（例えば、化学修飾及び／または構造的修飾）。本開示のポリヌクレオチドは、ＩＶＴポリヌクレオチド、キメラポリヌクレオチドまたは環状ポリヌクレオチドとして合成することができ、そのような実施形態が企図される。

【００３８】

いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、少なくとも１つの化学修飾されたヌクレオシドを含む、ＤＮＡまたはＲＮＡである。いくつかの実施形態において、少なくとも１つの化学修飾されたヌクレオシドは、本明細書に記載されるもののいずれかから選択される。

【００３９】

いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、5'ＵＴＲを更に含むか、5'ＵＴＲを更にコードする。他の実施形態において、ポリヌクレオチドは、3'ＵＴＲを更に含むか、3'ＵＴＲを更にコードする。いくつかの実施形態において、ＵＴＲは、ｍｉＲＮＡ（例えば、ｍｉＲ－１４２－３ｐ、ｍｉＲ－１４２－５ｐ、ｍｉＲ－１２６－３ｐ、及び／またはｍｉＲ－１２６－５ｐ）を含むか、ｍｉＲＮＡをコードする。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、5'末端キャップを更に含む。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、3'ポリＡテールを更に含むか、3'ポリＡテールを更にコードする。

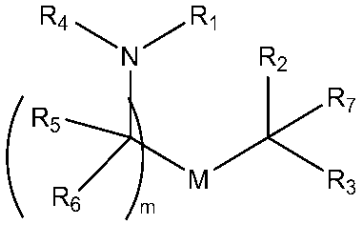
【００４０】

いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、ＲＮＡ、例えば、ｍＲＮＡである。いくつかの実施形態において、ｍＲＮＡは、配列番号７６６～７７１に列挙される配列を含む。

【００４１】

いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）担体中に製

剤化されるＲＮＡポリヌクレオチドである。
【００４２】
本開示はまた、対象におけるメチルマロン酸血症を治療する方法であって、ＭＣＭポリペプチドをコードするｍＲＮＡを含む、有効量のポリヌクレオチドを対象に投与することを含み、当該投与により、対象におけるメチルマロン酸血症の症状が軽減する、方法に関する。いくつかの実施形態において、本開示に有用なポリヌクレオチドは、本明細書に記載されるＭＣＭポリペプチドをコードするポリヌクレオチドのうちのいずれか１つであるか、本明細書に記載される組成物のうちのいずれか１つとして製剤化される。
【００４３】
いくつかの実施形態において、本開示は、メチルマロン酸血症に関連する代謝産物のレベルを減少させることを、それを必要とする対象において行う方法を含み、当該方法は、ＭＣＭポリペプチドをコードするｍＲＮＡを含む、有効量のポリヌクレオチドを対象に投与することを含む。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、本明細書に別途記載されるポリヌクレオチドであるか、本明細書に記載される組成物として製剤化される。ある特定の実施形態において、ポリヌクレオチドは、投与後、対象に存在するメチルマロン酸のレベルを、少なくとも約１０％、少なくとも約２０％、少なくとも約３０％、少なくとも約４０％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％または約１００％減少させる。他の実施形態において、ポリヌクレオチドは、投与後、対象に存在するプロピオニルカルニチンのレベルを、少なくとも約１０％、少なくとも約２０％、少なくとも約３０％、少なくとも約４０％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％または約１００％減少させる。更に他の実施形態において、ポリヌクレオチドは、投与後、対象に存在するアセチルカルニチンのレベルを、少なくとも約１０％、少なくとも約２０％、少なくとも約３０％、少なくとも約４０％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％または約１００％減少させる。ある特定の実施形態において、投与後、メチルマロン酸血症に関連する１つ以上の代謝産物が、ポリヌクレオチドの投与の１日以内、２日以内、３日以内、４日以内、５日以内、７日以内、１週間以内、２週間以内、３週間以内、または１ヶ月以内に減少する。
【００４４】
本開示の種々の実施形態の詳細については、以下の発明を実施するための形態に記載される。本開示の他の特長、目的及び利点は、発明を実施するための形態及び図面ならびに特許請求の範囲から明らかになるであろう。
【００４５】
実施形態
Ｅ１．ＭＣＭポリペプチドをコードするオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）を含むポリヌクレオチドと、送達剤とを含む、組成物であって、当該送達剤は、式（Ｉ）
【化２】



（Ｉ）
を有する化合物またはその塩もしくは立体異性体を含み、
式中、
Ｒ１は、Ｃ５～２０アルキル、Ｃ５～２０アルケニル、－Ｒ＊ＹＲ”、－ＹＲ”、及び－Ｒ”Ｍ’Ｒ’からなる群から選択され、

Ｒ２及びＲ３は、Ｈ、Ｃ１～１４アルキル、Ｃ２～１４アルケニル、－Ｒ＊ＹＲ”、－ＹＲ”、及び－Ｒ＊ＯＲ”からなる群から独立して選択されるか、R_2及びＲ３は、それらが結合している原子とともに、複素環または炭素環を形成し、
Ｒ４は、Ｃ３～６炭素環、－（ＣＨ２）ｎＱ、－（ＣＨ２）ｎＣＨＱＲ、－ＣＨＱＲ、－ＣＱ（Ｒ）２、及び無置換Ｃ１～６アルキルからなる群から選択され、ここで、Ｑは、炭素環、複素環、－ＯＲ、－Ｏ（ＣＨ２）ｎＮ（Ｒ）２、－Ｃ（Ｏ）ＯＲ、－ＯＣ（Ｏ）Ｒ、－ＣＸ３、－ＣＸ２Ｈ、－ＣＸＨ２、－ＣＮ、－Ｎ（Ｒ）２、－Ｃ（Ｏ）Ｎ（Ｒ）２、－Ｎ（Ｒ）Ｃ（Ｏ）Ｒ、－Ｎ（Ｒ）Ｓ（Ｏ）２Ｒ、－Ｎ（Ｒ）Ｃ（Ｏ）Ｎ（Ｒ）２、－Ｎ（Ｒ）Ｃ（Ｓ）Ｎ（Ｒ）２、及び－Ｃ（Ｒ）Ｎ（Ｒ）２Ｃ（Ｏ）ＯＲから選択され、各ｎは、１、２、３、４及び５から独立して選択され、
各Ｒ５は、Ｃ１～３アルキル、Ｃ２～３アルケニル及びＨからなる群から独立して選択され、
各Ｒ６は、Ｃ１～３アルキル、Ｃ２～３アルケニル及びＨからなる群から独立して選択され、
Ｍ及びＭ’は、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－ＯＣ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｏ）Ｎ（Ｒ’）－、－Ｎ（Ｒ’）Ｃ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｓ）－、－Ｃ（Ｓ）Ｓ－、－ＳＣ（Ｓ）－、－ＣＨ（ＯＨ）－、－Ｐ（Ｏ）（ＯＲ’）Ｏ－、－Ｓ（Ｏ）$_2$－、アリール基及びヘテロアリール基から独立して選択され、
Ｒ７は、Ｃ１～３アルキル、Ｃ２～３アルケニル及びＨからなる群から選択され、
各Ｒは、Ｃ１～３アルキル、Ｃ２～３アルケニル及びＨからなる群から独立して選択され、
各Ｒ’は、Ｃ$_1$～１８アルキル、Ｃ２～１８アルケニル、－Ｒ＊ＹＲ”、－ＹＲ”、及びＨからなる群から独立して選択され、
各Ｒ”は、Ｃ$_3$～１４アルキル及びＣ３～１４アルケニルからなる群から独立して選択され、
各Ｒ＊は、Ｃ１～１２アルキル及びＣ２～１２アルケニルからなる群から独立して選択され、
各Ｙは、独立して、Ｃ３～６炭素環であり、
各Ｘは、Ｆ、Ｃｌ、Ｂｒ及びＩからなる群から独立して選択され、
ｍは、５、６、７、８、９、１０、１１、１２及び１３から選択され、
ただし、Ｒ４が－（ＣＨ２）ｎＱ、－（ＣＨ２）ｎＣＨＱＲ、－ＣＨＱＲ、または－ＣＱ（Ｒ）２である場合、（ｉ）ｎが１、２、３、４または５であるとき、Ｑは、－Ｎ（Ｒ）２ではないか、（ｉｉ）ｎが１または２であるとき、Ｑは、５、６または７員ヘテロシクロアルキルではない、当該組成物。

【００４６】

Ｅ２．当該ＯＲＦが、配列番号１～２０７、７３２～７６５及び７７２のヌクレオチド９７～ヌクレオチド２２５０からなる群から選択される配列に対して、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％の配列同一性を有する、実施形態１に記載の組成物。

【００４７】

Ｅ３．当該ＯＲＦが、
（ｉ）配列番号７３４のヌクレオチド９７～ヌクレオチド２２５０に対して、少なくとも９９％または１００％の配列同一性を有するか、
（ｉｉ）配列番号７３２のヌクレオチド９７～ヌクレオチド２２５０に対して、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％の配列同一性を有するか、
（ｉｉｉ）配列番号１８２、７３３及び７４１のヌクレオチド９７～ヌクレオチド２２５０からなる群から選択される配列に対して、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９

８％、少なくとも９９％または１００％の配列同一性を有するか、
（ｉｖ）配列番号７３５、７３６、７３８、７４３、７４４、７４８、７４９、７５０、７５４、７５５、７５８、７６２及び７６５のヌクレオチド９７～ヌクレオチド２２５０からなる群から選択される配列に対して、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％の配列同一性を有するか、
（ｖ）配列番号１８０、１８７、７３７、７３９、７４０、７４２、７４５、７４６、７４７、７５１、７５２、７５３、７５７、７５９、７６０、７６１、７６３及び７６４のヌクレオチド９７～ヌクレオチド２２５０からなる群から選択される配列に対して、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％の配列同一性を有するか、
（ｖｉ）配列番号１８１及び７５６のヌクレオチド９７～ヌクレオチド２２５０からなる群から選択される配列に対して、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％の配列同一性を有するか、
（ｖｉｉ）配列番号１５４、１６５、１７１、１７３及び１７５のヌクレオチド９７～ヌクレオチド２２５０からなる群から選択される配列に対して、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％の配列同一性を有するか、
（ｖｉｉｉ）配列番号１５１、１５２、１５３、１６３、１６４、１６６、１６７、１６８、１６９、１７０、１７２、１７７、１７８、１７９、１９５及び２０４のヌクレオチド９７～ヌクレオチド２２５０からなる群から選択される配列に対して、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％の配列同一性を有するか、
（ｉｘ）配列番号１５６、１５７、１５８、１５９、１６０、１６１、１６２、１７４及び１７６のヌクレオチド９７～ヌクレオチド２２５０からなる群から選択される配列に対して、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％の配列同一性を有するか、
（ｘ）配列番号１５５及び２０３のヌクレオチド９７～ヌクレオチド２２５０からなる群から選択される配列に対して、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％の配列同一性を有するか、
（ｘｉ）配列番号６４、６６、７１、９１及び１２８のヌクレオチド９７～ヌクレオチド２２５０からなる群から選択される配列に対して、少なくとも８２％、少なくとも８３％、少なくとも８４％、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％の配列同一性を有するか、
（ｘｉｉ）配列番号９、１１、１８、１９、２１、２２、２３、２４、３２、３３、３７、３９、４０、４４、４５、４７、５０、５１、５２、５５、５７、６１、６５、７０、

７９、８４、８６、８８、９０、９２、９８、１００、１１５、１１７、１２６、１２９、１３５、１３６、１３７、１４４、１４８、１５０、１８４、１９０、１９１及び２０６のヌクレオチド９７～ヌクレオチド２２５０からなる群から選択される配列に対して、少なくとも８１％、少なくとも８２％、少なくとも８３％、少なくとも８４％、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％の配列同一性を有するか、

（ｘｉｉｉ）配列番号３、５、６、８、１０、１２、１４、１６、１７、２０、２７、２８、２９、３１、３４、３５、３６、３８、４１、４２、４３、４６、４８、４９、５３、５４、５６、５８、６０、６３、６８、６９、７４、７７、７８、８０、８３、８５、８７、９３、９５、９６、９７、９９、１０２、１０３、１０４、１０５、１０７、１１０、１１２、１１３、１１４、１１６、１１９、１２０、１２２、１２３、１２４、１２５、１２７、１３１、１３２、１３３、１３４、１３８、１３９、１４０、１４１、１４２、１４３、１４７、１４９、１８３、１８６、１８８、１８９、１９２、１９３、１９４、１９６、１９７、１９８、１９９、２００、２０１、２０２、２０５及び２０７のヌクレオチド９７～ヌクレオチド２２５０からなる群から選択される配列に対して、少なくとも８０％、少なくとも８１％、少なくとも８２％、少なくとも８３％、少なくとも８４％、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％の配列同一性を有するか、

（ｘｉｖ）配列番号１、２、４、７、１３、１５、２５、２６、３０、５９、６２、６７、７２、７３、７５、７６、８１、８２、８９、９４、１０１、１０６、１０８、１０９、１１１、１１８、１２１、１３０、１４５、１４６及び１８５のヌクレオチド９７～ヌクレオチド２２５０からなる群から選択される配列に対して、少なくとも７９％、少なくとも８０％、少なくとも８１％、少なくとも８２％、少なくとも８３％、少なくとも８４％、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％の配列同一性を有する、

実施形態１または２に記載の組成物。

【００４８】

Ｅ４．当該ＯＲＦが、輸送ペプチドをコードする核酸配列を更に含む、実施形態１～３のいずれか１つに記載の組成物。

【００４９】

Ｅ５．当該輸送ペプチドが、ミトコンドリア輸送ペプチドを含む、実施形態４に記載の組成物。

【００５０】

Ｅ６．当該ミトコンドリア輸送ペプチドが、配列番号２５１～２６５及び２７０～７１９からなる群から選択されるタンパク質に由来する、実施形態５に記載の組成物。

【００５１】

Ｅ７．輸送ペプチドをコードする核酸配列が、配列番号１～２０７、７３２～７６５及び７７２のヌクレオチド１～９６からなる群から選択される配列に対して、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、少なくとも約９９％または約１００％の配列同一性を有する、実施形態４～６のいずれか１つに記載の組成物。

【００５２】

Ｅ８．当該ＯＲＦが、

（ｉ）配列番号７３４のヌクレオチド１～ヌクレオチド２２５０に対して、少なくとも９

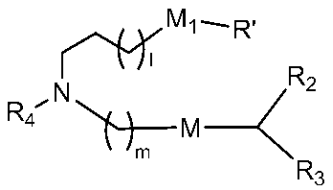
９％または１００％の配列同一性を有するか、
（ｉｉ）配列番号７３２のヌクレオチド１～ヌクレオチド２２５０に対して、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％の配列同一性を有するか、
（ｉｉｉ）配列番号１８２及び７３３のヌクレオチド１～ヌクレオチド２２５０からなる群から選択される配列に対して、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％の配列同一性を有するか、
（ｉｖ）配列番号７３５、７４１、７４３、７４４、７４８、７５８、７６２及び７６５のヌクレオチド１～ヌクレオチド２２５０からなる群から選択される配列に対して、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％の配列同一性を有するか、
（ｖ）配列番号１８０、１８１、７３６、７３８、７３９、７４０、７４２、７４６、７４７、７４９、７５０、７５１、７５２、７５３、７５４、７５５、７５７、７５９、７６０、７６１及び７６３のヌクレオチド１～ヌクレオチド２２５０からなる群から選択される配列に対して、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％の配列同一性を有するか、
（ｖｉ）配列番号７４５、７５６及び７６４のヌクレオチド１～ヌクレオチド２２５０からなる群から選択される配列に対して、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％の配列同一性を有するか、
（ｖｉｉ）配列番号１５４、１６５、１７１、１７３及び１７５のヌクレオチド１～ヌクレオチド２２５０からなる群から選択される配列に対して、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％の配列同一性を有するか、
（ｖｉｉｉ）配列番号１５１、１５２、１５３、１６３、１６６、１６７、１６８、１６９、１７０、１７２、１７７、１７８、１７９、１８７及び２０４のヌクレオチド１～ヌクレオチド２２５０からなる群から選択される配列に対して、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％の配列同一性を有するか、
（ｉｘ）配列番号１５６、１５７、１５８、１５９、１６０、１６２、１６４、１７４、１７６、１９５及び７３７のヌクレオチド１～ヌクレオチド２２５０からなる群から選択される配列に対して、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％の配列同一性を有するか、
（ｘ）配列番号１５５、１６１及び２０３のヌクレオチド１～ヌクレオチド２２５０からなる群から選択される配列に対して、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％の配列同一性を有するか、
（ｘｉ）配列番号７１及び１２８のヌクレオチド１～ヌクレオチド２２５０からなる群から選択される配列に対して、少なくとも８２％、少なくとも８３％、少なくとも８４％、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくと

も８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％の配列同一性を有するか、
（ｘｉｉ）配列番号４、６、８、９、１１、１９、２２、２３、２４、３２、３３、３７、４０、４４、４５、４７、５１、６１、６４、６５、６６、７９、８４、８６、９０、９１、９２、１００、１０１、１１２、１１５、１１７、１２６、１２９、１３５、１３６、１４６、１４８、１８４、１９０及び１９１のヌクレオチド１～ヌクレオチド２２５０からなる群から選択される配列に対して、少なくとも８１％、少なくとも８２％、少なくとも８３％、少なくとも８４％、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％の配列同一性を有するか、
（ｘｉｉｉ）配列番号２、３、５、７、１０、１２、１３、１４、１５、１６、１８、２０、２１、２６、２７、２８、２９、３１、３４、３６、３８、３９、４１、４２、４３、４６、４８、４９、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６２、６８、６９、７０、７２、７３、７４、７６、７７、８０、８３、８５、８８、９５、９６、９７、９８、１０２、１０４、１０５、１０６、１０７、１０８、１０９、１１０、１１３、１１４、１２０、１２１、１２２、１２３、１２４、１２７、１３１、１３２、１３３、１３４、１３７、１３８、１３９、１４０、１４１、１４２、１４４、１４５、１４７、１４９、１５０、１８６、１８８、１８９、１９２、１９３、１９４、１９６、１９８、１９９、２００、２０２、２０５、２０６及び２０７のヌクレオチド１～ヌクレオチド２２５０からなる群から選択される配列に対して、少なくとも８０％、少なくとも８１％、少なくとも８２％、少なくとも８３％、少なくとも８４％、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％の配列同一性を有するか、
（ｘｉｖ）配列番号１、１７、２５、３０、３５、５０、６３、６７、７５、７８、８１、８２、８７、８９、９３、９４、９９、１０３、１１１、１１６、１１８、１１９、１２５、１３０、１４３、１８３、１８５、１９７及び２０１のヌクレオチド１～ヌクレオチド２２５０からなる群から選択される配列に対して、少なくとも７９％、少なくとも８０％、少なくとも８１％、少なくとも８２％、少なくとも８３％、少なくとも８４％、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％の配列同一性を有する、
実施形態１～７のいずれか１つに記載の組成物。
【００５３】
Ｅ９．当該ＭＣＭポリペプチドが、配列番号２０８に対して、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、少なくとも約９９％または約１００％同一であるアミノ酸配列を含み、当該ＭＣＭポリペプチドが、メチルマロニルＣｏＡムターゼ活性を保持する、実施形態１～８のいずれか１つに記載の組成物。
【００５４】
Ｅ１０．当該ＭＣＭポリペプチドが配列番号２０９を含む、実施形態９に記載の組成物。
【００５５】
Ｅ１１．当該ＭＣＭポリペプチドが配列番号２１０を含む、実施形態９に記載の組成物。
【００５６】
Ｅ１２．当該ＭＣＭポリペプチドが配列番号２１１を含む、実施形態９に記載の組成物。
【００５７】

Ｅ１３．当該ＭＣＭポリペプチドが配列番号２１２を含む、実施形態９に記載の組成物。
【００５８】
Ｅ１４．当該ＭＣＭポリペプチドが配列番号２１３を含む、実施形態９に記載の組成物。
【００５９】
Ｅ１５．当該ポリヌクレオチドが、少なくとも１つの化学修飾された核酸塩基、糖、骨格またはこれらの任意の組み合わせを含む、実施形態１～１４のいずれか１つに記載の組成物。
【００６０】
Ｅ１６．当該少なくとも１つの化学修飾された核酸塩基が、プソイドウラシル（ψ）、Ｎ１－メチルプソイドウラシル（ｍ１ψ）、２－チオウラシル（ｓ２Ｕ）、４’－チオウラシル、５－メチルシトシン、５－メチルウラシル及びこれらの任意の組み合わせからなる群から選択される、実施形態１５に記載の組成物。
【００６１】
Ｅ１７．当該少なくとも１つの化学修飾されたヌクレオシドが５－メトキシウラシルである、実施形態１６に記載の組成物。
【００６２】
Ｅ１８．当該ポリヌクレオチド配列中のヌクレオシドが、少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９９％または１００％化学修飾されている、実施形態１～１７のいずれか１つに記載の組成物。
【００６３】
Ｅ１９．当該ポリヌクレオチド配列中の化学修飾されたヌクレオシドが、ウリジン、アデニン、シトシン、グアニン及びこれらの任意の組み合わせからなる群から選択される、実施形態１５～１８のいずれか１つに記載の組成物。
【００６４】
Ｅ２０．当該ポリヌクレオチド配列中のウリジンヌクレオシドが、少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９９％または１００％化学修飾されている、実施形態１～１９のいずれか１つに記載の組成物。
【００６５】
Ｅ２１．当該ポリヌクレオチド配列中のアデニンヌクレオシドが、少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９９％または１００％化学修飾されている、実施形態１～２０のいずれか１つに記載の組成物。
【００６６】
Ｅ２２．当該ポリヌクレオチド配列中のシトシンヌクレオシドが、少なくとも少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９９％または１００％化学修飾されている、実施形態１～２１のいずれか１つに記載の組成物。
【００６７】
Ｅ２３．当該ポリヌクレオチド配列中のグアニンヌクレオシドが、少なくとも少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９９％または１００％化学修飾されている、実施形態１～２２のいずれか１つに記載の組成物。
【００６８】

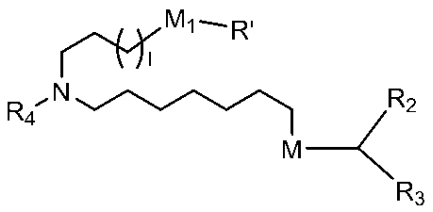
Ｅ２４．当該ポリヌクレオチドが５'ＵＴＲを更に含む、実施形態１～２３のいずれか１つに記載の組成物。
【００６９】
Ｅ２５．当該５'ＵＴＲが、配列番号２１５～２３１、２６６及び７２５～７３１から選択される配列に対して、少なくとも９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％同一である核酸配列を含む、実施形態２４に記載の組成物。
【００７０】
Ｅ２６．当該ポリヌクレオチドがｍｉＲＮＡ結合部位を更に含む、実施形態１～２５のいずれか１つに記載の組成物。
【００７１】
Ｅ２７．当該ｍｉＲＮＡ結合部位が、配列番号７２０、７２１、７２２、７２３及び７２４から選択される１つ以上のポリヌクレオチド配列を含む、実施形態２６に記載の組成物。
【００７２】
Ｅ２８．当該ｍｉＲＮＡ結合部位が、ｍｉＲ－１４２またはｍｉＲ－１２６に結合する、実施形態２６に記載の組成物。
【００７３】
Ｅ２９．当該ｍｉＲＮＡ結合部位が、ｍｉＲ－１４２－３ｐ、ｍｉＲ－１４２－５ｐ、ｍｉＲ－１２６－３ｐまたはｍｉＲ－１２６－５ｐに結合する、実施形態２６に記載の組成物。
【００７４】
Ｅ３０．当該５'ＵＴＲが、配列番号７２５、７２６、７２７、７２８、７２９、７３０及び７３１から選択される配列を含む、実施形態２４に記載の組成物。
【００７５】
Ｅ３１．当該５'ＵＴＲが、配列最適化されている、実施形態２４～３０のいずれか１つに記載の組成物。
【００７６】
Ｅ３２．当該ポリヌクレオチドが３'ＵＴＲを更に含む、実施形態１～３１のいずれか１つに記載の組成物。
【００７７】
Ｅ３３．当該３'ＵＴＲが、配列番号２３２～２４８及び２６７から選択される配列に対して、少なくとも９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％同一である核酸配列を含む、実施形態３２に記載の組成物。
【００７８】
Ｅ３４．当該３'ＵＴＲが、コドン最適化されている、実施形態３２または３３に記載の組成物。
【００７９】
Ｅ３５．当該ポリヌクレオチドが５'末端キャップを更に含む、実施形態１～３４のいずれか１つに記載の組成物。
【００８０】
Ｅ３６．当該５'末端キャップが、Ｃａｐ０、Ｃａｐ１、ＡＲＣＡ、イノシン、Ｎ１－メチル－グアノシン、２’フルオロ－グアノシン、７－デアザ－グアノシン、８－オキソ－グアノシン、２－アミノ－グアノシン、ＬＮＡ－グアノシン、２－アジドグアノシン、Ｃａｐ２、Ｃａｐ４、５'メチルＧキャップまたはこれらの類似体である、実施形態３５に記載の組成物。
【００８１】
Ｅ３７．当該ポリヌクレオチドが３'ポリＡテールを更に含む、実施形態１～３６のいずれか１つに記載の組成物。
【００８２】
Ｅ３８．当該ポリヌクレオチドがＲＮＡである、実施形態１～３７のいずれか１つに記載の組成物。

【００８３】
Ｅ３９．当該ＲＮＡがｍＲＮＡである、実施形態３８に記載の組成物。
【００８４】
Ｅ４０．当該ポリヌクレオチドがｉｎ　ｖｉｔｒｏ転写（ＩＶＴ）される、実施形態１～３９のいずれか１つに記載の組成物。
【００８５】
Ｅ４１．当該ポリヌクレオチドがキメラである、実施形態１～４０のいずれか１つに記載の組成物。
【００８６】
Ｅ４２．当該ポリヌクレオチドが環状である、実施形態１～４１のいずれか１つに記載の組成物。
【００８７】
Ｅ４３．当該ポリヌクレオチドが、強陰イオン交換ＨＰＬＣ、弱陰イオン交換ＨＰＬＣ、逆相ＨＰＬＣ（ＲＰ－ＨＰＬＣ）及び疎水性相互作用ＨＰＬＣ（ＨＩＣ－ＨＰＬＣ）、液体クロマトグラフィー質量分析（ＬＣＭＳ）、キャピラリー電気泳動（ＣＥ）及びキャピラリーゲル電気泳動（ＣＧＥ）によって精製される、実施形態１～４２のいずれか１つに記載の組成物。
【００８８】
Ｅ４４．当該化合物が、式（ＩＡ）
【化３】



（ＩＡ）
（式中、
ｌは、１、２、３、４及び５から選択され、
ｍは、５、６、７、８、及び９から選択され、
Ｍ１は、単結合またはＭ’であり、
Ｒ４は、無置換Ｃ１～３アルキルまたは－（ＣＨ２）ｎＱであり、ここで、ｎは、１、２、３、４または５であり、Ｑは、ＯＨ、－ＮＨＣ（Ｓ）Ｎ（Ｒ）２、または－ＮＨＣ（Ｏ）Ｎ（Ｒ）２であり、
Ｍ及びＭ’は、Ｃ（Ｏ）Ｏ、ＯＣ（Ｏ）、Ｃ（Ｏ）Ｎ（Ｒ’）、Ｐ（Ｏ）（ＯＲ’）Ｏ、アリール基及びヘテロアリール基から独立して選択され、
Ｒ２及びＲ３は、Ｈ、Ｃ１～１４アルキル及びＣ２～１４アルケニルからなる群から独立して選択される）
またはその塩もしくは立体異性体からなる、実施形態１～４３のいずれか１つに記載の組成物。
【００８９】
Ｅ４５．ｍが５、７または９である、実施形態１～４４のいずれか１つに記載の組成物。
【００９０】
Ｅ４６．当該化合物が、式（ＩＩ）

【化４】



（ＩＩ）
（式中、
ｌは、１、２、３、４及び５から選択され、
Ｍ１は、結合またはＭ’であり、
Ｒ４は、無置換Ｃ１～３アルキルまたは－（ＣＨ２）ｎＱであり、ここで、ｎは、２、３または４であり、Ｑは、ＯＨ、－ＮＨＣ（Ｓ）Ｎ（Ｒ）２、または－ＮＨＣ（Ｏ）Ｎ（Ｒ）２であり、
Ｍ及びＭ’は、－Ｃ（Ｏ）Ｏ、ＯＣ（Ｏ）、Ｃ（Ｏ）Ｎ（Ｒ’）、Ｐ（Ｏ）（ＯＲ’）Ｏ、アリール基及びヘテロアリール基から独立して選択され、
Ｒ２及びＲ３は、Ｈ、Ｃ１～１４アルキル及びＣ２～１４アルケニルからなる群から独立して選択される）
またはその塩もしくは立体異性体からなる、実施形態１～４５のいずれか１つに記載の組成物。

【００９１】
Ｅ４７．Ｍ１がＭ’である、実施形態４４～４６のいずれか１つに記載の組成物。

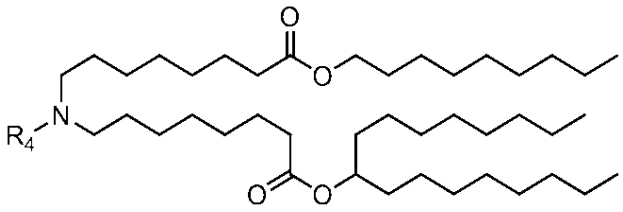
【００９２】
Ｅ４８．Ｍ及びＭ’が独立して－Ｃ（Ｏ）Ｏ－または－ＯＣ（Ｏ）－である、実施形態４７に記載の組成物。

【００９３】
Ｅ４９．ｌが１、３または５である、実施形態４４～４８のいずれか１つに記載の組成物。

【００９４】
Ｅ５０．当該化合物が、化合物１～化合物１４７、これらの塩及び立体異性体、ならびにこれらの任意の組み合わせからなる群から選択される、実施形態１～４３のいずれか１つに記載の組成物。

【００９５】
Ｅ５１．当該化合物が、式（ＩＩａ）

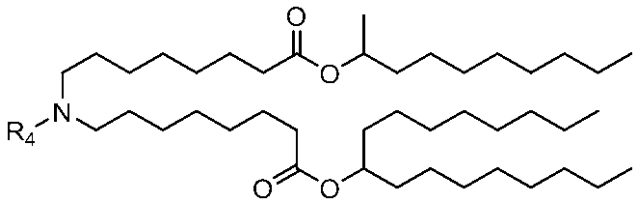
【化５】



（Ｉｉａ）
またはその塩もしくは立体異性体からなる、実施形態１～４３のいずれか１つに記載の組成物。

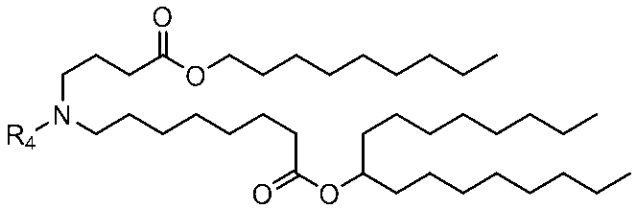
【００９６】
Ｅ５２．当該化合物が、式（ＩＩｂ）

【化６】

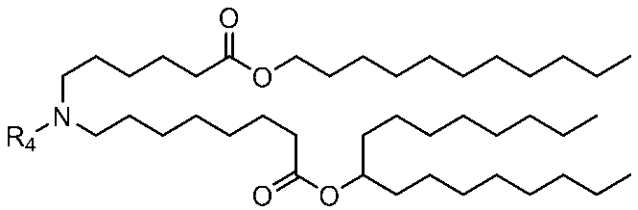


（ＩＩｂ）
またはその塩もしくは立体異性体からなる、実施形態１～４３のいずれか１つに記載の組成物。

【００９７】
Ｅ５３．当該化合物が、式（ＩＩｃ）または（ＩＩｅ）
【化７】



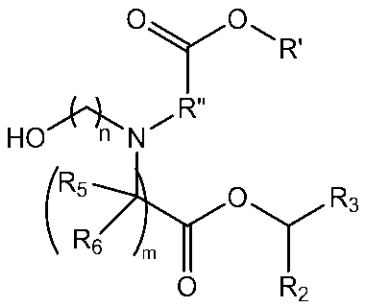
（ＩＩｃ）
【化８】



（ＩＩｅ）
またはこれらの塩もしくは立体異性体からなる、実施形態１～４３のいずれか１つに記載の組成物。

【００９８】
Ｅ５４．Ｒ４が－（ＣＨ２）ｎＱ及び－（ＣＨ２）ｎＣＨＱＲから選択される、実施形態５１～５３のいずれか１つに記載の組成物。

【００９９】
Ｅ５５．当該化合物が、式（ＩＩｄ）
【化９】



（ＩＩｄ）
（式中、Ｒ２及びＲ３は、Ｃ５～１４アルキル及びＣ５～１４アルケニルからなる群から独立して選択され、ｎは、２、３及び４から選択され、Ｒ’、Ｒ’’５ＲＲ６及びｍは、

実施形態１に定義されるとおりである）
またはその塩もしくは立体異性体からなる、実施形態１～４３のいずれか１つに記載の組成物。
【０１００】
Ｅ５６．R_2がC_8アルキルである、実施形態５５に記載の組成物。
【０１０１】
Ｅ５７．R_3が、C_5アルキル、C_6アルキル、C_7アルキル、C_8アルキルまたはC_9アルキルである、実施形態５６に記載の組成物。
【０１０２】
Ｅ５８．ｍが５、７または９である、実施形態５５～５７のいずれか１つに記載の組成物。
【０１０３】
Ｅ５９．各R_5がＨである、実施形態５５～５８のいずれか１つに記載の組成物。
【０１０４】
Ｅ６０．各R_6がＨである、実施形態５９に記載の組成物。
【０１０５】
Ｅ６１．ナノ粒子組成物である、実施形態１～６０のいずれか１つに記載の組成物。
【０１０６】
Ｅ６２．当該送達剤がリン脂質を更に含む、実施形態６１に記載の組成物。
【０１０７】
Ｅ６３．当該リン脂質が、１，２－ジリノレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＬＰＣ）、１，２－ジミリストイル－ｓｎ－グリセロ－ホスホコリン（ＤＭＰＣ）、１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＯＰＣ）、１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＰＰＣ）、１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＳＰＣ）、１，２－ジウンデカノイル－ｓｎ－グリセロ－ホスホコリン（ＤＵＰＣ）、１－パルミトイル－２－オレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＰＯＰＣ）、１，２－ジ－Ｏ－オクタデセニル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（１８：０　ジエーテル　ＰＣ）、１－オレオイル－２－コレステリルヘミスクシノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＯＣｈｅｍｓＰＣ）、１－ヘキサデシル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（Ｃ１６　Ｌｙｓｏ　ＰＣ）、１，２－ジリノレノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン、１，２－ジアラキドノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン、１，２－ジドコサヘキサエノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン、１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＯＰＥ）、１，２－ジフィタノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＭＥ　１６：０　ＰＥ）、１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン、１，２－ジリノレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン、１，２－ジリノレノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン、１，２－ジアラキドノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン、１，２－ジドコサヘキサエノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン、１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホ－ｒａｃ－（１－グリセロール）ナトリウム塩（ＤＯＰＧ）、スフィンゴミエリン及びこれらの任意の混合物からなる群から選択される、実施形態６２に記載の組成物。
【０１０８】
Ｅ６４．当該送達剤が構造脂質を更に含む、実施形態１～６３のいずれか１つに記載の組成物。
【０１０９】
Ｅ６５．当該構造脂質が、コレステロール、フェコステロール、シトステロール、エルゴステロール、カンペステロール、スチグマステロール、ブラシカステロール、トマチジン、ウルソル酸、α－トコフェロール及びこれらの任意の混合物からなる群から選択される、実施形態６４に記載の組成物。
【０１１０】

Ｅ６６．当該送達剤がＰＥＧ脂質を更に含む、実施形態１～６５のいずれか１つに記載の組成物。

【０１１１】

Ｅ６７．当該ＰＥＧ脂質が、ＰＥＧ修飾化ホスファチジルエタノールアミン、ＰＥＧ修飾化ホスファチジン酸、ＰＥＧ修飾化セラミド、ＰＥＧ修飾化ジアルキルアミン、ＰＥＧ修飾化ジアシルグリセロール、ＰＥＧ修飾化ジアルキルグリセロール及びこれらの任意の混合物からなる群から選択される、実施形態６６に記載の組成物。

【０１１２】

Ｅ６８．当該送達剤が、３－（ジドデシルアミノ）－Ｎ１，Ｎ１，４－トリドデシル－１－ピペラジンエタンアミン（ＫＬ１０）、Ｎ１－［２－（ジドデシルアミノ）エチル］－Ｎ１，Ｎ４，Ｎ４－トリドデシル－１，４－ピペラジンジエタンアミン（ＫＬ２２）、１４，２５－ジトリデシル－１５，１８，２１，２４－テトラアザ－オクタトリアコンタン（ＫＬ２５）、１，２－ジリノレイルオキシ－Ｎ，Ｎ－ジメチルアミノプロパン（ＤＬｉｎ－ＤＭＡ）、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）、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－ＭＣ３－ＤＭＡ）、２，２－ジリノレイル－４－（２－ジメチルアミノエチル）－［１，３］－ジオキソラン（ＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡ）、１，２－ジオレイルオキシ－Ｎ，Ｎ－ジメチルアミノプロパン（ＤＯＤＭＡ）、２－（｛８－［（３β）－コレスタ－５－エン－３－イルオキシ］オクチル｝オキシ）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－［（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イルオキシ］プロパン－１－アミン（オクチル－ＣＬｉｎＤＭＡ）、（２Ｒ）－２－（｛８－［（３β）－コレスタ－５－エン－３－イルオキシ］オクチル｝オキシ）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－［（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イルオキシ］プロパン－１－アミン（オクチル－ＣＬｉｎＤＭＡ（２Ｒ））及び（２Ｓ）－２－（｛８－［（３β）－コレスタ－５－エン－３－イルオキシ］オクチル｝オキシ）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－［（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イルオキシ］プロパン－１－アミン（オクチル－ＣＬｉｎＤＭＡ（２Ｓ））からなる群から選択されるイオン性脂質を更に含む、実施形態１～６７のいずれか１つに記載の組成物。

【０１１３】

Ｅ６９．当該送達剤が、リン脂質、構造脂質、ＰＥＧ脂質またはこれらの任意の組み合わせを更に含む、実施形態１～６８のいずれか１つに記載の組成物。

【０１１４】

Ｅ７０．ｉｎ　ｖｉｖｏ送達用に製剤化される、実施形態１～６９のいずれか１つに記載の組成物。

【０１１５】

Ｅ７１．筋肉内、皮下または皮内送達用に製剤化される、実施形態７０に記載の組成物。

【０１１６】

Ｅ７２．ＭＣＭの細胞発現を増加させる、実施形態１～７１のいずれか１つに記載の組成物。

【０１１７】

Ｅ７３．ＭＣＭの当該細胞発現が、少なくとも２０％、少なくとも２５％、少なくとも３０％、少なくとも３５％、少なくとも４０％、少なくとも４５％または少なくとも５０％増加する、実施形態７２に記載の組成物。

【０１１８】

Ｅ７４．実施形態１～７３のいずれか１つに記載の組成物を投与する方法であって、当該投与により、対象におけるメチルマロン酸血症の症状が軽減する、当該方法。

【０１１９】

Ｅ７５．当該投与により、それを必要とする対象において、メチルマロン酸血症に関連する代謝産物のレベルが減少する、実施形態７４に記載の方法。

【０１２０】
Ｅ７６．投与前及び／または投与後に、対象中または対象から得られた試料中の代謝産物のレベルを測定することを更に含む、実施形態７４または７５に記載の方法。
【０１２１】
Ｅ７７．当該試料が、対象の血液、尿、脳脊髄液またはこれらの任意の組み合わせから採取される、実施形態７６に記載の方法。
【０１２２】
Ｅ７８．当該投与により、対象に存在するメチルマロン酸のレベルが少なくとも約１０％、少なくとも約２０％、少なくとも約３０％、少なくとも約４０％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％または約１００％減少する、実施形態７４～７７のいずれか１つに記載の方法。
【０１２３】
Ｅ７９．当該ポリヌクレオチドが、対象に存在するプロピオニルカルニチンのレベルを、少なくとも約１０％、少なくとも約２０％、少なくとも約３０％、少なくとも約４０％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％または約１００％減少させる、実施形態７４～７８のいずれか１つに記載の方法。
【０１２４】
Ｅ８０．当該ポリヌクレオチドが、対象に存在するアセチルカルニチンのレベルを、少なくとも約１０％、少なくとも約２０％、少なくとも約３０％、少なくとも約４０％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％または約１００％減少させる、実施形態７４～７９のいずれか１つに記載の方法。
【０１２５】
Ｅ８１．メチルマロン酸血症に関連する１つ以上の代謝産物が、当該ポリヌクレオチドの投与の１日以内、２日以内、３日以内、４日以内、５日以内、７日以内、１週間以内、２週間以内、３週間以内、または１ヶ月以内に減少する、実施形態７４～８０のいずれか１つに記載の方法。
【０１２６】
Ｅ８２．メチルマロン酸血症を治療することを、それを必要とする対象において行う方法であって、ＭＣＭポリペプチドをコードするＯＲＦを含むｍＲＮＡを含む、有効量のポリヌクレオチドを対象に投与することを含み、当該投与により、対象におけるメチルマロン酸血症の症状が軽減する、当該方法。
【０１２７】
Ｅ８３．当該ポリヌクレオチドが、実施形態１～７３のいずれか１つに記載の組成物中にポリヌクレオチドを含む、実施形態８２に記載の方法。
【０１２８】
Ｅ８４．当該投与により、それを必要とする対象において、メチルマロン酸血症に関連する代謝産物のレベルが減少する、実施形態８２または８３に記載の方法。
【０１２９】
Ｅ８５．投与前及び／または投与後に、対象または対象から得られた試料中の代謝産物のレベルを測定することを更に含む、実施形態８２～８４のいずれか１つに記載の方法。
【０１３０】
Ｅ８６．当該試料が、対象の血液、尿、脳脊髄液またはこれらの任意の組み合わせから採取される、実施形態８５に記載の方法。
【０１３１】
Ｅ８７．当該ポリヌクレオチドが、対象に存在するメチルマロン酸のレベルを、少なくとも約１０％、少なくとも約２０％、少なくとも約３０％、少なくとも約４０％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％または約１００％減少させる、実施形態８２～８６のいずれか１つに記載の方

法。
【０１３２】
Ｅ８８．当該ポリヌクレオチドが、対象に存在するプロピオニルカルニチンのレベルを、少なくとも約１０％、少なくとも約２０％、少なくとも約３０％、少なくとも約４０％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％または約１００％減少させる、実施形態８２～８７のいずれか１つに記載の方法。
【０１３３】
Ｅ８９．当該ポリヌクレオチドが、対象に存在するアセチルカルニチンのレベルを、少なくとも約１０％、少なくとも約２０％、少なくとも約３０％、少なくとも約４０％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％または約１００％減少させる、実施形態８２～８８のいずれか１つに記載の方法。
【０１３４】
Ｅ９０．メチルマロン酸血症に関連する１つ以上の代謝産物が、当該ポリヌクレオチドの投与の１日以内、２日以内、３日以内、４日以内、５日以内、７日以内、１週間以内、２週間以内、３週間以内、または１ヶ月以内に減少する、実施形態８２～８９のいずれか１つに記載の方法。
【０１３５】
Ｅ９１．当該ヌクレオチドがナノ粒子組成物として投与される、実施形態８２～９０のいずれか１つに記載の方法。
【０１３６】
Ｅ９２．当該組成物が送達剤を更に含む、実施形態９１に記載の方法。
【０１３７】
Ｅ９３．当該送達剤がリン脂質を含む、実施形態９２に記載の方法。
【０１３８】
Ｅ９４．当該リン脂質が、１，２－ジリノレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＬＰＣ）、１，２－ジミリストイル－ｓｎ－グリセロ－ホスホコリン（ＤＭＰＣ）、１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＯＰＣ）、１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＰＰＣ）、１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＳＰＣ）、１，２－ジウンデカノイル－ｓｎ－グリセロ－ホスホコリン（ＤＵＰＣ）、１－パルミトイル－２－オレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＰＯＰＣ）、１，２－ジ－Ｏ－オクタデセニル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（１８：０　ジエーテル　ＰＣ）、１－オレオイル－２－コレステリルヘミスクシノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＯＣｈｅｍｓＰＣ）、１－ヘキサデシル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（Ｃ１６　Ｌｙｓｏ　ＰＣ）、１，２－ジリノレノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン、１，２－ジアラキドノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン、１，２－ジドコサヘキサエノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン、１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＯＰＥ）、１，２－ジフィタノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＭＥ　１６：０　ＰＥ）、１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン、１，２－ジリノレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン、１，２－ジリノレノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン、１，２－ジアラキドノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン、１，２－ジドコサヘキサエノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン、１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホ－ｒａｃ－（１－グリセロール）ナトリウム塩（ＤＯＰＧ）、スフィンゴミエリン及びこれらの任意の混合物からなる群から選択される、実施形態９３に記載の方法。
【０１３９】
Ｅ９５．当該送達剤が構造脂質を更に含む、実施形態９２～９４のいずれか１つに記載の

方法。
【０１４０】
Ｅ９６．当該構造脂質が、コレステロール、フェコステロール、シトステロール、エルゴステロール、カンペステロール、スチグマステロール、ブラシカステロール、トマチジン、ウルソル酸、α－トコフェロール及びこれらの任意の混合物からなる群から選択される、実施形態９５に記載の方法。
【０１４１】
Ｅ９７．当該送達剤がＰＥＧ脂質を更に含む、実施形態９２～９６のいずれか１つに記載の方法。
【０１４２】
Ｅ９８．当該ＰＥＧ脂質が、ＰＥＧ修飾化ホスファチジルエタノールアミン、ＰＥＧ修飾化ホスファチジン酸、ＰＥＧ修飾化セラミド、ＰＥＧ修飾化ジアルキルアミン、ＰＥＧ修飾化ジアシルグリセロール、ＰＥＧ修飾化ジアルキルグリセロール及びこれらの任意の混合物からなる群から選択される、実施形態９７に記載の方法。
【０１４３】
Ｅ９９．当該送達剤が、３－（ジドデシルアミノ）－Ｎ１，Ｎ１，４－トリドデシル－１－ピペラジンエタンアミン（ＫＬ１０）、Ｎ１－［２－（ジドデシルアミノ）エチル］－Ｎ１，Ｎ４，Ｎ４－トリドデシル－１，４－ピペラジンジエタンアミン（ＫＬ２２）、１４，２５－ジトリデシル－１５，１８，２１，２４－テトラアザ－オクタトリアコンタン（ＫＬ２５）、１，２－ジリノレイルオキシ－Ｎ，Ｎ－ジメチルアミノプロパン（ＤＬｉｎ－ＤＭＡ）、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）、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－ＭＣ３－ＤＭＡ）、２，２－ジリノレイル－４－（２－ジメチルアミノエチル）－［１，３］－ジオキソラン（ＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡ）、１，２－ジオレイルオキシ－Ｎ，Ｎ－ジメチルアミノプロパン（ＤＯＤＭＡ）、２－（｛８－［（３β）－コレスタ－５－エン－３－イルオキシ］オクチル｝オキシ）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－［（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イルオキシ］プロパン－１－アミン（オクチル－ＣＬｉｎＤＭＡ）、（２Ｒ）－２－（｛８－［（３β）－コレスタ－５－エン－３－イルオキシ］オクチル｝オキシ）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－［（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イルオキシ］プロパン－１－アミン（オクチル－ＣＬｉｎＤＭＡ（２Ｒ））及び（２Ｓ）－２－（｛８－［（３β）－コレスタ－５－エン－３－イルオキシ］オクチル｝オキシ）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－［（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イルオキシ］プロパン－１－アミン（オクチル－ＣＬｉｎＤＭＡ（２Ｓ））からなる群から選択されるイオン性脂質を更に含む、実施形態９２～９８のいずれか１つに記載の方法。
【０１４４】
Ｅ１００．当該送達剤が、リン脂質、構造脂質、ＰＥＧ脂質またはこれらの任意の組み合わせを更に含む、実施形態９２～９９のいずれか１つに記載の方法。
【０１４５】
Ｅ１０１．ｉｎ　ｖｉｖｏ送達用に製剤化される、実施形態９２～１００のいずれか１つに記載の方法。
【０１４６】
Ｅ１０２．筋肉内、皮下または皮内送達用に製剤化される、実施形態１０１に記載の方法。
【０１４７】
Ｅ１０３．ＭＣＭの細胞発現を増加させる、実施形態８２～１０２のいずれか１つに記載の方法。
【０１４８】
Ｅ１０４．ＭＣＭの当該細胞発現が、少なくとも２０％、少なくとも２５％、少なくとも３０％、少なくとも３５％、少なくとも４０％、少なくとも４５％または少なくとも５０

％増加する、実施形態１０３に記載の方法。
【０１４９】
Ｅ１０５．当該ポリヌクレオチドが、０．１ｍｇ／ｋｇ～１．０ｍｇ／ｋｇ、０．１ｍｇ／ｋｇ～１０ｍｇ／ｋｇ、０．１ｍｇ／ｋｇ～２ｍｇ／ｋｇ、０．１ｍｇ／ｋｇ～５ｍｇ／ｋｇ、１ｍｇ／ｋｇ～５ｍｇ／ｋｇ、または１ｍｇ／ｋｇ～３ｍｇ／ｋｇの用量で投与される、実施形態７４～１０４のいずれか１つに記載の方法。
【０１５０】
Ｅ１０６．投与後の血漿中ＭＭＡレベルが、投与前の血漿中ＭＭＡレベルと比較して、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％または少なくとも９５％減少する、実施形態７４～１０５のいずれか１つに記載の方法。
【０１５１】
Ｅ１０７．血漿中ＭＭＡレベルが、投与前の血漿中ＭＭＡレベルと比較して、約７５％～８５％減少する、実施形態１０６に記載の方法。
【０１５２】
Ｅ１０８．投与後の血漿中ＭＭＡレベルが、約５μｍｏｌ／Ｌ、約４．５μｍｏｌ／Ｌ、約４μｍｏｌ／Ｌ、約３．５μｍｏｌ／Ｌ、約３μｍｏｌ／Ｌ、約２．５μｍｏｌ／Ｌ、約２μｍｏｌ／Ｌ、約１．５μｍｏｌ／Ｌ、約１μｍｏｌ／Ｌ、約０．９μｍｏｌ／Ｌ、約０．８μｍｏｌ／Ｌ、約０．７μｍｏｌ／Ｌ、約０．６μｍｏｌ／Ｌ、約０．５μｍｏｌ／Ｌ、約０．４μｍｏｌ／Ｌ、約０．３μｍｏｌ／Ｌ、または０．２７μｍｏｌ／Ｌよりも低い、実施形態７４～１０７のいずれか１つに記載の方法。
【０１５３】
Ｅ１０９．尿中ＭＭＡレベルが、２０００ｍｍｏｌ／ｍｏｌクレアチニン未満、１９００ｍｍｏｌ／ｍｏｌクレアチニン未満、１８００ｍｍｏｌ／ｍｏｌクレアチニン未満、１７００ｍｍｏｌ／ｍｏｌクレアチニン未満、１６００ｍｍｏｌ／ｍｏｌクレアチニン未満、１５００ｍｍｏｌ／ｍｏｌクレアチニン未満、１４００ｍｍｏｌ／ｍｏｌクレアチニン未満、１３００ｍｍｏｌ／ｍｏｌクレアチニン未満、１２００ｍｍｏｌ／ｍｏｌクレアチニン未満、１１００ｍｍｏｌ／ｍｏｌクレアチニン未満、１０００ｍｍｏｌ／ｍｏｌクレアチニン未満、９００ｍｍｏｌ／ｍｏｌクレアチニン、８００ｍｍｏｌ／ｍｏｌクレアチニン、７００ｍｍｏｌ／ｍｏｌクレアチニン、６００ｍｍｏｌ／ｍｏｌクレアチニン、５００ｍｍｏｌ／ｍｏｌクレアチニン、４００ｍｍｏｌ／ｍｏｌクレアチニン、３００ｍｍｏｌ／ｍｏｌクレアチニン、２００ｍｍｏｌ／ｍｏｌクレアチニン、１００ｍｍｏｌ／ｍｏｌクレアチニン、９０ｍｍｏｌ／ｍｏｌクレアチニン、８０ｍｍｏｌ／ｍｏｌクレアチニン、７０ｍｍｏｌ／ｍｏｌクレアチニン、６０ｍｍｏｌ／ｍｏｌクレアチニン、５０ｍｍｏｌ／ｍｏｌクレアチニン、４０ｍｍｏｌ／ｍｏｌクレアチニン、３０ｍｍｏｌ／ｍｏｌクレアチニン、２０ｍｍｏｌ／ｍｏｌクレアチニン、１０ｍｍｏｌ／ｍｏｌクレアチニン、９ｍｍｏｌ／ｍｏｌクレアチニン、８ｍｍｏｌ／ｍｏｌクレアチニン、７ｍｍｏｌ／ｍｏｌクレアチニン、６ｍｍｏｌ／ｍｏｌクレアチニン、５ｍｍｏｌ／ｍｏｌクレアチニン、４ｍｍｏｌ／ｍｏｌクレアチニン、３ｍｍｏｌ／ｍｏｌクレアチニン、２ｍｍｏｌ／ｍｏｌクレアチニン、または１ｍｍｏｌ／ｍｏｌクレアチニンである、実施形態７４～１０８のいずれか１つに記載の方法。
【図面の簡単な説明】
【０１５４】
【図１】マウス肝臓ミトコンドリア抽出物、マウス細胞（Ｈｅｐａ１－６）及びヒト細胞（ＨｅｐＧ２、ＳＮＵ４２３及びＨｅＬａ）における内因性メチルマロニルＣｏＡムターゼ発現のウェスタンブロット分析である。上のバンド（細い矢印）は、マウスα－メチルマロニルＣｏＡムターゼを示し、下のバンド（太い矢印）は、ウサギα－クエン酸シンセターゼを示す。
【図２】ＨｅＬａ細胞における内因性メチルマロニルＣｏＡムターゼの局在に関する免疫蛍光分析を示す。Ａは、Ｍｉｔｏｔｒａｃｋｅｒを使用したミトコンドリアの位置及びＤ

ＡＰＩを使用した核の位置を示す。Ｂは、マウス抗－ＭＣＭモノクローナル抗体を使用したｈＭＣＭタンパク質の免疫染色及びＤＡＰＩを使用した核の位置を示す。Ｃは、ＡとＢを合わせた画像を示す。

【図３】（ｉ）対照ＧＦＰ発現構築物をトランスフェクトしたＨｅＬａ細胞、（ｉｉ）メチルマロニルＣｏＡムターゼを発現させるための構築物をトランスフェクトしたＨｅＬａ細胞、及び（ｉｉｉ）マウス肝臓ミトコンドリア抽出物における、メチルマロニルＣｏＡムターゼ発現を比較するウェスタンブロット分析である。

【図４】（ｉ）対照ＧＦＰ発現構築物をトランスフェクトしたＨｅＬａ細胞、（ｉｉ）メチルマロニルＣｏＡムターゼを発現させるための構築物をトランスフェクトしたＨｅＬａ細胞、及び（ｉｉｉ）マウス肝臓ミトコンドリア抽出物における、メチルマロニルＣｏＡムターゼ酵素活性の比較である。

【図５】対照ｍＲＮＡ、ヒトＭＣＭ　ｍＲＮＡまたはマウスＭＣＭ　ｍＲＮＡをトランスフェクトした、Ｈｅｐａ１－６細胞、正常ヒト対象由来の線維芽細胞（ＮＨＤＦ）及びＭＭＡ患者由来の線維芽細胞（ＧＭ５０及びＧＭ１５７３）における、メチルマロニルＣｏＡムターゼ発現のウェスタンブロット分析である。

【図６】ｅＧＦＰ　ｍＲＮＡまたはＭＣＭ　ｍＲＮＡ（「ＭＵＴ」とも称される）をトランスフェクトしたヒト線維芽細胞における外因性発現メチルマロニルＣｏＡムターゼの局在に関する免疫蛍光分析を示す。左のパネルは、Ｍｉｔｏｔｒａｃｋｅｒを使用したミトコンドリアの位置及びＤＡＰＩを使用した核の位置を示し、中央のパネルは、ＭＣＭタンパク質を使用したミトコンドリアの位置及びＤＡＰＩを使用した核の位置を示し、右のパネルは、左のパネルと右のパネルを合わせた画像を示す。Ａ及びＣは、ｅＧＦＰをコードするｍＲＮＡをトランスフェクトした患者由来線維芽細胞から得た画像である。Ｂ及びＤは、ｈＭＣＭをコードするｍＲＮＡをトランスフェクトした患者由来線維芽細胞から得た画像である。

【図７】対照ｍＲＮＡ、ヒトＭＣＭ　ｍＲＮＡまたはマウスＭＣＭ　ｍＲＮＡをトランスフェクトした、Ｈｅｐａ１－６細胞、正常ヒト対象由来の線維芽細胞（ＮＨＤＦ）及びＭＭＡ患者由来の線維芽細胞（ＧＭ５０及びＧＭ１５７３）における、メチルマロニルＣｏＡムターゼ活性の測定値である。

【図８】メチルマロニルＣｏＡムターゼをコードするｍＲＮＡを用いたｉｎ　ｖｉｖｏ処置の分析である。Ａ及びＢに関して、対照ｍＲＮＡ（ＮＴ－ＦＩＸ）またはＭＣＭ　ｍＲＮＡのいずれかを０．５ｍｇ　ｍＲＮＡ／ｋｇ体重（「ｍｐｋ」）でＣ５７Ｂ／Ｌ６マウスに静脈内注射した。マウスを２４時間または４８時間後に　　殺し、肝臓由来ミトコンドリアのＭＣＭタンパク質をキャピラリー電気泳動（ＣＥ）によって決定した。上のパネル（Ａ）は、２４時間及び４８時間後にＭＣＭ　ｍＲＮＡの注射によりＭＣＭタンパク質発現が増加したことを示し、下のパネル（Ｂ）は、対象タンパク質のクエン酸シンターゼの発現を示す。

【図９】メチルマロニルＣｏＡムターゼをコードする例示的なコドン最適化ＭＣＭ配列を示す。図９に例示される配列は、配列番号７３２である。

【図１０】メチルマロニルＣｏＡムターゼをコードする例示的なコドン最適化ＭＣＭ配列を示す。図１０に例示される配列は、配列番号７３３である。

【図１１】メチルマロニルＣｏＡムターゼをコードする例示的なコドン最適化ＭＣＭ配列を示す。図１１に例示される配列は、配列番号７３４である。

【図１２】メチルマロニルＣｏＡムターゼをコードする例示的なコドン最適化ＭＣＭ配列を示す。図１２に例示される配列は、配列番号１５１である。

【図１３】メチルマロニルＣｏＡムターゼをコードする例示的なコドン最適化ＭＣＭ配列を示す。図１３に例示される配列は、配列番号１５２である。

【図１４】メチルマロニルＣｏＡムターゼをコードする例示的なコドン最適化ＭＣＭ配列を示す。図１４に例示される配列は、配列番号１５３である。

【図１５】メチルマロニルＣｏＡムターゼをコードする例示的なコドン最適化ＭＣＭ配列を示す。図１５に例示される配列は、配列番号１５４である。

【図１６】ＭＣＫマウスモデルにおけるＭＭＡレベル及び体重の分析を示す。Ａは、対照ｍＲＮＡ（ＮＴ－ＦＩＸ）０．１ｍｇ／ｋｇ、脂質ナノ粒子中に製剤化したコドン最適化ＭＣＭ　ｍＲＮＡ（配列番号７３４をコード）０．１６ｍｇ／ｋｇもしくは０．２ｍｇ／ｋｇを５回注射、または脂質ナノ粒子中に製剤化したコドン最適化ＭＣＭ　ｍＲＮＡ（配列番号７３４をコード）０．２ｍｇ／ｋｇを２回注射することにより毎週処置したマウスにおける、ＬＣ－ＭＳ／ＭＳで経時的に測定したμＭ単位のメチルマロン酸（ＭＭＡ）血漿レベルを示す。Ｂは、経時的なマウス体重を示す（週２回測定）。＊＊＊ｐ＜０．００１。Ｐ値は、反復測定ＡＮＯＶＡから得た。Ｃは、コドン最適化ＭＣＭ　ｍＲＮＡを毎週注射したマウスにおける経時的な体重増加を示す。

【図１７】脂質ナノ粒子中に製剤化したコドン最適化ＭＣＭ　ｍＲＮＡ（配列番号７３４）を０．２ｍｇ／ｋｇで投与した野生型ＣＤ１マウスの肝臓におけるＭＣＭ発現を内因性ヒトＭＣＭ及び内因性マウスＭＣＭと比較して示す。

【図１８】コドン最適化ＭＣＭ　ｍＲＮＡの注射効果の時間経過を示す。Ａは、コドン最適化ＭＣＭ　ｍＲＮＡの単回注射投与後の脂質ナノ粒子レベルを示す。Ｂは、コドン最適化ＭＣＭ　ｍＲＮＡの単回注射投与後のマウス肝臓における肝臓ｈＭｕｔ　ｍＲＮＡレベルを示す。Ｃは、コドン最適化ＭＣＭ　ｍＲＮＡの単回注射投与後のＭＣＭタンパク質レベルを示す。

【図１９】コドン最適化ＭＣＭ　ｍＲＮＡを投与した野生型ＣＤマウスの肝臓におけるＭＣＭ発現を示す。ｍＲＮＡは、ＭＣ３または化合物１８のいずれかで製剤化した。ＮＴＦＩＸ　ｍＲＮＡを対照として使用した。Ａは、異なる製剤を用いた投与後の発現に関するウェスタンブロットを示し、Ｂは、当該ウェスタンブロットの定量を示す。

【図２０】ＭＭＡの血漿レベル（Ａ）及びマウスの体重（Ｂ）に対する、コドン最適化ＭＣＭ　ｍＲＮＡのマウスへの投与作用を示す。

【発明を実施するための形態】

【０１５５】

本開示は、メチルマロニルＣｏＡムターゼポリペプチド（「ＭＣＭ」または「ＭＵＴ」）をコードする配列最適化された核酸をコードするポリヌクレオチド配列を提供する。ＭＣＭは、メチルマロン酸血症（「ＭＭＡ」、メチルマロン酸尿症とも呼ばれる）に関連する主要遺伝子である。ヒトメチルマロニルＣｏＡムターゼ（ＭＣＭ）の野生型核酸配列及びアミノ酸配列は、ＮＣＢＩ配列登録ｇｉ２９６０１０７９５（参照配列ＮＭ＿０００２５５．３「ヒトメチルマロニルＣｏＡムターゼ（ＭＵＴ）ｍＲＮＡ」、配列番号２１４も参照されたい）及びｇｉ１５６１０５６８９（参照配列ＮＰ＿０００２４６．２「メチルマロニルＣｏＡムターゼミトコンドリア前駆体［ヒト］」、配列番号２０８も参照されたい）にそれぞれ記載されている。アクセッション番号及び関連配列は、国立生物工学情報センター（ＮＣＢＩ）のウェブサイトから得られる。

【０１５６】

ＭＣＭは、代謝酵素（Ｅ．Ｃ．５．４．９９．２）であり、その生物学的機能は、Ｌ－メチルマロニルＣｏＡをクレブス回路の中間体であるスクシニルＣｏＡに異性化することである。ＭＣＭは、細胞のミトコンドリアに局在し、その天然形態でホモ二量体として存在し、アデノシルコバラミン依存性である。ヒトＭＣＭの前駆体形態は７５０アミノ酸であるが、その成熟形態は、ミトコンドリア輸入及びプロセシング機構によって３２アミノ酸のリーダー配列が切断されるため、７１８アミノ酸である。

【０１５７】

Ⅰ．組成物

ＭＣＭをコードするポリヌクレオチド

ある特定の態様において、本開示は、核酸分子、特に、１つ以上のＭＣＭポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを提供する。コードされるＭＣＭポリペプチドは、哺乳動物ＭＣＭポリペプチド、例えば、ヒトＭＣＭペプチドまたはその機能性断片であり得る。

【０１５８】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるポリヌクレオチドは、少なくとも１

つのメチルマロニルＣｏＡムターゼタンパク質、その機能性断片またはバリアントをコードする。ＭＣＭは、メチルマロニルＣｏＡのスクシニルＣｏＡへの酵素的変換を触媒し、また、コバラミン結合ドメインを含んでいる。ＭＣＭの酵素活性は、その補因子であるデノシルコバラミンへの結合に依存する。

【０１５９】

ＭＣＭは、脂肪及びタンパク質の異化作用、具体的には、代謝中に生成されるメチルマロニルＣｏＡの除去において重要な役割を果たす。例えば、メチルマロニルＣｏＡは、イソロイシン、メチオニン及びトレオニンなどのアミノ酸の異化作用における中間体である。メチルマロニルＣｏＡはまた、コレステロール及び脂肪酸の異化作用における中間体である。この酵素の活性における欠損は、非効率な代謝、及びメチルマロン酸などの潜在的に有毒な代謝中間体の蓄積をもたらす。ＭＣＭの欠損は、メチルマロン酸血症（ＭＭＡ）として知られる疾患を引き起こす。

【０１６０】

ＭＣＭの置換がこの形態のＭＭＡに対する治療法であると理論付けられている。いくつかの実施形態において、本明細書で開示されるポリヌクレオチドは、このような遺伝子置換療法での使用に好適なメチルマロニルＣｏＡムターゼタンパク質、その機能性断片またはバリアントをコードする１つ以上の配列を含む。ある特定の態様において、本出願は、メチルマロニルＣｏＡムターゼまたはその機能性断片をコードするポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡ）であって、配列最適化されたポリヌクレオチドを提供することによって、メチルマロニルＣｏＡムターゼの欠乏に関する問題に応えるものである。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド、例えば、ｍＲＮＡは、細胞に導入されたとき、当該細胞のＭＣＭ発現レベルを、例えば、少なくとも２０％、少なくとも２０％、少なくとも２５％、少なくとも３５％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、または少なくとも１００％増加させる。

【０１６１】

いくつかの実施形態において、本開示のポリヌクレオチドは、機能性ＭＣＭポリペプチドまたはその断片をコードする。いくつかの実施形態において、本開示のポリヌクレオチドは、完全長であるＭＣＭタンパク質またはそのバリアントをコードするが（すなわち、天然の完全長ＭＣＭに対して天然または異種のいずれかであるミトコンドリア輸送ペプチドを含む）、他の実施形態では、本開示のポリヌクレオチドは、成熟した機能性ＭＣＭタンパク質またはそのバリアントをコードする（すなわち、ミトコンドリア輸送ペプチドを持たない）。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、異種または同種のミトコンドリア輸送ペプチドに連結されたヒトＭＣＭまたはそのバリアントをコードする。

【０１６２】

いくつかの実施形態において、本開示のポリヌクレオチドは、機能性ヒトＭＣＭ（配列番号２０８、配列番号２０９、配列番号２１０、配列番号２１１、配列番号２１２及び配列番号２１３）またはその断片をコードする。いくつかの実施形態において、本開示のポリヌクレオチドは、変異ＭＣＭをコードする。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、ＭＣＭ配列中に少なくとも１つの点変異を含むが、ＭＣＭ酵素活性を依然として保持するＭＣＭポリペプチドをコードする。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、ＭＣＭの機能を変更しない変異を含む機能性ＭＣＭポリペプチドをコードする。そのような機能性ＭＣＭは、機能不変性（ｎｅｕｔｒａｌ）と称される場合もある。いくつかの実施形態において、コードされるＭＣＭポリペプチドは、機能不変性点変異Ｖ６９、Ｔ４９９、Ｈ５３２、Ａ５９８及びＶ６７１のうちの１つ以上を含む。いくつかの実施形態において、本開示のポリヌクレオチドは、機能不変性変異Ｖ６９、Ｔ４９９、Ｈ５３２、Ａ５９８及びＶ６７１をそれぞれ含有する、配列番号２０９、配列番号２１０、配列番号２１１、配列番号２１２及び配列番号２１３のポリペプチド配列をコードする。特定の実施形態において、コードされるＭＣＭポリペプチドは、Ｖ６７１変異体（配列番号２１３）である。ＭＣＭポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを配列番号１～２０７

、２１４、７３２～７６５及び７７２に列挙する。
【０１６３】
いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、配列番号１～２０７、７３２～７６５及び７７２からなる群から選択されるポリヌクレオチドに対して、かなりの配列類似性を有するヌクレオチド配列を含み、ＯＲＦは、ＭＣＭポリペプチドをコードする。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、配列番号１５１、１５２、１５３、１５４、７３２、７３３及び７３４（図９～１５）に対して、かなりの配列類似性を有するヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、配列番号７３４（図１１）に対して、かなりの配列類似性を有するヌクレオチド配列を含む。
【０１６４】
いくつかの実施形態において、本開示は、配列番号７３４のヌクレオチド９７～ヌクレオチド２２５０に対して、少なくとも９９％または１００％の配列同一性を有するＯＲＦを含み、当該ＯＲＦは、ＭＣＭポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチドに関する。
【０１６５】
いくつかの実施形態において、本開示は、配列番号７３２のヌクレオチド９７～ヌクレオチド２２５０に対して、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％の配列同一性を有するＯＲＦを含み、当該ＯＲＦは、ＭＣＭポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチドに関する。
【０１６６】
いくつかの実施形態において、本開示は、配列番号１８２、７３３及び７４１のヌクレオチド９７～ヌクレオチド２２５０からなる群から選択される配列に対して、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％の配列同一性を有するＯＲＦを含み、当該ＯＲＦは、ＭＣＭポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチドに関する。
【０１６７】
いくつかの実施形態において、本開示は、配列番号７３５、７３６、７３８、７４３、７４４、７４８、７４９、７５０、７５４、７５５、７５８、７６２及び７６５のヌクレオチド９７～ヌクレオチド２２５０からなる群から選択される配列に対して、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％の配列同一性を有するＯＲＦを含み、当該ＯＲＦは、ＭＣＭポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチドに関する。
【０１６８】
いくつかの実施形態において、本開示は、配列番号１８０、１８７、７３７、７３９、７４０、７４２、７４５、７４６、７４７、７５１、７５２、７５３、７５７、７５９、７６０、７６１、７６３及び７６４のヌクレオチド９７～ヌクレオチド２２５０からなる群から選択される配列に対して、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％の配列同一性を有するＯＲＦを含み、当該ＯＲＦは、ＭＣＭポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチドに関する。
【０１６９】
いくつかの実施形態において、本開示は、配列番号１８１及び７５６のヌクレオチド９７～ヌクレオチド２２５０からなる群から選択される配列に対して、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％の配列同一性を有するＯＲＦを含み、当該ＯＲＦは、ＭＣＭポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチドに関する。
【０１７０】

いくつかの実施形態において、本開示は、配列番号１５４、１６５、１７１、１７３及び１７５のヌクレオチド９７～ヌクレオチド２２５０からなる群から選択される配列に対して、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％の配列同一性を有するＯＲＦを含み、当該ＯＲＦは、ＭＣＭポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチドに関する。

【０１７１】

いくつかの実施形態において、本開示は、配列番号１５１、１５２、１５３、１６３、１６４、１６６、１６７、１６８、１６９、１７０、１７２、１７７、１７８、１７９、１９５及び２０４のヌクレオチド９７～ヌクレオチド２２５０からなる群から選択される配列に対して、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％の配列同一性を有するＯＲＦを含み、当該ＯＲＦは、ＭＣＭポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチドに関する。

【０１７２】

いくつかの実施形態において、本開示は、配列番号１５６、１５７、１５８、１５９、１６０、１６１、１６２、１７４及び１７６のヌクレオチド９７～ヌクレオチド２２５０からなる群から選択される配列に対して、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％の配列同一性を有するＯＲＦを含み、当該ＯＲＦは、ＭＣＭポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチドに関する。

【０１７３】

いくつかの実施形態において、本開示は、配列番号１５５及び２０３のヌクレオチド９７～ヌクレオチド２２５０からなる群から選択される配列に対して、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％の配列同一性を有するＯＲＦを含み、当該ＯＲＦは、ＭＣＭポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチドに関する。

【０１７４】

いくつかの実施形態において、本開示は、配列番号６４、６６、７１、９１及び１２８のヌクレオチド９７～ヌクレオチド２２５０からなる群から選択される配列に対して、少なくとも８２％、少なくとも８３％、少なくとも８４％、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％の配列同一性を有するＯＲＦを含み、当該ＯＲＦは、ＭＣＭポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチドに関する。

【０１７５】

いくつかの実施形態において、本開示は、配列番号９、１１、１８、１９、２１、２２、２３、２４、３２、３３、３７、３９、４０、４４、４５、４７、５０、５１、５２、５５、５７、６１、６５、７０、７９、８４、８６、８８、９０、９２、９８、１００、１１５、１１７、１２６、１２９、１３５、１３６、１３７、１４４、１４８、１５０、１８４、１９０、１９１及び２０６のヌクレオチド９７～ヌクレオチド２２５０からなる群から選択される配列に対して、少なくとも８１％、少なくとも８２％、少なくとも８３％、少なくとも８４％、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なく

とも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％の配列同一性を有するＯＲＦを含み、当該ＯＲＦは、ＭＣＭポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチドに関する。

【０１７６】

いくつかの実施形態において、本開示は、配列番号３、５、６、８、１０、１２、１４、１６、１７、２０、２７、２８、２９、３１、３４、３５、３６、３８、４１、４２、４３、４６、４８、４９、５３、５４、５６、５８、６０、６３、６８、６９、７４、７７、７８、８０、８３、８５、８７、９３、９５、９６、９７、９９、１０２、１０３、１０４、１０５、１０７、１１０、１１２、１１３、１１４、１１６、１１９、１２０、１２２、１２３、１２４、１２５、１２７、１３１、１３２、１３３、１３４、１３８、１３９、１４０、１４１、１４２、１４３、１４７、１４９、１８３、１８６、１８８、１８９、１９２、１９３、１９４、１９６、１９７、１９８、１９９、２００、２０１、２０２、２０５及び２０７のヌクレオチド９７～ヌクレオチド２２５０からなる群から選択される配列に対して、少なくとも８０％、少なくとも８１％、少なくとも８２％、少なくとも８３％、少なくとも８４％、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％の配列同一性を有するＯＲＦを含み、当該ＯＲＦは、ＭＣＭポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチドに関する。

【０１７７】

いくつかの実施形態において、本開示は、配列番号１、２、４、７、１３、１５、２５、２６、３０、５９、６２、６７、７２、７３、７５、７６、８１、８２、８９、９４、１０１、１０６、１０８、１０９、１１１、１１８、１２１、１３０、１４５、１４６及び１８５のヌクレオチド９７～ヌクレオチド２２５０からなる群から選択される配列に対して、少なくとも７９％、少なくとも８０％、少なくとも８１％、少なくとも８２％、少なくとも８３％、少なくとも８４％、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％の配列同一性を有するＯＲＦを含み、当該ＯＲＦは、ＭＣＭポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチドに関する。

【０１７８】

本開示のポリヌクレオチドはまた、治療上関連する部位へのポリペプチドの輸送を促進する追加の特徴をコードし得る。そのようなタンパク質輸送を助ける特徴の１つは、シグナル配列またはターゲティング配列である。これらのシグナル配列によってコードされるペプチドは、ターゲティングペプチド、輸送ペプチド及びシグナルペプチドなどの様々な名称で知られている。本開示はまた、本明細書に記載されるポリヌクレオチドに機能的に連結された（すなわち、ＭＣＭポリペプチドをコードするＯＲＦを含むポリヌクレオチドに連結された）、ミトコンドリア輸送ペプチドをコードする配列を含むポリヌクレオチドを含む。

【０１７９】

本明細書で使用されるとき、「シグナル配列」または「シグナルペプチド」は、それぞれ、約９～２００ヌクレオチド長（３～７０アミノ酸長）のポリヌクレオチドまたはポリペプチドであり、いくつかの実施形態において、コーディング領域またはコードされるポリペプチドの５’側（またはＮ末端）にそれぞれ組み込まれる。これらの配列を付加することで、コードされたポリペプチドは、１つ以上の標的経路を介して、小胞体またはミトコンドリアなどの所望の部位に輸送される。いくつかのシグナルペプチドは、タンパク質が輸

送された後に、例えば、シグナルペプチダーゼによって、タンパク質から切断される。

【０１８０】

例えば、ヒトＭＣＭの前駆体タンパク質は、ＭＣＭミトコンドリアターゲティング配列またはミトコンドリアターゲティングペプチドとも称される、ＭＣＭタンパク質のミトコンドリアへの送達及びミトコンドリア内の局在化を促進する、３２アミノ酸のミトコンドリア輸送ペプチドを含む。本開示は、同種ターゲティング配列（すなわち、ＭＣＭの天然ミトコンドリア輸送配列）をコードするポリヌクレオチドと、異種ミトコンドリア輸送配列（すなわち、機能的に連結されたＭＣＭタンパク質に対して天然ターゲティングペプチドではないミトコンドリア輸送ペプチド）をコードするポリヌクレオチドの両方を含む。いくつかの実施形態において、交互ターゲティング配列は、ＭＣＭのミトコンドリアへの送達を促進する。

【０１８１】

既知のミトコンドリア輸送ペプチドの例示的な配列には、ＭＬＳＬＲＱＳＩＲＦＦＫＰＡＴＲＴＬＣＳＳＲＹＬＬ（配列番号２５１）、ＭＡＬＬＲＧＶＦＶＶＡＡＫＲＴＰ（配列番号２５２）及びＭＬＲＩＰＶＲＫＡＬＶＧＬＳＫＳＳＫＧＣＶＲＴ（配列番号２５３）が含まれる。ミトコンドリア輸送ペプチドの非限定的な例について、以下の表１（配列番号２５１～２６５）に列挙する。ミトコンドリア輸送ペプチドの更なる例は、配列番号２７０～７１９として記載される。本開示に利用できる更なるミトコンドリア輸送ペプチドは、当該技術分野において知られている予測ツールを使用して特定することができる。例えば、ミトコンドリア標的化は、Ｆｕｋｕｓａｗａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　ａｎｄ　Ｃｅｌｌｕｌａｒ　Ｐｒｏｔｅｏｍｉｃｓ　１４：１１１３－１１２６（２０１５）（その内容を本明細書に援用する）に記載されている方法を使用して解析することができる。

表１．ミトコンドリア輸送ペプチド

【表１】

ＩＤ（配列番号）	タンパク質の名称	配列
ＣＯＸ４（配列番号２５１）	出芽酵母ミトコンドリアのシトクロムｃ酸化酵素サブユニットＩＶ	ＭＬＳＬＲＱＳＩＲＦＦＫＰＡＴＲＴＬＣＳＳＲＹＬＬ
ＡＣＡＡ２（配列番号２５２）	ミトコンドリアの３－ケトアシルＣｏＡチオラーゼ	ＭＡＬＬＲＧＶＦＶＶＡＡＫＲＴＰ
ＮＤＵＦＳ１（配列番号２５３）	ＮＡＤＨ－ユビキノン酸化還元酵素７５ｋＤａサブユニット、ミトコンドリアのアイソフォーム２	ＭＬＲＩＰＶＲＫＡＬＶＧＬＳＫＳＳＫＧＣＶＲＴ
Ａ６ＮＫ５８（配列番号２５４）	推定リポ酸転移酵素２、ミトコンドリア（ＥＣ２．３．１．１８１）（リポ酸タンパク質リガーゼＢ）（リポイル／オクタノイル転移酵素）（オクタノイル－［アシル－キャリアタンパク質］－タンパク質Ｎ－オクタノイル転移酵素）	ＭＲＱＰＡＶＲＬＶＲＬＧＲＶＰＹＡＥＬＬＧＬＱＤＲＷＬＲＲＬＱ

【表２】

Ａ８Ｋ５Ｍ９（配列番号２５５）	機能未知タンパク質Ｃ１５ｏｒｆ６２、ミトコンドリア	ＭＥＴＷＲＫＧＳＦＲＮ
Ａ８ＭＵＰ２（配列番号２５６）	メチル基転移酵素様タンパク質１２、ミトコンドリア（ＥＣ２．１．１．－）	ＭＡＡＬＲＲＭＬＨＬＰＳＬＭＭＧＴＣＲＰＦＡＧＳＬＡＤＳ
Ｏ００１４２（配列番号２５７）	チミジンキナーゼ２、ミトコンドリア（ＥＣ２．７．１．２１）（Ｍｔ－ＴＫ）	ＭＬＬＷＰＬＲＧＷＡＡＲＡＬＲＣＦＧＰＧＳＲＧＳＰＡＳＧＰＧＰＲＲ
Ｏ００２１７（配列番号２５８）	ＮＡＤＨ脱水素酵素［ユビキノン］鉄硫黄タンパク質８、ミトコンドリア（ＥＣ１．６．５．３）（ＥＣ１．６．９９．３）（複合体Ｉ－２３ｋＤ）（ＣＩ－２３ｋＤ）（ＮＡＤＨ－ユビキノン酸化還元酵素２３ｋＤａサブユニット）（ＴＹＫＹサブユニット）	ＭＲＣＬＴＴＰＭＬＬＲＡＬＡＱＡＡＲＡＧＰＰＧＧＲＳＬＨＳＳＡＶＡＡ

【表３】

Ｏ００３３０（配列番号２５９）	ピルビン酸脱水素酵素タンパク質Ｘ構成成分、ミトコンドリア（ピルビン酸脱水素酵素複合体のジヒドロリポアミド脱水素酵素結合タンパク質）（Ｅ３結合タンパク質）（Ｅ３ＢＰ）（リポイル含有ピルビン酸脱水素酵素複合体構成成分Ｘ）（ｐｒｏＸ）	ＭＡＡＳＷＲＬＧＣＤＰＲＬＬＲＹＬＶＧＦＰＧＲＲＳＶＧＬＶＫＧＡＬＧＷＳＶＳＲＧＡＮＷＲＷＦＨＳＴＱＷＬＲ
Ｏ００４１１（配列番号２６０）	ＤＮＡ指向性ＲＮＡポリメラーゼ、ミトコンドリア（ＭｔＲＰＯＬ）（ＥＣ２．７．７．６）	ＭＳＡＬＣＷＧＲＧＡＡＧＬＫＲＡＬＲＰＣＧＲＰＧＬＰＧＫＥＧＴＡＧＧＶＣＧＰＲＲＳ
Ｏ００７４６（配列番号２６１）	ヌクレオシド二リン酸キナーゼ、ミトコンドリア（ＮＤＫ）（ＮＤＰキナーゼ、ミトコンドリア）（ＥＣ２．７．４．６）（ヌクレオシド二リン酸キナーゼＤ）（ＮＤＰＫＤ）（ｎｍ２３－Ｈ４）	ＭＧＧＬＦＷＲＳＡＬＲＧＬＲＣＧＰＲＡＰＧＰＳＬＬＶＲＨＧＳＧＧＰ
Ｏ１４５２１（配列番号２６２）	コハク酸脱水素酵素［ユビキノン］シトクロムｂ小サブユニット、ミトコンドリア（ＣｙｂＳ）（ＣＩＩ－４）（ＱＰｓ３）（コハク酸脱水素酵素複合体サブユニットＤ）（コハク酸－ユビキノン酸化還元酵素シトクロムｂ小サブユニット）（コハク酸－ユビキノン還元酵素膜アンカーサブユニット）	ＭＡＶＬＷＲＬＳＡＶＣＧＡＬＧＧＲＡＬＬＬＲＴＰＶＶＲＰＡＨＩＳＡＦＬＱＤＲＰＩＰＥＷＣＧＶＱＨＩＨＬＳＰＳＨＨ
Ｏ１４５４８（配列番号２６３）	シトクロムｃ酸化酵素サブユニット７Ａ関連タンパク質、ミトコンドリア（ＣＯＸ７ａ関連タンパク質）（シトクロムｃ酸化酵素サブユニットＶＩＩａ関連タンパク質）（ＥＢ１）	ＭＹＹＫＦＳＧＦＴＱＫＬＡＧＡＷＡＳＥＡＹＳＰＱＧＬＫＰＶＶＳＴＥＡＰＰＩＩＦＡＴＰＴＫＬＴＳＤＳＴＶＹＤＹＡ
ｍＭＣＭ（配列番号２６４）	マウスメチルマロニルＣｏＡムターゼ	ＭＬＲＡＫＮＱＬＦＬＬＳＰＨＹＬＫＱＬＮＩＰＳＡＳＲＷＫＲＬ
ｈＭＣＭ（配列番号２６５）	ヒトメチルマロニルＣｏＡムターゼ	ＭＬＲＡＫＮＱＬＦＬＬＳＰＨＹＬＲＱＶＫＥＳＳＧＳＲＬＩＱＱＲＬ

【０１８２】

いくつかの実施形態において、ミトコンドリア輸送ペプチドをコードする核酸配列は、配列番号１～２０７、７３２～７６５及び７７２のヌクレオチド１～９６からなる群から選択される配列に対して、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、少なくとも約９９％または約１００％の配列同一性を有し、当該輸送ペプチドは、ＭＣＭポリペプチドをミトコンドリアへ標的化または運搬することができる。

【０１８３】

いくつかの実施形態において、ミトコンドリア輸送ペプチドをコードする核酸配列は、表１中の配列（配列番号２５１、２５２、２５３、２５４、２５５、２５６、２５７、２５８、２５９、２６０、２６１、２６２、２６３、２６４、または２６５）に対して、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少な

くとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、少なくとも約９９％または約１００％の配列同一性を有し、当該輸送ペプチドは、ＭＣＭポリペプチドをミトコンドリアへ標的化または運搬することができる。いくつかの実施形態において、ミトコンドリア輸送ペプチドをコードする核酸配列は、配列番号２７０～７１９からなる群から選択される配列に対して、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、少なくとも約９９％または約１００％の配列同一性を有し、当該輸送ペプチドは、ＭＣＭポリペプチドをミトコンドリアへ標的化または運搬することができる。

【０１８４】

いくつかの実施形態において、本開示は、配列番号７３４のヌクレオチド１～ヌクレオチド２２５０に対して、少なくとも９９％または１００％の配列同一性を有するＯＲＦを含み、当該ＯＲＦは、ＭＣＭポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチドに関する。

【０１８５】

いくつかの実施形態において、本開示は、配列番号７３２のヌクレオチド１～ヌクレオチド２２５０に対して、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％の配列同一性を有するＯＲＦを含み、当該ＯＲＦは、ＭＣＭポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチドに関する。

【０１８６】

いくつかの実施形態において、本開示は、配列番号１８２及び７３３のヌクレオチド１～ヌクレオチド２２５０からなる群から選択される配列に対して、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％の配列同一性を有するＯＲＦを含み、当該ＯＲＦは、ＭＣＭポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチドに関する。

【０１８７】

いくつかの実施形態において、本開示は、配列番号７３５、７４１、７４３、７４４、７４８、７５８、７６２及び７６５のヌクレオチド１～ヌクレオチド２２５０からなる群から選択される配列に対して、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％の配列同一性を有するＯＲＦを含み、当該ＯＲＦは、ＭＣＭポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチドに関する。

【０１８８】

いくつかの実施形態において、本開示は、配列番号１８０、１８１、７３６、７３８、７３９、７４０、７４２、７４６、７４７、７４９、７５０、７５１、７５２、７５３、７５４、７５５、７５７、７５９、７６０、７６１及び７６３のヌクレオチド１～ヌクレオチド２２５０からなる群から選択される配列に対して、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％の配列同一性を有するＯＲＦを含み、当該ＯＲＦは、ＭＣＭポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチドに関する。

【０１８９】

いくつかの実施形態において、本開示は、配列番号７４５、７５６及び７６４のヌクレオチド１～ヌクレオチド２２５０からなる群から選択される配列に対して、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％の配列同一性を有するＯＲＦを含み、当該ＯＲＦは、ＭＣＭポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチドに関する。

【０１９０】

いくつかの実施形態において、本開示は、配列番号１５４、１６５、１７１、１７３及び１７５のヌクレオチド１～ヌクレオチド２２５０からなる群から選択される配列に対して、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なく

とも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％の配列同一性を有するＯＲＦを含み、当該ＯＲＦは、ＭＣＭポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチドに関する。

【０１９１】

いくつかの実施形態において、本開示は、配列番号１５１、１５２、１５３、１６３、１６６、１６７、１６８、１６９、１７０、１７２、１７７、１７８、１７９、１８７及び２０４のヌクレオチド１～ヌクレオチド２２５０からなる群から選択される配列に対して、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％の配列同一性を有するＯＲＦを含み、当該ＯＲＦは、ＭＣＭポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチドに関する。

【０１９２】

いくつかの実施形態において、本開示は、配列番号１５６、１５７、１５８、１５９、１６０、１６２、１６４、１７４、１７６、１９５及び７３７のヌクレオチド１～ヌクレオチド２２５０からなる群から選択される配列に対して、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％の配列同一性を有するＯＲＦを含み、当該ＯＲＦは、ＭＣＭポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチドに関する。

【０１９３】

いくつかの実施形態において、本開示は、配列番号１５５、１６１及び２０３のヌクレオチド１～ヌクレオチド２２５０からなる群から選択される配列に対して、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％の配列同一性を有するＯＲＦを含み、当該ＯＲＦは、ＭＣＭポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチドに関する。

【０１９４】

いくつかの実施形態において、本開示は、配列番号７１及び１２８のヌクレオチド１～ヌクレオチド２２５０からなる群から選択される配列に対して、少なくとも８２％、少なくとも８３％、少なくとも８４％、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％の配列同一性を有するＯＲＦを含み、当該ＯＲＦは、ＭＣＭポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチドに関する。

【０１９５】

いくつかの実施形態において、本開示は、配列番号４、６、８、９、１１、１９、２２、２３、２４、３２、３３、３７、４０、４４、４５、４７、５１、６１、６４、６５、６６、７９、８４、８６、９０、９１、９２、１００、１０１、１１２、１１５、１１７、１２６、１２９、１３５、１３６、１４６、１４８、１８４、１９０及び１９１のヌクレオチド１～ヌクレオチド２２５０からなる群から選択される配列に対して、少なくとも８１％、少なくとも８２％、少なくとも８３％、少なくとも８４％、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％の配列同一性を有するＯＲＦを含み、当該ＯＲＦは、ＭＣＭポリ

ペプチドをコードする、ポリヌクレオチドに関する。
【０１９６】
いくつかの実施形態において、本開示は、配列番号２、３、５、７、１０、１２、１３、１４、１５、１６、１８、２０、２１、２６、２７、２８、２９、３１、３４、３６、３８、３９、４１、４２、４３、４６、４８、４９、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６２、６８、６９、７０、７２、７３、７４、７６、７７、８０、８３、８５、８８、９５、９６、９７、９８、１０２、１０４、１０５、１０６、１０７、１０８、１０９、１１０、１１３、１１４、１２０、１２１、１２２、１２３、１２４、１２７、１３１、１３２、１３３、１３４、１３７、１３８、１３９、１４０、１４１、１４２、１４４、１４５、１４７、１４９、１５０、１８６、１８８、１８９、１９２、１９３、１９４、１９６、１９８、１９９、２００、２０２、２０５、２０６及び２０７のヌクレオチド１～ヌクレオチド２２５０からなる群から選択される配列に対して、少なくとも８０％、少なくとも８１％、少なくとも８２％、少なくとも８３％、少なくとも８４％、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％の配列同一性を有するＯＲＦを含み、当該ＯＲＦは、ＭＣＭポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチドに関する。
【０１９７】
いくつかの実施形態において、本開示は、配列番号１、１７、２５、３０、３５、５０、６３、６７、７５、７８、８１、８２、８７、８９、９３、９４、９９、１０３、１１１、１１６、１１８、１１９、１２５、１３０、１４３、１８３、１８５、１９７及び２０１のヌクレオチド１～ヌクレオチド２２５０からなる群から選択される配列に対して、少なくとも７９％、少なくとも８０％、少なくとも８１％、少なくとも８２％、少なくとも８３％、少なくとも８４％、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％の配列同一性を有するＯＲＦを含み、当該ＯＲＦは、ＭＣＭポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチドに関する。
【０１９８】
いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、約１５００～約１００，０００個のヌクレオチド（例えば、約１５００～２５００個、約１８００～約２６００個、約１９００～約２６００個、約２０００～約２７００個、２１５４～２，７５０個、２１５４～３，０００個、２１５４～５，０００個、２１５４～７，０００個、２１５４～１０，０００個、２１５４～２５，０００個、２１５４～５０，０００個、２１５４～７０，０００個、２１５４～１００，０００個、２２５０～２７５０個、２２５０～３，０００個、２２５０～５，０００個、２２５０～７，０００個、２２５０～１０，０００個、２２５０～２５，０００個、２２５０～５０，０００個、２２５０～７０，０００個、及び２２５０～１００，０００個のヌクレオチド）を含む。
【０１９９】
いくつかの実施形態において、本開示のポリヌクレオチドは、ノンコーディングである少なくとも１つの核酸配列を更に含み得る。
【０２００】
いくつかの実施形態において、少なくとも１つの目的のポリペプチドをコードする領域の長さは、約２１５４ヌクレオチド長よりも大きい（例えば、少なくとも約２１５４、２，２５０、２，５００、３，０００、４，０００、４，１００、４，２００、４，３００、４，４００、４，５００、４，６００、４，７００、４，８００、４，９００、５，０００、５，１００、５，２００、５，３００、５，４００、５，５００、５，６００、５，７００、５，８００、５，９００、６，０００、７，０００、８，０００、９，０００、

１０，０００、２０，０００、３０，０００、４０，０００、５０，０００、６０，０００、７０，０００、８０，０００、９０，０００もしくはそれ以上、または最大１００，０００ヌクレオチド（それを含む）まで）。本明細書で使用されるとき、かかる領域は、「コーディング領域」または「コード領域」と称される場合もある。

【０２０１】

いくつかの実施形態において、本開示のポリヌクレオチドは、メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）であるか、ｍＲＮＡとして機能する。本明細書で使用されるとき、「メッセンジャーＲＮＡ」（ｍＲＮＡ）という用語は、少なくとも１つの目的のポリペプチドをコードしており、かつ翻訳されて、コードされた目的のポリペプチドをｉｎ ｖｉｔｒｏ、ｉｎ ｖｉｖｏ、ｉｎ ｓｉｔｕまたはｅｘ ｖｉｖｏで生産することができる、任意のポリヌクレオチドを指す。使用することができる例示的なｍＲＮＡについては、配列番号７７６～７７１に列挙する。

【０２０２】

ＭＣＭをコードする最適化されたポリヌクレオチド

本開示のポリヌクレオチド、その領域または部分またはサブ領域は、配列最適化される。配列最適化の方法は、当該技術分野において知られており、１つ以上の所望の結果を達成するのに有用であり得る。これらの結果には、標的生物及び宿主生物におけるコドン頻度を一致させて適切な折り畳みを確保すること、ＧＣ含量に偏りをもたせてｍＲＮＡの安定性を向上させ、もしくは二次構造を低減させること、遺伝子構築物もしくは発現を損なう可能性のあるタンデム反復コドンもしくは塩基ラン（ｂａｓｅ ｒｕｎ）を最小にすること、転写及び翻訳制御領域をカスタマイズすること、タンパク質輸送配列を挿入もしくは除去すること、コードされるタンパク質の翻訳後修飾部位（例えば、グリコシル化部位）を除去／付加すること、タンパク質ドメインを付加、除去もしくはシャッフルすること、制限部位を挿入もしくは欠失すること、リボソーム結合部位及びｍＲＮＡ分解部位を改変すること、翻訳率を調整してタンパク質の様々なドメインの適切な折り畳みを可能にすること、またはポリヌクレオチド内の問題のある二次構造を低減もしくは排除することが含まれる。配列最適化のツール、アルゴリズム及びサービスは、当該技術分野において知られており、非限定的な例には、ＧｅｎｅＡｒｔ（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）、ＤＮＡ２．０（Ｍｅｎｌｏ Ｐａｒｋ ＣＡ）によるサービス及び／または独自の方法が挙げられる。いくつかの実施形態において、最適化アルゴリズムを使用してＯＲＦ配列が最適化される。各アミノ酸のコドン選択肢を表２に示す。

表２．コドン選択肢

【表４】

アミノ酸	１文字記号	コドン選択肢
イソロイシン	Ｉ	ＡＴＴ、ＡＴＣ、ＡＴＡ
ロイシン	Ｌ	ＣＴＴ、ＣＴＣ、ＣＴＡ、ＣＴＧ、ＴＴＡ、ＴＴＧ
バリン	Ｖ	ＧＴＴ、ＧＴＣ、ＧＴＡ、ＧＴＧ
フェニルアラニン	Ｆ	ＴＴＴ、ＴＴＣ
メチオニン	Ｍ	ＡＴＧ
システイン	Ｃ	ＴＧＴ、ＴＧＣ
アラニン	Ａ	ＧＣＴ、ＧＣＣ、ＧＣＡ、ＧＣＧ
グリシン	Ｇ	ＧＧＴ、ＧＧＣ、ＧＧＡ、ＧＧＧ
プロリン	Ｐ	ＣＣＴ、ＣＣＣ、ＣＣＡ、ＣＣＧ
スレオニン	Ｔ	ＡＣＴ、ＡＣＣ、ＡＣＡ、ＡＣＧ
セリン	Ｓ	ＴＣＴ、ＴＣＣ、ＴＣＡ、ＴＣＧ、ＡＧＴ、ＡＧＣ
チロシン	Ｙ	ＴＡＴ、ＴＡＣ
トリプトファン	Ｗ	ＴＧＧ
グルタミン	Ｑ	ＣＡＡ、ＣＡＧ
アスパラギン	Ｎ	ＡＡＴ、ＡＡＣ
ヒスチジン	Ｈ	ＣＡＴ、ＣＡＣ
グルタミン酸	Ｅ	ＧＡＡ、ＧＡＧ
アスパラギン酸	Ｄ	ＧＡＴ、ＧＡＣ
リシン	Ｋ	ＡＡＡ、ＡＡＧ
アルギニン	Ｒ	ＣＧＴ、ＣＧＣ、ＣＧＡ、ＣＧＧ、ＡＧＡ、ＡＧＧ
セレノシステイン	Ｓｅｃ	セレノシステイン挿入要素（ＳＥＣＩＳ）の存在下におけるｍＲＮＡ中のＵＧＡ
終止コドン	終止	ＴＡＡ、ＴＡＧ、ＴＧＡ

【０２０３】

いくつかの実施形態において、配列最適化されたヌクレオチド配列（例えば、ＭＣＭポリペプチド、その機能性断片またはバリアントをコードするもの）におけるウラシルまたはチミン核酸塩基のパーセンテージは、参照の野生型ヌクレオチド配列におけるウラシルまたはチミン核酸塩基のパーセンテージに対して、変更される（例えば、少ない）。そのような配列は、ウラシル変更配列またはチミン変更配列と称される。ヌクレオチド配列におけるウラシル含量またはチミン含量のパーセンテージは、配列中のウラシルまたはチミンの数をヌクレオチドの総数で除し、１００を掛けることによって求めることができる。いくつかの実施形態において、配列最適化されたヌクレオチド配列は、参照の野生型配列におけるウラシル含量またはチミン含量よりもウラシル含量またはチミン含量が低い。いくつかの実施形態において、本開示の配列最適化されたヌクレオチド配列におけるウラシル含量またはチミン含量は、参照の野生型配列におけるウラシル含量またはチミン含量よりも多く、参照の野生型配列と比較したとき、依然として有益な効果、例えば、発現の増加及び／またはＴｏｌｌ様受容体（ＴＬＲ）応答の減少を維持している。

【０２０４】

野生型ＭＣＭのウラシル含量またはチミン含量は、約２６．６７％である。いくつかの実施形態において、ＭＣＭポリペプチドをコードする、ウラシル変更配列またはチミン変更配列のウラシル含量またはチミン含量は、２６．６７％未満である。いくつかの実施形態

において、本開示のＭＣＭポリペプチドをコードする、ウラシル変更配列またはチミン変更配列のウラシル含量またはチミン含量は、１９％未満、１８％未満、１７％未満、１６％未満、１５％未満、１４％未満、１３％未満、１２％未満、１１％未満または１０％未満である。いくつかの実施形態において、ウラシル含量またはチミン含量は、１８％、１７％、１６％、１５％、１４％、１３％、１２％または１１％を下回ることはない。本明細書で開示される配列のウラシル含量またはチミン含量、すなわち、その合計のウラシル含量またはチミン含量は、本明細書中、％ＵＴＬまたは％ＴＴＬと略される。

【０２０５】

いくつかの実施形態において、本開示のＭＣＭポリペプチドをコードする、ウラシル変更配列またはチミン変更配列のウラシル含量またはチミン含量（％ＵＴＬまたは％ＴＴＬ）は、１１％～２６％、１２％～２５％、１２％～２４％、１３％～２３％、１３％～２２％、１４％～２１％、１４％～２０％、１４％～１９％、１４％～１８％、１４％～１７％または１４％～１６％である。

【０２０６】

いくつかの実施形態において、本開示のＭＣＭポリペプチドをコードする、ウラシル変更配列またはチミン変更配列のウラシル含量またはチミン含量（％ＵＴＬまたは％ＴＴＬ）は、１３％～１７％、１３％～１６％または１４％～１６％である。

【０２０７】

特定の実施形態において、本開示のＭＣＭポリペプチドをコードする、ウラシル変更配列またはチミン変更配列のウラシル含量またはチミン含量（％ＵＴＬまたは％ＴＴＬ）は、約１４％～約１６％、例えば、１４％～１５％である。

【０２０８】

本開示のＭＣＭポリペプチドをコードする、ウラシル変更配列またはチミン変更配列はまた、対応する野生型核酸配列におけるウラシル含量もしくはチミン含量に対するそのウラシル含量もしくはチミン含量（％ＵＷＴまたは％ＴＷＴ）に従って、または野生型タンパク質配列をコードする核酸の理論上最小のウラシル含量もしくはチミン含量に対するそのウラシル含量もしくはチミン含量（％ＵＴＭ）または（％ＴＴＭ）に従って、記載することもできる。

【０２０９】

「野生型核酸配列におけるウラシル含量またはチミン含量に対するウラシル含量またはチミン含量」という文言は、配列最適化された核酸中のウラシルまたはチミンの数を、対応する野生型核酸配列中のウラシルまたはチミンの総数で除し、１００を掛けることによって求められるパラメーターを指す。このパラメーターは、本明細書中、％ＵＷＴまたは％ＴＷＴと略される。

【０２１０】

いくつかの実施形態において、本開示のＭＣＭポリペプチドをコードする、ウラシル変更配列またはチミン変更配列の％ＵＷＴまたは％ＴＷＴは、５０％超、５５％超、６０％超、６５％超、７０％超、７５％超、８０％超、８５％超、９０％超または９５％超である。

【０２１１】

いくつかの実施形態において、本開示のＭＣＭポリペプチドをコードする、ウラシル変更配列またはチミン変更配列の％ＵＷＴまたは％ＴＷＴは、４２％～６８％、４３％～６７％、４４％～６６％、４５％～６５％、４６％～６４％、４７％～６３％、４８％～６２％、４９％～６１％、５０％～６０％、５１％～５９％または５２％～５８％である。

【０２１２】

いくつかの実施形態において、本開示のＭＣＭポリペプチドをコードする、ウラシル変更配列またはチミン変更配列の％ＵＷＴまたは％ＴＷＴは、５１％～６０％、５１％～５９％、５２％～５９％、５２％～５８％または５３％～５８％である。

【０２１３】

具体的な実施形態において、本開示のＭＣＭポリペプチドをコードする、ウラシル変更配列またはチミン変更配列の％ＵＷＴまたは％ＴＷＴは、約５３％～約５８％である。

【０２１４】
理論上最小のウラシルまたはチミンに対するウラシル含量またはチミン含量は、配列最適化されたヌクレオチド配列中のウラシルまたはチミンの数を、想定上のヌクレオチド配列（想定配列中の全てのコドンが、可能な限り最も低いウラシル含量またはチミン含量を有する同義コドンで置き換えられている）中のウラシルまたはチミンの総数で除し、１００を掛けることによって求められるパラメーターを指す。このパラメーターは、本明細書中、％ＵＴＭまたは％ＴＴＭと略される。
【０２１５】
ＤＮＡの場合、ウラシルの代わりにチミンが存在し、Ｕが現れる箇所には、Ｔが代用されることが認識される。したがって、ＲＮＡに関する、例えば、％ＵＴＭ、％ＵＷＴ、または％ＵＴＬに関連する全ての開示は、ＤＮＡに関する％ＴＴＭ、％ＴＷＴ、または％ＴＴＬに等しく適用できる。
【０２１６】
いくつかの実施形態において、本開示のＭＣＭポリペプチドをコードするウラシル変更配列の％ＵＴＭは、３００％未満、２９５％未満、２９０％未満、２８５％未満、２８０％未満、２７５％未満、２７０％未満、２６５％未満、２６０％未満、２５５％未満、２５０％未満、２４５％未満、２４０％未満、２３５％未満、２３０％未満、２２５％未満、２２０％未満、２１５％未満、２００％未満、１９５％未満、１９０％未満、１８５％未満、１８０％未満、１７５％未満、１７０％未満、１６５％未満、１６０％未満、１５５％未満、１５０％未満、１４５％未満、１４０％未満、１３９％未満、１３８％未満、１３７％未満、１３６％未満、１３５％未満、１３４％未満、１３３％未満、１３２％未満、１３１％未満、１３０％未満、１２９％未満、１２８％未満、１２７％未満、１２６％未満、１２５％未満、１２４％未満、１２３％未満、１２２％未満、１２１％未満、１２０％未満、１１９％未満、１１８％未満または１１７％未満である。
【０２１７】
いくつかの実施形態において、本開示のＭＣＭポリペプチドをコードするウラシル変更配列の％ＵＴＭは、１００％超、１０１％超、１０２％超、１０３％超、１０４％超、１０５％超、１０６％超、１０７％超、１０８％超、１０９％超、１１０％超、１１１％超、１１２％超、１１３％超、１１４％超、１１５％超、１１６％超、１１７％超、１１８％超、１１９％超、１２０％超、１２１％超、１２２％超、１２３％超、１２４％超、１２５％超または１２６％超、１２７％超、１２８％超または１２９％超である。
【０２１８】
いくつかの実施形態において、本開示のＭＣＭポリペプチドをコードするウラシル変更配列の％ＵＴＭは、１２３％～１２５％、１２２％～１２６％、１２１％～１２７％、１２０％～１２８％、１１９％～１２９％、１１８％～１３０％、１１７％～１３１％、１１６％～１３２％、１１５％～１３３％、１１４％～１３４％、１１３％～１３５％、１１２％～１３６％または１１１％～１３７％である。
【０２１９】
いくつかの実施形態において、本開示のＭＣＭポリペプチドをコードするウラシル変更配列の％ＵＴＭは、約１１８％～約１２９％である。
【０２２０】
いくつかの実施形態において、本開示のＭＣＭポリペプチドをコードするウラシル変更配列は、対応する野生型核酸配列に対して、連続するウラシルの数が少ない。例えば、２つの連続するロイシンは、４つのウラシルのクラスターを含む配列ＣＵＵＵＵＧによってコードすることができる。そのようなサブ配列を、例えば、ＣＵＧＣＵＣに置換して、ウラシルのクラスターを取り除く。
【０２２１】
フェニルアラニンは、ＵＵＣまたはＵＵＵによってコードされ得る。そのため、ＵＵＵによってコードされるフェニルアラニンをＵＵＣに置き換えたとしても、同義コドンは、ウラシルペア（ＵＵ）を依然として含有する。したがって、配列中のフェニルアラニンの数

は、コードされるポリペプチド中のフェニルアラニンの数を変更することなく排除することができないウラシルペア（ＵＵ）の最小数を定める。例えば、ポリペプチド、例えば、野生型ＭＣＭが、２７、２８、２９または３０個のフェニルアラニンを有する場合、ポリペプチド、例えば、野生型ＭＣＭをコードするウラシル変更配列が含有し得るウラシルペア（ＵＵ）の絶対最小数は、それぞれ２７、２８、２９または３０個である。

【０２２２】

野生型ＭＣＭは、８２個のウラシルペア（ＵＵ）及び２９個のウラシルトリプレット（ＵＵＵ）を含有する。いくつかの実施形態において、本開示のＭＣＭポリペプチドをコードするウラシル変更配列は、野生型核酸配列に対して、ウラシルトリプレット（ＵＵＵ）の数が少ない。いくつかの実施形態において、本開示のＭＣＭポリペプチドをコードするウラシル変更配列は、２８、２７、２６、２５、２４、２３、２２、２１、２０、１９、１８，１７、１６、１５、１４、１３，１２、１１、１０、９、８、７、６、５、４、３、２、１個のウラシルトリプレット（ＵＵＵ）を含有するか、ウラシルトリプレット（ＵＵＵ）を含有しない。

【０２２３】

いくつかの実施形態において、ＭＣＭポリペプチドをコードするウラシル変更配列は、野生型核酸配列中のウラシルペア（ＵＵ）の数に対して、ウラシルペア（ＵＵ）の数が少ない。いくつかの実施形態において、本開示のＭＣＭポリペプチドをコードするウラシル変更配列は、野生型核酸配列中のウラシルペア（ＵＵ）の可能な最小数に対応するウラシルペア（ＵＵ）の数（例えば、野生型ＭＣＭの場合、２８個のウラシルペア）を有する。

【０２２４】

いくつかの実施形態において、本開示のＭＣＭポリペプチドをコードするウラシル変更配列は、野生型核酸配列中のウラシルペア（ＵＵ）の数よりも少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３または５４個少ないウラシルペア（ＵＵ）を有する。いくつかの実施形態において、本開示のＭＣＭポリペプチドをコードするウラシル変更配列は、２０～３５個のウラシルペア（ＵＵ）を有する。

【０２２５】

「野生型核酸配列中のウラシルペア（ＵＵ）に対するウラシルペア（ＵＵ）」という文言は、配列最適化されたヌクレオチド配列中のウラシルペア（ＵＵ）の数を、対応する野生型ヌクレオチド配列中のウラシルペア（ＵＵ）の総数で除し、１００を掛けることによって求められるパラメーターを指す。このパラメーターは、本明細書中、％ＵＵ$_{wt}$と略される。

【０２２６】

いくつかの実施形態において、本開示のＭＣＭポリペプチドをコードするウラシル変更配列は、９０％未満、８５％未満、８０％未満、７５％未満、７０％未満、６５％未満、６０％未満、６５％未満、６０％未満、５５％未満、５０％未満、４０％未満、３０％未満または２０％未満の％ＵＵ$_{wt}$を有する。

【０２２７】

いくつかの実施形態において、ＭＣＭポリペプチドをコードするウラシル変更配列は、２０％～５０％の％ＵＵ$_{wt}$を有する。具体的な実施形態において、本開示のＭＣＭポリペプチドをコードするウラシル変更配列は、２４％～４３％の％ＵＵ$_{wt}$を有する。

【０２２８】

いくつかの実施形態において、本開示のポリヌクレオチドは、本明細書で開示されるＭＣＭポリペプチドをコードするウラシル変更配列を含む。いくつかの実施形態において、ＭＣＭポリペプチドをコードするウラシル変更配列は、少なくとも１つの化学修飾された核酸塩基、例えば、５－メトキシウラシルを含む。いくつかの実施形態において、本開示のＭＣＭポリペプチドをコードするウラシル変更配列中の核酸塩基（例えば、ウラシル）の

少なくとも９５％は、修飾核酸塩基である。いくつかの実施形態において、ＭＣＭポリペプチドをコードするウラシル変更配列中のウラシルの少なくとも９５％は、５－メトキシウラシルである。

【０２２９】

いくつかの実施形態において、％ＧＴＭＸと略される、「ＭＣＭポリペプチドをコードするヌクレオチド配列の理論上最大のグアニン含量に対する、ＭＣＭをコードする配列最適化されたＯＲＦのグアニン含量」は、少なくとも６９％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％または約１００％である。いくつかの実施形態において、％ＧＴＭＸは、約７０％～約８０％、約７１％～約７９％、約７１％～約７８％、約７１％～約７７％または約７１％～約７６％である。

【０２３０】

いくつかの実施形態において、％ＣＴＭＸと略される、「ＭＣＭポリペプチドをコードするヌクレオチド配列の理論上最大のシトシン含量に対する、ＯＲＦのシトシン含量」は、少なくとも約６８％、少なくとも約７０％、少なくとも約７５％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％または約１００％である。いくつかの実施形態において、％ＣＴＭＸは、約６８％～約７７％、約６９％～約７６％または約７０％～約７５％である。

【０２３１】

いくつかの実施形態において、％Ｇ／ＣＴＭＸと略される、「ＭＣＭポリペプチドをコードするヌクレオチド配列における理論上最大のグアニン及びシトシン含量（Ｇ／Ｃ）に対する、ＯＲＦのＧ／Ｃ含量」は、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％または約１００％である。％Ｇ／ＣＴＭＸは、約８５％～約１００％、約８９％～約９６％、約９０％～約９５％または約９１％～約９４％である。

【０２３２】

いくつかの実施形態において、％Ｇ／ＣＷＴと略される、「対応する野生型ＯＲＦにおけるＧ／Ｃ含量に対する、ＯＲＦのＧ／Ｃ含量」は、少なくとも１２０％、少なくとも１３０％、少なくとも１４０％、少なくとも１４１％、少なくとも１４２％、少なくとも１４３％、少なくとも１４４％、少なくとも１４５％、少なくとも１４６％、少なくとも１４７％、少なくとも１５０％または少なくとも１５５％である。

【０２３３】

いくつかの実施形態において、ＯＲＦ中の３番目のコドン位置の平均Ｇ／Ｃ含量は、対応する野生型ＯＲＦ中の３番目のコドン位置の平均Ｇ／Ｃ含量よりも少なくとも５０％、少なくとも５１％、少なくとも５２％、少なくとも５３％、少なくとも５４％、少なくとも５５％、少なくとも５６％、少なくとも５７％、少なくとも５８％、少なくとも５９％または少なくとも６０％高い。

【０２３４】

いくつかの実施形態において、本開示のポリヌクレオチドは、ＭＣＭポリペプチドをコードするオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）を含み、当該ＯＲＦは、配列最適化されており、％ＵＴＬ、％ＵＷＴ、％ＵＴＭ、％ＧＴＬ、％ＧＷＴ、％ＧＴＭＸ、％ＣＴＬ、％ＣＷＴ、％ＣＴＭＸ、％Ｇ／ＣＴＬ、％Ｇ／ＣＷＴまたは％Ｇ／ＣＴＭＸのそれぞれは、単独またはこれらの組み合わせで、（ｉ）パラメーターの最大値（ＭＡＸ）＋約０．５、１、１．５、２、２．５、３、３．５、４、４．５、５、５．５、６、６．５、７、７．５、８、８．５、９、９．５または１０標準偏差（ＳＴＤ　ＤＥＶ）に対応する最大値と、（ｉｉ）パラメーターの最小値（ＭＩＮ）－０．５、１、１．５、２、２．５、３、３．５、４、４．５、５、５．５、６、６．５、７、７．５、８、８．５、９、９．５または１０標準偏差（ＳＴＤ　ＤＥＶ）に対応する最小値との間の範囲内である。

【０２３５】

本開示のいくつかの実施形態において有益であるとみなされ得る特徴は、ポリヌクレオチドの領域によってコードされ得、かかる領域は、ポリペプチドをコードする領域の上流（

５'）または下流（３'）にあってもよいし、当該領域内にあってもよい。これらの領域は、タンパク質コーディング領域またはオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）を配列最適化する前及び／または後に、ポリヌクレオチド中に組み込まれ得る。ポリヌクレオチドが５’フランキング領域と３’フランキング領域の両方を含有する必要はない。このような特徴の例には、非翻訳領域（ＵＴＲ）、Ｋｏｚａｋ配列、オリゴ（ｄＴ）配列及び検出可能タグが挙げられるが、これらに限定されず、ＸｂａＩ認識を有し得るマルチクローニングサイトを含み得る。

【０２３６】

いくつかの実施形態において、５’ＵＴＲ領域及び／または３’ＵＴＲ領域はフランキング領域として提供され得る。複数の５’ＵＴＲまたは３’ＵＴＲをフランキング領域に含めることができ、同じ配列または異なる配列であり得る。フランキング領域の任意の部分は、ない場合も含め、配列最適化され得、いずれも、配列最適化の前及び／または後に、１つ以上の異なる構造的修飾または化学修飾を独立して含有し得る。

【０２３７】

いくつかの実施形態において、本開示のポリヌクレオチドは、配列番号７６９に記載される配列（チミジンをウリジンに変更する）を含むか、当該配列から本質的になるか、当該配列からなる。他の実施形態において、本開示のポリヌクレオチドは、配列番号７７０に記載される配列（チミジンをウリジンに変更する）を含むか、当該配列から本質的になるか、当該配列からなる。他の実施形態において、ポリヌクレオチドは、ポリＣを含まない。

【０２３８】

最適化後（所望の場合）、ポリヌクレオチド構成成分は、限定するものではないが、プラスミド、ウイルス、コスミド及び人工染色体などのベクターに再構成され、形質転換される。例えば、最適化されたポリヌクレオチドは、再構成され、化学的にコンピテントなＥ．ｃｏｌｉ、酵母、ニューロスポラ、トウモロコシ、ショウジョウバエなどに形質転換することができ、これにより、コピー数の高いプラスミド様または染色体構造が本明細書に記載される方法によって生じる。

【０２３９】

合成ポリヌクレオチド及びその核酸類似体は、生化学的プロセスの研究及び試験に重要な役割を果たす。ポリヌクレオチド及び核酸を合成するには、酵素を介した方法及び化学ベースの方法が様々開発されている。

【０２４０】

酵素的方法には、ＲＮＡポリメラーゼを使用して本開示のポリヌクレオチドを合成するｉｎ ｖｉｔｒｏ転写が含まれる。転写に関する酵素的方法及びＲＮＡポリメラーゼについては、国際特許出願第ＰＣＴ／ＵＳ２０１４／５３９０７号に記載されており、その内容全体を参照により本明細書に援用する。

【０２４１】

固相化学合成を使用して、本明細書に記載されるポリヌクレオチドまたはその部分を製造してもよい。本明細書に記載されるポリヌクレオチドを製造する固相化学合成については、国際特許出願第ＰＣＴ／ＵＳ２０１４／５３９０７号に記載されており、その内容全体を参照により本明細書に援用する。

【０２４２】

液相化学合成を使用して、本明細書に記載されるポリヌクレオチドまたはその部分を製造してもよい。本明細書に記載されるポリヌクレオチドを製造する液相化学合成については、国際特許出願第ＰＣＴ／ＵＳ２０１４／５３９０７号に記載されており、その内容全体を参照により本明細書に援用する。

【０２４３】

異なる合成方法の組み合わせを使用して、本明細書に記載されるポリヌクレオチドまたはその部分を製造してもよい。これらの組み合わせについては、国際特許出願第ＰＣＴ／ＵＳ２０１４／５３９０７号に記載されており、その内容全体を参照により本明細書に援用する。

【０２４４】
本開示のポリヌクレオチドの領域またはサブ領域のために、小領域合成が使用されてもよい。これらの合成法については、国際特許出願第ＰＣＴ／ＵＳ２０１４／５３９０７号に記載されており、その内容全体を参照により本明細書に援用する。
【０２４５】
ポリヌクレオチド領域またはサブ領域のライゲーションを使用して、本明細書に記載されるポリヌクレオチドを調製してもよい。これらのライゲーション法については、国際特許出願第ＰＣＴ／ＵＳ２０１４／５３９０７号に記載されており、その内容全体を参照により本明細書に援用する。
【０２４６】
本開示のポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド
いくつかの実施形態において、本開示のポリヌクレオチドペプチドによってコードされるＭＣＭポリペプチドは、機能性ＭＣＭである。本明細書で使用されるとき、「ＭＣＭ」タンパク質という用語は、「ＭＵＴ」タンパク質と区別なく使用される。したがって、ヒトＭＣＭタンパク質は、ヒトＭＵＴまたはｈＭＵＴと記載することができ、マウスＭＣＭタンパク質は、マウスＭＵＴまたはｍＭＵＴと記載することができる。いくつかの実施形態において、本開示のポリヌクレオチドペプチドによってコードされるＭＣＭポリペプチドは、ＭＣＭペプチド配列に対して、置換、挿入及び／または付加、欠失ならびに共有結合修飾を含有する、バリアント、ペプチドまたはポリペプチドである。例えば、配列タグまたは１つ以上のリシンなどのアミノ酸を、本開示のポリヌクレオチドによってコードされるペプチド配列に（例えば、Ｎ末端またはＣ末端に）付加することができる。配列タグは、ペプチドの精製または局在のために使用することができる。リシンは、ペプチドの溶解性を増大させるために、またはビオチニル化を可能にするために使用することができる。いくつかの実施形態において、本開示のポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドのカルボキシ末端領域及びアミノ末端領域に位置するアミノ酸残基を任意選択により欠失させて、切断型配列を提供してもよい。
【０２４７】
いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるポリヌクレオチドは、ＭＣＭタンパク質の置換バリアントをコードする。置換バリアントは、１、２、３または４つ以上の置換を含み得る。ポリペプチドに関する場合の「置換バリアント」は、天然配列または出発配列中の少なくとも１つのアミノ酸残基が除去され、その代わりに同じ位置に別のアミノ酸が挿入されたものである。置換は、分子中のアミノ酸が１つのみ置換された単一の置換であってもよいし、同一分子中の２つ以上のアミノ酸が置換された複数の置換であってもよい。
【０２４８】
いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるポリヌクレオチドは、１つ以上の保存的アミノ酸置換を含むＭＣＭタンパク質のバリアントをコードする。本明細書で使用されるとき、「保存的アミノ酸置換」という用語は、配列中に通常存在するアミノ酸を、同様の大きさ、電荷または極性を有する別のアミノ酸で置き換える置換を指す。保存的置換の例には、イソロイシン、バリン及びロイシンなどの非極性（疎水性）残基を別の非極性残基にする置換が挙げられる。同様に、保存的置換の例には、ある極性（親水性）残基を別の極性残基にする置換、例えば、アルギニンとリシンの間、グルタミンとアスパラギンの間、及びグリシンとセリンの間の置換が挙げられる。加えて、リシン、アルギニンまたはヒスチジンなどの塩基性残基を別の塩基性残基にする置換、またはアスパラギン酸またはグルタミン酸などのある酸性残基を別の酸性残基にする置換も保存的置換の更なる例である。非保存的置換の例には、イソロイシン、バリン、ロイシン、アラニン、メチオニンなどの非極性（疎水性）アミノ酸残基をシステイン、グルタミン、グルタミン酸もしくはリシンなどの極性（親水性）残基にする置換、及び／または極性残基を非極性残基にする置換が挙げられる。
【０２４９】

他の実施形態において、ポリヌクレオチドは、挿入ＭＣＭバリアントをコードする。ポリペプチドに関する場合の「挿入バリアント」は、天然配列または出発配列中の特定位置にあるアミノ酸にすぐ隣接して、１つ以上のアミノ酸が挿入されたものである。アミノ酸に「すぐ隣接した」とは、アミノ酸のα－カルボキシ官能基またはα－アミノ官能基のいずれかに連結されていることを意味する。

【０２５０】

他の実施形態において、本開示のポリヌクレオチドは、欠失ＭＣＭバリアントをコードする。ポリペプチドに関する場合の「欠失バリアント」は、天然アミノ酸配列または出発アミノ酸配列中のアミノ酸が１つ以上除去されたものである。通常、欠失バリアントは、当該分子の特定領域中のアミノ酸が１つ以上欠失している。

【０２５１】

いくつかの実施形態において、本開示のポリヌクレオチドは、共有結合誘導体をコードする。ポリペプチドに関する場合の「共有結合誘導体」は、有機タンパク質性もしくは非タンパク質性誘導体化剤、及び／または翻訳後修飾による、天然タンパク質または出発タンパク質の修飾を含む。共有結合修飾は、従来、タンパク質の標的アミノ酸残基を、選択された側鎖もしくは端末残基と反応することができる有機誘導体化剤と反応させることによって、または選択された組み換え宿主細胞内で機能する翻訳後修飾の機構を利用することによって、導入される。結果として得られる共有結合誘導体は、生物活性にとって、免疫学的アッセイにとって、または組み換え糖タンパク質の免疫親和性精製のための抗タンパク質抗体の精製にとって重要な残基を特定することに関するプログラムに有用である。そのような修飾は、当該技術分野の技術の範囲内であり、過度の実験なく実施される。

【０２５２】

ある特定の翻訳後修飾は、発現されたポリペプチドに対する組み換え宿主細胞の作用の結果である。グルタミニル残基及びアスパラギニル残基は、多くの場合、翻訳後に脱アミド化されて、対応するグルタミル残基及びアスパルチル残基になる。あるいは、これらの残基は、弱酸性条件下で脱アミド化される。これらの残基のいずれの形態も、本開示に従って生産されるポリペプチド中に存在し得る。

【０２５３】

他の翻訳後修飾には、プロリン及びリシンのヒドロキシル化、セリル残基またはスレオニル残基のヒドロキシル基のリン酸化、リシン、アルギニン及びヒスチジン側鎖のα－アミノ基のメチル化が含まれる（Ｔ．Ｅ．Ｃｒｅｉｇｈｔｏｎ，Ｐｒｏｔｅｉｎｓ：Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｐｒｏｐｅｒｔｉｅｓ，Ｗ．Ｈ．Ｆｒｅｅｍａｎ＆Ｃｏ．，Ｓａｎ Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ，ｐｐ．７９－８６（１９８３））。

【０２５４】

ポリペプチドに関する場合の「特徴」は、分子のうち、明確に異なるアミノ酸配列ベースの構成成分として定義される。本開示のポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドの特徴には、表面発現、局所的高次構造形状、折り畳み、ループ、半ループ、ドメイン、半ドメイン、部位、末端またはこれらの任意の組み合わせが含まれる。

【０２５５】

ポリペプチドに関して本明細書で使用されるとき、「ドメイン」という用語は、１つ以上の特定可能な構造的または機能的特徴または特性（例えば、結合能力、タンパク質－タンパク質相互作用の部位としての機能）を有するポリペプチドモチーフを指す。

【０２５６】

ポリペプチドに関して本明細書で使用されるとき、「部位」という用語は、それがアミノ酸に基づく実施形態に属する場合、「アミノ酸残基」及び「アミノ酸側鎖」と同義的に使用される。部位は、本開示のポリペプチドベースの分子のうちで修飾、操作、改変、誘導体化または変更することができるペプチドまたはポリペプチド内の位置を表す。

【０２５７】

ポリペプチドに関して本明細書で使用されるとき、「末端（ｔｅｒｍｉｎｉまたはｔｅｒｍｉｎｕｓ）」という用語は、ペプチドまたはポリペプチドの端部を指す。かかる端部は

、ペプチドまたはポリペプチドの最初の部位または最後の部位のみに限定されるものではなく、末端領域中の付加アミノ酸も含み得る。本開示のポリペプチドベースの分子は、Ｎ末端（遊離アミノ基（ＮＨ２）を有するアミノ酸で終わる）及びＣ末端（遊離カルボキシル基（ＣＯＯＨ）を有するアミノ酸で終わる）の両方を有することを特徴とし得る。本開示のタンパク質は、場合によって、ジスルフィド結合または非共有結合性の力によって一緒になった複数のポリペプチド鎖から構成される（多量体、オリゴマー）。これらの種類のタンパク質は、複数のＮ末端及びＣ末端を有する。あるいは、ポリペプチドの末端は、状況に応じて、有機コンジュゲートなどの非ポリペプチドベースの部分で開始または終結するように修飾されてもよい。

【０２５８】

これらの特徴のうちのいずれかが、本開示のポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドの所望の構成成分として特定または定義されたら、移動、交換、反転、欠失、ランダム化または複製によって、これらの特徴のいくつかの操作及び／または修飾のいずれかが実施されてもよい。更に、特徴の操作は、本開示の分子に対する修飾と同じ結果をもたらすことができることが理解される。例えば、ドメイン欠失を伴う操作は、完全長よりも短い分子をコードするような核酸修飾と全く同じように、分子長の変更をもたらす。

【０２５９】

修飾及び操作は、限定するものではないが、部位特異的変異誘発または化学合成中の先験的導入などの当該技術分野において知られている方法によって達成することができる。次に、結果として得られた修飾分子の活性について、本明細書に記載されるものまたは当該技術分野において知られている任意の他の好適なスクリーニングアッセイなどのｉｎ　ｖｉｔｒｏまたはｉｎ　ｖｉｖｏアッセイを使用して試験することができる。

【０２６０】

本開示によれば、ポリペプチドは、一連の実験を通じて発見されるコンセンサス配列を含み得る。本明細書で使用されるとき、「コンセンサス」配列は、１つ以上の部位での多様性を許容する集合的配列集団を表す単一配列である。

【０２６１】

当業者によって認識されるように、タンパク質断片、機能性タンパク質ドメイン及び相同タンパク質もまた、本開示の目的のポリペプチドの範囲内であるとみなされる。例えば、参照タンパク質の１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００または１００超のアミノ酸長の任意のタンパク質断片（すなわち、参照ポリペプチド配列よりも少なくとも１アミノ酸残基短いがそれ以外では同一であるポリペプチド配列）が本明細書で提供される。別の例において、本明細書に記載される配列のいずれかに対して、約４０％、約５０％、約６０％、約７０％、約８０％、約９０％、約９５％または約１００％同一である、約２０、約３０、約４０、約５０または約１００アミノ酸のストレッチを含む任意のタンパク質を本開示に従って利用することができる。

【０２６２】

ある特定の実施形態において、本開示のポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドは、本明細書に記載または参照される配列のうちのいずれかに示されるように、２、３、４、５、６、７、８、９、１０個またはそれ以上の変異を含む。

【０２６３】

いくつかの実施形態において、コードされるポリペプチドバリアントは、参照ポリペプチドと同一の活性または類似の活性を有する。あるいは、バリアントは、参照ポリペプチドに対して変更された活性（例えば、増加または減少）を有する。一般に、本開示の特定のポリヌクレオチドまたはポリペプチドのバリアントは、本明細書に記載され、当業者に知られている配列アライメントプログラム及びパラメーターによって決定したとき、特定の参照ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの配列に対して、少なくとも約４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％であるが、１００％未満の配列同一性を有する。このようなアライメントツールには、ＢＬＡＳＴスイート

のものが含まれる（Ｓｔｅｐｈｅｎ Ｆ．Ａｌｔｓｃｈｕｌ，Ｔｈｏｍａｓ Ｌ．Ｍａｄｄｅｎ，Ａｌｅｊａｎｄｒｏ Ａ．Ｓｃｈａｆｆｅｒ，Ｊｉｎｇｈｕｉ Ｚｈａｎｇ，Ｚｈｅｎｇ Ｚｈａｎｇ，Ｗｅｂｂ Ｍｉｌｌｅｒ，ａｎｄ Ｄａｖｉｄ Ｊ．Ｌｉｐｍａｎ（１９９７），”Ｇａｐｐｅｄ ＢＬＡＳＴ ａｎｄ ＰＳＩ－ＢＬＡＳＴ：ａ ｎｅｗ ｇｅｎｅｒａｔｉｏｎ ｏｆ ｐｒｏｔｅｉｎ ｄａｔａｂａｓｅ ｓｅａｒｃｈ ｐｒｏｇｒａｍｓ，” Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２５：３３８９－３４０２）。他のツールについては、本明細書中、具体的には「同一性」の定義において記載される。

【０２６４】

ＢＬＡＳＴアルゴリズムのデフォルトパラメーターには、例えば、期待閾値１０、ワードサイズ２８、マッチ／ミスマッチスコア１、－２、線形ギャップコストが含まれる。任意のフィルターが適用され得、生物種特異的リピート、例えば、ヒト（Ｈｏｍｏ ｓａｐｉｅｎｓ）特異的リピートの選択についても同様である。

【０２６５】

本開示によれば、タンパク質は、少なくとも１つの目的のポリペプチドをコードする連結されたヌクレオシドの少なくとも第１の領域を含み得るポリヌクレオチドによってコードされる。本開示の目的のポリヌクレオチドによってコードされるいくつかのポリペプチドについて、以下の表３に列挙する。特に、表３は、ヒトＭＣＭの野生型及び変異型アミノ酸配列を示す。

表３．ＭＣＭポリペプチド及びポリヌクレオチド

【表５】

配列番号	遺伝子	配列
配列番号２０８	機能性ヒトｍＣＭ	ＭＬＲＡＫＮＱＬＦＬＬＳＰＨＹＬＲＱＶＫＥＳＳＧＳＲＬ ＩＱＱＲＬＬＨＱＱＱＰＬＨＰＥＷＡＡＬＡＫＫＱＬＫＧＫ ＮＰＥＤＬＩＷＨＴＰＥＧＩＳＩＫＰＬＹＳＫＲＤＴＭＤＬ ＰＥＥＬＰＧＶＫＰＦＴＲＧＰＹＰＴＭＹＴＦＲＰＷＴＩＲ ＱＹＡＧＦＳＴＶＥＥＳＮＫＦＹＫＤＮＩＫＡＧＱＱＧＬＳ ＶＡＦＤＬＡＴＨＲＧＹＤＳＤＮＰＲＶＲＧＤＶＧＭＡＧＶ ＡＩＤＴＶＥＤＴＫＩＬＦＤＧＩＰＬＥＫＭＳＶＳＭＴＭＮ ＧＡＶＩＰＶＬＡＮＦＩＶＴＧＥＥＱＧＶＰＫＥＫＬＴＧＴ ＩＱＮＤＩＬＫＥＦＭＶＲＮＴＹＩＦＰＰＥＰＳＭＫＩＩＡ ＤＩＦＥＹＴＡＫＨＭＰＫＦＮＳＩＳＩＳＧＹＨＭＱＥＡＧ ＡＤＡＩＬＥＬＡＹＴＬＡＤＧＬＥＹＳＲＴＧＬＱＡＧＬＴ ＩＤＥＦＡＰＲＬＳＦＦＷＧＩＧＭＮＦＹＭＥＩＡＫＭＲＡ ＧＲＲＬＷＡＨＬＩＥＫＭＦＱＰＫＮＳＫＳＬＬＬＲＡＨＣ ＱＴＳＧＷＳＬＴＥＱＤＰＹＮＮＩＶＲＴＡＩＥＡＭＡＡＶ ＦＧＧＴＱＳＬＨＴＮＳＦＤＥＡＬＧＬＰＴＶＫＳＡＲＩＡ ＲＮＴＱＩＩＩＱＥＥＳＧＩＰＫＶＡＤＰＷＧＧＳＹＭＭＥ ＣＬＴＮＤＶＹＤＡＡＬＫＬＩＮＥＩＥＥＭＧＧＭＡＫＡＶ ＡＥＧＩＰＫＬＲＩＥＥＣＡＡＲＲＱＡＲＩＤＳＧＳＥＶＩ ＶＧＶＮＫＹＱＬＥＫＥＤＡＶＥＶＬＡＩＤＮＴＳＶＲＮＲ ＱＩＥＫＬＫＫＩＫＳＳＲＤＱＡＬＡＥＲＣＬＡＡＬＴＥＣ ＡＡＳＧＤＤＧＮＩＬＡＬＡＶＤＡＳＲＡＲＣＴＶＧＥＩＴＤ ＡＬＫＫＶＦＧＥＨＫＡＮＤＲＭＶＳＧＡＹＲＱＥＦＧＥＳ ＫＥＩＴＳＡＩＫＲＶＨＫＦＭＥＲＥＧＲＲＰＲＬＬＶＡＫ ＭＧＱＤＧＨＤＲＧＡＫＶＩＡＴＧＦＡＤＬＧＦＤＶＤＩＧ ＰＬＦＱＴＰＲＥＶＡＱＱＡＶＤＡＤＶＨＡＶＧＩＳＴＬＡ ＡＧＨＫＴＬＶＰＥＬＩＫＥＬＮＳＬＧＲＰＤＩＬＶＭＣＧ ＧＶＩＰＰＱＤＹＥＦＬＦＥＶＧＶＳＮＶＦＧＰＧＴＲＩＰ ＫＡＡＶＱＶＬＤＤＩＥＫＣＬＥＫＫＱＱＳＶ

【表６】

配列番号２０８のアミノ酸３３～７５０	成熟ヒトＭＣＭ	LHQQQPLHPEWAALAKKQLKGKNPEDL IWHTPEGISIKPLYSKRDTMDLPEELP GVKPFTRGPYPTMYTFRPWTIRQYAGF STVEESNKFYKDNIKAGQQGLSVAFDL ATHRGYDSDNPRVRGDVGMAGVAIDTV EDTKILFDGIPLEKMSVSMTMNGAVIP VLANFIVTGEEQGVPKEKLTGTIQNDI LKEFMVRNTYIFPPEPSMKIIADIFEY TAKHMPKFNSISISGYHMQEAGADAIL ELAYTLADGLEYSRTGLQAGLTIDEFA PRLSFFWGIGMNFYMEIAKMRAGRRLW AHLIEKMFQPKNSKSLLLRAHCQTSGW SLTEQDPYNNIVRTAIEAMAAVFGGTQ SLHTNSFDEALGLPTVKSARIARNTQI IIQEESGIPKVADPWGGSYMMECLTND VYDAALKLINEIEEMGGMAKAVAEGIP KLRIEECAARRQARIDSGSEVIVGVNK YQLEKEDAVEVLAIDNTSVRNRQIEKL KKIKSSRDQALAERCLAALTECAASGD GNILALAVDASRARCTVGEITDALKKV FGEHKANDRMVSGAYRQEFGESKEITS AIKRVHKFMEREGRRPRLLVAKMGQDG HDRGAKVIATGFADLGFDVDIGPLFQT PREVAQQAVDADVHAVGVSTLAAGHKT LVPELIKELNSLGRPDILVMCGGVIPP QDYEFLFEVGVSNVFGPGTRIPKAAVQ VLDDIEKCLEKKQQSV

【表７】

配列番号	機能性	
２０９	ヒトＭＣＩＶ	ＭＬＲＡＫＮＱＬＦＬＬＳＰＨＹＬＲＱＶＫＥＳＳＧＳＲＬ ＩＱＱＲＬＬＨＱＱＱＰＬＨＰＥＷＡＡＬＡＫＫＱＬＫＧＫ ＮＰＥＤＬＩＷＨＴＰＥＧＩＳＶＫＰＬＹＳＫＲＤＴＭＤＬ ＰＥＥＬＰＧＶＫＰＦＴＲＧＰＹＰＴＭＹＴＦＲＰＷＴＩＲ ＱＹＡＧＦＳＴＶＥＥＳＮＫＦＹＫＤＮＩＫＡＧＱＱＧＬＳ ＶＡＦＤＬＡＴＨＲＧＹＤＳＤＮＰＲＶＲＧＤＶＧＭＡＧＶ ＡＩＤＴＶＥＤＴＫＩＬＦＤＧＩＰＬＥＫＭＳＶＳＭＴＭＮ ＧＡＶＩＰＶＬＡＮＦＩＶＴＧＥＥＱＧＶＰＫＥＫＬＴＧＴ ＩＱＮＤＩＬＫＥＦＭＶＲＮＴＹＩＦＰＰＥＰＳＭＫＩＩＡ ＤＩＦＥＹＴＡＫＨＭＰＫＦＮＳＩＳＩＳＧＹＨＭＱＥＡＧ ＡＤＡＩＬＥＬＡＹＴＬＡＤＧＬＥＹＳＲＴＧＬＱＡＧＬＴ ＩＤＥＦＡＰＲＬＳＦＦＷＧＩＧＭＮＦＹＭＥＩＡＫＭＲＡ ＧＲＲＬＷＡＨＬＩＥＫＭＦＱＰＫＮＳＫＳＬＬＬＲＡＨＣ ＱＴＳＧＷＳＬＴＥＱＤＰＹＮＮＩＶＲＴＡＩＥＡＭＡＡＶ ＦＧＧＴＱＳＬＨＴＮＳＦＤＥＡＬＧＬＰＴＶＫＳＡＲＩＡ ＲＮＴＱＩＩＩＱＥＥＳＧＩＰＫＶＡＤＰＷＧＧＳＹＭＭＥ ＣＬＴＮＤＶＹＤＡＡＬＫＬＩＮＥＩＥＥＭＧＧＭＡＫＡＶ ＡＥＧＩＰＫＬＲＩＥＥＣＡＡＲＲＱＡＲＩＤＳＧＳＥＶＩ ＶＧＶＮＫＹＱＬＥＫＥＤＡＶＥＶＬＡＩＤＮＴＳＶＲＮＲ ＱＩＥＫＬＫＫＩＫＳＳＲＤＱＡＬＡＥＲＣＬＡＡＬＴＥＣ ＡＡＳＧＤＧＮＩＬＡＬＡＶＤＡＳＲＡＲＣＴＶＧＥＩＴＤ ＡＬＫＫＶＦＧＥＨＫＡＮＤＲＭＶＳＧＡＹＲＱＥＦＧＥＳ ＫＥＩＴＳＡＩＫＲＶＨＫＦＭＥＲＥＧＲＲＰＲＬＬＶＡＫ ＭＧＱＤＧＨＤＲＧＡＫＶＩＡＴＧＦＡＤＬＧＦＤＶＤＩＧ ＰＬＦＱＴＰＲＥＶＡＱＱＡＶＤＡＤＶＨＡＶＧＩＳＴＬＡ ＡＧＨＫＴＬＶＰＥＬＩＫＥＬＮＳＬＧＲＰＤＩＬＶＭＣＧ ＧＶＩＰＰＱＤＹＥＦＬＦＥＶＧＶＳＮＶＦＧＰＧＴＲＩＰ ＫＡＡＶＱＶＬＤＤＩＥＫＣＬＥＫＫＱＱＳＶ

【表８】

配列番号	機能性	
２１０	ヒトMCMA499T	MLRAKNQLFLLSPHYLRQVKESSGSRL IQQRLLHQQQPLHPEWAALAKKQLKGK NPEDLIWHTPEGISIKPLYSKRDTMDL PEELPGVKPFTRGPYPTMYTFRPWTIR QYAGFSTVEESNKFYKDNIKAGQQGLS VAFDLATHRGYDSDNPRVRGDVGMAGV AIDTVEDTKILFDGIPLEKMSVSMTMN GAVIPVLANFIVTGEEQGVPKEKLTGT IQNDILKEFMVRNTYIFPPEPSMKIIA DIFEYTAKHMPKFNSISISGYHMQEAG ADAILELAYTLADGLEYSRTGLQAGLT IDEFAPRLSFFWGIGMNFYMEIAKMRA GRRLWAHLIEKMFQPKNSKSLLLRAHC QTSGWSLTEQDPYNNIVRTAIEAMAAV FGGTQSLHTNSFDEALGLPTVKSARIA RNTQIIIQEESGIPKVADPWGGSYMME CLTNDVYDAALKLINEIEEMGGMAKAV AEGIPKLRIEECAARRQARIDSGSEVI VGVNKYQLEKEDTVEVLAIDNTSVRNR QIEKLKKIKSSRDQALAERCLAALTEC AASGDGNILALAVDASRARCTVGEITD ALKKVFGEHKANDRMVSGAYRQEFGES KEITSAIKRVHKFMERERGRRPRLLVAK MGQDGHDRGAKVIATGFADLGFDVDIG PLFQTPREVAQQAVDADVHAVGISTLA AGHKTLVPELIKELNSLGRPDILVMCG GVIPPQDYEFLFEVGVSNVFGPGTRIP KAAVQVLDDIEKCLEKKQQSV

10

20

30

40

50

【表９】

配列番号	機能性	
２１１	ヒトMCMR５３２H	MLRAKNQLFLLSPHYLRQVKESSGSRL IQQRLLHQQQPLHPEWAALAKKQLKGK NPEDLIWHTPEGISIKPLYSKRDTMDL PEELPGVKPFTRGPYPTMYTFRPWTIR QYAGFSTVEESNKFYKDNIKAGQQGLS VAFDLATHRGYDSDNPRVRGDVGMAGV AIDTVEDTKILFDGIPLEKMSVSMTMN GAVIPVLANFIVTGEEQGVPKEKLTGT IQNDILKEFMVRNTYIFPPEPSMKIIA DIFEYTAKHMPKFNSISISGYHMQEAG ADAILELAYTLADGLEYSRTGLQAGLT IDEFAPRLSFFWGIGMNFYMEIAKMRA GRRLWAHLIEKMFQPKNSKSLLLRAHC QTSGWSLTEQDPYNNIVRTAIEAMAAV FGGTQSLHTNSFDEALGLPTVKSARIA RNTQIIIQEESGIPKVADPWGGSYMME CLTNDVYDAALKLINEIEEMGGMAKAV AEGIPKLRIEECAARRQARIDSGSEVI VGVNKYQLEKEDAVEVLAIDNTSVRNR QIEKLKKIKSSRDQALAEHCLAALTEC AASGDGNILALAVDASRARCTVGEITD ALKKVFGEHKANDRMVSGAYRQEFGES KEITSAIKRVHKFMEREGRRPRLLVAK MGQDGHDRGAKVIATGFADLGFDVDIG PLFQTPREVAQQAVDADVHAVGISTLA AGHKTLVPELIKELNSLGRPDILVMCG GVIPPQDYEFLFEVGVSNVFGPGTRIP KAAVQVLDDIEKCLEKKQQSV

10

20

30

40

50

【表１０】

配列番号	機能性	
２１２	ヒトMCMT598A	MLRAKNQLFLLSPHYLRQVKESSGSRL IQQRLLHQQQPLHPEWAALAKKQLKGK NPEDLIWHTPEGISIKPLYSKRDTMDL PEELPGVKPFTRGPYPTMYTFRPWTIR QYAGFSTVEESNKFYKDNIKAGQQGLS VAFDLATHRGYDSDNPRVRGDVGMAGV AIDTVEDTKILFDGIPLEKMSVSMTMN GAVIPVLANFIVTGEEQGVPKEKLTGT IQNDILKEFMVRNTYIFPPEPSMKIIA DIFEYTAKHMPKFNSISISGYHMQEAG ADAILELAYTLADGLEYSRTGLQAGLT IDEFAPRLSFFWGIGMNFYMEIAKMRA GRRLWAHLIEKMFQPKNSKSLLLRAHC QTSGWSLTEQDPYNNIVRTAIEAMAAV FGGTQSLHTNSFDEALGLPTVKSARIA RNTQIIIQEESGIPKVADPWGGSYMME CLTNDVYDAALKLINEIEEMGGMAKAV AEGIPKLRIEECAARRQARIDSGSEVI VGVNKYQLEKEDAVEVLAIDNTSVRNR QIEKLKKIKSSRDQALAERCLAALTEC AASGDGNILALAVDASRARCTVGEITD ALKKVFGEHKANDRMVSGAYRQEFGES KEIASAIKRVHKFMERE GRRPRLLVAK MGQDGHDRGAKVIATGFADLGFDVDIG PLFQTPREVAQQAVDADVHAVGISTLA AGHKTLVPELIKELNSLGRPDILVMCG GVIPPQDYEFLFEVGVSNVFGPGTRIP KAAVQVLDDIEKCLEKKQQSV

10

20

30

40

50

【表１１】

配列番号	機能性	
２１３	ヒトMCM167 1V	MLRAKNQLFLLSPHYLRQVKESSGSRL IQQRLLHQQQPLHPEWAALAKKQLKGK NPEDLIWHTPEGISIKPLYSKRDTMDL PEELPGVKPFTRGPYPTMYTFRPWTIR QYAGFSTVEESNKFYKDNIKAGQQGLS VAFDLATHRGYDSDNPRVRGDVGMAGV AIDTVEDTKILFDGIPLEKMSVSMTMN GAVIPVLANFIVTGEEQGVPKEKLTGT IQNDILKEFMVRNTYIFPPEPSMKIIA DIFEYTAKHMPKFNSISISGYHMQEAG ADAILELAYTLADGLEYSRTGLQAGLT IDEFAPRLSFFWGIGMNFYMEIAKMRA GRRLWAHLIEKMFQPKNSKSLLLRAHC QTSGWSLTEQDPYNNIVRTAIEAMAAV FGGTQSLHTNSFDEALGLPTVKSARIA RNTQIIIQEESGIPKVADPWGGSYMME CLTNDVYDAALKLINEIEEMGGMAKAV AEGIPKLRIEECAARRQARIDSGSEVI VGVNKYQLEKEDAVEVLAIDNTSVRNR QIEKLKKIKSSRDQALAERCLAALTEC AASGDGNILALAVDASRARCTVGEITD ALKKVFGEHKANDRMVSGAYRQEFGES KEITSAIKRVHKFMEREGRRPRLLVAK MGQDGHDRGAKVIATGFADLGFDVDIG PLFQTPREVAQQAVDADVHAVGVSTLA AGHKTLVPELIKELNSLGRPDILVMCG GVIPPQDYEFLFEVGVSNVFGPGTRIP KAAVQVLDDIEKCLEKKQQSV

【０２６６】

ＩＩ．修飾ポリヌクレオチド

本開示はまた、本明細書に記載されるポリヌクレオチドを含む修飾ポリヌクレオチド、すなわち、化学的及び／または構造的に修飾されたポリヌクレオチドを含有するＭＣＭポリペプチドをコードするＯＲＦを含むポリヌクレオチドを含む。本開示のポリヌクレオチドが化学的及び／または構造的に修飾される場合、そのポリヌクレオチドは、「修飾ポリヌクレオチド」と称され得る。

【０２６７】

本開示は、ポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡポリヌクレオチドなどのＲＮＡポリヌクレオチド）の修飾ヌクレオシド及び修飾ヌクレオチドを提供する。「ヌクレオシド」は、糖分子（例えば、ペントースまたはリボース）またはその誘導体を、有機塩基（例えば、プリンまたはピリミジン）またはその誘導体（本明細書において「核酸塩基」ともいう）との組み合わせで含有する化合物を指す。「ヌクレオチド」は、リン酸基を含むヌクレオシドを指す。修飾ヌクレオチドは、任意の有用な方法によって、例えば、化学的、酵素的または組み換え的に、１つ以上の修飾ヌクレオシドまたは非天然ヌクレオシドを含むように合成することができる。ポリヌクレオチドは、連結されたヌクレオシドの１つまたは複数の領域を含み得る。そのような領域は、様々な主鎖結合を有し得る。結合は、標準的な

ホスホジエステル結合であってよく、この場合、ポリヌクレオチドは、ヌクレオチドの領域を含むことになる。

【０２６８】

修飾は、種々の明確に異なる修飾であり得る。いくつかの実施形態において、領域は、１つ、２つまたはそれ以上の（任意選択により異なる）ヌクレオシド修飾またはヌクレオチド修飾を含有し得る。いくつかの実施形態において、修飾ポリヌクレオチドは、細胞に導入されると、非修飾ポリヌクレオチドと比較して、細胞内での低減された分解を示し得る。

【０２６９】

構造的修飾

いくつかの実施形態において、本開示のポリヌクレオチドは、構造的に修飾される。本明細書で使用されるとき、「構造的」修飾は、ヌクレオチド自体に対する著しい化学修飾なく、ポリヌクレオチド中に、２つ以上の連結されたヌクレオシドが挿入、欠失、複製、反転またはランダム化されているものである。必然的に化学結合を破壊及び再形成して構造的修飾をもたらすため、構造的修飾は、化学的性質のものであり、そのため、化学修飾である。しかしながら、構造的修飾は、異なるヌクレオチド配列をもたらす。例えば、ポリヌクレオチド「ＡＴＣＧ」は、「ＡＴ－５ｍｅＣ－Ｇ」に化学修飾され得る。同ポリヌクレオチドは、「ＡＴＣＧ」から「ＡＴＣＣＣＧ」に構造的に修飾され得る。ここで、ジヌクレオチド「ＣＣ」が挿入されており、その結果、ポリヌクレオチドに構造的修飾が生じる。

【０２７０】

化学修飾

いくつかの実施形態において、本開示のポリヌクレオチドは、化学修飾される。ポリヌクレオチドに関して本明細書で使用されるとき、「化学修飾」または必要に応じて「化学修飾された」という用語は、アデノシン（Ａ）、グアノシン（Ｇ）、ウリジン（Ｕ）、チミジン（Ｔ）またはシチジン（Ｃ）のリボヌクレオシドまたはデオキシリボヌクレオシドに対する、その位置、パターン、パーセントまたは集団のうちの１つ以上における修飾を指す。一般に、本明細書中、これらの用語は、天然に存在する５’末端のｍＲＮＡキャップ部分におけるリボヌクレオチド修飾を指すことは意図されない。

【０２７１】

いくつかの実施形態において、本開示のポリヌクレオチドは、同一ヌクレオシドタイプの全てもしくはいずれかの均一の化学修飾を有し得るか、同一ヌクレオシドタイプの全てもしくはいずれかにおいて同一出発修飾の単なる漸減によって生じる修飾集団を有し得るか、全てのウリジンがウリジン類似体（例えば、プソイドウリジンまたは５－メトキシウリジン）によって置き換えられているなどのランダムな組み込みを有する、同一ヌクレオシドタイプのいずれかの全てに関して化学修飾の既定のパーセントを有し得る。別の実施形態において、ポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチド全体にわたって、２、３または４つの同一ヌクレオシドタイプの均一の化学修飾を有し得る（全てのウリジン及び全てのシトシンなどが同じように修飾されているなど）。

【０２７２】

修飾ヌクレオチドの塩基対合は、標準的なアデノシン－チミン、アデノシン－ウラシルまたはグアノシン－シトシンの塩基対だけでなく、ヌクレオチド及び／または非標準的塩基もしくは修飾塩基を含む修飾ヌクレオチドの間で形成される塩基対も包含され、ここで、水素結合ドナーと水素結合アクセプターの配置は、非標準的塩基と標準的塩基との間、または２つの相補的な非標準的塩基構造との間の水素結合を可能にするものである。このような非標準的塩基対合の一例は、修飾ヌクレオチドのイノシンとアデニン、シトシンまたはウラシルとの間の塩基対合である。塩基／糖またはリンカーの任意の組み合わせを本開示のポリヌクレオチドに組み込むことができる。

【０２７３】

当業者であれば、別途記載される場合を除き、本出願に記載されるポリヌクレオチド配列は、ＤＮＡ配列を表す場合には「Ｔ」を用い、配列がＲＮＡを表す場合には、「Ｔ」は「

Ｕ」に置き換えられることを理解するであろう。

【０２７４】

本開示の組成物、方法及び合成プロセスに有用なポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡポリヌクレオチドなどのＲＮＡポリヌクレオチド）の修飾には、次のヌクレオチド、ヌクレオシド及び核酸塩基が挙げられるが、これらに限定されない：２－メチルチオ－Ｎ６－（シス－ヒドロキシイソペンテニル）アデノシン、２－メチルチオ－Ｎ６－メチルアデノシン、２－メチルチオ－Ｎ６－スレオニルカルバモイルアデノシン、Ｎ６－グリシニルカルバモイルアデノシン、Ｎ６－イソペンテニルアデノシン、Ｎ６－メチルアデノシン、Ｎ６－スレオニルカルバモイルアデノシン、１，２’－Ｏ－ジメチルアデノシン、１－メチルアデノシン、２’－Ｏ－メチルアデノシン、２’－Ｏ－リボシルアデノシン（リン酸）、２－メチルアデノシン、２－メチルチオ－Ｎ６イソペンテニルアデノシン、２－メチルチオ－Ｎ６－ヒドロキシノルバリルカルバモイルアデノシン、２’－Ｏ－メチルアデノシン、２’－Ｏ－リボシルアデノシン（リン酸）、イソペンテニルアデノシン、Ｎ６－（シス－ヒドロキシイソペンテニル）アデノシン、Ｎ６，２’－Ｏ－ジメチルアデノシン、Ｎ６，２’－Ｏ－ジメチルアデノシン、Ｎ６，Ｎ６，２’－Ｏ－トリメチルアデノシン、Ｎ６，Ｎ６－ジメチルアデノシン、Ｎ６－アセチルアデノシン、Ｎ６－ヒドロキシノルバリルカルバモイルアデノシン、Ｎ６－メチル－Ｎ６－スレオニルカルバモイルアデノシン、２－メチルアデノシン、２－メチルチオ－Ｎ６－イソペンテニルアデノシン、７－デアザ－アデノシン、Ｎ１－メチル－アデノシン、Ｎ６，Ｎ６（ジメチル）アデニン、Ｎ６－シス－ヒドロキシ－イソペンテニル－アデノシン、α－チオ－アデノシン、２（アミノ）アデニン、２（アミノプロピル）アデニン、２（メチルチオ）Ｎ６（イソペンテニル）アデニン、２－（アルキル）アデニン、２－（アミノアルキル）アデニン、２－（アミノプロピル）アデニン、２－（ハロ）アデニン、２－（ハロ）アデニン、２－（プロピル）アデニン、２’－アミノ－２’－デオキシ－ＡＴＰ、２’－アジド－２’－デオキシ－ＡＴＰ、２’－デオキシ－２’－ａ－アミノアデノシンＴＰ、２’－デオキシ－２’－ａ－アジドアデノシンＴＰ、６（アルキル）アデニン、６（メチル）アデニン、６－（アルキル）アデニン、６－（メチル）アデニン、７（デアザ）アデニン、８（アルケニル）アデニン、８（アルキニル）アデニン、８（アミノ）アデニン、８（チオアルキル）アデニン、８－（アルケニル）アデニン、８－（アルキル）アデニン、８－（アルキニル）アデニン、８－（アミノ）アデニン、８－（ハロ）アデニン、８－（ヒドロキシル）アデニン、８－（チオアルキル）アデニン、８－（チオール）アデニン、８－アジド－アデノシン、アザアデニン、デアザアデニン、Ｎ６（メチル）アデニン、Ｎ６－（イソペンチル）アデニン、７－デアザ－８－アザ－アデノシン、７－メチルアデニン、１－デアザアデノシンＴＰ、２’フルオロ－Ｎ６－Ｂｚ－デオキシアデノシンＴＰ、２’－ＯＭｅ－２－アミノ－ＡＴＰ、２’Ｏ－メチル－Ｎ６－Ｂｚ－デオキシアデノシンＴＰ、２’－ａ－エチニルアデノシンＴＰ、２－アミノアデニン、２－アミノアデノシンＴＰ、２－アミノ－ＡＴＰ、２’－ａ－トリフルオロメチルアデノシンＴＰ、２－アジドアデノシンＴＰ、２’－ｂ－エチニルアデノシンＴＰ、２－ブロモアデノシンＴＰ、２’－ｂ－トリフルオロメチルアデノシンＴＰ、２－クロロアデノシンＴＰ、２’－デオキシ－２’，２’－ジフルオロアデノシンＴＰ、２’－デオキシ－２’－ａ－メルカプトアデノシンＴＰ、２’－デオキシ－２’－ａ－チオメトキシアデノシンＴＰ、２’－デオキシ－２’－ｂ－アミノアデノシンＴＰ、２’－デオキシ－２’－ｂ－アジドアデノシンＴＰ、２’－デオキシ－２’－ｂ－ブロモアデノシンＴＰ、２’－デオキシ－２’－ｂ－クロロアデノシンＴＰ、２’－デオキシ－２’－ｂ－フルオロアデノシンＴＰ、２’－デオキシ－２’－ｂ－ヨードアデノシンＴＰ、２’－デオキシ－２’－ｂ－メルカプトアデノシンＴＰ、２’－デオキシ－２’－ｂ－チオメトキシアデノシンＴＰ、２－フルオロアデノシンＴＰ、２－ヨードアデノシンＴＰ、２－メルカプトアデノシンＴＰ、２－メトキシ－アデニン、２－メチルチオ－アデニン、２－トリフルオロメチルアデノシンＴＰ、３－デアザ－３－ブロモアデノシンＴＰ、３－デアザ－３－クロロアデノシンＴＰ、３－デアザ－３－フルオロアデノシンＴＰ、３－デアザ－３－ヨードアデノシンＴＰ、３－デアザアデノシンＴＰ、４’－アジドアデノシンＴＰ、４’－炭素環式アデノシンＴＰ、４’－エチニルアデノシンＴＰ

、５’－ホモ－アデノシンＴＰ、８－アザ－ＡＴＰ、８－ブロモ－アデノシンＴＰ、８－トリフルオロメチルアデノシンＴＰ、９－デアザアデノシンＴＰ、２－アミノプリン、７－デアザ－２，６－ジアミノプリン、７－デアザ－８－アザ－２，６－ジアミノプリン、７－デアザ－８－アザ－２－アミノプリン、２，６－ジアミノプリン、７－デアザ－８－アザ－アデニン、７－デアザ－２－アミノプリン、２－チオシチジン、３－メチルシチジン、５－ホルミルシチジン、５－ヒドロキシメチルシチジン、５－メチルシチジン、Ｎ４－アセチルシチジン、２’－Ｏ－メチルシチジン、２’－Ｏ－メチルシチジン、５，２’－Ｏ－ジメチルシチジン、５－ホルミル－２’－Ｏ－メチルシチジン、リシジン、Ｎ４，２’－Ｏ－ジメチルシチジン、Ｎ４－アセチル－２’－Ｏ－メチルシチジン、Ｎ４－メチルシチジン、Ｎ４，Ｎ４－ジメチル－２’－ＯＭｅ－シチジンＴＰ、４－メチルシチジン、５－アザ－シチジン、プソイド－イソ－シチジン、ピロロ－シチジン、α－チオ－シチジン、２－（チオ）シトシン、２’－アミノ－２’－デオキシ－ＣＴＰ、２’－アジド－２’－デオキシ－ＣＴＰ、２’－デオキシ－２’－ａ－アミノシチジンＴＰ、２’－デオキシ－２’－ａ－アジドシチジンＴＰ、３（デアザ）５（アザ）シトシン、３（メチル）シトシン、３－（アルキル）シトシン、３－（デアザ）５（アザ）シトシン、３－（メチル）シチジン、４，２’－Ｏ－ジメチルシチジン、５（ハロ）シトシン、５（メチル）シトシン、５（プロピニル）シトシン、５（トリフルオロメチル）シトシン、５－（アルキル）シトシン、５－（アルキニル）シトシン、５－（ハロ）シトシン、５－（プロピニル）シトシン、５－（トリフルオロメチル）シトシン、５－ブロモ－シチジン、５－ヨード－シチジン、５－プロピニルシトシン、６－（アゾ）シトシン、６－アザ－シチジン、アザシトシン、デアザシトシン、Ｎ４（アセチル）シトシン、１－メチル－１－デアザ－プソイドイソシチジン、１－メチル－プソイドイソシチジン、２－メトキシ－５－メチル－シチジン、２－メトキシ－シチジン、２－チオ－５－メチル－シチジン、４－メトキシ－１－メチル－プソイドイソシチジン、４－メトキシ－プソイドイソシチジン、４－チオ－１－メチル－１－デアザ－プソイドイソシチジン、４－チオ－１－メチル－プソイドイソシチジン、４－チオ－プソイドイソシチジン、５－アザ－ゼブラリン、５－メチル－ゼブラリン、ピロロ－プソイドイソシチジン、ゼブラリン、（Ｅ）－５－（２－ブロモ－ビニル）シチジンＴＰ、２，２’－無水－シチジンＴＰ塩酸塩、２’フルオロ－Ｎ４－Ｂｚ－シチジンＴＰ、２’フルオロ－Ｎ４－アセチル－シチジンＴＰ、２’－Ｏ－メチル－Ｎ４－アセチル－シチジンＴＰ、２’Ｏ－メチル－Ｎ４－Ｂｚ－シチジンＴＰ、２’－ａ－エチニルシチジンＴＰ、２’－ａ－トリフルオロメチルシチジンＴＰ、２’－ｂ－エチニルシチジンＴＰ、２’－ｂ－トリフルオロメチルシチジンＴＰ、２’－デオキシ－２’，２’－ジフルオロシチジンＴＰ、２’－デオキシ－２’－ａ－メルカプトシチジンＴＰ、２’－デオキシ－２’－ａ－チオメトキシシチジンＴＰ、２’－デオキシ－２’－ｂ－アミノシチジンＴＰ、２’－デオキシ－２’－ｂ－アジドシチジンＴＰ、２’－デオキシ－２’－ｂ－ブロモシチジンＴＰ、２’－デオキシ－２’－ｂ－クロロシチジンＴＰ、２’－デオキシ－２’－ｂ－フルオロシチジンＴＰ、２’－デオキシ－２’－ｂ－ヨードシチジンＴＰ、２’－デオキシ－２’－ｂ－メルカプトシチジンＴＰ、２’－デオキシ－２’－ｂ－チオメトキシシチジンＴＰ、２’－Ｏ－メチル－５－（１－プロピニル）シチジンＴＰ、３’－エチニルシチジンＴＰ、４’－アジドシチジンＴＰ、４’－炭素環式シチジンＴＰ、４’－エチニルシチジンＴＰ、５－（１－プロピニル）アラ－シチジンＴＰ、５－（２－クロロ－フェニル）－２－チオシチジンＴＰ、５－（４－アミノ－フェニル）－２－チオシチジンＴＰ、５－アミノアリル－ＣＴＰ、５－シアノシチジンＴＰ、５－エチニルアラ－シチジンＴＰ、５－エチニルシチジンＴＰ、５’－ホモ－シチジンＴＰ、５－メトキシシチジンＴＰ、５－トリフルオロメチル－シチジンＴＰ、Ｎ４－アミノ－シチジンＴＰ、Ｎ４－ベンゾイル－シチジンＴＰ、プソイドイソシチジン、７－メチルグアノシン、Ｎ２，２’－Ｏ－ジメチルグアノシン、Ｎ２－メチルグアノシン、ワイオシン、１，２’－Ｏ－ジメチルグアノシン、１－メチルグアノシン、２’－Ｏ－メチルグアノシン、２’－Ｏ－リボシルグアノシン（リン酸）、２’－Ｏ－メチルグアノシン、２’－Ｏ－リボシルグアノシン（リン酸）、７－アミノメチル－７－デアザグアノシン、７－シアノ－７－デアザグアノシン、アルカエオシン、メチルワイオシン、Ｎ２，７－ジメチルグアノシン、Ｎ

２，Ｎ２，２’－Ｏ－トリメチルグアノシン、Ｎ２，Ｎ２，７－トリメチルグアノシン、Ｎ２，Ｎ２－ジメチルグアノシン、Ｎ２，７，２’－Ｏ－トリメチルグアノシン、６－チオ－グアノシン、７－デアザ－グアノシン、８－オキソ－グアノシン、Ｎ１－メチル－グアノシン、α－チオ－グアノシン、２（プロピル）グアニン、２－（アルキル）グアニン、２’－アミノ－２’－デオキシ－ＧＴＰ、２’－アジド－２’－デオキシ－ＧＴＰ、２’－デオキシ－２’－ａ－アミノグアノシンＴＰ、２’－デオキシ－２’－ａ－アジドグアノシンＴＰ、６（メチル）グアニン、６－（アルキル）グアニン、６－（メチル）グアニン、６－メチル－グアノシン、７（アルキル）グアニン、７（デアザ）グアニン、７（メチル）グアニン、７－（アルキル）グアニン、７－（デアザ）グアニン、７－（メチル）グアニン、８（アルキル）グアニン、８（アルキニル）グアニン、８（ハロ）グアニン、８（チオアルキル）グアニン、８－（アルケニル）グアニン、８－（アルキル）グアニン、８－（アルキニル）グアニン、８－（アミノ）グアニン、８－（ハロ）グアニン、８－（ヒドロキシル）グアニン、８－（チオアルキル）グアニン、８－（チオール）グアニン、アザグアニン、デアザグアニン、Ｎ（メチル）グアニン、Ｎ－（メチル）グアニン、１－メチル－６－チオ－グアノシン、６－メトキシ－グアノシン、６－チオ－７－デアザ－８－アザ－グアノシン、６－チオ－７－デアザ－グアノシン、６－チオ－７－メチル－グアノシン、７－デアザ－８－アザ－グアノシン、７－メチル－８－オキソ－グアノシン、Ｎ２，Ｎ２－ジメチル－６－チオ－グアノシン、Ｎ２－メチル－６－チオ－グアノシン、１－Ｍｅ－ＧＴＰ、２’フルオロ－Ｎ２－イソブチル－グアノシンＴＰ、２’Ｏ－メチル－Ｎ２－イソブチル－グアノシンＴＰ、２’－ａ－エチニルグアノシンＴＰ、２’－ａ－トリフルオロメチルグアノシンＴＰ、２’－ｂ－エチニルグアノシンＴＰ、２’－ｂ－トリフルオロメチルグアノシンＴＰ、２’－デオキシ－２’，２’－ジフルオログアノシンＴＰ、２’－デオキシ－２’－ａ－メルカプトグアノシンＴＰ、２’－デオキシ－２’－ａ－チオメトキシグアノシンＴＰ、２’－デオキシ－２’－ｂ－アミノグアノシンＴＰ、２’－デオキシ－２’－ｂ－アジドグアノシンＴＰ、２’－デオキシ－２’－ｂ－ブロモグアノシンＴＰ、２’－デオキシ－２’－ｂ－クロログアノシンＴＰ、２’－デオキシ－２’－ｂ－フルオログアノシンＴＰ、２’－デオキシ－２’－ｂ－ヨードグアノシンＴＰ、２’－デオキシ－２’－ｂ－メルカプトグアノシンＴＰ、２’－デオキシ－２’－ｂ－チオメトキシグアノシンＴＰ、４’－アジドグアノシンＴＰ、４’－炭素環式グアノシンＴＰ、４’－エチニルグアノシンＴＰ、５’－ホモ－グアノシンＴＰ、８－ブロモ－グアノシンＴＰ、９－デアザグアノシンＴＰ、Ｎ２－イソブチル－グアノシンＴＰ、１－メチルイノシン、イノシン、１，２’－Ｏ－ジメチルイノシン、２’－Ｏ－メチルイノシン、７－メチルイノシン、２’－Ｏ－メチルイノシン、エポキシクエオシン、ガラクトシル－クエオシン、マンノシルクエオシン、クエオシン、アリルアミノ－チミジン、アザチミジン、デアザチミジン、デオキシ－チミジン、２’－Ｏ－メチルウリジン、２－チオウリジン、３－メチルウリジン、５－カルボキシメチルウリジン、５－ヒドロキシウリジン、５－メチルウリジン、５－タウリノメチル－２－チオウリジン、５－タウリノメチルウリジン、ジヒドロウリジン、プソイドウリジン、（３－（３－アミノ－３－カルボキシプロピル）ウリジン、１－メチル－３－（３－アミノ－５－カルボキシプロピル）プソイドウリジン、１－メチルプソイドウリジン、１－エチル－プソイドウリジン、２’－Ｏ－メチルウリジン、２’－Ｏ－メチルプソイドウリジン、２’－Ｏ－メチルウリジン、２－チオ－２’－Ｏ－メチルウリジン、３－（３－アミノ－３－カルボキシプロピル）ウリジン、３，２’－Ｏ－ジメチルウリジン、３－メチル－プソイド－ウリジンＴＰ、４－チオウリジン、５－（カルボキシヒドロキシメチル）ウリジン、５－（カルボキシヒドロキシメチル）ウリジンメチルエステル、５，２’－Ｏ－ジメチルウリジン、５，６－ジヒドロ－ウリジン、５－アミノメチル－２－チオウリジン、５－カルバモイルメチル－２’－Ｏ－メチルウリジン、５－カルバモイルメチルウリジン、５－カルボキシヒドロキシメチルウリジン、５－カルボキシヒドロキシメチルウリジンメチルエステル、５－カルボキシメチルアミノメチル－２’－Ｏ－メチルウリジン、５－カルボキシメチルアミノメチル－２－チオウリジン、５－カルボキシメチルアミノメチルウリジン、

５－カルボキシメチルアミノメチルウリジン、５－カルバモイルメチルウリジンＴＰ、５－メトキシカルボニルメチル－２’－Ｏ－メチルウリジン、５－メトキシカルボニルメチル－２－チオウリジン、５－メトキシカルボニルメチルウリジン、５－メチルウリジン，）、５－メトキシウリジン、５－メチル－２－チオウリジン、５－メチルアミノメチル－２－セレノウリジン、５－メチルアミノメチル－２－チオウリジン、５－メチルアミノメチルウリジン、５－メチルジヒドロウリジン、５－オキシ酢酸－ウリジンＴＰ、５－オキシ酢酸－メチルエステル－ウリジンＴＰ、Ｎ１－メチル－プソイド－ウラシル、Ｎ１－エチル－プソイド－ウラシル、ウリジン５－オキシ酢酸、ウリジン５－オキシ酢酸メチルエステル、３－（３－アミノ－３－カルボキシプロピル）－ウリジンＴＰ、５－（イソ－ペンテニルアミノメチル）－２－チオウリジンＴＰ、５－（イソ－ペンテニルアミノメチル）－２’－Ｏ－メチルウリジンＴＰ、５－（イソ－ペンテニルアミノメチル）ウリジンＴＰ、５－プロピニルウラシル、α－チオ－ウリジン、１（アミノアルキルアミノ－カルボニルエチルエニル）－２（チオ）－プソイドウラシル、１（アミノアルキルアミノカルボニルエチルエニル）－２，４－（ジチオ）プソイドウラシル、１（アミノアルキルアミノカルボニルエチルエニル）－４（チオ）プソイドウラシル、１（アミノアルキルアミノカルボニルエチルエニル）－プソイドウラシル、１（アミノカルボニルエチルエニル）－２（チオ）－プソイドウラシル、１（アミノカルボニルエチルエニル）－２，４－（ジチオ）プソイドウラシル、１（アミノカルボニルエチルエニル）－４（チオ）プソイドウラシル、１（アミノカルボニルエチルエニル）－プソイドウラシル、１置換２（チオ）－プソイドウラシル、１置換２，４－（ジチオ）プソイドウラシル、１置換４（チオ）プソイドウラシル、１置換プソイドウラシル、１－（アミノアルキルアミノ－カルボニルエチルエニル）－２－（チオ）－プソイドウラシル、１－メチル－３－（３－アミノ－３－カルボキシプロピル）プソイドウリジンＴＰ、１－メチル－３－（３－アミノ－３－カルボキシプロピル）プソイド－ＵＴＰ、１－メチル－プソイド－ＵＴＰ、１－エチル－プソイド－ＵＴＰ、２（チオ）プソイドウラシル、２’デオキシウリジン、２’フルオロウリジン、２－（チオ）ウラシル、２，４－（ジチオ）プソイドウラシル、２’メチル、２’アミノ、２’アジド、２’フルロ－グアノシン、２’－アミノ－２’－デオキシ－ＵＴＰ、２’－アジド－２’－デオキシ－ＵＴＰ、２’－アジド－デオキシウリジンＴＰ、２’－Ｏ－メチルプソイドウリジン、２’デオキシウリジン、２’フルオロウリジン、２’－デオキシ－２’－ａ－アミノウリジンＴＰ、２’－デオキシ－２’－ａ－アジドウリジンＴＰ、２－メチルプソイドウリジン、３（３アミノ－３カルボキシプロピル）ウラシル、４（チオ）プソイドウラシル、４－（チオ）プソイドウラシル、４－（チオ）ウラシル、４－チオウラシル、５（１，３－ジアゾール－１－アルキル）ウラシル、５（２－アミノプロピル）ウラシル、５（アミノアルキル）ウラシル、５（ジメチルアミノアルキル）ウラシル、５（グアニジニウムアルキル）ウラシル、５（メトキシカルボニルメチル）－２－（チオ）ウラシル、５（メトキシカルボニル－メチル）ウラシル、５（メチル）２（チオ）ウラシル、５（メチル）２，４（ジチオ）ウラシル、５（メチル）４（チオ）ウラシル、５（メチルアミノメチル）－２（チオ）ウラシル、５（メチルアミノメチル）－２，４（ジチオ）ウラシル、５（メチルアミノメチル）－４（チオ）ウラシル、５（プロピニル）ウラシル、５（トリフルオロメチル）ウラシル、５－（２－アミノプロピル）ウラシル、５－（アルキル）－２－（チオ）プソイドウラシル、５－（アルキル）－２，４（ジチオ）プソイドウラシル、５－（アルキル）－４（チオ）プソイドウラシル、５－（アルキル）プソイドウラシル、５－（アルキル）ウラシル、５－（アルキニル）ウラシル、５－（アリルアミノ）ウラシル、５－（シアノアルキル）ウラシル、５－（ジアルキルアミノアルキル）ウラシル、５－（ジメチルアミノアルキル）ウラシル、５－（グアニジニウムアルキル）ウラシル、５－（ハロ）ウラシル、５－（ｌ，３－ジアゾール－ｌ－アルキル）ウラシル、５－（メトキシ）ウラシル、５－（メトキシカルボニルメチル）－２－（チオ）ウラシル、５－（メトキシカルボニル－メチル）ウラシル、５－（メチル）２（チオ）ウラシル、５－（メチル）２，４（ジチオ）ウラシル、５－（メチル）４（チオ）ウラシル、５－（メチル）－２－（チオ）プソイドウラシル、５－（メチル）－２，４（ジチオ）プソイドウラシル、５－（メ

チル）－４（チオ）プソイドウラシル、５－（メチル）プソイドウラシル、５－（メチルアミノメチル）－２（チオ）ウラシル、５－（メチルアミノメチル）－２，４（ジチオ）ウラシル、５－（メチルアミノメチル）－４－（チオ）ウラシル、５－（プロピニル）ウラシル、５－（トリフルオロメチル）ウラシル、５－アミノアリル－ウリジン、５－ブロモ－ウリジン、５－ヨード－ウリジン、５－ウラシル、６（アゾ）ウラシル、６－（アゾ）ウラシル、６－アザ－ウリジン、アリルアミノ－ウラシル、アザウラシル、デアザウラシル、Ｎ３（メチル）ウラシル、プソイド－ＵＴＰ－１－２－エタン酸、プソイドウラシル、４－チオ－プソイド－ＵＴＰ、１－カルボキシメチル－プソイドウリジン、１－メチル－１－デアザ－プソイドウリジン、１－プロピニル－ウリジン、１－タウリノメチル－１－メチル－ウリジン、１－タウリノメチル－４－チオ－ウリジン、１－タウリノメチル－プソイドウリジン、２－メトキシ－４－チオ－プソイドウリジン、２－チオ－１－メチル－１－デアザ－プソイドウリジン、２－チオ－１－メチル－プソイドウリジン、２－チオ－５－アザ－ウリジン、２－チオ－ジヒドロプソイドウリジン、２－チオ－ジヒドロウリジン、２－チオ－プソイドウリジン、４－メトキシ－２－チオ－プソイドウリジン、４－メトキシ－プソイドウリジン、４－チオ－１－メチル－プソイドウリジン、４－チオ－プソイドウリジン、５－アザ－ウリジン、ジヒドロプソイドウリジン、（±）１－（２－ヒドロキシプロピル）プソイドウリジンＴＰ、（２Ｒ）－１－（２－ヒドロキシプロピル）プソイドウリジンＴＰ、（２Ｓ）－１－（２－ヒドロキシプロピル）プソイドウリジンＴＰ、（Ｅ）－５－（２－ブロモ－ビニル）アラ－ウリジンＴＰ、（Ｅ）－５－（２－ブロモ－ビニル）ウリジンＴＰ、（Ｚ）－５－（２－ブロモ－ビニル）アラ－ウリジンＴＰ、（Ｚ）－５－（２－ブロモ－ビニル）ウリジンＴＰ、１－（２，２，２－トリフルオロエチル）－プソイド－ＵＴＰ、１－（２，２，３，３，３－ペンタフルオロプロピル）プソイドウリジンＴＰ、１－（２，２－ジエトキシエチル）プソイドウリジンＴＰ、１－（２，４，６－トリメチルベンジル）プソイドウリジンＴＰ、１－（２，４，６－トリメチル－ベンジル）プソイド－ＵＴＰ、１－（２，４，６－トリメチル－フェニル）プソイド－ＵＴＰ、１－（２－アミノ－２－カルボキシエチル）プソイド－ＵＴＰ、１－（２－アミノ－エチル）プソイド－ＵＴＰ、１－（２－ヒドロキシエチル）プソイドウリジンＴＰ、１－（２－Ｍエトキシエチル）プソイドウリジンＴＰ、１－（３，４－ビス－トリフルオロメトキシベンジル）プソイドウリジンＴＰ、１－（３，４－ジメトキシベンジル）プソイドウリジンＴＰ、１－（３－アミノ－３－カルボキシプロピル）プソイド－ＵＴＰ、１－（３－アミノ－プロピル）プソイド－ＵＴＰ、１－（３－シクロプロピル－プロパ－２－イニル）プソイドウリジンＴＰ、１－（４－アミノ－４－カルボキシブチル）プソイド－ＵＴＰ、１－（４－アミノ－ベンジル）プソイド－ＵＴＰ、１－（４－アミノ－ブチル）プソイド－ＵＴＰ、１－（４－アミノ－フェニル）プソイド－ＵＴＰ、１－（４－アジドベンジル）プソイドウリジンＴＰ、１－（４－ブロモベンジル）プソイドウリジンＴＰ、１－（４－クロロベンジル）プソイドウリジンＴＰ、１－（４－フルオロベンジル）プソイドウリジンＴＰ、１－（４－ヨードベンジル）プソイドウリジンＴＰ、１－（４－メタンスルホニルベンジル）プソイドウリジンＴＰ、１－（４－メトキシベンジル）プソイドウリジンＴＰ、１－（４－メトキシ－ベンジル）プソイド－ＵＴＰ、１－（４－メトキシ－フェニル）プソイド－ＵＴＰ、１－（４－メチルベンジル）プソイドウリジンＴＰ、１－（４－メチル－ベンジル）プソイド－ＵＴＰ、１－（４－ニトロベンジル）プソイドウリジンＴＰ、１－（４－ニトロ－ベンジル）プソイド－ＵＴＰ、１（４－ニトロ－フェニル）プソイド－ＵＴＰ、１－（４－チオメトキシベンジル）プソイドウリジンＴＰ、１－（４－トリフルオロメトキシベンジル）プソイドウリジンＴＰ、１－（４－トリフルオロメチルベンジル）プソイドウリジンＴＰ、１－（５－アミノ－ペンチル）プソイド－ＵＴＰ、１－（６－アミノ－ヘキシル）プソイド－ＵＴＰ、１，６－ジメチル－プソイド－ＵＴＰ、１－［３－（２－｛２－［２－（２－アミノエトキシ）－エトキシ］－エトキシ｝－エトキシ）－プロピオニル］プソイドウリジンＴＰ、１－｛３－［２－（２－アミノエトキシ）－エトキシ］－プロピオニル｝プソイドウリジンＴＰ、１－アセチルプソイドウリジンＴＰ、１－アルキル－６－（１－プロピニル）－プソイド－ＵＴＰ、１－アル

キル－６－（２－プロピニル）－プソイド－ＵＴＰ、１－アルキル－６－アリル－プソイド－ＵＴＰ、１－アルキル－６－エチニル－プソイド－ＵＴＰ、１－アルキル－６－ホモアリル－プソイド－ＵＴＰ、１－アルキル－６－ビニル－プソイド－ＵＴＰ、１－アリルプソイドウリジンＴＰ、１－アミノメチル－プソイド－ＵＴＰ、１－ベンゾイルプソイドウリジンＴＰ、１－ベンジルオキシメチルプソイドウリジンＴＰ、１－ベンジル－プソイド－ＵＴＰ、１－ビオチニル－ＰＥＧ
２－プソイドウリジンＴＰ、１－ビオチニルプソイドウリジンＴＰ、１－ブチル－プソイド－ＵＴＰ、１－シアノメチルプソイドウリジンＴＰ、１－シクロブチルメチル－プソイド－ＵＴＰ、１－シクロブチル－プソイド－ＵＴＰ、１－シクロヘプチルメチル－プソイド－ＵＴＰ、１－シクロヘプチル－プソイド－ＵＴＰ、１－シクロヘキシルメチル－プソイド－ＵＴＰ、１－シクロヘキシル－プソイド－ＵＴＰ、１－シクロオクチルメチル－プソイド－ＵＴＰ、１－シクロオクチル－プソイド－ＵＴＰ、１－シクロペンチルメチル－プソイド－ＵＴＰ、１－シクロペンチル－プソイド－ＵＴＰ、１－シクロプロピルメチル－プソイド－ＵＴＰ、１－シクロプロピル－プソイド－ＵＴＰ、１－エチル－プソイド－ＵＴＰ、１－ヘキシル－プソイド－ＵＴＰ、１－ホモアリルプソイドウリジンＴＰ、１－ヒドロキシメチルプソイドウリジンＴＰ、１－イソ－プロピル－プソイド－ＵＴＰ、１－Ｍｅ－２－チオ－プソイド－ＵＴＰ、１－Ｍｅ－４－チオ－プソイド－ＵＴＰ、１－Ｍｅ－アルファ－チオ－プソイド－ＵＴＰ、１－メタンスルホニルメチルプソイドウリジンＴＰ、１－メトキシメチルプソイドウリジンＴＰ、１－メチル－６－（２，２，２－トリフルオロエチル）プソイド－ＵＴＰ、１－メチル－６－（４－モルホリノ）－プソイド－ＵＴＰ、１－メチル－６－（４－チオモルホリノ）－プソイド－ＵＴＰ、１－メチル－６－（置換フェニル）プソイド－ＵＴＰ、１－メチル－６－アミノ－プソイド－ＵＴＰ、１－メチル－６－アジド－プソイド－ＵＴＰ、１－メチル－６－ブロモ－プソイド－ＵＴＰ、１－メチル－６－ブチル－プソイド－ＵＴＰ、１－メチル－６－クロロ－プソイド－ＵＴＰ、１－メチル－６－シアノ－プソイド－ＵＴＰ、１－メチル－６－ジメチルアミノ－プソイド－ＵＴＰ、１－メチル－６－エトキシ－プソイド－ＵＴＰ、１－メチル－６－エチルカルボキシレート－プソイド－ＵＴＰ、１－メチル－６－エチル－プソイド－ＵＴＰ、１－メチル－６－フルオロ－プソイド－ＵＴＰ、１－メチル－６－ホルミル－プソイド－ＵＴＰ、１－メチル－６－ヒドロキシアミノ－プソイド－ＵＴＰ、１－メチル－６－ヒドロキシ－プソイド－ＵＴＰ、１－メチル－６－ヨード－プソイド－ＵＴＰ、１－メチル－６－イソ－プロピル－プソイド－ＵＴＰ、１－メチル－６－メトキシ－プソイド－ＵＴＰ、１－メチル－６－メチルアミノ－プソイド－ＵＴＰ、１－メチル－６－フェニル－プソイド－ＵＴＰ、１－メチル－６－プロピル－プソイド－ＵＴＰ、１－メチル－６－ｔｅｒｔ－ブチル－プソイド－ＵＴＰ、１－メチル－６－トリフルオロメトキシ－プソイド－ＵＴＰ、１－メチル－６－トリフルオロメチル－プソイド－ＵＴＰ、１－モルホリノメチルプソイドウリジンＴＰ、１－ペンチル－プソイド－ＵＴＰ、１－フェニル－プソイド－ＵＴＰ、１－ピバロイルプソイドウリジンＴＰ、１－プロパルギルプソイドウリジンＴＰ、１－プロピル－プソイド－ＵＴＰ、１－プロピニル－プソイドウリジン、１－ｐ－トリル－プソイド－ＵＴＰ、１－ｔｅｒｔ－ブチル－プソイド－ＵＴＰ、１－チオメトキシメチルプソイドウリジンＴＰ、１－チオモルホリノメチルプソイドウリジンＴＰ、１－トリフルオロアセチルプソイドウリジンＴＰ、１－トリフルオロメチル－プソイド－ＵＴＰ、１－ビニルプソイドウリジンＴＰ、２，２’－無水－ウリジンＴＰ、２’－ブロモ－デオキシウリジンＴＰ、２’－Ｆ－５－メチル－２’－デオキシ－ＵＴＰ、２’－ＯＭｅ－５－Ｍｅ－ＵＴＰ、２’－ＯＭｅ－プソイド－ＵＴＰ、２’－ａ－エチニルウリジンＴＰ、２’－ａ－トリフルオロメチルウリジンＴＰ、２’－ｂ－エチニルウリジンＴＰ、２’－ｂ－トリフルオロメチルウリジンＴＰ、２’－デオキシ－２’，２’－ジフルオロウリジンＴＰ、２’－デオキシ－２’－ａ－メルカプトウリジンＴＰ、２’－デオキシ－２’－ａ－チオメトキシウリジンＴＰ、２’－デオキシ－２’－ｂ－アミノウリジンＴＰ、２’－デオキシ－２’－ｂ－アジドウリジンＴＰ、２’－デオキシ－２’－ｂ－ブロモウリジンＴＰ、２’－デオキシ－２’－ｂ－クロロウリジンＴＰ、２’－デオキシ－２’－ｂ－フルオロウリジンＴＰ、２’－デオキシ－２’

－ｂ－ヨードウリジンＴＰ、２’－デオキシ－２’－ｂ－メルカプトウリジンＴＰ、２’－デオキシ－２’－ｂ－チオメトキシウリジンＴＰ、２－メトキシ－４－チオ－ウリジン、２－メトキシウリジン、２’－Ｏ－メチル－５－（１－プロピニル）ウリジンＴＰ、３－アルキル－プソイド－ＵＴＰ、４’－アジドウリジンＴＰ、４’－炭素環式ウリジンＴＰ、４’－エチニルウリジンＴＰ、５－（１－プロピニル）アラ－ウリジンＴＰ、５－（２－フラニル）ウリジンＴＰ、５－シアノウリジンＴＰ、５－ジメチルアミノウリジンＴＰ、５’－ホモ－ウリジンＴＰ、５－ヨード－２’－フルオロ－デオキシウリジンＴＰ、５－フェニルエチニルウリジンＴＰ、５－トリ重水素メチル－６－重水素ウリジンＴＰ、５－トリフルオロメチル－ウリジンＴＰ、５－ビニルアラウリジンＴＰ、６－（２，２，２－トリフルオロエチル）－プソイド－ＵＴＰ、６－（４－モルホリノ）－プソイド－ＵＴＰ、６－（４－チオモルホリノ）－プソイド－ＵＴＰ、６－（置換フェニル）－プソイド－ＵＴＰ、６－アミノ－プソイド－ＵＴＰ、６－アジド－プソイド－ＵＴＰ、６－ブロモ－プソイド－ＵＴＰ、６－ブチル－プソイド－ＵＴＰ、６－クロロ－プソイド－ＵＴＰ、６－シアノ－プソイド－ＵＴＰ、６－ジメチルアミノ－プソイド－ＵＴＰ、６－エトキシ－プソイド－ＵＴＰ、６－エチルカルボキシレート－プソイド－ＵＴＰ、６－エチル－プソイド－ＵＴＰ、６－フルオロ－プソイド－ＵＴＰ、６－ホルミル－プソイド－ＵＴＰ、６－ヒドロキシアミノ－プソイド－ＵＴＰ、６－ヒドロキシ－プソイド－ＵＴＰ、６－ヨード－プソイド－ＵＴＰ、６－イソ－プロピル－プソイド－ＵＴＰ、６－メトキシ－プソイド－ＵＴＰ、６－メチルアミノ－プソイド－ＵＴＰ、６－メチル－プソイド－ＵＴＰ、６－フェニル－プソイド－ＵＴＰ、６－フェニル－プソイド－ＵＴＰ、６－プロピル－プソイド－ＵＴＰ、６－ｔｅｒｔ－ブチル－プソイド－ＵＴＰ、６－トリフルオロメトキシ－プソイド－ＵＴＰ、６－トリフルオロメチル－プソイド－ＵＴＰ、アルファ－チオ－プソイド－ＵＴＰ、プソイドウリジン１－（４－メチルベンゼンスルホン酸）ＴＰ、プソイドウリジン１－（４－メチル安息香酸）ＴＰ、プソイドウリジンＴＰ１－［３－（２－エトキシ）］プロピオン酸、プソイドウリジンＴＰ１－［３－｛２－（２－［２－（２－エトキシ）－エトキシ］－エトキシ）－エトキシ｝］プロピオン酸、プソイドウリジンＴＰ１－［３－｛２－（２－［２－｛２（２－エトキシ）－エトキシ｝－エトキシ］－エトキシ）－エトキシ｝］プロピオン酸、プソイドウリジンＴＰ１－［３－｛２－（２－［２－エトキシ］－エトキシ）－エトキシ｝］プロピオン酸、プソイドウリジンＴＰ１－［３－｛２－（２－エトキシ）－エトキシ｝］プロピオン酸、プソイドウリジンＴＰ１－メチルホスホン酸、プソイドウリジンＴＰ１－メチルホスホン酸ジエチルエステル、プソイド－ＵＴＰ－Ｎ１－３－プロピオン酸、プソイド－ＵＴＰ－Ｎ１－４－ブタン酸、プソイド－ＵＴＰ－Ｎ１－５－ペンタン酸、プソイド－ＵＴＰ－Ｎ１－６－ヘキサン酸、プソイド－ＵＴＰ－Ｎ１－７－ヘプタン酸、プソイド－ＵＴＰ－Ｎ１－メチル－ｐ－安息香酸、プソイド－ＵＴＰ－Ｎ１－ｐ－安息香酸、ワイブトシン、ヒドロキシワイブトシン、イソワイオシン、ペルオキシワイブトシン、中間体（ｕｎｄｅｒｍｏｄｉｆｉｅｄ）ヒドロキシワイブトシン、４－デメチルワイオシン、２，６－（ジアミノ）プリン、１－（アザ）－２－（チオ）－３－（アザ）－フェノキサジン－１－イル：１，３－（ジアザ）－２－（オキソ）－フェノチアジン－ｌ－イル、１，３－（ジアザ）－２－（オキソ）－フェノキサジン－１－イル、１，３，５－（トリアザ）－２，６－（ジオキサ）－ナフタレン、２（アミノ）プリン、２，４，５－（トリメチル）フェニル、２’メチル、２’アミノ、２’アジド、２’フルロ－シチジン、２’メチル、２’アミノ、２’アジド、２’フルロ－アデニン、２’メチル、２’アミノ、２’アジド、２’フルロ－ウリジン、２’－アミノ－２’－デオキシリボース、２－アミノ－６－クロロ－プリン、２－アザ－イノシニル、２’－アジド－２’－デオキシリボース、２’フルオロ－２’－デオキシリボース、２’－フルオロ－修飾塩基、２’－Ｏ－メチル－リボース、２－オキソ－７－アミノピリドピリミジン－３－イル、２－オキソ－ピリドピリミジン－３－イル、２－ピリジノン、３ニトロピロール、３－（メチル）－７－（プロピニル）イソカルボスチリリル、３－（メチル）イソカルボスチリリル、４－（フルオロ）－６－（メチル）ベンゾイミダゾール、４－（メチル）ベンゾイミダゾール、４－（メチル）インドリル、４，６－（ジメチル）インドリル、５ニトロインドール、５置換ピリミジ

ン、５－（メチル）イソカルボスチリリル、５－ニトロインドール、６－（アザ）ピリミジン、６－（アゾ）チミン、６－（メチル）－７－（アザ）インドリル、６－クロロ－プリン、６－フェニル－ピロロ－ピリミジン－２－オン－３－イル、７－（アミノアルキルヒドロキシ）－１－（アザ）－２－（チオ）－３－（アザ）－フェノチアジン－１－イル、７－（アミノアルキルヒドロキシ）－１－（アザ）－２－（チオ）－３－（アザ）－フェノキサジン－１－イル、７－（アミノアルキルヒドロキシ）－１，３－（ジアザ）－２－（オキソ）－フェノキサジン－１－イル、７－（アミノアルキルヒドロキシ）－１，３－（ジアザ）－２－（オキソ）－フェノチアジン－１－イル、７－（アミノアルキルヒドロキシ）－１，３－（ジアザ）－２－（オキソ）－フェノキサジン－１－イル、７－（アザ）インドリル、７－（グアニジニウムアルキルヒドロキシ）－１－（アザ）－２－（チオ）－３－（アザ）－フェノキサジン１－イル、７－（グアニジニウムアルキルヒドロキシ）－１－（アザ）－２－（チオ）－３－（アザ）－フェノチアジン－１－イル、７－（グアニジニウムアルキルヒドロキシ）－１－（アザ）－２－（チオ）－３－（アザ）－フェノキサジン－１－イル、７－（グアニジニウムアルキルヒドロキシ）－１，３－（ジアザ）－２－（オキソ）－フェノキサジン－１－イル、７－（グアニジニウムアルキル－ヒドロキシ）－１，３－（ジアザ）－２－（オキソ）－フェノチアジン－１－イル、７－（グアニジニウムアルキルヒドロキシ）－１，３－（ジアザ）－２－（オキソ）－フェノキサジン－１－イル、７－（プロピニル）イソカルボスチリリル、７－（プロピニル）イソカルボスチリリル、プロピニル－７－（アザ）インドリル、７－デアザ－イノシニル、７－置換１－（アザ）－２－（チオ）－３－（アザ）－フェノキサジン－１－イル、７－置換１，３－（ジアザ）－２－（オキソ）－フェノキサジン－１－イル、９－（メチル）－イミジゾピリジニル、アミノインドリル、アントラセニル、ビス－オルト－（アミノアルキルヒドロキシ）－６－フェニル－ピロロ－ピリミジン－２－オン－３－イル、ビス－オルト－置換－６－フェニル－ピロロ－ピリミジン－２－オン－３－イル、ジフルオロトリル、ヒポキサンチン、イミジゾピリジニル、イノシニル、イソカルボスチリリル、イソグアニシン、Ｎ２－置換プリン、Ｎ６－メチル－２－アミノ－プリン、Ｎ６－置換プリン、Ｎ－アルキル化誘導体、ナフタレニル、ニトロベンゾイミダゾリル、ニトロイミダゾリル、ニトロインダゾリル、ニトロピラゾリル、ヌブラリン、Ｏ６－置換プリン、Ｏ－アルキル化誘導体、オルト－（アミノアルキルヒドロキシ）－６－フェニル－ピロロ－ピリミジン－２－オン－３－イル、オルト－置換－６－フェニル－ピロロ－ピリミジン－２－オン－３－イル、オキソホルミシンＴＰ、パラ－（アミノアルキルヒドロキシ）－６－フェニル－ピロロ－ピリミジン－２－オン－３－イル、パラ－置換－６－フェニル－ピロロ－ピリミジン－２－オン－３－イル、ペンタセニル、フェナントラセニル、フェニル、プロピニル－７－（アザ）インドリル、ピレニル、ピリドピリミジン－３－イル、ピリドピリミジン－３－イル、２－オキソ－７－アミノ－ピリドピリミジン－３－イル、ピロロ－ピリミジン－２－オン－３－イル、ピロロピリミジニル、ピロロピリジニル、スチルベンジル、置換１，２，４－トリアゾール、テトラセニル、ツベルシジン、キサンチン、キサントシン－５’－ＴＰ、２－チオ－ゼブラリン、５－アザ－２－チオ－ゼブラリン、７－デアザ－２－アミノ－プリン、ピリジン－４－オンリボヌクレオシド、２－アミノ－リボシド－ＴＰ、ホルマイシンＡＴＰ、ホルマイシンＢＴＰ、ピロロシンＴＰ、２’－ＯＨ－アラ－アデノシンＴＰ、２’－ＯＨ－アラ－シチジンＴＰ、２’－ＯＨ－アラ－ウリジンＴＰ、２’－ＯＨ－アラ－グアノシンＴＰ、５－（２－カルボメトキシビニル）ウリジンＴＰ、及びＮ６－（１９－アミノ－ペンタオキサノンアデシル）アデノシンＴＰ。

【０２７５】

いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡポリヌクレオチドなどのＲＮＡポリヌクレオチド）は、前述の修飾核酸塩基の少なくとも２つ（例えば、２、３、４つまたはそれ以上）の組み合わせを含む。

【０２７６】

いくつかの実施形態において、ｍＲＮＡは、少なくとも１つの化学修飾ヌクレオシドを含む。いくつかの実施形態において、少なくとも１つの化学修飾ヌクレオシドは、プソイド

ウリジン（ψ）、２－チオウリジン（ｓ２Ｕ）、４’－チオウリジン、５－メチルシトシン、２－チオ－１－メチル－１－デアザ－プソイドウリジン、２－チオ－１－メチル－プソイドウリジン、２－チオ－５－アザ－ウリジン、２－チオ－ジヒドロプソイドウリジン、２－チオ－ジヒドロウリジン、２－チオ－プソイドウリジン、４－メトキシ－２－チオ－プソイドウリジン、４－メトキシ－プソイドウリジン、４－チオ－１－メチル－プソイドウリジン、４－チオ－プソイドウリジン、５－アザ－ウリジン、ジヒドロプソイドウリジン、５－メチルウリジン、５－メトキシウリジン、２’－Ｏ－メチルウリジン、１－メチル－プソイドウリジン（ｍ１ψ）、１－エチル－プソイドウリジン（ｅ１ψ）、５－メトキシ－ウリジン（ｍｏ５Ｕ）、５－メチル－シチジン（ｍ５Ｃ）、α－チオ－グアノシン、α－チオ－アデノシン、５－シアノウリジン、４’－チオウリジン７－デアザ－アデニン、１－メチル－アデノシン（ｍ１Ａ）、２－メチル－アデニン（ｍ２Ａ）、Ｎ６－メチル－アデノシン（ｍ６Ａ）及び２，６－ジアミノプリン、（Ｉ）、１－メチル－イノシン（ｍ１Ｉ）、ワイオシン（ｉｍＧ）、メチルワイオシン（ｍｉｍＧ）、７－デアザ－グアノシン、７－シアノ－７－デアザ－グアノシン（ｐｒｅＱ０）、７－アミノメチル－７－デアザ－グアノシン（ｐｒｅＱ１）、７－メチル－グアノシン（ｍ７Ｇ）、１－メチル－グアノシン（ｍ１Ｇ）、８－オキソ－グアノシン、７－メチル－８－オキソ－グアノシン、２，８－ジメチルアデノシン、２－ゲラニルチオウリジン、２－リシジン、２－セレノウリジン、３－（３－アミノ－３－カルボキシプロピル）－５，６－ジヒドロウリジン、３－（３－アミノ－３－カルボキシプロピル）プソイドウリジン、３－メチルプソイドウリジン、５－（カルボキシヒドロキシメチル）－２’－Ｏ－メチルウリジンメチルエステル、５－アミノメチル－２－ゲラニルチオウリジン、５－アミノメチル－２－セレノウリジン、５－アミノメチルウリジン、５－カルバモイルヒドロキシメチルウリジン、５－カルバモイルメチル－２－チオウリジン、５－カルボキシメチル－２－チオウリジン、５－カルボキシメチルアミノメチル－２－ゲラニルチオウリジン、５－カルボキシメチルアミノメチル－２－セレノウリジン、５－シアノメチルウリジン、５－ヒドロキシシチジン、５－メチルアミノメチル－２－ゲラニルチオウリジン、７－アミノカルボキシプロピル－デメチルワイオシン、７－アミノカルボキシプロピルワイオシン、７－アミノカルボキシプロピルワイオシンメチルエステル、８－メチルアデノシン、Ｎ４，Ｎ４－ジメチルシチジン、Ｎ６－ホルミルアデノシン、Ｎ６－ヒドロキシメチルアデノシン、アグマチジン、環式Ｎ６－スレオニルカルバモイルアデノシン、グルタミル－クエオシン、メチル化中間体ヒドロキシワイブトシン、Ｎ４，Ｎ４，２’－Ｏ－トリメチルシチジン、ゲラニル化５－メチルアミノメチル－２－チオウリジン、ゲラニル化５－カルボキシメチルアミノメチル－２－チオウリジン、Ｑ塩基、ｐｒｅＱ０塩基、ｐｒｅＱ１塩基、ならびにこれらの２つ以上の組み合わせからなる群から選択される。いくつかの実施形態において、少なくとも１つの化学修飾ヌクレオシドは、プソイドウリジン、１－メチル－プソイドウリジン、１－エチル－プソイドウリジン、５－メチルシトシン、５－メトキシウリジン及びこれらの組み合わせからなる群から選択される。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡポリヌクレオチドなどのＲＮＡポリヌクレオチド）は、前述の修飾核酸塩基の少なくとも２つ（例えば、２、３、４つまたはそれ以上）の組み合わせを含む。

【０２７７】

塩基修飾

ある特定の実施形態において、化学修飾は、ポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡポリヌクレオチドなどのＲＮＡポリヌクレオチド）中の核酸塩基にある。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡポリヌクレオチドなどのＲＮＡポリヌクレオチド）中の修飾核酸塩基は、１－メチル－プソイドウリジン（ｍ１ψ）、１－エチル－プソイドウリジン（ｅ１ψ）、５－メトキシ－ウリジン（ｍｏ５Ｕ）、５－メチル－シチジン（ｍ５Ｃ）、プソイドウリジン（ψ）、α－チオ－グアノシン及びα－チオ－アデノシンからなる群から選択される。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、前述の修飾核酸塩基の少なくとも２つ（例えば、２、３、４つまたはそれ以上）の組み合わせを含む。

【０２７８】
いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡポリヌクレオチドなどのＲＮＡポリヌクレオチド）は、プソイドウリジン（ψ）及び５－メチル－シチジン（ｍ５Ｃ）を含む。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡポリヌクレオチドなどのＲＮＡポリヌクレオチド）は、１－メチル－プソイドウリジン（ｍ１ψ）を含む。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡポリヌクレオチドなどのＲＮＡポリヌクレオチド）は、１－エチル－プソイドウリジン（ｅ１ψ）を含む。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡポリヌクレオチドなどのＲＮＡポリヌクレオチド）は、１－メチル－プソイドウリジン（ｍ１ψ）及び５－メチル－シチジン（ｍ５Ｃ）を含む。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡポリヌクレオチドなどのＲＮＡポリヌクレオチド）は、１－エチル－プソイドウリジン（ｅ１ψ）及び５－メチル－シチジン（ｍ５Ｃ）を含む。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡポリヌクレオチドなどのＲＮＡポリヌクレオチド）は、２－チオウリジン（ｓ２Ｕ）を含む。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡポリヌクレオチドなどのＲＮＡポリヌクレオチド）は、２－チオウリジン及び５－メチル－シチジン（ｍ５Ｃ）を含む。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡポリヌクレオチドなどのＲＮＡポリヌクレオチド）は、メトキシ－ウリジン（ｍｏ５Ｕ）を含む。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡポリヌクレオチドなどのＲＮＡポリヌクレオチド）は、５－メトキシ－ウリジン（ｍｏ５Ｕ）及び５－メチル－シチジン（ｍ５Ｃ）を含む。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡポリヌクレオチドなどのＲＮＡポリヌクレオチド）は、２'－Ｏ－メチルウリジンを含む。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡポリヌクレオチドなどのＲＮＡポリヌクレオチド）は、２'－Ｏ－メチルウリジン及び５－メチル－シチジン（ｍ５Ｃ）を含む。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡポリヌクレオチドなどのＲＮＡポリヌクレオチド）は、Ｎ６－メチル－アデノシン（ｍ６Ａ）を含む。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡポリヌクレオチドなどのＲＮＡポリヌクレオチド）は、Ｎ６－メチル－アデノシン（ｍ６Ａ）及び５－メチル－シチジン（ｍ５Ｃ）を含む。
【０２７９】
いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡポリヌクレオチドなどのＲＮＡポリヌクレオチド）は、特定の修飾で均一に修飾される（例えば、完全に修飾される、配列全体にわたって修飾される）。例えば、ポリヌクレオチドは、５－メチル－シチジン（ｍ５Ｃ）で均一に修飾され得、すなわち、ｍＲＮＡ配列中の全てのシトシン残基が５－メチル－シチジン（ｍ５Ｃ）で置き換えられる。同様に、ポリヌクレオチドは、配列中に存在する任意の種類のヌクレオシド残基が上記のもののいずれかなどの修飾残基で置き換えられることによって、均一に修飾され得る。
【０２８０】
いくつかの実施形態において、オープンリーディングフレーム中の化学修飾ヌクレオシドは、ウリジン、アデニン、シトシン、グアニン及びこれらの任意の組み合わせからなる群から選択される。
【０２８１】
いくつかの実施形態において、修飾核酸塩基は、修飾シトシンである。修飾シトシンを有する核酸塩基及びヌクレオシドの例には、Ｎ４－アセチル－シチジン（ａｃ４Ｃ）、５－メチル－シチジン（ｍ５Ｃ）、５－ハロ－シチジン（例えば、５－ヨード－シチジン）、５－ヒドロキシメチル－シチジン（ｈｍ５Ｃ）、１－メチル－プソイドイソシチジン、２－チオ－シチジン（ｓ２Ｃ）、２－チオ－５－メチル－シチジンが挙げられる。
【０２８２】
いくつかの実施形態において、修飾核酸塩基は、修飾ウリジンである。修飾ウリジンを有する例示的な核酸塩基及びヌクレオシドには、５－シアノウリジンまたは４'－チオウリジ

ンが挙げられる。
【０２８３】
いくつかの実施形態において、修飾核酸塩基は、修飾アデニンである。修飾アデニンを有する例示的な核酸塩基及びヌクレオシドには、７－デアザ－アデニン、１－メチル－アデノシン（ｍ１Ａ）、２－メチル－アデニン（ｍ２Ａ）、Ｎ６－メチル－アデニン（ｍ６Ａ）及び２，６－ジアミノプリンが挙げられる。
【０２８４】
いくつかの実施形態において、修飾核酸塩基は、修飾グアニンである。修飾グアニンを有する例示的な核酸塩基及びヌクレオシドには、イノシン（Ｉ）、１－メチル－イノシン（ｍ１Ｉ）、ワイオシン（ｉｍＧ）、メチルワイオシン（ｍｉｍＧ）、７－デアザ－グアノシン、７－シアノ－７－デアザ－グアノシン（ｐｒｅＱ０）、７－アミノメチル－７－デアザ－グアノシン（ｐｒｅＱ１）、７－メチル－グアノシン（ｍ７Ｇ）、１－メチル－グアノシン（ｍ１Ｇ）、８－オキソ－グアノシン、７－メチル－８－オキソ－グアノシンが挙げられる。
【０２８５】
いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡポリヌクレオチドなどのＲＮＡポリヌクレオチド）中の核酸塩基修飾ヌクレオチドは、５－メトキシウリジンである。
【０２８６】
いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡポリヌクレオチドなどのＲＮＡポリヌクレオチド）は、修飾核酸塩基の少なくとも２つ（例えば、２、３、４つまたはそれ以上）の組み合わせを含む。
【０２８７】
いくつかの実施形態において、本開示のポリヌクレオチド（例えば、ＭＣＭをコードするｍＲＮＡポリヌクレオチド）中のある種類の核酸塩基（例えば、ウラシル）の少なくとも９５％が修飾核酸塩基である。いくつかの実施形態において、本開示のポリヌクレオチド（例えば、ＭＣＭをコードするｍＲＮＡポリヌクレオチド）中のウラシルの少なくとも９５％が５－メトキシウラシルである。
【０２８８】
いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡポリヌクレオチドなどのＲＮＡポリヌクレオチド）は、５－メトキシウリジン（５ｍｏ５Ｕ）及び５－メチル－シチジン（ｍ５Ｃ）を含む。
【０２８９】
いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡポリヌクレオチドなどのＲＮＡポリヌクレオチド）は、特定の修飾で均一に修飾される（例えば、完全に修飾される、配列全体にわたって修飾される）。例えば、ポリヌクレオチドは、５－メトキシウリジンで均一に修飾され得、すなわち、ｍＲＮＡ配列中の実質的に全てのウリジン残基が５－メトキシウリジンに置き換えられる。同様に、ポリヌクレオチドは、配列中に存在するあらゆる種類のヌクレオシド残基が上記のもののいずれかなどの修飾残基で置き換えられることによって、均一に修飾され得る。
【０２９０】
いくつかの実施形態において、修飾核酸塩基は、修飾シトシンである。
【０２９１】
いくつかの実施形態において、修飾核酸塩基は、修飾ウラシルである。修飾ウラシルを有する例示的な核酸塩基及びヌクレオシドには、５－メトキシウラシルが挙げられる。
【０２９２】
いくつかの実施形態において、修飾核酸塩基は、修飾アデニンである。
【０２９３】
いくつかの実施形態において、修飾核酸塩基は、修飾グアニンである。
【０２９４】

いくつかの実施形態において、ＭＣＭポリペプチドをコードするオープンリーディングフレーム中の核酸塩基、糖、骨格またはこれらの任意の組み合わせは、少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９９％または１００％化学修飾される。

【０２９５】

いくつかの実施形態において、ＭＣＭポリペプチドをコードするオープンリーディングフレーム中のウリジンヌクレオシドは、少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９９％または１００％化学修飾される。

【０２９６】

いくつかの実施形態において、ＭＣＭポリペプチドをコードするオープンリーディングフレーム中のアデノシンヌクレオシドは、少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９９％または１００％化学修飾される。

【０２９７】

いくつかの実施形態において、ＭＣＭポリペプチドをコードするオープンリーディングフレーム中のシチジンヌクレオシドは、少なくとも少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９９％または１００％化学修飾される。

【０２９８】

いくつかの実施形態において、ＭＣＭポリペプチドをコードするオープンリーディングフレーム中のグアノシンヌクレオシドは、少なくとも少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９９％または１００％化学修飾される。

【０２９９】

いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、ヌクレオシド間に任意の有用なリンカーを含み得る。本開示の組成物に有用である、骨格修飾を含む、そのようなリンカーには、次のものが挙げられるが、これらに限定されない：３'－アルキレンホスホネート、３'－アミノホスホロアミデート、アルケン含有骨格、アミノアルキルホスホロアミデート、アミノアルキルホスホトリエステル、ボラノホスフェート、－ＣＨ２－Ｏ－Ｎ（ＣＨ３）－ＣＨ２－、－ＣＨ２－Ｎ（ＣＨ３）－Ｎ（ＣＨ３）－ＣＨ２－、－ＣＨ２－ＮＨ－ＣＨ２－、キラルホスホネート、キラルホスホロチオエート、ホルムアセチル及びチオホルムアセチル骨格、メチレン（メチルイミノ）、メチレンホルムアセチル及びチオホルムアセチル骨格、メチレンイミノ及びメチレンヒドラジノ骨格、モルホリノ結合、－Ｎ（ＣＨ３）－ＣＨ２－ＣＨ２－、ヘテロ原子ヌクレオシド間結合を有するオリゴヌクレオシド、ホスフィネート、ホスホロアミデート、ホスホロジチオエート、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合、ホスホロチオエート、ホスホトリエステル、ＰＮＡ、シロキサン骨格、スルファミン酸骨格、スルフィドスルホキシド及びスルホン骨格、スルホン酸及びスルホンアミド骨格、チオノアルキルホスホネート、チオノアルキルホスホトリエステル及びチオノホスホロアミデート。

【０３００】

糖に対する修飾

ポリヌクレオチド（例えば、本明細書に記載されるようなＲＮＡまたはｍＲＮＡ）に組み込むことができる修飾ヌクレオシド及び修飾ヌクレオチド（例えば、基本成分分子）は、リボ核酸の糖に対して修飾され得る。例えば、２’ヒドロキシル基（ＯＨ）がいくつかの異

なる置換基で修飾または置換され得る。２’位の例示的な置換には、Ｈ、ハロ、任意選択により置換されたＣ１～６アルキル；任意選択により置換されたＣ１～６アルコキシ；任意選択により置換されたＣ６～１０アリールオキシ；任意選択により置換されたＣ３～８シクロアルキル；任意選択により置換されたＣ３～８シクロアルコキシ；任意選択により置換されたＣ６～１０アリールオキシ；任意選択により置換されたＣ６～１０アリール－Ｃ１～６アルコキシ、任意選択により置換されたＣ１～１２（ヘテロシクリル）オキシ；糖（例えば、リボース、ペントースまたは本明細書に記載される任意のもの）；ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、－Ｏ（ＣＨ２ＣＨ２Ｏ）ｎＣＨ２ＣＨ２ＯＲ（式中、Ｒは、Ｈまたは任意選択により置換されたアルキルであり、ｎは、０～２０（例えば、０～４、０～８、０～１０、０～１６、１～４、１～８、１～１０、１～１６、１～２０、２～４、２～８、２～１０、２～１６、２～２０、４～８、４～１０、４～１６及び４～２０）の整数である）；２’－ヒドロキシルがＣ１～６アルキレンまたはＣ１～６ヘテロアルキレン架橋によって同じリボース糖の４’－炭素に接続されている、「ロックド」核酸（ＬＮＡ）（ここで、例示的な架橋にはメチレン、プロピレン、エーテルまたはアミノ架橋が挙げられる）；本明細書で定義されるアミノアルキル；本明細書で定義されるアミノアルコキシ；本明細書で定義されるアミノ；及び本明細書で定義されるアミノ酸が挙げられるが、これらに限定されない。

【０３０１】

一般に、ＲＮＡは、酸素を有する５員環である糖類リボースを含む。例示的な非限定的な修飾ヌクレオチドには、リボース中の酸素の置換（例えば、Ｓ、Ｓｅ、またはメチレンもしくはエチレンなどのアルキレンによる置換）；二重結合の付加（例えば、シクロペンテニルまたはシクロヘキセニルによるリボースの置換）；リボースの環縮小（例えば、シクロブタンまたはオキセタンの４員環の形成）；リボースの環拡大（例えば、無水ヘキシトール、アルトリトール、マンニトール、シクロヘキサニル、シクロヘキセニル及びホスホロアミデート骨格も有するモルホリノなどの更なる炭素またはヘテロ原子を有する６員または７員環の形成）；多環式形態（例えば、トリシクロ；ならびにグリコール核酸（ＧＮＡ）（例えば、Ｒ－ＧＮＡまたはＳ－ＧＮＡ、この場合、リボースは、ホスホジエステル結合に接続されたグリコール単位で置換される）、トレオース核酸（ＴＮＡ、この場合、リボースは、α－Ｌ－トレオフラノシル－（３’→２’）で置換される）及びペプチド核酸（ＰＮＡ、この場合、２－アミノ－エチル－グリシン結合でリボース及びホスホジエステル骨格を置換する）などの「アンロックド」形態）が挙げられる。糖類はまた、リボース中の対応する炭素立体化学配置とは逆の立体化学配置を有する１つ以上の炭素を含有し得る。したがって、ポリヌクレオチド分子は、糖として、例えば、アラビノースを含有するヌクレオチドを含み得る。このような糖修飾は、国際特許公開第ＷＯ２０１３０５２５２３号及び国際特許出願第ＰＣＴ／ＵＳ２０１３／７５１７７号に教示されており、それぞれの内容全体を参照により本明細書に援用する。

【０３０２】

修飾の組み合わせ

本開示のポリヌクレオチドは、糖、核酸塩基及び／またはヌクレオシド間結合に対する修飾の組み合わせを含み得る。これらの組み合わせは、本明細書に記載される任意の１つ以上の修飾を含み得る。

【０３０３】

修飾ヌクレオチド及び修飾ヌクレオチドの組み合わせの例を以下の表４に記載する。これらの修飾ヌクレオチドの組み合わせを使用して本開示のポリヌクレオチドを形成することができる。特に記載のない限り、本開示のポリヌクレオチドの天然ヌクレオチドを修飾ヌクレオチドで完全に置換することができる。非限定的な例として、天然ヌクレオチドウリジンは、本明細書に記載される修飾ヌクレオシドで置換され得る。別の非限定的な例において、天然ヌクレオチドウリジンは、本明細書で開示される修飾ヌクレオシドのうちの少なくとも１つで部分的に置換され得る（例えば、約０．１％、１％、５％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５

％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％または９９．９％）。塩基／糖またはリンカーの任意の組み合わせを本開示のポリヌクレオチドに組み込むことができ、そのような修飾は、国際特許公開第ＷＯ２０１３０５２５２３号及び国際特許出願第ＰＣＴ／ＵＳ２０１３／７５１７７号に教示されており、それぞれの内容全体を参照により本明細書に援用する。

表４．組み合わせ

【表１２】

ウラシル	シトシン	アデニン	グアニン
５－メトキシ－ＵＴＰ	ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
５－メトキシ－ＵＴＰ	Ｎ４Ａｃ－ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
５－メトキシ－ＵＴＰ	５－メチル－ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
５－メトキシ－ＵＴＰ	５－トリフルオロメチル－ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
５－メトキシ－ＵＴＰ	５－ヒドロキシメチル－ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
５－メトキシ－ＵＴＰ	５－ブロモ－ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
５－メトキシ－ＵＴＰ	Ｎ４Ａｃ－ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
５－メトキシ－ＵＴＰ	ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
５－メトキシ－ＵＴＰ	５－メチル－ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
５－メトキシ－ＵＴＰ	５－トリフルオロメチル－ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
５－メトキシ－ＵＴＰ	５－ヒドロキシメチル－ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
５－メトキシ－ＵＴＰ	５－ブロモ－ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
５－メトキシ－ＵＴＰ	Ｎ４－Ａｃ－ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
５－メトキシ－ＵＴＰ	５－ヨード－ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
５－メトキシ－ＵＴＰ	５－ブロモ－ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
５－メトキシ－ＵＴＰ	ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
５－メトキシ－ＵＴＰ	５－メチル－ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
７５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋２５％　ＵＴＰ	５－メチル－ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
５０％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋５０％　ＵＴＰ	５－メチル－ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
２５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋７５％　ＵＴＰ	５－メチル－ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
５－メトキシ－ＵＴＰ	７５％　５－メチル－ＣＴＰ＋２５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
５－メトキシ－ＵＴＰ	５０％　５－メチル－ＣＴＰ＋５０％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
５－メトキシ－ＵＴＰ	２５％　５－メチル－ＣＴＰ＋７５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ

【表１３】

７５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋２５％　ＵＴＰ	７５％　５－メチル－ＣＴＰ＋２５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
７５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋２５％　ＵＴＰ	５０％　５－メチル－ＣＴＰ＋５０％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
７５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋２５％　ＵＴＰ	２５％　５－メチル－ＣＴＰ＋７５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
５０％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋５０％　ＵＴＰ	７５％　５－メチル－ＣＴＰ＋２５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
５０％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋５０％　ＵＴＰ	５０％　５－メチル－ＣＴＰ＋５０％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
５０％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋５０％　ＵＴＰ	２５％　５－メチル－ＣＴＰ＋７５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
２５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋７５％　ＵＴＰ	７５％　５－メチル－ＣＴＰ＋２５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
２５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋７５％　ＵＴＰ	５０％　５－メチル－ＣＴＰ＋５０％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
２５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋７５％　ＵＴＰ	２５％　５－メチル－ＣＴＰ＋７５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
７５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋２５％　ＵＴＰ	ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
５０％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋５０％　ＵＴＰ	ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
２５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋７５％　ＵＴＰ	ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
５－メトキシ－ＵＴＰ	ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
５－メトキシ－ＵＴＰ	ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
５－メトキシ－ＵＴＰ	ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
５－メトキシ－ＵＴＰ	５－メチル－ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
５－メトキシ－ＵＴＰ	５－メチル－ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
５－メトキシ－ＵＴＰ	５－メチル－ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
５－メトキシ－ＵＴＰ	ＣＴＰ	α－チオ－ＡＴＰ	ＧＴＰ
５－メトキシ－ＵＴＰ	５－メチル－ＣＴＰ	α－チオ－ＡＴＰ	ＧＴＰ
５－メトキシ－ＵＴＰ	ＣＴＰ	ＡＴＰ	α－チオ－ＧＴＰ
５－メトキシ－ＵＴＰ	５－メチル－ＣＴＰ	ＡＴＰ	α－チオ－ＧＴＰ

【表１４】

５－メトキシ－ＵＴＰ	ＣＴＰ	Ｎ６－Ｍｅ－ＡＴＰ	ＧＴＰ
５－メトキシ－ＵＴＰ	５－メチル－ＣＴＰ	Ｎ６－Ｍｅ－ＡＴＰ	ＧＴＰ
５－メトキシ－ＵＴＰ	ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
５－メトキシ－ＵＴＰ	５－メチル－ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
７５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋２５％　ＵＴＰ	５－メチル－ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
５０％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋５０％　ＵＴＰ	５－メチル－ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
２５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋７５％　ＵＴＰ	５－メチル－ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
５－メトキシ－ＵＴＰ	７５％　５－メチル－ＣＴＰ＋２５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
５－メトキシ－ＵＴＰ	５０％　５－メチル－ＣＴＰ＋５０％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
５－メトキシ－ＵＴＰ	２５％　５－メチル－ＣＴＰ＋７５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
７５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋２５％　ＵＴＰ	７５％　５－メチル－ＣＴＰ＋２５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
７５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋２５％　ＵＴＰ	５０％　５－メチル－ＣＴＰ＋５０％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
７５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋２５％　ＵＴＰ	２５％　５－メチル－ＣＴＰ＋７５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
５０％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋５０％　ＵＴＰ	７５％　５－メチル－ＣＴＰ＋２５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
５０％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋５０％　ＵＴＰ	５０％　５－メチル－ＣＴＰ＋５０％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
５０％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋５０％　ＵＴＰ	２５％　５－メチル－ＣＴＰ＋７５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
２５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋７５％　ＵＴＰ	７５％　５－メチル－ＣＴＰ＋２５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
２５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋７５％　ＵＴＰ	５０％　５－メチル－ＣＴＰ＋５０％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
２５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋７５％　ＵＴＰ	２５％　５－メチル－ＣＴＰ＋７５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
７５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋２５％　ＵＴＰ	ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ

【表１５】

５０％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋５０％　ＵＴＰ	ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
２５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋７５％　ＵＴＰ	ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
５－メトキシ－ＵＴＰ	５－エチル－ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
５－メトキシ－ＵＴＰ	５－メトキシ－ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
５－メトキシ－ＵＴＰ	５－エチニル－ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
５－メトキシ－ＵＴＰ	ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
５－メトキシ－ＵＴＰ	５－メチル－ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
５－メトキシ－ＵＴＰ	ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
５－メトキシ－ＵＴＰ	５－メチル－ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
７５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋２５％　１－メチル－プソイド－ＵＴＰ	５－メチル－ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
５０％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋５０％　１－メチル－プソイド－ＵＴＰ	５－メチル－ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
２５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋７５％　１－メチル－プソイド－ＵＴＰ	５－メチル－ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
５－メトキシ－ＵＴＰ	７５％　５－メチル－ＣＴＰ＋２５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
５－メトキシ－ＵＴＰ	５０％　５－メチル－ＣＴＰ＋５０％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
５－メトキシ－ＵＴＰ	２５％　５－メチル－ＣＴＰ＋７５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
７５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋２５％　１－メチル－プソイド－ＵＴＰ	７５％　５－メチル－ＣＴＰ＋２５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
７５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋２５％　１－メチル－プソイド－ＵＴＰ	５０％　５－メチル－ＣＴＰ＋５０％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
７５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋２５％　１－メチル－プソイド－ＵＴＰ	２５％　５－メチル－ＣＴＰ＋７５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
５０％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋５０％　１－メチル－プソイド－ＵＴＰ	７５％　５－メチル－ＣＴＰ＋２５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ

【表１６】

５０％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋５０％　１－メチル－プソイド－ＵＴＰ	５０％　５－メチル－ＣＴＰ＋５０％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
５０％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋５０％　１－メチル－プソイド－ＵＴＰ	２５％　５－メチル－ＣＴＰ＋７５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
２５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋７５％　１－メチル－プソイド－ＵＴＰ	７５％　５－メチル－ＣＴＰ＋２５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
２５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋７５％　１－メチル－プソイド－ＵＴＰ	５０％　５－メチル－ＣＴＰ＋５０％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
２５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋７５％　１－メチル－プソイド－ＵＴＰ	２５％　５－メチル－ＣＴＰ＋７５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
７５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋２５％　１－メチル－プソイド－ＵＴＰ	ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
５０％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋５０％　１－メチル－プソイド－ＵＴＰ	ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
２５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋７５％　１－メチル－プソイド－ＵＴＰ	ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
５－メトキシ－ＵＴＰ	ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
５－メトキシ－ＵＴＰ	ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
５－メトキシ－ＵＴＰ	５－メチル－ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
５－メトキシ－ＵＴＰ	ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
５－メトキシ－ＵＴＰ	５－メチル－ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
７５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋２５％　ＵＴＰ	５－メチル－ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
５０％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋５０％　ＵＴＰ	５－メチル－ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
２５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋７５％　ＵＴＰ	５－メチル－ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
５－メトキシ－ＵＴＰ	７５％　５－メチル－ＣＴＰ＋２５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
５－メトキシ－ＵＴＰ	５０％　５－メチル－ＣＴＰ＋５０％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ

【表１７】

５－メトキシ－ＵＴＰ	２５％　５－メチル－ＣＴＰ＋７５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
７５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋２５％　ＵＴＰ	７５％　５－メチル－ＣＴＰ＋２５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
７５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋２５％　ＵＴＰ	５０％　５－メチル－ＣＴＰ＋５０％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
７５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋２５％　ＵＴＰ	２５％　５－メチル－ＣＴＰ＋７５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
５０％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋５０％　ＵＴＰ	７５％　５－メチル－ＣＴＰ＋２５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
５０％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋５０％　ＵＴＰ	５０％　５－メチル－ＣＴＰ＋５０％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
５０％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋５０％　ＵＴＰ	２５％　５－メチル－ＣＴＰ＋７５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
２５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋７５％　ＵＴＰ	７５％　５－メチル－ＣＴＰ＋２５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
２５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋７５％　ＵＴＰ	５０％　５－メチル－ＣＴＰ＋５０％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
２５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋７５％　ＵＴＰ	２５％　５－メチル－ＣＴＰ＋７５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
７５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋２５％　ＵＴＰ	ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
５０％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋５０％　ＵＴＰ	ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
２５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋７５％　ＵＴＰ	ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
５－メトキシ－ＵＴＰ	ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
５－メトキシ－ＵＴＰ	５－メチル－ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
７５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋２５％　ＵＴＰ	５－メチル－ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
５０％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋５０％　ＵＴＰ	５－メチル－ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
２５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋７５％　ＵＴＰ	５－メチル－ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
５－メトキシ－ＵＴＰ	７５％　５－メチル－ＣＴＰ＋２５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
５－メトキシ－ＵＴＰ	５０％　５－メチル－ＣＴＰ＋５０％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
５－メトキシ－ＵＴＰ	２５％　５－メチル－ＣＴＰ＋７５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ

【表１８】

７５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋２５％　ＵＴＰ	７５％　５－メチル－ＣＴＰ＋２５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
７５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋２５％　ＵＴＰ	５０％　５－メチル－ＣＴＰ＋５０％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
７５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋２５％　ＵＴＰ	２５％　５－メチル－ＣＴＰ＋７５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
５０％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋５０％　ＵＴＰ	７５％　５－メチル－ＣＴＰ＋２５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
５０％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋５０％　ＵＴＰ	５０％　５－メチル－ＣＴＰ＋５０％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
５０％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋５０％　ＵＴＰ	２５％　５－メチル－ＣＴＰ＋７５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
２５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋７５％　ＵＴＰ	７５％　５－メチル－ＣＴＰ＋２５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
２５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋７５％　ＵＴＰ	５０％　５－メチル－ＣＴＰ＋５０％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
２５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋７５％　ＵＴＰ	２５％　５－メチル－ＣＴＰ＋７５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
７５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋２５％　ＵＴＰ	ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
５０％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋５０％　ＵＴＰ	ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
２５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋７５％　ＵＴＰ	ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
５－メトキシ－ＵＴＰ	ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
２５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋７５％　ＵＴＰ	７５％　５－メチル－ＣＴＰ＋２５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
２５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋７５％　ＵＴＰ	５０％　５－メチル－ＣＴＰ＋５０％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
２５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋７５％　ＵＴＰ	２５％　５－メチル－ＣＴＰ＋７５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
７５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋２５％　ＵＴＰ	７５％　５－メチル－ＣＴＰ＋２５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
５－メトキシ－ＵＴＰ	ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
２５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋７５％　ＵＴＰ	７５％　５－メチル－ＣＴＰ＋２５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
２５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋７５％　ＵＴＰ	５０％　５－メチル－ＣＴＰ＋５０％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ

【表１９】

２５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋７５％　ＵＴＰ	２５％　５－メチル－ＣＴＰ＋７５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
７５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋２５％　ＵＴＰ	７５％　５－メチル－ＣＴＰ＋２５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
５－メトキシ－ＵＴＰ	ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
２５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋７５％　ＵＴＰ	７５％　５－メチル－ＣＴＰ＋２５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
２５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋７５％　ＵＴＰ	５０％　５－メチル－ＣＴＰ＋５０％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
２５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋７５％　ＵＴＰ	２５％　５－メチル－ＣＴＰ＋７５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
７５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋２５％　ＵＴＰ	７５％　５－メチル－ＣＴＰ＋２５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
５－メトキシ－ＵＴＰ	ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
２５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋７５％　ＵＴＰ	７５％　５－メチル－ＣＴＰ＋２５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
２５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋７５％　ＵＴＰ	５０％　５－メチル－ＣＴＰ＋５０％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
２５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋７５％　ＵＴＰ	２５％　５－メチル－ＣＴＰ＋７５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
７５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋２５％　ＵＴＰ	７５％　５－メチル－ＣＴＰ＋２５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
５－メトキシ－ＵＴＰ	ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
２５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋７５％　ＵＴＰ	７５％　５－メチル－ＣＴＰ＋２５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
２５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋７５％　ＵＴＰ	５０％　５－メチル－ＣＴＰ＋５０％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
２５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋７５％　ＵＴＰ	２５％　５－メチル－ＣＴＰ＋７５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
７５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋２５％　ＵＴＰ	７５％　５－メチル－ＣＴＰ＋２５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
５－メトキシ－ＵＴＰ	ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
２５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋７５％　ＵＴＰ	７５％　５－メチル－ＣＴＰ＋２５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
２５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋７５％　ＵＴＰ	５０％　５－メチル－ＣＴＰ＋５０％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
２５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋７５％　ＵＴＰ	２５％　５－メチル－ＣＴＰ＋７５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
７５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋２５％　ＵＴＰ	７５％　５－メチル－ＣＴＰ＋２５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ

【表２０】

５－メトキシ－ＵＴＰ	ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
２５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋７５％　ＵＴＰ	７５％　５－メチル－ＣＴＰ＋２５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
２５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋７５％　ＵＴＰ	５０％　５－メチル－ＣＴＰ＋５０％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
２５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋７５％　ＵＴＰ	２５％　５－メチル－ＣＴＰ＋７５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
７５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋２５％　ＵＴＰ	７５％　５－メチル－ＣＴＰ＋２５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
５－メトキシ－ＵＴＰ	５－フルオロ－ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
５－メトキシ－ＵＴＰ	５－フェニル－ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
５－メトキシ－ＵＴＰ	Ｎ４－Ｂｚ－ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
５－メトキシ－ＵＴＰ	ＣＴＰ	Ｎ６－イソペンテニル－ＡＴＰ	ＧＴＰ
５－メトキシ－ＵＴＰ	Ｎ４－Ａｃ－ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
２５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋７５％　ＵＴＰ	２５％　Ｎ４－Ａｃ－ＣＴＰ＋７５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
２５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋７５％　ＵＴＰ	７５％　Ｎ４－Ａｃ－ＣＴＰ＋２５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
７５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋２５％　ＵＴＰ	２５％　Ｎ４－Ａｃ－ＣＴＰ＋７５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
７５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋２５％　ＵＴＰ	７５％　Ｎ４－Ａｃ－ＣＴＰ＋２５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
５－メトキシ－ＵＴＰ	５－ヒドロキシメチル－ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
２５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋７５％　ＵＴＰ	２５％　５－ヒドロキシメチル－ＣＴＰ＋７５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
２５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋７５％　ＵＴＰ	７５％　５－ヒドロキシメチル－ＣＴＰ＋２５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
７５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋２５％　ＵＴＰ	２５％　５－ヒドロキシメチル－ＣＴＰ＋７５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
７５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋２５％　ＵＴＰ	７５％　５－ヒドロキシメチル－ＣＴＰ＋２５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
５－メトキシ－ＵＴＰ	Ｎ４－メチルＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
２５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋７５％　ＵＴＰ	２５％　Ｎ４－メチルＣＴＰ＋７５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
２５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋７５％　ＵＴＰ	７５％　Ｎ４－メチルＣＴＰ＋２５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ

【表２１】

７５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋２５％　ＵＴＰ	２５％　Ｎ４－メチルＣＴＰ＋７５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
７５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋２５％　ＵＴＰ	７５％　Ｎ４－メチルＣＴＰ＋２５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
５－メトキシ－ＵＴＰ	５－トリフルオロメチル－ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
２５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋７５％　ＵＴＰ	２５％　５－トリフルオロメチル－ＣＴＰ＋７５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
２５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋７５％　ＵＴＰ	７５％　５－トリフルオロメチル－ＣＴＰ＋２５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
７５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋２５％　ＵＴＰ	２５％　５－トリフルオロメチル－ＣＴＰ＋７５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
７５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋２５％　ＵＴＰ	７５％　５－トリフルオロメチル－ＣＴＰ＋２５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
５－メトキシ－ＵＴＰ	５－ブロモ－ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
２５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋７５％　ＵＴＰ	２５％　５－ブロモ－ＣＴＰ＋７５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
２５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋７５％　ＵＴＰ	７５％　５－ブロモ－ＣＴＰ＋２５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
７５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋２５％　ＵＴＰ	２５％　５－ブロモ－ＣＴＰ＋７５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
７５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋２５％　ＵＴＰ	７５％　５－ブロモ－ＣＴＰ＋２５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
５－メトキシ－ＵＴＰ	５－ヨード－ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
２５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋７５％　ＵＴＰ	２５％　５－ヨード－ＣＴＰ＋７５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
２５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋７５％　ＵＴＰ	７５％　５－ヨード－ＣＴＰ＋２５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
７５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋２５％　ＵＴＰ	２５％　５－ヨード－ＣＴＰ＋７５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
７５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋２５％　ＵＴＰ	７５％　５－ヨード－ＣＴＰ＋２５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
５－メトキシ－ＵＴＰ	５－エチル－ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
２５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋７５％　ＵＴＰ	２５％　５－エチル－ＣＴＰ＋７５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
２５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋７５％　ＵＴＰ	７５％　５－エチル－ＣＴＰ＋２５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ

【表２２】

７５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋２５％　ＵＴＰ	２５％　５－エチル－ＣＴＰ＋７５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
７５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋２５％　ＵＴＰ	７５％　５－エチル－ＣＴＰ＋２５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
５－メトキシ－ＵＴＰ	５－メトキシ－ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
２５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋７５％　ＵＴＰ	２５％　５－メトキシ－ＣＴＰ＋７５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
２５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋７５％　ＵＴＰ	７５％　５－メトキシ－ＣＴＰ＋２５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
７５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋２５％　ＵＴＰ	２５％　５－メトキシ－ＣＴＰ＋７５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
７５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋２５％　ＵＴＰ	７５％　５－メトキシ－ＣＴＰ＋２５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
５－メトキシ－ＵＴＰ	５－エチニル－ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
２５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋７５％　ＵＴＰ	２５％　５－エチニル－ＣＴＰ＋７５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
２５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋７５％　ＵＴＰ	７５％　－エチニル－ＣＴＰ＋２５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
７５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋２５％　ＵＴＰ	２５％　５－エチニル－ＣＴＰ＋７５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
７５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋２５％　ＵＴＰ	７５％　－エチニル－ＣＴＰ＋２５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
５－メトキシ－ＵＴＰ	５－プソイド－イソ－ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
２５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋７５％　ＵＴＰ	２５％　５－プソイド－イソ－ＣＴＰ＋７５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
２５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋７５％　ＵＴＰ	７５％　５－プソイド－イソ－ＣＴＰ＋２５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
７５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋２５％　ＵＴＰ	２５％　５－プソイド－イソ－ＣＴＰ＋７５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
７５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋２５％　ＵＴＰ	７５％　５－プソイド－イソ－ＣＴＰ＋２５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
５－メトキシ－ＵＴＰ	５－ホルミル－ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
２５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋７５％　ＵＴＰ	２５％　５－ホルミル－ＣＴＰ＋７５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
２５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋７５％　ＵＴＰ	７５％　５－ホルミル－ＣＴＰ＋２５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ

【表２３】

７５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋２５％　ＵＴＰ	２５％　５－ホルミル－ＣＴＰ＋７５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
７５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋２５％　ＵＴＰ	７５％　５－ホルミル－ＣＴＰ＋２５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
５－メトキシ－ＵＴＰ	５－アミノアリル－ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
２５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋７５％　ＵＴＰ	２５％　５－アミノアリル－ＣＴＰ＋７５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
２５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋７５％　ＵＴＰ	７５％　５－アミノアリル－ＣＴＰ＋２５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
７５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋２５％　ＵＴＰ	２５％　５－アミノアリル－ＣＴＰ＋７５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ
７５％　５－メトキシ－ＵＴＰ＋２５％　ＵＴＰ	７５％　５－アミノアリル－ＣＴＰ＋２５％　ＣＴＰ	ＡＴＰ	ＧＴＰ

【０３０４】

ＩＩＩ．ポリヌクレオチド構造

従来、ｍＲＮＡ分子の基本構成成分は、少なくとも、コーディング領域、５’ＵＴＲ、３’ＵＴＲ、５’キャップ及びポリＡテールを含む。本開示のポリヌクレオチドは、ｍＲＮＡとして機能し得るが、その設計上の機能的及び／または構造的特徴から野生型ｍＲＮＡとは区別され、その特徴とは、例えば、核酸治療法を使用した効果的なポリペプチド生産に関する既存の課題を解決するのに役立つものである。

【０３０５】

ｉｎ　ｖｉｔｒｏ転写ポリヌクレオチド

本開示はまた、本明細書に記載されるポリヌクレオチド（すなわち、ＭＣＭポリペプチドをコードするＯＲＦを含むポリヌクレオチド）を含む、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ転写ポリヌクレオチドを含む。

【０３０６】

ｉｎ　ｖｉｔｒｏ転写（ＩＶＴ）酵素合成法のみを使用して作製されたポリヌクレオチドは、「ＩＶＴポリヌクレオチド」と称される。ＩＶＴポリヌクレオチドの作製方法は、当該技術分野において知られており、例えば、国際公開第ＷＯ２０１３１５１６６６号、同第ＷＯ２０１３１５１６６７号、同第ＷＯ２０１３１５１６６８号、同第ＷＯ２０１３１５１６６３号、同第ＷＯ２０１３１５１６６９号、同第ＷＯ２０１３１５１６７０号、同第ＷＯ２０１３１５１６６４号、同第ＷＯ２０１３１５１６６５号、同第ＷＯ２０１３１５１６７１号、同第ＷＯ２０１３１５１６７２号及び同第ＷＯ２０１３１５１７３６号に記載されており、それぞれの内容全体を参照により本明細書に援用する。

【０３０７】

ＩＶＴポリヌクレオチドの一次構築物の第１の領域の最短の長さは、ＭＣＭ、その断片またはそのバリアントをコードするに十分な核酸配列の長さであり得る。目的のポリペプチドをコードするＩＶＴポリヌクレオチドの一次構築物の第１の領域の長さは、約３０ヌクレオチド長より大きくてよい（例えば、少なくとも約２，１５４、２，２５０、２，５００、及び３，０００、４，０００、４，１００、４，２００、４，３００、４，４００、４，５００、４，６００、４，７００、４，８００、４，９００、５，０００、５，１００、５，２００、５，３００、５，４００、５，５００、６，０００、７，０００、８，０００、９，０００、１０，０００、２０，０００、３０，０００、４０，０００、５０，０００、６０，０００、７０，０００、８０，０００、９０，０００もしくはそれ以上、または最大１００，０００ヌクレオチドまで）。

【０３０８】

いくつかの実施形態において、ＩＶＴポリヌクレオチドの第１及び第２のフランキング領

域は、独立して、１５～１，０００ヌクレオチド長の範囲（例えば、３０、４０、４５、５０、５５、６０、７０、８０、９０、１００、１２０、１４０、１６０、１８０、２００、２５０、３００、３５０、４００、４５０、５００、６００、７００、８００、９００、１，０００、１，５００、２，０００、２，５００、３，０００、３，５００、４，０００、４，５００、５，０００、５，５００を超えるヌクレオチドまたは少なくとも３０、４０、４５、５０、５５、６０、７０、８０、９０、１００、１２０、１４０、１６０、１８０、２００、２５０、３００、３５０、４００、４５０、５００、６００、７００、８００、９００、１，０００、１，５００、２，０００、２，５００、３，０００、３，５００、４，０００、４，５００、５，０００、５，５００ヌクレオチド）であり得る。

【０３０９】

いくつかの実施形態において、ＩＶＴポリヌクレオチドのテール配列は、０～５００ヌクレオチド長の範囲（例えば、少なくとも６０、７０、８０、９０、１２０、１４０、１６０、１８０、２００、２５０、３００、３５０、４００、４５０または５００ヌクレオチド）であり得る。テール領域がポリＡテールである場合、その長さは、ポリＡ結合タンパク質の結合の単位で、またはその関数として決定され得る。この実施形態において、ポリＡテールは、少なくとも４つのポリＡ結合タンパク質単量体に結合するのに十分な長さである。ポリＡ結合タンパク質の単量体は、およそ３８ヌクレオチドのストレッチに結合する。このように、約８０ヌクレオチド及び１６０ヌクレオチドのポリＡテールが機能的であることが観察されている。

【０３１０】

いくつかの実施形態において、ＩＶＴポリヌクレオチドのキャッピング領域は、単一のキャップ、またはキャップを形成する一連のヌクレオチドを含み得る。この実施形態において、キャッピング領域は、１～１０、例えば、２～９、３～８、４～７、１～５、５～１０、または少なくとも２もしくは１０以下のヌクレオチド長の範囲であり得る。いくつかの実施形態において、キャップは、存在しない。

【０３１１】

いくつかの実施形態において、ＩＶＴポリヌクレオチドの第１及び第２の機能性領域は、３～４０の範囲、例えば、５～３０、１０～２０、１５、または少なくとも４もしくは３０以下のヌクレオチド長であり得、開始コドン及び／または終止コドンに加えて、１つ以上のシグナル配列及び／または制限配列を含み得る。

【０３１２】

いくつかの実施形態において、ＩＶＴポリヌクレオチドは、構造的に修飾され得るか、化学修飾され得る。ＩＶＴポリヌクレオチドが化学的及び／または構造的に修飾される場合、そのＩＶＴポリヌクレオチドは、「修飾ＩＶＴポリヌクレオチド」と称され得る。

【０３１３】

いくつかの実施形態において、ＩＶＴポリヌクレオチドが化学修飾される場合、当該ＩＶＴポリヌクレオチドは、同一ヌクレオシドタイプの全てもしくはいずれかの均一の化学修飾を有し得るか、同一ヌクレオシドタイプの全てもしくはいずれかにおいて同一出発修飾の単なる漸減によって生じる修飾集団を有し得るか、全てのウリジンがウリジン類似体（例えば、プソイドウリジンまたは５－メトキシウリジン）によって置き換えられているなどのランダムな組み込みを有する、同一ヌクレオシドタイプのいずれかの全てに関して化学修飾の既定のパーセントを有し得る。別の実施形態において、ＩＶＴポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチド全体にわたって、２、３または４つの同一ヌクレオシドタイプの均一の化学修飾を有し得る（全てのウリジン及び全てのシトシンなどが同じように修飾されているなど）。

【０３１４】

いくつかの実施形態において、ＩＶＴポリヌクレオチドは、ＭＣＭ及び少なくとも１つの目的の追加のペプチドまたはポリペプチドをコードし得る。別の実施形態において、ＩＶＴポリヌクレオチドは、ＭＣＭ及び２つ以上の目的のペプチドまたはポリペプチドをコー

ドし得る。目的のペプチドまたはポリペプチドの非限定的な例には、酵素とその基質、標識とその結合分子、第２のメッセンジャーとその酵素、または多量体タンパク質もしくは複合体の構成成分が含まれる。

【０３１５】

いくつかの実施形態において、ＩＶＴポリヌクレオチドは、ＭＣＭタンパク質またはその機能性断片をコードする。いくつかの実施形態において、本開示のＩＶＴポリヌクレオチドは、配列番号１～２０７、７３２～７６５及び７７２から選択されるヒトＭＣＭ核酸配列のうちのいずれか１つを含む。いくつかの実施形態において、ＩＶＴポリヌクレオチドは、野生型配列を基準にして少なくとも１つのアミノ酸変異を含む、ヒトＭＣＭまたはその機能性断片をコードする。いくつかの実施形態において、ＩＶＴポリヌクレオチドは、点変異Ｖ６９、Ｔ４９９、Ｈ５３２、Ａ５９８及びＶ６７１のうちの１つ以上を含む、ＭＣＭ変異体をコードする。いくつかの実施形態において、コードされたポリペプチドの発現が増加する。いくつかの実施形態において、ＩＶＴポリヌクレオチドは、細胞に導入されたとき、当該細胞のＭＣＭ発現レベルを、例えば、２０～５０％、少なくとも２０％、少なくとも２５％、少なくとも３０％、少なくとも３５％、少なくとも４０％、少なくとも４５％または少なくとも５０％増加させる。

【０３１６】

キメラポリヌクレオチド構造

本開示はまた、本明細書に記載されるポリヌクレオチド（すなわち、ＭＣＭポリペプチドをコードするＯＲＦを含むポリヌクレオチド）を含む、キメラポリヌクレオチドを含む。

【０３１７】

大きさ及び／または化学修飾パターン、化学修飾位置、化学修飾パーセントまたは化学修飾集団、ならびに前述の組み合わせが異なる部分または領域を有するポリヌクレオチドは、「キメラポリヌクレオチド」として知られている。本開示による「キメラ」は、２つ以上の不均等または不均一な部分または領域を有する実体である。本明細書で使用されるとき、ポリヌクレオチドの「部分」または「領域」は、ポリヌクレオチドの完全長よりも短いポリヌクレオチドの任意の部分として定義される。修飾ｍＲＮＡ分子であるキメラポリヌクレオチドは、「キメラ修飾ｍＲＮＡ」または「キメラｍＲＮＡ」と称される。

【０３１８】

キメラポリヌクレオチドは、大きさ及び／または化学修飾パターン、化学修飾位置、化学修飾パーセントまたは化学修飾集団、ならびに前述の組み合わせが異なる部分または領域を有する。

【０３１９】

部分または領域の例には、キメラポリヌクレオチドがｍＲＮＡとして機能し、目的のポリペプチドをコードする場合、非翻訳領域（５'ＵＴＲまたは３'ＵＴＲなどのＵＴＲ）、コーディング領域、キャップ領域、ポリＡテール領域、開始領域、終止領域、シグナル配列領域またはターゲット配列領域及びこれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。

【０３２０】

いくつかの実施形態において、本開示のキメラポリヌクレオチドは、式Ｉを含む構造を有する。

５'　［Ａｎ］－ｘＬ１－［Ｂｏ］ｙ－Ｌ２－［Ｃｐ］ｚ－Ｌ３　３'

式Ｉ

式中、

Ａ及びＢのそれぞれは、連結ヌクレオシド領域を独立して含み、

ＡもしくはＢの一方、またはＡとＢの両方は、本明細書に別途記載されるＭＣＭをコードし、

Ｃは、連結ヌクレオシドの任意選択の領域であり、

領域Ａ、ＢまたはＣのうちの少なくとも１つは、位置的に修飾され、当該位置的に修飾される領域は、アデノシン、チミジン、グアノシン、シチジンまたはウリジンの同じヌクレ

オシドタイプのうちの１つ以上が少なくとも２つの化学修飾ヌクレオシドを含み、同じタイプのヌクレオシドの化学修飾のうちの少なくとも２つは、異なる化学修飾であり、
ｎ、ｏ及びｐは、独立して、１５～１０，０００の整数であり、それぞれ、領域Ａ、Ｂ及びＣ中のヌクレオシドの数を表し、
ｘ及びｙは、独立して、１～２０であり、
ｚは、０～５であり、
Ｌ１及びＬ２は、独立して、任意選択のリンカー部分であり、当該リンカー部分は、核酸ベースまたは非核酸ベースのいずれかであり、
Ｌ３は、任意選択のコンジュゲートまたは任意選択のリンカー部分であり、当該リンカー部分は、核酸ベースまたは非核酸ベースのいずれかである。

【０３２１】
いくつかの実施形態において、Ａの連結ヌクレオシド領域のうちの少なくとも１つは、５'非翻訳領域（ＵＴＲ）として機能し得る連結ヌクレオシド配列を含み得る。連結ヌクレオシド配列は、天然または合成の５'ＵＴＲであり得る。非限定的な例として、キメラポリヌクレオチドは、ＭＣＭをコードし得、Ａの連結ヌクレオシド配列は、ＭＣＭタンパク質の天然５'ＵＴＲまたは非異種５'ＵＴＲ、例えば、限定するものではないが、合成ＵＴＲをコードし得る。

【０３２２】
別の実施形態において、Ａの連結ヌクレオシド領域のうちの少なくとも１つは、キャップ領域であり得る。キャップ領域は、５'ＵＴＲとして機能するＡの連結ヌクレオシド領域の５'側に位置し得る。キャップ領域は、限定するものではないが、Ｃａｐ０、Ｃａｐ１、ＡＲＣＡ、イノシン、Ｎ１－メチル－グアノシン、２’フルオロ－グアノシン、７－デアザ－グアノシン、８－オキソ－グアノシン、２－アミノ－グアノシン、ＬＮＡ－グアノシン、２－アジド－グアノシン、Ｃａｐ２及びＣａｐ４などの少なくとも１つのキャップを含み得る。

【０３２３】
いくつかの実施形態において、本開示のポリヌクレオチドは、Ｃａｐ１　５'ＵＴＲを含む。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、Ｃａｐ１　５'ＵＴＲを含み、ポリヌクレオチドは、ヒトＭＣＭまたはその機能性断片をコードする。いくつかの実施形態において、本明細書で開示されるＭＣＭタンパク質をコードする、５'ＵＴＲ配列（例えば、Ｃａｐ１）を含むポリヌクレオチドは、異なる５'ＵＴＲ（例えば、Ｃａｐ０、ＡＲＣＡ、イノシン、Ｎ１－メチル－グアノシン、２’フルオロ－グアノシン、７－デアザ－グアノシン、８－オキソ－グアノシン、２－アミノ－グアノシン、ＬＮＡ－グアノシン、２－アジド－グアノシン、Ｃａｐ２またはＣａｐ４）を含むＭＣＭをコードするポリヌクレオチドと比較して、ＭＣＭの発現を増加させる。いくつかの実施形態において、Ｃａｐ１の５'ＵＴＲを含むポリヌクレオチドは、細胞に導入されたとき、当該細胞のＭＣＭ発現レベルを、例えば、少なくとも２０％、例えば、少なくとも２０％、少なくとも２５％、少なくとも３５％または少なくとも４０％増加させる。

【０３２４】
いくつかの実施形態において、Ｃの連結ヌクレオシド領域のうちの少なくとも１つは、３'ＵＴＲとして機能し得る連結ヌクレオシド配列を含み得る。連結されたヌクレオシドの配列は、天然または合成の３'ＵＴＲであり得る。非限定的な例として、キメラポリヌクレオチドは、ＭＣＭをコードし得、Ｃの連結ヌクレオシド配列は、ＭＣＭの天然３'ＵＴＲまたは非異種３'ＵＴＲ、例えば、限定するものではないが、合成ＵＴＲをコードし得る。

【０３２５】
いくつかの実施形態において、Ａの連結ヌクレオシド領域のうちの少なくとも１つは、５'ＵＴＲとして機能する連結ヌクレオシド配列を含み、Ｃの連結ヌクレオシド領域のうちの少なくとも１つは、３'ＵＴＲとして機能する連結ヌクレオシド配列を含む。いくつかの実施形態において、５'ＵＴＲ及び３'ＵＴＲは、同じ生物種または異なる生物種に由来し得る。別の実施形態において、５'ＵＴＲ及び３'ＵＴＲは、同じ生物種または異なる生物種

に由来する異なるタンパク質に由来する天然の非翻訳領域をコードし得る。
【０３２６】
本開示のキメラポリヌクレオチドは、その部分または領域を含め、ヘミマー、ギャップマー、ウイングマーまたはブロックマーに分類することができる。
【０３２７】
本明細書で使用されるとき、「ヘミマー」は、半分が１つの化学修飾（複数可）のパターン、パーセント、位置または集団を含み、もう半分が２つ目の化学修飾（複数可）のパターン、パーセント、位置または集団を含む領域または部分を含む、キメラポリヌクレオチドである。本開示のキメラポリヌクレオチドはまた、ヘミマーサブ領域を含み得る。いくつかの実施形態において、部分または領域は、一方が５０％、他方が５０％である。
【０３２８】
いくつかの実施形態において、キメラポリヌクレオチド全体は、一方が５０％、他方が５０％である。本開示の任意のキメラポリヌクレオチドの任意の領域または部分がヘミマーであり得る。ヘミマーの種類には、パターンヘミマー、集団ヘミマーまたは位置ヘミマーが含まれる。定義上、ヘミマーは、５０：５０パーセントヘミマーである。
【０３２９】
本明細書で使用されるとき、「ギャップマー」は、部分間または領域間にギャップがある少なくとも３つの部分または領域を有する、キメラポリヌクレオチドである。「ギャップ」は、隣接する２つの部分または領域のキメラ性とは異なる連結ヌクレオシドまたは単一ヌクレオシドの領域を含み得る。ギャップマーの２つの部分または領域は、互いに同じであっても異なっていてもよい。
【０３３０】
本明細書で使用されるとき、「ウイングマー」は、部分間または領域間にギャップがある少なくとも３つの部分または領域を有する、キメラポリヌクレオチドである。ギャップマーとは異なり、ウイングマー中のギャップ周辺の２つのフランキング部分または領域は、程度または種類において同じである。このような類似性は、異なる修飾単位の数の長さ、または修飾数にあってよい。ウイングマーのウイングは、ギャップより長くても短くてもよい。ウイングの部分または領域は、長さが、ギャップを含む領域よりも２０、３０、４０、５０、６０　７０、８０、９０または９５％大きくても小さくてもよい。
【０３３１】
本明細書で使用されるとき、「ブロックマー」は、部分または領域が同等の大きさまたは修飾数及び修飾タイプである、パターン化されたポリヌクレオチドである。ブロックマー中の領域またはサブ領域は、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、１００、１０１、１０２、１０３、１０４、１０５、１０６、１０７、１０８、１０９、１１０、１１１、１１２、１１３、１１４、１１５、１１６、１１７、１１８、１１９、１２０、１２１、１２２、１２３、１２４、１２５、１２６、１２７、１２８、１２９、１３０、１３１、１３２、１３３、１３４、１３５、１３６、１３７、１３８、１３９、１４０、１４１、１４２、１４３、１４４、１４５、１４６、１４７、１４８、１４９、１５０、１５１、１５２、１５３、１５４、１５５、１５６、１５７、１５８、１５９、１６０、１６１、１６２、１６３、１６４、１６５、１６６、１６７、１６８、１６９、１７０、１７１、１７２、１７３、１７４、１７５、１７６、１７７、１７８、１７９、１８０、１８１、１８２、１８３、１８４、１８５、１８６、１８７、１８８、１８９、１９０、１９１、１９２、１９３、１９４、１９５、１９６、１９７、１９８、１９９、２００、２０１、２０２、２０３、２０４、２０５、２０６、２０７、２０８、２０９、２１０、２１１、２１２、２１３、２１４、２１５、２１６、２１７、２１８、２１９、２２０、２２１、２２２、２２３、２２４、２２５、２２６、２２７、２２８、２２９、２３０、２３１、２３２、２３３、２３４、２３５、２３６、２３７、２３８、２３

９、２４０、２４１、２４２、２４３、２４４、２４５、２４６、２４７、２４８、２４９、２５０、２５１、２５２、２５３、２５４、２５５、２５６、２５７、２５８、２５９、２６０、２６１、２６２、２６３、２６４、２６５、２６６、２６７、２６８、２６９、２７０、２７１、２７２、２７３、２７４、２７５、２７６、２７７、２７８、２７９、２８０、２８１、２８２、２８３、２８４、２８５、２８６、２８７、２８８、２８９、２９０、２９１、２９２、２９３、２９４、２９５、２９６、２９７、２９８、２９９、３００、３１０、３２０、３３０、３４０、３５０、３６０、３７０、３８０、３９０、４００、４１０、４２０、４３０、４４０、４５０、４６０、４７０、４８０、４９０または５００ヌクレオシド長であり得る。

【０３３２】

化学修飾パターンを有する本開示のキメラポリヌクレオチドは、その部分または領域を含め、「パターンキメラ」と称される。パターンキメラは、ブロックマーと称されることもある。パターンキメラは、領域内もしくは部分内、領域全体もしくは部分全体、または領域間もしくは部分間に、修飾パターンを有するポリヌクレオチドである。

【０３３３】

部分内または領域内の修飾パターンは、ある画定された領域で開始し、終了するものである。部分全体または領域全体にわたる修飾パターンは、ある部分または領域で開始して、別の隣接する部分または領域で終了するパターンである。部分間または領域間の修飾パターンは、ある部分または領域で開始して終了し、第１の領域または部分に必ずしも隣接するものではない異なる部分または領域で反復されるものである。

【０３３４】

パターンキメラまたはブロックマーの領域またはサブ領域は、ＡＢＡＢ［ＡＢ］ｎなどの単純な交互パターンを有し得、ここで、各「Ａ」及び各「Ｂ」は、異なる化学修飾（塩基、糖または骨格リンカーのうちの少なくとも１つ）、異なる化学修飾タイプ（例えば、天然及び非天然）、異なる修飾パーセンテージまたは異なる修飾集団を表す。パターンは、ｎ回繰り返され得、ｎ＝３～３００である。更に、各ＡまたはＢは、パターン中、１～２５００単位（例えば、ヌクレオシド）であり得る。パターンはまた、ＡＡＢＢＡＡＢＢ［ＡＡＢＢ］ｎ（ダブル交互繰り返し）またはＡＡＡＢＢＢＡＡＡＢＢＢ［ＡＡＡＢＢＢ］ｎ（トリプル交互繰り返し）パターンなどの交互繰り返しであり得る。パターンは、ｎ回繰り返され得、ｎ＝３～３００である。

【０３３５】

また、異なるパターンを混合して二次パターンを形成してもよい。例えば、シングル交互パターンをトリプル交互パターンと組み合わせて、二次交互パターンＡ'Ｂ'を形成してもよい。一例は、［ＡＢＡＢＡＢ］［ＡＡＡＢＢＢＡＡＡＢＢＢ］［ＡＢＡＢＡＢ］［ＡＡＡＢＢＢＡＡＡＢＢＢ］［ＡＢＡＢＡＢ］［ＡＡＡＢＢＢＡＡＡＢＢＢ］であり、ここで、［ＡＢＡＢＡＢ］はＡ'であり、［ＡＡＡＢＢＢＡＡＡＢＢＢ］はＢ'である。同様に、これらのパターンは、ｎ回繰り返され得、ｎ＝３～３００である。

【０３３６】

パターンは、３つ以上の異なる修飾を含めて、ＡＢＣＡＢＣ［ＡＢＣ］ｎパターンを形成してもよい。これらの３成分パターンもまた、ＡＡＢＢＣＣＡＡＢＢＣＣ［ＡＡＢＢＣＣ］ｎなどの繰り返しであってもよく、ＡＢＣＡＢＣＡＡＢＢＣＣＡＢＣＡＢＣＡＡＢＢＣＣなどの他のパターンとの組み合わせとして設計され得、より高次のパターンであってもよい。

【０３３７】

位置、パーセント及び集団修飾の領域またはサブ領域は、各修飾タイプの均等な寄与率を反映する必要はない。「１－２－３－４」、「１－２－４－８」などのシリーズを形成してもよく、ここで、各整数は、特定の修飾タイプの単位数を表す。あるいは、「１－３－３－１－３－１－５」などの奇数のみ、または「２－４－２－４－６－４－８」の偶数のみ、「１－３－４－２－５－７－３－３－４」などの奇数及び偶数の単位の両方の組み合わせであってもよい。

【０３３８】
パターンキメラは、それらの化学修飾において、程度（上記のものなど）または種類（例えば、異なる修飾）で異なり得る。
【０３３９】
同一ヌクレオシドタイプ（Ａ、Ｃ、Ｇ、ＴまたはＵ）の２つ以上のヌクレオシドメンバーが２つ以上の異なる化学修飾を含む少なくとも１つの領域を有する本開示のキメラポリヌクレオチドは、その部分または領域を含め、「位置的修飾」キメラと称される。位置的修飾キメラはまた、本明細書中、「選択的配置」キメラまたは「選択的配置ポリヌクレオチド」とも称される。その名称が示唆するように、選択的配置は、任意のＡ、Ｃ、Ｇ、ＴまたはＵに対する修飾が合成法によって同じである、当該技術分野におけるポリヌクレオチドとは異なり、ポリヌクレオチドまたはその領域中の個々のＡ、Ｃ、Ｇ、ＴまたはＵが異なる修飾を有し得る、ポリヌクレオチド設計を指す。例えば、位置的修飾キメラポリヌクレオチドでは、Ａ、Ｃ、Ｇ、ＴまたはＵのヌクレオシドタイプのいずれかに２つ以上の異なる化学修飾が存在し得る。また、同一ヌクレオシドタイプのいずれか２つ以上に２つ以上の組み合わせが存在してもよい。例えば、位置的修飾または選択的配置キメラポリヌクレオチドは、分子中のアデニン集団に３つの異なる修飾を含み得、かつ構築物中のシトシン集団にも３つの異なる修飾を含み得、それらの全てが特有の非無作為的配置を有し得る。
【０３４０】
化学修飾パーセントを有する本開示のキメラポリヌクレオチドは、その部分または領域を含め、「パーセントキメラ」と称される。パーセントキメラは、少なくとも１％、少なくとも２％、少なくとも５％、少なくとも８％、少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、または少なくとも９９％の位置、パターンまたは集団の修飾を含む、領域または部分を有し得る。あるいは、パーセントキメラは、修飾位置、パターンまたは集団について、完全に修飾されてもよい。パーセントキメラの修飾パーセントは、天然修飾及び非天然修飾との間で分割されてもよい。
【０３４１】
化学修飾集団を有する本開示のキメラポリヌクレオチドは、その部分または領域を含め、「集団キメラ」と称される。集団キメラは、ヌクレオシド（その塩基、糖もしくは骨格結合またはこれらの組み合わせ）が選択修飾集団を有する、領域または部分を含み得る。かかる修飾は、表現型の結果を誘導、変更または調節する修飾などの機能的集団から選択され得る。例えば、機能的集団は、サイトカインのレベルを増加させる化学修飾の集団または選択であってよい。他の機能的集団は、個別にまたは全体として、１つ以上のサイトカインのレベルを減少させるように機能し得る。したがって、キメラポリヌクレオチドにおけるこれらの同様の機能修飾の選択の使用は、「機能的集団キメラ」を構成することになる。本明細書で使用されるとき、「機能的集団キメラ」は、その特有の機能的特徴が、上述される修飾集団によって定義されるものであってもよいし、当該用語は、キメラポリヌクレオチド自体の全体的機能に対して適用されてもよい。例えば、全体として、キメラポリヌクレオチドは、非修飾または非キメラポリヌクレオチドと比較して、異なる様式または優れた様式で機能し得る。
【０３４２】
同一ヌクレオシドタイプのいずれかの全ての均一の化学修飾を有し得るか、同一ヌクレオシドタイプのいずれかの全てにおいて同一出発修飾の単なる漸減によって生じる修飾集団を有し得るか、全てのウリジンがウリジン類似体（例えば、プソイドウリジンまたは５－メトキシウリジン）によって置き換えられているなどのランダムな組み込みを有する、同一ヌクレオシドタイプのいずれかの全てに関して化学修飾の既定のパーセントを有し得る、ポリヌクレオチドは、キメラポリヌクレオチドとみなされないことに留意すべきである。同様に、ポリヌクレオチド全体にわたって、２、３または４つの同一ヌクレオシドタイプの均一の化学修飾を有する（全てのウリジン及び全てのシトシンなどが同じように修飾

されているなど）ポリヌクレオチドは、キメラポリヌクレオチドとみなされない。キメラではないポリヌクレオチドの一例は、標準的なプソイドウリジン／５－メチルシトシン修飾ポリヌクレオチドである。これらの均一なポリヌクレオチドは、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ転写（ＩＶＴ）酵素合成によって完全に得られ、これらは、合成酵素に制限があるため、ポリヌクレオチドにみられる同一ヌクレオシドタイプ、すなわち、アデノシン（Ａ）、チミジン（Ｔ）、グアノシン（Ｇ）、シチジン（Ｃ）またはウリジン（Ｕ）のそれぞれの出現時に１種のみの修飾を含有する。このようなポリヌクレオチドは、ＩＶＴポリヌクレオチドとして特徴付けることができる。

【０３４３】

本開示のキメラポリヌクレオチドは、構造的に修飾され得るか、化学修飾され得る。本開示のキメラポリヌクレオチドが化学的及び／または構造的に修飾される場合、そのポリヌクレオチドは、「修飾キメラポリヌクレオチド」と称され得る。

【０３４４】

いくつかの実施形態において、キメラポリヌクレオチドは、２つ以上の目的のペプチドまたはポリペプチドをコードし得る。このような目的のペプチドまたはポリペプチドには、酵素とその基質、ラベルとその結合分子、第２のメッセンジャーとその酵素、または多量体タンパク質もしくは複合体の構成成分が含まれる。

【０３４５】

キメラポリヌクレオチドの領域または部分は、リンカー部分またはスペーサー部分によって隔てられてもよい。このようなリンカーまたはスペーサーは、核酸ベースであっても非ヌクレオシドであってもよい。

【０３４６】

いくつかの実施形態において、キメラポリヌクレオチドは、本明細書に記載される自己開裂ペプチド、限定するものではないが、２Ａペプチドなどをコードする配列を含み得る。キメラポリヌクレオチド中の２Ａペプチドのポリヌクレオチド配列は、本明細書に記載される方法及び／または当該技術分野において知られている方法によって、修飾または配列最適化され得る。

【０３４７】

前述の記載にかかわらず、本開示のキメラポリヌクレオチドは、本明細書で定義されるような位置的修飾またはキメラではない領域または部分を含み得る。例えば、キメラポリヌクレオチドの領域または部分は、１つ以上のＡ、Ｔ、Ｃ、ＧまたはＵにおいて均一に修飾され得るが、当該ポリヌクレオチドは、全体の領域または部分にわたって均一に修飾されない。

【０３４８】

キメラポリヌクレオチド領域または部分は、いくつかの実施形態において、１５～１０，０００ヌクレオシド長であり得、いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、本明細書に記載されるように、２～１００の異なる領域または領域パターンを有し得る。

【０３４９】

いくつかの実施形態において、キメラポリヌクレオチドは、１つ以上の目的のポリペプチドをコードする。別の実施形態において、キメラポリヌクレオチドは、実質的に非コーディングである。別の実施形態において、キメラポリヌクレオチドは、コーディングと非コーディングの両方の領域及び部分を有する。

【０３５０】

いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドの領域またはサブ領域は、０～５００ヌクレオチド長である範囲（例えば、少なくとも６０、７０、８０、９０、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０、１６０、１７０、１８０、１９０、２００、２５０、３００、３５０、４００、４５０または５００ヌクレオチド）であり得る。領域がポリＡテールである場合、その長さは、ポリＡ結合タンパク質の結合の単位で、またはその関数として決定され得る。この実施形態において、ポリＡテールは、少なくとも４つのポリＡ結合タンパク質単量体に結合するのに十分な長さである。ポリＡ結合タンパク質の単量

体は、およそ３８ヌクレオチドのストレッチに結合する。このように、約８０ヌクレオチド～約１６０ヌクレオチドのポリＡテールが機能的であることが観察されている。ｍＲＮＡとして機能する本開示のキメラポリヌクレオチドは、ポリＡテールを含む必要はない。

【０３５１】

本開示のいくつかの実施形態において、ｍＲＮＡとして機能するキメラポリヌクレオチドは、キャッピング領域を有する。キャッピング領域は、単一のキャップ、またはキャップを形成する一連のヌクレオチドを含み得る。この実施形態において、キャッピング領域は、１～１０、例えば、２～９、３～８、４～７、１～５、５～１０、または少なくとも２もしくは１０以下のヌクレオチド長の範囲であり得る。いくつかの実施形態において、キャップは、存在しない。

【０３５２】

本開示は、環状または環式であるキメラポリヌクレオチドを企図する。その名称が示唆するように、環状ポリヌクレオチドは、本質的に環状であり、すなわち、同じタンパク質または他の分子もしくは複合体とのライゲーション、共有結合、共有の会合によるか、ハイブリダイゼーションによるかにかかわらず、末端が何らかの方法で連結していることを意味する。

【０３５３】

キメラポリヌクレオチド、キメラポリヌクレオチドを含む製剤及び組成物、ならびにキメラポリヌクレオチドの製造、使用及び投与の方法は、国際特許出願第ＰＣＴ／ＵＳ２０１４／５３９０７号にも記載されており、その内容全体を参照により援用する。

【０３５４】

いくつかの実施形態において、キメラポリヌクレオチドは、ＭＣＭタンパク質またはその機能性断片をコードする。いくつかの実施形態において、本開示のキメラポリヌクレオチドは、配列番号１～２０７、７３２～７６５及び７７２から選択されるヒトＭＣＭ核酸配列のうちのいずれか１つを含む。いくつかの実施形態において、キメラポリヌクレオチドは、野生型配列を基準にして少なくとも１つのアミノ酸変異を含む、ヒトＭＣＭまたはその機能性断片をコードする。いくつかの実施形態において、キメラポリヌクレオチドは、点変異Ｖ６９、Ｔ４９９、Ｈ５３２、Ａ５９８及びＶ６７１のうちの１つ以上を含む、ＭＣＭ変異体をコードする。いくつかの実施形態において、コードされたポリペプチドの発現が増加する。いくつかの実施形態において、キメラポリヌクレオチドは、細胞に導入されたとき、当該細胞のＭＣＭ発現レベルを、例えば、２０～５０％、少なくとも２０％、少なくとも２５％、少なくとも３０％、少なくとも３５％、少なくとも４０％、少なくとも４５％または少なくとも５０％増加させる。

【０３５５】

環状ポリヌクレオチド構造

本開示はまた、本明細書に記載されるポリヌクレオチド（すなわち、ＭＣＭポリペプチドをコードするＯＲＦを含むポリヌクレオチド）を含む、環状ポリヌクレオチドを含む。

【０３５６】

環状であるポリヌクレオチドは、「環状ポリヌクレオチド」または「ｃｉｒｃＰ」として知られる。本明細書で使用されるとき、「環状ポリヌクレオチド」または「ｃｉｒｃＰ」とは、実質的にＲＮＡと同様に作用し、ＲＮＡの特性を有する、一本鎖環状ポリヌクレオチドを意味する。「環状」という用語は、任意の二次または三次構造のｃｉｒｃＰを包含することも意味する。

【０３５７】

本開示は、環状または環式である、ＭＣＭをコードするポリヌクレオチドを企図する。その名称が示唆するように、環状ポリヌクレオチドは、本質的に環状であり、すなわち、同じタンパク質または他の分子もしくは複合体とのライゲーション、共有結合、共有の会合によるか、ハイブリダイゼーションによるかにかかわらず、末端が何らかの方法で連結していることを意味する。

【０３５８】

少なくとも１つの目的のペプチドまたはポリペプチドをコードする環状ポリヌクレオチドまたはｃｉｒｃＰは、環状ＲＮＡまたはｃｉｒｃＲＮＡとして知られる。本明細書で使用されるとき、「環状ＲＮＡ」または「ｃｉｒｃＲＮＡ」とは、少なくとも１つの目的のペプチドまたはポリペプチドをコードし得る環状ポリヌクレオチドを意味する。

【０３５９】

少なくとも１つのセンサー配列を含み、目的のペプチドまたはポリペプチドをコードしないｃｉｒｃＰは、環状スポンジまたはｃｉｒｃＳＰとして知られる。本明細書で使用されるとき、「環状スポンジ」、「環状ポリヌクレオチドスポンジ」または「ｃｉｒｃＳＰ」とは、少なくとも１つのセンサー配列を含み、目的のポリペプチドをコードしない環状ポリヌクレオチドを意味する。

【０３６０】

本明細書で使用されるとき、「センサー配列」とは、内因性核酸結合分子の受容体または類似受容体を意味する。センサー配列の非限定的な例には、マイクロＲＮＡ結合部位、マイクロＲＮＡシード配列、シード配列を含まないマイクロＲＮＡ結合部位、転写因子結合部位及び類似受容体として機能するように操作された人工結合部位、ならびにその部分及び断片が挙げられる。

【０３６１】

少なくとも１つのセンサー配列を含み、少なくとも１つの目的のペプチドまたはポリペプチドをコードするｃｉｒｃＰは、環状ＲＮＡスポンジまたはｃｉｒｃＲＮＡ－ＳＰとして知られる。本明細書で使用されるとき、「環状ＲＮＡスポンジ」または「ｃｉｒｃＲＮＡ－ＳＰ」とは、少なくとも１つのセンサー配列と、少なくとも１つの目的のペプチドまたはポリペプチドをコードする少なくとも１つの領域とを含む、環状ポリヌクレオチドを意味する。

【０３６２】

本明細書で使用されるとき、「環状構築物」という用語は、実質的にＲＮＡ分子と同様に機能し、ＲＮＡ分子の特性を有し得る、環状ポリヌクレオチド転写物を指す。いくつかの実施形態において、環状構築物は、ｍＲＮＡとして機能する。環状構築物が１つ以上の目的のペプチドまたはポリペプチド（例えば、ｃｉｒｃＲＮＡまたはｃｉｒｃＲＮＡ－ＳＰ）をコードする場合、そのポリヌクレオチド転写物は、コードされている目的のポリペプチドが翻訳されるのに十分な構造的及び／または化学的特徴を保持する。環状構築物は、本開示のポリヌクレオチドであり得る。構造的修飾または化学修飾がなされる場合、構築物は、修飾ｃｉｒｃＰ、修飾ｃｉｒｃＳＰ、修飾ｃｉｒｃＲＮＡまたは修飾ｃｉｒｃＲＮＡ－ＳＰと称され得る。

【０３６３】

環状ポリヌクレオチド、環状ポリヌクレオチドを含む製剤及び組成物、ならびに環状ポリヌクレオチドの製造、使用及び投与の方法は、国際特許出願第ＰＣＴ／ＵＳ２０１４／５３９０４号にも記載されており、その内容全体を参照により援用する。

【０３６４】

いくつかの実施形態において、環状ポリヌクレオチドは、ＭＣＭタンパク質またはその機能性断片をコードする。いくつかの実施形態において、環状本開示のポリヌクレオチドは、配列番号１～２０７、７３２～７６５及び７７２から選択されるヒトＭＣＭ核酸のうちのいずれか１つを含む。いくつかの実施形態において、環状ポリヌクレオチドは、野生型配列を基準にして少なくとも１つのアミノ酸変異を含む、ヒトＭＣＭまたはその機能性断片をコードする。いくつかの実施形態において、環状ポリヌクレオチドは、点変異Ｖ６９、Ｔ４９９、Ｈ５３２、Ａ５９８及びＶ６７１のうちの１つ以上を含む、ＭＣＭ変異体をコードする。いくつかの実施形態において、コードされたポリペプチドの発現が増加する。いくつかの実施形態において、環状ポリヌクレオチドは、細胞に導入されたとき、当該細胞のＭＣＭ発現レベルを、例えば、２０～５０％、少なくとも２０％、少なくとも２５％、少なくとも３０％、少なくとも３５％、少なくとも４０％、少なくとも４５％または少なくとも５０％増加させる。

【０３６５】
ポリヌクレオチドの多量体
本開示はまた、本明細書に記載されるポリヌクレオチド（すなわち、ＭＣＭポリペプチドをコードするＯＲＦを含むポリヌクレオチド）を含む、ポリヌクレオチドの多量体を含む。
【０３６６】
いくつかの実施形態において、複数の別個のキメラポリヌクレオチド及び／またはＩＶＴポリヌクレオチドは、３’末端が修飾されたヌクレオチドを使用することによって、３’末端を介して一緒に連結され得る。化学コンジュゲートを使用して、細胞内送達の化学量論を制御することができる。例えば、グリオキシル酸回路酵素であるイソクエン酸リアーゼとリンゴ酸シンターゼを１：１の比率で細胞に供給すると、細胞の脂肪酸代謝を変更することができる。この比率は、１つのポリヌクレオチド種上の３’－アジド末端ヌクレオチドと、対向するポリヌクレオチド種上のＣ５－エチニルまたはアルキニルヌクレオチドとを使用して、キメラポリヌクレオチド及び／またはＩＶＴポリヌクレオチドを化学的に連結するによって制御することができる。修飾ヌクレオチドは、末端転移酵素（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ（Ｉｐｓｗｉｃｈ，ＭＡ））を製造元のプロトコルに従って使用して、転写後に付加される。３’－修飾ヌクレオチドの付加後、水溶液中、２つのポリヌクレオチド種を銅の存在下または不存在下で組み合わせ、文献に記載されているようなクリックケミストリー機構を介して新しい共有結合を形成することができる。
【０３６７】
別の例において、官能化リンカー分子を使用して、３つ以上のキメラポリヌクレオチド及び／またはＩＶＴポリヌクレオチドを一緒に連結することができる。例えば、３’－官能化ｍＲＮＡ分子（すなわち、３’－マレイミドエステル、３’－ＮＨＳ－エステル、アルキニル）上の同種の部分と反応する複数の化学反応性基（ＳＨ－、NH_2－、N_3など）を含有するように、官能化糖分子を化学的に修飾することができる。修飾糖上の反応性基の数を化学量論的方法で制御して、コンジュゲートされるキメラポリヌクレオチド及び／またはＩＶＴポリヌクレオチドの化学量論比を直接制御することができる。
【０３６８】
いくつかの実施形態において、キメラポリヌクレオチド及び／またはＩＶＴポリヌクレオチドは、あるパターンで一緒に連結され得る。パターンは、ＣＤ［ＣＤ］$_x$などの単純な交互パターンであり得、ここで、各「Ｃ」及び各「Ｄ」は、キメラポリヌクレオチド、ＩＶＴポリヌクレオチド、異なるキメラポリヌクレオチドまたは異なるＩＶＴポリヌクレオチドを表す。パターンは、ｘ回繰り返され得、ｘ＝１～３００である。パターンはまた、ＣＣＤＤ［ＣＣＤＤ］$_x$（ダブル交互繰り返し）またはＣＣＣＤＤＤ［ＣＣＣＤＤＤ］$_x$（トリプル交互繰り返し）パターンなどの交互繰り返しであり得る。ダブル交互繰り返しまたはトリプル交互繰り返しは、ｘ回繰り返され得、ｘ＝１～３００である。
【０３６９】
ポリヌクレオチドのコンジュゲート及び組み合わせ
本開示はまた、本明細書に記載されるポリヌクレオチド（すなわち、ＭＣＭポリペプチドをコードするＯＲＦを含むポリヌクレオチド）を含む、ポリヌクレオチドのコンジュゲート及び組み合わせを含む。
【０３７０】
タンパク質生産を更に向上させるために、本開示のポリヌクレオチドは、他のポリヌクレオチド、色素または他の作用物質にコンジュゲートされるように設計され得る。
【０３７１】
コンジュゲートは、安定性及び／または半減期の増大をもたらし得、細胞、組織または生物内の特定部位に対してポリヌクレオチドを標的化するのに特に有用であり得る。
【０３７２】
いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、ＲＮＡｉ剤、ｓｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ結合部位、アンチセンスＲＮＡ、リボザイム、触媒性ＤＮＡ、ｔＲＮＡ、トリプルヘリックスの形成を誘導するＲＮＡ、アプタマーまたはベクターな

どのうちの１つ以上とともに投与されてもよいし、これらにコンジュゲートされてもよいし、これらを更にコードしてもよい。

【０３７３】

二機能性ポリヌクレオチド

本開示はまた、本明細書に記載されるポリヌクレオチド（すなわち、ＭＣＭポリペプチドをコードするＯＲＦを含むポリヌクレオチド）を含む、二機能性ポリヌクレオチドを含む。

【０３７４】

本開示のいくつかの実施形態において、二機能性ポリヌクレオチド（例えば、二機能性ＩＶＴポリヌクレオチド、二機能性キメラポリヌクレオチドまたは二機能性環状ポリヌクレオチド）である。その名称が示唆するように、二機能性ポリヌクレオチドは、少なくとも２つの機能を有するか、その能力があるものである。これらの分子はまた、慣例上、多機能性と称される。

【０３７５】

二機能性ポリヌクレオチドの多機能性は、ＲＮＡによってコードされてもよいし（機能は、コードされた産物が翻訳されるまで顕在化し得ない）、ポリヌクレオチド自体の特性であってもよい。構造的または化学的であってよい。二機能性修飾ポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチドと共有結合的に、または静電的に会合する機能を含み得る。更に、２つの機能は、キメラポリヌクレオチドと別の分子との複合体に関して付与されてもよい。

【０３７６】

二機能性ポリヌクレオチドは、抗増殖性であるペプチドをコードし得る。これらのペプチドは、線状、環状、拘束またはランダムコイルであってよく、アプタマー、シグナル伝達分子、リガンドまたはそれらの模倣体もしくはミメティックとして機能し得る。抗増殖性ペプチドは、翻訳された場合、３～５０アミノ酸長であり得、５～４０、１０～３０またはおよそ１５アミノ酸長であってよい。当該ペプチドは、単鎖、多連鎖または分岐状であり得、翻訳されると、複合体、アグリゲートまたは任意の多単位構造を形成し得る。

【０３７７】

ノンコーディングポリヌクレオチド

本開示はまた、本明細書に記載されるポリヌクレオチド（すなわち、ＭＣＭポリペプチドをコードするＯＲＦを含むポリヌクレオチド）を含む、ノンコーディングポリヌクレオチドを含む。

【０３７８】

本明細書に記載されるポリヌクレオチドは、部分的または実質的に翻訳されない配列（例えば、ノンコーディング領域を有する配列）を更に含み得る。非限定的な一例として、ノンコーディング領域は、ＩＶＴポリヌクレオチドまたは環状ポリヌクレオチドの第１の領域であり得る。あるいは、ノンコーディング領域は、第１の領域以外の領域であり得る。別の非限定的な例として、ノンコーディング領域は、キメラポリヌクレオチドのＡ、Ｂ及び／またはＣ領域であり得る。

【０３７９】

そのような分子は、通常翻訳されないが、リボソームタンパク質または転移ＲＮＡ（ｔＲＮＡ）などの１つ以上の翻訳機構構成成分への結合及び当該構成成分からの隔離のうちの１つ以上によってタンパク質生産に影響を与えることができ、これにより、細胞内でのタンパク質発現を効果的に減少させるか、細胞内の１つ以上の経路またはカスケードを調節してタンパク質レベルを変更する。ポリヌクレオチドは、１つ以上の長いノンコーディングＲＮＡ（ｌｎｃＲＮＡまたはｌｉｎｃＲＮＡ）もしくはその部分、核小体低分子ＲＮＡ（ｓｎｏ－ＲＮＡ）、マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）、低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）またはＰｉｗｉ相互作用ＲＮＡ（ｐｉＲＮＡ）を含有するか、コードし得る。そのようなｌｎｃＲＮＡ分子と、当該ｌｎｃＲＮＡを標的にするように設計されたＲＮＡｉ構築物は、いずれもポリヌクレオチド中にコードされ得、これらの例は、国際公開第ＷＯ２０１２／０１８８８１Ａ２号に開示されており、その内容全体を参照により本明細書に援用する。

【０３８０】

細胞傷害性ヌクレオシド
いくつかの実施形態において、本開示のポリヌクレオチド（すなわち、ＭＣＭポリペプチドをコードするＯＲＦを含むポリヌクレオチド）は、１つ以上の細胞傷害性ヌクレオシドを更に組み込むことができる。
【０３８１】
非翻訳領域（ＵＴＲ）
非翻訳領域（ＵＴＲ）は、開始コドンの前（５'ＵＴＲ）及び終止コドンの後（３'ＵＴＲ）の翻訳されないポリヌクレオチドの核酸部分である。いくつかの実施形態において、ＭＣＭポリペプチドをコードするオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）を含む本開示のポリヌクレオチド（例えば、リボ核酸（ＲＮＡ）、例えば、メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ））は、ＵＴＲ（例えば、５’ＵＴＲもしくはその機能性断片、３’ＵＴＲもしくはその機能性断片、またはこれらの組み合わせ）を更に含む。
【０３８２】
ＵＴＲは、ポリヌクレオチド中のコーディング領域に対して、同種または異種であり得る。いくつかの実施形態において、ＵＴＲは、ＭＣＭポリペプチドをコードするＯＲＦに対して同種である。いくつかの実施形態において、ＵＴＲは、ＭＣＭポリペプチドをコードするＯＲＦに対して異種である。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、２つ以上の５’ＵＴＲまたはその機能性断片を含み、そのそれぞれは、同じヌクレオチド配列または異なるヌクレオチド配列を有する。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、２つ以上の３’ＵＴＲまたはその機能性断片を含み、そのそれぞれは、同じヌクレオチド配列または異なるヌクレオチド配列を有する。
【０３８３】
いくつかの実施形態において、５’ＵＴＲもしくはその機能性断片、３’ＵＴＲもしくはその機能性断片、またはこれらの任意の組み合わせは、配列最適化される。
【０３８４】
いくつかの実施形態において、５’ＵＴＲもしくはその機能性断片、３’ＵＴＲもしくはその機能性断片、またはこれらの任意の組み合わせは、少なくとも１つの化学修飾核酸塩基、例えば、５－メトキシウラシルを含む。
【０３８５】
ＵＴＲは、制御的役割、例えば、安定性、局在化及び／または翻訳効率の増大または減少を提供する特徴を有し得る。ＵＴＲを含むポリヌクレオチドは、細胞、組織または生物に投与することができ、１つ以上の制御的特徴は、常法を使用して測定することができる。いくつかの実施形態において、５'ＵＴＲまたは３'ＵＴＲの機能性断片は、それぞれ完全長５'または３'ＵＴＲの１つ以上の制御的特徴を含む。
【０３８６】
天然５’ＵＴＲは、翻訳開始に関与する特徴を有する。天然５’ＵＴＲは、リボソームが多数の遺伝子の翻訳を開始する過程に関与することが一般に知られているＫｏｚａｋ配列のようなシグネチャを保有する。Ｋｏｚａｋ配列は、共通のＣＣＲ（Ａ／Ｇ）ＣＣＡＵＧＧを有し、配列中、Ｒは、別の「Ｇ」が後に続く開始コドン（ＡＵＧ）の３塩基上流のプリン（アデニンまたはグアニン）である。５’ＵＴＲはまた、伸長因子の結合に関与する二次構造を形成することが知られている。
【０３８７】
特定の標的器官で大量に発現される遺伝子に典型的にみられる特徴を操作することによって、ポリヌクレオチドの安定性及びタンパク質生産を向上させることができる。例えば、肝細胞株または肝臓においては、アルブミン、血清アミロイドＡ、アポリポタンパク質Ａ／Ｂ／Ｅ、トランスフェリン、αフェトタンパク質、エリスロポエチンまたは第ＶＩＩＩ因子などの肝臓発現ｍＲＮＡの５’ＵＴＲを導入すると、ポリヌクレオチドの発現が向上し得る。同様に、他の組織特異的ｍＲＮＡからの５’ＵＴＲを使用すると、筋肉（例えば、ＭｙｏＤ、ミオシン、ミオグロビン、ミオゲニン、ヘルクリン）、内皮細胞（例えば、Ｔｉｅ－１、ＣＤ３６）、骨髄細胞（例えば、Ｃ／ＥＢＰ、ＡＭＬ１、Ｇ－ＣＳＦ、ＧＭ－Ｃ

ＳＦ、ＣＤ１１ｂ、ＭＳＲ、Ｆｒ－１、ｉ－ＮＯＳ）、白血球（例えば、ＣＤ４５、ＣＤ１８）、脂肪組織（例えば、ＣＤ３６、ＧＬＵＴ４、ＡＣＲＰ３０、アディポネクチン）及び肺上皮細胞（例えば、ＳＰ－Ａ／Ｂ／Ｃ／Ｄ）についても、組織内の発現を改善することが可能である。

【０３８８】

いくつかの実施形態において、ＵＴＲは、そのタンパク質が共通の機能、構造、特徴または特性を共有する、転写物のファミリーから選択される。例えば、コードされるポリペプチドは、特定の細胞、組織において、または成長中のある期間に発現される、タンパク質のファミリー（すなわち、少なくとも１つの機能、構造、特徴、局在化、起源または発現パターンを共有する）に属し得る。遺伝子またはｍＲＮＡのいずれかに由来するＵＴＲを、同じタンパク質ファミリーまたは異なるタンパク質ファミリーの任意の他のＵＴＲと交換して、新しいポリヌクレオチドを作製することができる。

【０３８９】

いくつかの実施形態において、５’ＵＴＲ及び３’ＵＴＲは、異種であり得る。いくつかの実施形態において、５'ＵＴＲは、３'ＵＴＲとは異なる生物種に由来し得る。いくつかの実施形態において、３'ＵＴＲは、５'ＵＴＲとは異なる生物種に由来し得る。

【０３９０】

共同所有の国際特許出願第ＰＣＴ／ＵＳ２０１４／０２１５２２号（国際公開第ＷＯ／２０１４／１６４２５３号、その全体を参照により本明細書に援用する）は、ＯＲＦのフランキング領域として本開示のポリヌクレオチドに利用することができる、例示的なＵＴＲの一覧を提供している。

【０３９１】

本出願の例示的なＵＴＲには、α－グロビンまたはβ－グロビンなどのグロビン（例えば、Ｘｅｎｏｐｕｓ、マウス、ウサギまたはヒトグロビン）、強力なＫｏｚａｋ翻訳開始シグナル、ＣＹＢＡ（例えば、ヒトシトクロムｂ－２４５αポリペプチド）、アルブミン（例えば、ヒトアルブミン７）、ＨＳＤ１７Ｂ４（ヒドロキシステロイド（１７－β）脱水素酵素）、ウイルス（例えば、タバコエッチウイルス（ＴＥＶ）、ベネズエラウマ脳炎ウイルス（ＶＥＥＶ）、デング熱ウイルス、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）（例えば、ＣＭＶ前初期１（ＩＥ１））、肝炎ウイルス（例えば、Ｂ型肝炎ウイルス）、シンドビスウイルスまたはＰＡＶオオムギ黄萎ウイルス）、熱ショックタンパク質（例えば、ｈｓｐ７０）、翻訳開始因子（例えば、ｅｌＦ４Ｇ）、グルコース輸送体（例えば、ｈＧＬＵＴ１（ヒトグルコース輸送体１））、アクチン（例えば、ヒトαまたはβアクチン）、ＧＡＰＤＨ、チューブリン、ヒストン、クエン酸回路酵素、トポイソメラーゼ（例えば、５’ＴＯＰモチーフを欠くＴＯＰ遺伝子の５’ＵＴＲ（オリゴピリミジントラクト））、ラージリボソームタンパク質３２（Ｌ３２）、リボソームタンパク質（例えば、ヒトまたはマウスリボソームタンパク質、例えば、ｒｐｓ９など）、ＡＴＰ合成酵素（例えば、ＡＴＰ５Ａ１またはミトコンドリアＨ＋－ＡＴＰ合成酵素のβサブユニット）、成長ホルモンｅ（例えば、ウシ（ｂＧＨ）またはヒト（ｈＧＨ））、伸長因子（例えば、伸長因子１　α１（ＥＥＦ１Ａ１））、マンガンスーパーオキシドジスムターゼ（ＭｎＳＯＤ）、筋細胞エンハンサー因子２Ａ（ＭＥＦ２Ａ）、β－Ｆ１－ＡＴＰａｓｅ、クレアチンキナーゼ、ミオグロビン、顆粒球コロニー刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ）、コラーゲン（例えば、Ｉ型コラーゲンα２（Ｃｏｌ１Ａ２）、Ｉ型コラーゲンα１（Ｃｏｌ１Ａ１）、ＶＩ型コラーゲンα２（Ｃｏｌ６Ａ２）、ＶＩ型コラーゲンα１（Ｃｏｌ６Ａ１））、リボフォリン（例えば、リボフォリンＩ（ＲＰＮＩ））、低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質（例えば、ＬＲＰ１）、カルジオトロフィン様サイトカイン因子（例えば、Ｎｎｔ１）、カルレチクリン（Ｃａｌｒ）、プロコラーゲン－リシン，２－オキソグルタル酸５－ジオキシゲナーゼ１（Ｐｌｏｄ１）、及びヌクレオビンジン（例えば、Ｎｕｃｂ１）の核酸配列に由来する１つ以上の５’ＵＴＲ及び／または３’ＵＴＲが挙げられるが、これらに限定されない。

【０３９２】

他の例示的な５'及び３'ＵＴＲには、Ｋａｒｉｋｏ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒ．２

008 16(11):1833-1840、Kariko et al.,Mol.Ther.2012 20(5):948-953、Kariko et al.,Nucleic Acids Res.2011 39(21):e142、Strong et al.,Gene Therapy 1997 4:624-627、Hansson et al.,J.Biol.Chem.2015 290(9):5661-5672、Yu et al.,Vaccine 2007 25(10):1701-1711、Cafri et al.,Mol.Ther.2015 23(8):1391-1400、Andries et al.,Mol.Pharm.2012 9(8):2136-2145、Crowley et al.,Gene Ther.2015 Jun 30,doi:10.1038/gt.2015.68、Ramunas et al.,FASEB J.2015 29(5):1930-1939、Wang et al.,Curr.Gene Ther.2015 15(4):428-435、Holtkamp et al.,Blood 2006 108(13):4009-4017、Kormann et al.,Nat.Biotechnol.2011 29(2):154-157、Poleganov et al.,Hum.Gen.Ther.2015 26(11):751-766、Warren et al.,Cell Stem Cell 2010 7(5):618-630、Mandal and Rossi,Nat.Protoc.2013 8(3):568-582、Holcik and Liebhaber,PNAS 1997 94(6):2410-2414、Ferizi et al.,Lab Chip.2015 15(17):3561-3571、Thess et al.,Mol.Ther.2015 23(9):1456-1464、Boros et al.,PLoS One 2015 10(6):e0131141、Boros et al.,J.Photochem.Photobiol.B.2013 129:93-99、Andries et al.,J.Control.Release 2015 217:337-344、Zinckgraf et al.,Vaccine 2003 21(15):1640-9、Garneau et al.,J.Virol.2008 82(2):880-892、Holden and Harris,Virology 2004 329(1):119-133、Chiu et al.,J.Virol.2005 79(13):8303-8315、Wang et al.,EMBO J.1997 16(13):4107-4116、Al-Zoghaibi et al.,Gene 2007 391(1-2):130-9、Vivinus et al.,Eur.J.Biochem.2001 268(7):1908-1917、Gan and Rhoads,J.Biol.Chem.1996 271(2):623-626、Boado et al.,J.Neurochem.1996 67(4):1335-1343、Knirsch and Clerch,Biochem.Biophys.Res.Commun.2000 272(1):164-168、Chung et al.,Biochemistry 1998 37(46):16298-16306、Izquierdo and Cuevza,Biochem.J.2000 346 Pt 3:849-855、Dwyer et al.,J.Neurochem.1996 66(2):449-458、Black et al.,Mol.Cell.Biol.1997 17(5):2756-2763、Izquierdo and Cuevza,Mol.Cell.Biol.1997 17(9):5255-5268、US8278036、US8748089、US8835108、US9012219、US2010/0129877、US2011/0065103、US2011/0086904、US2012/0195936、US2014/020675、US2013/0195967、US2014/029490、US2014/0206753、WO2007/036366、WO2011/015347、WO2012/072096、WO2013/143555、WO2014/071963、WO2013/185067、WO2013/182623、WO2014/089486、WO2013/185069、WO2014/144196、WO2014/152659、2014/152673、WO

２０１４／１５２９４０、ＷＯ２０１４／１５２７７４、ＷＯ２０１４／１５３０５２、ＷＯ２０１４／１５２９６６，ＷＯ２０１４／１５２５１３、ＷＯ２０１５／１０１４１４、ＷＯ２０１５／１０１４１５、ＷＯ２０１５／０６２７３８及びＷＯ２０１５／０２４６６７に記載のものが挙げられるが、これらに限定されず、それぞれの内容全体を参照により本明細書に援用する。

【０３９３】

いくつかの実施形態において、５'ＵＴＲは、β－グロビン５’ＵＴＲ、強力なＫｏｚａｋ翻訳開始シグナルを含有する５’ＵＴＲ、シトクロムｂ－２４５αポリペプチド（ＣＹＢＡ）５'ＵＴＲ、ヒドロキシステロイド（１７－β）脱水素酵素（ＨＳＤ１７Ｂ４）５'ＵＴＲ、タバコエッチウイルス（ＴＥＶ）５'ＵＴＲ、ベネズエラウマ脳炎ウイルス（ＴＥＥＶ）５'ＵＴＲ、非構造タンパク質をコードする風疹ウイルス（ＲＶ）ＲＮＡの５'隣接オープンリーディングフレーム、デング熱ウイルス（ＤＥＮ）５'ＵＴＲ、熱ショックタンパク質７０（Ｈｓｐ７０）５'ＵＴＲ、ｅＩＦ４Ｇ　５'ＵＴＲ、ＧＬＵＴ１　５'ＵＴＲ、これらの機能性断片及びこれらの任意の組み合わせからなる群から選択される。

【０３９４】

いくつかの実施形態において、３'ＵＴＲは、β－グロビン３’ＵＴＲ、ＣＹＢＡ　３'ＵＴＲ、アルブミン３'ＵＴＲ、成長ホルモン（ＧＨ）３'ＵＴＲ、ＶＥＥＶ　３'ＵＴＲ、Ｂ型肝炎ウイルス（ＨＢＶ）３'ＵＴＲ、α－グロビン３’ＵＴＲ、ＤＥＮ　３'ＵＴＲ、ＰＡＶオオムギ黄萎ウイルス（ＢＹＤＶ－ＰＡＶ）３'ＵＴＲ、伸長因子１　α１（ＥＥＦ１Ａ１）３'ＵＴＲ、マンガンスーパーオキシドジスムターゼ（ＭｎＳＯＤ）３'ＵＴＲ、ミトコンドリアＨ（＋）－ＡＴＰシンターゼ（β－ｍＲＮＡ）のβサブユニット３'ＵＴＲ、ＧＬＵＴ１　３'ＵＴＲ、ＭＥＦ２Ａ　３'ＵＴＲ、β－Ｆ１－ＡＴＰａｓｅ　３'ＵＴＲ、これらの機能性断片及びこれらの組み合わせからなる群から選択される。

【０３９５】

他の例示的なＵＴＲには、ＷＯ２０１４／１６４２５３（その内容全体を参照により本明細書に援用する）に開示される、ＵＴＲの任意の組み合わせを含む、ＵＴＲのうちの１つ以上が挙げられるが、これらに限定されない。米国特許仮出願第６１／７７５，５０９号の表２１及び米国特許仮出願第６１／８２９，３７２号の表２２（それぞれの内容全体を参照により本明細書に援用する）に、５'ＵＴＲ及び３'ＵＴＲに関する開始部位及び終止部位の一覧が示されている。表２１中、各５’ＵＴＲ（５’－ＵＴＲ－００５～５’－ＵＴＲ６８５１１）は、その天然型または野生型（同種）転写物と比較して、その開始部位及び終止部位によって特定される（ＥＮＳＴ；ＥＮＳＥＭＢＬデータベースで使用される識別名）。

【０３９６】

任意の遺伝子またはｍＲＮＡに由来する野生型ＵＴＲを本開示のポリヌクレオチド中に組み込むことができる。いくつかの実施形態において、ＵＴＲは、バリアントＵＴＲを作製するために、例えば、ＯＲＦと比較してＵＴＲの配向もしくは位置を変更することによって、または付加ヌクレオチドの包含、ヌクレオチドの欠失、ヌクレオチドの交換もしくは入れ換えによって、野生型または天然ＵＴＲに対して変更することができる。いくつかの実施形態において、５’または３’ＵＴＲのバリアント、例えば、１つ以上のヌクレオチドがＵＴＲの末端に付加されているか、削除されている、野生型ＵＴＲの変異体またはバリアントを利用することができる。

【０３９７】

更に、１つ以上の合成ＵＴＲを１つ以上の非合成ＵＴＲと組み合わせ使用することができる。例えば、Ｍａｎｄａｌ　ａｎｄ　Ｒｏｓｓｉ，Ｎａｔ．Ｐｒｏｔｏｃ．２０１３　８（３）：５６８－８２を参照されたい（その内容全体を参照により本明細書に援用する；配列は、ｗｗｗ．ａｄｄｇｅｎｅ．ｏｒｇ／Ｄｅｒｒｉｃｋ＿Ｒｏｓｓｉ/で入手可能である）。ＵＴＲまたはその部分は、選択された転写物と同じ配向に配置されてもよいし、配向または位置を変更してもよい。したがって、５’及び／または３’ＵＴＲは、反転、短縮、延長されてもよいし、１つ以上の他の５’ＵＴＲまたは３’ＵＴＲと組み合わされてもよい。

【０３９８】
いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、複数のＵＴＲ、例えば、ダブル、トリプルまたはクアドラプルの５’ＵＴＲまたは３’ＵＴＲを含む。例えば、ダブルＵＴＲは、同一ＵＴＲの２つのコピーを、連続して、または実質的に連続して含む。例えば、ダブルβ－グロビン３’ＵＴＲを使用することができる（ＵＳ２０１０／０１２９８７７参照、その内容全体を参照により本明細書に援用する）。
【０３９９】
表５及び６は、本開示のポリヌクレオチドで利用することができる例示的なＵＴＲの一覧を提供する。本開示の５’非翻訳領域のリストを表５に示す。Ａ、Ｔ、ＣまたはＧを含む１つ以上のヌクレオチドが末端に付加されているか、除去されている、５'ＵＴＲのバリアントを利用することができる。
表５．５’非翻訳領域
【表２４】

５’ＵＴＲ識別名	名称／説明	配列	配列番号
５ＵＴＲ－００１	上流ＵＴＲ	ＧＧＧＡＡＡＴＡＡＧＡＧＡＧＡＡＡＡＧＡＡＧＡＧＴＡＡＧＡＡＧＡＡＡＴＡＴＡＡＧＡＧＣＣＡＣＣ	２１５
５ＵＴＲ－００２	上流ＵＴＲ	ＧＧＧＡＧＡＴＣＡＧＡＧＡＧＡＡＡＡＧＡＡＧＡＧＴＡＡＧＡＡＧＡＡＡＴＡＴＡＡＧＡＧＣＣＡＣＣ	２１６
５ＵＴＲ－００３	上流ＵＴＲ	ＧＧＡＡＴＡＡＡＡＧＴＣＴＣＡＡＣＡＣＡＡＣＡＴＡＴＡＣＡＡＡＡＣＡＡＡＣＧＡＡＴＣＴＣＡＡＧＣＡＡＴＣＡＡＧＣＡＴＴＣＴＡＣＴＴＣＴＡＴＴＧＣＡＧＣＡＡＴＴＴＡＡＡＴＣＡＴＴＴＣＴＴＴＴＡＡＡＧＣＡＡＡＡＧＣＡＡＴＴＴＴＣＴＧＡＡＡＡＴＴＴＴＣＡＣＣＡＴＴＴＡＣＧＡＡＣＧＡＴＡＧＣＡＡＣ	２１７
５ＵＴＲ－００４	上流ＵＴＲ	ＧＧＧＡＧＡＣＡＡＧＣＵＵＧＧＣＡＵＵＣＣＧＧＵＡＣＵＧＵＵＧＧＵＡＡＡＧＣＣＡＣＣ	２１８
５ＵＴＲ－００５	上流ＵＴＲ	ＧＧＧＡＧＡＴＣＡＧＡＧＡＧＡＡＡＡＧＡＡＧＡＧＴＡＡＧＡＡＧＡＡＡＴＡＴＡＡＧＡＧＣＣＡＣＣ	２１９
５ＵＴＲ－００６	上流ＵＴＲ	ＧＧＡＡＴＡＡＡＡＧＴＣＴＣＡＡＣＡＣＡＡＣＡＴＡＴＡＣＡＡＡＡＣＡＡＡＣＧＡＡＴＣＴＣＡＡＧＣＡＡＴＣＡＡＧＣＡＴＴＣＴＡＣＴＴＣＴＡＴＴＧＣＡＧＣＡＡＴＴＴＡＡＡＴＣＡＴＴＴＣＴＴＴＴＡＡＡＧＣＡＡＡＡＧＣＡＡＴＴＴＴＣＴＧＡＡＡＡＴＴＴＴＣＡＣＣＡＴＴＴＡＣＧＡＡＣＧＡＴＡＧＣＡＡＣ	２２０
５ＵＴＲ－００７	上流ＵＴＲ	ＧＧＧＡＧＡＣＡＡＧＣＵＵＧＧＣＡＵＵＣＣＧＧＵＡＣＵＧＵＵＧＧＵＡＡＡＧＣＣＡＣＣ	２２１
５ＵＴＲ－００８	上流ＵＴＲ	ＧＧＧＡＡＴＴＡＡＣＡＧＡＧＡＡＡＡＧＡＡＧＡＧＴＡＡＧＡＡＧＡＡＡＴＡＴＡＡＧＡＧＣＣＡＣＣ	２２２

【表２５】

５ＵＴＲ－００９	上流ＵＴＲ	ＧＧＧＡＡＡＴＴＡＧＡＣＡＧＡＡＡＡＧＡＡＧＡＧＴＡＡＧＡＡＧＡＡＡＴＡＴＡＡＧＡＧＣＣＡＣＣ	２２３
５ＵＴＲ－０１０	上流ＵＴＲ	ＧＧＧＡＡＡＴＡＡＧＡＧＡＧＴＡＡＡＧＡＡＣＡＧＴＡＡＧＡＡＧＡＡＡＴＡＴＡＡＧＡＧＣＣＡＣＣ	２２４
５ＵＴＲ－０１１	上流ＵＴＲ	ＧＧＧＡＡＡＡＡＡＧＡＧＡＧＡＡＡＡＧＡＡＧＡＣＴＡＡＧＡＡＧＡＡＡＴＡＴＡＡＧＡＧＣＣＡＣＣ	２２５
５ＵＴＲ－０１２	上流ＵＴＲ	ＧＧＧＡＡＡＴＡＡＧＡＧＡＧＡＡＡＡＧＡＡＧＡＧＴＡＡＧＡＡＧＡＴＡＴＡＴＡＡＧＡＧＣＣＡＣＣ	２２６
５ＵＴＲ－０１３	上流ＵＴＲ	ＧＧＧＡＡＡＴＡＡＧＡＧＡＣＡＡＡＡＣＡＡＧＡＧＴＡＡＧＡＡＧＡＡＡＴＡＴＡＡＧＡＧＣＣＡＣＣ	２２７
５ＵＴＲ－０１４	上流ＵＴＲ	ＧＧＧＡＡＡＴＴＡＧＡＧＡＧＴＡＡＡＧＡＡＣＡＧＴＡＡＧＴＡＧＡＡＴＴＡＡＡＡＧＡＧＣＣＡＣＣ	２２８
５ＵＴＲ－０１５	上流ＵＴＲ	ＧＧＧＡＡＡＴＡＡＧＡＧＡＧＡＡＴＡＧＡＡＧＡＧＴＡＡＧＡＡＧＡＡＡＴＡＴＡＡＧＡＧＣＣＡＣＣ	２２９
５ＵＴＲ－０１６	上流ＵＴＲ	ＧＧＧＡＡＡＴＡＡＧＡＧＡＧＡＡＡＡＧＡＡＧＡＧＴＡＡＧＡＡＧＡＡＡＡＴＴＡＡＧＡＧＣＣＡＣＣ	２３０
５ＵＴＲ－０１７	上流ＵＴＲ	ＧＧＧＡＡＡＴＡＡＧＡＧＡＧＡＡＡＡＧＡＡＧＡＧＴＡＡＧＡＡＧＡＡＡＴＴＴＡＡＧＡＧＣＣＡＣＣ	２３１
５ＵＴＲ－０１８	上流ＵＴＲ	ＴＣＡＡＧＣＴＴＴＴＧＧＡＣＣＣＴＣＧＴＡＣＡＧＡＡＧＣＴＡＡＴＡＣＧＡＣＴＣＡＣＴＡＴＡＧＧＧＡＡＡＴＡＡＧＡＧＡＧＡＡＡＡＧＡＡＧＡＧＴＡＡＧＡＡＧＡＡＡＴＡＴＡＡＧＡＧＣＣＡＣＣ	２６６

【表２６】

１４２－３ｐ ＵＴＲ－００１	ｍｉＲ１４２－３ｐを含む上流ＵＴＲ	ＴＧＡＴＡＡＴＡＧＴＣＣＡＴＡＡＡＧＴＡＧＧ ＡＡＡＣＡＣＴＡＣＡＧＣＴＧＧＡＧＣＣＴＣＧ ＧＴＧＧＣＣＡＴＧＣＴＴＣＴＴＧＣＣＣＣＴＴ ＧＧＧＣＣＴＣＣＣＣＣＣＡＧＣＣＣＣＴＣＣＴ ＣＣＣＣＴＴＣＣＴＧＣＡＣＣＣＧＴＡＣＣＣＣ ＣＧＴＧＧＴＣＴＴＴＧＡＡＴＡＡＡＧＴＣＴＧ ＡＧＴＧＧＧＣＧＧＣ	７２５
１４２－３ｐ ＵＴＲ－００２	ｍｉＲ１４２－３ｐを含む上流ＵＴＲ	ＴＧＡＴＡＡＴＡＧＧＣＴＧＧＡＧＣＣＴＣＧＧ ＴＧＧＣＴＣＣＡＴＡＡＡＧＴＡＧＧＡＡＡＣＡ ＣＴＡＣＡＣＡＴＧＣＴＴＣＴＴＧＣＣＣＣＴＴ ＧＧＧＣＣＴＣＣＣＣＣＣＡＧＣＣＣＣＴＣＣＴ ＣＣＣＣＴＴＣＣＴＧＣＡＣＣＣＧＴＡＣＣＣＣ ＣＧＴＧＧＴＣＴＴＴＧＡＡＴＡＡＡＧＴＣＴＧ ＡＧＴＧＧＧＣＧＧＣ	７２６
１４２－３ｐ ＵＴＲ－００３	ｍｉＲ１４２－３ｐを含む上流ＵＴＲ	ＴＧＡＴＡＡＴＡＧＧＣＴＧＧＡＧＣＣＴＣＧＧ ＴＧＧＣＣＡＴＧＣＴＴＣＴＴＧＣＣＣＣＴＴＣ ＣＡＴＡＡＡＧＴＡＧＧＡＡＡＣＡＣＴＡＣＡＴ ＧＧＧＣＣＴＣＣＣＣＣＣＡＧＣＣＣＣＴＣＣＴ ＣＣＣＣＴＴＣＣＴＧＣＡＣＣＣＧＴＡＣＣＣＣ ＣＧＴＧＧＴＣＴＴＴＧＡＡＴＡＡＡＧＴＣＴＧ ＡＧＴＧＧＧＣＧＧＣ	７２７
１４２－３ｐ ＵＴＲ－００４	ｍｉＲ１４２－３ｐを含む上流ＵＴＲ	ＴＧＡＴＡＡＴＡＧＧＣＴＧＧＡＧＣＣＴＣＧＧ ＴＧＧＣＣＡＴＧＣＴＴＣＴＴＧＣＣＣＣＴＴＧ ＧＧＣＣＴＣＣＣＣＣＣＡＧＴＣＣＡＴＡＡＡＧ ＴＡＧＧＡＡＡＣＡＣＴＡＣＡＣＣＣＣＴＣＣＴ ＣＣＣＣＴＴＣＣＴＧＣＡＣＣＣＧＴＡＣＣＣＣ ＣＧＴＧＧＴＣＴＴＴＧＡＡＴＡＡＡＧＴＣＴＧ ＡＧＴＧＧＧＣＧＧＣ	７２８

【表２７】

１４２－３ｐ ＵＴＲ－００５	ｍｉＲ１４２－３ｐを含む上流ＵＴＲ	ＴＧＡＴＡＡＴＡＧＧＣＴＧＧＡＧＣＣＴＣＧＧ ＴＧＧＣＣＡＴＧＣＴＴＣＴＴＧＣＣＣＣＴＴＧ ＧＧＣＣＴＣＣＣＣＣＣＡＧＣＣＣＣＴＣＣＴＣ ＣＣＣＴＴＣＴＣＣＡＴＡＡＡＧＴＡＧＧＡＡＡ ＣＡＣＴＡＣＡＣＴＧＣＡＣＣＣＧＴＡＣＣＣＣ ＣＧＴＧＧＴＣＴＴＴＧＡＡＴＡＡＡＧＴＣＴＧ ＡＧＴＧＧＧＣＧＧＣ	７２９
１４２－３ｐ ＵＴＲ－００６	ｍｉＲ１４２－３ｐを含む上流ＵＴＲ	ＴＧＡＴＡＡＴＡＧＧＣＴＧＧＡＧＣＣＴＣＧＧ ＴＧＧＣＣＡＴＧＣＴＴＣＴＴＧＣＣＣＣＴＴＧ ＧＧＣＣＴＣＣＣＣＣＣＡＧＣＣＣＣＴＣＣＴＣ ＣＣＣＴＴＣＣＴＧＣＡＣＣＣＧＴＡＣＣＣＣＣ ＴＣＣＡＴＡＡＡＧＴＡＧＧＡＡＡＣＡＣＴＡＣ ＡＧＴＧＧＴＣＴＴＴＧＡＡＴＡＡＡＧＴＣＴＧ ＡＧＴＧＧＧＣＧＧＣ	７３０
１４２－３ｐ ＵＴＲ－００７	ｍｉＲ１４２－３ｐを含む上流ＵＴＲ	ＴＧＡＴＡＡＴＡＧＧＣＴＧＧＡＧＣＣＴＣＧＧ ＴＧＧＣＣＡＴＧＣＴＴＣＴＴＧＣＣＣＣＴＴＧ ＧＧＣＣＴＣＣＣＣＣＣＡＧＣＣＣＣＴＣＣＴＣ ＣＣＣＴＴＣＣＴＧＣＡＣＣＣＧＴＡＣＣＣＣＣ ＧＴＧＧＴＣＴＴＴＧＡＡＴＡＡＡＧＴＴＣＣＡ ＴＡＡＡＧＴＡＧＧＡＡＡＣＡＣＴＡＣＡＣＴＧ ＡＧＴＧＧＧＣＧＧＣ	７３１

【０４００】

具体的な実施形態において、ポリヌクレオチドに有用な５'ＵＴＲは、配列番号２６６を含む。

【０４０１】

本開示の３’－非翻訳領域のリストを表６に示す。Ａ、Ｔ、ＣまたはＧを含む１つ以上のヌクレオチドが末端に付加されているか、除去されている、３'ＵＴＲのバリアントを利用することができる。

表６．３’非翻訳領域

【表２８】

３’ＵＴＲ識別名	名称／説明	配列	配列番号
３ＵＴＲ－００１	クレアチンキナーゼ	ＧＣＧＣＣＴＧＣＣＣＡＣＣＴＧＣＣＡＣＣＧＡＣＴＧＣＴＧＧＡＡＣＣＣＡＧＣＣＡＧＴＧＧＧＡＧＧＧＣＣＴＧＧＣＣＣＡＣＣＡＧＡＧＴＣＣＴＧＣＴＣＣＣＴＣＡＣＴＣＣＴＣＧＣＣＣＣＧＣＣＣＣＣＴＧＴＣＣＣＡＧＡＧＴＣＣＣＡＣＣＴＧＧＧＧＧＧＣＴＣＴＣＴＣＣＡＣＣＣＴＴＣＴＣＡＧＡＧＴＴＣＣＡＧＴＴＴＣＡＡＣＣＡＧＡＧＴＴＣＣＡＡＣＣＡＡＴＧＧＧＣＴＣＣＡＴＣＣＴＣＴＧＧＡＴＴＣＴＧＧＣＣＡＡＴＧＡＡＡＴＡＴＣＴＣＣＣＴＧＧＣＡＧＧＧＴＣＣＴＣＴＴＣＴＴＴＴＣＣＣＡＧＡＧＣＴＣＣＡＣＣＣＣＡＡＣＣＡＧＧＡＧＣＴＣＴＡＧＴＴＡＡＴＧＧＡＧＡＧＣＴＣＣＣＡＧＣＡＣＡＣＴＣＧＧＡＧＣＴＴＧＴＧＣＴＴＴＧＴＣＴＣＣＡＣＧＣＡＡＡＧＣＧＡＴＡＡＡＴＡＡＡＡＧＣＡＴＴＧＧＴＧＧＣＣＴＴＴＧＧＴＣＴＴＴＧＡＡＴＡＡＡＧＣＣＴＧＡＧＴＡＧＧＡＡＧＴＣＴＡＧＡ	２３２

【表２９】

３ＵＴＲ－００２	ミオグロビン	ＧＣＣＣＣＴＧＣＣＧＣＴＣＣＣＡＣＣＣＣＣＡ ＣＣＣＡＴＣＴＧＧＧＣＣＣＣＧＧＧＴＴＣＡＡ ＧＡＧＡＧＡＧＣＧＧＧＧＴＣＴＧＡＴＣＴＣＧ ＴＧＴＡＧＣＣＡＴＡＴＡＧＡＧＴＴＴＧＣＴＴ ＣＴＧＡＧＴＧＴＣＴＧＣＴＴＴＧＴＴＴＡＧＴ ＡＧＡＧＧＴＧＧＧＣＡＧＧＡＧＧＡＧＣＴＧＡ ＧＧＧＧＣＴＧＧＧＧＣＴＧＧＧＧＴＧＴＴＧＡ ＡＧＴＴＧＧＣＴＴＴＧＣＡＴＧＣＣＣＡＧＣＧ ＡＴＧＣＧＣＣＴＣＣＣＴＧＴＧＧＧＡＴＧＴＣ ＡＴＣＡＣＣＣＴＧＧＧＡＡＣＣＧＧＧＡＧＴＧ ＧＣＣＣＴＴＧＧＣＴＣＡＣＴＧＴＧＴＴＣＴＧ ＣＡＴＧＧＴＴＴＧＧＡＴＣＴＧＡＡＴＴＡＡＴ ＴＧＴＣＣＴＴＴＣＴＴＣＴＡＡＡＴＣＣＣＡＡ ＣＣＧＡＡＣＴＴＣＴＴＣＣＡＡＣＣＴＣＣＡＡ ＡＣＴＧＧＣＴＧＴＡＡＣＣＣＣＡＡＡＴＣＣＡ ＡＧＣＣＡＴＴＡＡＣＴＡＣＡＣＣＴＧＡＣＡＧ ＴＡＧＣＡＡＴＴＧＴＣＴＧＡＴＴＡＡＴＣＡＣ ＴＧＧＣＣＣＣＴＴＧＡＡＧＡＣＡＧＣＡＧＡＡ ＴＧＴＣＣＣＴＴＴＧＣＡＡＴＧＡＧＧＡＧＧＡ ＧＡＴＣＴＧＧＧＣＴＧＧＧＣＧＧＧＣＣＡＧＣ ＴＧＧＧＧＡＡＧＣＡＴＴＴＧＡＣＴＡＴＣＴＧ ＧＡＡＣＴＴＧＴＧＴＧＴＧＣＣＴＣＣＴＣＡＧ ＧＴＡＴＧＧＣＡＧＴＧＡＣＴＣＡＣＣＴＧＧＴ ＴＴＴＡＡＴＡＡＡＡＣＡＡＣＣＴＧＣＡＡＣＡ ＴＣＴＣＡＴＧＧＴＣＴＴＴＧＡＡＴＡＡＡＧＣ ＣＴＧＡＧＴＡＧＧＡＡＧＴＣＴＡＧＡ	２３３

10

20

30

40

50

【表３０】

３ＵＴＲ－００３	α－アクチン	ＡＣＡＣＡＣＴＣＣＡＣＣＴＣＣＡＧＣＡＣＧ ＣＧＡＣＴＴＣＴＣＡＧＧＡＣＧＡＣＧＡＡＴ ＣＴＴＣＴＣＡＡＴＧＧＧＧＧＧＧＣＧＧＣＴ ＧＡＧＣＴＣＣＡＧＣＣＡＣＣＣＣＧＣＡＧＴ ＣＡＣＴＴＴＣＴＴＴＧＴＡＡＣＡＡＣＴＴＣ ＣＧＴＴＧＣＴＧＣＣＡＴＣＧＴＡＡＡＣＴＧ ＡＣＡＣＡＧＴＧＴＴＴＡＴＡＡＣＧＴＧＴＡ ＣＡＴＡＣＡＴＴＡＡＣＴＴＡＴＴＡＣＣＴＣ ＡＴＴＴＴＧＴＴＡＴＴＴＴＴＣＧＡＡＡＣＡ ＡＡＧＣＣＣＴＧＴＧＧＡＡＧＡＡＡＡＴＧＧ ＡＡＡＡＣＴＴＧＡＡＧＡＡＧＣＡＴＴＡＡＡ ＧＴＣＡＴＴＣＴＧＴＴＡＡＧＣＴＧＣＧＴＡ ＡＡＴＧＧＴＣＴＴＴＧＡＡＴＡＡＡＧＣＣＴ ＧＡＧＴＡＧＧＡＡＧＴＣＴＡＧＡ	２３４
３ＵＴＲ－００４	アルブミン	ＣＡＴＣＡＣＡＴＴＴＡＡＡＡＧＣＡＴＣＴＣ ＡＧＣＣＴＡＣＣＡＴＧＡＧＡＡＴＡＡＧＡＧ ＡＡＡＧＡＡＡＡＴＧＡＡＧＡＴＣＡＡＡＡＧ ＣＴＴＡＴＴＣＡＴＣＴＧＴＴＴＴＴＣＴＴＴ ＴＴＣＧＴＴＧＧＴＧＴＡＡＡＧＣＣＡＡＣＡ ＣＣＣＴＧＴＣＴＡＡＡＡＡＡＡＣＡＴＡＡＡＴ ＴＴＣＴＴＴＡＡＴＣＡＴＴＴＴＧＣＣＴＣＴ ＴＴＴＣＴＣＴＧＴＧＣＴＴＣＡＡＴＴＡＡＴ ＡＡＡＡＡＡＴＧＧＡＡＡＧＡＡＴＣＴＡＡＴ ＡＧＡＧＴＧＧＴＡＣＡＧＣＡＣＴＧＴＴＡＴ ＴＴＴＴＣＡＡＡＧＡＴＧＴＧＴＴＧＣＴＡＴ ＣＣＴＧＡＡＡＡＴＴＣＴＧＴＡＧＧＴＴＣＴ ＧＴＧＧＡＡＧＴＴＣＣＡＧＴＧＴＴＣＴＣＴ ＣＴＴＡＴＴＣＣＡＣＴＴＣＧＧＴＡＧＡＧＧ ＡＴＴＴＣＴＡＧＴＴＴＣＴＴＧＴＧＧＧＣＴ ＡＡＴＴＡＡＡＴＡＡＡＴＣＡＴＴＡＡＴＡＣ ＴＣＴＴＣＴＡＡＴＧＧＴＣＴＴＴＧＡＡＴＡ ＡＡＧＣＣＴＧＡＧＴＡＧＧＡＡＧＴＣＴＡＧ Ａ	２３５

【表３１】

３ＵＴＲ－００５	α－グロビン	ＧＣＴＧＣＣＴＴＣＴＧＣＧＧＧＧＣＴＴＧＣＣ ＴＴＣＴＧＧＣＣＡＴＧＣＣＣＴＴＣＴＴＣＴＣ ＴＣＣＣＴＴＧＣＡＣＣＴＧＴＡＣＣＴＣＴＴＧ ＧＴＣＴＴＴＧＡＡＴＡＡＡＧＣＣＴＧＡＧＴＡ ＧＧＡＡＧＧＣＧＧＣＣＧＣＴＣＧＡＧＣＡＴＧ ＣＡＴＣＴＡＧＡ	２３６

【表３２】

３ＵＴＲ－００６	Ｇ－ＣＳＦ	ＧＣＣＡＡＧＣＣＣＴＣＣＣＣＡＴＣＣＣＡＴＧＴ ＡＴＴＴＡＴＣＴＣＴＡＴＴＴＡＡＴＡＴＴＴＡＴ ＧＴＣＴＡＴＴＴＡＡＧＣＣＴＣＡＴＡＴＴＴＡＡ ＡＧＡＣＡＧＧＧＡＡＧＡＧＣＡＧＡＡＣＧＧＡＧ ＣＣＣＣＡＧＧＣＣＴＣＴＧＴＧＴＣＣＴＴＣＣＣ ＴＧＣＡＴＴＴＣＴＧＡＧＴＴＴＣＡＴＴＣＴＣＣ ＴＧＣＣＴＧＴＡＧＣＡＧＴＧＡＧＡＡＡＡＡＧＣ ＴＣＣＴＧＴＣＣＴＣＣＣＡＴＣＣＣＣＴＧＧＡＣ ＴＧＧＧＡＧＧＴＡＧＡＴＡＧＧＴＡＡＡＴＡＣＣ ＡＡＧＴＡＴＴＴＡＴＴＡＣＴＡＴＧＡＣＴＧＣＴ ＣＣＣＣＡＧＣＣＣＴＧＧＣＴＣＴＧＣＡＡＴＧＧ ＧＣＡＣＴＧＧＧＡＴＧＡＧＣＣＧＣＴＧＴＧＡＧ ＣＣＣＣＴＧＧＴＣＣＴＧＡＧＧＧＴＣＣＣＣＡＣ ＣＴＧＧＧＡＣＣＣＴＴＧＡＧＡＧＴＡＴＣＡＧＧ ＴＣＴＣＣＣＡＣＧＴＧＧＧＡＧＡＣＡＡＧＡＡＡ ＴＣＣＣＴＧＴＴＴＡＡＴＡＴＴＴＡＡＡＣＡＧＣ ＡＧＴＧＴＴＣＣＣＣＡＴＣＴＧＧＧＴＣＣＴＴＧ ＣＡＣＣＣＣＴＣＡＣＴＣＴＧＧＣＣＴＣＡＧＣＣ ＧＡＣＴＧＣＡＣＡＧＣＧＧＣＣＣＣＴＧＣＡＴＣ ＣＣＣＴＴＧＧＣＴＧＴＧＡＧＧＣＣＣＣＴＧＧＡ ＣＡＡＧＣＡＧＡＧＧＴＧＧＣＣＡＧＡＧＣＴＧＧ ＧＡＧＧＣＡＴＧＧＣＣＣＴＧＧＧＧＴＣＣＣＡＣ ＧＡＡＴＴＴＧＣＴＧＧＧＧＡＡＴＣＴＣＧＴＴＴ ＴＴＣＴＴＣＴＴＡＡＧＡＣＴＴＴＴＧＧＧＡＣＡ ＴＧＧＴＴＴＧＡＣＴＣＣＣＧＡＡＣＡＴＣＡＣＣ ＧＡＣＧＣＧＴＣＴＣＣＴＧＴＴＴＴＴＣＴＧＧＧ ＴＧＧＣＣＴＣＧＧＧＡＣＡＣＣＴＧＣＣＣＴＧＣ ＣＣＣＣＡＣＧＡＧＧＧＴＣＡＧＧＡＣＴＧＴＧＡ ＣＴＣＴＴＴＴＴＡＧＧＧＣＣＡＧＧＣＡＧＧＴＧ ＣＣＴＧＧＡＣＡＴＴＴＧＣＣＴＴＧＣＴＧＧＡＣ ＧＧＧＧＡＣＴＧＧＧＧＡＴＧＴＧＧＧＡＧＧＧＡ ＧＣＡＧＡＣＡＧＧＡＧＧＡＡＴＣＡＴＧＴＣＡＧ ＧＣＣＴＧＴＧＴＧＴＧＡＡＡＧＧＡＡＧＣＴＣＣ ＡＣＴＧＴＣＡＣＣＣＴＣＣＡＣＣＴＣＴＴＣＡＣ ＣＣＣＣＣＡＣＴＣＡＣＣＡＧＴＧＴＣＣＣＣＴＣ ＣＡＣＴＧＴＣＡＣＡＴＴＧＴＡＡＣＴＧＡＡＣＴ ＴＣＡＧＧＡＴＡＡＴＡＡＡＧＴＧＴＴＴＧＣＣＴ ＣＣＡＴＧＧＴＣＴＴＴＧＡＡＴＡＡＡＧＣＣＴＧ ＡＧＴＡＧＧＡＡＧＧＣＧＧＣＣＧＣＴＣＧＡＧＣ ＡＴＧＣＡＴＣＴＡＧＡ	２３７

【表３３】

３ＵＴＲ－００７	Ｃｏｌ１ａ２、Ｉ型コラーゲンα２	ＡＣＴＣＡＡＴＣＴＡＡＡＴＴＡＡＡＡＡＡＧＡ ＡＡＧＡＡＡＴＴＴＧＡＡＡＡＡＡＣＴＴＴＣＴ ＣＴＴＴＧＣＣＡＴＴＴＣＴＴＣＴＴＣＴＴＣＴ ＴＴＴＴＴＡＡＣＴＧＡＡＡＧＣＴＧＡＡＴＣＣ ＴＴＣＣＡＴＴＴＣＴＴＣＴＧＣＡＣＡＴＣＴＡ ＣＴＴＧＣＴＴＡＡＡＴＴＧＴＧＧＧＣＡＡＡＡ ＧＡＧＡＡＡＡＡＧＡＡＧＧＡＴＴＧＡＴＣＡＧ ＡＧＣＡＴＴＧＴＧＣＡＡＴＡＣＡＧＴＴＴＣＡ ＴＴＡＡＣＴＣＣＴＴＣＣＣＣＣＧＣＴＣＣＣＣ ＣＡＡＡＡＡＴＴＴＧＡＡＴＴＴＴＴＴＴＴＴＣ ＡＡＣＡＣＴＣＴＴＡＣＡＣＣＴＧＴＴＡＴＧＧ ＡＡＡＡＴＧＴＣＡＡＣＣＴＴＴＧＴＡＡＧＡＡ ＡＡＣＣＡＡＡＡＴＡＡＡＡＡＴＴＧＡＡＡＡＡ ＴＡＡＡＡＡＣＣＡＴＡＡＡＣＡＴＴＴＧＣＡＣ ＣＡＣＴＴＧＴＧＧＣＴＴＴＴＧＡＡＴＡＴＣＴ ＴＣＣＡＣＡＧＡＧＧＧＡＡＧＴＴＴＡＡＡＡＣ ＣＣＡＡＡＣＴＴＣＣＡＡＡＧＧＴＴＴＡＡＡＣ ＴＡＣＣＴＣＡＡＡＡＣＡＣＴＴＴＣＣＣＡＴＧ ＡＧＴＧＴＧＡＴＣＣＡＣＡＴＴＧＴＴＡＧＧＴ ＧＣＴＧＡＣＣＴＡＧＡＣＡＧＡＧＡＴＧＡＡＣ ＴＧＡＧＧＴＣＣＴＴＧＴＴＴＴＧＴＴＴＴＧＴ ＴＣＡＴＡＡＴＡＣＡＡＡＧＧＴＧＣＴＡＡＴＴ ＡＡＴＡＧＴＡＴＴＴＣＡＧＡＴＡＣＴＴＧＡＡ ＧＡＡＴＧＴＴＧＡＴＧＧＴＧＣＴＡＧＡＡＧＡ ＡＴＴＴＧＡＧＡＡＧＡＡＡＴＡＣＴＣＣＴＧＴ ＡＴＴＧＡＧＴＴＧＴＡＴＣＧＴＧＴＧＧＴＧＴ ＡＴＴＴＴＴＴＡＡＡＡＡＡＴＴＴＧＡＴＴＴＡ ＧＣＡＴＴＣＡＴＡＴＴＴＴＣＣＡＴＣＴＴＡＴ ＴＣＣＣＡＡＴＴＡＡＡＡＧＴＡＴＧＣＡＧＡＴ ＴＡＴＴＴＧＣＣＣＡＡＡＴＣＴＴＣＴＴＣＡＧ ＡＴＴＣＡＧＣＡＴＴＴＧＴＴＣＴＴＴＧＣＣＡ ＧＴＣＴＣＡＴＴＴＴＣＡＴＣＴＴＣＴＴＣＣＡ ＴＧＧＴＴＣＣＡＣＡＧＡＡＧＣＴＴＴＧＴＴＴ ＣＴＴＧＧＧＣＡＡＧＣＡＧＡＡＡＡＡＴＴＡＡ ＡＴＴＧＴＡＣＣＴＡＴＴＴＴＧＴＡＴＡＴＧＴ ＧＡＧＡＴＧＴＴＴＡＡＡＴＡＡＡＴＴＧＴＧＡ ＡＡＡＡＡＡＴＧＡＡＡＴＡＡＡＧＣＡＴＧＴＴ ＴＧＧＴＴＴＴＣＣＡＡＡＡＧＡＡＣＡＴＡＴ	２３８

10 20 30 40 50

【表３４】

３ＵＴＲ－００８	Ｃｏｌ６ａ２、ＶＩ型コラーゲンα２	ＣＧＣＣＧＣＣＧＣＣＣＧＧＧＣＣＣＣＧＣＡＧ ＴＣＧＡＧＧＧＴＣＧＴＧＡＧＣＣＣＡＣＣＣＣ ＧＴＣＣＡＴＧＧＴＧＣＴＡＡＧＣＧＧＧＣＣＣ ＧＧＧＴＣＣＣＡＣＡＣＧＧＣＣＡＧＣＡＣＣＧ ＣＴＧＣＴＣＡＣＴＣＧＧＡＣＧＡＣＧＣＣＣＴ ＧＧＧＣＣＴＧＣＡＣＣＴＣＴＣＣＡＧＣＴＣＣ ＴＣＣＣＡＣＧＧＧＧＴＣＣＣＣＧＴＡＧＣＣＣ ＣＧＧＣＣＣＣＣＧＣＣＣＡＧＣＣＣＣＡＧＧＴ ＣＴＣＣＣＣＡＧＧＣＣＣＴＣＣＧＣＡＧＧＣＴ ＧＣＣＣＧＧＣＣＴＣＣＣＴＣＣＣＣＣＴＧＣＡ ＧＣＣＡＴＣＣＣＡＡＧＧＣＴＣＣＴＧＡＣＣＴ ＡＣＣＴＧＧＣＣＣＣＴＧＡＧＣＴＣＴＧＧＡＧ ＣＡＡＧＣＣＣＴＧＡＣＣＣＡＡＴＡＡＡＧＧＣ ＴＴＴＧＡＡＣＣＣＡＴ	２３９

【表３５】

３ＵＴＲ－００９	ＲＰＮ１、リボフォリンＩ	ＧＧＧＧＣＴＡＧＡＧＣＣＣＴＣＴＣＣＧＣＡＣ ＡＧＣＧＴＧＧＡＧＡＣＧＧＧＧＣＡＡＧＧＡＧ ＧＧＧＧＧＴＴＡＴＴＡＧＧＡＴＴＧＧＴＧＧＴ ＴＴＴＧＴＴＴＴＧＣＴＴＴＧＴＴＴＡＡＡＧＣ ＣＧＴＧＧＧＡＡＡＡＴＧＧＣＡＣＡＡＣＴＴＴ ＡＣＣＴＣＴＧＴＧＧＧＡＧＡＴＧＣＡＡＣＡＣ ＴＧＡＧＡＧＣＣＡＡＧＧＧＧＴＧＧＧＡＧＴＴ ＧＧＧＡＴＡＡＴＴＴＴＴＡＴＡＴＡＡＡＡＧＡ ＡＧＴＴＴＴＴＣＣＡＣＴＴＴＧＡＡＴＴＧＣＴ ＡＡＡＡＧＴＧＧＣＡＴＴＴＴＴＣＣＴＡＴＧＴ ＧＣＡＧＴＣＡＣＴＣＣＴＣＴＣＡＴＴＴＣＴＡ ＡＡＡＴＡＧＧＧＡＣＧＴＧＧＣＣＡＧＧＣＡＣ ＧＧＴＧＧＣＴＣＡＴＧＣＣＴＧＴＡＡＴＣＣＣ ＡＧＣＡＣＴＴＴＧＧＧＡＧＧＣＣＧＡＧＧＣＡ ＧＧＣＧＧＣＴＣＡＣＧＡＧＧＴＣＡＧＧＡＧＡ ＴＣＧＡＧＡＣＴＡＴＣＣＴＧＧＣＴＡＡＣＡＣ ＧＧＴＡＡＡＡＣＣＣＴＧＴＣＴＣＴＡＣＴＡＡ ＡＡＧＴＡＣＡＡＡＡＡＡＴＴＡＧＣＴＧＧＧＣ ＧＴＧＧＴＧＧＴＧＧＧＣＡＣＣＴＧＴＡＧＴＣ ＣＣＡＧＣＴＡＣＴＣＧＧＧＡＧＧＣＴＧＡＧＧ ＣＡＧＧＡＧＡＡＡＧＧＣＡＴＧＡＡＴＣＣＡＡ ＧＡＧＧＣＡＧＡＧＣＴＴＧＣＡＧＴＧＡＧＣＴ ＧＡＧＡＴＣＡＣＧＣＣＡＴＴＧＣＡＣＴＣＣＡ ＧＣＣＴＧＧＧＣＡＡＣＡＧＴＧＴＴＡＡＧＡＣ ＴＣＴＧＴＣＴＣＡＡＡＴＡＴＡＡＡＴＡＡＡＴ ＡＡＡＴＡＡＡＴＡＡＡＴＡＡＡＴＡＡＡＴＡＡ ＡＴＡＡＡＡＡＴＡＡＡＧＣＧＡＧＡＴＧＴＴＧ ＣＣＣＴＣＡＡＡ	２４０

【表３６】

３ＵＴＲ－０１０	ＬＲＰ１、低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質１	ＧＧＣＣＣＴＧＣＣＣＣＧＴＣＧＧＡＣＴＧＣＣ ＣＣＣＡＧＡＡＡＧＣＣＴＣＣＴＧＣＣＣＣＣＴ ＧＣＣＡＧＴＧＡＡＧＴＣＣＴＴＣＡＧＴＧＡＧ ＣＣＣＣＴＣＣＣＣＡＧＣＣＡＧＣＣＣＴＴＣＣ ＣＴＧＧＣＣＣＣＧＣＣＧＧＡＴＧＴＡＴＡＡＡ ＴＧＴＡＡＡＡＡＴＧＡＡＧＧＡＡＴＴＡＣＡＴ ＴＴＴＡＴＡＴＧＴＧＡＧＣＧＡＧＣＡＡＧＣＣ ＧＧＣＡＡＧＣＧＡＧＣＡＣＡＧＴＡＴＴＡＴＴ ＴＣＴＣＣＡＴＣＣＣＣＴＣＣＣＴＧＣＣＴＧＣ ＴＣＣＴＴＧＧＣＡＣＣＣＣＣＡＴＧＣＴＧＣＣ ＴＴＣＡＧＧＧＡＧＡＣＡＧＧＣＡＧＧＧＡＧＧ ＧＣＴＴＧＧＧＧＣＴＧＣＡＣＣＴＣＣＴＡＣＣ ＣＴＣＣＣＡＣＣＡＧＡＡＣＧＣＡＣＣＣＣＡＣ ＴＧＧＧＡＧＡＧＣＴＧＧＴＧＧＴＧＣＡＧＣＣ ＴＴＣＣＣＣＴＣＣＣＴＧＴＡＴＡＡＧＡＣＡＣ ＴＴＴＧＣＣＡＡＧＧＣＴＣＴＣＣＣＣＴＣＴＣ ＧＣＣＣＣＡＴＣＣＣＴＧＣＴＴＧＣＣＣＧＣＴ ＣＣＣＡＣＡＧＣＴＴＣＣＴＧＡＧＧＧＣＴＡＡ ＴＴＣＴＧＧＧＡＡＧＧＧＡＧＡＧＴＴＣＴＴＴ ＧＣＴＧＣＣＣＣＴＧＴＣＴＧＧＡＡＧＡＣＧＴ ＧＧＣＴＣＴＧＧＧＴＧＡＧＧＴＡＧＧＣＧＧＧ ＡＡＡＧＧＡＴＧＧＡＧＴＧＴＴＴＴＡＧＴＴＣ ＴＴＧＧＧＧＧＡＧＧＣＣＡＣＣＣＣＡＡＡＣＣ ＣＣＡＧＣＣＣＣＡＡＣＴＣＣＡＧＧＧＧＣＡＣ ＣＴＡＴＧＡＧＡＴＧＧＣＣＡＴＧＣＴＣＡＡＣ ＣＣＣＣＣＴＣＣＣＡＧＡＣＡＧＧＣＣＣＴＣＣ ＣＴＧＴＣＴＣＣＡＧＧＧＣＣＣＣＣＡＣＣＧＡ ＧＧＴＴＣＣＣＡＧＧＧＣＴＧＧＡＧＡＣＴＴＣ ＣＴＣＴＧＧＴＡＡＡＣＡＴＴＣＣＴＣＣＡＧＣ ＣＴＣＣＣＣＴＣＣＣＣＴＧＧＧＧＡＣＧＣＣＡ ＡＧＧＡＧＧＴＧＧＧＣＣＡＣＡＣＣＣＡＧＧＡ ＡＧＧＧＡＡＡＧＣＧＧＧＣＡＧＣＣＣＣＧＴＴ ＴＴＧＧＧＧＡＣＧＴＧＡＡＣＧＴＴＴＴＡＡＴ ＡＡＴＴＴＴＴＧＣＴＧＡＡＴＴＣＣＴＴＴＡＣ ＡＡＣＴＡＡＡＴＡＡＣＡＣＡＧＡＴＡＴＴＧＴ ＴＡＴＡＡＡＴＡＡＡＡＴＴＧＴ	２４１

【表３７】

３ＵＴＲ－０１１	Ｎｎｔ１、カルジオトロフィン様サイトカイン因子１	ＡＴＡＴＴＡＡＧＧＡＴＣＡＡＧＣＴＧＴＴＡＧ ＣＴＡＡＴＡＡＴＧＣＣＡＣＣＴＣＴＧＣＡＧＴ ＴＴＴＧＧＧＡＡＣＡＧＧＣＡＡＡＴＡＡＡＧＴ ＡＴＣＡＧＴＡＴＡＣＡＴＧＧＴＧＡＴＧＴＡＣ ＡＴＣＴＧＴＡＧＣＡＡＡＧＣＴＣＴＴＧＧＡＧ ＡＡＡＡＴＧＡＡＧＡＣＴＧＡＡＧＡＡＡＧＣＡ ＡＡＧＣＡＡＡＡＡＣＴＧＴＡＴＡＧＡＧＡＧＡ ＴＴＴＴＴＣＡＡＡＡＧＣＡＧＴＡＡＴＣＣＣＴ ＣＡＡＴＴＴＴＡＡＡＡＡＡＧＧＡＴＴＧＡＡＡ ＡＴＴＣＴＡＡＡＴＧＴＣＴＴＴＣＴＧＴＧＣＡ ＴＡＴＴＴＴＴＴＴＧＴＧＴＴＡＧＧＡＡＴＣＡＡ ＡＡＧＴＡＴＴＴＴＡＴＡＡＡＡＧＧＡＧＡＡＡ ＧＡＡＣＡＧＣＣＴＣＡＴＴＴＴＡＧＡＴＧＴＡ ＧＴＣＣＴＧＴＴＧＧＡＴＴＴＴＴＴＡＴＧＣＣ ＴＣＣＴＣＡＧＴＡＡＣＣＡＧＡＡＡＴＧＴＴＴ ＴＡＡＡＡＡＡＣＴＡＡＧＴＧＴＴＴＡＧＧＡＴ ＴＴＣＡＡＧＡＣＡＡＣＡＴＴＡＴＡＣＡＴＧＧ ＣＴＣＴＧＡＡＡＴＡＴＣＴＧＡＣＡＣＡＡＴＧ ＴＡＡＡＣＡＴＴＧＣＡＧＧＣＡＣＣＴＧＣＡＴ ＴＴＴＡＴＧＴＴＴＴＴＴＴＴＴＴＣＡＡＣＡＡ ＡＴＧＴＧＡＣＴＡＡＴＴＴＧＡＡＡＣＴＴＴＴ ＡＴＧＡＡＣＴＴＣＴＧＡＧＣＴＧＴＣＣＣＣＴ ＴＧＣＡＡＴＴＣＡＡＣＣＧＣＡＧＴＴＴＧＡＡ ＴＴＡＡＴＣＡＴＡＴＣＡＡＡＴＣＡＧＴＴＴＴ ＡＡＴＴＴＴＴＴＡＡＡＴＴＧＴＡＣＴＴＣＡＧ ＡＧＴＣＴＡＴＡＴＴＴＣＡＡＧＧＧＣＡＣＡＴ ＴＴＴＣＴＣＡＣＴＡＣＴＡＴＴＴＴＡＡＴＡＣ ＡＴＴＡＡＡＧＧＡＣＴＡＡＡＴＡＡＴＣＴＴＴ ＣＡＧＡＧＡＴＧＣＴＧＧＡＡＡＣＡＡＡＴＣＡ ＴＴＴＧＣＴＴＴＡＴＡＴＧＴＴＴＣＡＴＴＡＧ ＡＡＴＡＣＣＡＡＴＧＡＡＡＣＡＴＡＣＡＡＣＴ ＴＧＡＡＡＡＴＴＡＧＴ	２４２

10

20

30

40

50

【表３８】

		AATAGTATTTTTGAAGATCCCA TTTCTAATTGGAGATCTCTTTA ATTTCGATCAACTTATAATGTG TAGTACTATATTAAGTGCACTT GAGTGGAATTCAACATTTGACT AATAAAATGAGTTCATCATGTT GGCAAGTGATGTGGCAATTATC TCTGGTGACAAAAGAGTAAAAT CAAATATTTCTGCCTGTTACAA ATATCAAGGAAGACCTGCTACT ATGAAATAGATGACATTAATCT GTCTTCACTGTTTATAATACGG ATGGATTTTTTTTCAAATCAGT GTGTGTTTTGAGGTCTTATGTA ATTGATGACATTTGAGAGAAAT GGTGGCTTTTTTTAGCTACCTC TTTGTTCATTTAAGCACCAGTA AAGATCATGTCTTTTTATAGAA GTGTAGATTTTCTTTGTGACTT TGCTATCGTGCCTAAAGCTCTA AATATAGGTGAATGTGTGATGA ATACTCAGATTATTTGTCTCTC TATATAATTAGTTTGGTACTAA GTTTCTCAAAAAATTATTAACA CATGAAAGACAATCTCTAAACC AGAAAAAGAAGTAGTACAAATT TTGTTACTGTAATGCTCGCGTT TAGTGAGTTTAAAACACACAGT ATCTTTTGGTTTTATAATCAGT TTCTATTTTGCTGTGCCTGAGA TTAAGATCTGTGTATGTGTGTG TGTGTGTGTGT	

10

20

30

40

50

【表３９】

		GCGTTTGTGTGTTAAAGCAGAA AAGACTTTTTTAAAAGTTTTAA GTGATAAATGCAATTTGTTAAT TGATCTTAGATCACTAGTAAAC TCAGGGCTGAATTATACCATGT ATATTCTATTAGAAGAAAGTAA ACACCATCTTTATTCCTGCCCT TTTTCTTCTCTCAAAGTAGTTG TAGTTATATCTAGAAAGAAGCA ATTTTGATTTCTTGAAAAGGTA GTTCCTGCACTCAGTTTAAACT AAAAATAATCATACTTGGATTT TATTTATTTTTGTCATAGTAAA AATTTTAATTTATATATATTTT TATTTAGTATTATCTTATTCTT TGCTATTTGCCAATCCTTTGTC ATCAATTGTGTTAAATGAATTG AAAATTCATGCCCTGTTCATTT TATTTTACTTTATTGGTTAGGA TATTTAAAGGATTTTTGTATAT ATAATTTCTTAAATTAATATTC CAAAAGGTTAGTGGACTTAGAT TATAAATTATGGCAAAAATCTA AAAACAACAAAAATGATTTTTA TACATTCTATTTCATTATTCCT CTTTTTCCAATAAGTCATACAA TTGGTAGATATGACTTATTTTA TTTTTGTATTATTCACTATATC TTTATGATATTTAAGTATAAAT AATTAAAAAAATTTATTGTACC TTATAGTCTGTCACCAAAAAAA AAAAATTATCT	

10

20

30

40

50

【表４０】

		GTAGGTAGTGAAATGCTAATGT TGATTTGTCTTTAAGGGCTTGT TAACTATCCTTTATTTTCTCAT TTGTCTTAAATTAGGAGTTTGT GTTTAAATTACTCATCTAAGCA AAAAATGTATATAAATCCCATT ACTGGGTATATACCCAAAGGAT TATAAATCATGCTGCTATAAAG ACACATGCACACGTATGTTTAT TGCAGCACTATTCACAATAGCA AAGACTTGGAACCAACCCAAAT GTCCATCAATGATAGACTTGAT TAAGAAAATGTGCACATATACA CCATGGAATACTATGCAGCCAT AAAAAAGGATGAGTTCATGTCC TTTGTAGGGACATGGATAAAGC TGGAAACCATCATTCTGAGCAA ACTATTGCAAGGACAGAAAACC AAACACTGCATGTTCTCACTCA TAGGTGGGAATTGAACAATGAG AACACTTGGACACAAGGTGGGG AACACCACACACCAGGGCCTGT CATGGGGTGGGGGGAGTGGGGA GGGATAGCATTAGGAGATATAC CTAATGTAAATGATGAGTTAAT GGGTGCAGCACACCAACATGGC ACATGTATACATATGTAGCAAA CCTGCACGTTGTGCACATGTAC CCTAGAACTTAAAGTATAATTA AAAAAAAAAAGAAAACAGAAGC TATTTATAAAGAAGTTATTTGC TGAAATAAATGTGATCTTTCCC ATTAAAAAAATAAAGAAATTTT GGGGTAAAA	

【表４１】

		AAACACAATATATTGTATTCTT GAAAAATTCTAAGAGAGTGGAT GTGAAGTGTTCTCACCACAAAA GTGATAACTAATTGAGGTAATG CACATATTAATTAGAAAGATTT TGTCATTCCACAATGTATATAT ACTTAAAAATATGTTATACACA ATAAATACATACATTAAAAAAT AAGTAAATGTA	

【表４２】

３ＵＴＲ－０１２	Ｃｏｌ６ａ１、ＶＩ型コラーゲンα１	CCCACCCTGCACGCCGGCACCA AACCCTGTCCTCCCACCCCTCC CCACTCATCACTAAACAGAGTA AAATGTGATGCGAATTTTCCCG ACCAACCTGATTCGCTAGATTT TTTTTAAGGAAAAGCTTGGAAA GCCAGGACACAACGCTGCTGCC TGCTTTGTGCAGGGTCCTCCGG GGCTCAGCCCTGAGTTGGCATC ACCTGCGCAGGGCCCTCTGGGG CTCAGCCCTGAGCTAGTGTCAC CTGCACAGGGCCCTCTGAGGCT CAGCCCTGAGCTGGCGTCACCT GTGCAGGGCCCTCTGGGGCTCA GCCCTGAGCTGGCCTCACCTGG GTTCCCCACCCCGGGCTCTCCT GCCCTGCCCTCCTGCCCGCCCT CCCTCCTGCCTGCGCAGCTCCT TCCCTAGGCACCTCTGTGCTGC ATCCCACCAGCCTGAGCAAGAC GCCCTCTCGGGGCCTGTGCCGC ACTAGCCTCCCTCTCCTCTGTC CCCATAGCTGGTTTTTCCCACC AATCCTCACCTAACAGTTACTT TACAATTAAACTCAAAGC	２４３

【表４３】

		AAGCTCTTCTCCTCAGCTTGGG GCAGCCATTGGCCTCTGTCTCG TTTTGGGAAACCAAGGTCAGGA GGCCGTTGCAGACATAAATCTC GGCGACTCGGCCCCGTCTCCTG AGGGTCCTGCTGGTGACCGGCC TGGACCTTGGCCCTACAGCCCT GGAGGCCGCTGCTGACCAGCAC TGACCCCGACCTCAGAGAGTAC TCGCAGGGGCGCTGGCTGCACT CAAGACCCTCGAGATTAACGGT GCTAACCCCGTCTGCTCCTCCC TCCCGCAGAGACTGGGGCCTGG ACTGGACATGAGAGCCCCTTGG TGCCACAGAGGGCTGTGTCTTA CTAGAAACAACGCAAACCTCTC CTTCCTCAGAATAGTGATGTGT TCGACGTTTTATCAAAGGCCCC CTTTCTATGTTCATGTTAGTTT TGCTCCTTCTGTGTTTTTTTCT GAACCATATCCATGTTGCTGAC TTTTCCAAATAAAGGTTTTCAC TCCTCTC	

【表４４】

３ＵＴＲ－０１３	Ｃａｌｒ、カルレチクリン	ＡＧＡＧＧＣＣＴＧＣＣＴＣＣＡＧＧＧＣＴＧＧ ＡＣＴＧＡＧＧＣＣＴＧＡＧＣＧＣＴＣＣＴＧＣ ＣＧＣＡＧＡＧＣＴＧＧＣＣＧＣＧＣＣＡＡＡＴ ＡＡＴＧＴＣＴＣＴＧＴＧＡＧＡＣＴＣＧＡＧＡ ＡＣＴＴＴＣＡＴＴＴＴＴＴＴＣＣＡＧＧＣＴＧ ＧＴＴＣＧＧＡＴＴＴＧＧＧＧＴＧＧＡＴＴＴＴ ＧＧＴＴＴＴＧＴＴＣＣＣＣＴＣＣＴＣＣＡＣＴ ＣＴＣＣＣＣＣＡＣＣＣＣＣＴＣＣＣＣＧＣＣＣ ＴＴＴＴＴＴＴＴＴＴＴＴＴＴＴＴＴＴＴＡＡＡＣ ＴＧＧＴＡＴＴＴＴＡＴＣＴＴＴＧＡＴＴＣＴＣ ＣＴＴＣＡＧＣＣＣＴＣＡＣＣＣＣＴＧＧＴＴＣ ＴＣＡＴＣＴＴＴＣＴＴＧＡＴＣＡＡＣＡＴＣＴ ＴＴＴＣＴＴＧＣＣＴＣＴＧＴＣＣＣＣＴＴＣＴ ＣＴＣＡＴＣＴＣＴＴＡＧＣＴＣＣＣＣＴＣＣＡ ＡＣＣＴＧＧＧＧＧＧＣＡＧＴＧＧＴＧＴＧＧＡ ＧＡＡＧＣＣＡＣＡＧＧＣＣＴＧＡＧＡＴＴＴＣ ＡＴＣＴＧＣＴＣＴＣＣＴＴＣＣＴＧＧＡＧＣＣ ＣＡＧＡＧＧＡＧＧＧＣＡＧＣＡＧＡＡＧＧＧＧ ＧＴＧＧＴＧＴＣＴＣＣＡＡＣＣＣＣＣＣＡＧＣ ＡＣＴＧＡＧＧＡＡＧＡＡＣＧＧＧＧＣＴＣＴＴ ＣＴＣＡＴＴＴＣＡＣＣＣＣＴＣＣＣＴＴＴＣＴ ＣＣＣＣＴＧＣＣＣＣＣＡＧＧＡＣＴＧＧＧＣＣ ＡＣＴＴＣＴＧＧＧＴＧＧＧＧＣＡＧＴＧＧＧＴ ＣＣＣＡＧＡＴＴＧＧＣＴＣＡＣＡＣＴＧＡＧＡ ＡＴＧＴＡＡＧＡＡＣＴＡＣＡＡＡＣＡＡＡＡＴ ＴＴＣＴＡＴＴＡＡＡＴＴＡＡＡＴＴＴＴＧＴＧ ＴＣＴＣＣ	２４４

10

20

30

40

50

【表４５】

３ＵＴＲ－０１４	Ｃｏｌ１ａ１、Ｉ型コラーゲンα１	ＣＴＣＣＣＴＣＣＡＴＣＣＣＡＡＣＣＴＧＧＣＴ ＣＣＣＴＣＣＣＡＣＣＣＡＡＣＣＡＡＣＴＴＴＣ ＣＣＣＣＣＡＡＣＣＣＧＧＡＡＡＣＡＧＡＣＡＡ ＧＣＡＡＣＣＣＡＡＡＣＴＧＡＡＣＣＣＣＣＴＣ ＡＡＡＡＧＣＣＡＡＡＡＡＡＴＧＧＧＡＧＡＣＡ ＡＴＴＴＣＡＣＡＴＧＧＡＣＴＴＴＧＧＡＡＡＡ ＴＡＴＴＴＴＴＴＴＣＣＴＴＴＧＣＡＴＴＣＡＴ ＣＴＣＴＣＡＡＡＣＴＴＡＧＴＴＴＴＴＡＴＣＴ ＴＴＧＡＣＣＡＡＣＣＧＡＡＣＡＴＧＡＣＣＡＡ ＡＡＡＣＣＡＡＡＡＧＴＧＣＡＴＴＣＡＡＣＣＴ ＴＡＣＣＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡ ＡＧＡＡＴＡＡＡＴＡＡＡＴＡＡＣＴＴＴＴＴＡ ＡＡＡＡＡＧＧＡＡＧＣＴＴＧＧＴＣＣＡＣＴＴ ＧＣＴＴＧＡＡＧＡＣＣＣＡＴＧＣＧＧＧＧＧＴ ＡＡＧＴＣＣＣＴＴＴＣＴＧＣＣＣＧＴＴＧＧＧ ＣＴＴＡＴＧＡＡＡＣＣＣＣＡＡＴＧＣＴＧＣＣ ＣＴＴＴＣＴＧＣＴＣＣＴＴＴＣＴＣＣＡＣＡＣ ＣＣＣＣＣＴＴＧＧＧＧＣＣＴＣＣＣＣＴＣＣＡ ＣＴＣＣＴＴＣＣＣＡＡＡＴＣＴＧＴＣＴＣＣＣ ＣＡＧＡＡＧＡＣＡＣＡＧＧＡＡＡＣＡＡＴＧＴ ＡＴＴＧＴＣＴＧＣＣＣＡＧＣＡＡＴＣＡＡＡＧ ＧＣＡＡＴＧＣＴＣＡＡＡＣＡＣＣＣＡＡＧＴＧ ＧＣＣＣＣＣＡＣＣＣＴＣＡＧＣＣＣＧＣＴＣＣ ＴＧＣＣＣＧＣＣＣＡＧＣＡＣＣＣＣＣＡＧＧＣ ＣＣＴＧＧＧＧＧＡＣＣＴＧＧＧＧＴＴＣＴＣＡ ＧＡＣＴＧＣＣＡＡＡＧＡＡＧＣＣＴ	２４５

10

20

30

40

50

【表４６】

		TGCCATCTGGCGCTCCCATGGC TCTTGCAACATCTCCCCTTCGT TTTTGAGGGGGTCATGCCGGGG GAGCCACCAGCCCCTCACTGGG TTCGGAGGAGAGTCAGGAAGGG CCACGACAAAGCAGAAACATCG GATTTGGGGAACGCGTGTCAAT CCCTTGTGCCGCAGGGCTGGGC GGGAGAGACTGTTCTGTTCCTT GTGTAACTGTGTTGCTGAAAGA CTACCTCGTTCTTGTCTTGATG TGTCACCGGGGCAACTGCCTGG GGGCGGGGATGGGGGCAGGGTG GAAGCGGCTCCCCATTTTATAC CAAAGGTGCTACATCTATGTGA TGGGTGGGGTGGGGAGGGAATC ACTGGTGCTATAGAAATTGAGA TGCCCCCCCCAGGCCAGCAAATG TTCCTTTTTGTTCAAAGTCTAT TTTTATTCCTTGATATTTTTCT TTTTTTTTTTTTTTTTTTTGTGG ATGGGGACTTGTGAATTTTTCT AAAGGTGCTATTTAACATGGGA GGAGAGCGTGTGCGGCTCCAGC CCAGCCCGCTGCTCACTTTCCA CCCTCTCTCCACCTGCCTCTGG CTTCTCAGGCCTCTGCTCTCCG ACCTCTCTCCTCTGAAACCCTC CTCCACAGCTGCAGCCCATCCT CCCGGCTCCCTCCTAGTCTGTC CTGCGTCCTCTGTCCCCGGGTT TCAGAGACAAC	

10

20

30

40

50

【表４７】

		TTCCCAAAGCACAAAGCAGTTT TTCCCCCTAGGGGTGGGAGGAA GCAAAAGACTCTGTACCTATTT TGTATGTGTATAATAATTTGAG ATGTTTTTAATTATTTTGATTG CTGGAATAAAGCATGTGGAAAT GACCCAAACATAATCCGCAGTG GCCTCCTAATTTCCTTCTTTGG AGTTGGGGGAGGGGTAGACATG GGGAAGGGGCTTTGGGGTGATG GGCTTGCCTTCCATTCCTGCCC TTTCCCTCCCCACTATTCTCTT CTAGATCCCTCCATAACCCCAC TCCCCTTTCTCTCACCCTTCTT ATACCGCAAACCTTTCTACTTC CTCTTTCATTTTCTATTCTTGC AATTTCCTTGCACCTTTTCCAA ATCCTCTTCTCCCCTGCAATAC CATACAGGCAATCCACGTGCAC AACACACACACACACTCTTCAC ATCTGGGGTTGTCCAAACCTCA TACCCACTCCCCTTCAAGCCCA TCCACTCTCCACCCCCTGGATG CCCTGCACTTGGTGGCGGTGGG ATGCTCATGGATACTGGGAGGG TGAGGGGAGTGGAACCCGTGAG GAGGACCTGGGGGCCTCTCCTT GAACTGACATGAAGGGTCATCT GGCCTCTGCTCCCTTCTCACCC ACGCTGACCTCCTGCCGAAGGA GCAACGCAACAG	

【表４８】

		GAGAGGGGTCTGCTGAGCCTGG CGAGGGTCTGGGAGGGACCAGG AGGAAGGCGTGCTCCCTGCTCG CTGTCCTGGCCCTGGGGGAGTG AGGGAGACAGACACCTGGGAGA GCTGTGGGGAAGGCACTCGCAC CGTGCTCTTGGGAAGGAAGGAG ACCTGGCCCTGCTCACCACGGA CTGGGTGCCTCGACCTCCTGAA TCCCCAGAACACAACCCCCCTG GGCTGGGGTGGTCTGGGGAACC ATCGTGCCCCCGCCTCCCGCCT ACTCCTTTTTAAGCTT	

【表４９】

３ＵＴＲ－０１５	Ｐｌｏｄ１、プロコラーゲン－リシン，２－オキソグルタル酸５－ジオキシゲナーゼ１	ＴＴＧＧＣＣＡＧＧＣＣＴＧＡＣＣＣＴＣＴＴＧＧＡＣＣＴＴＴＣＴＴＣＴＴＴＧＣＣＧＡＣＡＡＣＣＡＣＴＧＣＣＣＡＧＣＡＧＣＣＴＣＴＧＧＧＡＣＣＴＣＧＧＧＧＴＣＣＣＡＧＧＧＡＡＣＣＣＡＧＴＣＣＡＧＣＣＴＣＣＴＧＧＣＴＧＴＴＧＡＣＴＴＣＣＣＡＴＴＧＣＴＣＴＴＧＧＡＧＣＣＡＣＣＡＡＴＣＡＡＡＧＡＧＡＴＴＣＡＡＡＧＡＧＡＴＴＣＣＴＧＣＡＧＧＣＣＡＧＡＧＧＣＧＧＡＡＣＡＣＡＣＣＴＴＴＡＴＧＧＣＴＧＧＧＧＣＴＣＴＣＣＧＴＧＧＴＧＴＴＣＴＧＧＡＣＣＣＡＧＣＣＣＣＴＧＧＡＧＡＣＡＣＣＡＴＴＣＡＣＴＴＴＴＡＣＴＧＣＴＴＴＧＴＡＧＴＧＡＣＴＣＧＴＧＣＴＣＴＣＣＡＡＣＣＴＧＴＣＴＴＣＣＴＧＡＡＡＡＣＣＡＡＧＧＣＣＣＣＣＴＴＣＣＣＣＣＡＣＣＴＣＴＴＣＣＡＴＧＧＧＧＴＧＡＧＡＣＴＴＧＡＧＣＡＧＡＡＣＡＧＧＧＧＣＴＴＣＣＣＣＡＡＧＴＴＧＣＣＣＡＧＡＡＡＧＡＣＴＧＴＣＴＧＧＧＴＧＡＧＡＡＧＣＣＡＴＧＧＣＣＡＧＡＧＣＴＴＣＴＣＣＣＡＧＧＣＡＣＡＧＧＴＧＴＴＧＣＡＣＣＡＧＧＧＡＣＴＴＣＴＧＣＴＴＣＡＡＧＴＴＴＴＧＧＧＧＴＡＡＡＧＡＣＡＣＣＴＧＧＡＴＣＡＧＡＣＴＣＣＡＡＧＧＧＣＴＧＣＣＣＴＧＡＧＴＣＴＧＧＧＡＣＴＴＣＴＧＣＣＴＣＣＡＴＧＧＣＴＧＧＴＣＡＴＧＡＧＡＧＣＡＡＡＣＣＧＴＡＧＴＣＣＣＣＴＧＧＡＧＡＣＡＧＣＧＡＣＴＣＣＡＧＡＧＡＡＣＣＴＣＴＴＧＧＧＡＧＡＣＡＧＡＡＧＡＧＧＣＡＴＣＴＧＴＧＣＡＣＡＧＣＴＣＧＡＴＣＴＴＣＴＡＣＴＴＧＣＣＴＧＴＧＧＧＧＡＧＧＧＧＡＧＴＧＡＣＡＧＧＴＣＣＡＣＡＣＡＣＣＡＣＡＣＴＧＧＧＴＣＡＣＣＣＴＧＴＣＣＴＧＧＡＴＧＣＣＴＣＴＧＡＡＧＡＧＡＧＧＧＡＣＡＧＡＣＣＧＴＣＡＧＡＡＡＣＴＧＧＡＧＡＧＴＴＴＣＴＡＴＴＡＡＡＧＧＴＣＡＴＴＴＡＡＡＣＣＡ	２４６

【表５０】

３ＵＴＲ－０１６	Ｎｕｃｂ１、ヌクレオビンジン１	ＴＣＣＴＣＣＧＧＧＡＣＣＣＣＡＧＣＣＣＴＣＡ ＧＧＡＴＴＣＣＴＧＡＴＧＣＴＣＣＡＡＧＧＣＧ ＡＣＴＧＡＴＧＧＧＣＧＣＴＧＧＡＴＧＡＡＧＴ ＧＧＣＡＣＡＧＴＣＡＧＣＴＴＣＣＣＴＧＧＧＧ ＧＣＴＧＧＴＧＴＣＡＴＧＴＴＧＧＧＣＴＣＣＴ ＧＧＧＧＣＧＧＧＧＧＣＡＣＧＧＣＣＴＧＧＣＡ ＴＴＴＣＡＣＧＣＡＴＴＧＣＴＧＣＣＡＣＣＣＣ ＡＧＧＴＣＣＡＣＣＴＧＴＣＴＣＣＡＣＴＴＴＣ ＡＣＡＧＣＣＴＣＣＡＡＧＴＣＴＧＴＧＧＣＴＣ ＴＴＣＣＣＴＴＣＴＧＴＣＣＴＣＣＧＡＧＧＧＧ ＣＴＴＧＣＣＴＴＣＴＣＴＣＧＴＧＴＣＣＡＧＴ ＧＡＧＧＴＧＣＴＣＡＧＴＧＡＴＣＧＧＣＴＴＡ ＡＣＴＴＡＧＡＧＡＡＧＣＣＣＧＣＣＣＣＣＴＣ ＣＣＣＴＴＣＴＣＣＧＴＣＴＧＴＣＣＣＡＡＧＡ ＧＧＧＴＣＴＧＣＴＣＴＧＡＧＣＣＴＧＣＧＴＴ ＣＣＴＡＧＧＴＧＧＣＴＣＧＧＣＣＴＣＡＧＣＴ ＧＣＣＴＧＧＧＴＴＧＴＧＧＣＣＧＣＣＣＴＡＧ ＣＡＴＣＣＴＧＴＡＴＧＣＣＣＡＣＡＧＣＴＡＣ ＴＧＧＡＡＴＣＣＣＣＧＣＴＧＣＴＧＣＴＣＣＧ ＧＧＣＣＡＡＧＣＴＴＣＴＧＧＴＴＧＡＴＴＡＡ ＴＧＡＧＧＧＣＡＴＧＧＧＧＴＧＧＴＣＣＣＴＣ ＡＡＧＡＣＣＴＴＣＣＣＣＴＡＣＣＴＴＴＴＧＴ ＧＧＡＡＣＣＡＧＴＧＡＴＧＣＣＴＣＡＡＡ	２４７

【表５１】

		ＧＡＣＡＧＴＧＴＣＣＣＣＴＣＣＡＣＡＧＣＴＧ ＧＧＴＧＣＣＡＧＧＧＧＣＡＧＧＧＧＡＴＣＣＴ ＣＡＧＴＡＴＡＧＣＣＧＧＴＧＡＡＣＣＣＴＧＡ ＴＡＣＣＡＧＧＡＧＣＣＴＧＧＧＣＣＴＣＣＣＴ ＧＡＡＣＣＣＣＴＧＧＣＴＴＣＣＡＧＣＣＡＴＣ ＴＣＡＴＣＧＣＣＡＧＣＣＴＣＣＴＣＣＴＧＧＡ ＣＣＴＣＴＴＧＧＧＣＣＣＣＣＡＧＣＣＣＣＴＴＣ ＣＣＣＡＣＡＣＡＧＣＣＣＣＡＧＡＡＧＧＧＴＣ ＣＣＡＧＡＧＣＴＧＡＣＣＣＣＡＣＴＣＣＡＧＧ ＡＣＣＴＡＧＧＣＣＣＡＧＣＣＣＣＴＣＡＧＣＣ ＴＣＡＴＣＴＧＧＡＧＣＣＣＣＴＧＡＡＧＡＣＣ ＡＧＴＣＣＣＡＣＣＣＡＣＣＴＴＴＣＴＧＧＣＣ ＴＣＡＴＣＴＧＡＣＡＣＴＧＣＴＣＣＧＣＡＴＣ ＣＴＧＣＴＧＴＧＴＧＴＣＣＴＧＴＴＣＣＡＴＧ ＴＴＣＣＧＧＴＴＣＣＡＴＣＣＡＡＡＴＡＣＡＣ ＴＴＴＣＴＧＧＡＡＣＡＡＡ	

【表５２】

３ＵＴＲ－０１７	α－グロビン	ＧＣＴＧＧＡＧＣＣＴＣＧＧＴＧＧＣＣＡＴＧＣＴＴＣＴＴＧＣＣＣＣＴＴＧＧＧＣＣＴＣＣＣＣＣＣＡＧＣＣＣＣＴＣＣＴＣＣＣＣＣＴＴＣＣＴＧＣＡＣＣＣＧＴＡＣＣＣＣＣＧＴＧＧＴＣＴＴＴＧＡＡＴＡＡＡＧＴＣＴＧＡＧＴＧＧＧＣＧＧＣ	２４８
３ＵＴＲ－０１８		ＴＧＡＴＡＡＴＡＧＧＣＴＧＧＡＧＣＣＴＣＧＧＴＧＧＣＣＡＴＧＣＴＴＣＴＴＧＣＣＣＣＴＴＧＧＧＣＣＴＣＣＣＣＣＣＣＡＧＣＣＣＣＴＣＣＴＣＣＣＴＴＣＣＴＧＣＡＣＣＣＧＴＡＣＣＣＣＣＧＴＧＧＴＣＴＴＴＧＡＡＴＡＡＡＧＴＣＴＧＡＧＴＧＧＧＣＧＧＣ	２６７
３ＵＴＲ－０１９		ＴＧＡＴＡＡＴＡＧＴＣＣＡＴＡＡＡＧＴＡＧＧＡＡＡＣＡＣＴＡＣＡＧＣＴＧＧＡＧＣＣＴＣＧＧＴＧＧＣＣＡＴＧＣＴＴＣＴＴＧＣＣＣＣＴＴＧＧＧＣＣＴＣＣＣＣＣＣＡＧＣＣＣＣＴＣＣＴＣＣＣＣＴＴＣＣＴＧＣＡＣＣＣＧＴＡＣＣＣＣＣＧＣＡＴＴＡＴＴＡＣＴＣＡＣＧＧＴＡＣＧＡＧＴＧＧＴＣＴＴＴＧＡＡＴＡＡＡＧＴＣＴＧＡＧＴＧＧＧＣＧＧＣ	７７３
３ＵＴＲ－０２０		ＴＧＡＴＡＡＴＡＧＧＣＴＧＧＡＧＣＣＴＣＧＧＴＧＧＣＣＡＴＧＣＴＴＣＴＴＧＣＣＣＣＴＴＧＧＧＣＣＴＣＣＣＣＣＣＡＧＣＣＣＣＴＣＣＴＣＣＣＴＴＣＣＴＧＣＡＣＣＣＧＴＡＣＣＣＣＣＣＧＣＡＴＴＡＴＴＡＣＴＣＡＣＧＧＴＡＣＧＡＧＴＧＧＴＣＴＴＴＧＡＡＴＡＡＡＧＴＣＴＧＡＧＴＧＧＧＣＧＧＣ	７７４

【０４０２】

特定の実施形態において、ポリヌクレオチドに有用な３'ＵＴＲは、配列番号２６７を含む。

【０４０３】

ある特定の実施形態において、本開示の５'ＵＴＲ及び／または３'ＵＴＲ配列は、配列番号２１５～２３１のいずれかを含む５'ＵＴＲ配列及び／または配列番号２３２～２４８のいずれかを含む３'ＵＴＲ配列ならびにこれらの任意の組み合わせからなる群から選択される配列に対して、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、少なくとも約９９％または約１００％同一であるヌクレオチド配列を含む。本開示のポリヌクレオチドは、特徴の組み合わせを含み得る。例えば、ＯＲＦは、強力なＫｏｚａｋ翻訳開始シグナルを含む５’ＵＴＲ及び／またはポリＡテールの鋳型付加のためのオリゴ（ｄＴ）配列を含む３’ＵＴＲに隣接し得る。５’ＵＴＲは、同一ＵＴＲ及び／または異なるＵＴＲに由来する第１のポリヌクレオチド断片及び第２のポリヌクレオチド断片を含み得る（例えば、ＵＳ２０１０／０２９３６２５参照、その全体を参照により本明細書に援用する）。

【０４０４】

パターン化されたＵＴＲを有することも本開示の範囲内である。本明細書で使用されるとき、「パターン化されたＵＴＲ」は、１回、２回または３回以上繰り返される、ＡＢＡＢＡＢもしくはＡＡＢＢＡＡＢＢＡＡＢＢもしくはＡＢＣＡＢＣＡＢＣまたはこれらの変形などの反復または交互パターンを含む。これらのパターンにおいて、各文字Ａ、Ｂまたは

Ｃは、異なるＵＴＲ核酸配列を表す。
【０４０５】
他の非ＵＴＲ配列は、本開示のポリヌクレオチド内の領域またはサブ領域として使用することができる。例えば、イントロンまたはイントロン配列の一部を本開示のポリヌクレオチド中に組み込むことができる。イントロン配列の組み込みは、タンパク質生産及びポリヌクレオチド発現レベルを増加させ得る。いくつかの実施形態において、本開示のポリヌクレオチドは、ＵＴＲの変わりに、またはＵＴＲに加えて、配列内リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ）を含む（例えば、Ｙａｋｕｂｏｖ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍｕｎ．２０１０ ３９４（１）：１８９－１９３参照、その内容全体を参照により本明細書に援用する）。いくつかの実施形態において、本開示のポリヌクレオチドは、非構造タンパク質をコードする風疹ウイルス（ＲＶ）ＲＮＡの５’隣接オープンリーディングフレームを含む、ＲＶゲノムＲＮＡの５’及び／もしくは３’末端にそれぞれに関連する５’及び／もしくは３’配列、またはその欠失誘導体を含む（例えば、Ｐｏｇｕｅ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．６７（１２）：７１０６－７１１７参照、その内容全体を参照により本明細書に援用する）。ウイルスカプシド配列（例えば、カプシド配列の５’部分）もまた翻訳エンハンサーとして使用することができる（例えば、Ｓｊｏｂｅｒｇ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（ＮＹ）１９９４ １２（１１）：１１２７－１１３１及びＦｒｏｌｏｖ ａｎｄ Ｓｃｈｌｅｓｉｎｇｅｒ Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．１９９６ ７０（２）：１１８２－１１９０に記載されているようなセムリキ森林ウイルス及びシンドビスウイルスカプシドＲＮＡ、それぞれの内容全体を参照により本明細書に援用する）。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、５’ＵＴＲ配列の代わりにＩＲＥＳを含む。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、ＯＲＦ及びウイルスカプシド配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、合成５'ＵＴＲを非合成３'ＵＴＲとの組み合わせで含む。
【０４０６】
いくつかの実施形態において、ＵＴＲはまた、少なくとも１つの翻訳エンハンサーポリヌクレオチド、翻訳エンハンサー要素または翻訳のエンハンサー要素（ポリヌクレオチドから生成されるポリペプチドまたはタンパク質の量を増加させる核酸配列を指し、総称的に「ＴＥＥ」という）も含み得る。非限定的な例として、ＴＥＥは、ＵＳ２００９／０２２６４７０（その全体を参照により本明細書に援用する）に記載のもの及び当該技術分野において知られている他のものを挙げることができる。非限定的な例として、ＴＥＥは、転写プロモーターと開始コドンとの間に位置し得る。いくつかの実施形態において、５'ＵＴＲは、ＴＥＥを含む。
【０４０７】
一態様において、ＴＥＥは、限定するものではないが、キャップ依存性またはキャップ非依存性翻訳などの核酸の翻訳活性を促進することができるＵＴＲの保存要素である。これらの配列の保存は、ヒトを含む１４の生物種にわたって確認されている。例えば、Ｐａｎｅｋ ｅｔ ａｌ．，”Ａｎ ｅｖｏｌｕｔｉｏｎａｒｙ ｃｏｎｓｅｒｖｅｄ ｐａｔｔｅｒｎ ｏｆ １８Ｓ ｒＲＮＡ ｓｅｑｕｅｎｃｅ ｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔａｒｉｔｙ ｔｏ ｍＲＮＡ ５’ＵＴＲｓ ａｎｄ ｉｔｓ ｉｍｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ ｆｏｒ ｅｕｋａｒｙｏｔｉｃ ｇｅｎｅ ｔｒａｎｓｌａｔｉｏｎ ｒｅｇｕｌａｔｉｏｎ，” Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ２０１３，ｄｏｉ：１０．１０９３／ｎａｒ／ｇｋｔ５４８を参照されたい（その全体を参照により本明細書に援用する）。
【０４０８】
非限定的な一例において、ＴＥＥは、Ｇｔｘホメオドメインタンパク質の５’リーダー中のＴＥＥ配列を含む。Ｃｈａｐｐｅｌｌ ｅｔ ａｌ．，ＰＮＡＳ ２００４ １０１：９５９０－９５９４を参照されたい（その全体を参照により本明細書に援用する）。
【０４０９】
別の非限定的な例において、ＴＥＥは、ＵＳ２００９／０２２６４７０、ＵＳ２０１３／０１７７５８１及びＷＯ２００９／０７５８８６の配列番号１～３５、ＷＯ２０１２／０

０９６４４の配列番号１～５及び７～６４５、ならびにＷＯ１９９９／０２４５９５、ＵＳ６３１０１９７及びＵＳ６８４９４０５の配列番号１の配列のうちの１つ以上を有するＴＥＥを含む（それぞれの内容全体を参照により本明細書に援用する）。

【０４１０】

いくつかの実施形態において、ＴＥＥは、限定するものではないが、ＵＳ７４６８２７５、ＵＳ２００７／００４８７７６、ＵＳ２０１１／０１２４１００、ＷＯ２００７／０２５００８及びＷＯ２００１／０５５３６９（それぞれの内容全体を参照により本明細書に援用する）に記載されているものなどの配列内リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ）、ＨＣＶ－ＩＲＥＳまたはＩＲＥＳ要素である。ＩＲＥＳ要素には、Ｃｈａｐｐｅｌｌ ｅｔ ａｌ．，ＰＮＡＳ ２００４ １０１：９５９０－９５９４、Ｚｈｏｕ ｅｔ ａｌ．，ＰＮＡＳ ２００５ １０２：６２７３－６２７８、ＵＳ２００７／００４８７７６、ＵＳ２０１１／０１２４１００及びＷＯ２００７／０２５００８（それぞれの内容全体を参照により本明細書に援用する）に記載されているようなＧｔｘ配列（例えば、Ｇｔｘ９－ｎｔ、Ｇｔｘ８－ｎｔ、Ｇｔｘ７－ｎｔ）が含まれるが、これらに限定されない。

【０４１１】

「翻訳エンハンサーポリヌクレオチド」または「翻訳エンハンサーポリヌクレオチド配列」は、本明細書で提供されるＴＥＥ及び／もしくは当該技術分野において知られているＴＥＥ（例えば、ＵＳ６３１０１９７、ＵＳ６８４９４０５、ＵＳ７４５６２７３、ＵＳ７１８３３９５、ＵＳ２００９／０２２６４７０、ＵＳ２００７／００４８７７６、ＵＳ２０１１／０１２４１００、ＵＳ２００９／００９３０４９、ＵＳ２０１３／０１７７５８１、ＷＯ２００９／０７５８８６、ＷＯ２００７／０２５００８、ＷＯ２０１２／００９６４４、ＷＯ２００１／０５５３７１、ＷＯ１９９９／０２４５９５、ＥＰ２６１０３４１Ａ１及びＥＰ２６１０３４０Ａ１参照、それぞれの内容全体を参照により本明細書に援用する）またはそれらのバリアント、ホモログもしくは機能的誘導体のうちの１つ以上を含むポリヌクレオチドを指す。いくつかの実施形態において、本開示のポリヌクレオチドは、ＴＥＥの１つまたは複数のコピーを含む。翻訳エンハンサーポリヌクレオチド中のＴＥＥは、１つ以上の配列セグメントに編成することができる。配列セグメントは、本明細書で提供されるＴＥＥのうちの１つ以上を保有し得、各ＴＥＥは、１つ以上のコピーで存在する。複数の配列セグメントが翻訳エンハンサーポリヌクレオチド中に存在する場合、これらのセグメントは、均一であっても不均一であってもよい。したがって、翻訳エンハンサーポリヌクレオチド中の複数の配列セグメントは、本明細書で提供されるＴＥＥと同一もしくは異なるタイプを保有し得、ＴＥＥのそれぞれと同一もしくは異なるコピー数を保有し得、かつ／または各配列セグメント内のＴＥＥと同一もしくは異なる編成を保有し得る。一実施形態において、本開示のポリヌクレオチドは、翻訳エンハンサーポリヌクレオチド配列を含む。

【０４１２】

いくつかの実施形態において、本開示のポリヌクレオチドの５'ＵＴＲ及び／または３'ＵＴＲは、ＷＯ１９９９／０２４５９５、ＷＯ２０１２／００９６４４、ＷＯ２００９／０７５８８６、ＷＯ２００７／０２５００８、ＷＯ１９９９／０２４５９５、ＷＯ２００１／０５５３７１、ＥＰ２６１０３４１Ａ１、ＥＰ２６１０３４０Ａ１、ＵＳ６３１０１９７、ＵＳ６８４９４０５、ＵＳ７４５６２７３、ＵＳ７１８３３９５、ＵＳ２００９／０２２６４７０、ＵＳ２０１１／０１２４１００、ＵＳ２００７／００４８７７６、ＵＳ２００９／００９３０４９またはＵＳ２０１３／０１７７５８１（それぞれの内容全体を参照により本明細書に援用する）に開示されている少なくとも１つのＴＥＥまたはその部分を含む。

【０４１３】

いくつかの実施形態において、本開示のポリヌクレオチドの５'ＵＴＲ及び／または３'ＵＴＲは、ＵＳ２００９／０２２６４７０、ＵＳ２００７／００４８７７６、ＵＳ２０１３／０１７７５８１、ＵＳ２０１１／０１２４１００、ＷＯ１９９９／０２４５９５、ＷＯ２０１２／００９６４４、ＷＯ２００９／０７５８８６、ＷＯ２００７／０２５００８、

ＥＰ２６１０３４１Ａ１、ＥＰ２６１０３４０Ａ１、ＵＳ６３１０１９７、ＵＳ６８４９４０５、ＵＳ７４５６２７３、ＵＳ７１８３３９５、Ｃｈａｐｐｅｌｌ ｅｔ ａｌ．，ＰＮＡＳ ２００４ １０１：９５９０－９５９４、Ｚｈｏｕ ｅｔ ａｌ．，ＰＮＡＳ ２００５ １０２：６２７３－６２７８ならびにＷｅｌｌｅｎｓｉｅｋ ｅｔ ａｌ．，”Ｇｅｎｏｍｅ－ｗｉｄｅ ｐｒｏｆｉｌｉｎｇ ｏｆ ｈｕｍａｎ ｃａｐ－ｉｎｄｅｐｅｎｄｅｎｔ ｔｒａｎｓｌａｔｉｏｎ－ｅｎｈａｎｃｉｎｇ ｅｌｅｍｅｎｔｓ，” Ｎａｔｕｒｅ Ｍｅｔｈｏｄｓ ２０１３，ＤＯＩ：１０．１０３８／ＮＭＥＴＨ．２５２２中の補足表１及び補足表２（それぞれの内容全体を参照により本明細書に援用する）に開示されているＴＥＥに対して、少なくとも５％、少なくとも１０％、少なくとも１５％、少なくとも２０％、少なくとも２５％、少なくとも３０％、少なくとも３５％、少なくとも４０％、少なくとも４５％、少なくとも５０％、少なくとも５５％、少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％同一であるＴＥＥを含む。

【０４１４】

いくつかの実施形態において、本開示のポリヌクレオチドの５'ＵＴＲ及び／または３'ＵＴＲは、ＵＳ２００９／０２２６４７０、ＵＳ２００７／００４８７７６、ＵＳ２０１３／０１７７５８１、ＵＳ２０１１／０１２４１００、ＷＯ１９９９／０２４５９５、ＷＯ２０１２／００９６４４、ＷＯ２００９／０７５８８６、ＷＯ２００７／０２５００８、ＥＰ２６１０３４１Ａ１、ＥＰ２６１０３４０Ａ１、ＵＳ６３１０１９７、ＵＳ６８４９４０５、ＵＳ７４５６２７３、ＵＳ７１８３３９５、Ｃｈａｐｐｅｌｌ ｅｔ ａｌ．，ＰＮＡＳ ２００４ １０１：９５９０－９５９４、Ｚｈｏｕ ｅｔ ａｌ．，ＰＮＡＳ ２００５ １０２：６２７３－６２７８ならびにＷｅｌｌｅｎｓｉｅｋ ｅｔ ａｌ．，”Ｇｅｎｏｍｅ－ｗｉｄｅ ｐｒｏｆｉｌｉｎｇ ｏｆ ｈｕｍａｎ ｃａｐ－ｉｎｄｅｐｅｎｄｅｎｔ ｔｒａｎｓｌａｔｉｏｎ－ｅｎｈａｎｃｉｎｇ ｅｌｅｍｅｎｔｓ，” Ｎａｔｕｒｅ Ｍｅｔｈｏｄｓ ２０１３，ＤＯＩ：１０．１０３８／ＮＭＥＴＨ．２５２２中の補足表１及び補足表２に開示されているＴＥＥ配列のうちの５～３０ヌクレオチド断片、５～２５ヌクレオチド断片、５～２０ヌクレオチド断片、５～１５ヌクレオチド断片または５～１０ヌクレオチド断片（５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９または３０ヌクレオチドの断片を含む）から選択されるＴＥＥを含む。

【０４１５】

いくつかの実施形態において、本開示のポリヌクレオチドの５'ＵＴＲ及び／または３'ＵＴＲは、ＵＳ７４５６２７３、ＵＳ７１８３３９５、ＵＳ２００９／００９３０４９及びＷＯ２００１／０５５３７１（それぞれの内容全体を参照により本明細書に援用する）のいずれかに記載されている転写制御要素であるＴＥＥを含む。転写制御要素は、当該技術分野において知られている方法、限定するものではないが、ＵＳ７４５６２７３、ＵＳ７１８３３９５、ＵＳ２００９／００９３０４９及びＷＯ２００１／０５５３７１に記載されている方法などによって特定することができる。

【０４１６】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される少なくとも１つのＴＥＥを含む５’ＵＴＲ及び／または３'ＵＴＲは、限定するものではないが、ベクター系または核酸ベクターなどのモノシストロン性配列に組み込むことができる。非限定的な例として、ベクター系及び核酸ベクターには、ＵＳ７４５６２７３、ＵＳ７１８３３９５、ＵＳ２００７／００４８７７６、ＵＳ２００９／００９３０４９、ＵＳ２０１１／０１２４１００、ＷＯ２００７／０２５００８及びＷＯ２００１／０５５３７１に記載されているものを挙げることができる。

【０４１７】

いくつかの実施形態において、本開示のポリヌクレオチドの５’ＵＴＲ及び／または３’ＵＴＲは、本明細書に記載されるＴＥＥまたはその部分を含む。いくつかの実施形態におい

て、３’ＵＴＲ中のＴＥＥは、５’ＵＴＲ中に位置するＴＥＥと同じＴＥＥ及び／または異なるＴＥＥであり得る。

【０４１８】

いくつかの実施形態において、本開示のポリヌクレオチドの５'ＵＴＲ及び／または３'ＵＴＲは、少なくとも１、少なくとも２、少なくとも３、少なくとも４、少なくとも５、少なくとも６、少なくとも７、少なくとも８、少なくとも９、少なくとも１０、少なくとも１１、少なくとも１２、少なくとも１３、少なくとも１４、少なくとも１５、少なくとも１６、少なくとも１７、少なくとも１８少なくとも１９、少なくとも２０、少なくとも２１、少なくとも２２、少なくとも２３、少なくとも２４、少なくとも２５、少なくとも３０、少なくとも３５、少なくとも４０、少なくとも４５、少なくとも５０、少なくとも５５または６０個を超えるＴＥＥ配列を含み得る。一実施形態において、本開示のポリヌクレオチドの５’ＵＴＲは、１～６０、１～５５、１～５０、１～４５、１～４０、１～３５、１～３０、１～２５、１～２０、１～１５、１～１０、９、８、７、６、５、４、３、２または１個のＴＥＥ配列を含み得る。本開示のポリヌクレオチドの５’ＵＴＲ中のＴＥＥ配列は、同じＴＥＥ配列であっても異なるＴＥＥ配列であってもよい。本開示のポリヌクレオチドの５’ＵＴＲ中の異なるＴＥＥ配列の組み合わせは、異なるＴＥＥ配列のいずれかのコピーが２つ以上組み込まれている、組み合わせを含み得る。ＴＥＥ配列は、１回、２回または３回以上繰り返される、ＡＢＡＢＡＢもしくはＡＡＢＢＡＡＢＢＡＡＢＢもしくはＡＢＣＡＢＣＡＢＣまたはそのバリアントなどのパターンであり得る。これらのパターンにおいて、各文字Ａ、ＢまたはＣは、異なるＴＥＥヌクレオチド配列を表す。

【０４１９】

いくつかの実施形態において、ＴＥＥは、ＵＳ２００７／００４８７７６、ＵＳ２０１１／０１２４１００、ＷＯ２００７／０２５００８、ＷＯ２０１２／００９６４４（それぞれの内容全体を参照により本明細書に援用する）に記載されている方法によって特定することができる。

【０４２０】

いくつかの実施形態において、５’ＵＴＲ及び／または３'ＵＴＲは、２つのＴＥＥ配列を隔てるスペーサーを含む。非限定的な例として、スペーサーは、１５ヌクレオチドスペーサー及び／または当該技術分野において知られている他のスペーサーであってよい。別の非限定的な例として、５’ＵＴＲ及び／または３'ＵＴＲは、それぞれ少なくとも１回、少なくとも２回、少なくとも３回、少なくとも４回、少なくとも５回、少なくとも６回、少なくとも７回、少なくとも８回、少なくとも９回、少なくとも１０回または１０回を超えて繰り返されるＴＥＥ配列－スペーサーモジュールを５’ＵＴＲ及び／または３'ＵＴＲ中に含む。いくつかの実施形態において、５’ＵＴＲ及び／または３'ＵＴＲは、１、２、３、４、５、６、７、８、９または１０回繰り返される、ＴＥＥ配列－スペーサーモジュールを含む。

【０４２１】

いくつかの実施形態において、２つのＴＥＥ配列を隔てるスペーサーは、本開示のポリヌクレオチド、例えば、本明細書に記載されるｍｉＲ配列（例えば、ｍｉＲ結合部位及びｍｉＲシード）の翻訳を制御することができる、当該技術分野において知られている他の配列を含み得る。非限定的な例として、２つのＴＥＥ配列を隔てるのに使用される各スペーサーは、異なるｍｉＲ配列またはｍｉＲ配列の構成成分（例えば、ｍｉＲシード配列）を含み得る。

【０４２２】

いくつかの実施形態において、本開示のポリヌクレオチドは、ｍｉＲ配列及び／またはＴＥＥ配列を含む。いくつかの実施形態において、本開示のポリヌクレオチドにｍｉＲ配列及び／またはＴＥＥ配列を組み込むと、翻訳を増加及び／または減少させることができるステムループ領域の形状を変えることができる。例えば、Ｋｅｄｄｅ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌｏｇｙ ２０１０ １２（１０）：１０１４－２０を参照されたい（その全体を参照により本明細書に援用する）。

【０４２３】
センサー配列及びマイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）結合部位
本開示のポリヌクレオチドは、制御要素、例えば、マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）結合部位、転写因子結合部位、構造化ｍＲＮＡ配列及び／またはモチーフ、内因性核酸結合分子の類似受容体として機能するように操作された人工結合部位、ならびにこれらの組み合わせを含み得る。いくつかの実施形態において、そのような制御要素を含むポリヌクレオチドは、「センサー配列」を含むものと称される。センサー配列の非限定的な例は、米国特許出願公開第２０１４／０２００２６１号に記載されており、その内容全体を参照により本明細書に援用する。
【０４２４】
いくつかの実施形態において、本開示のポリヌクレオチド（例えば、リボ核酸（ＲＮＡ）、例えば、メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ））は、目的のポリペプチドをコードするオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）を含み、１つ以上のｍｉＲＮＡ結合部位を更に含む。ｍｉＲＮＡ結合部位（複数可）の含有または組み込みは、天然ｍｉＲＮＡの組織特異的及び／または細胞型特異的発現に基づいた、本開示のポリヌクレオチドの制御、ひいては、当該ポリヌクレオチドからコードされるポリペプチドの制御をもたらす。
【０４２５】
ｍｉＲＮＡ、例えば、天然ｍｉＲＮＡは、１９～２５ヌクレオチドの長いノンコーディングＲＮＡであり、ポリヌクレオチドに結合し、ポリヌクレオチドの安定性を減少させるか、翻訳を阻害することによって、遺伝子発現を下方制御する。ｍｉＲＮＡ配列は、「シード」領域、すなわち、成熟ｍｉＲＮＡの位置２～８の領域内の配列を含む。ｍｉＲＮＡシードは、成熟ｍｉＲＮＡの位置２～８または２～７を含み得る。いくつかの実施形態において、ｍｉＲＮＡシードは、７ヌクレオチド（例えば、成熟ｍｉＲＮＡのヌクレオチド２～８）を含み得、対応するｍｉＲＮＡ結合部位中のシード相補的部位には、ｍｉＲＮＡの位置１に対向するアデノシン（Ａ）が隣接する。いくつかの実施形態において、ｍｉＲＮＡシードは、６ヌクレオチド（例えば、成熟ｍｉＲＮＡのヌクレオチド２～７）を含み得、対応するｍｉＲＮＡ結合部位中のシード相補的部位には、ｍｉＲＮＡの位置１に対向するアデノシン（Ａ）が隣接する。例えば、Ｇｒｉｍｓｏｎ Ａ，Ｆａｒｈ ＫＫ，Ｊｏｈｎｓｔｏｎ ＷＫ，Ｇａｒｒｅｔｔ－Ｅｎｇｅｌｅ Ｐ，Ｌｉｍ ＬＰ，Ｂａｒｔｅｌ ＤＰ；Ｍｏｌ Ｃｅｌｌ．２００７ Ｊｕｌ ６；２７（１）：９１－１０５を参照されたい。標的細胞または標的組織のｍｉＲＮＡプロファイリングを行って、細胞または組織中におけるｍｉＲＮＡの有無を決定することができる。いくつかの実施形態において、本開示のポリヌクレオチド（例えば、リボ核酸（ＲＮＡ）、例えば、メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ））は、１つ以上のマイクロＲＮＡ結合部位、マイクロＲＮＡ標的配列、マイクロＲＮＡ相補的配列またはマイクロＲＮＡシード相補的配列を含む。このような配列は、米国特許出願公開第ＵＳ２００５／０２６１２１８号及び米国特許出願公開第ＵＳ２００５／００５９００５号（それぞれの内容全体を参照により本明細書に援用する）に教示されているものなどの任意の既知のマイクロＲＮＡに対応し得、例えば、これらのにマイクロＲＮＡ対して相補性を有し得る。
【０４２６】
本明細書で使用されるとき、「マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡまたはｍｉＲ）結合部位」という用語は、ポリヌクレオチド内、例えば、ＤＮＡ内、またはＲＮＡ転写物内の配列であって、ｍｉＲＮＡの全てまたは領域に対して、そのｍｉＲＮＡと相互作用するか、会合するか、結合するのに十分な相補性を有する、５’ＵＴＲ及び／または３’ＵＴＲ中に含まれる配列を指す。いくつかの実施形態において、目的のポリペプチドをコードするＯＲＦを含む本開示のポリヌクレオチドは、１つ以上のｍｉＲＮＡ結合部位を更に含む。例示的な実施形態において、ポリヌクレオチド（例えば、リボ核酸（ＲＮＡ）、例えば、メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ））の5'ＵＴＲ及び／または3'ＵＴＲは、１つ以上のｍｉＲＮＡ結合部位を含む。
【０４２７】

ｍｉＲＮＡ結合部位がｍｉＲＮＡに対して十分な相補性を有するとは、ｍｉＲＮＡを介したポリヌクレオチドの制御（例えば、ｍｉＲＮＡを介した翻訳抑制またはポリヌクレオチドの分解）を促進するのに十分な相補性の程度を指す。本開示の例示的な態様において、ｍｉＲＮＡ結合部位がｍｉＲＮＡに対して十分な相補性を有するとは、ｍｉＲＮＡを介したポリヌクレオチドの分解（例えば、ｍｉＲＮＡ誘導によるＲＮＡ誘導型サイレンシング複合体（ＲＩＳＣ）を介したｍＲＮＡの切断）を促進するのに十分な相補性の程度を指す。ｍｉＲＮＡ結合部位は、例えば、１９～２５ヌクレオチドのｍｉＲＮＡ配列、１９～２３ヌクレオチドのｍｉＲＮＡ配列または２２ヌクレオチドのｍｉＲＮＡ配列に対して、相補性を有し得る。ｍｉＲＮＡ結合部位は、ｍｉＲＮＡの一部のみに対して、例えば、完全長の天然ｍｉＲＮＡ配列のうちの１、２、３または４ヌクレオチド未満の部分に対して、相補性を有し得る。所望の制御がｍＲＮＡ分解である場合、最大相補性または完全相補性（例えば、天然ｍｉＲＮＡの長さ全体にわたるか、かなりの部分にわたる最大相補性または完全相補性）が好ましい。

【０４２８】

いくつかの実施形態において、ｍｉＲＮＡ結合部位は、ｍｉＲＮＡシード配列との相補性（例えば、部分相補性または完全相補性）を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、ｍｉＲＮＡ結合部位は、ｍｉＲＮＡシード配列との完全相補性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、ｍｉＲＮＡ結合部位は、ｍｉＲＮＡ配列との相補性（例えば、部分相補性または完全相補性）を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、ｍｉＲＮＡ結合部位は、ｍｉＲＮＡ配列との完全相補性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、ｍｉＲＮＡ結合部位は、１、２または３ヌクレオチド置換、末端付加及び／または切断を除き、ｍｉＲＮＡ配列との完全相補性を有する。

【０４２９】

いくつかの実施形態において、ｍｉＲＮＡ結合部位は、対応するｍｉＲＮＡと同じ長さである。他の実施形態において、ｍｉＲＮＡ結合部位は、５'末端、３'末端またはその両方が、対応するｍｉＲＮＡよりも１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１または１２ヌクレオチド短い。更に他の実施形態において、マイクロＲＮＡ結合部位は、５'末端、３'末端またはその両方が、対応するマイクロＲＮＡよりも２ヌクレオチド短い。対応するｍｉＲＮＡよりも短いｍｉＲＮＡ結合部位は、ｍｉＲＮＡ結合部位のうちの１つ以上を組み込んだｍＲＮＡの分解またはｍＲＮＡの翻訳阻害を依然として行うことができる。

【０４３０】

いくつかの実施形態において、ｍｉＲＮＡ結合部位は、ダイサー含有活性ＲＩＳＣの一部である、対応する成熟ｍｉＲＮＡに結合する。別の実施形態において、ｍｉＲＮＡ結合部位がＲＩＳＣ中の対応するｍｉＲＮＡに結合すると、ｍｉＲＮＡ結合部位を含有するｍＲＮＡが分解されるか、ｍＲＮＡの翻訳が阻害される。いくつかの実施形態において、ｍｉＲＮＡ結合部位は、ｍｉＲＮＡを含むＲＩＳＣ複合体が、ｍｉＲＮＡ結合部位を含むポリヌクレオチドを切断するように、ｍｉＲＮＡに対して十分な相補性を有する。他の実施形態において、ｍｉＲＮＡ結合部位は、ｍｉＲＮＡを含むＲＩＳＣ複合体が、ｍｉＲＮＡ結合部位を含むポリヌクレオチドの不安定性を誘導するように、不完全な相補性を有する。別の実施形態において、ｍｉＲＮＡ結合部位は、ｍｉＲＮＡを含むＲＩＳＣ複合体が、ｍｉＲＮＡ結合部位を含むポリヌクレオチドの転写を抑制するように、不完全な相補性を有する。

【０４３１】

いくつかの実施形態において、ｍｉＲＮＡ結合部位は、対応するｍｉＲＮＡと１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１または１２のミスマッチを有する。

【０４３２】

いくつかの実施形態において、ｍｉＲＮＡ結合部位は、対応するｍｉＲＮＡの少なくとも約１０、少なくとも約１１、少なくとも約１２、少なくとも約１３、少なくとも約１４、少なくとも約１５、少なくとも約１６、少なくとも約１７、少なくとも約１８、少なくとも約１９、少なくとも約２０または少なくとも約２１の連続するヌクレオチドに対してそ

れぞれ相補的な少なくとも約１０、少なくとも約１１、少なくとも約１２、少なくとも約１３、少なくとも約１４、少なくとも約１５、少なくとも約１６、少なくとも約１７、少なくとも約１８、少なくとも約１９、少なくとも約２０または少なくとも約２１の連続するヌクレオチドを有する。

【０４３３】

１つ以上のｍｉＲＮＡ結合部位を本開示のポリヌクレオチドに操作導入することで、当該ポリヌクレオチドは、当該ｍｉＲＮＡが利用可能である限り、分解または翻訳減少の標的になり得る。これにより、ポリヌクレオチドを送達する際のオフターゲット作用を減少させることができる。例えば、本開示のポリヌクレオチドが、ある組織または細胞への送達を意図していないにもかかわらず、当該組織または細胞に到達してしまった場合、当該ポリヌクレオチドの５’ＵＴＲ及び／または３’ＵＴＲに１つまたは複数のｍｉＲＮＡ結合部位が操作導入されていれば、その組織または細胞内に豊富に存在するｍｉＲＮＡにより、対象の遺伝子発現を阻害することができる。

【０４３４】

逆に、特定組織におけるタンパク質発現を増加させるために、天然に生じるｍｉＲＮＡ結合部位をポリヌクレオチド配列から除去することができる。例えば、特定のｍｉＲＮＡに対する結合部位をポリヌクレオチドから除去することで、ｍｉＲＮＡを含有する組織または細胞内でのタンパク質発現を改善することができる。

【０４３５】

一実施形態において、本開示のポリヌクレオチドは、細胞傷害性または細胞保護性ｍＲＮＡ治療物質を、限定するものではないが、正常細胞及び／またはがん性細胞などの特定の細胞に対して制御するために、少なくとも１つのｍｉＲＮＡ結合部位を５'ＵＴＲ及び／または３’ＵＴＲ中に含み得る。別の実施形態において、本開示のポリヌクレオチドは、細胞傷害性または細胞保護性ｍＲＮＡ治療物質を、限定するものではないが、正常細胞及び／またはがん性細胞などの特定の細胞に対して制御するために、２、３、４、５、６、７、８、９、１０個またはそれ以上のｍｉＲＮＡ結合部位を５'ＵＴＲ及び／または３’ＵＴＲ中に含み得る。

【０４３６】

複数組織での発現制御は、１つ以上のｍｉＲＮＡ結合部位、例えば、１つ以上の異なるｍｉＲＮＡ結合部位の導入または除去により達成することができる。ｍｉＲＮＡ結合部位を除去するか挿入するかの決定は、発症及び／または疾患時における組織及び／または細胞のｍｉＲＮＡ発現パターン及び／またはそのプロファイルに基づいて行うことができる。ｍｉＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ結合部位、ならびにその発現パターン及び生物学上の役割の特定は、報告されている（例えば、Ｂｏｎａｕｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｃｕｒｒ Ｄｒｕｇ Ｔａｒｇｅｔｓ ２０１０ １１：９４３－９４９；Ａｎａｎｄ ａｎｄ Ｃｈｅｒｅｓｈ Ｃｕｒｒ Ｏｐｉｎ Ｈｅｍａｔｏｌ ２０１１ １８：１７１－１７６；Ｃｏｎｔｒｅｒａｓ ａｎｄ Ｒａｏ Ｌｅｕｋｅｍｉａ ２０１２ ２６：４０４－４１３（２０１１ Ｄｅｃ ２０．ｄｏｉ：１０．１０３８／ｌｅｕ．２０１１．３５６）；Ｂａｒｔｅｌ Ｃｅｌｌ ２００９ １３６：２１５－２３３；Ｌａｎｄｇｒａｆ ｅｔ ａｌ，Ｃｅｌｌ，２００７ １２９：１４０１－１４１４；Ｇｅｎｔｎｅｒ ａｎｄ Ｎａｌｄｉｎｉ，Ｔｉｓｓｕｅ Ａｎｔｉｇｅｎｓ．２０１２ ８０：３９３－４０３及び当該文献中の全ての参考文献、それぞれの全体を参照により本明細書に援用する）。

【０４３７】

ｍｉＲＮＡ及びｍｉＲＮＡ結合部位は、任意の既知の配列に対応し得、米国特許出願公開第２０１４／０２００２６１号、同第２００５／０２６１２１８号及び同第２００５／０２５９００５号（それぞれの全体を参照により本明細書に援用する）に記載されている非限定的な例を含む。

【０４３８】

ｍｉＲＮＡがｍＲＮＡを制御し、それによりタンパク質発現を制御することが知られている組織の例には、肝臓（ｍｉＲ－１２２）、筋肉（ｍｉＲ－１３３、ｍｉＲ－２０６、ｍ

ｉＲ－２０８）、内皮細胞（ｍｉＲ－１７－９２、ｍｉＲ－１２６）、骨髄細胞（ｍｉＲ－１４２－３ｐ、ｍｉＲ－１４２－５ｐ、ｍｉＲ－１６、ｍｉＲ－２１、ｍｉＲ－２２３、ｍｉＲ－２４、ｍｉＲ－２７）、脂肪組織（ｌｅｔ－７、ｍｉＲ－３０ｃ）、心臓（ｍｉＲ－１ｄ、ｍｉＲ－１４９）、腎臓（ｍｉＲ－１９２、ｍｉＲ－１９４、ｍｉＲ－２０４）及び肺上皮細胞（ｌｅｔ－７、ｍｉＲ－１３３、ｍｉＲ－１２６）が挙げられるが、これらに限定されない。

【０４３９】

具体的には、ｍｉＲＮＡは、抗原提示細胞（ＡＰＣ）（例えば、樹状細胞及びマクロファージ）、マクロファージ、単球、Ｂリンパ球、Ｔリンパ球、顆粒球、ナチュラルキラー細胞などの免疫細胞（造血細胞とも呼ばれる）において、特異的に発現されることが知られている。免疫細胞特異的ｍｉＲＮＡは、免疫原性、自己免疫、感染症、炎症に対する免疫応答、ならびに遺伝子治療及び組織／臓器移植後の望ましくない免疫応答に関与する。免疫細胞特異的ｍｉＲＮＡはまた、造血細胞（免疫細胞）の発生、増殖、分化及びアポトーシスの多くの側面を制御する。例えば、ｍｉＲ－１４２及びｍｉＲ－１４６は、免疫細胞にのみ発現し、特に、骨髄系樹状細胞に豊富である。ｍｉＲ－１４２結合部位をポリヌクレオチドの３’ＵＴＲに付加することにより、ポリヌクレオチドに対する免疫応答を遮断することができ、組織及び細胞におけるより安定した遺伝子導入が可能となることが示されている。ｍｉＲ－１４２は、抗原提示細胞中の外因性ポリヌクレオチドを効率的に分解し、形質導入細胞の細胞傷害性排除を抑制する（例えば、Ａｎｎｏｎｉ Ａ ｅｔ ａｌ．，ｂｌｏｏｄ，２００９，１１４，５１５２－５１６１；Ｂｒｏｗｎ ＢＤ，ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ ｍｅｄ．２００６，１２（５），５８５－５９１；Ｂｒｏｗｎ ＢＤ，ｅｔ ａｌ．，ｂｌｏｏｄ，２００７，１１０（１３）：４１４４－４１５２、それぞれの全体を参照により本明細書に援用する）。

【０４４０】

抗原媒介免疫応答は、外来抗原によって誘起される免疫応答を指し得、外来抗原は、生物内に入ると、抗原提示細胞によって処理され、抗原提示細胞の表面上に提示される。Ｔ細胞は、提示された抗原を認識し、抗原を発現する細胞の細胞傷害性排除を誘導することができる。

【０４４１】

ｍｉＲ－１４２結合部位を本開示のポリヌクレオチドの５'ＵＴＲ及び／または３’ＵＴＲに導入すると、ｍｉＲ－１４２を介した分解によって抗原提示細胞における遺伝子発現が選択的に抑制され、抗原提示細胞（例えば、樹状細胞）における抗原提示が制限され、これにより、ポリヌクレオチド送達後の抗原媒介免疫応答を防ぐことができる。ポリヌクレオチドは、次いで、細胞傷害性排除を誘起することなく、標的組織または標的細胞において安定的に発現される。

【０４４２】

一実施形態において、免疫細胞、特に、抗原提示細胞で発現されることが知られているｍｉＲＮＡの結合部位を本開示のポリヌクレオチドに操作導入することで、ｍｉＲＮＡを介したＲＮＡ分解により抗原提示細胞におけるポリヌクレオチドの発現を抑制し、抗原媒介免疫応答を抑えることができる。ポリヌクレオチドの発現は、免疫細胞特異的ｍｉＲＮＡが発現されない非免疫細胞において維持される。例えば、いくつかの実施形態において、肝臓特異的タンパク質に対する免疫原性応答を防ぐために、あらゆるｍｉＲ－１２２結合部位を除去することができ、かつｍｉＲ－１４２（及び／またはｍｉｒＲ－１４６）結合部位を本開示のポリヌクレオチドの５'ＵＴＲ及び／または３'ＵＴＲに操作導入することができる。

【０４４３】

ＡＰＣ及びマクロファージにおける選択的分解及び抑制を更に促進するために、本開示のポリヌクレオチドは、更なる負制御要素を、単独で、またはｍｉＲ－１４２及び／もしくはｍｉＲ－１４６結合部位との組み合わせのいずれかで、５'ＵＴＲ及び／または３'ＵＴＲ中に含み得る。非限定的な例として、更なる負制御要素は、構成的崩壊要素（ＣＤＥ：

Ｃｏｎｓｔｉｔｕｔｉｖｅ Ｄｅｃａｙ Ｅｌｅｍｅｎｔ）である。
【０４４４】
免疫細胞特異的ｍｉＲＮＡには、ｈｓａ－ｌｅｔ－７ａ－２－３ｐ、ｈｓａ－ｌｅｔ－７ａ－３ｐ、ｈｓａ－７ａ－５ｐ、ｈｓａ－ｌｅｔ－７ｃ、ｈｓａ－ｌｅｔ－７ｅ－３ｐ、ｈｓａ－ｌｅｔ－７ｅ－５ｐ、ｈｓａ－ｌｅｔ－７ｇ－３ｐ、ｈｓａ－ｌｅｔ－７ｇ－５ｐ、ｈｓａ－ｌｅｔ－７ｉ－３ｐ、ｈｓａ－ｌｅｔ－７ｉ－５ｐ、ｍｉＲ－１０ａ－３ｐ、ｍｉＲ－１０ａ－５ｐ、ｍｉＲ－１１８４、ｈｓａ－ｌｅｔ－７ｆ－１－－３ｐ、ｈｓａ－ｌｅｔ－７ｆ－２－－５ｐ、ｈｓａ－ｌｅｔ－７ｆ－５ｐ、ｍｉＲ－１２５ｂ－１－３ｐ、ｍｉＲ－１２５ｂ－２－３ｐ、ｍｉＲ－１２５ｂ－５ｐ、ｍｉＲ－１２７９、ｍｉＲ－１３０ａ－３ｐ、ｍｉＲ－１３０ａ－５ｐ、ｍｉＲ－１３２－３ｐ、ｍｉＲ－１３２－５ｐ、ｍｉＲ－１４２－３ｐ、ｍｉＲ－１４２－５ｐ、ｍｉＲ－１４３－３ｐ、ｍｉＲ－１４３－５ｐ、ｍｉＲ－１４６ａ－３ｐ、ｍｉＲ－１４６ａ－５ｐ、ｍｉＲ－１４６ｂ－３ｐ、ｍｉＲ－１４６ｂ－５ｐ、ｍｉＲ－１４７ａ、ｍｉＲ－１４７ｂ、ｍｉＲ－１４８ａ－５ｐ、ｍｉＲ－１４８ａ－３ｐ、ｍｉＲ－１５０－３ｐ、ｍｉＲ－１５０－５ｐ、ｍｉＲ－１５１ｂ、ｍｉＲ－１５５－３ｐ、ｍｉＲ－１５５－５ｐ、ｍｉＲ－１５ａ－３ｐ、ｍｉＲ－１５ａ－５ｐ、ｍｉＲ－１５ｂ－５ｐ、ｍｉＲ－１５ｂ－３ｐ、ｍｉＲ－１６－１－３ｐ、ｍｉＲ－１６－２－３ｐ、ｍｉＲ－１６－５ｐ、ｍｉＲ－１７－５ｐ、ｍｉＲ－１８１ａ－３ｐ、ｍｉＲ－１８１ａ－５ｐ、ｍｉＲ－１８１ａ－２－３ｐ、ｍｉＲ－１８２－３ｐ、ｍｉＲ－１８２－５ｐ、ｍｉＲ－１９７－３ｐ、ｍｉＲ－１９７－５ｐ、ｍｉＲ－２１－５ｐ、ｍｉＲ－２１－３ｐ、ｍｉＲ－２１４－３ｐ、ｍｉＲ－２１４－５ｐ、ｍｉＲ－２２３－３ｐ、ｍｉＲ－２２３－５ｐ、ｍｉＲ－２２１－３ｐ、ｍｉＲ－２２１－５ｐ、ｍｉＲ－２３ｂ－３ｐ、ｍｉＲ－２３ｂ－５ｐ、ｍｉＲ－２４－１－５ｐ，ｍｉＲ－２４－２－５ｐ、ｍｉＲ－２４－３ｐ、ｍｉＲ－２６ａ－１－３ｐ、ｍｉＲ－２６ａ－２－３ｐ、ｍｉＲ－２６ａ－５ｐ、ｍｉＲ－２６ｂ－３ｐ、ｍｉＲ－２６ｂ－５ｐ、ｍｉＲ－２７ａ－３ｐ、ｍｉＲ－２７ａ－５ｐ、ｍｉＲ－２７ｂ－３ｐ，ｍｉＲ－２７ｂ－５ｐ、ｍｉＲ－２８－３ｐ、ｍｉＲ－２８－５ｐ、ｍｉＲ－２９０９、ｍｉＲ－２９ａ－３ｐ、ｍｉＲ－２９ａ－５ｐ、ｍｉＲ－２９ｂ－１－５ｐ、ｍｉＲ－２９ｂ－２－５ｐ、ｍｉＲ－２９ｃ－３ｐ、ｍｉＲ－２９ｃ－５ｐ，、ｍｉＲ－３０ｅ－３ｐ、ｍｉＲ－３０ｅ－５ｐ、ｍｉＲ－３３１－５ｐ、ｍｉＲ－３３９－３ｐ、ｍｉＲ－３３９－５ｐ、ｍｉＲ－３４５－３ｐ、ｍｉＲ－３４５－５ｐ、ｍｉＲ－３４６、ｍｉＲ－３４ａ－３ｐ、ｍｉＲ－３４ａ－５ｐ、ｍｉＲ－３６３－３ｐ、ｍｉＲ－３６３－５ｐ、ｍｉＲ－３７２、ｍｉＲ－３７７－３ｐ、ｍｉＲ－３７７－５ｐ、ｍｉＲ－４９３－３ｐ、ｍｉＲ－４９３－５ｐ、ｍｉＲ－５４２、ｍｉＲ－５４８ｂ－５ｐ、ｍｉＲ５４８ｃ－５ｐ、ｍｉＲ－５４８ｉ、ｍｉＲ－５４８ｊ、ｍｉＲ－５４８ｎ、ｍｉＲ－５７４－３ｐ、ｍｉＲ－５９８、ｍｉＲ－７１８、ｍｉＲ－９３５、ｍｉＲ－９９ａ－３ｐ、ｍｉＲ－９９ａ－５ｐ、ｍｉＲ－９９ｂ－３ｐ及びｍｉＲ－９９ｂ－５ｐが含まれるが、これらに限定されない。更に、免疫細胞における新規ｍｉＲＮＡをマイクロアレイハイブリダイゼーション及びミクロトーム分析により特定することができる（例えば、Ｊｉｍａ ＤＤ ｅｔ ａｌ，Ｂｌｏｏｄ，２０１０，１１６：ｅ１１８－ｅ１２７；Ｖａｚ Ｃ ｅｔ ａｌ．，ＢＭＣ Ｇｅｎｏｍｉｃｓ，２０１０，１１，２８８、それぞれの内容全体を参照により本明細書に援用する）。
【０４４５】
肝臓で発現することが知られているｍｉＲＮＡには、ｍｉＲ－１０７、ｍｉＲ－１２２－３ｐ、ｍｉＲ－１２２－５ｐ、ｍｉＲ－１２２８－３ｐ、ｍｉＲ－１２２８－５ｐ、ｍｉＲ－１２４９、ｍｉＲ－１２９－５ｐ、ｍｉＲ－１３０３、ｍｉＲ－１５１ａ－３ｐ、ｍｉＲ－１５１ａ－５ｐ、ｍｉＲ－１５２、ｍｉＲ－１９４－３ｐ、ｍｉＲ－１９４－５ｐ、ｍｉＲ－１９９ａ－３ｐ、ｍｉＲ－１９９ａ－５ｐ、ｍｉＲ－１９９ｂ－３ｐ、ｍｉＲ－１９９ｂ－５ｐ、ｍｉＲ－２９６－５ｐ、ｍｉＲ－５５７、ｍｉＲ－５８１、ｍｉＲ－９３９－３ｐ及びｍｉＲ－９３９－５ｐが含まれるが、これらに限定されない。任意の肝臓特異的ｍｉＲＮＡに由来するｍｉＲＮＡ結合部位を本開示のポリヌクレオチドに導入す

るか、除去することで、肝臓でのポリヌクレオチド発現を制御することができる。肝臓特異的ｍｉＲＮＡ結合部位は、単独で操作されてもよいし、本開示のポリヌクレオチド中の免疫細胞（例えば、ＡＰＣ）ｍｉＲＮＡ結合部位と更に組み合わせて操作されてもよい。

【０４４６】

肺で発現することが知られているｍｉＲＮＡには、ｌｅｔ－７ａ－２－３ｐ、ｌｅｔ－７ａ－３ｐ、ｌｅｔ－７ａ－５ｐ、ｍｉＲ－１２６－３ｐ、ｍｉＲ－１２６－５ｐ、ｍｉＲ－１２７－３ｐ、ｍｉＲ－１２７－５ｐ、ｍｉＲ－１３０ａ－３ｐ、ｍｉＲ－１３０ａ－５ｐ、ｍｉＲ－１３０ｂ－３ｐ、ｍｉＲ－１３０ｂ－５ｐ、ｍｉＲ－１３３ａ、ｍｉＲ－１３３ｂ、ｍｉＲ－１３４、ｍｉＲ－１８ａ－３ｐ、ｍｉＲ－１８ａ－５ｐ、ｍｉＲ－１８ｂ－３ｐ、ｍｉＲ－１８ｂ－５ｐ、ｍｉＲ－２４－１－５ｐ、ｍｉＲ－２４－２－５ｐ、ｍｉＲ－２４－３ｐ、ｍｉＲ－２９６－３ｐ、ｍｉＲ－２９６－５ｐ、ｍｉＲ－３２－３ｐ、ｍｉＲ－３３７－３ｐ、ｍｉＲ－３３７－５ｐ、ｍｉＲ－３８１－３ｐ及びｍｉＲ－３８１－５ｐが含まれるが、これらに限定されない。任意の肺特異的ｍｉＲＮＡに由来するｍｉＲＮＡ結合部位を本開示のポリヌクレオチドに導入するか、除去することで、肺でのポリヌクレオチド発現を制御することができる。肺特異的ｍｉＲＮＡ結合部位は、単独で操作されてもよいし、本開示のポリヌクレオチド中の免疫細胞（例えば、ＡＰＣ）ｍｉＲＮＡ結合部位と更に組み合わせて操作されてもよい。

【０４４７】

心臓で発現することが知られているｍｉＲＮＡには、ｍｉＲ－１、ｍｉＲ－１３３ａ、ｍｉＲ－１３３ｂ、ｍｉＲ－１４９－３ｐ、ｍｉＲ－１４９－５ｐ、ｍｉＲ－１８６－３ｐ、ｍｉＲ－１８６－５ｐ、ｍｉＲ－２０８ａ、ｍｉＲ－２０８ｂ、ｍｉＲ－２１０、ｍｉＲ－２９６－３ｐ、ｍｉＲ－３２０、ｍｉＲ－４５１ａ、ｍｉＲ－４５１ｂ、ｍｉＲ－４９９ａ－３ｐ、ｍｉＲ－４９９ａ－５ｐ、ｍｉＲ－４９９ｂ－３ｐ、ｍｉＲ－４９９ｂ－５ｐ、ｍｉＲ－７４４－３ｐ、ｍｉＲ－７４４－５ｐ、ｍｉＲ－９２ｂ－３ｐ及びｍｉＲ－９２ｂ－５ｐが含まれるが、これらに限定されない。任意の心臓特異的マイクロＲＮＡに由来するｍＭｉＲＮＡ結合部位を本開示のポリヌクレオチドに導入するか、除去することで、心臓でのポリヌクレオチド発現を制御することができる。心臓特異的ｍｉＲＮＡ結合部位は、単独で操作されてもよいし、本開示のポリヌクレオチド中の免疫細胞（例えば、ＡＰＣ）ｍｉＲＮＡ結合部位と更に組み合わせて操作されてもよい。

【０４４８】

神経系で発現することが知られているｍｉＲＮＡには、ｍｉＲ－１２４－５ｐ、ｍｉＲ－１２５ａ－３ｐ、ｍｉＲ－１２５ａ－５ｐ、ｍｉＲ－１２５ｂ－１－３ｐ、ｍｉＲ－１２５ｂ－２－３ｐ、ｍｉＲ－１２５ｂ－５ｐ，ｍｉＲ－１２７１－３ｐ、ｍｉＲ－１２７１－５ｐ、ｍｉＲ－１２８、ｍｉＲ－１３２－５ｐ、ｍｉＲ－１３５ａ－３ｐ、ｍｉＲ－１３５ａ－５ｐ、ｍｉＲ－１３５ｂ－３ｐ、ｍｉＲ－１３５ｂ－５ｐ、ｍｉＲ－１３７、ｍｉＲ－１３９－５ｐ、ｍｉＲ－１３９－３ｐ、ｍｉＲ－１４９－３ｐ、ｍｉＲ－１４９－５ｐ、ｍｉＲ－１５３、ｍｉＲ－１８１ｃ－３ｐ、ｍｉＲ－１８１ｃ－５ｐ、ｍｉＲ－１８３－３ｐ、ｍｉＲ－１８３－５ｐ、ｍｉＲ－１９０ａ、ｍｉＲ－１９０ｂ、ｍｉＲ－２１２－３ｐ、ｍｉＲ－２１２－５ｐ、ｍｉＲ－２１９－１－３ｐ、ｍｉＲ－２１９－２－３ｐ、ｍｉＲ－２３ａ－３ｐ、ｍｉＲ－２３ａ－５ｐ、ｍｉＲ－３０ａ－５ｐ、ｍｉＲ－３０ｂ－３ｐ、ｍｉＲ－３０ｂ－５ｐ、ｍｉＲ－３０ｃ－１－３ｐ、ｍｉＲ－３０ｃ－２－３ｐ、ｍｉＲ－３０ｃ－５ｐ、ｍｉＲ－３０ｄ－３ｐ、ｍｉＲ－３０ｄ－５ｐ、ｍｉＲ－３２９、ｍｉＲ－３４２－３ｐ、ｍｉＲ－３６６５、ｍｉＲ－３６６６、ｍｉＲ－３８０－３ｐ、ｍｉＲ－３８０－５ｐ、ｍｉＲ－３８３、ｍｉＲ－４１０、ｍｉＲ－４２５－３ｐ、ｍｉＲ－４２５－５ｐ、ｍｉＲ－４５４－３ｐ、ｍｉＲ－４５４－５ｐ、ｍｉＲ－４８３、ｍｉＲ－５１０、ｍｉＲ－５１６ａ－３ｐ、ｍｉＲ－５４８ｂ－５ｐ、ｍｉＲ－５４８ｃ－５ｐ、ｍｉＲ－５７１、ｍｉＲ－７－１－３ｐ、ｍｉＲ－７－２－３ｐ、ｍｉＲ－７－５ｐ、ｍｉＲ－８０２、ｍｉＲ－９２２、ｍｉＲ－９－３ｐ及びｍｉＲ－９－５ｐが含まれるが、これらに限定されない。神経系に豊富なｍｉＲＮＡには、限定するものではないが、ｍｉＲ－１３２－３ｐ、ｍｉＲ－１３２－３ｐ、ｍｉＲ－１４８ｂ－３ｐ、

ｍｉＲ－１４８ｂ－５ｐ、ｍｉＲ－１５１ａ－３ｐ、ｍｉＲ－１５１ａ－５ｐ、ｍｉＲ－２１２－３ｐ、ｍｉＲ－２１２－５ｐ、ｍｉＲ－３２０ｂ、ｍｉＲ－３２０ｅ、ｍｉＲ－３２３ａ－３ｐ、ｍｉＲ－３２３ａ－５ｐ、ｍｉＲ－３２４－５ｐ、ｍｉＲ－３２５、ｍｉＲ－３２６、ｍｉＲ－３２８、ｍｉＲ－９２２を含む、ニューロンで特に発現されるもの、ならびに限定するものではないが、ｍｉＲ－１２５０、ｍｉＲ－２１９－１－３ｐ、ｍｉＲ－２１９－２－３ｐ、ｍｉＲ－２１９－５ｐ、ｍｉＲ－２３ａ－３ｐ、ｍｉＲ－２３ａ－５ｐ、ｍｉＲ－３０６５－３ｐ、ｍｉＲ－３０６５－５ｐ、ｍｉＲ－３０ｅ－３ｐ、ｍｉＲ－３０ｅ－５ｐ、ｍｉＲ－３２－５ｐ、ｍｉＲ－３３８－５ｐ及びｍｉＲ－６５７を含む、グリア細胞で特に発現されるものが更に含まれる。任意のＣＮＳ特異的ｍｉＲＮＡに由来するｍｉＲＮＡ結合部位を本開示のポリヌクレオチドに導入するか、除去することで、神経系でのポリヌクレオチド発現を制御することができる。神経系特異的ｍｉＲＮＡ結合部位は、単独で操作されてもよいし、本開示のポリヌクレオチド中の免疫細胞（例えば、ＡＰＣ）ｍｉＲＮＡ結合部位と更に組み合わせて操作されてもよい。

【０４４９】

膵臓で発現することが知られているｍｉＲＮＡには、ｍｉＲ－１０５－３ｐ、ｍｉＲ－１０５－５ｐ、ｍｉＲ－１８４、ｍｉＲ－１９５－３ｐ、ｍｉＲ－１９５－５ｐ、ｍｉＲ－１９６ａ－３ｐ、ｍｉＲ－１９６ａ－５ｐ、ｍｉＲ－２１４－３ｐ、ｍｉＲ－２１４－５ｐ、ｍｉＲ－２１６ａ－３ｐ、ｍｉＲ－２１６ａ－５ｐ、ｍｉＲ－３０ａ－３ｐ、ｍｉＲ－３３ａ－３ｐ、ｍｉＲ－３３ａ－５ｐ、ｍｉＲ－３７５、ｍｉＲ－７－１－３ｐ、ｍｉＲ－７－２－３ｐ、ｍｉＲ－４９３－３ｐ、ｍｉＲ－４９３－５ｐ及びｍｉＲ－９４４が含まれるが、これらに限定されない。任意の膵臓特異的ｍｉＲＮＡに由来するｍｉＲＮＡ結合部位を本開示のポリヌクレオチドに導入するか、除去することで、膵臓でのポリヌクレオチド発現を制御することができる。膵臓特異的ｍｉＲＮＡ結合部位は、単独で操作されてもよいし、本開示のポリヌクレオチド中の免疫細胞（例えば、ＡＰＣ）ｍｉＲＮＡ結合部位と更に組み合わせて操作されてもよい。

【０４５０】

腎臓で発現することが知られているｍｉＲＮＡには、ｍｉＲ－１２２－３ｐ、ｍｉＲ－１４５－５ｐ、ｍｉＲ－１７－５ｐ、ｍｉＲ－１９２－３ｐ、ｍｉＲ－１９２－５ｐ、ｍｉＲ－１９４－３ｐ、ｍｉＲ－１９４－５ｐ、ｍｉＲ－２０ａ－３ｐ、ｍｉＲ－２０ａ－５ｐ、ｍｉＲ－２０４－３ｐ、ｍｉＲ－２０４－５ｐ、ｍｉＲ－２１０、ｍｉＲ－２１６ａ－３ｐ、ｍｉＲ－２１６ａ－５ｐ、ｍｉＲ－２９６－３ｐ、ｍｉＲ－３０ａ－３ｐ、ｍｉＲ－３０ａ－５ｐ、ｍｉＲ－３０ｂ－３ｐ、ｍｉＲ－３０ｂ－５ｐ、ｍｉＲ－３０ｃ－１－３ｐ、ｍｉＲ－３０ｃ－２－３ｐ、ｍｉＲ３０ｃ－５ｐ、ｍｉＲ－３２４－３ｐ、ｍｉＲ－３３５－３ｐ、ｍｉＲ－３３５－５ｐ、ｍｉＲ－３６３－３ｐ、ｍｉＲ－３６３－５ｐ及びｍｉＲ－５６２が含まれるが、これらに限定されない。任意の腎臓特異的ｍｉＲＮＡに由来するｍｉＲＮＡ結合部位を本開示のポリヌクレオチドに導入するか、除去することで、腎臓でのポリヌクレオチド発現を制御することができる。腎臓特異的ｍｉＲＮＡ結合部位は、単独で操作されてもよいし、本開示のポリヌクレオチド中の免疫細胞（例えば、ＡＰＣ）ｍｉＲＮＡ結合部位と更に組み合わせて操作されてもよい。

【０４５１】

筋肉で発現することが知られているｍｉＲＮＡには、ｌｅｔ－７ｇ－３ｐ、ｌｅｔ－７ｇ－５ｐ、ｍｉＲ－１、ｍｉＲ－１２８６、ｍｉＲ－１３３ａ、ｍｉＲ－１３３ｂ、ｍｉＲ－１４０－３ｐ、ｍｉＲ－１４３－３ｐ、ｍｉＲ－１４３－５ｐ、ｍｉＲ－１４５－３ｐ、ｍｉＲ－１４５－５ｐ、ｍｉＲ－１８８－３ｐ、ｍｉＲ－１８８－５ｐ、ｍｉＲ－２０６、ｍｉＲ－２０８ａ、ｍｉＲ－２０８ｂ、ｍｉＲ－２５－３ｐ及びｍｉＲ－２５－５ｐが含まれるが、これらに限定されない。任意の筋肉特異的ｍｉＲＮＡに由来するｍｉＲＮＡ結合部位を本開示のポリヌクレオチドに導入するか、除去することで、筋肉でのポリヌクレオチド発現を制御することができる。筋肉特異的ｍｉＲＮＡ結合部位は、単独で操作されてもよいし、本開示のポリヌクレオチド中の免疫細胞（例えば、ＡＰＣ）ｍｉＲＮＡ結合部位と更に組み合わせて操作されてもよい。

【０４５２】
ｍｉＲＮＡはまた、限定するものではないが、内皮細胞、上皮細胞及び脂肪細胞などの異なる細胞種で特異的に発現される。
【０４５３】
内皮細胞で発現することが知られているｍｉＲＮＡには、ｌｅｔ－７ｂ－３ｐ、ｌｅｔ－７ｂ－５ｐ、ｍｉＲ－１００－３ｐ、ｍｉＲ－１００－５ｐ、ｍｉＲ－１０１－３ｐ、ｍｉＲ－１０１－５ｐ、ｍｉＲ－１２６－３ｐ、ｍｉＲ－１２６－５ｐ、ｍｉＲ－１２３６－３ｐ、ｍｉＲ－１２３６－５ｐ、ｍｉＲ－１３０ａ－３ｐ、ｍｉＲ－１３０ａ－５ｐ、ｍｉＲ－１７－５ｐ、ｍｉＲ－１７－３ｐ、ｍｉＲ－１８ａ－３ｐ、ｍｉＲ－１８ａ－５ｐ、ｍｉＲ－１９ａ－３ｐ、ｍｉＲ－１９ａ－５ｐ、ｍｉＲ－１９ｂ－１－５ｐ、ｍｉＲ－１９ｂ－２－５ｐ、ｍｉＲ－１９ｂ－３ｐ、ｍｉＲ－２０ａ－３ｐ、ｍｉＲ－２０ａ－５ｐ、ｍｉＲ－２１７、ｍｉＲ－２１０、ｍｉＲ－２１－３ｐ、ｍｉＲ－２１－５ｐ、ｍｉＲ－２２１－３ｐ、ｍｉＲ－２２１－５ｐ、ｍｉＲ－２２２－３ｐ、ｍｉＲ－２２２－５ｐ、ｍｉＲ－２３ａ－３ｐ、ｍｉＲ－２３ａ－５ｐ、ｍｉＲ－２９６－５ｐ、ｍｉＲ－３６１－３ｐ、ｍｉＲ－３６１－５ｐ、ｍｉＲ－４２１、ｍｉＲ－４２４－３ｐ、ｍｉＲ－４２４－５ｐ、ｍｉＲ－５１３ａ－５ｐ、ｍｉＲ－９２ａ－１－５ｐ、ｍｉＲ－９２ａ－２－５ｐ、ｍｉＲ－９２ａ－３ｐ、ｍｉＲ－９２ｂ－３ｐ及びｍｉＲ－９２ｂ－５ｐが含まれるが、これらに限定されない。ディープシーケンシング解析から多くの新規ｍｉＲＮＡが内皮細胞で発見されている（例えば、Ｖｏｅｌｌｅｎｋｌｅ Ｃ ｅｔ ａｌ．，ＲＮＡ，２０１２，１８，４７２－４８４、その全体を参照により本明細書に援用する）。任意の内皮細胞特異的ｍｉＲＮＡに由来するｍｉＲＮＡ結合部位を本開示のポリヌクレオチドに導入するか、除去することで、内皮細胞でのポリヌクレオチド発現を制御することができる。
【０４５４】
上皮細胞で発現することが知られているｍｉＲＮＡには、呼吸器系線毛上皮細胞に特異的なｌｅｔ－７ｂ－３ｐ、ｌｅｔ－７ｂ－５ｐ、ｍｉＲ－１２４６、ｍｉＲ－２００ａ－３ｐ、ｍｉＲ－２００ａ－５ｐ、ｍｉＲ－２００ｂ－３ｐ、ｍｉＲ－２００ｂ－５ｐ、ｍｉＲ－２００ｃ－３ｐ、ｍｉＲ－２００ｃ－５ｐ、ｍｉＲ－３３８－３ｐ、ｍｉＲ－４２９、ｍｉＲ－４５１ａ、ｍｉＲ－４５１ｂ、ｍｉＲ－４９４、ｍｉＲ－８０２及びｍｉＲ－３４ａ、ｍｉＲ－３４ｂ－５ｐ、ｍｉＲ－３４ｃ－５ｐ、ｍｉＲ－４４９ａ、ｍｉＲ－４４９ｂ－３ｐ、ｍｉＲ－４４９ｂ－５ｐ、肺上皮細胞に特異的なｌｅｔ－７ファミリー、ｍｉＲ－１３３ａ、ｍｉＲ－１３３ｂ、ｍｉＲ－１２６、腎臓上皮細胞に特異的なｍｉＲ－３８２－３ｐ、ｍｉＲ－３８２－５ｐ、ならびに角膜上皮細胞に特異的なｍｉＲ－７６２が含まれるが、これらに限定されない。任意の上皮細胞特異的ｍｉＲＮＡに由来するｍｉＲＮＡ結合部位を本開示のポリヌクレオチドに導入するか、除去することで、上皮細胞でのポリヌクレオチド発現を制御することができる。
【０４５５】
加えて、幹細胞の自己複製、ならびに神経細胞、心臓細胞、造血細胞、皮膚細胞、骨形成細胞及び筋肉細胞などの様々な細胞系譜の発生及び／または分化を制御する、ｍｉＲＮＡの大きなグループが胚幹細胞に豊富に存在する（例えば、Ｋｕｐｐｕｓａｍｙ ＫＴ ｅｔ ａｌ．，Ｃｕｒｒ．Ｍｏｌ Ｍｅｄ，２０１３，１３（５），７５７－７６４；Ｖｉｄｉｇａｌ ＪＡ ａｎｄ Ｖｅｎｔｕｒａ Ａ，Ｓｅｍｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｂｉｏｌ．２０１２，２２（５－６），４２８－４３６；Ｇｏｆｆ ＬＡ ｅｔ ａｌ．，ＰＬｏＳ Ｏｎｅ，２００９，４：ｅ７１９２；Ｍｏｒｉｎ ＲＤ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｏｍｅ Ｒｅｓ，２００８，１８，６１０－６２１；Ｙｏｏ ＪＫ ｅｔ ａｌ．，Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌｓ Ｄｅｖ．２０１２，２１（１１），２０４９－２０５７、それぞれの全体を参照により本明細書に援用する）。胚幹細胞で豊富なｍｉＲＮＡには、ｌｅｔ－７ａ－２－３ｐ、ｌｅｔ－ａ－３ｐ、ｌｅｔ－７ａ－５ｐ、ｌｅｔ７ｄ－３ｐ、ｌｅｔ－７ｄ－５ｐ、ｍｉＲ－１０３ａ－２－３ｐ、ｍｉＲ－１０３ａ－５ｐ、ｍｉＲ－１０６ｂ－３ｐ、ｍｉＲ－１０６ｂ－５ｐ、ｍｉＲ－１２４６、ｍｉＲ－１２７５、ｍｉＲ－１３８－１－３ｐ、ｍｉＲ

－１３８－２－３ｐ、ｍｉＲ－１３８－５ｐ、ｍｉＲ－１５４－３ｐ、ｍｉＲ－１５４－５ｐ、ｍｉＲ－２００ｃ－３ｐ、ｍｉＲ－２００ｃ－５ｐ、ｍｉＲ－２９０、ｍｉＲ－３０１ａ－３ｐ、ｍｉＲ－３０１ａ－５ｐ、ｍｉＲ－３０２ａ－３ｐ、ｍｉＲ－３０２ａ－５ｐ、ｍｉＲ－３０２ｂ－３ｐ、ｍｉＲ－３０２ｂ－５ｐ、ｍｉＲ－３０２ｃ－３ｐ、ｍｉＲ－３０２ｃ－５ｐ、ｍｉＲ－３０２ｄ－３ｐ、ｍｉＲ－３０２ｄ－５ｐ、ｍｉＲ－３０２ｅ、ｍｉＲ－３６７－３ｐ、ｍｉＲ－３６７－５ｐ、ｍｉＲ－３６９－３ｐ、ｍｉＲ－３６９－５ｐ、ｍｉＲ－３７０、ｍｉＲ－３７１、ｍｉＲ－３７３、ｍｉＲ－３８０－５ｐ、ｍｉＲ－４２３－３ｐ、ｍｉＲ－４２３－５ｐ、ｍｉＲ－４８６－５ｐ、ｍｉＲ－５２０ｃ－３ｐ、ｍｉＲ－５４８ｅ、ｍｉＲ－５４８ｆ、ｍｉＲ－５４８ｇ－３ｐ、ｍｉＲ－５４８ｇ－５ｐ、ｍｉＲ－５４８ｉ、ｍｉＲ－５４８ｋ、ｍｉＲ－５４８ｌ、ｍｉＲ－５４８ｍ、ｍｉＲ－５４８ｎ、ｍｉＲ－５４８ｏ－３ｐ、ｍｉＲ－５４８ｏ－５ｐ、ｍｉＲ－５４８ｐ、ｍｉＲ－６６４ａ－３ｐ、ｍｉＲ－６６４ａ－５ｐ、ｍｉＲ－６６４ｂ－３ｐ、ｍｉＲ－６６４ｂ－５ｐ、ｍｉＲ－７６６－３ｐ、ｍｉＲ－７６６－５ｐ、ｍｉＲ－８８５－３ｐ、ｍｉＲ－８８５－５ｐ，ｍｉＲ－９３－３ｐ、ｍｉＲ－９３－５ｐ、ｍｉＲ－９４１、ｍｉＲ－９６－３ｐ、ｍｉＲ－９６－５ｐ、ｍｉＲ－９９ｂ－３ｐ及びｍｉＲ－９９ｂ－５ｐが含まれるが、これらに限定されない。ディープシーケンシングによって、多くの新規推定ｍｉＲＮＡがヒト胚幹細胞で発見されている（例えば、Ｍｏｒｉｎ ＲＤ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｏｍｅ Ｒｅｓ，２００８，１８，６１０－６２１；Ｇｏｆｆ ＬＡ ｅｔ ａｌ．，ＰＬｏＳ Ｏｎｅ，２００９，４：ｅ７１９２；Ｂａｒ Ｍ ｅｔ ａｌ．，Ｓｔｅｍ ｃｅｌｌｓ，２００８，２６，２４９６－２５０５、それぞれの内容全体を参照により本明細書に援用する）。

【０４５６】

一実施形態において、胚幹細胞特異的ｍｉＲＮＡの結合部位を本開示のポリヌクレオチドの３'ＵＴＲに含めるか、除去することで、胚幹細胞の発生及び／または分化を調節すること、変性状態（例えば、変性疾患）にある幹細胞の老化を阻害すること、または疾患状態にある幹細胞（例えば、がん幹細胞）の老化及びアポトーシスを刺激することができる。

【０４５７】

様々ながん細胞／組織及び他の疾患におけるｍｉＲＮＡの特異的発現を分析するために、多くのｍｉＲＮＡ発現研究が実施されている。いくつかのｍｉＲＮＡは、ある特定のがん細胞で異常に過剰発現され、他のｍｉＲＮＡは、低発現である。例えば、ｍｉＲＮＡは、がん細胞（ＷＯ２００８／１５４０９８、ＵＳ２０１３／００５９０１５、ＵＳ２０１３／００４２３３３、ＷＯ２０１１／１５７２９４）、がん幹細胞（ＵＳ２０１２／００５３２２４）、膵癌及び膵疾患（ＵＳ２００９／０１３１３４８、ＵＳ２０１１／０１７１６４６、ＵＳ２０１０／０２８６２３２、ＵＳ８３８９２１０）、喘息及び炎症（ＵＳ８４１５０９６）、前立腺癌（ＵＳ２０１３／００５３２６４）、肝細胞癌（ＷＯ２０１２／１５１２１２、ＵＳ２０１２／０３２９６７２、ＷＯ２００８／０５４８２８、ＵＳ８２５２５３８）、肺癌細胞（ＷＯ２０１１／０７６１４３、ＷＯ２０１３／０３３６４０、ＷＯ２００９／０７０６５３、ＵＳ２０１０／０３２３３５７）、皮膚Ｔ細胞性リンパ腫（ＷＯ２０１３／０１１３７８）、大腸癌細胞（ＷＯ２０１１／０２８１７５６、ＷＯ２０１１／０７６１４２）、癌陽性リンパ節（ＷＯ２００９／１００４３０、ＵＳ２００９／０２６３８０３）、鼻咽腔癌（ＥＰ２１１２２３５）、慢性閉塞性肺疾患（ＵＳ２０１２／０２６４６２６、ＵＳ２０１３／００５３２６３）、甲状腺癌（ＷＯ２０１３／０６６６７８）、卵巣癌細胞（ＵＳ２０１２／０３０９６４５、ＷＯ２０１１／０９５６２３）、乳癌細胞（ＷＯ２００８／１５４０９８、ＷＯ２００７／０８１７４０、ＵＳ２０１２／０２１４６９９）、白血病及びリンパ腫（ＷＯ２００８／０７３９１５、ＵＳ２００９／００９２９７４、ＵＳ２０１２／０３１６０８１、ＵＳ２０１２／０２８３３１０、ＷＯ２０１０／０１８５６３、その内容の全体を参照により本明細書に援用する）において特異的に発現される。

【０４５８】

非限定的な例として、ある特定のがん細胞及び／または腫瘍細胞で過剰発現されるｍｉＲ

ＮＡのｍｉＲＮＡ結合部位を本開示のポリヌクレオチドの３'ＵＴＲから除去することで、がん細胞内で過剰発現されるｍｉＲＮＡによって抑制される発現を回復させ、これにより、対応する生物学的機能、例えば、転写刺激及び／または転写抑制、細胞周期停止、アポトーシスならびに細胞死を改善することができる。ｍｉＲＮＡ発現が上方制御されていない正常細胞及び正常組織は、影響を受けない状態を保ち得る。

【０４５９】

ｍｉＲＮＡはまた、血管新生などの複雑な生物学的過程を制御し得る（例えば、ｍｉＲ－１３２）（Ａｎａｎｄ ａｎｄ Ｃｈｅｒｅｓｈ Ｃｕｒｒ Ｏｐｉｎ Ｈｅｍａｔｏｌ ２０１１ １８：１７１－１７６）。本開示のポリヌクレオチドにおいて、ポリヌクレオチドの発現を生物学的に関連する細胞種または関連する生物学的過程に合わせるために、そのような過程に関与するｍｉＲＮＡ結合部位を除去するか、導入することができる。この場合、本開示のポリヌクレオチドは、栄養要求性ポリヌクレオチドとして定義される。

【０４６０】

いくつかの実施形態において、本開示のポリヌクレオチドは、ｍｉＲＮＡ結合部位を含み、ｍｉＲＮＡ結合部位は、表７から選択される１つ以上のヌクレオチド配列（ｍｉＲＮＡ結合部位配列のうちのいずれか１つ以上のコピーを１つ以上含む）を含む。いくつかの実施形態において、本開示のポリヌクレオチドは、表７から選択される同一または異なるｍｉＲＮＡ結合部位（これらの任意の組み合わせを含む）の少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０個またはそれ以上を更に含む。いくつかの実施形態において、ｍｉＲＮＡ結合部位は、ｍｉＲ－１４２に結合するか、ｍｉＲ－１４２に相補的である。いくつかの実施形態において、ｍｉＲ－１４２は、配列番号７２０を含む。いくつかの実施形態において、ｍｉＲＮＡ結合部位は、ｍｉＲ－１４２－３ｐまたはｍｉＲ－１４２－５ｐに結合する。いくつかの実施形態において、ｍｉＲ－１４２－３ｐ結合部位は、配列番号７２１を含む。いくつかの実施形態において、ｍｉＲ－１４２－５ｐ結合部位は、配列番号７２３を含む。いくつかの実施形態において、ｍｉＲＮＡ結合部位は、配列番号７２２または配列番号７２４に対して、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％または１００％同一であるヌクレオチド配列を含む。

表７．ｍｉＲ－１４２及びｍｉＲ－１４２の結合部位

【表５３】

配列番号	説明	配列
７２０	ｍｉＲ－１４２	ＧＡＣＡＧＵＧＣＡＧＵＣＡＣＣＣＡＵＡＡＡＧ ＵＡＧＡＡＡＧＣＡＣＵＡＣＵＡＡＣＡＧＣＡＣ ＵＧＧＡＧＧＧＵＧＵＡＧＵＧＵＵＵＣＣＵＡＣ ＵＵＵＡＵＧＧＡＵＧＡＧＵＧＵＡＣＵＧＵＧ
７２１	ｍｉＲ－１４２－３ｐ	ＵＧＵＡＧＵＧＵＵＵＣＣＵＡＣＵＵＵＡＵＧＧ Ａ
７２２	ｍｉＲ－１４２－３ｐ結合部位	ＵＣＣＡＵＡＡＡＧＵＡＧＧＡＡＡＣＡＣＵＡＣ Ａ
７２３	ｍｉＲ－１４２－５ｐ	ＣＡＵＡＡＡＧＵＡＧＡＡＡＧＣＡＣＵＡＣＵ
７２４	ｍｉＲ－１４２－５ｐ結合部位	ＡＧＵＡＧＵＧＣＵＵＵＣＵＡＣＵＵＵＡＵＧ

【０４６１】

いくつかの実施形態において、ｍｉＲＮＡ結合部位は、ポリヌクレオチドの任意の位置（例えば、５'ＵＴＲ及び／または３'ＵＴＲ）で本開示のポリヌクレオチドに挿入される。いくつかの実施形態において、５'ＵＴＲは、ｍｉＲＮＡ結合部位を含む。いくつかの実施形態において、３'ＵＴＲは、ｍｉＲＮＡ結合部位を含む。いくつかの実施形態において、

５'ＵＴＲ及び３'ＵＴＲは、ｍｉＲＮＡ結合部位を含む。ポリヌクレオチド中の挿入部位は、ポリヌクレオチド中のｍｉＲＮＡ結合部位の挿入が、対応するｍｉＲＮＡの不存在下において、機能性ポリペプチドの翻訳に干渉せず、ｍｉＲＮＡの存在下では、ポリヌクレオチド中のｍｉＲＮＡ結合部位の挿入と、当該ｍｉＲＮＡ結合部位の対応するｍｉＲＮＡへの結合とにより、ポリヌクレオチドが分解されるか、ポリヌクレオチドの翻訳を阻害することができる限り、ポリヌクレオチドのいかなる場所でもよい。

【０４６２】

いくつかの実施形態において、ｍｉＲＮＡ結合部位は、ＯＲＦを含む本開示のポリヌクレオチド中のＯＲＦの終止コドンから少なくとも約３０ヌクレオチド下流に挿入される。いくつかの実施形態において、ｍｉＲＮＡ結合部位は、本開示のポリヌクレオチド中のＯＲＦの終止コドンから少なくとも約１０ヌクレオチド、少なくとも約１５ヌクレオチド、少なくとも約２０ヌクレオチド、少なくとも約２５ヌクレオチド、少なくとも約３０ヌクレオチド、少なくとも約３５ヌクレオチド、少なくとも約４０ヌクレオチド、少なくとも約４５ヌクレオチド、少なくとも約５０ヌクレオチド、少なくとも約５５ヌクレオチド、少なくとも約６０ヌクレオチド、少なくとも約６５ヌクレオチド、少なくとも約７０ヌクレオチド、少なくとも約７５ヌクレオチド、少なくとも約８０ヌクレオチド、少なくとも約８５ヌクレオチド、少なくとも約９０ヌクレオチド、少なくとも約９５ヌクレオチドまたは少なくとも約１００ヌクレオチド下流に挿入される。いくつかの実施形態において、ｍｉＲＮＡ結合部位は、本開示のポリヌクレオチド中のＯＲＦの終止コドンから約１０ヌクレオチド～約１００ヌクレオチド、約２０ヌクレオチド～約９０ヌクレオチド、約３０ヌクレオチド～約８０ヌクレオチド、約４０ヌクレオチド～約７０ヌクレオチド、約５０ヌクレオチド～約６０ヌクレオチド、約４５ヌクレオチド～約６５ヌクレオチド下流に挿入される。

【０４６３】

ｍｉＲＮＡ遺伝子制御は、ｍｉＲＮＡ周辺の配列、例えば、限定するものではないが、周辺配列の生物種、配列の種類（例えば、異種、同種、外因性、内因性または人工）、周辺配列中の制御要素及び／または周辺配列中の構造要素などによる影響を受け得る。ｍｉＲＮＡは、５’ＵＴＲ及び／または３’ＵＴＲによる影響を受け得る。非限定的な例として、非ヒト３’ＵＴＲは、同じ配列種類のヒト３’ＵＴＲと比較して、目的のポリペプチド発現に対するｍｉＲＮＡ配列の制御作用を増加させることができる。

【０４６４】

一実施形態において、５’ＵＴＲの他の制御要素及び／または構造要素は、ｍｉＲＮＡを介した遺伝子制御に影響を与え得る。制御要素及び／または構造要素の一例は、５’ＵＴＲ中の構造化ＩＲＥＳ（配列内リボソーム進入部位）であり、これは、タンパク質の翻訳を開始する翻訳伸長因子の結合に必要である。この５’ＵＴＲ中の二次構造化要素へのＥＩＦ４Ａ２結合は、ｍｉＲＮＡを介した遺伝子発現に必要である（Ｍｅｉｊｅｒ　ＨＡ　ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ，２０１３，３４０，８２－８５、その全体を参照により本明細書に援用する）。本開示のポリヌクレオチドは、マイクロＲＮＡを介した遺伝子制御を向上させるために、この構造化５’ＵＴＲを更に含み得る。

【０４６５】

少なくとも１つのｍｉＲＮＡ結合部位が本開示のポリヌクレオチドの３’ＵＴＲに操作挿入され得る。この場合、少なくとも２、少なくとも３、少なくとも４、少なくとも５、少なくとも６、少なくとも７、少なくとも８、少なくとも９、少なくとも１０個またはそれ以上のｍｉＲＮＡ結合部位を本開示のポリヌクレオチド３’ＵＴＲに操作導入することができる。例えば、１～１０、１～９、１～８、１～７、１～６、１～５、１～４、１～３、２または１個のｍｉＲＮＡ結合部位を本開示のポリヌクレオチドの３’ＵＴＲに操作導入することができる。一実施形態において、本開示のポリヌクレオチド中に組み込まれるｍｉＲＮＡ結合部位は、同じｍｉＲＮＡ部位であってもよいし、異なるｍｉＲＮＡ部位であってもよい。本開示のポリヌクレオチド中に組み込まれる異なるｍｉＲＮＡ結合部位の組み合わせは、異なるｍｉＲＮＡ部位のいずれかのコピーが２つ以上組み込まれている、組み合

わせを含み得る。別の実施形態において、本開示のポリヌクレオチド中に組み込まれるｍｉＲＮＡ結合部位は、体内の同じ組織を標的にしてもよいし、異なる組織を標的にしてもよい。非限定的な例として、本開示のポリヌクレオチドの３’ＵＴＲに組織、細胞種または疾患特異的ｍｉＲＮＡ結合部位を導入することにより、特定の細胞種（例えば、肝細胞、骨髄細胞、内皮細胞、がん細胞など）における発現の程度を減少させることができる。

【０４６６】

一実施形態において、ｍｉＲＮＡ結合部位は、本開示のポリヌクレオチドの３’ＵＴＲの５’末端近傍、３’ＵＴＲの５’末端と３’末端との中間、及び／または３’ＵＴＲの３’末端近傍に操作され得る。非限定的な例として、ｍｉＲＮＡ結合部位は、３’ＵＴＲの５’末端近傍、及び３’ＵＴＲの５’末端と３’末端との中間に操作され得る。別の非限定的な例として、ｍｉＲＮＡ結合部位は、３’ＵＴＲの３’末端近傍、及び３’ＵＴＲの５’末端と３’末端との中間に操作され得る。更に別の非限定的な例として、ｍｉＲＮＡ結合部位は、３’ＵＴＲの５’末端近傍、及び３’ＵＴＲの３’末端近傍に操作され得る。

【０４６７】

別の実施形態において、３’ＵＴＲは、１、２、３、４、５、６、７、８、９または１０個のｍｉＲＮＡ結合部位を含み得る。ｍｉＲＮＡ結合部位は、ｍｉＲＮＡ、ｍｉＲＮＡシード配列及び／またはシード配列に隣接するｍｉＲＮＡ配列に対して相補的であり得る。

【０４６８】

一実施形態において、本開示のポリヌクレオチドは、対象の異なる組織または異なる細胞種で発現される２つ以上のｍｉＲＮＡ部位を含むように操作され得る。非限定的な例として、本開示のポリヌクレオチドは、対象の肝臓及び腎臓におけるポリヌクレオチドの発現を制御するために、ｍｉＲ－１９２及びｍｉＲ－１２２を含むように操作することができる。別の実施形態において、本開示のポリヌクレオチドは、同じ組織の２つ以上のｍｉＲＮＡ部位を含むように操作され得る。

【０４６９】

いくつかの実施形態において、本開示のポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドに関連する治療可能時間域及びまたは特異的発現は、ｍｉＲＮＡ結合部位により変更することができる。例えば、がん細胞のｍｉＲＮＡシグネチャーによって当該細胞でより高度に発現されるように、細胞死シグナルをもたらすポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを設計することができる。がん細胞が特定のｍｉＲＮＡをより低いレベルで発現する場合、当該ｍｉＲＮＡ（または複数のｍｉＲＮＡ）の結合部位をコードするポリヌクレオチドは、より高度に発現されるだろう。したがって、細胞死シグナルをもたらすポリペプチドは、がん細胞の細胞死を誘起または誘導する。同ｍｉＲＮＡの発現が高い隣接非がん細胞は、３’ＵＴＲにコードされた結合部位または「センサー」にｍｉＲＮＡが結合する作用に起因して、当該ポリヌクレオチドが低レベルで発現されるので、コードされた細胞死シグナルによる影響を受けにくい。逆に、細胞生存または細胞保護シグナルをがん細胞及び非がん性細胞を含有する組織に送達することができ、この場合、ｍｉＲＮＡががん細胞で高発現していれば、結果として、がん細胞への生存シグナルが低くなり、正常細胞への生存シグナルが大きくなる。本明細書に記載されるｍｉＲＮＡ結合部位の使用に基づいて、異なるシグナルを有する複数のポリヌクレオチドを設計し、投与することができる。

【０４７０】

いくつかの実施形態において、本開示のポリヌクレオチドの発現は、ポリヌクレオチド中に少なくとも１つのセンサー配列を組み込み、ポリヌクレオチドを投与用に製剤化することによって、制御することができる。非限定的な例として、本開示のポリヌクレオチドは、ｍｉＲＮＡ結合部位を組み込み、カチオン性脂質（本明細書に記載される脂質のいずれかを含む）を含む脂質ナノ粒子でポリヌクレオチドを製剤化することによって、組織または細胞を標的にすることができる。

【０４７１】

本開示のポリヌクレオチドは、異なる組織、細胞種または生物学的状態におけるｍｉＲＮＡの発現パターンに基づいて、特定の組織、細胞種または生物学的状態における標的化発

現を高めるように操作することができる。組織特異的ｍｉＲＮＡ結合部位の導入により、本開示のポリヌクレオチドは、組織もしくは細胞における、または生物学的状態の状況におけるタンパク質発現を最適化するように設計することができる。

【０４７２】

いくつかの実施形態において、本開示のポリヌクレオチドは、既知のｍｉＲＮＡシード配列に対して１００％の同一性を有するか、ｍｉＲＮＡシード配列に対して１００％未満の同一性を有するかのいずれかであるｍｉＲＮＡ結合部位を組み込むように設計することができる。いくつかの実施形態において、本開示のポリヌクレオチドは、既知のｍｉＲＮＡシード配列に対して、少なくとも６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％の同一性を有するｍｉＲＮＡ結合部位を組み込むように設計することができる。ｍｉＲＮＡシード配列は、ｍｉＲＮＡ結合親和性を低下させるように部分的に変異させてもよく、その結果、ポリヌクレオチドの下方調節が減少する。本質的に、ｍｉＲＮＡ結合部位とｍｉＲＮＡシードとの間のマッチまたはミスマッチの程度は、タンパク質発現を調節するｍｉＲＮＡの能力をより微細に調整するための加減抵抗器として作用し得る。加えて、ｍｉＲＮＡ結合部位の非シード領域中の変異もまた、タンパク質発現を調節するｍｉＲＮＡの能力に影響を与え得る。

【０４７３】

一実施形態において、ｍｉＲＮＡ配列をステムループのループ中に組み込むことができる。

【０４７４】

別の実施形態において、ｍｉＲＮＡシード配列をステムループのループ中に組み込むことができ、ｍｉＲＮＡ結合部位は、ステムループの５’または３’ステムに組み込むことができる。

【０４７５】

一実施形態において、翻訳エンハンサー要素（ＴＥＥ）をステムループのステムの５’末端に組み込むことができ、ｍｉＲＮＡシードをステムループのステム中に組み込むことができる。別の実施形態において、ＴＥＥをステムループのステムの５’末端に組み込むことができ、ｍｉＲＮＡシードをステムループのステム中に組み込むことができ、ｍｉＲＮＡ結合部位をステムの３’末端またはステムループ後の配列中に組み込むことができる。ｍｉＲＮＡシード及びｍｉＲＮＡ結合部位は、同じ及び／または異なるｍｉＲＮＡ配列に対するものであり得る。

【０４７６】

一実施形態において、ｍｉＲＮＡ配列及び／またはＴＥＥ配列を組み込むと、翻訳を増加及び／または減少させることができるステムループ領域の形状を変えることができる（例えば、Ｋｅｄｄｅ ｅｔ ａｌ．，”Ａ Ｐｕｍｉｌｉｏ－ｉｎｄｕｃｅｄ ＲＮＡ ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ ｓｗｉｔｃｈ ｉｎ ｐ２７－３’ＵＴＲ ｃｏｎｔｒｏｌｓ ｍｉＲ－２２１ ａｎｄ ｍｉＲ－２２ ａｃｃｅｓｓｉｂｉｌｉｔｙ．” Ｎａｔｕｒｅ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌｏｇｙ．２０１０参照、その全体を参照により本明細書に援用する）。

【０４７７】

一実施形態において、本開示のポリヌクレオチドの５’ＵＴＲは、少なくとも１つのｍｉＲＮＡ配列を含み得る。ｍｉＲＮＡ配列は、１９もしくは２２ヌクレオチド配列及び／またはシードを含まないｍｉＲＮＡ配列であり得るが、これらに限定されない。

【０４７８】

一実施形態において、５’ＵＴＲ中のｍｉＲＮＡ配列は、本明細書に記載される本開示のポリヌクレオチドを安定化するために使用することができる。

【０４７９】

別の実施形態において、本開示のポリヌクレオチドの５’ＵＴＲ中のｍｉＲＮＡ配列は、翻訳開始部位、例えば、限定するものではないが、開始コドンなどのアクセス容易性を低下させるために使用することができる。例えば、最初の開始コドン（ＡＵＧ）へのアクセス容易性を低下させるために、開始コドン周辺（－４～＋３７、ここで、ＡＵＧコドンのＡは＋１）に、アンチセンスロックド核酸（ＬＮＡ）オリゴヌクレオチド及びエキソン接合

部複合体（ＥＪＣ）を使用した、Ｍａｔｓｕｄａ　ｅｔ　ａｌ．，ＰＬｏＳ　Ｏｎｅ．２０１０１１（５）：ｅ１５０５７（その全体を参照により本明細書に援用する）を参照されたい。Ｍａｔｓｕｄａは、ＬＮＡまたはＥＪＣによる開始コドン周辺の配列の変更が、ポリヌクレオチドの効率、長さ及び構造安定性に影響を与えることを示した。本開示のポリヌクレオチドは、翻訳開始部位へのアクセス容易性を低下させるために、Ｍａｔｓｕｄａらによって記載されたＬＮＡまたはＥＪＣ配列の代わりに、ｍｉＲＮＡ配列を翻訳開始部位の近傍に含み得る。翻訳開始部位は、ｍｉＲＮＡ配列の前、後または内部であり得る。非限定的な例として、翻訳開始部位は、シード配列などのｍｉＲＮＡ配列内または結合部位内に位置し得る。別の非限定的な例として、翻訳開始部位は、シード配列などのｍｉＲ－１２２配列内またはｍｉｒ－１２２結合部位内に位置し得る。

【０４８０】

いくつかの実施形態において、本開示のポリヌクレオチドは、抗原提示細胞による抗原提示を弱めるために、少なくとも１つのｍｉＲＮＡを含み得る。ｍｉＲＮＡは、完全なｍｉＲＮＡ配列、ｍｉＲＮＡシード配列、シードを含まないｍｉＲＮＡ配列、またはこれらの組み合わせであり得る。非限定的な例として、本開示のポリヌクレオチド中に組み込まれるｍｉＲＮＡは、造血系に特異的であり得る。別の非限定的な例として、抗原提示を弱めるために本開示のポリヌクレオチド中に組み込まれるｍｉＲＮＡは、ｍｉＲ－１４２－３ｐである。

【０４８１】

いくつかの実施形態において、本開示のポリヌクレオチドは、目的の組織または細胞におけるコードされたポリペプチドの発現を弱めるために、少なくとも１つのｍｉＲＮＡを含み得る。非限定的な例として、本開示のポリヌクレオチドは、肝臓におけるコードされた目的のポリペプチドの発現を弱めるために、少なくとも１つのｍｉＲ－１２２結合部位を含み得る。別の非限定的な例として、本開示のポリヌクレオチドは、少なくとも１つのｍｉＲ－１４２－３ｐ結合部位、ｍｉＲ－１４２－３ｐシード配列、シードを含まないｍｉＲ－１４２－３ｐ結合部位、ｍｉＲ－１４２－５ｐ結合部位、ｍｉＲ－１４２－５ｐシード配列、シードを含まないｍｉＲ－１４２－５ｐ結合部位、ｍｉＲ－１４６結合部位、ｍｉＲ－１４６シード配列及び／またはシード配列を含まないｍｉＲ－１４６結合部位を含み得る。

【０４８２】

いくつかの実施形態において、本開示のポリヌクレオチドは、免疫細胞においてｍＲＮＡ治療物質を選択的に分解し、治療的送達によって引き越される望ましくない免疫原性応答を抑えるために、少なくとも１つのｍｉＲＮＡ結合部位を３’ＵＴＲ中に含み得る。非限定的な例として、ｍｉＲＮＡ結合部位は、抗原提示細胞において、本開示のポリヌクレオチドを不安定にさせることができる。これらのｍｉＲＮＡの非限定的な例には、ｍｉｒ－１４２－５ｐ、ｍｉｒ－１４２－３ｐ、ｍｉｒ－１４６ａ－５ｐ及びｍｉｒ－１４６－３ｐが挙げられる。

【０４８３】

一実施形態において、本開示のポリヌクレオチドは、ＲＮＡ結合タンパク質と相互作用することができるポリヌクレオチドの領域中に少なくとも１つのｍｉＲＮＡ配列を含む。

【０４８４】

いくつかの実施形態において、本開示のポリヌクレオチド（例えば、ＲＮＡ、例えば、ｍＲＮＡ）は、（ｉ）ＭＣＭポリペプチド（例えば、野生型配列、その機能性断片またはバリアント）をコードする、配列最適化されたヌクレオチド配列（例えば、ＯＲＦ）と、（ｉｉ）ｍｉＲＮＡ結合部位（例えば、ｍｉＲ－１４２に結合するｍｉＲＮＡ結合部位）とを含む。

【０４８５】

いくつかの実施形態において、本開示のポリヌクレオチドは、本明細書で開示されるＭＣＭポリペプチドをコードするウラシル変更配列と、本明細書で開示されるｍｉＲＮＡ結合部位（例えば、ｍｉＲ－１４２に結合するｍｉＲＮＡ結合部位）とを含む。いくつかの実

施形態において、ＭＣＭポリペプチドをコードするウラシル変更配列は、少なくとも１つの化学修飾された核酸塩基、例えば、５－メトキシウラシルを含む。いくつかの実施形態において、本開示のＭＣＭポリペプチドをコードするウラシル変更配列中の核酸塩基のあるタイプ（例えば、ウラシル）の少なくとも９５％は、修飾核酸塩基である。いくつかの実施形態において、ＭＣＭポリペプチドをコードするウラシル変更配列中のウラシルの少なくとも９５％は、５－メトキシウリジンである。いくつかの実施形態において、本明細書で開示されるＭＣＭポリペプチドをコードするヌクレオチド配列と、ｍｉＲＮＡ結合部位とを含む、ポリヌクレオチドは、送達剤（例えば、式（Ｉ）を有する化合物、例えば、化合物１～１４７のうちのいずれか）とともに製剤化される。

【０４８６】

３’ＵＴＲ及びＡＵリッチ要素

本開示はまた、１つ以上の３'非翻訳領域と、本明細書に記載されるポリヌクレオチド、すなわち、ＭＣＭポリペプチドをコードするＯＲＦを含むポリヌクレオチドの両方を含む、ポリヌクレオチドを含み得る。

【０４８７】

天然または野生型３’ＵＴＲは、３’ＵＴＲ中に埋め込まれたアデノシン及びウリジンのストレッチを有することが知られている。これらのＡＵに富むシグネチャーは、代謝回転率が高い遺伝子に特に多くみられる。これらの配列の特徴及び機能特性に基づいて、ＡＵに富む要素（ＡＲＥ）は、次の３つのクラスに分けることができる（Ｃｈｅｎ　ｅｔ　ａｌ，１９９５）：クラスＩ　ＡＲＥは、Ｕリッチ領域内にＡＵＵＵＡモチーフのいくつかのコピーを分散して含有する。Ｃ－Ｍｙｃ及びＭｙｏＤは、クラスＩ　ＡＲＥを含有する。クラスＩＩ　ＡＲＥは、２つ以上の重複するＵＵＡＵＵＵＡ（Ｕ／Ａ）（Ｕ／Ａ）九量体を有する。このタイプのＡＲＥを含有する分子には、ＧＭ－ＣＳＦ及びＴＮＦ－ａが含まれる。クラスＩＩＩ　ＡＲＥＳは、あまり十分に定義されていない。これらのＵリッチ領域は、ＡＵＵＵＡモチーフを含有しない。ｃ－Ｊｕｎ及びミオゲニンは、このクラスのうちで十分に研究された２例である。ＡＲＥに結合する大部分のタンパク質は、メッセンジャーを不安定化することが知られているが、ＥＬＡＶファミリーのメンバー、とりわけＨｕＲは、ｍＲＮＡの安定性を増加させることが実証されている。ＨｕＲは、３つのクラス全てのＡＲＥに結合する。核酸分子の３’ＵＴＲにＨｕＲ特異的結合部位を操作導入すると、ＨｕＲ結合がもたらされ、これにより、ｉｎ　ｖｉｖｏにおいてメッセージが安定化する。

【０４８８】

３’ＵＴＲ　ＡＵリッチ要素（ＡＲＥ）の導入、除去または修飾を使用して、本開示のポリヌクレオチドの安定性を調節することができる。特定のポリヌクレオチドを操作する場合、ＡＲＥの１つ以上のコピーを導入して本開示のポリヌクレオチドの安定性を低下させ、これにより、翻訳を減らし、結果として生じるタンパク質の生産を減少させることができる。同様に、細胞内安定性を増すために、ＡＲＥを特定して、除去または変異させ、これにより、翻訳及び結果として生じるタンパク質の生産を増加させることができる。本開示のポリヌクレオチドを使用して、関連する細胞株でのトランスフェクション実験を実施することができ、トランスフェクション後の様々な時点でタンパク質生産を分析することができる。例えば、異なるＡＲＥ操作分子を細胞にトランスフェクトし、関連するタンパク質に対するＥＬＩＳＡキットを使用し、トランスフェクションから６時間、１２時間、２４時間、４８時間及び７日後に生産されたタンパク質を分析することができる。

【０４８９】

５’キャップを有する領域

本開示はまた、５’キャップと、本明細書に記載されるポリヌクレオチド、すなわち、ＭＣＭポリペプチドをコードするＯＲＦを含むポリヌクレオチドの両方を含む、ポリヌクレオチドを含み得る。

【０４９０】

天然ｍＲＮＡの５’キャップ構造は、核外輸送に関与し、ｍＲＮＡ安定性を高め、ｍＲＮＡキャップ結合タンパク質（ＣＢＰ）と結合する。ＣＢＰは、ポリ（Ａ）結合タンパク質と

会合し、成熟環式ｍＲＮＡ種を形成することにより、細胞内でのｍＲＮＡ安定性及び翻訳能力に関与する。キャップは、更に、ｍＲＮＡスプライシング中に、５’隣接イントロンの除去を助ける。

【０４９１】

内因性ｍＲＮＡ分子は、５’末端キャップされ、ｍＲＮＡ分子の末端グアノシンキャップ残基と５’末端転写センスヌクレオチドとの間に５’－ｐｐｐ－５’－三リン酸結合が生じ得る。次いで、この５’－グアニル酸キャップがメチル化され、Ｎ７－メチル－グアニル酸残基が生じ得る。ｍＲＮＡの５’末端の末端及び／または末端前の転写ヌクレオチドのリボース糖もまた、任意選択により２’－Ｏ－メチル化され得る。グアニル酸キャップ構造の加水分解及び切断を介した５’キャップ除去は、分解のために、ｍＲＮＡ分子などの核酸分子を標的にし得る。

【０４９２】

いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、キャップ部分を組み込むように設計され得る。本開示のポリヌクレオチドに対する修飾は、キャップ除去を防ぐことにより、ｍＲＮＡの半減期を増加させる、非加水分解性キャップ構造を生成してもよい。キャップ構造の加水分解には、５’－ｐｐｐ－５’ホスホロジエステル結合の切断を必要とするので、キャッピング反応中に修飾ヌクレオチドを使用することができる。例えば、Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ（Ｉｐｓｗｉｃｈ，ＭＡ）のワクシニアキャッピング酵素をα－チオ－グアノシンヌクレオチドとともに製造元の説明書に従って使用して、５’－ｐｐｐ－５’キャップ中にホスホロチオエート結合を生成することができる。α－メチル－ホスフェート及びセレノ－ホスフェートヌクレオチドなどの追加の修飾グアノシンヌクレオチドが使用されてもよい。

【０４９３】

追加の修飾には、糖環の２’－ヒドロキシル基上の、ポリヌクレオチドの５’末端及び／または５’末端前のヌクレオチドのリボース糖の２’－Ｏ－メチル化（上記のように）が含まれるが、これらに限定されない。複数の異なる５’キャップ構造を使用して、ｍＲＮＡ分子として機能するポリヌクレオチドなどの核酸分子の５’キャップを生成することができる。

【０４９４】

本明細書中、合成キャップ類似体、化学キャップ、化学キャップ類似体または構造もしくは機能キャップ類似体とも称される、キャップ類似体は、キャップ機能を維持しつつも、その化学構造が天然（すなわち、内因性、野生型または生理学的）５’キャップとは異なる。キャップ類似体は、化学的（すなわち、非酵素的）または酵素的に、合成され、かつ／または本開示のポリヌクレオチドに連結することができる。

【０４９５】

例えば、アンチリバースキャップ類似体（ＡＲＣＡ）キャップは、５’－５’－三リン酸基によって結合された２つのグアニンを含有し、１つのグアニンは、Ｎ７メチル基及び３’－Ｏ－メチル基を含有する（すなわち、Ｎ７，３’－Ｏ－ジメチル－グアノシン－５’－三リン酸－５’－グアノシン（m^7Ｇ－３’ｍｐｐｐ－Ｇ；同様の意味合いで、３’Ｏ－Ｍｅ－m^7Ｇ（５'）ｐｐｐ（５'）Ｇと称され得る）。他の非修飾グアニンの３’－Ｏ原子は、キャップされたポリヌクレオチドの５’末端ヌクレオチドに結合される。Ｎ７－及び３’－Ｏ－メチル化グアニンは、キャップされたポリヌクレオチドの末端部分を提供する。

【０４９６】

別の例示的なキャップは、ｍＣＡＰであり、ＡＲＣＡに類似するものであるが、グアノシン上に２’－Ｏ－メチル基を有する（すなわち、Ｎ７，２’－Ｏ－ジメチル－グアノシン－５’－トリホスフェート－５’－グアノシン、^{m}Ｇｍ－ｐｐｐ－Ｇ）。

【０４９７】

いくつかの実施形態において、キャップは、ジヌクレオチドキャップ類似体である。非限定的な例として、ジヌクレオチドキャップ類似体は、米国特許第ＵＳ８，５１９，１１０号（その内容全体を参照により本明細書に援用する）に記載されているジヌクレオチドキャップ類似体のように、異なるリン酸位置で、ボラノリン酸基またはホホロセレノ酸基に

より、修飾されてもよい。
【０４９８】
別の実施形態において、キャップは、キャップ類似体であり、当該技術分野において知られており、かつ／または本明細書に記載されるキャップ類似体のＮ７－（４－クロロフェノキシエチル）置換ジククレオチド形態である。キャップ類似体のＮ７－（４－クロロフェノキシエチル）置換ジククレオチド形態の非限定的な例には、Ｎ７－（４－クロロフェノキシエチル）－Ｇ（５'）ｐｐｐ（５'）Ｇ及びＮ７－（４－クロロフェノキシエチル）－ｍ３'－ＯＧ（５'）ｐｐｐ（５'）Ｇキャップ類似体が挙げられる（例えば、Ｋｏｒｅｅｔ ａｌ．Ｂｉｏｏｒｇａｎｉｃ＆Ｍｅｄｉｃｉｎａｌ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ２０１３；２１：４５７０－４５７４（その内容全体を参照により本明細書に援用する）に記載されている、様々なキャップ類似体及びキャップ類似体の合成方法を参照）。別の実施形態において、本開示のキャップ類似体は、４－クロロ／ブロモフェノキシエチル類似体である。
【０４９９】
キャップ類似体は、ポリヌクレオチドまたはその領域の同時キャッピングが可能であるが、ｉｎ ｖｉｔｒｏ転写反応では、転写物の最大２０％がキャップされないままの状態であり得る。これは、キャップ類似体の構造が内因性細胞転写機構によって生成される核酸の内因性５’キャップ構造とは異なることとともに、翻訳能力の低下及び細胞安定性の低下をもたらすことがある。
【０５００】
本開示のポリヌクレオチドはまた、より真性の５’キャップ構造をもたらすために、酵素を使用して、製造後（ＩＶＴまたは化学合成にかかわらず）にキャップされてもよい。本明細書で使用されるとき、「より真性の」という文言は、内因性または野生型の特徴を構造的または機能的のいずれかで正確に反映または模倣する特徴を指す。すなわち、「より真性の」特徴は、従来技術の合成的特徴または類似体などと比較して、内因性、野生型、天然または生理学的な細胞機能及び／または構造を良好に表すものであり、あるいは、１つ以上の点で、対応する内因性、野生型、天然または生理学的な特徴よりも優れるものである。本開示のより真性の５’キャップ構造の非限定的な例は、当該技術分野において知られている合成５’キャップ構造（または野生型、天然もしくは生理学的な５’キャップ構造）と比較して、とりわけ、キャップ結合タンパク質の結合を向上させ、半減期を延長させ、５’エンドヌクレアーゼに対する感受性を低下させ、及び／または５’キャップ除去を減少させるものである。例えば、組み換えワクシニアウイルスキャッピング酵素及び組み換え２’－Ｏ－メチル基転移酵素は、ポリヌクレオチドの５’末端ヌクレオチドとグアニンキャップヌクレオチドとの間に標準的な５’－５’－三リン酸結合を生成することができ、キャップグアニンは、Ｎ７メチル化を含有し、ｍＲＮＡの５’末端ヌクレオチドは、２’－Ｏ－メチルを含有する。そのような構造は、Ｃａｐ１構造と称される。このキャップは、例えば、当該技術分野において知られている他の５’キャップ類似体構造と比較して、より高い翻訳能力及び細胞安定性と、細胞炎症促進性サイトカインの活性化低下とをもたらす。キャップ構造には、７ｍＧ（５'）ｐｐｐ（５'）Ｎ，ｐＮ２ｐ（ｃａｐ０）、７ｍＧ（５'）ｐｐｐ（５'）ＮｌｍｐＮｐ（ｃａｐ１）、及び７ｍＧ（５'）－ｐｐｐ（５'）ＮｌｍｐＮ２ｍｐ（ｃａｐ２）が含まれるが、これらに限定されない。
【０５０１】
非限定的な例として、製造後のキメラポリヌクレオチドのキャッピングは、キメラポリヌクレオチドのほぼ１００％がキャップされ得るため、より効率的であり得る。これは、ｉｎ ｖｉｔｒｏ転写反応の過程において、キャップ類似体をキメラポリヌクレオチドに結合する場合では約８０％であることと対照的である。
【０５０２】
本開示によれば、５’末端キャップは、内因性キャップまたはキャップ類似体を含み得る。本開示によれば、５’末端キャップは、グアニン類似体を含み得る。有用なグアニン類似体には、イノシン、Ｎ１－メチル－グアノシン、２’フルオロ－グアノシン、７－デアザ－グアノシン、８－オキソ－グアノシン、２－アミノ－グアノシン、ＬＮＡ－グアノシン及び

２－アジド－グアノシンが含まれるが、これらに限定されない。
【０５０３】
ポリＡテール
本開示はまた、ポリＡテールと、本明細書に記載されるポリヌクレオチド、すなわち、ＭＣＭポリペプチドをコードするＯＲＦを含むポリヌクレオチドの両方を含む、ポリヌクレオチドを含む。
【０５０４】
ｍＲＮＡ分子などのポリヌクレオチドには、ＲＮＡプロセシング中に、安定性を高めるために、アデニンヌクレオチド（ポリＡテール）の長鎖が付加され得る。転写の直後に、転写物の３'末端が切断されて、３'ヒドロキシルを遊離し得る。次いで、ポリＡポリメラーゼがＲＮＡにアデニンヌクレオチド鎖を付加する。ポリアデニル化と呼ばれるこの過程は、例えば、およそ８０、９０、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０、１６０、１７０、１８０、１９０、２００、２１０、２２０、２３０、２４０または２５０残基長を含む、およそ８０～およそ２５０残基長であり得る、ポリＡテールを付加する。
【０５０５】
ポリＡテールはまた、構築物が核から輸送された後に付加されることもある。
【０５０６】
本開示によれば、ポリＡテール上の末端基は、安定化のために組み込まれ得る。本開示のポリヌクレオチドは、デス－３'ヒドロキシルテールを含み得る。本開示のポリヌクレオチドはまた、Ｊｕｎｊｉｅ Ｌｉらが教示するような構造部分または２'－Ｏメチル修飾を含んでもよい（Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｖｏｌ．１５，１５０１－１５０７，Ａｕｇｕｓｔ ２３，２００５、その内容全体を参照により本明細書に援用する）。
【０５０７】
本開示のポリヌクレオチドは、ヒストンｍＲＮＡを含む、代替ポリＡテール構造を含む転写物をコードするように設計することができる。Ｎｏｒｂｕｒｙによれば、「ヒト複製依存的ヒストンｍＲＮＡ上において、末端ウリジル化も検出された。これらのｍＲＮＡのターンオーバーは、染色体ＤＮＡ複製の完了または阻害後の潜在的に有毒なヒストン蓄積の防止に重要であると考えられる。これらのｍＲＮＡは、３’ポリ（Ａ）テールの欠如によって区別され、その機能は、代わりに、安定したステムループ構造及びその同種ステムループ結合タンパク質（ＳＬＢＰ）が担っており、後者は、ポリアデニル化ｍＲＮＡ上のＰＡＢＰと同じ機能を果たしている」（Ｎｏｒｂｕｒｙ，”Ｃｙｔｏｐｌａｓｍｉｃ ＲＮＡ：ａ ｃａｓｅ ｏｆ ｔｈｅ ｔａｉｌ ｗａｇｇｉｎｇ ｔｈｅ ｄｏｇ，” Ｎａｔｕｒｅ Ｒｅｖｉｅｗｓ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌｏｇｙ；ＡＯＰ、２０１３年８月２９日オンライン掲載；ｄｏｉ：１０．１０３８／ｎｒｍ３６４５、その内容全体を参照により本明細書に援用する）。
【０５０８】
特有のポリＡテール長は、本開示のポリヌクレオチドにある特定の利点を提供する。
【０５０９】
一般に、ポリＡテールの長さは、存在する場合、３０ヌクレオチド長より長い。別の実施形態において、ポリＡテールは、３５ヌクレオチド長より長い（例えば、少なくとも約３５、４０、４５、５０、５５、６０、７０、８０、９０、１００、１２０、１４０、１６０、１８０、２００、２５０、３００、３５０、４００、４５０、５００、６００、７００、８００、９００、１，０００、１，１００、１，２００、１，３００、１，４００、１，５００、１，６００、１，７００、１，８００、１，９００、２，０００、２，５００及び３，０００またはこれを超えるヌクレオチド）。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドまたはその領域は、約３０～約３，０００ヌクレオチド（例えば、３０～５０、３０～１００、３０～２５０、３０～５００、３０～７５０、３０～１，０００、３０～１，５００、３０～２，０００、３０～２，５００、５０～１００、５０～２５０、５０～５００、５０～７５０、５０～１，０００、５０～１，５００、５０～２，０００、５０～２，５００、５０～３，０００、１００～５００、１００～７５０、１００～

１，０００、１００～１，５００、１００～２，０００、１００～２，５００、１００～３，０００、５００～７５０、５００～１，０００、５００～１，５００、５００～２，０００、５００～２，５００、５００～３，０００、１，０００～１，５００、１，０００～２，０００、１，０００～２，５００、１，０００～３，０００、１，５００～２，０００、１，５００～２，５００、１，５００～３，０００、２，０００～３，０００、２，０００～２，５００及び２，５００～３，０００）を含む。

【０５１０】

いくつかの実施形態において、ポリＡテールは、ポリヌクレオチド全体の長さまたはポリヌクレオチドの特定領域の長さを基準として設計される。この設計は、コーディング領域の長さ、特定の特徴または領域の長さに基づき得るか、ポリヌクレオチドから発現される最終産物の長さに基づき得る。

【０５１１】

この場合、ポリＡテールは、ポリヌクレオチドまたはその特徴よりも１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０または１００％超の長さであり得る。ポリＡテールはまた、属するポリヌクレオチドの一部として設計されてもよい。この場合、ポリＡテールは、構築物の全長、構築物領域またはポリＡテールを差し引いた構築物の全長の１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０もしくは９０％またはそれ以上であり得る。更に、操作された結合部位及びポリＡ結合タンパク質に対するポリヌクレオチドのコンジュゲートにより、発現が向上し得る。

【０５１２】

更に、複数の異なるポリヌクレオチドが、ポリＡテールの３’末端の修飾ヌクレオチドを使用して、３’末端を介して、ＰＡＢＰ（ポリＡ結合タンパク質）により一緒に連結され得る。関連する細胞株でのトランスフェクション実験を実施することができ、トランスフェクションから１２時間、２４時間、４８時間、７２時間及び７日後にＥＬＩＳＡによってタンパク質生産を分析することができる。

【０５１３】

いくつかの実施形態において、本開示のポリヌクレオチドは、ポリＡ－Ｇカルテット領域を含むように設計される。Ｇカルテットは、ＤＮＡ及びＲＮＡの両方において、Ｇリッチ配列によって形成され得る、４つのグアニンヌクレオチドの環状水素結合配列である。本実施形態において、Ｇカルテットは、ポリＡテールの末端に組み込まれる。得られたポリヌクレオチドは、安定性、タンパク質生産、及び様々な時点における半減期を含む他のパラメーターについて分析される。ポリＡ－Ｇカルテットは、１２０ヌクレオチドのポリＡテールのみを使用したときにみられるタンパク質生産の少なくとも７５％に相当するｍＲＮＡからのタンパク質生産をもたらすことが見出されている。

【０５１４】

開始コドン領域

本開示はまた、開始コドン領域と、本明細書に記載されるポリヌクレオチド、すなわち、ＭＣＭポリペプチドをコードするＯＲＦを含むポリヌクレオチドの両方を含む、ポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、本開示のポリヌクレオチドは、開始コドン領域に類似するか、開始コドン領域と同様に機能する領域を有し得る。

【０５１５】

いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドの翻訳は、開始コドンＡＵＧではないコドン上で開始してもよい。ポリヌクレオチドの翻訳は、限定するものではないが、ＡＣＧ、ＡＧＧ、ＡＡＧ、ＣＴＧ／ＣＵＧ、ＧＴＧ／ＧＵＧ、ＡＴＡ／ＡＵＡ、ＡＴＴ／ＡＵＵ、ＴＴＧ／ＵＵＧなどの代替開始コドン上で開始し得る（Ｔｏｕｒｉｏｌ ｅｔ ａｌ．Ｂｉｏｌｏｇｙ ｏｆ ｔｈｅ Ｃｅｌｌ ９５（２００３）１６９－１７８及びＭａｔｓｕｄａ ａｎｄ Ｍａｕｒｏ ＰＬｏＳ ＯＮＥ，２０１０ ５：１１参照、それぞれの内容全体を参照により本明細書に援用する）。非限定的な例として、ポリヌクレオチドの翻訳は、代替開始コドンＡＣＧ上で開始する。別の非限定的な例として、ポリヌクレオチド翻訳は、代替開始コドンＣＴＧまたはＣＵＧ上で開始する。更に別の非限定的な例として、

ポリヌクレオチドの翻訳は、代替開始コドンＧＴＧまたはＧＵＧで開始する。
【０５１６】
翻訳を開始するコドン、例えば、限定するものではないが、開始コドンまたは代替開始コドンなどに隣接するヌクレオチドが、ポリヌクレオチドの翻訳効率、長さ及び／または構造に影響を与えることが知られている（例えば、Ｍａｔｓｕｄａ ａｎｄ Ｍａｕｒｏ ＰＬｏＳ ＯＮＥ，２０１０ ５：１１参照、その内容全体を参照により本明細書に援用する）。翻訳を開始するコドンに隣接するヌクレオチドのいずれかのマスキングを利用すると、ポリヌクレオチドの翻訳開始位置、翻訳効率、長さ及び／または構造を変更することができる。
【０５１７】
いくつかの実施形態において、コドンをマスキングまたは遮蔽し、マスキングされる開始コドンまたは代替開始コドンでの翻訳開始の可能性を下げるために、開始コドンまたは代替開始コドンの近傍でマスキング剤を使用することができる。マスキング剤の非限定的な例には、アンチセンスロックド核酸（ＬＮＡ）ポリヌクレオチド及びエキソン接合部複合体（ＥＪＣ）が挙げられる（例えば、マスキング剤のＬＮＡポリヌクレオチド及びＥＪＣについて記載しているＭａｔｓｕｄａ及びＭａｕｒｏ（ＰＬｏＳＯＮＥ、２０１０５：１１）参照、その内容全体を参照により本明細書に援用する）。
【０５１８】
別の実施形態において、翻訳が代替開始コドン上で開始する可能性を高めるために、マスキング剤を使用してポリヌクレオチドの開始コドンをマスキングすることができる。
【０５１９】
いくつかの実施形態において、マスキングされる開始コドンまたは代替開始コドンの下流にある開始コドンまたは代替開始コドン上で翻訳が開始する可能性を高めるために、マスキング剤を使用して最初の開始コドンまたは代替開始コドンをマスキングすることができる。
【０５２０】
いくつかの実施形態において、開始コドンまたは代替開始コドンは、ｍｉＲ結合部位のための完全相補体内に位置し得る。ｍｉＲ結合部位の完全相補体は、マスキング剤と同様に、ポリヌクレオチドの翻訳、長さ及び／または構造の調節を助け得る。非限定的な例として、開始コドンまたは代替開始コドンは、ｍｉＲ－１２２結合部位のための完全相補体の中央に位置し得る。開始コドンまたは代替開始コドンは、１番目のヌクレオチド、２番目のヌクレオチド、３番目のヌクレオチド、４番目のヌクレオチド、５番目のヌクレオチド、６番目のヌクレオチド、７番目のヌクレオチド、８番目のヌクレオチド、９番目のヌクレオチド、１０番目のヌクレオチド、１１番目のヌクレオチド、１２番目のヌクレオチド、１３番目のヌクレオチド、１４番目のヌクレオチド、１５番目のヌクレオチド、１６番目のヌクレオチド、１７番目のヌクレオチド、１８番目のヌクレオチド、１９番目のヌクレオチド、２０番目のヌクレオチドまたは２１番目のヌクレオチドの後に位置し得る。
【０５２１】
別の実施形態において、ポリヌクレオチドの翻訳を開始コドンではないコドンから開始させるために、ポリヌクレオチドの開始コドンがポリヌクレオチド配列から除去されてもよい。ポリヌクレオチドの翻訳は、除去された開始コドンの後にあるコドン上、または下流の開始コドンもしくは代替開始コドン上で開始し得る。非限定的な例において、下流の開始コドンまたは代替開始コドン上で翻訳を開始させるために、ポリヌクレオチド配列の最初の３ヌクレオチドである開始コドンＡＴＧまたはＡＵＧが除去される。開始コドンが除去されたポリヌクレオチド配列は、翻訳の開始、ポリヌクレオチドの長さ及び／またはポリヌクレオチドの構造を調節するか、調節を試みるために、下流の開始コドン及び／または代替開始コドンのための少なくとも１つのマスキング剤を更に含み得る。
【０５２２】
終止コドン領域
本開示はまた、終止コドン領域と、本明細書に記載されるポリヌクレオチド、すなわち、

ＭＣＭポリペプチドをコードするＯＲＦを含むポリヌクレオチドの両方を含む、ポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、本開示のポリヌクレオチドは、３'非翻訳領域（ＵＴＲ）の前に少なくとも２つの終止コドンを含み得る。終止コドンは、ＴＧＡ、ＴＡＡ及びＴＡＧから選択することができる。いくつかの実施形態において、本開示のポリヌクレオチドは、終止コドンＴＧＡ及び１つの追加の終止コドンを含む。更なる実施形態において、追加の終止コドンは、ＴＡＡであり得る。別の実施形態において、本開示のポリヌクレオチドは、３つの終止コドンを含む。

【０５２３】

挿入及び置換

本開示はまた、本明細書に記載されるポリヌクレオチド、すなわち、ＭＣＭポリペプチドをコードするＯＲＦを含むポリヌクレオチド中に挿入及び／または置換を含む、ポリヌクレオチドを含む。

【０５２４】

いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドの５'ＵＴＲを、同一塩基の少なくとも１つの領域及び／または一続きのヌクレオシドの挿入によって置き換えることができる。領域及び／または一続きのヌクレオチドは、少なくとも３、少なくとも４、少なくとも５、少なくとも６、少なくとも７または少なくとも８ヌクレオチドを含み得るが、これらに限定されず、ヌクレオチドは、天然及び／または非天然であり得る。非限定的な例として、ヌクレオチド群は、５～８個のアデニン、シトシン、チミン、本明細書で開示される他のヌクレオチドのいずれかの一続き及び／またはこれらの組み合わせを含み得る。

【０５２５】

いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドの５'ＵＴＲは、限定するものではないが、アデニン、シトシン、チミン、本明細書で開示される他のヌクレオチドのいずれか及び／またはこれらの組み合わせなどの２つの異なる塩基の少なくとも２つの領域及び／または一続きのヌクレオチドの挿入によって置換され得る。例えば、５'ＵＴＲは、５～８個のアデニン塩基の挿入と、それに続く５～８個のシトシン塩基の挿入によって置き換えられ得る。別の例において、５'ＵＴＲは、５～８個のシトシン塩基の挿入と、それに続く５～８個のアデニン塩基の挿入によって置き換えられ得る。

【０５２６】

いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、ＲＮＡポリメラーゼによって認識され得る転写開始点の下流に、少なくとも１つの置換及び／または挿入を含み得る。非限定的な例として、少なくとも１つの置換及び／または挿入が転写開始点のすぐ下流の領域中（限定するものではないが、＋１～＋６など）の少なくとも１つの核酸を置換することによって、転写開始点の下流で生じてよい。転写開始点のすぐ下流のヌクレオチド領域に対する変更は、開始速度に影響を与え、見かけのヌクレオチド三リン酸（ＮＴＰ）反応定数値を増加させ、転写複合体からの短い転写物の解離を増加させて初期転写を修正する（ｃｕｒｉｎｇ）ことができる（Ｂｒｉｅｂａ ｅｔ ａｌ，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ（２００２）４１：５１４４－５１４９、その全体を参照により本明細書に援用する）。少なくとも１つのヌクレオシドの修飾、置換及び／または挿入は、配列のサイレント変異をもたらしてもよいし、アミノ酸配列に変異をもたらしてもよい。

【０５２７】

いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、転写開始点の下流に、少なくとも１、少なくとも２、少なくとも３、少なくとも４、少なくとも５、少なくとも６、少なくとも７、少なくとも８、少なくとも９、少なくとも１０、少なくとも１１、少なくとも１２または少なくとも１３個のグアニン塩基の置換を含み得る。

【０５２８】

いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、転写開始点のすぐ下流の領域中に、少なくとも１、少なくとも２、少なくとも３、少なくとも４、少なくとも５または少なくとも６個のグアニン塩基の置換を含み得る。非限定的な例として、領域中のヌクレオチドがＧＧＧＡＧＡである場合、グアニン塩基は、少なくとも１、少なくとも２、少なくとも

３または少なくとも４個のアデニンヌクレオチドで置換され得る。別の非限定的な例において、領域中のヌクレオチドがＧＧＧＡＧＡである場合、グアニン塩基は、少なくとも１、少なくとも２、少なくとも３または少なくとも４個のシトシン塩基で置換され得る。別の非限定的な例において、領域中のヌクレオチドがＧＧＧＡＧＡである場合、グアニン塩基は、少なくとも１、少なくとも２、少なくとも３もしくは少なくとも４個のチミン及び／または本明細書に記載されるヌクレオチドのいずれかで置換され得る。

【０５２９】

いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、開始コドンの上流に少なくとも１つの置換及び／または挿入を含み得る。明確さのために記すと、開始コドンがタンパク質コーディング領域の最初のコドンであるのに対し、転写開始点は転写が開始する部位であることを当業者であれば認識するであろう。ポリヌクレオチドは、少なくとも１、少なくとも２、少なくとも３、少なくとも４、少なくとも５、少なくとも６、少なくとも７または少なくとも８個のヌクレオチド塩基の置換及び／または挿入を含み得るが、これらに限定されない。ヌクレオチド塩基は、開始コドンの上流の１つ、少なくとも１つ、少なくとも２つ、少なくとも３つ、少なくとも４つまたは少なくとも５つの位置において、挿入または置換され得る。挿入及び／または置換されるヌクレオチドは、同一塩基（例えば、全てＡまたは全てＣまたは全てＴまたは全てＧ）、２つの異なる塩基（例えば、Ａ及びＣ、Ａ及びＴ、またはＣ及びＴ）、３つの異なる塩基（例えば、Ａ、Ｃ及びＴまたはＡ、Ｃ及びＴ）または少なくとも４つの異なる塩基であり得る。非限定的な例として、ポリヌクレオチド中のコーディング領域の上流にあるグアニン塩基が、アデニン、シトシン、チミンまたは本明細書に記載されるヌクレオチドのいずれかで置換され得る。別の非限定的な例において、ポリヌクレオチド中のグアニン塩基の置換は、転写開始点の下流及び開始コドン前の領域中に１つのグアニン塩基が残るように設計され得る（Ｅｓｖｅｌｔ　ｅｔ　ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ（２０１１）４７２（７３４４）：４９９－５０３参照、その内容全体を参照により本明細書に援用する）。非限定的な例として、転写開始点の下流であるが、開始コドンの上流である１つの位置に少なくとも５ヌクレオチドが挿入され得、少なくとも５ヌクレオチドは、同じ塩基タイプであり得る。

【０５３０】

ＩＶ．ポリヌクレオチドの作製方法

本開示はまた、本明細書で開示されるポリヌクレオチドまたはその相補体を作製するための方法を提供する。いくつかの態様において、本明細書で開示される、ＭＣＭポリペプチドまたはその機能性断片をコードするポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡ）は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ転写を使用して構築することができる。他の態様において、本明細書で開示される、ＭＣＭポリペプチドまたはその機能性断片をコードするポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡ）は、オリゴヌクレオチド合成装置を使用する化学合成によって構築することができる。他の態様において、本明細書で開示される、ＭＣＭポリペプチドまたはその機能性断片をコードするポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡ）は、宿主細胞を使用することによって作製される。特定の態様において、本明細書で開示される、ＭＣＭポリペプチドまたはその機能性断片をコードするポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡ）は、ＩＶＴ、化学合成、宿主細胞発現または当該技術分野において知られている任意の他の方法のうちの１つ以上の組み合わせによって作製される。

【０５３１】

天然ヌクレオシド、非天然ヌクレオシドまたはこれらの組み合わせは、候補ヌクレオチド配列中に存在する天然ヌクレオシドを完全にまたは部分的に置き換えることができ、ＭＣＭポリペプチドをコードする配列最適化ヌクレオチド配列（例えば、ｍＲＮＡ）に組み込むことができる。次いで、得られたｍＲＮＡは、タンパク質を生産する能力及び／または治療効果をもたらす能力について試験され得る。

【０５３２】

ｉｎ　ｖｉｔｒｏ転写：酵素的合成

本明細書で開示されるポリヌクレオチドは、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ転写（ＩＶＴ）システムを

使用して転写することができる。このシステムは、典型的に、転写バッファー、ヌクレオチド三リン酸（ＮＴＰ）、ＲＮａｓｅ阻害剤及びポリメラーゼを備える。ＮＴＰは、天然及び非天然（修飾）ＮＴＰを含む、本明細書に記載されるものから選択することができるが、これらに限定されない。ポリメラーゼは、Ｔ７　ＲＮＡポリメラーゼ、Ｔ３　ＲＮＡポリメラーゼ及び変異ポリメラーゼ（限定するものではないが、修飾核酸を組み込むことができるポリメラーゼなど）から選択することができるが、これらに限定されない。米国特許出願公開第ＵＳ２０１３０２５９９２３号を参照されたい（その全体を参照により本明細書に援用する）。

【０５３３】

ＩＶＴシステムは、典型的に、転写バッファー、ヌクレオチド三リン酸（ＮＴＰ）、ＲＮａｓｅ阻害剤及びポリメラーゼを備える。ＮＴＰは、天然及び非天然（修飾）ＮＴＰを含む、本明細書に記載されるものから選択することができるが、これらに限定されない。ポリメラーゼは、Ｔ７　ＲＮＡポリメラーゼ、Ｔ３　ＲＮＡポリメラーゼ及び変異ポリメラーゼ（限定するものではないが、本明細書で開示されるポリヌクレオチドを組み込むことができるポリメラーゼなど）から選択することができるが、これらに限定されない。

【０５３４】

任意数のＲＮＡポリメラーゼまたはバリアントを本開示のポリヌクレオチドの合成に使用することができる。

【０５３５】

ＲＮＡポリメラーゼは、ＲＮＡポリメラーゼ配列のアミノ酸を挿入または欠失させることによって修飾することができる。非限定的な例として、ＲＮＡポリメラーゼは、非修飾のＲＮＡポリメラーゼと比較して、２’－修飾ヌクレオチド三リン酸を組み込む能力の増加を示すように修飾され得る（国際公開第ＷＯ２００８０７８１８０号及び米国特許第８，１０１，３８５号参照、これらの全体を参照により本明細書に援用する）。

【０５３６】

バリアントは、ＲＮＡポリメラーゼを進化させ、ＲＮＡポリメラーゼのアミノ酸及び／もしくは核酸配列を最適化することによって、ならびに／または当該技術分野において知られている他の方法を使用することによって、得ることができる。非限定的な例として、Ｅｓｖｅｌｔらによって記載された持続的定向進化システム（Ｎａｔｕｒｅ（２０１１）４７２（７３４４）：４９９－５０３、その全体を参照により本明細書に援用する）を使用して、Ｔ７　ＲＮＡポリメラーゼバリアントを進化させることができ、この場合、Ｔ７　ＲＮＡポリメラーゼのクローンは、限定するものではないが、位置９３のリシンのトレオニンでの置換（Ｋ９３Ｔ）、Ｉ４Ｍ、Ａ７Ｔ、Ｅ６３Ｖ、Ｖ６４Ｄ、Ａ６５Ｅ、Ｄ６６Ｙ、Ｔ７６Ｎ、Ｃ１２５Ｒ、Ｓ１２８Ｒ、Ａ１３６Ｔ、Ｎ１６５Ｓ、Ｇ１７５Ｒ、Ｈ１７６Ｌ、Ｙ１７８Ｈ、Ｆ１８２Ｌ、Ｌ１９６Ｆ、Ｇ１９８Ｖ、Ｄ２０８Ｙ、Ｅ２２２Ｋ、Ｓ２２８Ａ、Ｑ２３９Ｒ、Ｔ２４３Ｎ、Ｇ２５９Ｄ、Ｍ２６７Ｉ、Ｇ２８０Ｃ、Ｈ３００Ｒ、Ｄ３５１Ａ、Ａ３５４Ｓ、Ｅ３５６Ｄ、Ｌ３６０Ｐ、Ａ３８３Ｖ、Ｙ３８５Ｃ、Ｄ３８８Ｙ、Ｓ３９７Ｒ、Ｍ４０１Ｔ、Ｎ４１０Ｓ、Ｋ４５０Ｒ、Ｐ４５１Ｔ、Ｇ４５２Ｖ、Ｅ４８４Ａ、Ｈ５２３Ｌ、Ｈ５２４Ｎ、Ｇ５４２Ｖ、Ｅ５６５Ｋ、Ｋ５７７Ｅ、Ｋ５７７Ｍ、Ｎ６０１Ｓ、Ｓ６８４Ｙ、Ｌ６９９Ｉ、Ｋ７１３Ｅ、Ｎ７４８Ｄ、Ｑ７５４Ｒ、Ｅ７７５Ｋ、Ａ８２７Ｖ、Ｄ８５１ＮまたはＬ８６４Ｆなどの少なくとも１つの変異をコードし得る。別の非限定的な例として、Ｔ７　ＲＮＡポリメラーゼバリアントは、米国特許出願公開第２０１００１２００２４号及び同第２００７０１１７１１２号（これらの全体を参照により本明細書に援用する）に記載されているような少なくとも変異をコードし得る。ＲＮＡポリメラーゼのバリアントにはまた、置換バリアント、保存アミノ酸置換、挿入バリアント、欠失バリアント及び／または共有結合誘導体が含まれ得るが、これらに限定されない。

【０５３７】

一態様において、ポリヌクレオチドは、野生型またはバリアントＲＮＡポリメラーゼによって認識されるように設計され得る。それを行う際、ポリヌクレオチドは、野生型または

親キメラポリヌクレオチドからの配列変化部位または領域を含有するように修飾することができる。

【０５３８】

ポリヌクレオチドまたは核酸の合成反応は、ポリメラーゼを利用する酵素的方法によって実施することができる。ポリメラーゼは、ポリヌクレオチド鎖または核酸鎖中のヌクレオチド間のホスホジエステル結合の生成を触媒する。現在知られているＤＮＡポリメラーゼは、アミノ酸配列比較及び結晶構造解析に基づいて、異なるファミリーに分類することができる。ＤＮＡポリメラーゼＩ（ｐｏｌ　Ｉ）またはＡポリメラーゼファミリーは、Ｅ．ＣｏｌｉのＫｌｅｎｏｗ断片、Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ＤＮＡポリメラーゼＩ、Ｔｈｅｒｍｕｓ　ａｑｕａｔｉｃｕｓ（Ｔａｑ）ＤＮＡポリメラーゼ、ならびにＴ７　ＲＮＡ及びＤＮＡポリメラーゼを含み、これらのファミリーのなかで最もよく研究されている。別の大きなファミリーは、ＤＮＡポリメラーゼα（ｐｏｌ　α）またはＢポリメラーゼファミリーであり、全ての真核生物複製ＤＮＡポリメラーゼならびにファージＴ４及びＲＢ６９に由来するポリメラーゼを含む。これらは類似の触媒機構を用いるが、これらのポリメラーゼファミリーは、基質特異性、基質類似体組み込み効率、プライマー伸長の程度及び速度、ＤＮＡ合成様式、エキソヌクレアーゼ活性、ならびに阻害剤に対する感受性が異なる。

【０５３９】

ＤＮＡポリメラーゼはまた、反応温度、ｐＨ及び鋳型とプライマーの濃度などの必要とされる至適反応条件に基づいて選択される。所望のＤＮＡ断片サイズ及び合成効率を達成するために、２つ以上のＤＮＡポリメラーゼの組み合わせが用いられることがある。例えば、Ｃｈｅｎｇらは、ｐＨを上げ、グリセロール及びジメチルスルホキシドを添加し、変性時間を減らし、伸長時間を延ばし、３’→５’エキソヌクレアーゼ活性を有する二次熱安定性ＤＮＡポリメラーゼを利用して、クローンのインサート及びヒトゲノムＤＮＡから長い標的を効率的に増幅している（Ｃｈｅｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，ＰＮＡＳ，Ｖｏｌ．９１，５６９５－５６９９（１９９４）、その内容全体を参照により本明細書に援用する）。バクテリオファージＴ３、Ｔ７及びＳＰ６に由来するＲＮＡポリメラーゼは、生化学的及び生物物理学的研究のためのＲＮＡを調製するために広く使用されている。ＲＮＡポリメラーゼ、キャッピング酵素及びポリＡポリメラーゼについては、同時係属中の国際公開第ＷＯ２０１４０２８４２９号に開示されており、その内容全体を参照により本明細書に援用する。

【０５４０】

一態様において、本明細書に記載されるポリヌクレオチドの合成に使用することができるＲＮＡポリメラーゼは、Ｓｙｎ５　ＲＮＡポリメラーゼである（Ｚｈｕ　ｅｔ　ａｌ．Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　２０１３参照、その内容全体を参照により本明細書に援用する）。Ｓｙｎ５　ＲＮＡポリメラーゼは、先頃、Ｚｈｕらによって海洋性シアノファージＳｙｎ５から特徴付けされたものであり、プロモーター配列も特定されている（Ｚｈｕ　ｅｔ　ａｌ．Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　２０１３参照、その内容全体を参照により本明細書に援用する）。Ｚｈｕらは、Ｓｙｎ５　ＲＮＡポリメラーゼが、Ｔ７　ＲＮＡポリメラーゼと比較して、幅広い温度範囲及び塩度範囲でＲＮＡ合成を合成することを見出した。更に、Ｓｙｎ５　ＲＮＡポリメラーゼは、プロモーターの開始ヌクレオチドに関する要件がＴ７　ＲＮＡポリメラーゼと比較してあまり厳しくないことが判明したことから、Ｓｙｎ５　ＲＮＡポリメラーゼは、ＲＮＡ合成に有望なものとなっている。

【０５４１】

一態様において、本明細書に記載されるポリヌクレオチドの合成に、Ｓｙｎ５　ＲＮＡポリメラーゼを使用することができる。非限定的な例として、正確な３’末端を必要とするポリヌクレオチドの合成に、Ｓｙｎ５　ＲＮＡポリメラーゼを使用することができる。

【０５４２】

一態様において、ポリヌクレオチドの合成に、Ｓｙｎ５プロモーターを使用することができる。非限定的な例として、Ｓｙｎ５プロモーターは、Ｚｈｕらによって記載されるような５’－ＡＴＴＧＧＧＣＡＣＣＣＧＴＡＡＧＧＧ－３’であり得る（Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉ

ｄｓ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　２０１３、その内容全体を参照により本明細書に援用する）。
【０５４３】
一態様において、本明細書に記載される少なくとも１つの化学修飾及び／または当該技術分野において知られている少なくとも１つの化学修飾を含むポリヌクレオチドの合成に、Ｓｙｎ５　ＲＮＡポリメラーゼを使用することができる（例えば、Ｚｈｕ　ｅｔ　ａｌ．Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　２０１３に記載されているプソイド－ＵＴＰ及び５Ｍｅ－ＣＴＰの組み込みを参照、その内容全体を参照により本明細書に援用する）。
【０５４４】
一態様において、本明細書に記載されるポリヌクレオチドは、Ｚｈｕらが記載する改変及び改良された精製手順を使用して精製されたＳｙｎ５　ＲＮＡポリメラーゼを使用して合成することができる（Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　２０１３、その内容全体を参照により本明細書に援用する）。
【０５４５】
遺伝子工学における各種ツールは、鋳型として作用する標的遺伝子の酵素的増幅に基づいている。個々の遺伝子または特定の関心領域の配列及び他の研究ニーズに関する研究には、ポリヌクレオチドまたは核酸の少量の試料から標的遺伝子の複数のコピーを生成する必要がある。そのような方法を、本開示のポリヌクレオチドの製造に適用することができる。
【０５４６】
ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）は、標的遺伝子の迅速な増幅、ならびにゲノムマッピング及び配列決定に広く適用されている。ＤＮＡを合成するための主要構成成分は、鋳型としての標的ＤＮＡ分子、標的ＤＮＡ鎖の末端に相補的なプライマー、基本成分としてのデオキシヌクレオシド三リン酸（ｄＮＴＰ）及びＤＮＡポリメラーゼを含む。ＰＣＲは、変性、アニーリング及び伸長の各ステップを経るにつれて、新たに生成されたＤＮＡ分子が次の複製サイクルの鋳型として作用し得、標的ＤＮＡの指数関数的増幅が達成される。ＰＣＲは、変性及びアニーリングの加熱及び冷却のサイクルを必要とする。基本的なＰＣＲの変形形態には、非対称ＰＣＲ［Ｉｎｎｉｓ　ｅｔ　ａｌ．，ＰＮＡＳ，ｖｏｌ．８５，９４３６－９４４０（１９８８）］、逆ＰＣＲ［Ｏｃｈｍａｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｇｅｎｅｔｉｃｓ，ｖｏｌ．１２０（３），６２１－６２３，（１９８８）］、逆転写ＰＣＲ（ＲＴ－ＰＣＲ）（Ｆｒｅｅｍａｎ　ｅｔ　ａｌ．，ＢｉｏＴｅｃｈｎｉｑｕｅｓ，ｖｏｌ．２６（１），１１２－２２，１２４－５（１９９９）、これらの内容全体などを参照により本明細書に援用する）が含まれる。ＲＴ－ＰＣＲでは、一本鎖ＲＮＡが所望の標的であり、それが最初に逆転写酵素によって二本鎖ＤＮＡに変換される。
【０５４７】
ＰＣＲの代替または補足として、種々の等温ｉｎ　ｖｉｔｒｏ核酸増幅技術が開発されている。例えば、鎖置換増幅（ＳＤＡ）は、ニックを形成する制限酵素の能力に基づいている（Ｗａｌｋｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，ＰＮＡＳ，ｖｏｌ．８９，３９２－３９６（１９９２）、その内容全体を参照により本明細書に援用する））。アニールされるプライマー配列に制限酵素認識配列を挿入する。プライマーをＤＮＡポリメラーゼ及びｄＮＴＰにより伸長させて二本鎖を形成する。二本鎖の一方のみの鎖を制限酵素によって切断する。これにより、各一本鎖が後続の合成のための鋳型として使用可能となる。ＳＤＡは、ＰＣＲの複雑な温度調節サイクルを必要としない。
【０５４８】
転写媒介増幅（ＴＭＡ）とも呼ばれる核酸配列ベース増幅（ＮＡＳＢＡ）もまた、ＤＮＡポリメラーゼ、逆転写酵素、ＲＮＡｓｅ　Ｈ及びＴ７　ＲＮＡポリメラーゼの組み合わせを利用する、等温増幅法である［Ｃｏｍｐｔｏｎ，Ｎａｔｕｒｅ，ｖｏｌ．３５０，９１－９２（１９９１）、その内容全体を参照により本明細書に援用する］。標的ＲＮＡを鋳型として使用し、逆転写酵素がその相補的ＤＮＡ鎖を合成する。ＲＮＡｓｅ　Ｈは、ＲＮＡ鋳型を加水分解し、ＲＮＡ標的に相補的な第１のＤＮＡ鎖に相補的であるＤＮＡ鎖を合成し、ＤＮＡ二本鎖を形成する、ＤＮＡポリメラーゼためのスペースを作る。Ｔ７　ＲＮＡ

ポリメラーゼは、このＤＮＡ二本鎖の相補的ＲＮＡ鎖を連続的に生成する。これらのＲＮＡ鎖がＤＮＡ合成の新しいサイクルの鋳型として作用し、標的遺伝子の増幅をもたらす。

【０５４９】

ローリングサークル増幅（ＲＣＡ）は、一本鎖環状ポリヌクレオチドを増幅するものであり、Φ２９　ＤＮＡポリメラーゼが、ポリヌクレオチド環の周りを連続的に進行し、その配列を何度も繰り返し複製することによって、プライマーを伸長する、多数の等温酵素的合成ラウンドを伴う。したがって、環状鋳型の線状コピーが達成される。次いで、この線状コピーにプライマーをアニールすることができ、その相補鎖を合成することができる［Ｌｉｚａｒｄｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　Ｇｅｎｅｔｉｃｓ，ｖｏｌ．１９，２２５－２３２（１９９８）参照、その内容全体を参照により本明細書に援用する］。一本鎖環状ＤＮＡはまた、ＲＮＡポリメラーゼの存在下におけるＲＮＡ合成の鋳型としても機能し得る（Ｄａｕｂｅｎｄｉｅｋ　ｅｔ　ａｌ．，ＪＡＣＳ，ｖｏｌ．１１７，７８１８－７８１９（１９９５）、その内容全体を参照により本明細書に援用する）。ｃＤＮＡ末端の逆迅速増幅（ＲＡＣＥ）ＲＣＡは、Ｐｏｌｉｄｏｒｏｓらによって記載されている。メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）を逆転写してｃＤＮＡにした後、ＲＮＡｓｅ　Ｈで処理してｃＤＮＡを分離する。次いで、ｃＤＮＡをＣｉｒｃＬｉｇａｓｅによって環化して環状ＤＮＡにする。これにより得られた環状ＤＮＡの増幅をＲＣＡにより実施する（Ｐｏｌｉｄｏｒｏｓ　ｅｔ　ａｌ．，ＢｉｏＴｅｃｈｎｉｑｕｅｓ，ｖｏｌ．４１，３５－４２（２００６）、その内容全体を参照により本明細書に援用する）。

【０５５０】

本開示のポリヌクレオチドの１つ以上の領域の製造に、前述の方法のいずれかを利用することができる。

【０５５１】

リガーゼによるポリヌクレオチドまたは核酸の組み立てもまた広く使用されている。ＤＮＡまたはＲＮＡリガーゼは、ホスホジエステル結合の形成を介して、ポリヌクレオチド鎖の５’末端と３’末端の分子間ライゲーションを促進する。リガーゼ連鎖反応（ＬＣＲ）は、２つの隣接するポリヌクレオチドプローブが標的遺伝子の一方の鎖にハイブリダイズし、リガーゼによって互いに連結されるという原理に基づいた有望な診断技術である。標的遺伝子が存在しない場合、または標的遺伝子に一塩基多型（ＳＮＰ）などのミスマッチがある場合、プローブはライゲーションされない（Ｗｉｅｄｍａｎｎ　ｅｔ　ａｌ．，ＰＣＲ　Ｍｅｔｈｏｄｓ　ａｎｄ　Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎ，ｖｏｌ．３（４），ｓ５１－ｓ６４（１９９４）、その内容全体を参照により本明細書に援用する）。ＬＣＲは、検出感度を上げるために、またはポリヌクレオチド及び核酸の合成に使用される場合には産物の量を増加させるために、各種増幅技術と組み合わせることができる。

【０５５２】

現在、核酸用のライブラリー作製キットがいくつか市販されている。それらには、少量の核酸試料を、下流アプリケーションのためのインデックス付きライブラリーに変換するための酵素及びバッファーが含まれる。例えば、末端調製、ライゲーション、サイズ選択、クリーンアップ、ＰＣＲ増幅及び最終クリーンアップのために、ＮｅｗＥｎｇｌａｎｄ　ＢｉｏＬａｂｓ（登録商標）のＮＥＢＮＥＸＴ（登録商標）ＵＬＴＲＡＴＭ　ＤＮＡ　Ｌｉｂｒａｒｙ　Ｐｒｅｐ　Ｋｉｔ中にＤＮＡ断片を入れることができる。

【０５５３】

増幅技術を改良するための普段の開発が続けられている。例えば、Ａｓａｄａらの米国特許第８，３６７，３２８号（その内容全体を参照により本明細書に援用する）は、反応エンハンサーを利用してＤＮＡポリメラーゼによるＤＮＡ合成反応の効率を上げることを教示している。反応エンハンサーは、酸性物質または酸性物質のカチオン性錯体を含む。Ｋｉｔａｂａｙａｓｈｉらの米国特許第７．３８４，７３９号（その内容全体を参照により本明細書に援用する）は、酵素的ＤＮＡ合成を促進するカルボン酸イオン供給物質を教示しており、カルボン酸イオン供給物質は、シュウ酸、マロン酸、シュウ酸エステル、マロン酸エステル、マロン酸塩及びマレイン酸エステルから選択される。Ｓｏｂｅｋらの米国

特許第７，３７８，２６２号（その内容全体を参照により本明細書に援用する）は、ＤＮＡ増幅の正確性を高める酵素組成物を開示している。この組成物は、３’エキソヌクレアーゼ活性を有するが、ポリメラーゼ活性を有しない１つの酵素と、ポリメラーゼである別の酵素とを含む。酵素は両方とも熱安定性であり、低温で不活性になるように可逆的に改変されている。

【０５５４】

Ｇｅｔｔｓらの米国特許第７，５５０，２６４号（その内容全体を参照により本明細書に援用する）は、ｃＤＮＡ分子の３’末端上にオリゴデオキシヌクレオチドテールを付着させ、ＲＮＡポリメラーゼを使用するＲＮＡ転写を開始することによって、センスＲＮＡ分子の合成ラウンドを多数回実施することを教示している。Ｒｏｈａｙｅｍの米国特許出願公開第２０１３／０１８３７１８号（その内容全体を参照により本明細書に援用する）は、一本鎖ＤＮＡ鋳型に対してＲＮＡポリメラーゼ活性を示すＲＮＡ依存性ＲＮＡポリメラーゼ（ＲｄＲｐ）によるＲＮＡ合成を教示している。非標準的ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドは、Ｂｅｎｎｅｒの米国特許第６，６１７，１０６号（その内容全体を参照により本明細書に援用する）に開示されているように、非標準的ヌクレオチドを含む鋳型と、鋳型のヌクレオチドに相補的なヌクレオチドの混合物とを接触させることによって、酵素的重合により合成することができる。

【０５５５】

化学合成

目的の単離ポリペプチドをコードする単離ポリヌクレオチド配列を合成するために、標準的な方法を適用することができる。例えば、特定の単離ポリペプチドをコードするコドン最適化ヌクレオチド配列を含有する、単一のＤＮＡまたはＲＮＡオリゴマーを合成することができる。他の態様において、所望のポリペプチドの部分をコードするいくつかの小オリゴヌクレオチドを合成し、次いで、これらをライゲートすることができる。いくつかの態様において、個々のオリゴヌクレオチドは、典型的に、相補的組み立てのための５'または３'オーバーハングを含有する。

【０５５６】

本明細書で開示されるポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡ）は、当該技術分野において知られている化学合成法及び潜在的核酸塩基置換を使用して化学的に合成することができる。例えば、国際公開第ＷＯ２０１４０９３９２４号、同第ＷＯ２０１３０５２５２３号；同第ＷＯ２０１３０３９８５７号、同第ＷＯ２０１２１３５８０５号、同第ＷＯ２０１３１５１６７１号；米国特許出願公開第ＵＳ２０１３０１１５２７２号；または米国特許第ＵＳ８９９９３８０号、同第ＵＳ８７１０２００号（これらの全ての全体を参照により本明細書に援用する）を参照されたい。

【０５５７】

Ｖ．ポリヌクレオチドの精製及び定量

精製

本明細書に記載されるポリヌクレオチド（すなわち、ＭＣＭポリペプチドをコードするＯＲＦを含むポリヌクレオチド）の精製は、ポリヌクレオチドのクリーンアップ、品質保証及び品質管理を含み得るが、これらに限定されない。クリーンアップは、当該技術分野において知られている方法、限定するものではないが、ＡＧＥＮＣＯＵＲＴ（登録商標）ビーズ（Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ　Ｇｅｎｏｍｉｃｓ（Ｄａｎｖｅｒｓ，ＭＡ））、ポリＴビーズ、ＬＮＡ（商標）オリゴＴキャプチャープローブ（ＥＸＩＱＯＮ（登録商標）Ｉｎｃ．（Ｖｅｄｂａｅｋ，Ｄｅｎｍａｒｋ））または限定するものではないが、強陰イオン交換ＨＰＬＣ、弱陰イオン交換ＨＰＬＣ、逆相ＨＰＬＣ（ＲＰ－ＨＰＬＣ）及び疎水性相互作用ＨＰＬＣ（ＨＩＣ－ＨＰＬＣ）などのＨＰＬＣによる精製法などによって実施することができる。「精製されたポリヌクレオチド」などのポリヌクレオチドに関して使用される場合の「精製された」という用語は、少なくとも１つの夾雑物から分離されたものを指す。本明細書で使用されるとき、「夾雑物」とは、不適当、不純または低質の別のものにする任意の物質である。したがって、精製されたポリヌクレオチド（例えば、Ｄ

ＮＡ及びＲＮＡ）は、天然にみられる形態または状況とは異なる形態または状況に存在するか、処理法または精製法に供される前に存在した形態または状況とは異なる形態または状況で存在する。

【０５５８】

いくつかの実施形態において、本開示のポリヌクレオチドの精製は、不必要な免疫応答を低下または除去し得る不純物を除去する（例えば、サイトカイン活性の低下）。

【０５５９】

いくつかの実施形態において、本開示のポリヌクレオチドは、投与前に、カラムクロマトグラフィー（例えば、強陰イオン交換ＨＰＬＣ、弱陰イオン交換ＨＰＬＣ、逆相ＨＰＬＣ（ＲＰ－ＨＰＬＣ）及び疎水性相互作用ＨＰＬＣ（ＨＩＣ－ＨＰＬＣ）または（ＬＣＭＳ））を使用して精製される。いくつかの実施形態において、カラムクロマトグラフィー（例えば、強陰イオン交換ＨＰＬＣ、弱陰イオン交換ＨＰＬＣ、逆相ＨＰＬＣ（ＲＰ－ＨＰＬＣ）及び疎水性相互作用ＨＰＬＣ（ＨＩＣ－ＨＰＬＣ）または（ＬＣＭＳ））により精製された、本明細書で開示されるＭＣＭポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、異なる精製法によって精製されたＭＣＭコードポリヌクレオチドと比較して、ＭＣＭの発現が増加する。いくつかの実施形態において、カラムクロマトグラフィー（例えば、強陰イオン交換ＨＰＬＣ、弱陰イオン交換ＨＰＬＣ、逆相ＨＰＬＣ（ＲＰ－ＨＰＬＣ）及び疎水性相互作用ＨＰＬＣ（ＨＩＣ－ＨＰＬＣ）または（ＬＣＭＳ））により精製されたポリヌクレオチドは、点変異Ｖ６９、Ｔ４９９、Ｈ５３２、Ａ５９８及びＶ６７１のうちの１つ以上を含むＭＣＭポリペプチドまたはその機能性断片をコードする。いくつかの実施形態において、ＲＰ－ＨＰＬＣにより精製されたポリヌクレオチドは、ＭＣＭ発現が増加する（例えば、２０～５０％、少なくとも２０％、少なくとも２５％、少なくとも３０％、少なくとも３５％、少なくとも４０％、少なくとも４５％、または少なくとも５０％）。

【０５６０】

品質保証及び／または品質管理チェックは、限定するものではないが、ゲル電気泳動、ＵＶ吸光度または分析ＨＰＬＣなどの方法を使用して実施することができる。

【０５６１】

別の実施形態において、ポリヌクレオチドは、逆転写酵素ＰＣＲを含むが、これに限定されない方法によって配列決定することができる。

【０５６２】

定量

いくつかの実施形態において、本開示のポリヌクレオチド（すなわち、ＭＣＭポリペプチドをコードするＯＲＦを含むポリヌクレオチド）は、エクソソームで、または１つ以上の体液から得られたときに定量することができる。本明細書で使用されるとき、「体液」には、末梢血、血清、血漿、腹水、尿、脳脊髄液（ＣＳＦ）、痰、唾液、骨髄、滑液、眼房水、羊水、耳垢、母乳、気管支肺胞洗浄液、精液、前立腺液、カウパー腺液または尿道球腺液、汗、糞便物、毛髪、涙、嚢胞液、胸膜及び腹腔液、心膜液、リンパ液、糜粥、乳糜、胆汁、間質液、月経分泌物、膿汁、皮脂、嘔吐物、膣分泌物、粘膜分泌物、糞便水、膵液、副鼻腔からの洗浄液、気管支肺吸引液、胚盤胞液ならびに臍帯血が含まれる。あるいは、エクソソームは、肺、心臓、膵臓、胃、腸管、膀胱、腎臓、卵巣、精巣、皮膚、結腸、乳房、前立腺、脳、食道、肝臓及び胎盤からなる群から選択される器官から取得され得る。

【０５６３】

エキソソーム定量法では、２ｍＬを超えない試料を対象から採取し、サイズ排除クロマトグラフィー、密度勾配遠心分離、分画遠心分離、ナノ膜限外濾過、免疫吸着捕捉、アフィニティー精製、マイクロ流体分離またはこれらの組み合わせによってエキソソームが単離される。分析において、ポリヌクレオチドのレベルまたは濃度は、投与された構築物の発現レベル、存在、非存在、切断または変化であり得る。レベルを、１つ以上の臨床表現型またはヒト疾患バイオマーカーのためのアッセイと相関させることが有利である。アッセイは、構築物特異的プローブ、血球計算、ｑＲＴ－ＰＣＲ、リアルタイムＰＣＲ、ＰＣＲ

、フローサイトメトリー、電気泳動、質量分析またはこれらの組み合わせを使用して実施することができ、エキソソームは、酵素結合免疫吸着法（ＥＬＩＳＡ）などの免疫組織化学を使用して分離することができる。エキソソームはまた、サイズ排除クロマトグラフィー、密度勾配遠心分離、分画遠心分離、ナノ膜限外濾過、免疫吸着捕捉、アフィニティー精製、マイクロ流体分離またはこれらの組み合わせによって単離することができる。

【０５６４】

これらの方法により、研究者は、リアルタイムで、ポリヌクレオチドの残留レベルまたは送達レベルをモニターすることができる。これは、本開示のポリヌクレオチドが、構造的修飾または化学修飾によって内因性形態とは異なることから可能となる。

【０５６５】

いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、限定するものではないが、紫外可視分光法（ＵＶ／Ｖｉｓ）などの方法を使用して定量することができる。ＵＶ／Ｖｉｓ分光計の非限定的な例は、ＮＡＮＯＤＲＯＰ（登録商標）分光計（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ（Ｗａｌｔｈａｍ，ＭＡ））である。定量化されたポリヌクレオチドは、そのポリヌクレオチドが適切なサイズであり、ポリヌクレオチド分解が起きなかったことを調べるために、分析され得る。ポリヌクレオチド分解は、限定するものではないが、アガロースゲル電気泳動、限定するものではないが、強陰イオン交換ＨＰＬＣ、弱陰イオン交換ＨＰＬＣ、逆相ＨＰＬＣ（ＲＰ－ＨＰＬＣ）及び疎水性相互作用ＨＰＬＣ（ＨＩＣ－ＨＰＬＣ）などのＨＰＬＣによる精製法、液体クロマトグラフィー質量分析（ＬＣＭＳ）、キャピラリー電気泳動（ＣＥ）ならびにキャピラリーゲル電気泳動（ＣＧＥ）などの方法によって調べることができる。

【０５６６】

ＶＩ．医薬組成物

本開示は、本明細書に記載されるポリヌクレオチド、すなわち、ＭＣＭポリペプチドをコードするＯＲＦを含むポリヌクレオチドを含む、医薬組成物を含む。いくつかの実施形態において、製剤は、野生型ＭＣＭ、または配列番号１～２０７、７３２～７６５及び７７２からなる群から選択されるポリヌクレオチドに対して、かなりの配列類似性を有するヌクレオチド配列を含むＭＣＭをコードするポリヌクレオチドを含有し得、ＯＲＦは、ＭＣＭポリペプチドをコードする。

【０５６７】

医薬組成物は、任意選択により、１つ以上の追加の有効物質、例えば、治療的及び／または予防的に有効な物質を含み得る。本開示の医薬組成物は、無菌及び／またはパイロジェンフリーであり得る。医薬品の製剤化及び／または製造において一般的に検討すべき項目は、例えば、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ：Ｔｈｅ Ｓｃｉｅｎｃｅ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｙ ２１ｓｔ ｅｄ．，Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ Ｗｉｌｌｉａｍｓ＆Ｗｉｌｋｉｎｓ，２００５（その全体を参照により本明細書に援用する）にみることができる。本開示の目的上、「有効成分」という文言は、概して、本明細書に記載されるように送達されるポリヌクレオチドを指す。

【０５６８】

本明細書に記載される医薬組成物の製剤は、薬理学分野で知られているか、今後開発される任意の方法によって調製することができる。一般に、このような調製法は、有効成分を、賦形剤及び／または１つ以上の他の副成分とを一緒にするステップを含む。

【０５６９】

本開示による医薬組成物は、バルクで、単回単位用量として、及び／または複数の単回単位用量として調製、包装及び／または販売することができる。本明細書で使用されるとき、「単位用量」は、所定量の有効成分を含む医薬組成物の個々の量を指す。有効成分の量は、一般に、対象に投与される有効成分の用量及び／または当該用量の簡便な分数、例えば、当該用量の１／２もしくは１／３に相当する。

【０５７０】

本開示による医薬組成物中の有効成分、薬学的に許容される賦形剤及び／または任意追加

の成分の相対量は、治療を受ける対象の特性、体格及び／または状態に応じて、更には、組成物が投与される経路に応じて変動し得る。例えば、組成物は、０．１％～９９％（ｗ／ｗ）の有効成分を含み得る。例として、組成物は、０．１％～１００％、例えば、０．５～５０％、１～３０％、５～８０％、少なくとも８０％（ｗ／ｗ）の有効成分を含み得る。

【０５７１】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される製剤は、少なくとも１つのポリヌクレオチドを含み得る。非限定的な例として、製剤は、１、２、３、４または５つのポリヌクレオチドを含み得る。

【０５７２】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される製剤は、２種以上のポリヌクレオチドを含み得る。いくつかの実施形態において、製剤は、線状及び環状形態のポリヌクレオチドを含み得る。別の実施形態において、製剤は、環状ポリヌクレオチド及びＩＶＴポリヌクレオチドを含み得る。更に別の実施形態において、製剤は、ＩＶＴポリヌクレオチド、キメラポリヌクレオチド及び環状ポリヌクレオチドを含み得る。

【０５７３】

いくつかの実施形態において、組成物は、ヒト、ヒト患者または対象に投与される。本明細書で提供される医薬組成物の記述は、主にヒトへの投与に適した医薬組成物を対象とするが、当該組成物が一般に任意の他の動物、例えば、ヒト以外の動物、例えば、ヒト以外の哺乳類への投与に適することは、当業者であれば理解するであろう。ヒトへの投与に適した医薬組成物を各種動物への投与に適したものにするための改変は、よく理解されており、通常の熟練した獣医薬理学者であれば、たとえ実験を要する場合であっても通常の実験のみで、このような改変を設計及び／または実施することができる。医薬組成物の投与が企図される対象には、ヒト及び／もしくは他の霊長類；ウシ、ブタ、ウマ、ヒツジ、ネコ、イヌ、マウス及び／もしくはラットなどの商業的価値のある哺乳類を含む、哺乳類；ならびに／または家禽、ニワトリ、カモ、ガチョウ及び／もしくはシチメンチョウなどの商業的価値のあるものを含む、鳥類が含まれるが、これらに限定されない。

【０５７４】

送達剤

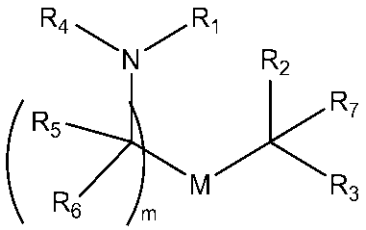
ａ．脂質化合物

本開示は、有利な性質を有する医薬組成物を提供する。特に、本出願は、

（ａ）ＭＣＭポリペプチドをコードするＯＲＦを含むポリヌクレオチドと、

（ｂ）式（Ｉ）

【化１０】



（Ｉ）

［式中、

Ｒ１は、Ｃ５～２０アルキル、Ｃ５～２０アルケニル、－Ｒ＊ＹＲ”、－ＹＲ”、及び－Ｒ”Ｍ’Ｒ’からなる群から選択され、

Ｒ２及びＲ３は、Ｈ、Ｃ１～１４アルキル、Ｃ２～１４アルケニル、－Ｒ＊ＹＲ”、－ＹＲ”、及び－Ｒ＊ＯＲ”からなる群から独立して選択されるか、Ｒ２及びＲ３は、それらが結合している原子とともに、複素環または炭素環を形成し、

Ｒ４は、Ｃ３～６炭素環、－（ＣＨ２）ｎＱ、－（ＣＨ２）ｎＣＨＱＲ、－ＣＨＱＲ、－ＣＱ（Ｒ）２、及び無置換Ｃ１～６アルキルからなる群から選択され、ここで、Ｑは、炭

素環、複素環、－ＯＲ、－Ｏ（ＣＨ２）ｎＮ（Ｒ）２、－Ｃ（Ｏ）ＯＲ、－ＯＣ（Ｏ）Ｒ、－ＣＸ３、－ＣＸ２Ｈ、－ＣＸＨ２、－ＣＮ、－Ｎ（Ｒ）２、－Ｃ（Ｏ）Ｎ（Ｒ）２、－Ｎ（Ｒ）Ｃ（Ｏ）Ｒ、－Ｎ（Ｒ）Ｓ（Ｏ）２Ｒ、－Ｎ（Ｒ）Ｃ（Ｏ）Ｎ（Ｒ）２、－Ｎ（Ｒ）Ｃ（Ｓ）Ｎ（Ｒ）２、及び－Ｃ（Ｒ）Ｎ（Ｒ）２Ｃ（Ｏ）ＯＲから選択され、各ｎは、１、２、３、４及び５から独立して選択され、
各Ｒ５は、Ｃ１～３アルキル、Ｃ２～３アルケニル及びＨからなる群から独立して選択され、
各Ｒ６は、Ｃ１～３アルキル、Ｃ２～３アルケニル及びＨからなる群から独立して選択され、
Ｍ及びＭ’は、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－ＯＣ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｏ）Ｎ（Ｒ’）－、－Ｎ（Ｒ’）Ｃ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｓ）－、－Ｃ（Ｓ）Ｓ－、－ＳＣ（Ｓ）－、－ＣＨ（ＯＨ）－、－Ｐ（Ｏ）（ＯＲ’）Ｏ－、－Ｓ（Ｏ）$_2$－、アリール基及びヘテロアリール基から独立して選択され、
Ｒ７は、Ｃ１～３アルキル、Ｃ２～３アルケニル及びＨからなる群から選択され、
各Ｒは、Ｃ１～３アルキル、Ｃ２～３アルケニル及びＨからなる群から独立して選択され、
各Ｒ’は、Ｃ１～１８アルキル、Ｃ２～１８アルケニル、－Ｒ＊ＹＲ”、－ＹＲ”、及びＨからなる群から独立して選択され、
各Ｒ”は、Ｃ３～１４アルキル及びＣ３～１４アルケニルからなる群から独立して選択され、
各Ｒ＊は、Ｃ１～１２アルキル及びＣ２～１２アルケニルからなる群から独立して選択され、
各Ｙは、独立して、Ｃ３～６炭素環であり、
各Ｘは、Ｆ、Ｃｌ、Ｂｒ及びＩからなる群から独立して選択され、ｍは、５、６、７、８、９、１０、１１、１２及び１３から選択される］
を有する脂質化合物またはその塩もしくは立体異性体（ここで、アルキル基及びアルケニル基は、直鎖状または分岐状であってよい）とを含む、医薬組成物を提供する。
【０５７５】
いくつかの実施形態において、式（Ｉ）の化合物のサブセットには、Ｒ４が－（ＣＨ２）ｎＱ、－（ＣＨ２）ｎＣＨＱＲ、－ＣＨＱＲ、または－ＣＱ（Ｒ）２である場合、（ｉ）ｎが１、２、３、４または５であるとき、Ｑは、－Ｎ（Ｒ）２ではないか、（ｉｉ）ｎが１または２であるとき、Ｑは、５、６または７員ヘテロシクロアルキルではないものが含まれる。
【０５７６】
別の実施形態において、式（Ｉ）の化合物の別のサブセットには、
Ｒ１が、Ｃ５～２０アルキル、Ｃ５～２０アルケニル、－Ｒ＊ＹＲ”、－ＹＲ”、及び－Ｒ”Ｍ’Ｒ’からなる群から選択され、
Ｒ２及びＲ３が、Ｈ、Ｃ１～１４アルキル、Ｃ２～１４アルケニル、－Ｒ＊ＹＲ”、－ＹＲ”、及び－Ｒ＊ＯＲ”からなる群から独立して選択されるか、Ｒ２及びＲ３が、それらが結合している原子とともに、複素環または炭素環を形成し、
Ｒ４が、Ｃ３～６炭素環、－（ＣＨ２）ｎＱ、－（ＣＨ２）ｎＣＨＱＲ、－ＣＨＱＲ、－ＣＱ（Ｒ）２、及び無置換Ｃ１～６アルキルからなる群から選択され、ここで、Ｑは、Ｃ３～６炭素環、Ｎ、Ｏ及びＳから選択される１つ以上のヘテロ原子を有する５～１４員ヘテロアリール、－ＯＲ、－Ｏ（ＣＨ２）ｎＮ（Ｒ）２、－Ｃ（Ｏ）ＯＲ、－ＯＣ（Ｏ）Ｒ、－ＣＸ３、－ＣＸ２Ｈ、－ＣＸＨ２、－ＣＮ、－Ｃ（Ｏ）Ｎ（Ｒ）２、－Ｎ（Ｒ）Ｃ（Ｏ）Ｒ、－Ｎ（Ｒ）Ｓ（Ｏ）２Ｒ、－Ｎ（Ｒ）Ｃ（Ｏ）Ｎ（Ｒ）２、－Ｎ（Ｒ）Ｃ（Ｓ）Ｎ（Ｒ）２、－ＣＲＮ（Ｒ）２Ｃ（Ｏ）ＯＲ、ならびにＮ、Ｏ及びＳから選択される１つ以上のヘテロ原子を有し、オキソ（＝Ｏ）、ＯＨ、アミノ及びＣ１～３アルキルから選択される１つ以上の置換基で置換された５～１４員ヘテロシクロアルキルから選択され、各ｎは、１、２、３、４及び５から独立して選択され、
各Ｒ５が、Ｃ１～３アルキル、Ｃ２～３アルケニル及びＨからなる群から独立して選択さ

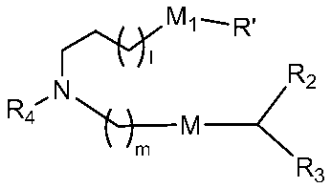
れ、
各Ｒ６が、Ｃ１～３アルキル、Ｃ２～３アルケニル及びＨからなる群から独立して選択され、
Ｍ及びＭ’が、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－ＯＣ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｏ）Ｎ（Ｒ’）－、－Ｎ（Ｒ’）Ｃ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｓ）－、－Ｃ（Ｓ）Ｓ－、－ＳＣ（Ｓ）－、－ＣＨ（ＯＨ）－、－Ｐ（Ｏ）（ＯＲ’）Ｏ－、－Ｓ（Ｏ）$_2$－、アリール基及びヘテロアリール基から独立して選択され、
Ｒ７が、Ｃ１～３アルキル、Ｃ２～３アルケニル及びＨからなる群から選択され、
各Ｒが、Ｃ１～３アルキル、Ｃ２～３アルケニル及びＨからなる群から独立して選択され、
各Ｒ’が、Ｃ$_1$～１８アルキル、Ｃ２～１８アルケニル、－Ｒ＊ＹＲ”、－ＹＲ”、及びＨからなる群から独立して選択され、
各Ｒ”が、Ｃ$_3$～１４アルキル及びＣ３～１４アルケニルからなる群から独立して選択され、
各Ｒ＊が、Ｃ１～１２アルキル及びＣ２～１２アルケニルからなる群から独立して選択され、
各Ｙが、独立して、Ｃ３～６炭素環であり、
各Ｘが、Ｆ、Ｃｌ、Ｂｒ及びＩからなる群から独立して選択され、
ｍが、５、６、７、８、９、１０、１１、１２及び１３から選択される
ものまたはその塩もしくは立体異性体が含まれる。
【０５７７】
更に別の実施形態において、式（Ｉ）の化合物の別のサブセットには、
Ｒ１が、Ｃ５～２０アルキル、Ｃ５～２０アルケニル、－Ｒ＊ＹＲ”、－ＹＲ”、及び－Ｒ”Ｍ’Ｒ’からなる群から選択され、
Ｒ２及びＲ３が、Ｈ、Ｃ１～１４アルキル、Ｃ２～１４アルケニル、－Ｒ＊ＹＲ”、－ＹＲ”、及び－Ｒ＊ＯＲ”からなる群から独立して選択されるか、Ｒ$_2$及びＲ３が、それらが結合している原子とともに、複素環または炭素環を形成し、
Ｒ４が、Ｃ３～６炭素環、－（ＣＨ２）ｎＱ、－（ＣＨ２）ｎＣＨＱＲ、－ＣＨＱＲ、－ＣＱ（Ｒ）２、及び無置換Ｃ１～６アルキルからなる群から選択され、ここで、Ｑは、Ｃ３～６炭素環、Ｎ、Ｏ及びＳから選択される１つ以上のヘテロ原子を有する５～１４員複素環、－ＯＲ、－Ｏ（ＣＨ２）ｎＮ（Ｒ）２、－Ｃ（Ｏ）ＯＲ、－ＯＣ（Ｏ）Ｒ、－ＣＸ３、－ＣＸ２Ｈ、－ＣＸＨ２、－ＣＮ、－Ｃ（Ｏ）Ｎ（Ｒ）２、－Ｎ（Ｒ）Ｃ（Ｏ）Ｒ、－Ｎ（Ｒ）Ｓ（Ｏ）２Ｒ、－Ｎ（Ｒ）Ｃ（Ｏ）Ｎ（Ｒ）２、－Ｎ（Ｒ）Ｃ（Ｓ）Ｎ（Ｒ）２、－ＣＲＮ（Ｒ）２Ｃ（Ｏ）ＯＲから選択され、各ｎは、１、２、３、４及び５から独立して選択され、Ｑが５～１４員複素環であり、かつ（ｉ）Ｒ４が－（ＣＨ２）ｎＱ（ｎは１または２）であるか、（ｉｉ）Ｒ４が－（ＣＨ２）ｎＣＨＱＲ（ｎは１）であるか、（ｉｉｉ）Ｒ４が－ＣＨＱＲ、及び－ＣＱ（Ｒ）２であるとき、Ｑは、５～１４員ヘテロアリールまたは８～１４員ヘテロシクロアルキルのいずれかであり、
各Ｒ５が、Ｃ１～３アルキル、Ｃ２～３アルケニル及びＨからなる群から独立して選択され、
各Ｒ６が、Ｃ１～３アルキル、Ｃ２～３アルケニル及びＨからなる群から独立して選択され、
Ｍ及びＭ’が、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－ＯＣ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｏ）Ｎ（Ｒ’）－、－Ｎ（Ｒ’）Ｃ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｓ）－、－Ｃ（Ｓ）Ｓ－、－ＳＣ（Ｓ）－、－ＣＨ（ＯＨ）－、－Ｐ（Ｏ）（ＯＲ’）Ｏ－、－Ｓ（Ｏ）$_2$－、アリール基及びヘテロアリール基から独立して選択され、
Ｒ７が、Ｃ１～３アルキル、Ｃ２～３アルケニル及びＨからなる群から選択され、
各Ｒが、Ｃ１～３アルキル、Ｃ２～３アルケニル及びＨからなる群から独立して選択され、
各Ｒ’が、Ｃ$_1$～１８アルキル、Ｃ２～１８アルケニル、－Ｒ＊ＹＲ”、－ＹＲ”、及びＨからなる群から独立して選択され、
各Ｒ”が、Ｃ$_3$～１４アルキル及びＣ３～１４アルケニルからなる群から独立して選択され

、
各Ｒ＊が、Ｃ１～１２アルキル及びＣ２～１２アルケニルからなる群から独立して選択され、
各Ｙが、独立して、Ｃ３～６炭素環であり、
各Ｘが、Ｆ、Ｃｌ、Ｂｒ及びＩからなる群から独立して選択され、
ｍが、５、６、７、８、９、１０、１１、１２及び１３から選択される
ものまたはその塩もしくは立体異性体が含まれる。
【０５７８】
更に別の実施形態において、式（Ｉ）の化合物の別のサブセットには、
Ｒ１が、Ｃ５～２０アルキル、Ｃ５～２０アルケニル、－Ｒ＊ＹＲ”、－ＹＲ”、及び－Ｒ”Ｍ’Ｒ’からなる群から選択され、
Ｒ２及びＲ３が、Ｈ、Ｃ１～１４アルキル、Ｃ２～１４アルケニル、－Ｒ＊ＹＲ”、－ＹＲ”、及び－Ｒ＊ＯＲ”からなる群から独立して選択されるか、Ｒ２及びＲ３が、それらが結合している原子とともに、複素環または炭素環を形成し、
Ｒ４が、Ｃ３～６炭素環、－（ＣＨ２）ｎＱ、－（ＣＨ２）ｎＣＨＱＲ、－ＣＨＱＲ、－ＣＱ（Ｒ）２、及び無置換Ｃ１～６アルキルからなる群から選択され、ここで、Ｑは、Ｃ３～６炭素環、Ｎ、Ｏ及びＳから選択される１つ以上のヘテロ原子を有する５～１４員ヘテロアリール、－ＯＲ、－Ｏ（ＣＨ２）ｎＮ（Ｒ）２、－Ｃ（Ｏ）ＯＲ、－ＯＣ（Ｏ）Ｒ、－ＣＸ３、－ＣＸ２Ｈ、－ＣＸＨ２、－ＣＮ、－Ｃ（Ｏ）Ｎ（Ｒ）２、－Ｎ（Ｒ）Ｃ（Ｏ）Ｒ、－Ｎ（Ｒ）Ｓ（Ｏ）２Ｒ、－Ｎ（Ｒ）Ｃ（Ｏ）Ｎ（Ｒ）２、－Ｎ（Ｒ）Ｃ（Ｓ）Ｎ（Ｒ）２、－ＣＲＮ（Ｒ）２Ｃ（Ｏ）ＯＲから選択され、各ｎは、１、２、３、４及び５から独立して選択され、
各Ｒ５が、Ｃ１～３アルキル、Ｃ２～３アルケニル及びＨからなる群から独立して選択され、
各Ｒ６が、Ｃ１～３アルキル、Ｃ２～３アルケニル及びＨからなる群から独立して選択され、
Ｍ及びＭ’が、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－ＯＣ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｏ）Ｎ（Ｒ’）－、－Ｎ（Ｒ’）Ｃ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｓ）－、－Ｃ（Ｓ）Ｓ－、－ＳＣ（Ｓ）－、－ＣＨ（ＯＨ）－、－Ｐ（Ｏ）（ＯＲ’）Ｏ－、－Ｓ（Ｏ）$_2$－、アリール基及びヘテロアリール基から独立して選択され、
Ｒ７が、Ｃ１～３アルキル、Ｃ２～３アルケニル及びＨからなる群から選択され、
各Ｒが、Ｃ１～３アルキル、Ｃ２～３アルケニル及びＨからなる群から独立して選択され、
各Ｒ’が、Ｃ１～１８アルキル、Ｃ２～１８アルケニル、－Ｒ＊ＹＲ”、－ＹＲ”、及びＨからなる群から独立して選択され、
各Ｒ”が、Ｃ３～１４アルキル及びＣ３～１４アルケニルからなる群から独立して選択され、
各Ｒ＊が、Ｃ１～１２アルキル及びＣ２～１２アルケニルからなる群から独立して選択され、
各Ｙが、独立して、Ｃ３～６炭素環であり、
各Ｘが、Ｆ、Ｃｌ、Ｂｒ及びＩからなる群から独立して選択され、
ｍはが、５、６、７、８、９、１０、１１、１２及び１３から選択される
ものまたはその塩もしくは立体異性体が含まれる。
更に別の実施形態において、式（Ｉ）の化合物の別のサブセットには、
Ｒ１が、Ｃ５～２０アルキル、Ｃ５～２０アルケニル、－Ｒ＊ＹＲ”、－ＹＲ”、及び－Ｒ”Ｍ’Ｒ’からなる群から選択され、
Ｒ２及びＲ３が、Ｈ、Ｃ２～１４アルキル、Ｃ２～１４アルケニル、－Ｒ＊ＹＲ”、－ＹＲ”、及び－Ｒ＊ＯＲ”からなる群から独立して選択されるか、Ｒ２及びＲ３が、それらが結合している原子とともに、複素環または炭素環を形成し、
Ｒ４が、－（ＣＨ２）ｎＱまたは－（ＣＨ２）ｎＣＨＱＲであり、ここで、Ｑは、－Ｎ（Ｒ）２であり、ｎは、３、４及び５から選択され、

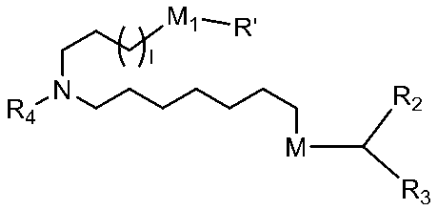
各Ｒ５が、Ｃ１～３アルキル、Ｃ２～３アルケニル及びＨからなる群から独立して選択され、
各Ｒ６が、Ｃ１～３アルキル、Ｃ２～３アルケニル及びＨからなる群から独立して選択され、
Ｍ及びＭ’が、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－ＯＣ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｏ）Ｎ（Ｒ’）－、－Ｎ（Ｒ’）Ｃ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｓ）－、－Ｃ（Ｓ）Ｓ－、－ＳＣ（Ｓ）－、－ＣＨ（ＯＨ）－、－Ｐ（Ｏ）（ＯＲ’）Ｏ－、－Ｓ（Ｏ）$_2$－、アリール基及びヘテロアリール基から独立して選択され、
Ｒ７が、Ｃ１～３アルキル、Ｃ２～３アルケニル及びＨからなる群から選択され、
各Ｒが、Ｃ１～３アルキル、Ｃ２～３アルケニル及びＨからなる群から独立して選択され、
各Ｒ’が、Ｃ$_1$～１８アルキル、Ｃ２～１８アルケニル、－Ｒ＊ＹＲ”、－ＹＲ”、及びＨからなる群から独立して選択され、
各Ｒ”が、Ｃ$_3$～１４アルキル及びＣ３～１４アルケニルからなる群から独立して選択され、
各Ｒ＊が、Ｃ１～１２アルキル及びＣ１～１２アルケニルからなる群から独立して選択され、
各Ｙが、独立して、Ｃ３～６炭素環であり、
各Ｘが、Ｆ、Ｃｌ、Ｂｒ及びＩからなる群から独立して選択され、
ｍが、５、６、７、８、９、１０、１１、１２及び１３から選択される
ものまたはその塩もしくは立体異性体が含まれる。

【０５７９】
更に別の実施形態において、式（Ｉ）の化合物の別のサブセットには、
Ｒ１が、Ｃ５～２０アルキル、Ｃ５～２０アルケニル、－Ｒ＊ＹＲ”、－ＹＲ”、及び－Ｒ”Ｍ’Ｒ’からなる群から選択され、
Ｒ２及びＲ３が、Ｃ１～１４アルキル、Ｃ２～１４アルケニル、－Ｒ＊ＹＲ”、－ＹＲ”、及び－Ｒ＊ＯＲ”からなる群から独立して選択されるか、Ｒ$_2$及びＲ３が、それらが結合している原子とともに、複素環または炭素環を形成し、
Ｒ４が、－（ＣＨ２）ｎＱ、－（ＣＨ２）ｎＣＨＱＲ、－ＣＨＱＲ、及び－ＣＱ（Ｒ）２からなる群から選択され、ここで、Ｑは、－Ｎ（Ｒ）２であり、ｎは、１、２、３、４及び５から選択され、
各Ｒ５が、Ｃ１～３アルキル、Ｃ２～３アルケニル及びＨからなる群から独立して選択され、
各Ｒ６が、Ｃ１～３アルキル、Ｃ２～３アルケニル及びＨからなる群から独立して選択され、
Ｍ及びＭ’は、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－ＯＣ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｏ）Ｎ（Ｒ’）－、－Ｎ（Ｒ’）Ｃ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｓ）－、－Ｃ（Ｓ）Ｓ－、－ＳＣ（Ｓ）－、－ＣＨ（ＯＨ）－、－Ｐ（Ｏ）（ＯＲ’）Ｏ－、－Ｓ（Ｏ）$_2$－、アリール基及びヘテロアリール基から独立して選択され、
Ｒ７が、Ｃ１～３アルキル、Ｃ２～３アルケニル及びＨからなる群から選択され、
各Ｒが、Ｃ１～３アルキル、Ｃ２～３アルケニル及びＨからなる群から独立して選択され、
各Ｒ’が、Ｃ$_1$～１８アルキル、Ｃ２～１８アルケニル、－Ｒ＊ＹＲ”、－ＹＲ”、及びＨからなる群から独立して選択され、
各Ｒ”が、Ｃ$_3$～１４アルキル及びＣ３～１４アルケニルからなる群から独立して選択され、
各Ｒ＊が、Ｃ１～１２アルキル及びＣ１～１２アルケニルからなる群から独立して選択され、
各Ｙが、独立して、Ｃ３～６炭素環であり、
各Ｘが、Ｆ、Ｃｌ、Ｂｒ及びＩからなる群から独立して選択され、
ｍが、５、６、７、８、９、１０、１１、１２及び１３から選択される
ものまたはその塩もしくは立体異性体が含まれる。

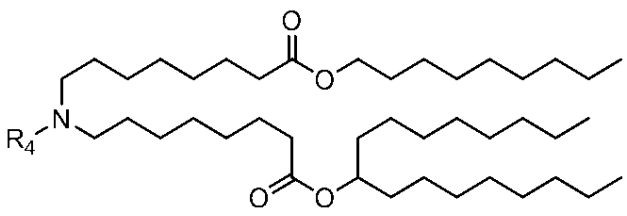
【０５８０】
特定の実施形態において、式（Ｉ）の化合物のサブセットには、式（ＩＡ）：
【化１１】



（ＩＡ）
のものまたはその塩もしくは立体異性体が含まれ、
式中、ｌは、１、２、３、４及び５から選択され、ｍは、５、６、７、８、及び９から選択され、Ｍ１は、単結合またはＭ’であり、Ｒ４は、無置換Ｃ１～３アルキルまたは－（ＣＨ２）ｎＱであり、ここで、Ｑは、ＯＨ、－ＮＨＣ（Ｓ）Ｎ（Ｒ）２、または－ＮＨＣ（Ｏ）Ｎ（Ｒ）２であり、Ｍ及びＭ’は、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－ＯＣ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｏ）Ｎ（Ｒ’）－、－Ｐ（Ｏ）（ＯＲ’）Ｏ－、アリール基及びヘテロアリール基から独立して選択され、
Ｒ２及びＲ３は、Ｈ、Ｃ１～１４アルキル及びＣ２～１４アルケニルからなる群から独立して選択される。
【０５８１】
特定の実施形態において、式（Ｉ）の化合物のサブセットには、式（ＩＩ）：
【化１２】

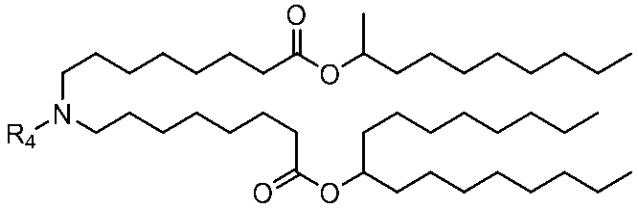


（ＩＩ）
のものまたはその塩もしくは立体異性体が含まれ、
式中、ｌは、１、２、３、４及び５から選択され、Ｍ１は、単結合またはＭ’であり、Ｒ４は、無置換Ｃ１～３アルキルまたは－（ＣＨ２）ｎＱであり、ここで、ｎは、２、３または４であり、Ｑは、ＯＨ、－ＮＨＣ（Ｓ）Ｎ（Ｒ）２、または－ＮＨＣ（Ｏ）Ｎ（Ｒ）２であり、Ｍ及びＭ’は、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－ＯＣ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｏ）Ｎ（Ｒ’）－、－Ｐ（Ｏ）（ＯＲ’）Ｏ－、アリール基及びヘテロアリール基から独立して選択され、
Ｒ２及びＲ３は、Ｈ、Ｃ１～１４アルキル及びＣ２～１４アルケニルからなる群から独立して選択される。
【０５８２】
いくつかの実施形態において、式（Ｉ）の化合物は、式（ＩＩａ）
【化１３】

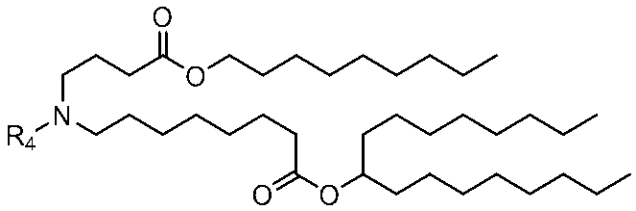


（ＩＩａ）
またはその塩であり、式中、Ｒ４は、上記のとおりである。

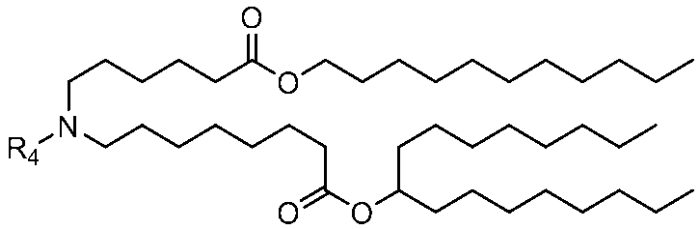
【０５８３】
いくつかの実施形態において、式（Ｉ）の化合物は、式（ＩＩｂ）
【化１４】



（ＩＩｂ）
またはその塩であり、式中、Ｒ４は、上記のとおりである。
【０５８４】
いくつかの実施形態において、式（Ｉ）の化合物は、式（ＩＩｃ）
【化１５】

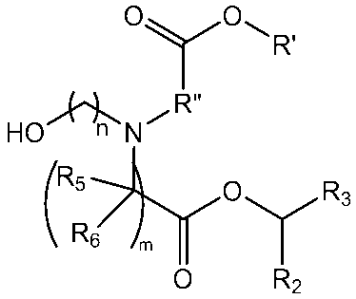


（ＩＩｃ）
またはその塩であり、式中、Ｒ４は、上記のとおりである。
【０５８５】
いくつかの実施形態において、式（Ｉ）の化合物は、式（ＩＩｅ）：
【化１６】



（ＩＩｅ）
またはその塩であり、式中、Ｒ４は、上記のとおりである。
【０５８６】
いくつかの実施形態において、式（ＩＩａ）、（ＩＩｂ）、（ＩＩｃ）または（ＩＩｅ）の化合物は、－（ＣＨ２）ｎＱ及び－（ＣＨ２）ｎＣＨＱＲから選択されるＲ４を含み、式中、Ｑ、Ｒ及びｎは、上に定義するとおりである。
【０５８７】
いくつかの実施形態において、Ｑは、－ＯＲ、－ＯＨ、－Ｏ（ＣＨ２）ｎＮ（Ｒ）２、－ＯＣ（Ｏ）Ｒ、－ＣＸ３、－ＣＮ、－Ｎ（Ｒ）Ｃ（Ｏ）Ｒ、－Ｎ（Ｈ）Ｃ（Ｏ）Ｒ、－Ｎ（Ｒ）Ｓ（Ｏ）２Ｒ、－Ｎ（Ｈ）Ｓ（Ｏ）２Ｒ、－Ｎ（Ｒ）Ｃ（Ｏ）Ｎ（Ｒ）２、－Ｎ（Ｈ）Ｃ（Ｏ）Ｎ（Ｒ）２、－Ｎ（Ｈ）Ｃ（Ｏ）Ｎ（Ｈ）（Ｒ）、－Ｎ（Ｒ）Ｃ（Ｓ）Ｎ（Ｒ）２、－Ｎ（Ｈ）Ｃ（Ｓ）Ｎ（Ｒ）２、－Ｎ（Ｈ）Ｃ（Ｓ）Ｎ（Ｈ）（Ｒ）及び複素環からなる群から選択され、Ｒは、上に定義するとおりである。いくつかの態様において、ｎは、１または２である。いくつかの実施形態において、Ｑは、ＯＨ、－ＮＨＣ（Ｓ）Ｎ（Ｒ）２、または－ＮＨＣ（Ｏ）Ｎ（Ｒ）２である。
【０５８８】

いくつかの実施形態において、式（Ｉ）の化合物は、式（ＩＩｄ）
【化１７】



（ＩＩｄ）
またはその塩であり、式中、Ｒ２及びＲ３は、Ｃ５～１４アルキル及びＣ５～１４アルケニルからなる群から独立して選択され、ｎは、２、３及び４から選択され、Ｒ’、Ｒ’’、Ｒ５、Ｒ６及びｍは、上に定義されるとおりである。
【０５８９】
式（ＩＩｄ）の化合物のいくつかの態様において、Ｒ２は、Ｃ８アルキルである。式（ＩＩｄ）の化合物のいくつかの態様において、Ｒ３は、Ｃ５～Ｃ９アルキルである。式（ＩＩｄ）の化合物のいくつかの態様において、ｍは、５、７または９である。式（ＩＩｄ）の化合物のいくつかの態様において、各Ｒ５は、Ｈである。式（ＩＩｄ）の化合物のいくつかの態様において、各Ｒ６は、Ｈである。
【０５９０】
別の態様において、本出願は、（１）式（Ｉ）を有する化合物、（２）任意選択によりヘルパー脂質（例えば、リン脂質）、（３）任意選択により構造脂質（例えば、ステロール）、（４）任意選択により脂質コンジュゲート（例えば、ＰＥＧ脂質）、及び（５）任意選択により第四級アミン化合物を含む、脂質組成物（例えば、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ））を提供する。例示的な実施形態において、脂質組成物（例えば、ＬＮＰ）は、ＭＣＭポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、例えば、脂質組成物中に封入されたポリヌクレオチドを更に含む。
【０５９１】
本明細書で使用されるとき、「アルキル」または「アルキル基」という用語は、１つ以上の炭素原子（例えば、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０個またはそれ以上の炭素原子）を含む、直鎖状または分岐状の飽和炭化水素を意味する。
【０５９２】
「Ｃ１～１４アルキル」という表記は、１～１４個の炭素原子を含む直鎖状または分岐状の飽和炭化水素を意味する。アルキル基は、任意選択により置換されてよい。
【０５９３】
本明細書で使用されるとき、「アルケニル」または「アルケニル基」という用語は、２つ以上の炭素原子（例えば、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０個またはそれ以上の炭素原子）及び少なくとも１つの二重結合を含む、直鎖状または分岐状の炭化水素を意味する。
【０５９４】
「Ｃ２～１４アルケニル」という表記は、２～１４個の炭素原子及び少なくとも１つの二重結合を含む、直鎖状または分岐状の炭化水素を意味する。アルケニル基は、１、２、３、４つまたはそれ以上の二重結合を含み得る。例えば、Ｃ１８アルケニルは、１つ以上の二重結合を含み得る。２つの二重結合を含むＣ１８アルケニル基は、リノレイル基であり得る。アルケニル基は、任意選択により置換され得る。
【０５９５】
本明細書で使用されるとき、「炭素環」または「炭素環式基」という用語は、１つ以上の

炭素原子環を含む単環系または多環系を意味する。環は、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４または１５員環であり得る。

【０５９６】

「Ｃ３～６炭素環」という表記は、３～６個の炭素原子を有する単環を含む炭素環を意味する。炭素環は、１つ以上の二重結合を含み得、芳香族（例えば、アリール基）であり得る。炭素環の例には、シクロプロピル、シクロペンチル、シクロヘキシル、フェニル、ナフチル及び１，２－ジヒドロナフチル基が挙げられる。炭素環は、任意選択により置換され得る。

【０５９７】

本明細書で使用されるとき、「複素環」または「複素環基」という用語は、少なくとも１つの環が少なくとも１つのヘテロ原子を含む環を１つ以上含む単環系または多環系を意味する。ヘテロ原子は、例えば、窒素原子、酸素原子または硫黄原子であってよい。環は、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１または１２員環であり得る。複素環は、１つ以上の二重結合を含み得、芳香族（例えば、ヘテロアリール基）であり得る。複素環の例には、イミダゾリル基、イミダゾリジニル基、オキサゾリル基、オキサゾリジニル基、チアゾリル基、チアゾリジニル基、ピラゾリジニル基、ピラゾリル基、イソオキサゾリジニル基、イソオキサゾリル基、イソチアゾリジニル基、イソチアゾリル基、モルホリニル基、ピロリル基、ピロリジニル基、フリル基、テトラヒドロフリル基、チオフェニル基、ピリジニル基、ピペリジニル基、キノリル基及びイソキノリル基が挙げられる。複素環は、任意選択により置換され得る。

【０５９８】

本明細書で使用されるとき、「生分解性基」は、対象において、脂質のより速い代謝を促進することができる基である。生分解性基は、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－ＯＣ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｏ）Ｎ（Ｒ’）－、－Ｎ（Ｒ’）Ｃ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｓ）－、－Ｃ（Ｓ）Ｓ－、－ＳＣ（Ｓ）－、－ＣＨ（ＯＨ）－、－Ｐ（Ｏ）（ＯＲ’）Ｏ－、－Ｓ（Ｏ）$_2$－、アリール基及びヘテロアリール基であり得るが、これらに限定されない。

【０５９９】

本明細書で使用されるとき、「アリール基」は、１つ以上の芳香環を含む炭素環式基である。アリール基の例には、フェニル基及びナフチル基が挙げられる。

【０６００】

本明細書で使用されるとき、「ヘテロアリール基」は、１つ以上の芳香環を含む複素環基である。ヘテロアリール基の例には、ピロリル、フリル、チオフェニル、イミダゾリル、オキサゾリル及びチアゾリルが挙げられる。アリール基及びヘテロアリール基はどちらも、任意選択により置換され得る。例えば、Ｍ及びＭ’は、任意選択により置換されたフェニル、オキサゾール及びチアゾールからなる非限定的な群から選択することができる。本明細書中の式において、Ｍ及びＭ’は、上記の生分解性基の一覧から独立して選択することができる。

【０６０１】

アルキル基、アルケニル基及びシクリル基（例えば、カルボシクリル基及びヘテロシクリル基）は、特に指定されない限り、任意選択により置換され得る。任意選択の置換基は、ハロゲン原子（例えば、クロリド基、ブロミド基、フロリド基またはヨージド基）、カルボン酸（例えば、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ）、アルコール（例えば、ヒドロキシル、－ＯＨ）、エステル（例えば、－Ｃ（Ｏ）ＯＲまたは－ＯＣ（Ｏ）Ｒ）、アルデヒド（例えば、－Ｃ（Ｏ）Ｈ）、カルボニル（例えば、－Ｃ（Ｏ）Ｒ、あるいはＣ＝Ｏで表される）、ハロゲン化アシル（例えば、－Ｃ（Ｏ）Ｘ、ここで、Ｘは、クロリド、ブロミド、フロリドまたはヨージドから選択されるハロゲン化物である）、カーボネート（例えば、－ＯＣ（Ｏ）ＯＲ）、アルコキシ（例えば、－ＯＲ）、アセタール（例えば、－Ｃ（ＯＲ）$_2$Ｒ”“、ここで、各ＯＲは、同じであっても異なっていてもよいアルコキシ基であり、Ｒ”“は、アルキル基またはアルケニル基である）、ホスフェート（例えば、Ｐ（Ｏ）$_4$$^{3-}$）、チオール（例えば、－ＳＨ）、スルホキシド（例えば、－Ｓ（Ｏ）Ｒ）、スルフィン酸（例えば、

－Ｓ（Ｏ）ＯＨ）、スルホン酸（例えば、－Ｓ（Ｏ）$_2$ＯＨ）、チアール（例えば、－Ｃ（Ｓ）Ｈ）、サルフェート（例えば、Ｓ（Ｏ）$_4$$^{2-}$）、スルホニル（例えば、－Ｓ（Ｏ）$_2$－）、アミド（例えば、－Ｃ（Ｏ）ＮＲ$_2$、または－Ｎ（Ｒ）Ｃ（Ｏ）Ｒ）、アジド（例えば、－Ｎ$_3$）、ニトロ（例えば、－ＮＯ$_2$）、シアノ（例えば、－ＣＮ）、イソシアノ（例えば、－ＮＣ）、アシルオキシ（例えば、－ＯＣ（Ｏ）Ｒ）、アミノ（例えば、－ＮＲ$_2$、－ＮＲＨ、または－ＮＨ$_2$）、カルバモイル（例えば、－ＯＣ（Ｏ）ＮＲ$_2$、－ＯＣ（Ｏ）ＮＲＨ、または－ＯＣ（Ｏ）ＮＨ$_2$）、スルホンアミド（例えば、－Ｓ（Ｏ）$_2$ＮＲ$_2$、－Ｓ（Ｏ）$_2$ＮＲＨ、－Ｓ（Ｏ）$_2$ＮＨ$_2$、－Ｎ（Ｒ）Ｓ（Ｏ）$_2$Ｒ、－Ｎ（Ｈ）Ｓ（Ｏ）$_2$Ｒ、－Ｎ（Ｒ）Ｓ（Ｏ）$_2$Ｈ、または－Ｎ（Ｈ）Ｓ（Ｏ）$_2$Ｈ）、アルキル基、アルケニル基及びシクリル基（例えば、カルボシクリル基またはヘテロシクリル基）からなる群から選択することができるが、これらに限定されない。

【０６０２】

前述のいずれにおいても、Ｒは、本明細書に定義されるアルキル基またはアルケニル基である。いくつかの実施形態において、置換基自体が、例えば、１、２、３、４、５または６つの本明細書に定義される置換基で更に置換されてもよい。例えば、Ｃ$_{1～6}$アルキル基は、１、２、３、４、５または６つの本明細書に記載される置換基で更に置換され得る。

【０６０３】

式（Ｉ）、（ＩＡ）、（ＩＩ）、（ＩＩａ）、（ＩＩｂ）、（ＩＩｃ）、（ＩＩｄ）及び（ＩＩｅ）のいずれか１つの化合物は、適用可能であれば、次の特徴のうちの１つ以上を含む。

【０６０４】

いくつかの実施形態において、Ｒ$_4$は、Ｃ$_{3～6}$炭素環、－（ＣＨ$_2$）$_n$Ｑ、－（ＣＨ$_2$）$_n$ＣＨＱＲ、－ＣＨＱＲ、及び－ＣＱ（Ｒ）$_2$からなる群から選択され、ここで、Ｑは、Ｃ$_{3～6}$炭素環、Ｎ、Ｏ、Ｓ及びＰから選択される１つ以上のヘテロ原子を有する５～１４員芳香族または非芳香族複素環、－ＯＲ、－Ｏ（ＣＨ$_2$）$_n$Ｎ（Ｒ）$_2$、－Ｃ（Ｏ）ＯＲ、－ＯＣ（Ｏ）Ｒ、－ＣＸ$_3$、－ＣＸ$_2$Ｈ、－ＣＸＨ$_2$、－ＣＮ、－Ｎ（Ｒ）$_2$、－Ｃ（Ｏ）Ｎ（Ｒ）$_2$、－Ｎ（Ｒ）Ｃ（Ｏ）Ｒ、－Ｎ（Ｒ）Ｓ（Ｏ）$_2$Ｒ、－Ｎ（Ｒ）Ｃ（Ｏ）Ｎ（Ｒ）$_2$、－Ｎ（Ｒ）Ｃ（Ｓ）Ｎ（Ｒ）$_2$、ならびに－Ｃ（Ｒ）Ｎ（Ｒ）$_2$Ｃ（Ｏ）ＯＲから選択され、各ｎは、１、２、３、４及び５から独立して選択される。

【０６０５】

別の実施形態において、Ｒ$_4$は、Ｃ$_{3～6}$炭素環、－（ＣＨ$_2$）$_n$Ｑ、－（ＣＨ$_2$）$_n$ＣＨＱＲ、－ＣＨＱＲ、及び－ＣＱ（Ｒ）$_2$からなる群から選択され、ここで、Ｑは、Ｃ$_{3～6}$炭素環、Ｎ、Ｏ及びＳから選択される１つ以上のヘテロ原子を有する５～１４員ヘテロアリール、－ＯＲ、－Ｏ（ＣＨ$_2$）$_n$Ｎ（Ｒ）$_2$、－Ｃ（Ｏ）ＯＲ、－ＯＣ（Ｏ）Ｒ、－ＣＸ$_3$、－ＣＸ$_2$Ｈ、－ＣＸＨ$_2$、－ＣＮ、－Ｃ（Ｏ）Ｎ（Ｒ）$_2$、－Ｎ（Ｒ）Ｃ（Ｏ）Ｒ、－Ｎ（Ｒ）Ｓ（Ｏ）$_2$Ｒ、－Ｎ（Ｒ）Ｃ（Ｏ）Ｎ（Ｒ）$_2$、－Ｎ（Ｒ）Ｃ（Ｓ）Ｎ（Ｒ）$_2$、－Ｃ（Ｒ）Ｎ（Ｒ）$_2$Ｃ（Ｏ）ＯＲ、ならびにＮ、Ｏ及びＳから選択される１つ以上のヘテロ原子を有し、オキソ（＝Ｏ）、ＯＨ、アミノ及びＣ$_{1～3}$アルキルから選択される１つ以上の置換基で置換された５～１４員ヘテロシクロアルキルから選択され、各ｎは、１、２、３、４及び５から独立して選択される。

【０６０６】

別の実施形態において、Ｒ$_4$は、Ｃ$_{3～6}$炭素環、－（ＣＨ$_2$）$_n$Ｑ、－（ＣＨ$_2$）$_n$ＣＨＱＲ、－ＣＨＱＲ、及び－ＣＱ（Ｒ）$_2$からなる群から選択され、ここで、Ｑは、Ｃ$_{3～6}$炭素環、Ｎ、Ｏ及びＳから選択される１つ以上のヘテロ原子を有する５～１４員複素環、－ＯＲ、－Ｏ（ＣＨ$_2$）$_n$Ｎ（Ｒ）$_2$、－Ｃ（Ｏ）ＯＲ、－ＯＣ（Ｏ）Ｒ、－ＣＸ$_3$、－ＣＸ$_2$Ｈ、－ＣＸＨ$_2$、－ＣＮ、－Ｃ（Ｏ）Ｎ（Ｒ）$_2$、－Ｎ（Ｒ）Ｃ（Ｏ）Ｒ、－Ｎ（Ｒ）Ｓ（Ｏ）$_2$Ｒ、－Ｎ（Ｒ）Ｃ（Ｏ）Ｎ（Ｒ）$_2$、－Ｎ（Ｒ）Ｃ（Ｓ）Ｎ（Ｒ）$_2$、－Ｃ（Ｒ）Ｎ（Ｒ）$_2$Ｃ（Ｏ）ＯＲから選択され、各ｎは、１、２、３、４及び５から独立して選択され、Ｑが５～１４員複素環であり、かつ（ｉ）Ｒ$_4$が－（ＣＨ$_2$）$_n$Ｑ（ｎは１または２）であるか、（ｉｉ）Ｒ$_4$が－（ＣＨ$_2$）$_n$ＣＨＱＲ（ｎは１）であるか

、（ｉｉｉ）Ｒ４が－ＣＨＱＲ、及び－ＣＱ（Ｒ）２であるとき、Ｑは、５～１４員ヘテロアリールまたは８～１４員ヘテロシクロアルキルのいずれかである。

【０６０７】

別の実施形態において、Ｒ４は、Ｃ３～６炭素環、－（ＣＨ２）ｎＱ、－（ＣＨ２）ｎＣＨＱＲ、－ＣＨＱＲ、及び－ＣＱ（Ｒ）２からなる群から選択され、ここで、Ｑは、Ｃ３～６炭素環、Ｎ、Ｏ及びＳから選択される１つ以上のヘテロ原子を有する５～１４員ヘテロアリール、－ＯＲ、－Ｏ（ＣＨ２）ｎＮ（Ｒ）２、－Ｃ（Ｏ）ＯＲ、－ＯＣ（Ｏ）Ｒ、－ＣＸ３、－ＣＸ２Ｈ、－ＣＸＨ２、－ＣＮ、－Ｃ（Ｏ）Ｎ（Ｒ）２、－Ｎ（Ｒ）Ｃ（Ｏ）Ｒ、－Ｎ（Ｒ）Ｓ（Ｏ）２Ｒ、－Ｎ（Ｒ）Ｃ（Ｏ）Ｎ（Ｒ）２、－Ｎ（Ｒ）Ｃ（Ｓ）Ｎ（Ｒ）２、－Ｃ（Ｒ）Ｎ（Ｒ）２Ｃ（Ｏ）ＯＲから選択され、各ｎは、１、２、３、４及び５から独立して選択される。

【０６０８】

別の実施形態において、Ｒ４は、無置換Ｃ１～４アルキル、例えば、無置換のメチルである。

【０６０９】

ある特定の実施形態において、本開示は、Ｒ４が－（ＣＨ２）ｎＱまたは－（ＣＨ２）ｎＣＨＱＲであり、ここで、Ｑは－Ｎ（Ｒ）２であり、ｎは３、４及び５から選択される、式（Ｉ）を有する化合物を提供する。

【０６１０】

ある特定の実施形態において、本開示は、Ｒ４が－（ＣＨ２）ｎＱ、－（ＣＨ２）ｎＣＨＱＲ、－ＣＨＱＲ、及び－ＣＱ（Ｒ）２からなる群から選択され、ここで、Ｑは－Ｎ（Ｒ）２であり、ｎは１、２、３、４、及び５から選択される、式（Ｉ）を有する化合物を提供する。

【０６１１】

ある特定の実施形態において、本開示は、Ｒ２及びＲ３が、Ｃ２～１４アルキル、Ｃ２～１４アルケニル、－Ｒ＊ＹＲ”、－ＹＲ”、及び－R”ＯＲ”からなる群から独立して選択されるか、Ｒ２及びＲ３が、それらが結合している原子とともに、複素環または炭素環を形成し、Ｒ４が－（ＣＨ２）ｎＱまたは－（ＣＨ２）ｎＣＨＱＲであり、ここで、Ｑは－Ｎ（Ｒ）２であり、ｎは３、４及び５から選択される、式（Ｉ）を有する化合物を提供する。

【０６１２】

ある特定の実施形態において、Ｒ２及びＲ３は、Ｃ２～１４アルキル、Ｃ２～１４アルケニル、－Ｒ＊ＹＲ”、－ＹＲ”、及び－R”ＯＲ”からなる群から独立して選択されるか、Ｒ２及びＲ３は、それらが結合している原子とともに、複素環または炭素環を形成する。

【０６１３】

いくつかの実施形態において、Ｒ１は、Ｃ５～２０アルキル及びＣ５～２０アルケニルからなる群から選択される。

【０６１４】

他の実施形態において、Ｒ１は、－Ｒ＊ＹＲ”、－ＹＲ”、及び－Ｒ”Ｍ’Ｒ’からなる群から選択される。

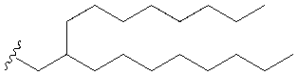
【０６１５】

ある特定の実施形態において、Ｒ１は、－Ｒ＊ＹＲ”及び－ＹＲ”から選択される。いくつかの実施形態において、Ｙは、シクロプロピル基である。いくつかの実施形態において、Ｒ＊は、Ｃ８アルキルまたはＣ８アルケニルである。ある特定の実施形態において、Ｒ”は、Ｃ３～１２アルキルである。例えば、Ｒ”は、C3アルキルであり得る。例えば、Ｒ”は、Ｃ４～８アルキル（例えば、Ｃ４、Ｃ５、Ｃ６、Ｃ７またはＣ８アルキル）であり得る。

【０６１６】

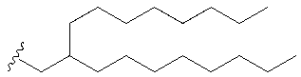
いくつかの実施形態において、Ｒ１は、Ｃ５～２０アルキルである。いくつかの実施形態において、Ｒ１は、Ｃ６アルキルである。いくつかの実施形態において、Ｒ１は、Ｃ８アルキルである。他の実施形態において、Ｒ１は、Ｃ９アルキルである。ある特定の実施形態において、Ｒ１は、Ｃ１４アルキルである。他の実施形態において、Ｒ１は、Ｃ１８ア

ルキルである。
【０６１７】
いくつかの実施形態において、Ｒ１は、Ｃ５～２０アルケニルである。ある特定の実施形態において、Ｒ１は、Ｃ１８アルケニルである。いくつかの実施形態において、Ｒ１は、リノレイルである。
【０６１８】
ある特定の実施形態において、Ｒ１は、分岐状である（例えば、デカン－２－イル、ウンデカン－３－イル、ドデカン－４－イル、トリデカン－５－イル、テトラデカン－６－イル、２－メチルウンデカン－３－イル、２－メチルデカン－２－イル、３－メチルウンデカン－３－イル、４－メチルドデカン－４－イルまたはヘプタデカ－９－イル）。ある特定の実施形態において、Ｒ１は、
【化１８】



である。
【０６１９】
ある特定の実施形態において、Ｒ１は、無置換のＣ５～２０アルキルまたはＣ５～２０アルケニルである。ある特定の実施形態において、Ｒ’は、置換されたＣ5～２０アルキルまたはＣ５～２０アルケニルである（例えば、１－シクロプロピルノニルなどのＣ３～６炭素環で置換される）。
【０６２０】
他の実施形態において、Ｒ１は、－Ｒ”Ｍ’Ｒ’である。
【０６２１】
いくつかの実施形態において、Ｒ’は、－R*ＹＲ”及び－ＹＲ”から選択される。いくつかの実施形態において、Ｙは、Ｃ３～８シクロアルキルである。いくつかの実施形態において、Ｙは、Ｃ６～１０アリールである。いくつかの実施形態において、Ｙは、シクロプロピル基である。いくつかの実施形態において、Ｙは、シクロヘキシル基である。特定の実施形態において、Ｒ＊は、Ｃ１アルキルである。
【０６２２】
いくつかの実施形態において、Ｒ”は、C3～１２アルキル及びＣ３～１２アルケニルからなる群から選択される。いくつかの実施形態において、Ｙに隣接するＲ”は、C1アルキルである。いくつかの実施形態において、Ｙに隣接するＲ”は、C4～９アルキル（例えば、Ｃ４、Ｃ５、Ｃ６、Ｃ７またはＣ８またはＣ９アルキル）である。
【０６２３】
いくつかの実施形態において、Ｒ’は、C4アルキル及びＣ４アルケニルから選択される。
ある特定の実施形態において、Ｒ’は、C5アルキル及びＣ５アルケニルから選択される。
いくつかの実施形態において、Ｒ’は、C6アルキル及びＣ６アルケニルから選択される。
いくつかの実施形態において、Ｒ’は、C7アルキル及びＣ７アルケニルから選択される。
いくつかの実施形態において、Ｒ’は、C9アルキル及びＣ９アルケニルから選択される。
【０６２４】
他の実施形態において、Ｒ’は、C1１アルキル及びＣ１１アルケニルから選択される。他の実施形態において、Ｒ’は、C1２アルキル、Ｃ１２アルケニル、Ｃ１３アルキル、Ｃ１３アルケニル、Ｃ１４アルキル、Ｃ１４アルケニル、Ｃ１５アルキル、Ｃ１５アルケニル、Ｃ１６アルキル、Ｃ１６アルケニル、Ｃ１７アルキル、Ｃ１７アルケニル、Ｃ１８アルキル及びＣ１８アルケニルから選択される。ある特定の実施形態において、Ｒ’は、分岐状である（例えば、デカン－２－イル、ウンデカン－３－イル、ドデカン－４－イル、トリデカン－５－イル、テトラデカン－６－イル、２－メチルウンデカン－３－イル、２－メチルデカン－２－イル、３－メチルウンデカン－３－イル、４－メチルドデカン－４－イルまたはヘプタデカ－９－イル）。ある特定の実施形態において、Ｒ’は、

【化１９】



である。

【０６２５】

ある特定の実施形態において、Ｒ’は、無置換Ｃ1～１８アルキルである。ある特定の実施形態において、Ｒ’は、置換Ｃ1～１８アルキル（例えば、１－シクロプロピルノニルなどのＣ３～６炭素環で置換されたＣ１～１５アルキル）である。

【０６２６】

いくつかの実施形態において、Ｒ”は、Ｃ3～１４アルキル及びＣ３～１４アルケニルからなる群から選択される。いくつかの実施形態において、Ｒ”は、Ｃ3アルキル、Ｃ４アルキル、Ｃ５アルキル、Ｃ６アルキル、Ｃ７アルキルまたはＣ８アルキルである。いくつかの実施形態において、Ｒ”は、Ｃ9アルキル、Ｃ１０アルキル、Ｃ１１アルキル、Ｃ１２アルキル、Ｃ１３アルキルまたはＣ１４アルキルである。

【０６２７】

いくつかの実施形態において、Ｍ’は、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－である。いくつかの実施形態において、Ｍ’は、－ＯＣ（Ｏ）－である。

【０６２８】

他の実施形態において、Ｍ’は、アリール基またはヘテロアリール基である。例えば、Ｍ’は、フェニル、オキサゾール及びチアゾールからなる群から選択され得る。

【０６２９】

いくつかの実施形態において、Ｍは、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－である。いくつかの実施形態において、Ｍは、－ＯＣ（Ｏ）－である。いくつかの実施形態において、Ｍは、－Ｃ（Ｏ）Ｎ（Ｒ’）－である。いくつかの実施形態において、Ｍは、－Ｐ（Ｏ）（ＯＲ’）Ｏ－である。

【０６３０】

他の実施形態において、Ｍは、アリール基またはヘテロアリール基である。例えば、Ｍは、フェニル、オキサゾール及びチアゾールからなる群から選択され得る。

【０６３１】

いくつかの実施形態において、Ｍは、Ｍ’と同じである。他の実施形態において、Ｍは、Ｍ’と異なる。

【０６３２】

いくつかの実施形態において、各Ｒ５は、Ｈである。そのようなある特定の実施形態において、各Ｒ６もまた Ｈである。

【０６３３】

いくつかの実施形態において、Ｒ７は、Ｈである。他の実施形態において、Ｒ７は、Ｃ１～3アルキル（例えば、メチル、エチル、プロピルまたはｉ－プロピル）である。

【０６３４】

いくつかの実施形態において、Ｒ２及びＲ３は、独立して、Ｃ５～１４アルキルまたはＣ５～１４アルケニルである。

【０６３５】

いくつかの実施形態において、Ｒ２及びＲ３は、同じである。いくつかの実施形態において、Ｒ２及びＲ３は、Ｃ８アルキルである。ある特定の実施形態において、Ｒ２及びＲ３は、Ｃ２アルキルである。他の実施形態において、Ｒ２及びＲ３は、Ｃ３アルキルである。いくつかの実施形態において、Ｒ２及びＲ３は、Ｃ４アルキルである。ある特定の実施形態において、Ｒ２及びＲ３は、Ｃ５アルキルである。他の実施形態において、Ｒ２及びＲ３は、Ｃ６アルキルである。いくつかの実施形態において、Ｒ２及びＲ３は、Ｃ７アルキルである。

【０６３６】

他の実施形態において、Ｒ２及びＲ３は、異なる。ある特定の実施形態において、Ｒ２は

、Ｃ８アルキルである。いくつかの実施形態において、Ｒ３は、Ｃ１～７（例えば、Ｃ１、Ｃ２、Ｃ３、Ｃ４、Ｃ５、Ｃ６またはＣ７アルキル）またはＣ９アルキルである。

【０６３７】

いくつかの実施形態において、Ｒ７及びＲ３は、Ｈである。

【０６３８】

ある特定の実施形態において、Ｒ２は、Ｈである。

【０６３９】

いくつかの実施形態において、ｍは、５、７または９である。

【０６４０】

いくつかの実施形態において、Ｒ４は、－（ＣＨ２）ｎＱ及び－（ＣＨ２）ｎＣＨＱＲから選択される。

【０６４１】

いくつかの実施形態において、Ｑは、－ＯＲ、－ＯＨ、－Ｏ（ＣＨ２）ｎＮ（Ｒ）２、－ＯＣ（Ｏ）Ｒ、－ＣＸ３、－ＣＮ、－Ｎ（Ｒ）Ｃ（Ｏ）Ｒ、－Ｎ（Ｈ）Ｃ（Ｏ）Ｒ、－Ｎ（Ｒ）Ｓ（Ｏ）２Ｒ、－Ｎ（Ｈ）Ｓ（Ｏ）２Ｒ、－Ｎ（Ｒ）Ｃ（Ｏ）Ｎ（Ｒ）２、－Ｎ（Ｈ）Ｃ（Ｏ）Ｎ（Ｒ）２、－Ｎ（Ｈ）Ｃ（Ｏ）Ｎ（Ｈ）（Ｒ）、－Ｎ（Ｒ）Ｃ（Ｓ）Ｎ（Ｒ）２、－Ｎ（Ｈ）Ｃ（Ｓ）Ｎ（Ｒ）２、－Ｎ（Ｈ）Ｃ（Ｓ）Ｎ（Ｈ）（Ｒ）、－Ｃ（Ｒ）Ｎ（Ｒ）２Ｃ（Ｏ）ＯＲ、炭素環及び複素環からなる群から選択される。

【０６４２】

ある特定の実施形態において、Ｑは、－ＯＨである。

【０６４３】

ある特定の実施形態において、Ｑは、置換または無置換の５～１０員ヘテロアリールであり、例えば、Ｑは、イミダゾール、ピリミジン、プリン、２－アミノ－１，９－ジヒドロ－６Ｈ－プリン－６－オン－９－イル（またはグアニン－９－イル）、アデニン－９－イル、シトシン－１－イルまたはウラシル－１－イルである。ある特定の実施形態において、Ｑは、例えば、オキソ（＝Ｏ）、ＯＨ、アミノ及びＣ１～３アルキルから選択される１つ以上の置換基で置換された置換５～１４員ヘテロシクロアルキルである。例えば、Ｑは、４－メチルピペラジニル、４－（４－メトキシベンジル）ピペラジニル、またはイソインドリン－２－イル－１，３－ジオンである。

【０６４４】

ある特定の実施形態において、Ｑは、無置換または置換のＣ６～１０アリール（フェニルなど）またはＣ３～６シクロアルキルである。

【０６４５】

いくつかの実施形態において、ｎは、１である。他の実施形態において、ｎは、２である。更なる実施形態において、ｎは、３である。ある特定の他の実施形態において、ｎは、４である。例えば、Ｒ４は、－（ＣＨ２）２ＯＨであり得る。例えば、Ｒ４は、－（ＣＨ２）３ＯＨであり得る。例えば、Ｒ４は、－（ＣＨ２）４ＯＨであり得る。例えば、Ｒ４は、ベンジルであり得る。例えば、Ｒ４は、４－メトキシベンジルであり得る。

【０６４６】

いくつかの実施形態において、Ｒ４は、Ｃ３～６炭素環である。いくつかの実施形態において、Ｒ４は、Ｃ３～６シクロアルキルである。例えば、Ｒ４は、例えば、ＯＨ、ハロ、Ｃ１～６アルキルなどで任意選択により置換されたシクロヘキシルであり得る。例えば、Ｒ４は、２－ヒドロキシシクロヘキシルであり得る。

【０６４７】

いくつかの実施形態において、Ｒは、Ｈである。

【０６４８】

いくつかの実施形態において、Ｒは、無置換Ｃ１～３アルキルまたは無置換Ｃ２～３アルケニルである。例えば、Ｒ４は、－ＣＨ２ＣＨ（ＯＨ）ＣＨ３または－ＣＨ２ＣＨ（ＯＨ）ＣＨ２ＣＨ３であり得る。

【０６４９】

いくつかの実施形態において、Ｒは、置換Ｃ１～３アルキル、例えば、ＣＨ２ＯＨである。例えば、Ｒ４は、－ＣＨ２ＣＨ（ＯＨ）ＣＨ２ＯＨであり得る。

【０６５０】

いくつかの実施形態において、Ｒ２及びＲ３は、それらが結合している原子とともに、複素環または炭素環を形成する。いくつかの実施形態において、Ｒ２及びＲ３は、それらが結合している原子とともに、Ｎ、Ｏ、Ｓ及びＰから選択される１つ以上のヘテロ原子を有する５～１４員芳香族または非芳香族複素環を形成する。いくつかの実施形態において、Ｒ２及びＲ３は、それらが結合している原子とともに、芳香族または非非芳香族のいずれかである、任意選択により置換されたＣ３～２０炭素環（例えば、Ｃ３～１８炭素環、Ｃ３～１５炭素環、Ｃ３～１２炭素環またはＣ３～１０炭素環）を形成する。いくつかの実施形態において、Ｒ２及びＲ３は、それらが結合している原子とともに、Ｃ３～６炭素環を形成する。他の実施形態において、Ｒ２及びＲ３は、それらが結合している原子とともに、シクロヘキシルまたはフェニル基などのＣ６炭素環を形成する。ある特定の実施形態において、複素環またはＣ３～６炭素環は、１つ以上のアルキル基で置換される（例えば、同じ環原子または隣接するもしくは隣接していない環原子上）。例えば、Ｒ２及びＲ３は、それらが結合している原子とともに、１つ以上のＣ５アルキル置換を有するシクロヘキシルまたはフェニル基を形成し得る。ある特定の実施形態において、Ｒ２及びＲ３によって形成された複素環またはＣ３～６炭素環は、炭素環基で置換される。例えば、Ｒ２及びＲ３は、それらが結合している原子とともに、シクロヘキシルで置換されているシクロヘキシルまたはフェニル基を形成し得る。いくつかの実施形態において、Ｒ２及びＲ３は、それらが結合している原子とともに、シクロヘプチル、シクロペンタデカニルまたはナフチル基などのＣ７～１５炭素環を形成する。

【０６５１】

いくつかの実施形態において、Ｒ４は、－（ＣＨ２）ｎＱ及び－（ＣＨ２）ｎＣＨＱＲから選択される。いくつかの実施形態において、Ｑは、－ＯＲ、－ＯＨ、－Ｏ（ＣＨ２）ｎＮ（Ｒ）２、－ＯＣ（Ｏ）Ｒ、－ＣＸ３、－ＣＮ、－Ｎ（Ｒ）Ｃ（Ｏ）Ｒ、－Ｎ（Ｈ）Ｃ（Ｏ）Ｒ、－Ｎ（Ｒ）Ｓ（Ｏ）２Ｒ、－Ｎ（Ｈ）Ｓ（Ｏ）２Ｒ、－Ｎ（Ｒ）Ｃ（Ｏ）Ｎ（Ｒ）２、－Ｎ（Ｈ）Ｃ（Ｏ）Ｎ（Ｒ）２、－Ｎ（Ｈ）Ｃ（Ｏ）Ｎ（Ｈ）（Ｒ）、－Ｎ（Ｒ）Ｃ（Ｓ）Ｎ（Ｒ）２、－Ｎ（Ｈ）Ｃ（Ｓ）Ｎ（Ｒ）２、－Ｎ（Ｈ）Ｃ（Ｓ）Ｎ（Ｈ）（Ｒ）及び複素環からなる群から選択される。他の実施形態において、Ｑは、イミダゾール、ピリミジン及びプリンからなる群から選択される。

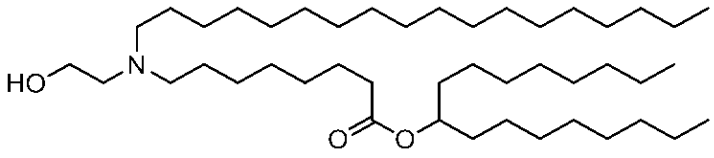
【０６５２】

いくつかの実施形態において、Ｒ２及びＲ３は、それらが結合している原子とともに、複素環または炭素環を形成する。いくつかの実施形態において、Ｒ２及びＲ３は、それらが結合している原子とともに、フェニル基などのＣ３～６炭素環を形成する。ある特定の実施形態において、複素環またはＣ３～６炭素環は、１つ以上のアルキル基で置換される（例えば、同じ環原子または隣接するもしくは隣接していない環原子上）。例えば、Ｒ２及びＲ３は、それらが結合している原子とともに、１つ以上のＣ５アルキル置換を有するフェニル基を形成し得る。

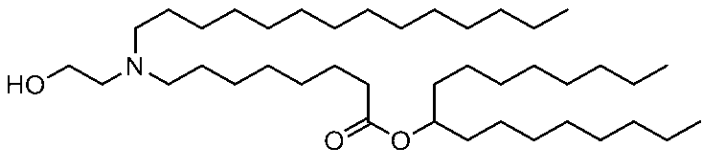
【０６５３】

いくつかの実施形態において、本開示の医薬組成物の式（Ｉ）の化合物は、以下及びそれらの塩もしくは立体異性体からなる群から選択される：

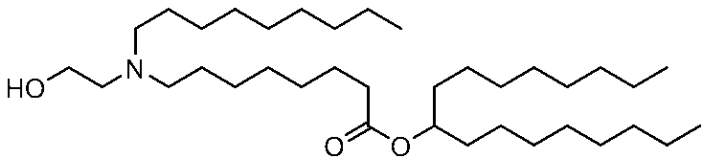
【化２０】



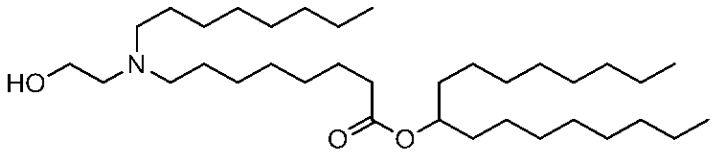
（化合物１）、



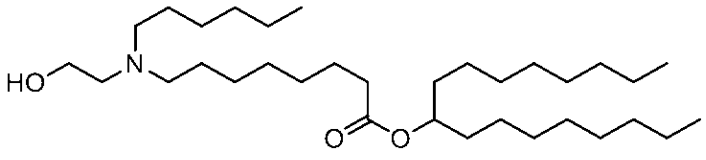
（化合物２）、



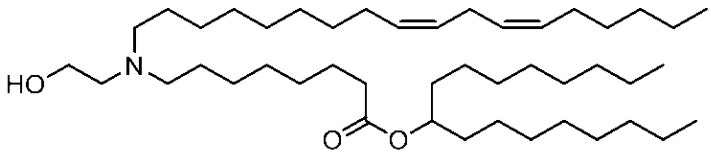
（化合物３）、



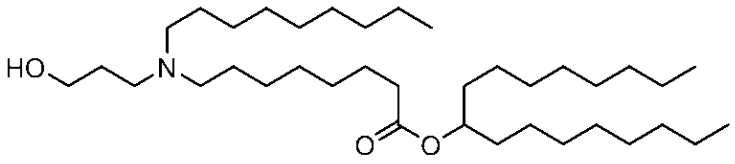
（化合物４）、



（化合物５）、

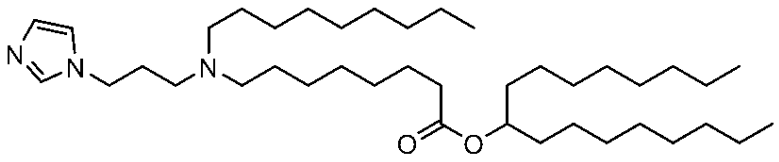


（化合物６）、

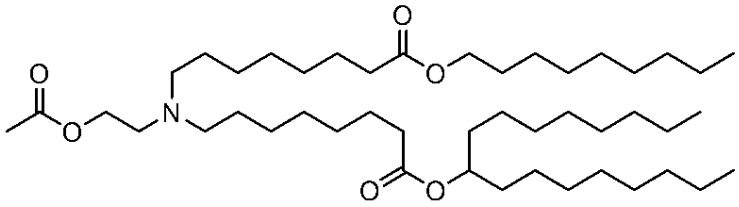


（化合物７）、

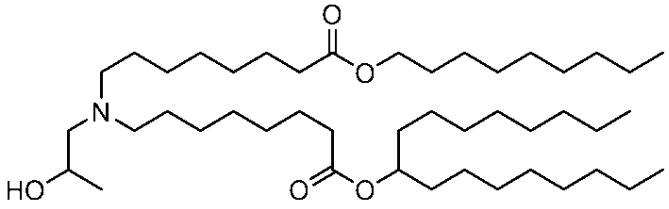
【化２１】



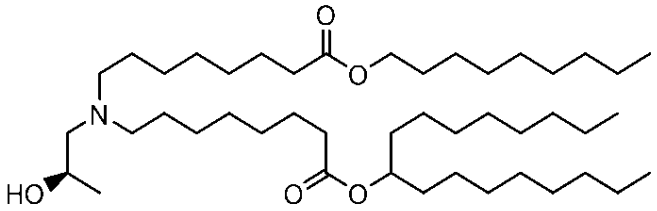
(化合物8)、



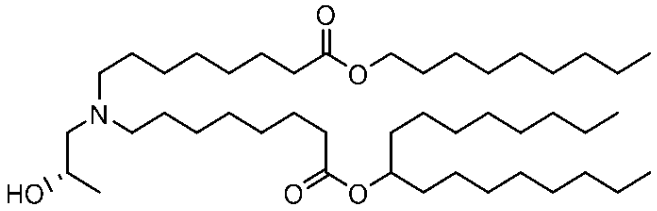
(化合物9)、



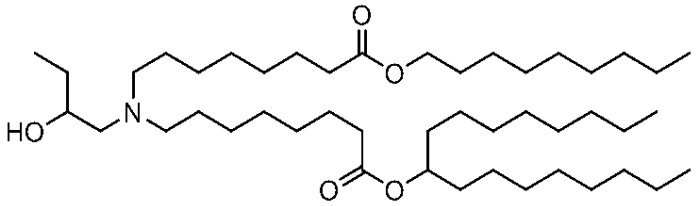
(化合物１０)、



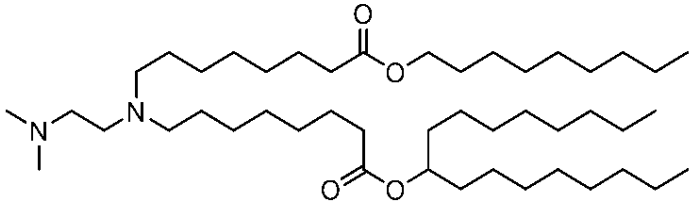
(化合物１１)、



(化合物１２)、

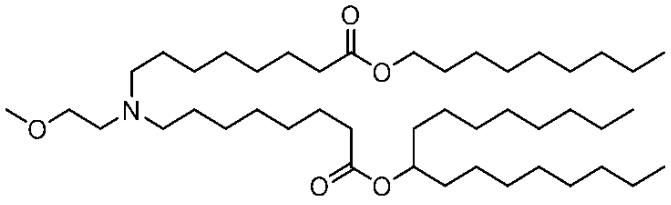


(化合物１３)、

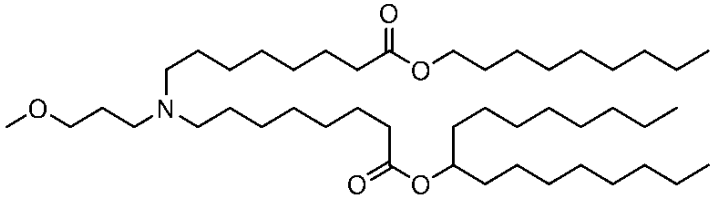


(化合物１４)、

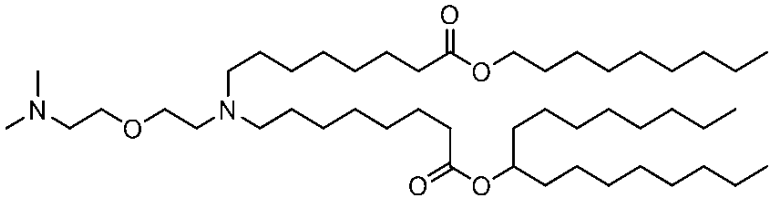
【化２２】



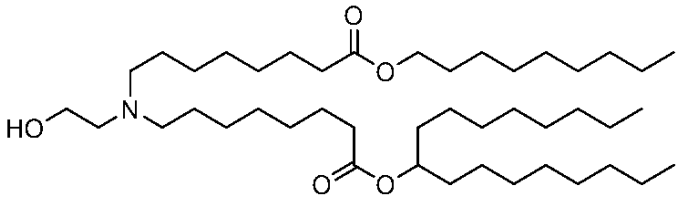
（化合物１５）、



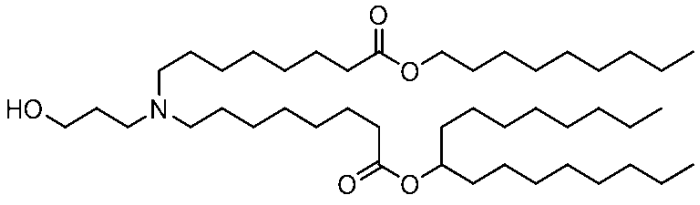
（化合物１６）、



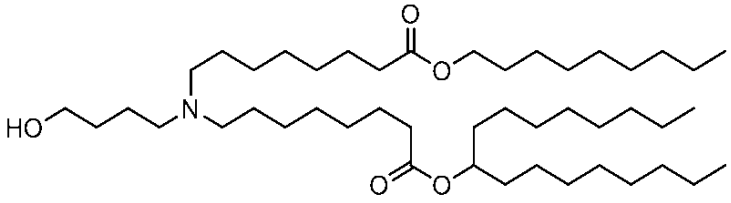
（化合物１７）、



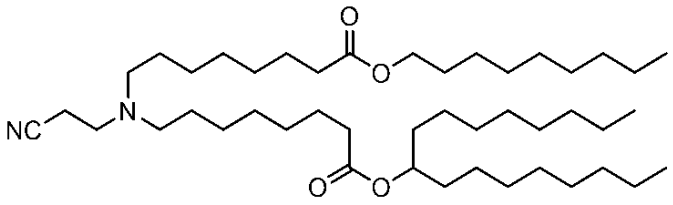
（化合物１８）、



（化合物１９）、

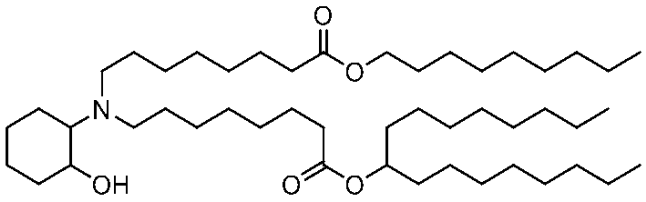


（化合物２０）、

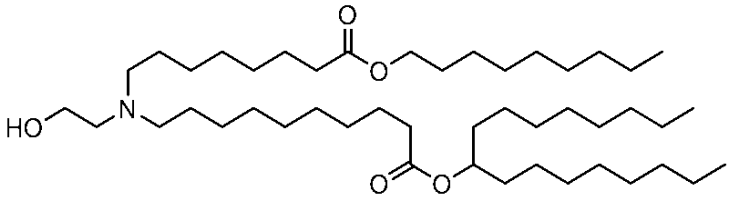


（化合物２１）、

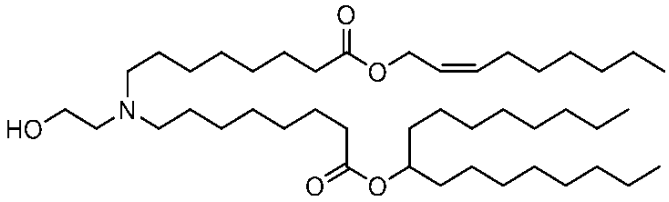
【化２３】



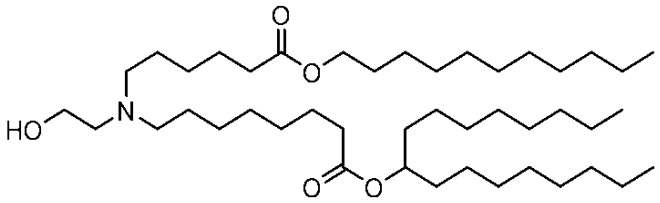
(化合物２２)、



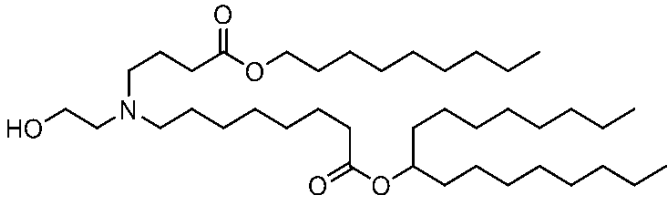
(化合物２３)、



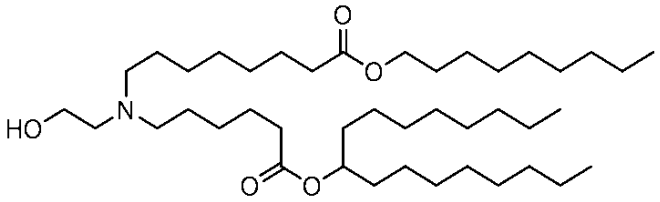
(化合物２４)、



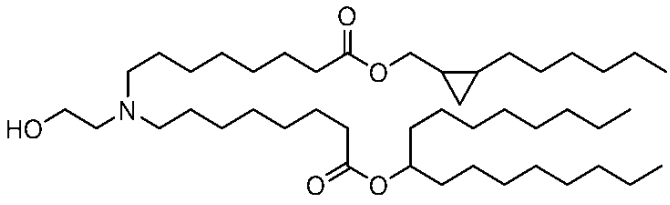
(化合物２５)、



(化合物２６)、

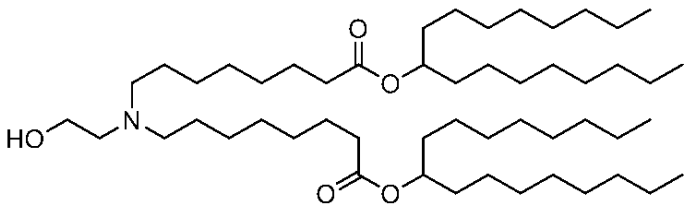


(化合物２７)、

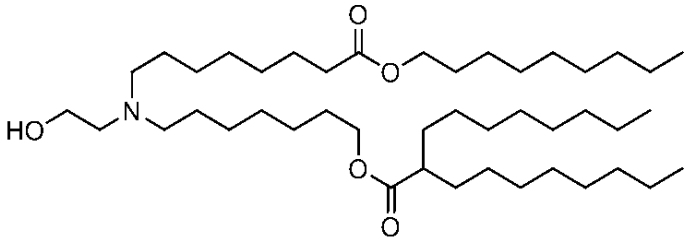


(化合物２８)、

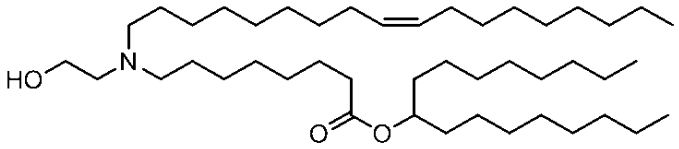
【化２４】



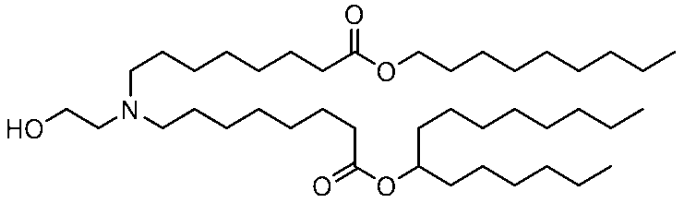
(化合物２９)、



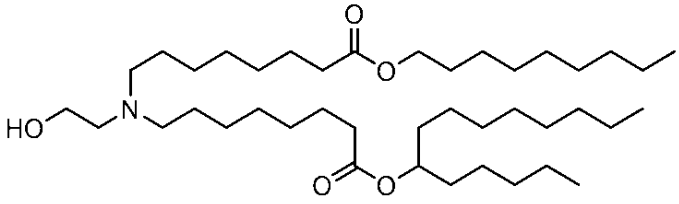
(化合物３０)、



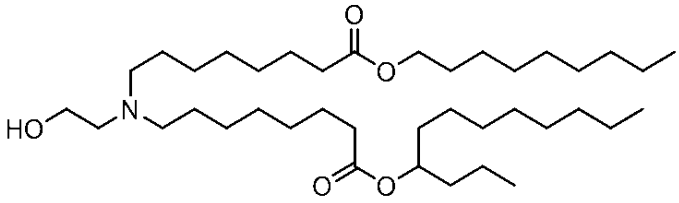
(化合物３１)、



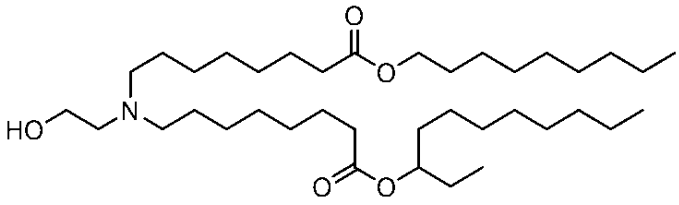
(化合物３２)、



(化合物３３)、

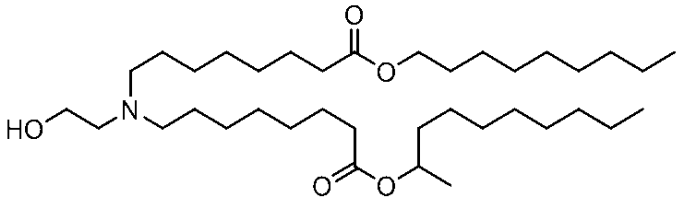


(化合物３４)、

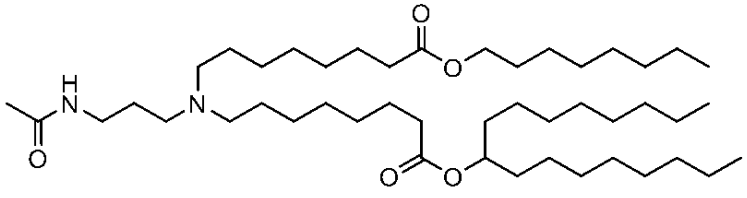


(化合物３５)、

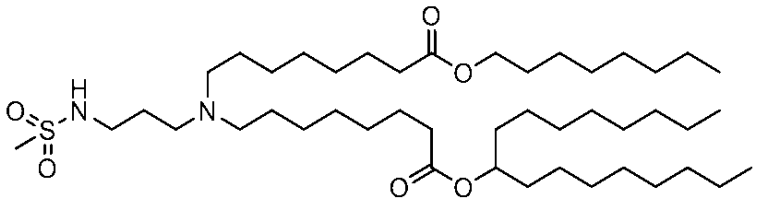
【化２５】



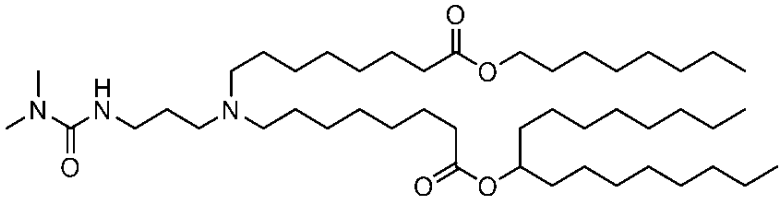
(化合物３６)、



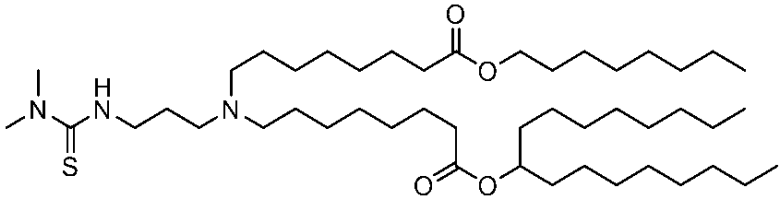
(化合物３７)、



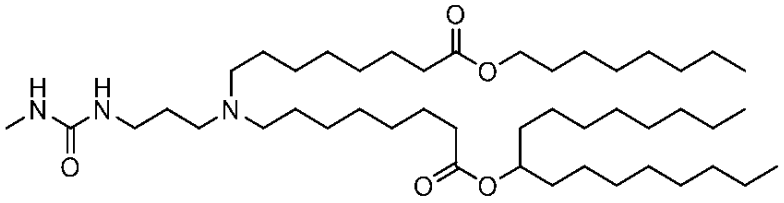
(化合物３８)、



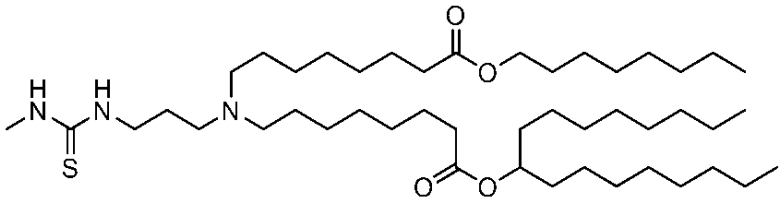
(化合物３９)、



(化合物４０)、

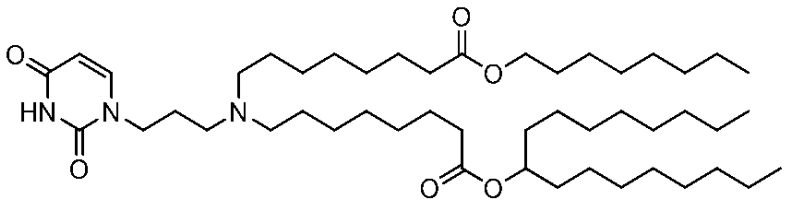


(化合物４１)、

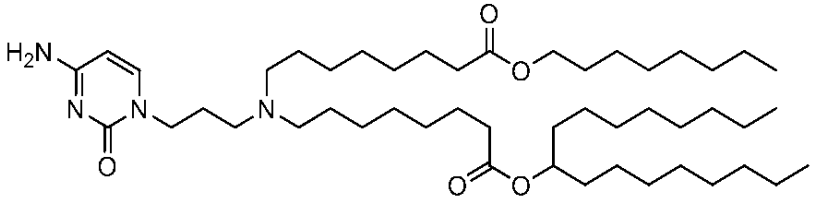


(化合物４２)、

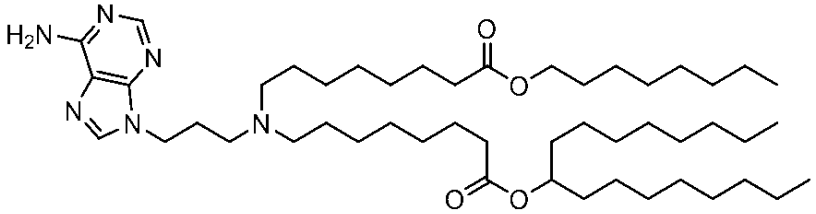
【化２６】



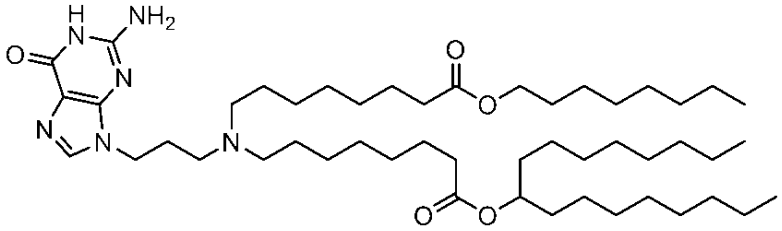
(化合物４３)、



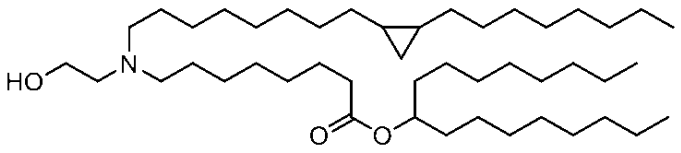
(化合物４４)、



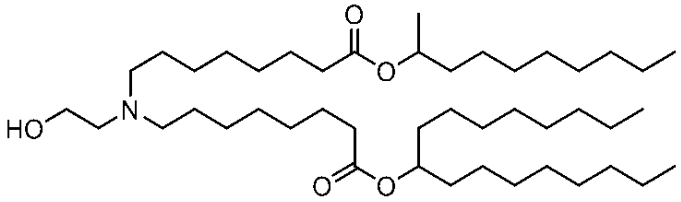
(化合物４５)、



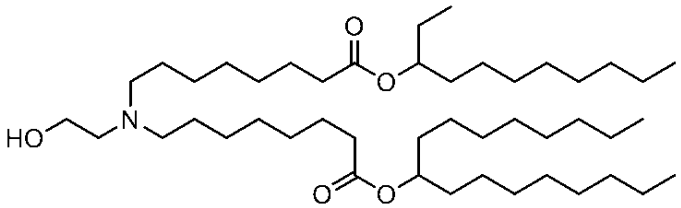
(化合物４６)、



(化合物４７)、

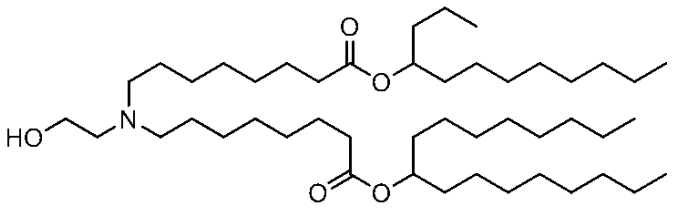


(化合物４８)、

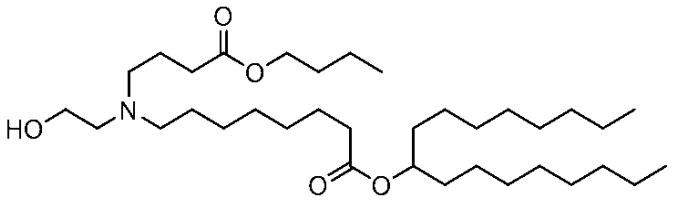


(化合物４９)、

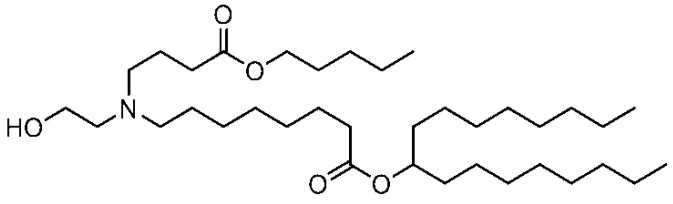
【化２７】



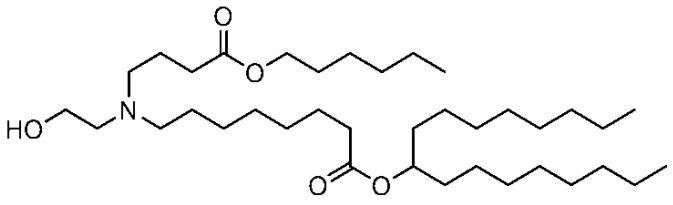
(化合物５０)、



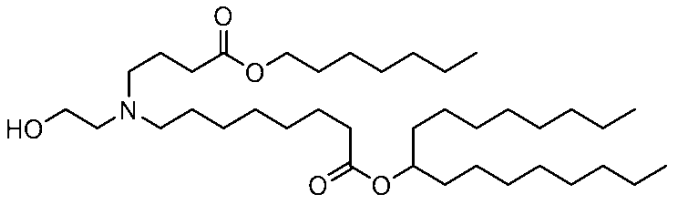
(化合物５１)、



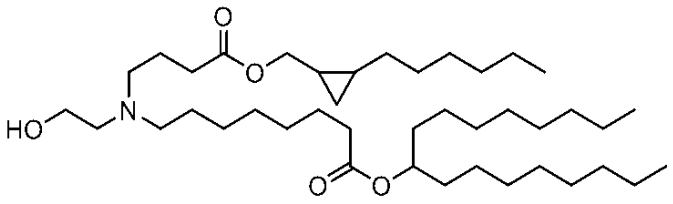
(化合物５２)、



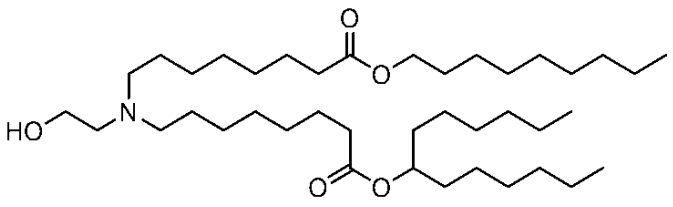
(化合物５３)、



(化合物５４)、

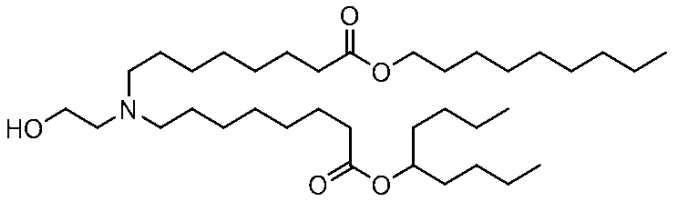


(化合物５５)、

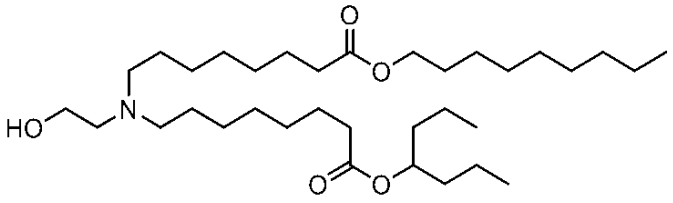


(化合物５６)、

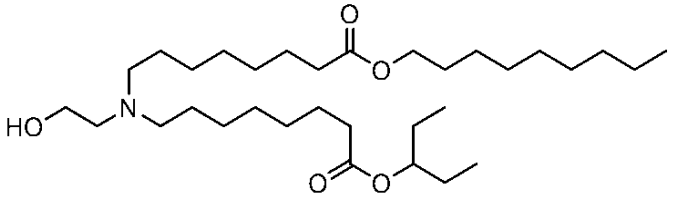
【化２８】



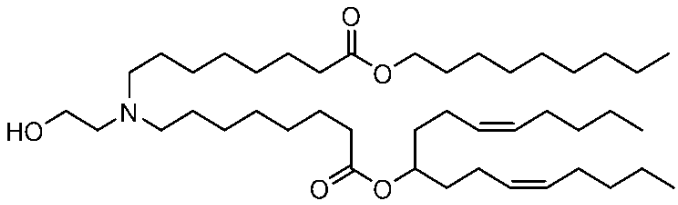
(化合物５７)、



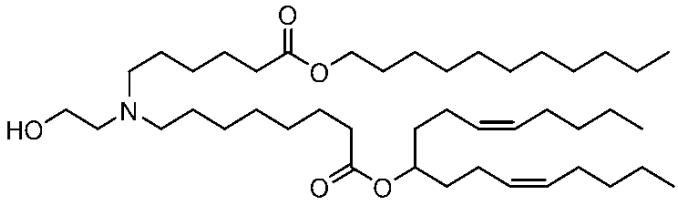
(化合物５８)、



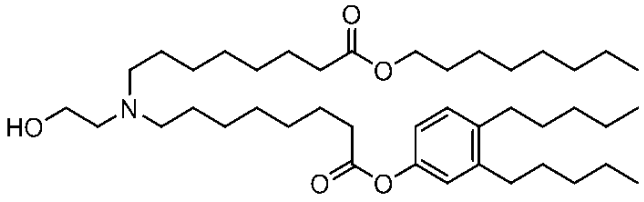
(化合物５９)、



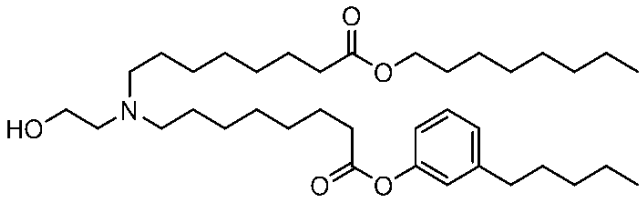
(化合物６０)、



(化合物６１)、

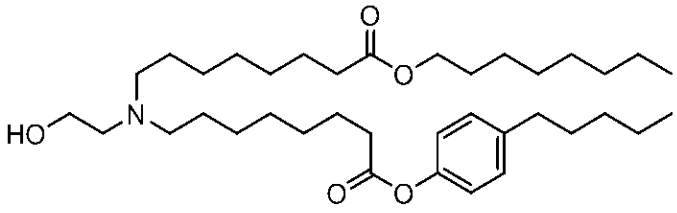


(化合物６２)、

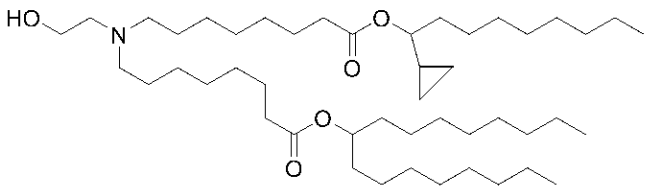


(化合物６３)、

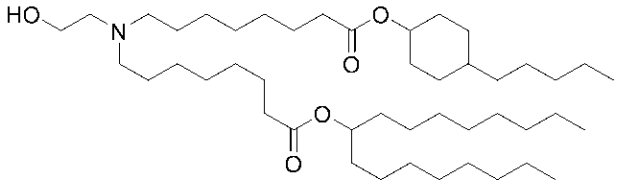
【化２９】



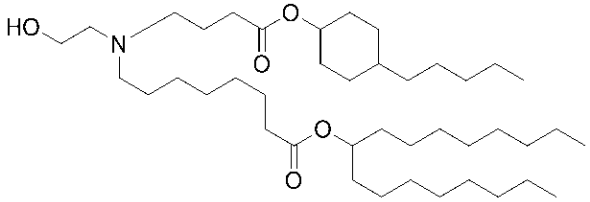
(化合物６４)、



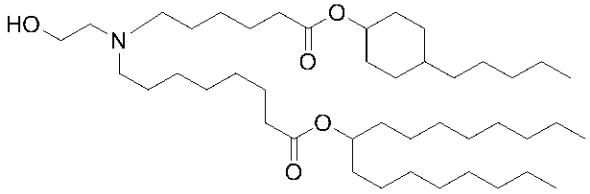
(化合物６５)、



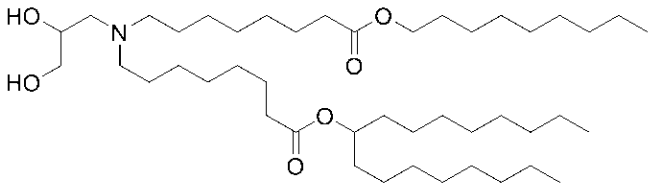
(化合物６６)、



(化合物６７)、

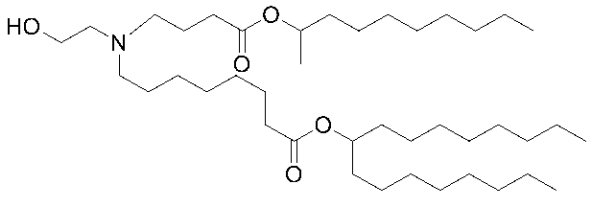


(化合物６８)、

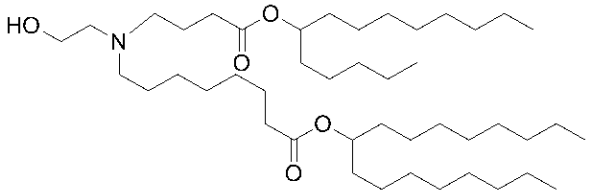


(化合物６９)、

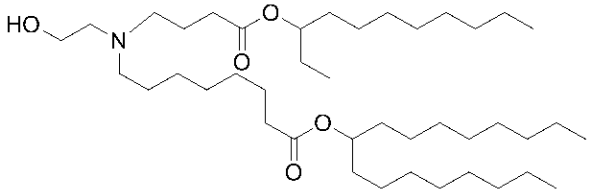
【化３０】



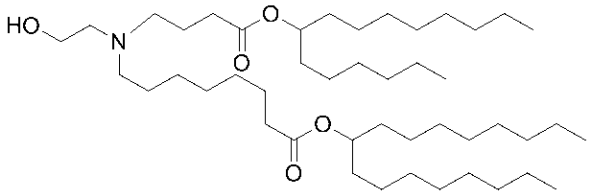
(化合物７０)、



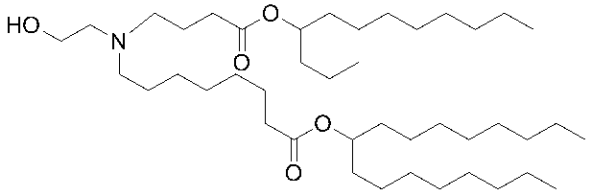
(化合物７１)、



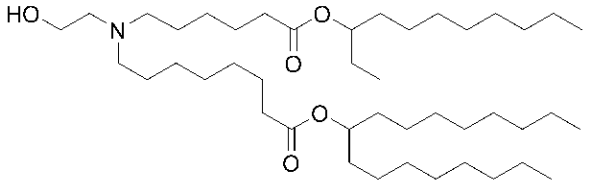
(化合物７２)、



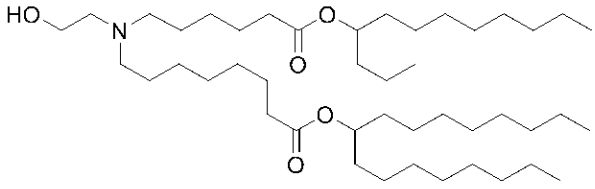
(化合物７３)、



(化合物７４)、

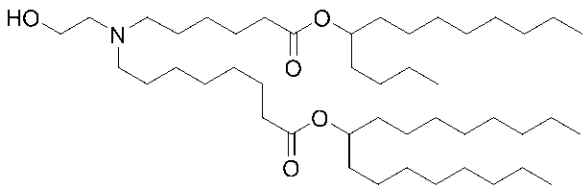


(化合物７５)、

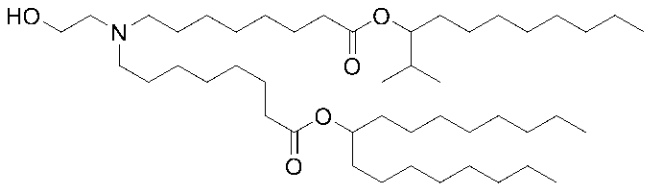


(化合物７６)、

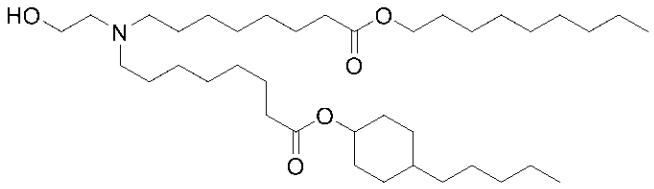
【化３１】



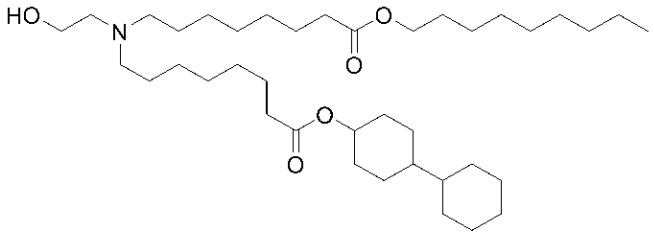
(化合物７７)、



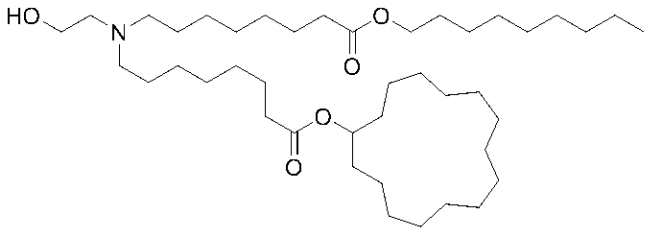
(化合物７８)、



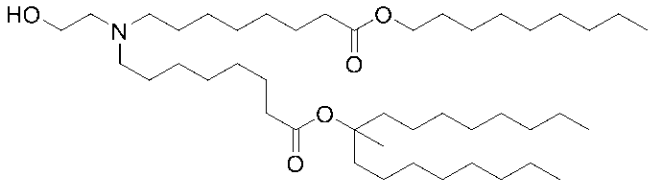
(化合物７９)、



(化合物８０)、

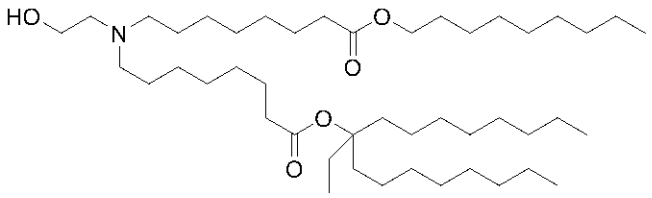


(化合物８１)、

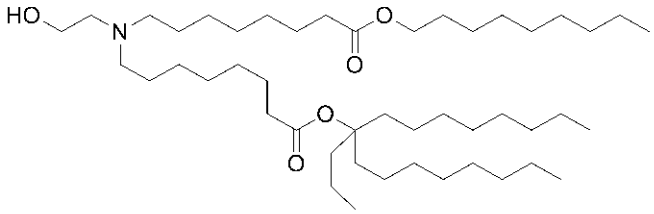


(化合物８２)、

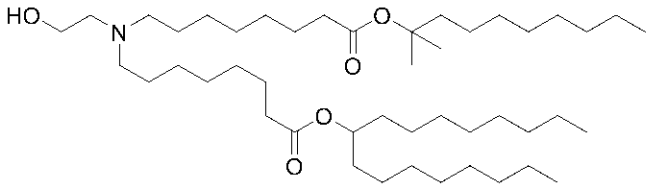
【化３２】



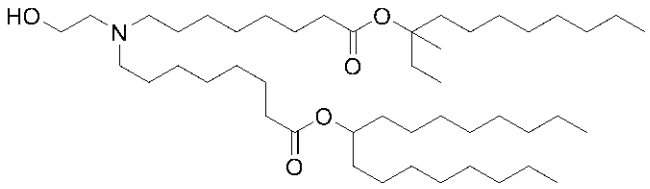
(化合物８３)、



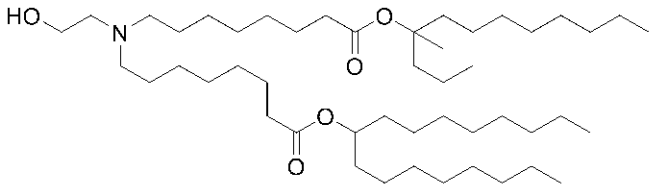
(化合物８４)、



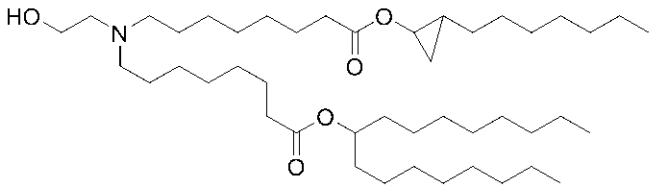
(化合物８５)、



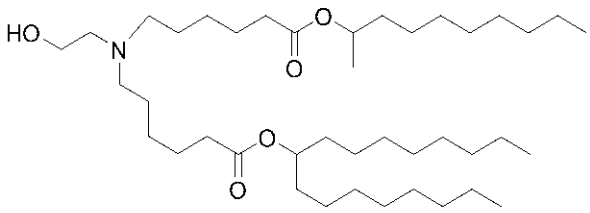
(化合物８６)、



(化合物８７)、

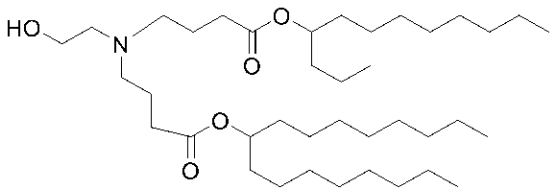


(化合物８８)、

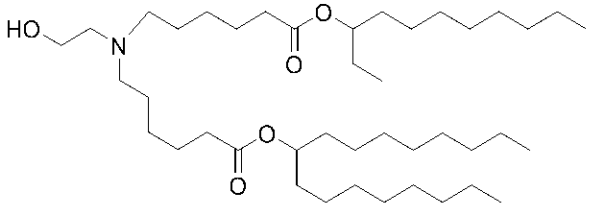


(化合物８９)、

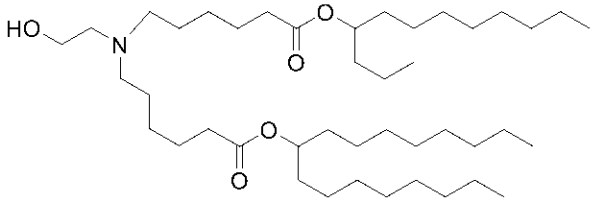
【化３３】



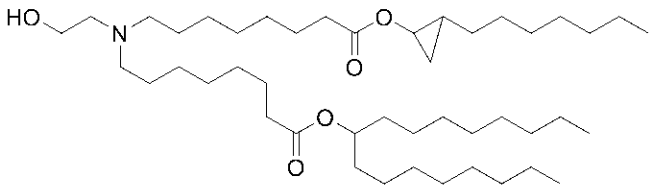
(化合物９０)、



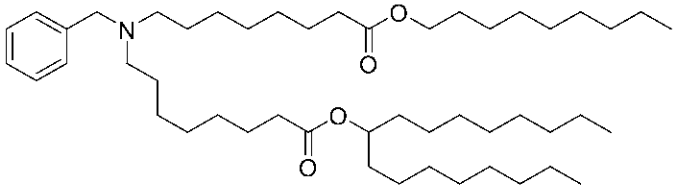
(化合物９１)、



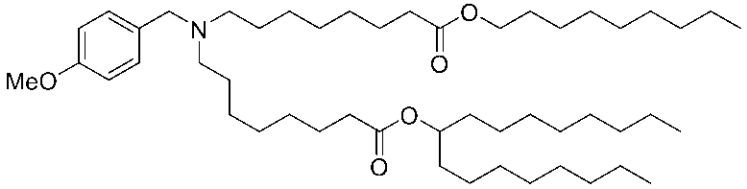
(化合物９２)、



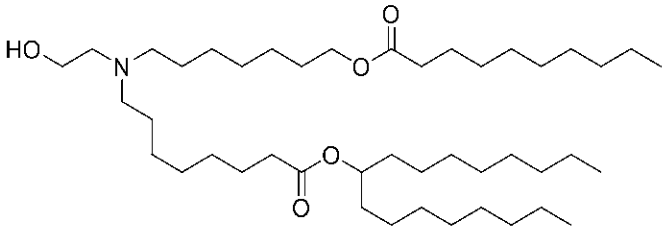
(化合物９３)、



(化合物９４)、

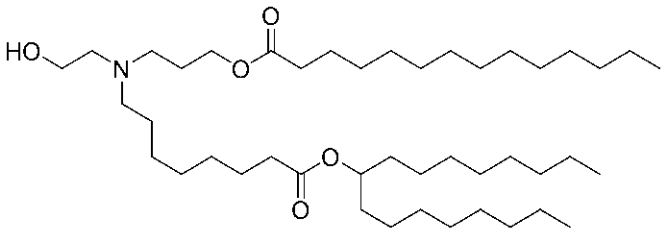


(化合物９５)、

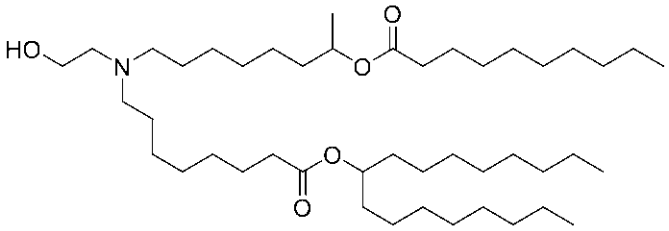


(化合物９６)、

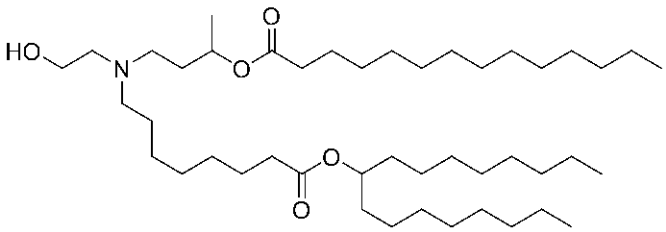
【化３４】



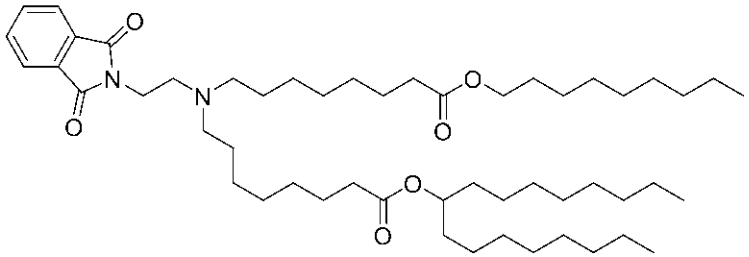
(化合物９７)、



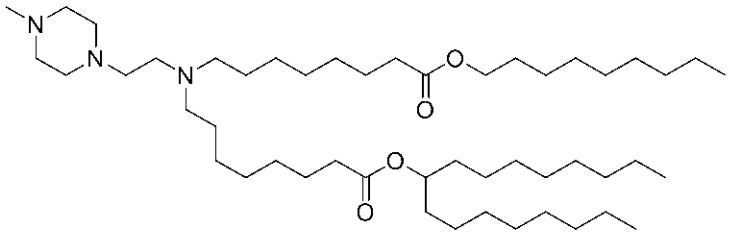
(化合物９８)、



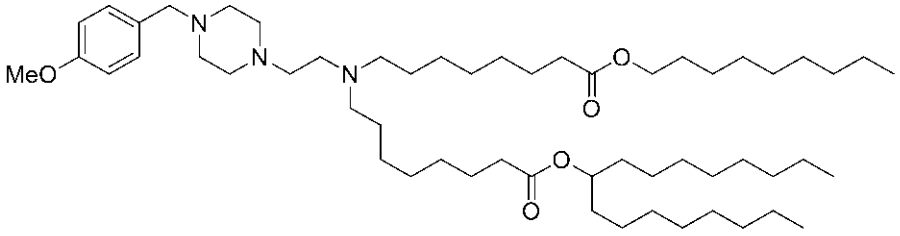
(化合物９９)、



(化合物１００)、

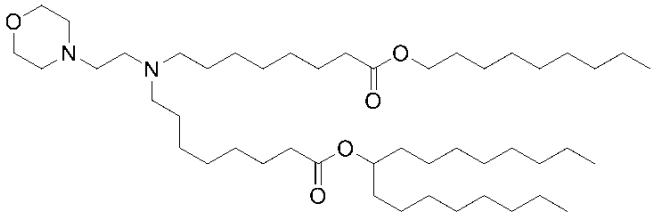


(化合物１０１)、

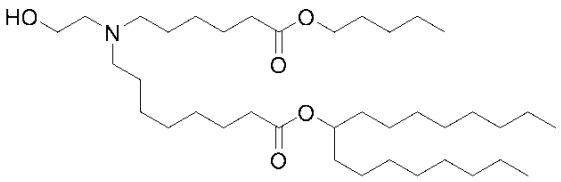


(化合物１０２)、

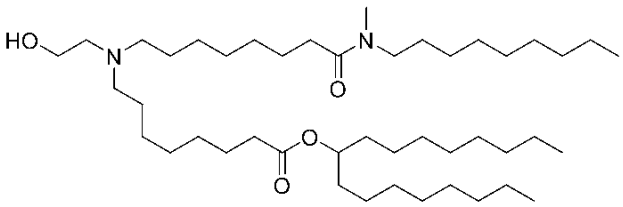
【化３５】



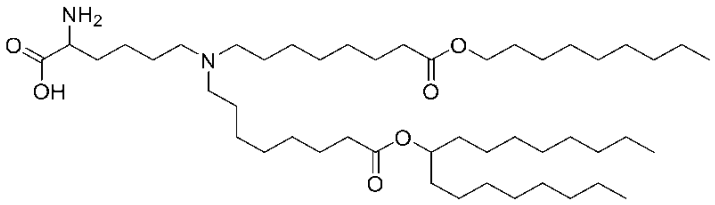
(化合物１０３)、



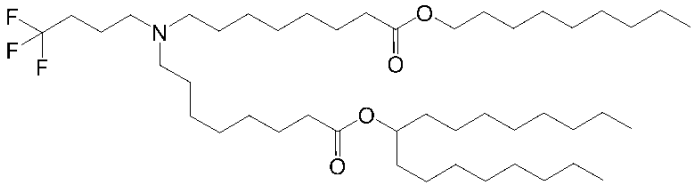
(化合物１０４)、



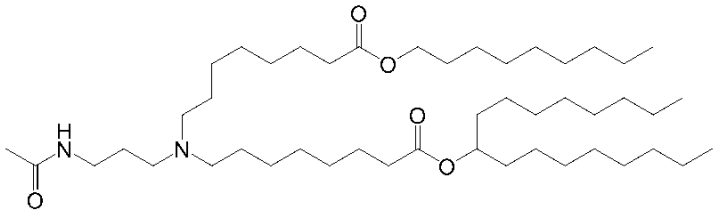
(化合物１０５)、



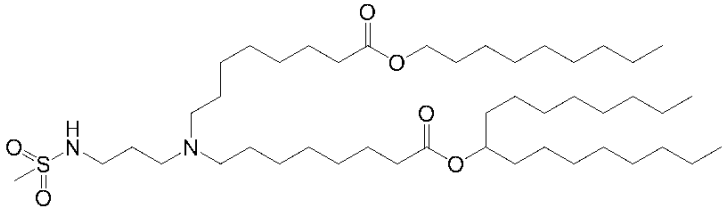
(化合物１０６)、



(化合物１０７)、

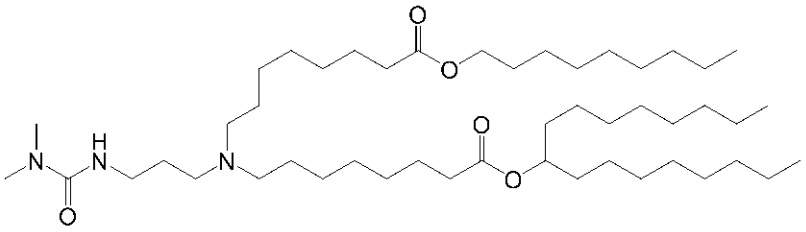


(化合物１０８)、

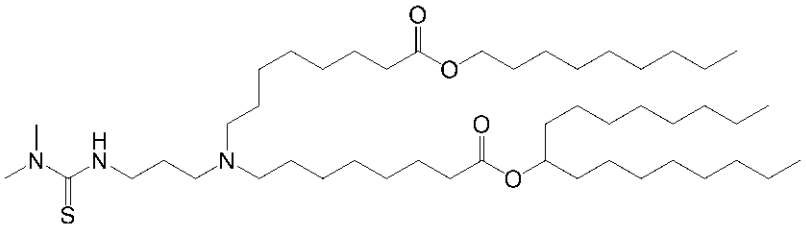


(化合物１０９)、

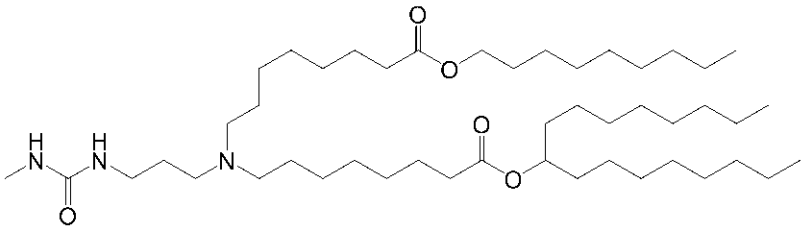
【化３６】



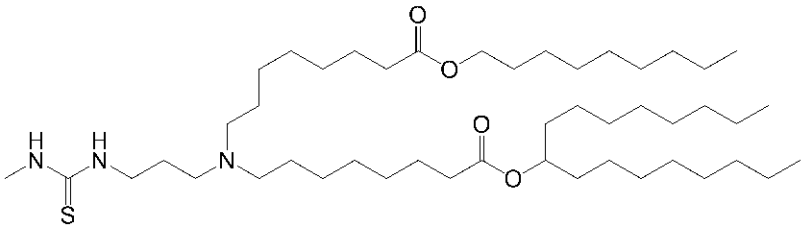
（化合物１１０）、



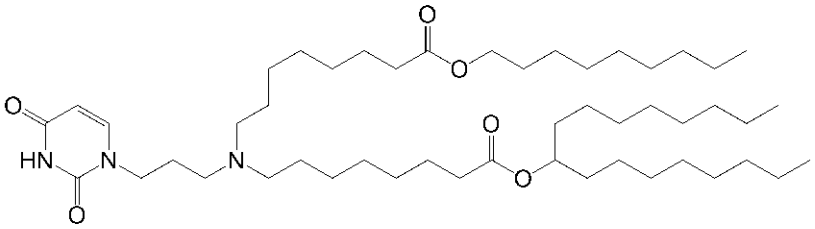
（化合物１１１）、



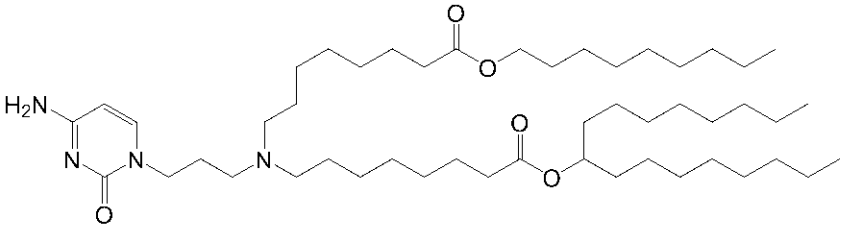
（化合物１１２）、



（化合物１１３）、

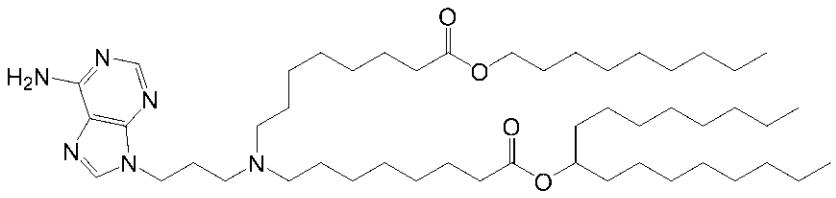


（化合物１１４）、

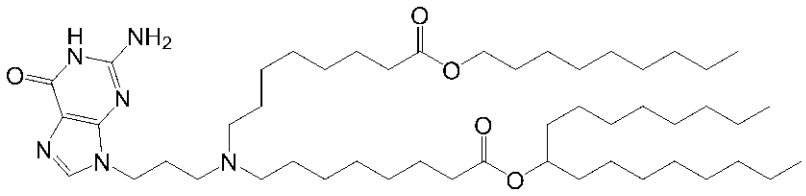


（化合物１１５）、

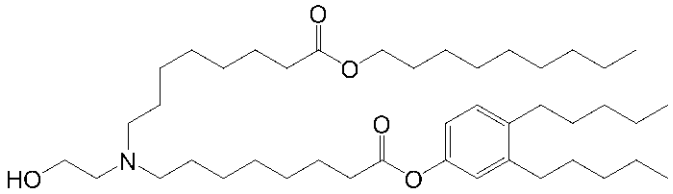
【化３７】



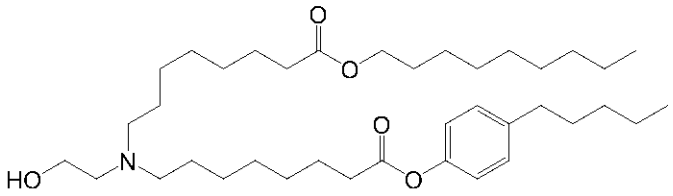
(化合物１１６)、



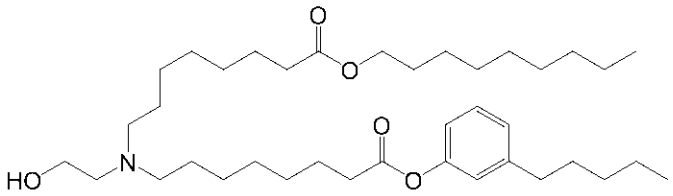
(化合物１１７)、



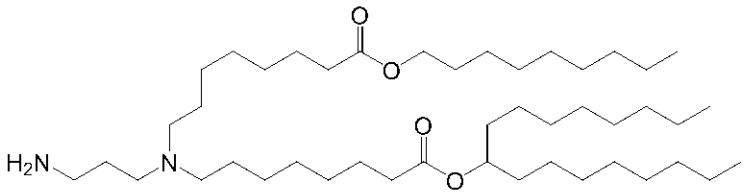
(化合物１１８)、



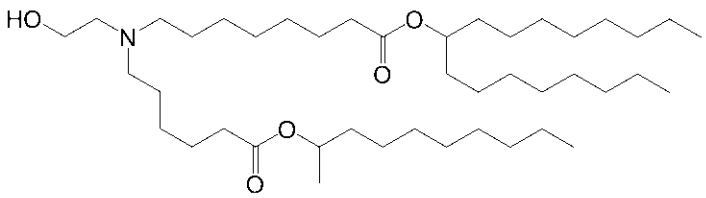
(化合物１１９)、



(化合物１２０)、

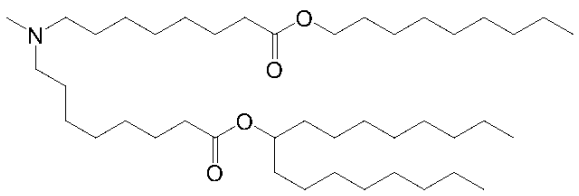


(化合物１２１)、

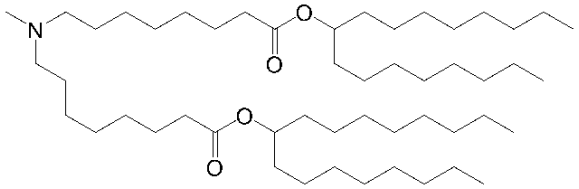


(化合物１２２)、

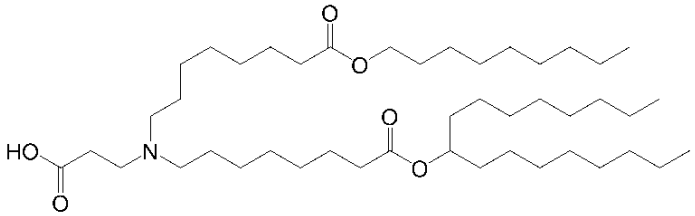
【化３８】



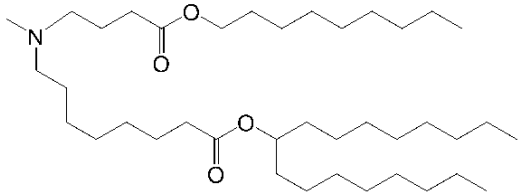
(化合物１２３)、



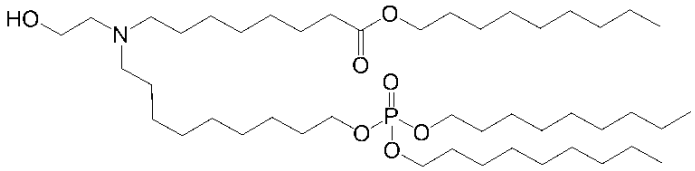
(化合物１２４)、



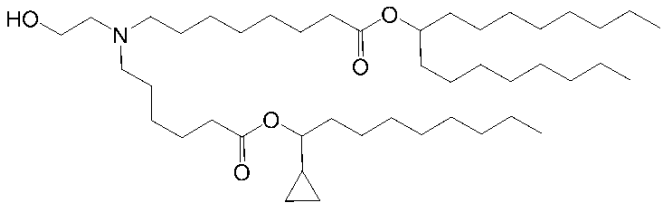
(化合物１２５)、



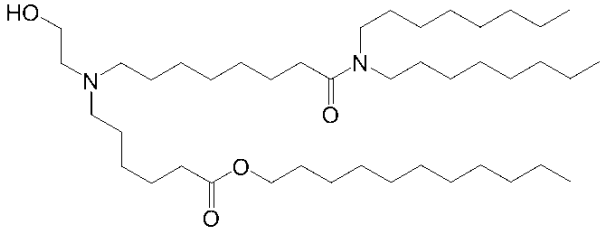
(化合物１２６)、



(化合物１２７)、

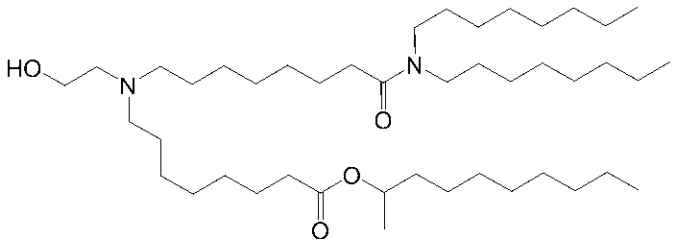


(化合物１２８)、

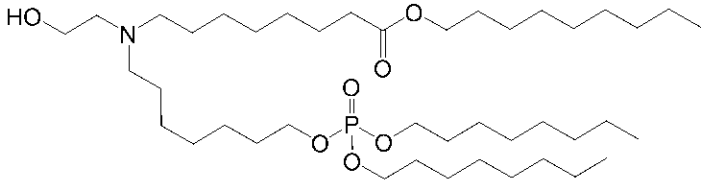


(化合物１２９)、

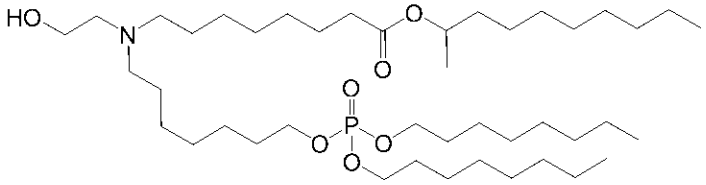
【化３９】



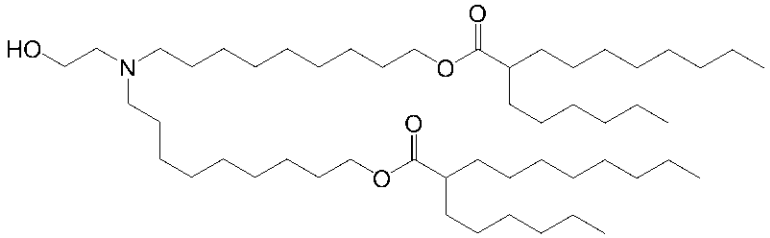
(化合物１３０)、



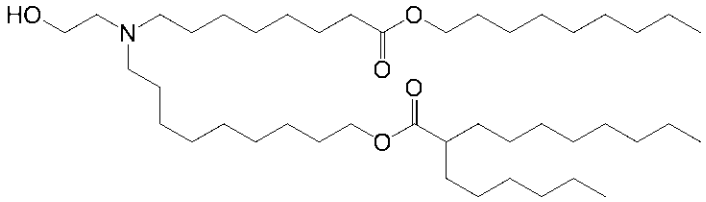
(化合物１３１)、



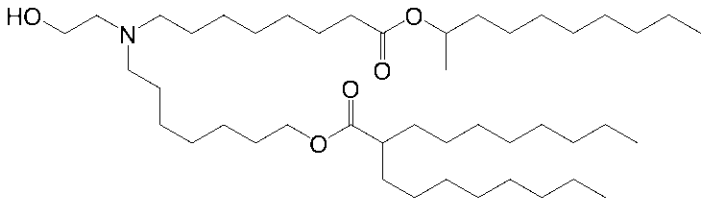
(化合物１３２)、



(化合物１３３)、

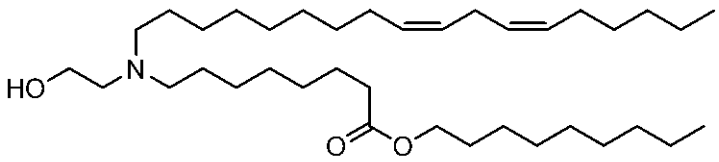


(化合物１３４)、

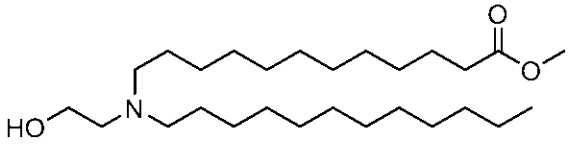


(化合物１３５)、

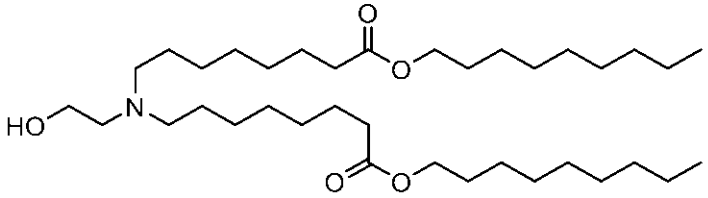
【化４０】



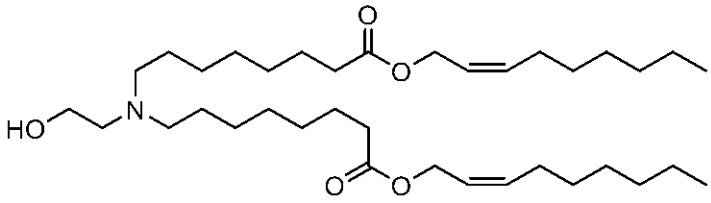
(化合物１３６)、



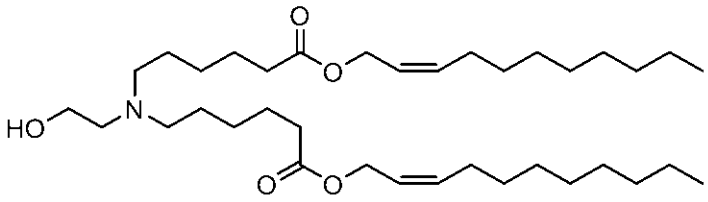
(化合物１３７)、



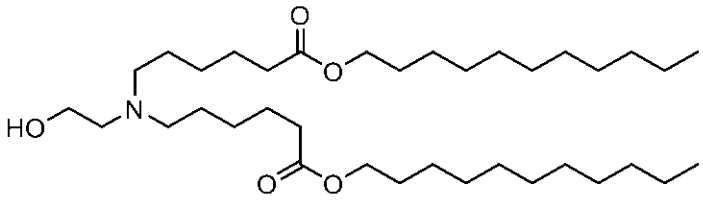
(化合物１３８)、



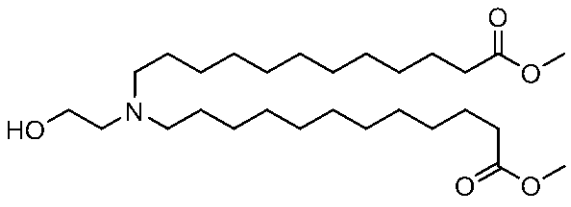
(化合物１３９)、



(化合物１４０)、

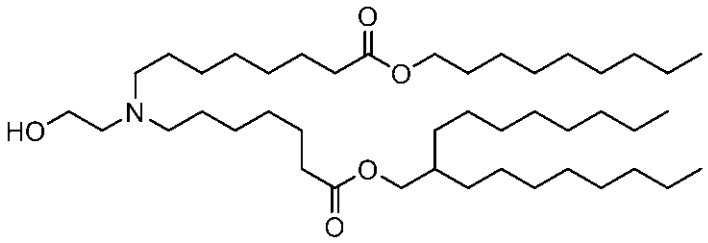


(化合物１４１)、

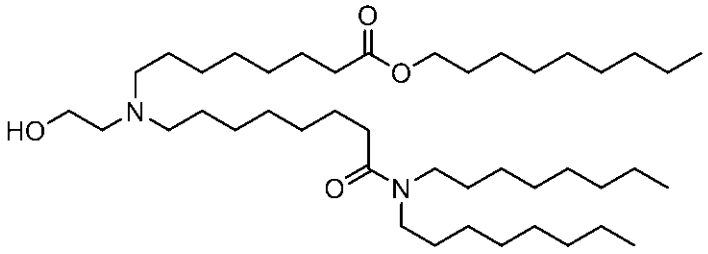


(化合物１４２)、

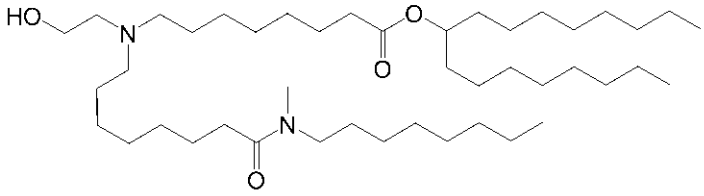
【化４１】



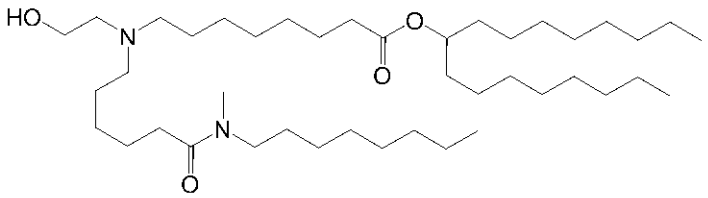
(化合物１４３)、



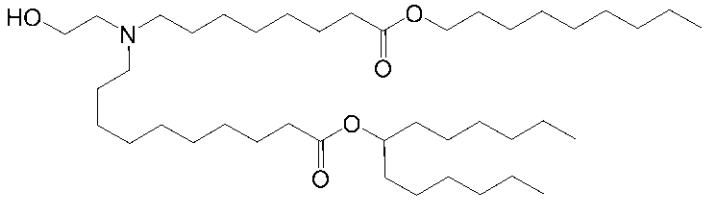
(化合物１４４)、



(化合物１４５)、



(化合物１４６)、



(化合物１４７)

。

【０６５４】

式（Ｉ）による脂質の中央アミン部分は、典型的に、アミノ部分のｐＫａを下回るｐＨでプロトン化し（すなわち、正電荷）、当該ｐＫａを上回るｐＨでは実質的に帯電しない。このような脂質は、イオン性アミノ脂質と称され得る。

【０６５５】

具体的な一実施形態において、式（Ｉ）の化合物は、化合物１８である。

【０６５６】

いくつかの実施形態において、式（Ｉ）の化合物の量は、脂質組成物中、約１モル％～９９モル％の範囲である。

【０６５７】

一実施形態において、式（Ｉ）の化合物の量は、脂質組成物中、少なくとも約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５

、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８または９９モル％である。

【０６５８】

一実施形態において、式（Ｉ）の化合物の量は、脂質組成物中、約３０モル％～約７０モル％、約３５モル％～約６５モル％、約４０モル％～約６０モル％及び約４５モル％～約５５モル％の範囲である。

【０６５９】

具体的な一実施形態において、式（Ｉ）の化合物の量は、脂質組成物中、約５０モル％である。

【０６６０】

式（Ｉ）の化合物に加えて、本明細書で開示される医薬組成物の脂質組成物は、リン脂質、構造脂質、第四級アミン化合物、ＰＥＧ脂質及びこれらの任意の組み合わせなどの追加成分を含み得る。

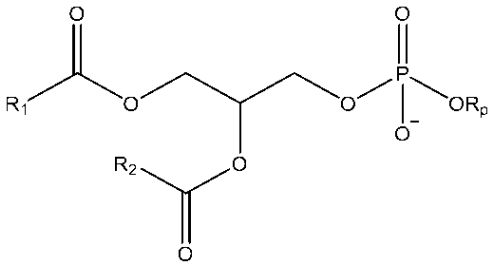
【０６６１】

ｂ．脂質組成物の追加成分

（ｉ）リン脂質

本明細書で開示される医薬組成物の脂質組成物は、１つ以上のリン脂質、例えば、１つ以上の飽和または（ポリ）不飽和リン脂質またはこれらの組み合わせを含み得る。一般に、リン脂質は、リン脂質部分と、１つ以上の脂肪酸部分とを含む。例えば、リン脂質は、式（ＩＩＩ）に従う脂質であり得、

【化４２】



（ＩＩＩ）

式中、Ｒｐは、リン脂質部分を表し、Ｒ１及びＲ２は、同じであっても異なっていてもよい、不飽和含有または非含有の脂肪酸部分を表す。

【０６６２】

リン脂質部分は、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルセリン、ホスファチジン酸、２－リゾホスファチジルコリン及びスフィンゴミエリンからなる非限定的な群から選択することができる。

【０６６３】

脂肪酸部分は、例えば、ラウリン酸、ミリスチン酸、ミリストレイン酸、パルミチン酸、パルミトレイン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、α－リノレン酸、エルカ酸、フィタン酸、アラキジン酸、アラキドン酸、エイコサペンタエン酸、ベヘン酸、ドコサペンタエン酸及びドコサヘキサエン酸からなる非限定的な群から選択することができる。

【０６６４】

特定のリン脂質は、膜への融合を促進することができる。例えば、カチオン性リン脂質は、膜（例えば、細胞膜または細胞内膜）の１つ以上の負電荷を帯びたリン脂質と相互作用し得る。膜へのリン脂質の融合は、脂質含有組成物（例えば、ＬＮＰ）の１つ以上の要素（例えば、治療薬）が膜を通過することを可能にし、例えば、１つ以上の要素を標的組織（例えば、腫瘍組織）へ送達することを可能にする。

【０６６５】

分岐、酸化、環化及びアルキンを含む修飾及び置換を有する天然種を含む、非天然リン脂質種もまた企図される。例えば、リン脂質は、１つ以上のアルキン（例えば、１つ以上の

二重結合が三重結合により置換されているアルケニル基）により官能化されてもよいし、アルキンに架橋してもよい。アルキン基は、適切な反応条件下でアジドに曝されると、銅触媒による付加環化を受け得る。かかる反応は、ナノ粒子組成物の脂質二重層を官能化して膜透過または膜認識を促進させるか、ナノ粒子組成物を標的部分またはイメージング部分（例えば、色素）などの有用な構成成分にコンジュゲートする際に有用であり得る。

【０６６６】

リン脂質には、ホスファチジルコリン、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、ホスファチジグリセロール及びホスファチジン酸などのグリセロリン脂質が含まれるが、これらに限定されない。リン脂質はまた、スフィンゴミエリンなどのリンスフィンゴ脂質が含まれる。いくつかの実施形態において、本明細書で開示される腫瘍内送達用医薬組成物は、２つ以上のリン脂質を含み得る。２つ以上のリン脂質が使用される場合、かかるリン脂質は、同じリン脂質クラス（例えば、ＭＳＰＣ及びＤＳＰＣ）または異なるクラス（例えば、ＭＳＰＣ及びＭＳＰＥ）に属し得る。

【０６６７】

リン脂質は、対称型でも非対称型でもよい。本明細書で使用されるとき、「対称リン脂質」という用語は、対をなす脂肪酸部分とスフィンゴ脂質とを有するグリセロリン脂質を含み、可変の脂肪酸部分とスフィンゴシン骨格の炭化水素鎖は、同数の炭素原子を含む。本明細書で使用されるとき、「非対称リン脂質」という用語は、リゾ脂質、異なる脂肪酸部分（例えば、異なる数の炭素原子及び／または不飽和（例えば、二重結合）を含む脂肪酸部分）を有するグリセロリン脂質、及びスフィンゴ脂質を含み、可変の脂肪酸部分とスフィンゴシン骨格の炭化水素鎖は、異なる数の素原子を含む（例えば、可変の脂肪酸部分は、炭化水素鎖よりも少なくとも２個多い炭素原子を含むか、炭化水素鎖よりも少なくとも２個少ない炭素原子を含む）。

【０６６８】

いくつかの実施形態において、本明細書で開示される医薬組成物の脂質組成物は、少なくとも１つの対称リン脂質を含む。対称リン脂質は、

１，２－ジプロピオニル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（０３：０ＰＣ）、
１，２－ジブチリル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（０４：０　ＰＣ）、
１，２－ジペンタノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（０５：０　ＰＣ）、
１，２－ジヘキサノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（０６：０　ＰＣ）、
１，２－ジヘプタノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（０７：０　ＰＣ）、
１，２－ジオクタノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（０８：０　ＰＣ）、
１，２－ジノナノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（０９：０　ＰＣ）、
１，２－ジデカノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（１０：０　ＰＣ）、
１，２－ジウンデカノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（１１：０　ＰＣ、ＤＵＰＣ）、
１，２－ジラウロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（１２：０　ＰＣ）、
１，２－ジトリデカノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（１３：０　ＰＣ）、
１，２－ジミリストイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（１４：０　ＰＣ、ＤＭＰＣ）、
１，２－ジペンタデカノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（１５：０　ＰＣ）、
１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（１６：０　ＰＣ、ＤＰＰＣ）、
１，２－ジフィタノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（４ＭＥ　１６：０　ＰＣ）、
１，２－ジヘプタデカノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（１７：０　ＰＣ）、
１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（１８：０　ＰＣ、ＤＳＰＣ）、
１，２－ジノナデカノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（１９：０　ＰＣ）、
１，２－ジアラキドイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（２０：０　ＰＣ）、
１，２－ジヘンアラキドイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（２１：０　ＰＣ）、

１，２－ジベヘノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（２２：０　ＰＣ）、
１，２－ジトリコサノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（２３：０　ＰＣ）、
１，２－ジリグノセロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（２４：０　ＰＣ）、
１，２－ジミリストレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（１４：１（Δ９－Ｃｉｓ）ＰＣ）、
１，２－ジミリステライドイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（１４：１（Δ９－Ｔｒａｎｓ）ＰＣ）、
１，２－ジパルミトレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（１６：１（Δ９－Ｃｉｓ）ＰＣ）、
１，２－ジパルミテライドイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（１６：１（Δ９－Ｔｒａｎｓ）ＰＣ）、
１，２－ジペトロセレノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（１８：１（Δ６－Ｃｉｓ）ＰＣ）、
１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（１８：１（Δ９－Ｃｉｓ）ＰＣ、ＤＯＰＣ）、
１，２－ジエライドイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（１８：１（Δ９－Ｔｒａｎｓ）ＰＣ）、
１，２－ジリノレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（１８：２（Ｃｉｓ）ＰＣ、ＤＬＰＣ）、
１，２－ジリノレノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（１８：３（Ｃｉｓ）ＰＣ、ＤＬｎＰＣ）、
１，２－ジエイコセノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（２０：１（Ｃｉｓ）ＰＣ）、
１，２－ジアラキドノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（２０：４（Ｃｉｓ）ＰＣ、ＤＡＰＣ）、
１，２－ジエルコイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（２２：１（Ｃｉｓ）ＰＣ）、
１，２－ジドコサヘキサエノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（２２：６（Ｃｉｓ）ＰＣ、ＤＨＡＰＣ）、
１，２－ジネルボノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（２４：１（Ｃｉｓ）ＰＣ）、
１，２－ジヘキサノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（０６：０　ＰＥ）、
１，２－ジオクタノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（０８：０　ＰＥ）、
１，２－ジデカノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（１０：０　ＰＥ）、
１，２－ジラウロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（１２：０　ＰＥ）、
１，２－ジミリストイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（１４：０　ＰＥ）、
１，２－ジペンタデカノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（１５：０　ＰＥ）、
１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（１６：０　ＰＥ）、
１，２－ジフィタノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（４ＭＥ　１６：０　ＰＥ）、
１，２－ジヘプタデカノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（１７：０　ＰＥ）、
１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（１８：０　ＰＥ、ＤＳＰＥ）、

１，２－ジパルミトレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（１６：１ＰＥ）、
１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（１８：１（Δ９－Ｃｉｓ）ＰＥ、ＤＯＰＥ）、
１，２－ジエライドイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（１８：１（Δ９－Ｔｒａｎｓ）ＰＥ）、
１，２－ジリノレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（１８：２　ＰＥ、ＤＬＰＥ）、
１，２－ジリノレノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（１８：３　ＰＥ、ＤＬｎＰＥ）、
１，２－ジアラキドノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（２０：４　ＰＥ、ＤＡＰＥ）、
１，２－ジドコサヘキサエノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（２２：６　ＰＥ、ＤＨＡＰＥ）、
１，２－ジ－Ｏ－オクタデセニル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（１８：０　ジエーテル　ＰＣ）、
１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホ－ｒａｃ－（１－グリセロール）ナトリウム塩（ＤＯＰＧ）、及び
これらの任意の組み合わせからなる非限定的な群から選択することができる。
【０６６９】
いくつかの実施形態において、本明細書で開示される医薬組成物の脂質組成物は、ＤＬＰＣ、ＤＭＰＣ、ＤＯＰＣ、ＤＰＰＣ、ＤＳＰＣ、ＤＵＰＣ、１８：０　ジエーテル　ＰＣ、ＤＬｎＰＣ、ＤＡＰＣ、ＤＨＡＰＣ、ＤＯＰＥ、４ＭＥ　１６：０　ＰＥ、ＤＳＰＥ、ＤＬＰＥ、ＤＬｎＰＥ、ＤＡＰＥ、ＤＨＡＰＥ、ＤＯＰＧ及びこれらの任意の組み合わせからなる非限定的な群から選択される少なくとも１つの対称リン脂質を含む。
【０６７０】
いくつかの実施形態において、本明細書で開示される医薬組成物の脂質組成物は、少なくとも１つの非対称リン脂質を含む。非対称リン脂質は、
１－ミリストイル－２－パルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（１４：０－１６：０　ＰＣ、ＭＰＰＣ）、
１－ミリストイル－２－ステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（１４：０－１８：０　ＰＣ、ＭＳＰＣ）、
１－パルミトイル－２－アセチル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（１６：０－０２：０　ＰＣ）、
１－パルミトイル－２－ミリストイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（１６：０－１４：０　ＰＣ、ＰＭＰＣ）、
１－パルミトイル－２－ステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（１６：０－１８：０　ＰＣ、ＰＳＰＣ）、
１－パルミトイル－２－オレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（１６：０－１８：１　ＰＣ、ＰＯＰＣ）、
１－パルミトイル－２－リノレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（１６：０－１８：２　ＰＣ、ＰＬＰＣ）、
１－パルミトイル－２－アラキドノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（１６：０－２０：４　ＰＣ）、
１－パルミトイル－２－ドコサヘキサエノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（１４：０－２２：６　ＰＣ）、
１－ステアロイル－２－ミリストイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（１８：０－１４：０　ＰＣ、ＳＭＰＣ）、
１－ステアロイル－２－パルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（１８：０－１６：０　ＰＣ、ＳＰＰＣ）、

１－ステアロイル－２－オレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（１８：０－１８：１　ＰＣ、ＳＯＰＣ）、
１－ステアロイル－２－リノレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（１８：０－１８：２　ＰＣ）、
１－ステアロイル－２－アラキドノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（１８：０－２０：４　ＰＣ）、
１－ステアロイル－２－ドコサヘキサエノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（１８：０－２２：６　ＰＣ）、
１－オレオイル－２－ミリストイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（１８：１－１４：０　ＰＣ、ＯＭＰＣ）、
１－オレオイル－２－パルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（１８：１－１６：０　ＰＣ、ＯＰＰＣ）、
１－オレオイル－２－ステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（１８：１－１８：０　ＰＣ、ＯＳＰＣ）、
１－パルミトイル－２－オレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（１６：０－１８：１　ＰＥ、ＰＯＰＥ）、
１－パルミトイル－２－リノレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（１６：０－１８：２　ＰＥ）、
１－パルミトイル－２－アラキドノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（１６：０－２０：４　ＰＥ）、
１－パルミトイル－２－ドコサヘキサエノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（１６：０－２２：６　ＰＥ）、
１－ステアロイル－２－オレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（１８：０－１８：１　ＰＥ）、
１－ステアロイル－２－リノレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（１８：０－１８：２　ＰＥ）、
１－ステアロイル－２－アラキドノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（１８：０－２０：４　ＰＥ）、
１－ステアロイル－２－ドコサヘキサエノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（１８：０－２２：６　ＰＥ）、
１－オレオイル－２－コレステリルヘミスクシノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＯＣｈｅｍｓＰＣ）、及び
これらの任意の組み合わせからなる非限定的な群から選択することができる。
【０６７１】
脂質組成物に有用な非対称脂質はまた、リゾ脂質であってもよい。リゾ脂質は、
１－ヘキサノイル－２－ヒドロキシ－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（０６：０　Ｌｙｓｏ　ＰＣ）、
１－ヘプタノイル－２－ヒドロキシ－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（０７：０　Ｌｙｓｏ　ＰＣ）、
１－オクタノイル－２－ヒドロキシ－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（０８：０　Ｌｙｓｏ　ＰＣ）、
１－ノナノイル－２－ヒドロキシ－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（０９：０　Ｌｙｓｏ　ＰＣ）、
１－デカノイル－２－ヒドロキシ－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（１０：０　Ｌｙｓｏ　ＰＣ）、
１－ウンデカノイル－２－ヒドロキシ－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（１１：０　Ｌｙｓｏ　ＰＣ）、
１－ラウロイル－２－ヒドロキシ－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（１２：０　Ｌｙｓｏ　ＰＣ）、
１－トリデカノイル－２－ヒドロキシ－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（１３：０

Ｌｙｓｏ　ＰＣ）、
１－ミリストイル－２－ヒドロキシ－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（１４：０　Ｌｙｓｏ　ＰＣ）、
１－ペンタデカノイル－２－ヒドロキシ－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（１５：０　Ｌｙｓｏ　ＰＣ）、
１－パルミトイル－２－ヒドロキシ－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（１６：０　Ｌｙｓｏ　ＰＣ）、
１－ヘプタデカノイル－２－ヒドロキシ－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（１７：０　Ｌｙｓｏ　ＰＣ）、
１－ステアロイル－２－ヒドロキシ－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（１８：０　Ｌｙｓｏ　ＰＣ）、
１－オレオイル－２－ヒドロキシ－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（１８：１　Ｌｙｓｏ　ＰＣ）、
１－ノナデカノイル－２－ヒドロキシ－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（１９：０　Ｌｙｓｏ　ＰＣ）、
１－アラキドイル－２－ヒドロキシ－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（２０：０　Ｌｙｓｏ　ＰＣ）、
１－ベヘノイル－２－ヒドロキシ－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（２２：０　Ｌｙｓｏ　ＰＣ）、
１－リグノセロイル－２－ヒドロキシ－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（２４：０　Ｌｙｓｏ　ＰＣ）、
１－ヘキサコサノイル－２－ヒドロキシ－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（２６：０　Ｌｙｓｏ　ＰＣ）、
１－ミリストイル－２－ヒドロキシ－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（１４：０　Ｌｙｓｏ　ＰＥ）、
１－パルミトイル－２－ヒドロキシ－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（１６：０　Ｌｙｓｏ　ＰＥ）、
１－ステアロイル－２－ヒドロキシ－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（１８：０　Ｌｙｓｏ　ＰＥ）、
１－オレオイル－２－ヒドロキシ－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（１８：１　Ｌｙｓｏ　ＰＥ）、
１－ヘキサデシル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（Ｃ１６　Ｌｙｓｏ　ＰＣ）、及びこれらの任意の組み合わせからなる非限定的な群から選択することができる。

【０６７２】

いくつかの実施形態において、本明細書で開示される医薬組成物の脂質組成物は、ＭＰＰＣ、ＭＳＰＣ、ＰＭＰＣ、ＰＳＰＣ、ＳＭＰＣ、ＳＰＰＣ及びこれらの任意の組み合わせからなる群から選択される少なくとも１つの非対称リン脂質を含む。いくつかの実施形態において、非対称リン脂質は、１－ミリストイル－２－ステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＭＳＰＣ）である。

【０６７３】

いくつかの実施形態において、本明細書で開示される脂質組成物は、１つ以上の対称リン脂質、１つ以上の非対称リン脂質またはこれらの組み合わせを含有し得る。複数のリン脂質が存在する場合、これらのリン脂質は、等モル比または非等モル比で存在し得る。

【０６７４】

一実施形態において、本明細書で開示される医薬組成物の脂質組成物は、脂質組成物中、約１モル％～約２０モル％、約５モル％ｔｏ約２０モル％、約１０モル％～約２０モル％、約１５モル％～約２０モル％、約１モル％～約１５モル％、約５モル％～約１５モル％、約１０モル％～約１５モル％、約５モル％～約１０モル％の範囲である総量のリン脂質（例えば、ＭＳＰＣ）を含む。一実施形態において、リン脂質の量は、脂質組成物中、約８モル％～約１５モル％である。一実施形態において、リン脂質（例えば、ＭＳＰＣ）の

量は、脂質組成物中、約１０モル％である。
【０６７５】
いくつかの態様において、特定のリン脂質（例えば、ＭＳＰＣ）の量は、脂質組成物中、少なくとも約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９または２０モル％である。
【０６７６】
（ｉｉ）第四級アミン化合物
本明細書で開示される医薬組成物の脂質組成物は、１つ以上の第四級アミン化合物（例えば、ＤＯＴＡＰ）を含み得る。「第四級アミン化合物」という用語は、１つ以上の第四級アミン基（例えば、トリアルキルアミノ基）を有し、永久的に正電荷を帯び、塩の形態で存在する化合物を含むために使用される。例えば、１つ以上の第四級アミン基が脂質またはポリマー（例えば、ＰＥＧ）中に存在し得る。いくつかの実施形態において、第四級アミン化合物は、（１）第四級アミン基と、（２）（ｉ）直鎖状または分岐状及び飽和または不飽和の炭化水素鎖、ならびに（ｉｉ）任意選択により、第四級アミン基と炭化水素鎖との間にエーテル、エステル、カルボニルまたはケタール結合を含む、少なくとも１つの疎水性尾部基とを含む。いくつかの実施形態において、第四級アミン基は、トリメチルアンモニウム基であり得る。いくつかの実施形態において、第四級アミン化合物は、２つの同一炭化水素鎖を含む。いくつかの実施形態において、第四級アミン化合物は、２つの異なる炭化水素鎖を含む。
【０６７７】
いくつかの実施形態において、本明細書で開示される医薬組成物の脂質組成物は、少なくとも１つの第四級アミン化合物を含む。第四級アミン化合物は、
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）、
Ｎ－［１－（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（ＤＯＴＭＡ）、
１－［２－（オレオイルオキシ）エチル］－２－オレイル－３－（２－ヒドロキシエチル）イミダゾリニウムクロリド（ＤＯＴＩＭ）、
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　トリフルオロアセテート（ＤＯＳＰＡ）、
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）、
Ｎ－（１，２－ジオレオイルオキシプロパ－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（ＤＯＲＩＥ）、
Ｎ，Ｎ－ジオレイル－Ｎ，Ｎ－ジメチルアンモニウムクロリド（ＤＯＤＡＣ）、
１，２－ジラウロイル－ｓｎ－グリセロ－３－エチルホスホコリン（ＤＬｅＰＣ）、
１，２－ジステアロイル－３－トリメチルアンモニウム－プロパン（ＤＳＴＡＰ）、
１，２－ジパルミトイル－３－トリメチルアンモニウム－プロパン（ＤＰＴＡＰ）、
１，２－ジリノレオイル－３－トリメチルアンモニウム－プロパン（ＤＬＴＡＰ）、
１，２－ジミリストイル－３－トリメチルアンモニウム－プロパン（ＤＭＴＡＰ）
１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－エチルホスホコリン（ＤＳｅＰＣ）
１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－エチルホスホコリン（ＤＰｅＰＣ）、
１，２－ジミリストイル－ｓｎ－グリセロ－３－エチルホスホコリン（ＤＭｅＰＣ）、
１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－エチルホスホコリン（ＤＯｅＰＣ）、
１，２－ジ－（９Ｚ－テトラデセノイル）－ｓｎ－グリセロ－３－エチルホスホコリン（１４：１　ＥＰＣ）、
１－パルミトイル－２－オレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－エチルホスホコリン（１６：０－１８：１　ＥＰＣ）、
及びこれらの任意の組み合わせからなる非限定的な群から選択することができる。
【０６７８】

一実施形態において、第四級アミン化合物は、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）である。

【０６７９】

第四級アミン化合物は、当該技術分野において知られており、ＵＳ２０１３／０２４５１０７Ａ１、ＵＳ２０１４／０３６３４９３Ａ１、ＵＳ８，１５８，６０１、ＷＯ２０１５／１２３２６４Ａ１及びＷＯ２０１５／１４８２４７Ａ１（その全体を参照により本明細書に援用する）に記載されているものなどである。

【０６８０】

一実施形態において、本明細書で開示される脂質組成物中の第四級アミン化合物（例えば、ＤＯＴＡＰ）の量は、約０．０１モル％～約２０モル％の範囲である。

【０６８１】

一実施形態において、本明細書で開示される脂質組成物中の第四級アミン化合物（例えば、ＤＯＴＡＰ）の量は、約０．５モル％～約２０モル％、約０．５モル％～約１５モル％、約０．５モル％～約１０モル％、約１モル％～約２０モル％、約１モル％～約１５モル％、約１モル％～約１０モル％、約２モル％～約２０モル％、約２モル％～約１５モル％、約２モル％～約１０モル％、約３モル％～約２０モル％、約３モル％～約１５モル％、約３モル％～約１０モル％、約４モル％～約２０モル％、約４モル％～約１５モル％、約４モル％～約１０モル％、約５モル％～約２０モル％、約５モル％～約１５モル％、約５モル％～約１０モル％、約６モル％～約２０モル％、約６モル％～約１５モル％、約６モル％～約１０モル％、約７モル％～約２０モル％、約７モル％～約１５モル％、約７モル％～約１０モル％、約８モル％～約２０モル％、約８モル％～約１５モル％、約８モル％～約１０モル％、約９モル％～約２０モル％、約９モル％～約１５モル％、約９モル％～約１０モル％の範囲である。

【０６８２】

一実施形態において、本明細書で開示される脂質組成物中の第四級アミン化合物（例えば、ＤＯＴＡＰ）の量は、約５モル％～約１０モル％の範囲である。

【０６８３】

一実施形態において、本明細書で開示される脂質組成物中の第四級アミン化合物（例えば、ＤＯＴＡＰ）の量は、約５モル％である。一実施形態において、本明細書で開示される脂質組成物中の第四級アミン化合物（例えば、ＤＯＴＡＰ）の量は、約１０モル％である。

【０６８４】

いくつかの実施形態において、第四級アミン化合物（例えば、ＤＯＴＡＰ）の量は、本明細書で開示される脂質組成物中、少なくとも約０．０１、０．０２、０．０３、０．０４、０．０５、０．０６、０．０７、０．０８、０．０９、０．１、０．２、０．３、０．４、０．５、０．６、０．７、０．８、０．９、１、１．５、２、２．５、３、３．５、４、４．５、５、５．５、６、６．５、７、７．５、８、８．５、９、９．５、１０、１０．５、１１、１１．５、１２、１２．５、１３、１３．５、１４、１４．５、１５、１５．５、１６、１６．５、１７、１７．５、１８、１８．５、１９、１９．５または２０モル％である。

【０６８５】

一実施形態において、式（Ｉ）の化合物（例えば、化合物１８、２５、２６または４８）と第四級アミン化合物（例えば、ＤＯＴＡ）のモル比は、約１００：１～約２．５：１である。一実施形態において、式（Ｉ）の化合物（例えば、化合物１８、２５、２６または４８）と第四級アミン化合物（例えば、ＤＯＴＡＰ）のモル比は、約９０：１、約８０：１、約７０：１、約６０：１、約５０：１、約４０：１、約３０：１、約２０：１、約１５：１、約１０：１、約９：１、約８：１、約７：１、約６：１、約５：１または約２．５：１である。一実施形態において、本明細書で開示される脂質組成物中、式（Ｉ）の化合物（例えば、化合物１８、２５、２６または４８）と第四級アミン化合物（例えば、ＤＯＴＡＰ）のモル比は、約１０：１である。

【０６８６】

いくつかの態様において、本明細書で開示される医薬組成物の脂質組成物は、第四級アミン化合物を含まない。いくつかの態様において、開示される医薬組成物の脂質組成物は、ＤＯＴＡＰを含まない。

【０６８７】

（ｉｉｉ）構造脂質

本明細書で開示される医薬組成物の脂質組成物は、１つ以上の構造脂質を含み得る。本明細書で使用されるとき、「構造脂質」という用語は、ステロールを指し、また、脂質含有ステロール部分も指す。いくつかの実施形態において、構造脂質は、コレステロール、フェコステロール、シトステロール、エルゴステロール、カンペステロール、スチグマステロール、ブラシカステロール、トマチジン、トマチン、ウルソル酸、α－トコフェロール及びこれらの混合物からなる群から選択される。いくつかの実施形態において、構造脂質は、コレステロールである。

【０６８８】

一実施形態において、本明細書で開示される医薬組成物の脂質組成物中の構造脂質（例えば、コレステロールなどのステロール）の量は、約２０モル％～約６０モル％、約２５モル％～約５５モル％、約３０モル％～約５０モル％、または約３５モル％～約４５モル％の範囲である。

【０６８９】

一実施形態において、本明細書で開示される脂質組成物中の構造脂質（例えば、コレステロールなどのステロール）の量は、約２５モル％～約３０モル％、約３０モル％～約３５モル％または約３５モル％～約４０モル％の範囲である。

【０６９０】

一実施形態において、本明細書で開示される脂質組成物中の構造脂質（例えば、コレステロールなどのステロール）の量は、約２３．５モル％、約２８．５モル％、約３３．５モル％または約３８．５モル％である。

【０６９１】

いくつかの実施形態において、本明細書で開示される脂質組成物中の構造脂質（例えば、コレステロールなどのステロール）の量は、少なくとも約２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９または６０モル％である。

【０６９２】

いくつかの態様において、開示される腫瘍内送達用医薬組成物の脂質組成物成分は、コレステロールを含まない。

【０６９３】

（ｉｖ）ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）脂質

本明細書で開示される医薬組成物の脂質組成物は、１つ以上のポリエチレングリコール（ＰＥＧ）脂質を含み得る。

【０６９４】

本明細書で使用されるとき、「ＰＥＧ脂質」という用語は、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）で修飾された脂質を指す。ＰＥＧ脂質の非限定的な例には、ＰＥＧ修飾化ホスファチジルエタノールアミン及びホスファチジン酸、ＰＥＧセラミドコンジュゲート（例えば、ＰＥＧ－ＣｅｒＣ１４またはＰＥＧ－ＣｅｒＣ２０）、ＰＥＧ修飾化ジアルキルアミン及びＰＥＧ修飾化１，２－ジアシルオキシプロパン－３－アミンが挙げられる。そのような脂質は、ＰＥＧ化脂質とも称される。例えば、ＰＥＧ脂質は、ＰＥＧ－ｃ－ＤＯＭＧ、ＰＥＧ－ＤＭＧ、ＰＥＧ－ＤＬＰＥ、ＰＥＧ－ＤＭＰＥ、ＰＥＧ－ＤＰＰＣ、またはＰＥＧ－ＤＳＰＥ脂質であり得る。

【０６９５】

いくつかの実施形態において、ＰＥＧ脂質には、１，２－ジミリストイル－ｓｎ－グリセロールメトキシポリエチレングリコール（ＰＥＧ－ＤＭＧ）、１，２－ジステアロイル－

ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン－Ｎ－［アミノ（ポリエチレングリコール）］（ＰＥＧ－ＤＳＰＥ）、ＰＥＧ－ジステリルグリセロール（ＰＥＧ－ＤＳＧ）、ＰＥＧ－ジパルメトレイル、ＰＥＧ－ジオレイル、ＰＥＧ－ジステアリル、ＰＥＧ－ジアシルグリカミド（ＰＥＧ－ＤＡＧ）、ＰＥＧ－ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン（ＰＥＧ－ＤＰＰＥ）、またはＰＥＧ－１，２－ジミリスチルオキシルプロピル－３－アミン（ＰＥＧ－ｃ－ＤＭＡ）が含まれるが、これらに限定されない。

【０６９６】

一実施形態において、ＰＥＧ脂質は、ＰＥＧ修飾化ホスファチジルエタノールアミン、ＰＥＧ修飾化ホスファチジン酸、ＰＥＧ修飾化セラミド、ＰＥＧ修飾化ジアルキルアミン、ＰＥＧ修飾化ジアシルグリセロール、ＰＥＧ修飾化ジアルキルグリセロール及びこれらの混合物からなる群から選択される。

【０６９７】

いくつかの実施形態において、ＰＥＧ脂質の脂質部分は、約Ｃ１４～約Ｃ２２、好ましくは、約Ｃ１４～約Ｃ１６の長さを有するものを含む。いくつかの実施形態において、ＰＥＧ部分、例えば、ｍＰＥＧ－ＮＨ２は、約１０００、２０００、５０００、１０，０００、１５，０００または２０，０００ダルトンの大きさを有する。一実施形態において、ＰＥＧ脂質は、ＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧである。

【０６９８】

一実施形態において、本明細書に記載される脂質ナノ粒子は、非拡散性ＰＥＧであるＰＥＧ脂質を含み得る。非拡散性ＰＥＧの非限定的な例には、ＰＥＧ－ＤＳＧ及びＰＥＧ－ＤＳＰＥが挙げられる。

【０６９９】

ＰＥＧ脂質は、当該技術分野において知られており、米国特許第８１５８６０１号及び国際公開第ＷＯ２０１５／１３０５８４Ａ２号（その全体を参照により本明細書に援用する）に記載されているものなどである。

【０７００】

一実施形態において、本明細書で開示される医薬組成物の脂質組成物中のＰＥＧ脂質の量は、約０．１モル％～約５モル％、約０．５モル％～約５モル％、約１モル％～約５モル％、約１．５モル％～約５モル％、約２モル％～約５モル％モル％、約０．１モル％～約４モル％、約０．５モル％～約４モル％、約１モル％～約４モル％、約１．５モル％～約４モル％、約２モル％～約４モル％、約０．１モル％～約３モル％、約０．５モル％～約３モル％、約１モル％～約３モル％、約１．５モル％～約３モル％、約２モル％～約３モル％、約０．１モル％～約２モル％、約０．５モル％～約２モル％、約１モル％～約２モル％、約１．５モル％～約２モル％、約０．１モル％～約１．５モル％、約０．５モル％～約１．５モル％または約１モル％～約１．５モル％の範囲である。

【０７０１】

一実施形態において、本明細書で開示される脂質組成物中のＰＥＧ脂質の量は、約１．５モル％である。

【０７０２】

一実施形態において、本明細書で開示される脂質組成物中のＰＥＧ脂質の量は、少なくとも約０．１、０．２、０．３、０．４、０．５、０．６、０．７、０．８、０．９、１、１．１、１．２、１．３、１．４、１．５、１．６、１．７、１．８、１．９、２、２．１、２．２、２．３、２．４、２．５、２．６、２．７、２．８、２．９、３、３．１、３．２、３．３、３．４、３．５、３．６、３．７、３．８、３．９、４、４．１、４．２、４．３、４．４、４．５、４．６、４．７、４．８、４．９または５モル％である。

【０７０３】

いくつかの態様において、本明細書で開示される医薬組成物の脂質組成物は、ＰＥＧ脂質を含まない。

【０７０４】

いくつかの実施形態において、本明細書で開示される脂質組成物は、式（Ｉ）の化合物及

び非対称リン脂質を含む。いくつかの実施形態において、脂質組成物は、化合物１８及びＭＳＰＣを含む。

【０７０５】

いくつかの実施形態において、本明細書で開示される脂質組成物は、式（Ｉ）の化合物及び第四級アミン化合物を含む。いくつかの実施形態において、脂質組成物は、化合物１８及びＤＯＴＡＰを含む。

【０７０６】

いくつかの実施形態において、本明細書で開示される脂質組成物は、式（Ｉ）の化合物、非対称リン脂質及び第四級アミン化合物を含む。いくつかの実施形態において、脂質組成物は、化合物１８、ＭＳＰＣ及びＤＯＴＡＰを含む。

【０７０７】

一実施形態において、脂質組成物は、約５０モル％の式（Ｉ）の化合物（例えば、化合物１８、２５、２６または４８）、約１０モル％のＤＳＰＣまたはＭＳＰＣ、約３３．５モル％のコレステロール、約１．５モル％のＰＥＧ－ＤＭＧ及び約５モル％のＤＯＴＡＰを含む。一実施形態において、脂質組成物は、約５０モル％の式（Ｉ）の化合物（例えば、化合物１８、２５、２６または４８）、約１０モル％のＤＳＰＣまたはＭＳＰＣ、約２８．５モル％のコレステロール、約１．５モル％のＰＥＧ－ＤＭＧ及び約１０モル％のＤＯＴＡＰを含む。

【０７０８】

脂質ナノ粒子の構成成分は、所望の結果に基づいて、ポリヌクレオチドの最適な送達のために調整することができる。非限定的な例として、脂質ナノ粒子は、式（Ｉ）の化合物４０～６０モル％、リン脂質８～１６モル％、コレステロール３０～４５モル％、ＰＥＧ脂質１～５モル％、及び任意選択により第四級アミン化合物１～１５モル％を含み得る。

【０７０９】

いくつかの実施形態において、脂質ナノ粒子は、４５～６５モル％の式（Ｉ）の化合物、リン脂質５～１０モル％、コレステロール２５～４０モル％、ＰＥＧ脂質０．５～５モル％、及び任意選択により第四級アミン化合物１～１５モル％を含み得る。

【０７１０】

核酸脂質粒子の非限定的な例には、米国特許出願公開第２０１４０１２１２６３号に開示されており、その全体を参照により本明細書に援用する。

【０７１１】

（ｖ）他のイオン性アミノ脂質

本明細書で開示される医薬組成物の脂質組成物は、式（Ｉ）による脂質に加えて、１つ以上のイオン性アミノ脂質を含み得る。

【０７１２】

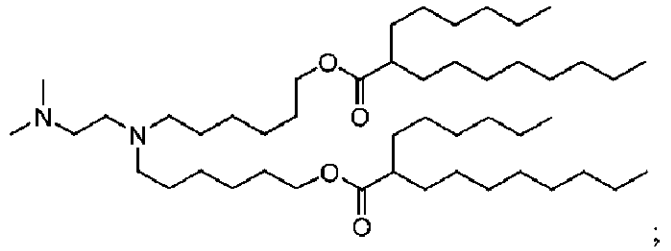
イオン性脂質は、３－（ジドデシルアミノ）－Ｎ１，Ｎ１，４－トリドデシル－１－ピペラジンエタンアミン（ＫＬ１０）、Ｎ１－［２－（ジドデシルアミノ）エチル］－Ｎ１，Ｎ４，Ｎ４－トリドデシル－１，４－ピペラジンジエタンアミン（ＫＬ２２）、１４，２５－ジトリデシル－１５，１８，２１，２４－テトラアザ－オクタトリアコンタン（ＫＬ２５）、１，２－ジリノレイルオキシ－Ｎ，Ｎ－ジメチルアミノプロパン（ＤＬｉｎ－ＤＭＡ）、２，２－ジリノレイル－４－ジメチルアミノメチル－［１，３］－ジオキソラン（ＤＬｉｎ－Ｋ－ＤＭＡ）、ヘプタトリアコンタ－６，９，２８，３１－テトラエン－１９－イル４－（ジメチルアミノ）ブタノエート（ＤＬｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡ）、２，２－ジリノレイル－４－（２－ジメチルアミノエチル）－［１，３］－ジオキソラン（ＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡ）、１，２－ジオレイルオキシ－Ｎ，Ｎ－ジメチルアミノプロパン（ＤＯＤＭＡ）、（１３Ｚ，１６５Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－ノニドコサ－１３－１６－ジエン－１－アミン（Ｌ６０８）、２－（｛８－［（３β）－コレスタ－５－エン－３－イルオキシ］オクチル｝オキシ）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－［（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イルオキシ］プロパン－１－アミン（オクチル－ＣＬｉｎＤＭＡ）、（２Ｒ）－２－（｛８－［（３β）－コレスタ－５－エン－３－イルオキシ

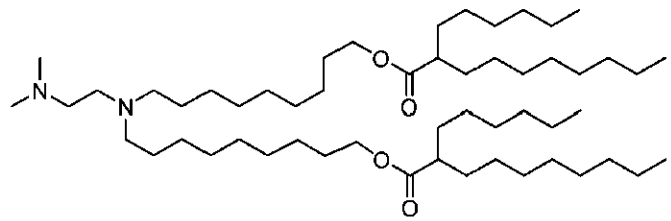
］オクチル｝オキシ）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－［（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イルオキシ］プロパン－１－アミン（オクチル－ＣＬｉｎＤＭＡ（２Ｒ））、及び（２Ｓ）－２－（｛８－［（３β）－コレスター５－エン－３－イルオキシ］オクチル｝オキシ）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－［（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イルオキシ］プロパン－１－アミン（オクチル－ＣＬｉｎＤＭＡ（２Ｓ））からなる非限定的な群から選択することができる。これらに加えて、イオン性アミノ脂質はまた、環式アミン基を含む脂質であり得る。

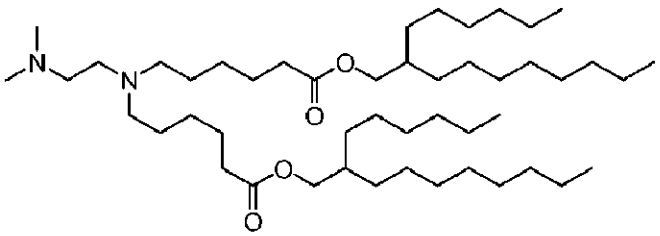
【０７１３】

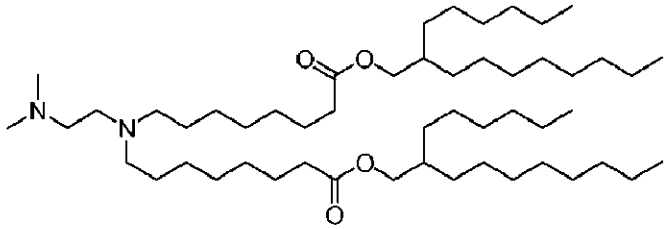
イオン性脂質は、国際公開第ＷＯ２０１５／１９９９５２Ａ１号（その全体を参照により本明細書に援用する）に開示されている化合物であり得る。例えば、イオン性アミノ脂質には、限定するものではないが、

【化４３】

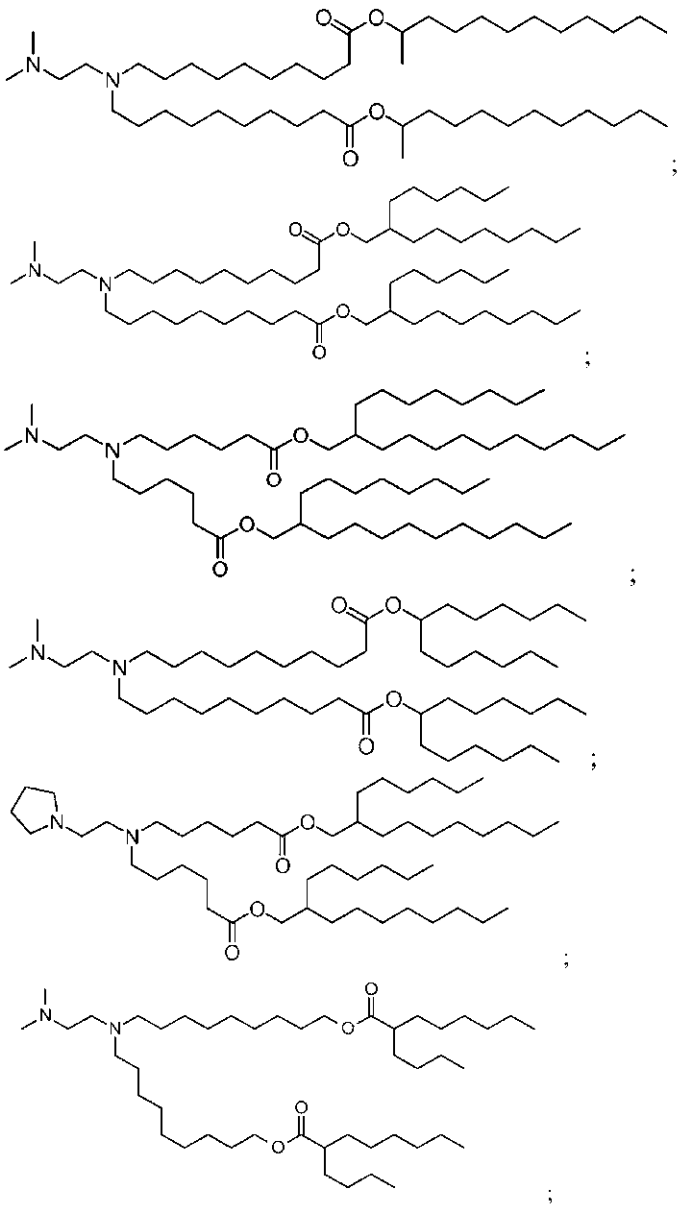

;




;


;

【化４４】



及びこれらの任意の組み合わせが挙げられる。

【０７１４】

（ｖｉ）他の脂質組成物成分

本明細書で開示される医薬組成物の脂質組成物は、上記のものに加えて、１つ以上の構成成分を含み得る。例えば、脂質組成物は、１つ以上の透過性向上分子、炭水化物、ポリマー、表面改質剤（例えば、界面活性剤）または他の構成成分を含み得る。例えば、透過性向上分子は、米国特許出願公開第２００５／０２２２０６４号に記載の分子であり得る。炭水化物は、単糖（例えば、グルコース）及び多糖（例えば、グリコーゲンならびにその誘導体及び類似体）を含み得る。脂質組成物は、限定するものではないが、ｐＨ７のクエン酸塩もしくはリン酸塩などの緩衝剤及び／または糖を含み得る。塩及び／または糖は、等張性のために、本明細書に記載される製剤中に含めることができる。

【０７１５】

ポリマーを本明細書で開示される医薬組成物中に含めることができ、かつ／または本明細書で開示される医薬組成物を封入または部分的に封入するために使用することができる（例えば、脂質ナノ粒子形態の医薬組成物）。ポリマーは、生分解性及び／または生体適合性であり得る。ポリマーは、ポリアミン、ポリエーテル、ポリアミド、ポリエステル、ポリカルバメート、ポリ尿素、ポリカーボネート、ポリスチレン、ポリイミド、ポリスルホ

ン、ポリウレタン、ポリアセチレン、ポリエチレン、ポリエチレンイミン、ポリイソシアネート、ポリアクリレート、ポリメタクリレート、ポリアクリロニトリル及びポリアリレートから選択することができるが、これらに限定されない。

【０７１６】

脂質組成物とポリヌクレオチドとの間の比の範囲は、約１０：１～約６０：１（ｗｔ／ｗｔ）であり得る。

【０７１７】

いくつかの実施形態において、脂質組成物とポリヌクレオチドとの間の比は、約１０：１、１１：１、１２：１、１３：１、１４：１、１５：１、１６：１、１７：１、１８：１、１９：１、２０：１、２１：１、２２：１、２３：１、２４：１、２５：１、２６：１、２７：１、２８：１、２９：１、３０：１、３１：１、３２：１、３３：１、３４：１、３５：１、３６：１、３７：１、３８：１、３９：１、４０：１、４１：１、４２：１、４３：１、４４：１、４５：１、４６：１、４７：１、４８：１、４９：１、５０：１、５１：１、５２：１、５３：１、５４：１、５５：１、５６：１、５７：１、５８：１、５９：１または６０：１（ｗｔ／ｗｔ）であり得る。いくつかの実施形態において、脂質組成物と、治療薬をコードするポリヌクレオチドとのｗｔ／ｗｔ比は、約２０：１または約１５：１である。

【０７１８】

いくつかの実施形態において、本明細書で開示される医薬組成物は、２種以上のポリペプチドを含有し得る。例えば、本明細書で開示される医薬組成物は、２種以上のポリヌクレオチド（例えば、ＲＮＡ、例えば、ｍＲＮＡ）を含有し得る。

【０７１９】

一実施形態において、本明細書に記載される脂質ナノ粒子は、ポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡ）を、５：１、１０：１、１５：１、２０：１、２５：１、３０：１、３５：１、４０：１、４５：１、５０：１、５５：１、６０：１もしくは７０：１の脂質：ポリヌクレオチド重量比で、または限定するものではないが、５：１～約１０：１、約５：１～約１５：１、約５：１～約２０：１、約５：１～約２５：１、約５：１～約３０：１、約５：１～約３５：１、約５：１～約４０：１、約５：１～約４５：１、約５：１～約５０：１、約５：１～約５５：１、約５：１～約６０：１、約５：１～約７０：１、約１０：１～約１５：１、約１０：１～約２０：１、約１０：１～約２５：１、約１０：１～約３０：１、約１０：１～約３５：１、約１０：１～約４０：１、約１０：１～約４５：１、約１０：１～約５０：１、約１０：１～約５５：１、約１０：１～約６０：１、約１０：１～約７０：１、約１５：１～約２０：１、約１５：１～約２５：１，約１５：１～約３０：１、約１５：１～約３５：１、約１５：１～約４０：１、約１５：１～約４５：１、約１５：１～約５０：１、約１５：１～約５５：１、約１５：１～約６０：１もしくは約１５：１～約７０：１などの比の範囲もしくはこれらの比のいずれかで含み得る。

【０７２０】

一実施形態において、本明細書に記載される脂質ナノ粒子は、限定するものではないが、０．１ｍｇ／ｍｌ、０．２ｍｇ／ｍｌ、０．３ｍｇ／ｍｌ、０．４ｍｇ／ｍｌ、０．５ｍｇ／ｍｌ、０．６ｍｇ／ｍｌ、０．７ｍｇ／ｍｌ、０．８ｍｇ／ｍｌ、０．９ｍｇ／ｍｌ、１．０ｍｇ／ｍｌ、１．１ｍｇ／ｍｌ、１．２ｍｇ／ｍｌ、１．３ｍｇ／ｍｌ、１．４ｍｇ／ｍｌ、１．５ｍｇ／ｍｌ、１．６ｍｇ／ｍｌ、１．７ｍｇ／ｍｌ、１．８ｍｇ／ｍｌ、１．９ｍｇ／ｍｌ、２．０ｍｇ／ｍｌまたは２．０ｍｇ／ｍｌ超などのおよそ０．１ｍｇ／ｍｌ～２ｍｇ／ｍｌの濃度で、ポリヌクレオチドを含み得る。

【０７２１】

一実施形態において、本明細書に記載されるポリヌクレオチド及び脂質ナノ粒子を含む製剤は、０．１５ｍｇ／ｍｌ～２ｍｇ／ｍｌの本明細書に記載されるポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡ）を含み得る。いくつかの実施形態において、製剤は、１０ｍＭのクエン酸緩衝液を更に含み得、製剤は、最大１０％ｗ／ｗのスクロース（例えば、少なくとも１％ｗ／ｗ、少なくとも２％ｗ／ｗ／、少なくとも３％ｗ／ｗ、少なくとも４％ｗ／ｗ、少

なくとも５％ｗ／ｗ、少なくとも６％ｗ／ｗ、少なくとも７％ｗ／ｗ、少なくとも８％ｗ／ｗ、少なくとも９％ｗ／ｗまたは１０％ｗ／ｗ）を追加で含み得る。

【０７２２】

（ｖｉｉ）ナノ粒子組成物

いくつかの実施形態において、本明細書で開示される医薬組成物は、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）として製剤化される。したがって、本開示はまた、（ｉ）本明細書に記載される式（Ｉ）の化合物を含む脂質組成物と、（ｉｉ）ＭＣＭポリペプチドをコードするポリヌクレオチドとを含む、ナノ粒子組成物を提供する。かかるナノ粒子組成物において、本明細書で開示される脂質組成物は、ＭＣＭポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを封入することができる。

【０７２３】

ナノ粒子組成物は、典型的に、ほぼマイクロメートル以下の大きさであり、脂質二重層を含み得る。ナノ粒子組成物は、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）、リポソーム（例えば、脂質小胞）及びリポプレックスを包含する。例えば、ナノ粒子組成物は、直径が５００ｎｍ以下の脂質二重層を有するリポソームであり得る。

【０７２４】

ナノ粒子組成物には、例えば、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）、リポソーム及びリポプレックスが含まれる。いくつかの実施形態において、ナノ粒子組成物は、１つ以上の脂質二重層を含む小胞である。ある特定の実施形態において、ナノ粒子組成物は、水性区画によって分離された２つ以上の同心円状二重層を含む。脂質二重層は、官能化され、かつ／または互いに架橋してもよい。脂質二重層は、１つ以上のリガンド、タンパク質またはチャネルを含み得る。

【０７２５】

本開示のナノ粒子組成物は、式（Ｉ）による少なくとも１つの化合物を含む。例えば、ナノ粒子組成物は、化合物１～１４７のうちの１つ以上を含み得る。ナノ粒子組成物はまた、様々な他の構成成分を含み得る。例えば、ナノ粒子組成物は、式（Ｉ）または（ＩＩ）による脂質に加えて、１つ以上の他の脂質、例えば、（ｉ）少なくとも１つのリン脂質、（ｉｉ）少なくとも１つの第四級アミン化合物、（ｉｉｉ）少なくとも１つの構造脂質、（ｉｖ）少なくとも１つのＰＥＧ脂質、または（ｖ）これらの任意の組み合わせを含み得る。

【０７２６】

いくつかの実施形態において、ナノ粒子組成物は、式（Ｉ）の化合物（例えば、化合物１８、２５、２６または４８）を含む。いくつかの実施形態において、ナノ粒子組成物は、式（Ｉ）の化合物（例えば、化合物１８、２５、２６または４８）と、リン脂質（例えば、ＤＳＰＣまたはＭＳＰＣ）とを含む。いくつかの実施形態において、ナノ粒子組成物は、式（Ｉ）の化合物（例えば、化合物１８、２５、２６または４８）と、リン脂質（例えば、ＤＳＰＣまたはＭＳＰＣ）と、第四級アミン化合物（例えば、ＤＯＴＡＰ）とを含む。いくつかの実施形態において、ナノ粒子組成物は、式（Ｉ）の化合物（例えば、化合物１８、２５、２６または４８）と、第四級アミン化合物（例えば、ＤＯＴＡＰ）とを含む。

【０７２７】

いくつかの実施形態において、ナノ粒子組成物は、式（Ｉ）の化合物（例えば、化合物１８、２５、２６または４８）からなるか、本質的になる脂質組成物を含む。いくつかの実施形態において、ナノ粒子組成物は、式（Ｉ）の化合物（例えば、化合物１８、２５、２６または４８）からなるか、本質的になる脂質組成物と、リン脂質（例えば、ＤＳＰＣまたはＭＳＰＣ）とを含む。いくつかの実施形態において、ナノ粒子組成物は、式（Ｉ）の化合物（例えば、化合物１８、２５、２６または４８）からなるか、本質的になる脂質組成物と、リン脂質（例えば、ＤＳＰＣまたはＭＳＰＣ）と、第四級アミン化合物（例えば、ＤＯＴＡＰ）とを含む。いくつかの実施形態において、ナノ粒子組成物は、式（Ｉ）の化合物（例えば、化合物１８、２５、２６または４８）からなるか、本質的になる脂質組成物と、第四級アミン化合物（例えば、ＤＯＴＡＰ）とを含む。

【０７２８】
ナノ粒子組成物は、様々な方法によって特徴付けることができる。例えば、ナノ粒子組成物の形態及びサイズ分布を調べるために、顕微鏡検査法（例えば、透過型電子顕微鏡検査法または走査型電子顕微鏡検査法）を使用することができる。ゼータ電位を測定するには、動的光散乱法または電位差測定法（例えば、電位差滴定法）を使用することができる。動的光散乱法は、粒径を決定するために使用することもできる。Ｚｅｔａｓｉｚｅｒ Ｎａｎｏ ＺＳ（Ｍａｌｖｅｒｎ Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ Ｌｔｄ（Ｍａｌｖｅｒｎ，Ｗｏｒｃｅｓｔｅｒｓｈｉｒｅ，ＵＫ））などの機器を使用して、粒径、多分散指数及びゼータ電位などのナノ粒子組成物の複数の特徴を測定することもできる。
【０７２９】
ナノ粒子のサイズは、生物学的応答、限定するものではないが、炎症などに対抗するのに役立ち得、またはポリヌクレオチドの生物学的作用を増大させることができる。
【０７３０】
本明細書で使用されるとき、ナノ粒子組成物に関する「サイズ」または「平均サイズ」は、ナノ粒子組成物の平均直径を指す。
【０７３１】
一実施形態において、ＭＣＭポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、限定するものではないが、約１０～約２０ｎｍ、約１０～約３０ｎｍ、約１０～約４０ｎｍ、約１０～約５０ｎｍ、約１０～約６０ｎｍ、約１０～約７０ｎｍ、約１０～約８０ｎｍ、約１０～約９０ｎｍ、約２０～約３０ｎｍ、約２０～約４０ｎｍ、約２０～約５０ｎｍ、約２０～約６０ｎｍ、約２０～約７０ｎｍ、約２０～約８０ｎｍ、約２０～約９０ｎｍ、約２０～約１００ｎｍ、約３０～約４０ｎｍ、約３０～約５０ｎｍ、約３０～約６０ｎｍ、約３０～約７０ｎｍ、約３０～約８０ｎｍ、約３０～約９０ｎｍ、約３０～約１００ｎｍ、約４０～約５０ｎｍ、約４０～約６０ｎｍ、約４０～約７０ｎｍ、約４０～約８０ｎｍ、約４０～約９０ｎｍ、約４０～約１００ｎｍ、約５０～約６０ｎｍ、約５０～約７０ｎｍ、約５０～約８０ｎｍ、約５０～約９０ｎｍ、約５０～約１００ｎｍ、約６０～約７０ｎｍ、約６０～約８０ｎｍ、約６０～約９０ｎｍ、約６０～約１００ｎｍ、約７０～約８０ｎｍ、約７０～約９０ｎｍ、約７０～約１００ｎｍ、約８０～約９０ｎｍ、約８０～約１００ｎｍ及び／または約９０～約１００ｎｍなどの約１０～約１００ｎｍの直径を有する脂質ナノ粒子中に製剤化される。
【０７３２】
一実施形態において、ナノ粒子は、約１０～５００ｎｍの直径を有する。一実施形態において、ナノ粒子は、１００ｎｍ超、１５０ｎｍ超、２００ｎｍ超、２５０ｎｍ超、３００ｎｍ超、３５０ｎｍ超、４００ｎｍ超、４５０ｎｍ超、５００ｎｍ超、５５０ｎｍ超、６００ｎｍ超、６５０ｎｍ超、７００ｎｍ超、７５０ｎｍ超、８００ｎｍ超、８５０ｎｍ超、９００ｎｍ超、９５０ｎｍまたは１０００ｎｍ超の直径を有する。
【０７３３】
いくつかの実施形態において、ナノ粒子組成物の最大寸法は、１μｍ以下（例えば、１μｍ、９００ｎｍ、８００ｎｍ、７００ｎｍ、６００ｎｍ、５００ｎｍ、４００ｎｍ、３００ｎｍ、２００ｎｍ、１７５ｎｍ、１５０ｎｍ、１２５ｎｍ、１００ｎｍ、７５ｎｍ、５０ｎｍ以下）である。
【０７３４】
ナノ粒子組成物は、比較的、均質であり得る。ナノ粒子組成物の均質性、例えば、ナノ粒子組成物の粒径分布を示すために、多分散指数を使用することができる。小さい多分散指数（例えば、０．３未満）は、一般に、狭い粒径分布を示す。ナノ粒子組成物は、０．０１、０．０２、０．０３、０．０４、０．０５、０．０６、０．０７、０．０８、０．０９、０．１０、０．１１、０．１２、０．１３、０．１４、０．１５、０．１６、０．１７、０．１８、０．１９、０．２０、０．２１、０．２２、０．２３、０．２４または０．２５などの約０～約０．２５の多分散指数を有し得る。いくつかの実施形態において、本明細書で開示されるナノ粒子組成物の多分散指数は、約０．１０～約０．２０であり得

る。
【０７３５】
ナノ粒子組成物のゼータ電位を、組成物の界面動電位を示すために使用することができる。例えば、ゼータ電位は、ナノ粒子組成物の表面電荷を記述することができる。高電荷種は、細胞、組織及び体内の他の要素と望ましくない相互作用を起こすことがあるので、比較的低い正電荷または負電荷を帯びたナノ粒子組成物が通常望ましい。いくつかの実施形態において、本明細書で開示されるナノ粒子組成物のゼータ電位は、約－１０ｍＶ～約＋２０ｍＶ、約－１０ｍＶ～約＋１５ｍＶ、約１０ｍＶ～約＋１０ｍＶ、約－１０ｍＶ～約＋５ｍＶ、約－１０ｍＶ～約０ｍＶ、約－１０ｍＶ～約－５ｍＶ、約－５ｍＶ～約＋２０ｍＶ、約－５ｍＶ～約＋１５ｍＶ、約－５ｍＶ～約＋１０ｍＶ、約－５ｍＶ～約＋５ｍＶ、約－５ｍＶ～約０ｍＶ、約０ｍＶ～約＋２０ｍＶ、約０ｍＶ～約＋１５ｍＶ、約０ｍＶ～約＋１０ｍＶ、約０ｍＶ～約＋５ｍＶ、約＋５ｍＶ～約＋２０ｍＶ、約＋５ｍＶ～約＋１５ｍＶ、または約＋５ｍＶ～約＋１０ｍＶであり得る。
【０７３６】
いくつかの実施形態において、脂質ナノ粒子のゼータ電位は、約０ｍＶ～約１００ｍＶ、約０ｍＶ～約９０ｍＶ、約０ｍＶ～約８０ｍＶ、約０ｍＶ～約７０ｍＶ、約０ｍＶ～約６０ｍＶ、約０ｍＶ～約５０ｍＶ、約０ｍＶ～約４０ｍＶ、約０ｍＶ～約３０ｍＶ、約０ｍＶ～約２０ｍＶ、約０ｍＶ～約１０ｍＶ、約１０ｍＶ～約１００ｍＶ、約１０ｍＶ～約９０ｍＶ、約１０ｍＶ～約８０ｍＶ、約１０ｍＶ～約７０ｍＶ、約１０ｍＶ～約６０ｍＶ、約１０ｍＶ～約５０ｍＶ、約１０ｍＶ～約４０ｍＶ、約１０ｍＶ～約３０ｍＶ、約１０ｍＶ～約２０ｍＶ、約２０ｍＶ～約１００ｍＶ、約２０ｍＶ～約９０ｍＶ、約２０ｍＶ～約８０ｍＶ、約２０ｍＶ～約７０ｍＶ、約２０ｍＶ～約６０ｍＶ、約２０ｍＶ～約５０ｍＶ、約２０ｍＶ～約４０ｍＶ、約２０ｍＶ～約３０ｍＶ、約３０ｍＶ～約１００ｍＶ、約３０ｍＶ～約９０ｍＶ、約３０ｍＶ～約８０ｍＶ、約３０ｍＶ～約７０ｍＶ、約３０ｍＶ～約６０ｍＶ、約３０ｍＶ～約５０ｍＶ、約３０ｍＶ～約４０ｍＶ、約４０ｍＶ～約１００ｍＶ、約４０ｍＶ～約９０ｍＶ、約４０ｍＶ～約８０ｍＶ、約４０ｍＶ～約７０ｍＶ、約４０ｍＶ～約６０ｍＶ、及び約４０ｍＶ～約５０ｍＶであり得る。いくつかの実施形態において、脂質ナノ粒子のゼータ電位は、約１０ｍＶ～約５０ｍＶ、約１５ｍＶ～約４５ｍＶ、約２０ｍＶ～約４０ｍＶ、及び約２５ｍＶ～約３５ｍＶであり得る。いくつかの実施形態において、脂質ナノ粒子のゼータ電位は、約１０ｍＶ、約２０ｍＶ、約３０ｍＶ、約４０ｍＶ、約５０ｍＶ、約６０ｍＶ、約７０ｍＶ、約８０ｍＶ、約９０ｍＶ及び約１００ｍＶであり得る。
【０７３７】
ポリヌクレオチドに関する「封入効率」という用語は、調製後のナノ粒子組成物によって封入されるか、ナノ粒子組成物と別様に会合している、初期供給量に対するポリヌクレオチドの量を表す。本明細書で使用されるとき、「封入」は、完全、実質的または部分的な封じ込め、閉じ込め、取り囲みまたは包み込みを指し得る。
【０７３８】
封入効率は、望ましくは高い（例えば、１００％に近い）。封入効率は、例えば、ナノ粒子組成物を含有する溶液中のポリヌクレオチドの量を、１つ以上の有機溶媒または界面活性剤でナノ粒子組成物を分解する前と後で比較することによって測定することができる。
【０７３９】
蛍光を使用して溶液中の遊離ポリヌクレオチドの量を測定することができる。本明細書に記載されるナノ粒子組成物の場合、ポリヌクレオチドの封入効率は、少なくとも５０％、例えば、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％であり得る。いくつかの実施形態において、封入効率は、少なくとも８０％であり得る。特定の実施形態において、封入効率は、少なくとも９０％であり得る。
【０７４０】
本明細書で開示される医薬組成物中のポリヌクレオチドの量は、ポリヌクレオチドのサイ

ズ、所望の標的及び／もしくは用途、またはナノ粒子組成物の他の特性などの複数の因子、ならびにポリヌクレオチドの特性に依存し得る。

【０７４１】

例えば、ナノ粒子組成物に有用なｍＲＮＡの量は、ｍＲＮＡのサイズ（長さまたは分子量として表される）、配列及び他の特徴に依存し得る。ナノ粒子組成物中のポリヌクレオチドの相対量も変動し得る。

【０７４２】

本開示の脂質ナノ粒子組成物中に存在する脂質組成物とポリヌクレオチドの相対量は、有効性及び忍容性の考慮により最適化することができる。ポリヌクレオチドとしてｍＲＮＡを含む組成物の場合、Ｎ：Ｐ比を有用な尺度として用いることができる。

【０７４３】

ナノ粒子組成物のＮ：Ｐ比が発現と忍容性の両方を制御するので、Ｎ：Ｐ比が低く、かつ発現が強いナノ粒子組成物が望ましい。Ｎ：Ｐ比は、ナノ粒子組成物中の脂質とＲＮＡの比によって変動する。

【０７４４】

一般に、より低いＮ：Ｐ比が好ましい。１つ以上のＲＮＡ、脂質及びこれらの量は、２：１、３：１、４：１、５：１、６：１、７：１、８：１、９：１、１０：１、１２：１、１４：１、１６：１、１８：１、２０：１、２２：１、２４：１、２６：１、２８：１または３０：１などの約２：１～約３０：１のＮ：Ｐ比を提供するように選択することができる。特定の実施形態において、Ｎ：Ｐ比は、約２：１～約８：１であり得る。他の実施形態において、Ｎ：Ｐ比は、約５：１～約８：１である。特定の実施形態において、Ｎ：Ｐ比は、５：１～６：１である。具体的な一態様において、Ｎ：Ｐ比は、約５．６７：１である。

【０７４５】

ナノ粒子組成物の提供に加えて、本開示はまた、ポリヌクレオチドを封入することを含む、脂質ナノ粒子を作製する方法を提供する。このような方法は、本明細書で開示される医薬組成物のいずれかを使用することと、当該技術分野において知られている脂質ナノ粒子の作製方法に従って脂質ナノ粒子を作製することとを含む。例えば、Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．（２０１５）“Ｄｅｌｉｖｅｒｙ ｏｆ ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ ｗｉｔｈ ｌｉｐｉｄ ｎａｎｏｐａｒｔｉｃｌｅｓ” Ａｄｖ．Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖ．Ｒｅｖ．８７：６８－８０；Ｓｉｌｖａ ｅｔ ａｌ．（２０１５）“Ｄｅｌｉｖｅｒｙ Ｓｙｓｔｅｍｓ ｆｏｒ Ｂｉｏｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ．Ｐａｒｔ Ｉ：Ｎａｎｏｐａｒｔｉｃｌｅｓ ａｎｄ Ｍｉｃｒｏｐａｒｔｉｃｌｅｓ” Ｃｕｒｒ．Ｐｈａｒｍ．Ｔｅｃｈｎｏｌ．１６：９４０－９５４；Ｎａｓｅｒｉ ｅｔ ａｌ．（２０１５）“Ｓｏｌｉｄ Ｌｉｐｉｄ Ｎａｎｏｐａｒｔｉｃｌｅｓ ａｎｄ Ｎａｎｏｓｔｒｕｃｔｕｒｅｄ Ｌｉｐｉｄ Ｃａｒｒｉｅｒｓ：Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ，Ｐｒｅｐａｒａｔｉｏｎ ａｎｄ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎ” Ａｄｖ．Ｐｈａｒｍ．Ｂｕｌｌ．５：３０５－１３；Ｓｉｌｖａ ｅｔ ａｌ．（２０１５）“Ｌｉｐｉｄ ｎａｎｏｐａｒｔｉｃｌｅｓ ｆｏｒ ｔｈｅ ｄｅｌｉｖｅｒｙ ｏｆ ｂｉｏｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ” Ｃｕｒｒ．Ｐｈａｒｍ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１６：２９１－３０２及び当該文献中で引用されている参考文献を参照されたい。

【０７４６】

賦形剤

本開示はまた、本明細書に記載されるポリヌクレオチド、すなわち、ＭＣＭポリペプチドをコードするＯＲＦを含むポリヌクレオチドの製剤を賦形剤とともに含む、医薬組成物を含む。本開示のポリヌクレオチドは、（１）安定性を高め、（２）細胞トランスフェクションを増加させ、（３）（例えば、ポリヌクレオチドのデポ製剤からの）持続放出もしくは遅延放出を可能にし、（４）体内分布を変え（例えば、特定の組織または細胞種へのポリヌクレオチドの標的化）、（５）コードタンパク質のｉｎ ｖｉｖｏでの翻訳を増加させ、かつ／または（６）コードタンパク質のｉｎ ｖｉｖｏでの放出プロファイルを変え

る、１つ以上の賦形剤を使用して製剤化することができる。本開示の賦形剤には、従来の賦形剤、例えば、溶媒、分散媒、希釈剤または他の液体ビヒクル、分散助剤または懸濁助剤、界面活性剤、等張化剤、増粘剤または乳化剤、保存剤のいずれか及び全てに加えて、限定するものではないが、リピドイド、リポソーム、脂質ナノ粒子、ポリマー、リポプレックス、コアシェル型ナノ粒子、ペプチド、タンパク質、ポリヌクレオチドがトランスフェクトされた細胞（例えば、対象への移植用）、ヒアルロニダーゼ、ナノ粒子模倣体及びこれらの組み合わせが含まれ得る。したがって、本開示の製剤は、１つ以上の賦形剤を含み得、各賦形剤は、互いに、ポリヌクレオチドの安定性を高め、ポリヌクレオチドの細胞トランスフェクションを増加させ、ポリヌクレオチドにコードされたタンパク質の発現を増加させ、かつ／またはポリヌクレオチドにコードされたタンパク質の放出プロファイルを変える量である。更に、本開示のポリヌクレオチドは、自己組織化核酸ナノ粒子を使用して製剤化することができる。

【０７４７】

薬学的に許容される賦形剤には、本明細書で使用されるとき、特定の望ましい剤形に適合するように、任意及び全ての溶媒、分散媒、希釈剤または他の液体ビヒクル、分散助剤または懸濁助剤、界面活性剤、等張化剤、増粘剤または乳化剤、保存剤、固体結合剤、滑沢剤、矯味剤、安定剤、抗酸化剤、浸透圧調整剤、ｐＨ調節剤などが含まれるが、これらに限定されない。医薬組成物を製剤化するための様々な賦形剤、及び組成物を調製するための技術は、当該技術分野において知られている（Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ：Ｔｈｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅ　ａｎｄ　Ｐｒａｃｔｉｃｅ　ｏｆ　Ｐｈａｒｍａｃｙ，２１ｓｔ　Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ａ．Ｒ．Ｇｅｎｎａｒｏ（Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ，Ｗｉｌｌｉａｍｓ＆Ｗｉｌｋｉｎｓ，Ｂａｌｔｉｍｏｒｅ，ＭＤ，２００６参照、その全体を参照により本明細書に援用する）。従来の賦形剤媒体の使用は、本発明の範囲内であることが企図され得、任意の従来の賦形剤媒体が、任意の望ましくない生物学的作用をもたらすか、別様に医薬組成物の任意の他の構成成分（複数可）と有害に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適合しない場合を除き、その使用は、本開示の範囲内であることが企図される。

【０７４８】

いくつかの実施形態において、薬学的に許容される賦形剤は、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％純粋であり得る。いくつかの実施形態において、賦形剤は、ヒト用途または獣医学的用途のための使用が承認されている。いくつかの実施形態において、賦形剤は、米国食品医薬品局によって承認され得る。いくつかの実施形態において、賦形剤は、医薬品等級のものであり得る。いくつかの実施形態において、賦形剤は、米国薬局方（ＵＳＰ）、欧州薬局方（ＥＰ）、英国薬局方及び／または国際薬局方の標準を満たし得る。

【０７４９】

医薬組成物の製造に使用される薬学的に許容される賦形剤には、不活性希釈剤、分散剤及び／または造粒剤、界面活性剤及び／または乳化剤、崩壊剤、結合剤、保存剤、緩衝剤、滑沢剤、及び／または油が含まれるが、これらに限定されない。そのような賦形剤は、任意選択により、医薬組成物中に含まれ得る。組成物は、カカオ脂及び坐剤用ワックス、着色剤、コーティング剤、甘味剤、矯味剤、ならびに／または着香剤などの賦形剤を含み得る。

【０７５０】

例示的な希釈剤には、炭酸カルシウム、炭酸ナトリウム、リン酸カルシウム、リン酸二カルシウム、硫酸カルシウム、リン酸水素カルシウム、リン酸ナトリウム　ラクトース、スクロース、セルロース、微結晶セルロース、カオリン、マンニトール、ソルビトール、イノシトール、塩化ナトリウム、乾燥デンプン、トウモロコシデンプン、粉糖など、及び／またはこれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。

【０７５１】

例示的な造粒剤及び／または分散剤には、ジャガイモデンプン、トウモロコシデンプン、タピオカデンプン、デンプングリコール酸ナトリウム、クレイ、アルギン酸、グアーガム

、柑橘類パルプ、寒天、ベントナイト、セルロース及び木材製品、天然スポンジ、カチオン交換樹脂、炭酸カルシウム、ケイ酸塩、炭酸ナトリウム、架橋ポリ（ビニル－ピロリドン）（クロスポビドン）、カルボキシメチルデンプンナトリウム（デンプングリコール酸ナトリウム）、カルボキシメチルセルロース、架橋カルボキシメチルセルロースナトリウム（クロスカルメロース）、メチルセルロース、α化デンプン（デンプン１５００）、微結晶デンプン、水不溶性デンプン、カルボキシメチルセルロースカルシウム、ケイ酸アルミニウムマグネシウム（ＶＥＥＧＵＭ（登録商標））、ラウリル硫酸ナトリウム、第四級アンモニウム化合物など、ならびに／またはこれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。

【０７５２】

例示的な界面活性剤及び／または乳化剤には、天然乳化剤（例えば、アラビアゴム、寒天、アルギン酸、アルギン酸ナトリウム、トラガカント、コンドラックス、コレステロール、キサンタン、ペクチン、ゼラチン、卵黄、カゼイン、羊毛脂、コレステロール、ワックス及びレシチン）、コロイド状クレイ（例えば、ベントナイト［ケイ酸アルミニウム］及びＶＥＥＧＵＭ（登録商標）［ケイ酸アルミニウムマグネシウム］）、長鎖アミノ酸誘導体、高分子量アルコール（例えば、ステアリルアルコール、セチルアルコール、オレイルアルコール、モノステアリン酸トリアセチン、ジステアリン酸エチレングリコール、モノステアリン酸グリセリル、及びモノステアリン酸プロピレングリコール、ポリビニルアルコール）、カルボマー（例えば、カルボキシポリメチレン、ポリアクリル酸、アクリル酸ポリマー及びカルボキシビニルポリマー）、カラギーナン、セルロース誘導体（例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、粉末状セルロース、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、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、メチルセルロース）、ソルビタン脂肪酸エステル（例えば、モノラウリン酸ポリオキシエチレンソルビタン［ＴＷＥＥＮ（登録商標）２０］、ポリオキシエチレンソルビタン［ＴＷＥＥＮ（登録商標）６０］、モノオレイン酸ポリオキシエチレンソルビタン［ＴＷＥＥＮ（登録商標）８０］、モノパルミチン酸ソルビタン［ＳＰＡＮ（登録商標）４０］、モノステアリン酸ソルビタン［ＳＰＡＮ（登録商標）６０］、トリステアリン酸ソルビタン［ＳＰＡＮ（登録商標）６５］、モノオレイン酸グリセリル、モノオレイン酸ソルビタン［ＳＰＡＮ（登録商標）８０］）、ポリオキシエチレンエステル（例えば、モノステアリン酸ポリオキシエチレン［ＭＹＲＪ（登録商標）４５］、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油、ポリエトキシレート化ヒマシ油、ステアリン酸ポリオキシメチレン、及びＳＯＬＵＴＯＬ（登録商標））、スクロース脂肪酸エステル、ポリエチレングリコール脂肪酸エステル（例えば、ＣＲＥＭＯＰＨＯＲ（登録商標））、ポリオキシエチレンエーテル、（例えば、ポリオキシエチレンラウリルエーテル［ＢＲＩＪ（登録商標）３０］）、ポリ（ビニル－ピロリドン）、モノラウリン酸ジエチレングリコール、オレイン酸トリエタノールアミン、オレイン酸ナトリウム、オレイン酸カリウム、オレイン酸エチル、オレイン酸、ラウリン酸エチル、ラウリル硫酸ナトリウム、ＰＬＵＯＲＩＮＣ（登録商標）Ｆ６８、ＰＯＬＯＸＡＭＥＲ（登録商標）１８８、臭化セトリモニウム、塩化セチルピリジニウム、塩化ベンザルコニウム、ドクサートナトリウムなど及び／またはこれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。

【０７５３】

例示的な結合剤には、デンプン（例えば、トウモロコシデンプン及びデンプンペースト）；ゼラチン；糖（例えば、スクロース、グルコース、デキストロース、デキストリン、糖蜜、ラクトース、ラクチトール、マンニトール）；アミノ酸（例えば、グリシン）；天然ゴム及び合成ゴム（例えば、アラビアゴム、アルギン酸ナトリウム、アイルランドゴケ抽出物、パンワー（ｐａｎｗａｒ）ゴム、ガティガム、イサポールハスク粘液、カルボキシメチルセルロース、メチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、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、微結晶セルロース、酢酸セルロース、ポリ（ビニル－ピロリドン）、ケイ酸アルミニウムマグネシウム（ＶＥＥＧＵＭ（登録商標））、及びカラマツアラボガラクタン）；アルギン酸塩；ポリ

エチレンオキシド；ポリエチレングリコール；無機カルシウム塩；ケイ酸；ポリメタクリレート；ワックス；水；アルコールなど、ならびにこれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。

【０７５４】

例示的な保存剤には、抗酸化剤、キレート剤、抗菌性保存剤、抗真菌性保存剤、アルコール性保存剤、酸性保存剤、及び／または他の保存剤を挙げることができるが、これらに限定されない。酸化は、ｍＲＮＡ、特に、液体ｍＲＮＡ製剤にとって、潜在的分解経路となる。酸化を防ぐために、抗酸化剤を製剤に添加することができる。例示的な抗酸化剤には、αトコフェロール、アスコルビン酸、パルミチン酸アコルビル、ベンジルアルコール、ブチル化ヒドロキシアニソール、ＥＤＴＡ、ｍ－クレゾール、メチオニン、ブチル化ヒドロキシトルエン、モノチオグリセロール、二亜硫酸カリウム、プロピオン酸、没食子酸プロピル、アスコルビン酸ナトリウム、亜硫酸水素ナトリウム、メタ重亜硫酸ナトリウム、チオグリセロール及び／または亜硫酸ナトリウムが挙げられるが、これらに限定されない。例示的なキレート剤には、エチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）、クエン酸一水和物、エデト酸二ナトリウム、エデト酸二カリウム、エデト酸、フマル酸、リンゴ酸、リン酸、エデト酸ナトリウム、酒石酸及び／またはエデト酸三ナトリウムが挙げられる。例示的な抗菌性保存剤には、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、ベンジルアルコール、ブロノポール、セトリミド、塩化セチルピリジニウム、クロルヘキシジン、クロロブタノール、クロロクレゾール、クロロキシレノール、クレゾール、エチルアルコール、グリセリン、ヘキセチジン、イミド尿素、フェノール、フェノキシエタノール、フェニルエチルアルコール、硝酸フェニル水銀、プロピレングリコール及び／またはチメロサールが挙げられるが、これらに限定されない。例示的な抗真菌性保存剤には、ブチルパラベン、メチルパラベン、エチルパラベン、プロピルパラベン、安息香酸、ヒドロキシ安息香酸、安息香酸カリウム、ソルビン酸カリウム、安息香酸ナトリウム、プロピオン酸ナトリウム及び／またはソルビン酸が挙げられるが、これらに限定されない。例示的なアルコール性保存剤には、エタノール、ポリエチレングリコール、フェノール、フェノール系化合物、ビスフェノール、クロロブタノール、ヒドロキシベンゾエート及び／またはフェニルエチルアルコールが挙げられるが、これらに限定されない。例示的な酸性保存剤には、ビタミンＡ、ビタミンＣ、ビタミンＥ、βカロテン、クエン酸、酢酸、デヒドロ酢酸、アスコルビン酸、ソルビン酸及び／またはフィチン酸が挙げられるが、これらに限定されない。他の保存剤には、トコフェロール、酢酸トコフェロール、メシル酸デテロキシム、セトリミド、ブチル化ヒドロキシアニソール（ＢＨＡ）、ブチル化ヒドロキシトルエン（ＢＨＴ）、エチレンジアミン、ラウリル硫酸ナトリウム（ＳＬＳ）、ラウリルエーテル硫酸ナトリウム（ＳＬＥＳ）、亜硫酸水素ナトリウム、二硫酸ナトリウム、亜硫酸カリウム、二亜硫酸カリウム、ＧＬＹＤＡＮＴ　ＰＬＵＳ（登録商標）、ＰＨＥＮＯＮＩＰ（登録商標）、メチルパラベン、ＧＥＲＭＡＬＬ（登録商標）１１５、ＧＥＲＭＡＢＥＮ（登録商標）ＩＩ、ＮＥＯＬＯＮＥ（商標）、ＫＡＴＨＯＮ（商標）及び／またはＥＵＸＹＬ（登録商標）が含まれるが、これらに限定されない。

【０７５５】

いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド溶液のｐＨは、安定性を改善するために、ｐＨ５～ｐＨ８に維持される。ｐＨを調節するための例示的な緩衝剤には、リン酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、コハク酸ナトリウム、ヒスチジン（またはヒスチジン－ＨＣｌ）、炭酸ナトリウム及び／またはリンゴ酸ナトリウムを挙げることができるが、これらに限定されない。別の実施形態において、上に列挙される例示的な緩衝剤は、追加の一価対イオン（限定するものではないが、カリウムを含む）とともに使用することができる。二価カチオンも緩衝液の対イオンとして使用され得るが、これらは、錯体形成及び／またはｍＲＮＡ分解を受けやすい。

【０７５６】

例示的な緩衝剤には、クエン酸緩衝液、酢酸緩衝液、リン酸緩衝液、塩化アンモニウム、炭酸カルシウム、塩化カルシウム、クエン酸カルシウム、グルビオン酸カルシウム、グル

セプト酸カルシウム、グルコン酸カルシウム、ｄ－グルコン酸、グリセロリン酸カルシウム、乳酸カルシウム、プロパン酸、レブリン酸カルシウム、ペンタン酸、二塩基性リン酸カルシウム、リン酸、三塩基性リン酸カルシウム、水酸化リン酸カルシウム、酢酸カリウム、塩化カリウム、グルコン酸カリウム、カリウム混合物、二塩基性リン酸カリウム、一塩基性リン酸カリウム、リン酸カリウム混合物、酢酸ナトリウム、炭酸水素ナトリウム、塩化ナトリウム、クエン酸ナトリウム、乳酸ナトリウム、二塩基性リン酸ナトリウム、一塩基性リン酸ナトリウム、リン酸ナトリウム混合物、トロメタミン、水酸化マグネシウム、水酸化アルミニウム、アルギン酸、パイロジェンフリー水、等張生理食塩水、リンゲル溶液、エチルアルコールなど、及び／またはこれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。

【０７５７】

例示的な滑沢剤には、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸、シリカ、タルク、モルト、ベハン酸グリセリル、水素化植物油、ポリエチレングリコール、安息香酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、ロイシン、ラウリル硫酸マグネシウム、ラウリル硫酸ナトリウムなど、及びこれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。

【０７５８】

例示的な油には、アーモンド油、キョウニン油、アボカド油、ババス油、ベルガモット油、クロフサスグリ種子油、ルリジサ油、カデ油、カモミール油、キャノーラ油、ヒメウイキョウ油、カルナウバ油、ヒマシ油、ケイヒ油、カカオ脂、ココナツ油、タラ肝油、コーヒー油、トウモロコシ油、綿実油、エミュー油、ユーカリ油、マツヨイグサ油、魚油、アマニ油、ゲラニオール、ヒョウタン種子油、ブドウ種子油、ヘーゼルナッツ油、ハッカ油、ミリスチン酸イソプロピル、ホホバ油、ククイナッツ油、ラバンディン油、ラベンダー油、レモン油、アオモジ油、マカデミアナッツ油、ゼニアオイ油、マンゴー種子油、メドウフォーム油、ミンク油、ナツメグ油、オリーブ油、オレンジ油、オレンジラフィー油、ヤシ油、パーム核油、トウニン油、ピーナッツ油、ケシ油、カボチャ種子油、ナタネ油、コメヌカ油、ローズマリー油、サフラワー油、ビャクダン油、サザンカ油、セイボリー油、シーバックソーン油、ゴマ油、シアバター油、シリコーン油、大豆油、ヒマワリ油、ティーツリー油、アザミ油、ツバキ油、ベチベル油、クルミ油及び小麦粉芽油が挙げられるが、これらに限定されない。例示的な油には、ステアリン酸ブチル、カプリル酸トリグリセリド、カプリン酸トリグリセリド、シクロメチコン、セバシン酸ジエチル、ジメチコン３６０、ミリスチン酸イソプロピル、ミネラルオイル、オクチルドデカノール、オレイルアルコール、シリコーン油及び／またはこれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。

【０７５９】

配合者の判断により、カカオ脂及び坐剤用ワックス、着色剤、コーティング剤、甘味剤、矯味剤、ならびに／または着香剤などの賦形剤が組成物中に存在し得る。

【０７６０】

例示的な添加剤には、生理学的生体適合性緩衝剤（例えば、トリメチルアミン塩酸塩）、キレート剤（例えば、ＤＴＰＡまたはＤＴＰＡ－ビスアミドなど）もしくはカルシウムキレート錯体（例えば、カルシウムＤＴＰＡ、ＣａＮａＤＴＰＡ－ビスアミド）の添加、または任意選択によるカルシウム塩もしくはナトリウム塩（例えば、塩化カルシウム、アスコルビン酸カルシウム、グルコン酸カルシウムまたは乳酸カルシウム）の添加が挙げられる。加えて、抗酸化剤及び懸濁化剤が使用され得る。

【０７６１】

リピドイド

本開示は、本明細書に記載されるポリヌクレオチド、すなわち、ＭＣＭポリペプチドをコードするＯＲＦを含むポリヌクレオチドのリピドイド製剤を含む、医薬組成物を含む。

【０７６２】

リピドイドの合成は、広範に記載されており、これらの化合物を含有する製剤は、ポリヌ

クレオチドの送達に特に適している（Ｍａｈｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇ．Ｃｈｅｍ．２０１０ ２１：１４４８－１４５４；Ｓｃｈｒｏｅｄｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｉｎｔｅｒｎ Ｍｅｄ．２０１０ ２６７：９－２１；Ａｋｉｎｃ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２００８ ２６：５６１－５６９；Ｌｏｖｅ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ．２０１０ １０７：１８６４－１８６９；Ｓｉｅｇｗａｒｔ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ．２０１１ １０８：１２９９６－３００１参照；これらの全ての全体を本明細書に援用する）。

【０７６３】

リピドイドは、齧歯類及び非ヒト霊長類において、二本鎖の低分子干渉ＲＮＡ分子を効率的に送達するために使用されている（Ａｋｉｎｃ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２００８ ２６：５６１－５６９；Ｆｒａｎｋ－Ｋａｍｅｎｅｔｓｋｙ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ．２００８ １０５：１１９１５－１１９２０；Ａｋｉｎｃ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ．２００９ １７：８７２－８７９；Ｌｏｖｅ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ．２０１０ １０７：１８６４－１８６９；Ｌｅｕｓｃｈｎｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２０１１ ２９：１００５－１０１０参照；これらの全ての全体を本明細書に援用する）。本開示は、これらの製剤及びポリヌクレオチド送達における使用を記載する。

【０７６４】

複合体、ミセル、リポソームまたは粒子を、これらのリピドイドを含有するように調製することができ、これにより、局所及び／または全身投与経路を介したリピドイド製剤の注射後におけるコードタンパク質の生産によって判断される、ポリヌクレオチドの効果的送達がもたらされ得る。ポリヌクレオチドのリピドイド複合体は、限定するものではないが、静脈内、筋肉内または皮下経路を含む、様々な手段によって投与することができる。

【０７６５】

核酸のｉｎ ｖｉｖｏ送達は、限定するものではないが、製剤組成、粒子ＰＥＧ化の性質、充填度、ポリヌクレオチドと脂質の比、及び生物物理学的パラメーター（限定するものではないが、粒径など）を含む、多くのパラメーターによる影響を受け得る（Ａｋｉｎｃ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ．２００９ １７：８７２－８７９、その全体を参照により本明細書に援用する）。一例として、ポリ（エチレングリコール）（ＰＥＧ）脂質のアンカー鎖長に小さな変化を加えると、ｉｎ ｖｉｖｏ効率に顕著な効果が生じ得る。異なるリピドイド、例えば、限定するものではないが、ペンタ［３－（１－ラウリルアミノプロピオニル）］－トリエチレンテトラミン塩酸塩（ＴＥＴＡ－５ＬＡＰ；別名９８Ｎ１２－５、Ｍｕｒｕｇａｉａｈ ｅｔ ａｌ．，Ａｎａｌｙｔｉｃａｌ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，４０１：６１（２０１０）参照、その全体を参照により本明細書に援用する）、Ｃ１２－２００（誘導体及びバリアントを含む）及びＭＤ１を用いた製剤がｉｎ ｖｉｖｏ活性について試験され得る。

【０７６６】

本明細書において「９８Ｎ１２－５」と称されるリピドイドは、Ａｋｉｎｃ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ．２００９ １７：８７２－８７９に開示されており、その全体を参照により用する。

【０７６７】

本明細書において 「Ｃ１２－２００」と称されるリピドイドは、Ｌｏｖｅ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ．２０１０ １０７：１８６４－１８６９及びＬｉｕ ａｎｄ Ｈｕａｎｇ，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｔｈｅｒａｐｙ．２０１０ ６６９－６７０に開示されており、いずれについてもその全体を参照により本明細書に援用する。リピドイド製剤は、ポリヌクレオチドに加えて、３または４以上のいずれかの構成成分を含む粒子を含み得る。

【０７６８】

リピドイド及びリピドイドを含むポリヌクレオチド製剤は、国際特許出願第ＰＣＴ／ＵＳ

２０１４／０９７０７７号に記載されており、その内容全体を参照により本明細書に援用する。

【０７６９】

リポソーム、リポプレックス及び脂質ナノ粒子

本開示はまた、１つ以上のリポソーム、リポプレックスまたは脂質ナノ粒子を使用した、本明細書に記載されるポリヌクレオチド、すなわち、ＭＣＭポリペプチドをコードするＯＲＦを含むポリヌクレオチドの製剤を含む、医薬組成物を含む。一実施形態において、ポリヌクレオチドの医薬組成物は、リポソームを含む。リポソームは、主に脂質二重層から構成され得、栄養素及び医薬製剤の投与のための送達媒体として使用することができる、人工的に調製された小胞である。リポソームは、限定するものではないが、直径が数１００ナノメートルであり得、かつ狭い水性区画によって分離された一連の同心円状二重層を含有し得る、多層ラメラ小胞（ＭＬＶ）、直径が５０ｎｍ未満であり得る、小型単層小胞（ＳＵＶ）、直径が５０～５００ｎｍであり得る、大型単層小胞（ＬＵＶ）などの異なる大きさのものであってよい。リポソームの設計には、不健康な組織へのリポソームの付着を改善するか、限定するものではないが、エンドサイトーシスなどの事象を活性化するために、オプソニンまたはリガンドが含まれ得るが、これらに限定されない。リポソームは、医薬製剤の送達を改善するために、低いｐＨまたは高いｐＨを有し得る。

【０７７０】

リポソームの形成は、限定するものではないが、封入される医薬製剤及びリポソームの成分、脂質小胞を分散させる媒体の性質、封入物質の有効濃度及びその潜在的毒性、小胞の適用及び／または送達中に伴う任意の追加プロセス、至適サイズ、目的用途のための小胞の多分散性及び貯蔵寿命、ならびに安全かつ効率的なリポソーム製品のバッチ間の再現性及び大規模製造の可能性などの物理化学的特徴に左右され得る。

【０７７１】

非限定的な例として、合成膜小胞などのリポソームは、米国特許出願公開第ＵＳ２０１３０１７７６３８号、同第ＵＳ２０１３０１７７６３７号、同第ＵＳ２０１３０１７７６３６号、同第ＵＳ２０１３０１７７６３５号、同第ＵＳ２０１３０１７７６３４号、同第ＵＳ２０１３０１７７６３３号、同第ＵＳ２０１３０１８３３７５号、同第ＵＳ２０１３０１８３３７３号及び同第ＵＳ２０１３０１８３３７２号（それぞれの内容全体を参照により本明細書に援用する）に記載されている方法、装置及びデバイスによって調製することができる。

【０７７２】

一実施形態において、本明細書に記載される医薬組成物は、限定するものではないが、１，２－ジオレイルオキシ－Ｎ，Ｎ－ジメチルアミノプロパン（ＤＯＤＭＡ）リポソーム、Ｍａｒｉｎａ Ｂｉｏｔｅｃｈ（Ｂｏｔｈｅｌｌ，ＷＡ）のＤｉＬａ２リポソーム、１，２－ジリノレイルオキシ－３－ジメチルアミノプロパン（ＤＬｉｎ－ＤＭＡ）、２，２－ジリノレイル－４－（２－ジメチルアミノエチル）－［１，３］－ジオキソラン（ＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡ）及びＭＣ３（ＵＳ２０１００３２４１２０、その全体を参照により本明細書に援用する）から形成されるものなどのリポソーム、ならびに低分子薬物を送達することができるリポソーム、限定するものではないが、Ｊａｎｓｓｅｎ Ｂｉｏｔｅｃｈ，Ｉｎｃ．（Ｈｏｒｓｈａｍ，ＰＡ）のＤＯＸＩＬ（登録商標）などを含み得る。

【０７７３】

一実施形態において、本明細書に記載される医薬組成物は、限定するものではないが、これまでに記載されており、かつｉｎ ｖｉｔｒｏ及びｉｎ ｖｉｖｏでのオリゴヌクレオチド送達に適することが示されている、安定化プラスミド脂質粒子（ＳＰＬＰ）または安定化核酸脂質粒子（ＳＮＡＬＰ）の合成から形成されたものなどのリポソームを含み得る（Ｗｈｅｅｌｅｒ ｅｔ ａｌ．Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ．１９９９ ６：２７１－２８１；Ｚｈａｎｇ ｅｔ ａｌ．Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ．１９９９ ６：１４３８－１４４７；Ｊｅｆｆｓ ｅｔ ａｌ．Ｐｈａｒｍ Ｒｅｓ．２００５ ２２：３６２－３７２；Ｍｏｒｒｉｓｓｅｙ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２００５ ２：１００

２－１００７；Ｚｉｍｍｅｒｍａｎｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ．２００６ ４４１：１１１－１１４；Ｈｅｙｅｓ ｅｔ ａｌ．Ｊ Ｃｏｎｔｒ Ｒｅｌ．２００５ １０７：２７６－２８７；Ｓｅｍｐｌｅ ｅｔ ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈ．２０１０ ２８：１７２－１７６；Ｊｕｄｇｅ ｅｔ ａｌ．Ｊ Ｃｌｉｎ Ｉｎｖｅｓｔ．２００９ １１９：６６１－６７３；ｄｅＦｏｕｇｅｒｏｌｌｅｓ Ｈｕｍ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．２００８ １９：１２５－１３２；米国特許出願公開第ＵＳ２０１３０１２２１０４参照；これらの全ての全体を本明細書に援用する）。Ｗｈｅｅｌｅｒらによる最初の製造法は、界面活性剤透析法であったが、後にＪｅｆｆｓらによって改良され、自発的小胞形成法と呼ばれている。リポソーム製剤は、ポリヌクレオチドに加えて、３～４つの脂質成分から構成される。一例として、リポソームは、Ｊｅｆｆｓらが記載するように、コレステロール５５％、ジステロイルホスファチジルコリン（ＤＳＰＣ）２０％、ＰＥＧ－Ｓ－ＤＳＧ１０％、及び１，２－ジオレイルオキシ－Ｎ，Ｎ－ジメチルアミノプロパン（ＤＯＤＭＡ）１５％を含有し得るが、これらに限定されない。別の例として、ある特定のリポソーム製剤は、Ｈｅｙｅｓらが記載するように、コレステロール４８％、ＤＳＰＣ ２０％、ＰＥＧ－ｃ－ＤＭＡ ２％、及び３０％カチオン性脂質を含有し得るが、これらに限定されず、ここで、カチオン性脂質は、１，２－ジステアルロキシ－Ｎ，Ｎ－ジメチルアミノプロパン（ＤＳＤＭＡ）、ＤＯＤＭＡ、ＤＬｉｎ－ＤＭＡ、または１，２－ジリノレニルオキシ－３－ジメチルアミノプロパン（ＤＬｅｎＤＭＡ）であり得る。

【０７７４】

いくつかの実施形態において、リポソーム製剤は、約２５．０％のコレステロール～約４０．０％のコレステロール、約３０．０％のコレステロール～約４５．０％のコレステロール、約３５．０％のコレステロール～約５０．０％のコレステロール及び／または約４８．５％のコレステロール～約６０％のコレステロールを含み得る。例えば、製剤は、２８．５％、３１．５％、３３．５％、３６．５％、３７．０％、３８．５％、３９．０％及び４３．５％からなる群から選択されるパーセンテージのコレステロールを含み得る。いくつかの実施形態において、製剤は、約５．０％～約１０．０％のＤＳＰＣ及び／または約７．０％～約１５．０％のＤＳＰＣを含み得る。

【０７７５】

一実施形態において、医薬組成物は、少なくとも１つの目的のポリペプチドをコードし得るポリヌクレオチドを送達するために形成され得るリポソームを含み得る。ポリヌクレオチドは、リポソームによって封入され得、かつ／またはリポソームによって次いで封入され得る水性コア中に含まれ得る（国際公開第ＷＯ２０１２０３１０４６号、同第ＷＯ２０１２０３１０４３号、同第ＷＯ２０１２０３０９０１号及び同第ＷＯ２０１２００６３７８号、ならびに米国特許出願公開第ＵＳ２０１３０１８９３５１号、同第ＵＳ２０１３０１９５９６９号及び同第ＵＳ２０１３０２０２６８４号参照、それぞれの内容全体を参照により本明細書に援用する）。

【０７７６】

別の実施形態において、リポソームは、標的化送達用に製剤化され得る。非限定的な例として、リポソームは、肝臓への標的化送達用に製剤化され得る。標的化送達に使用されるリポソームには、米国特許出願公開第ＵＳ２０１３０１９５９６７号（その内容全体を参照により本明細書に援用する）に記載されているリポソーム及びリポソームの作製方法が含まれるが、これらに限定されない。

【０７７７】

別の実施形態において、ポリヌクレオチドは、カチオン性水中油型エマルション中に製剤化され得、エマルション粒子は、油性コアと、ポリヌクレオチドと相互作用して分子をエマルション粒子に係留することができるカチオン性脂質とを含む（国際公開第ＷＯ２０１２００６３８０号参照、その全体を参照により本明細書に援用する）。

【０７７８】

一実施形態において、ポリヌクレオチドは、親水性相が分散している連続疎水性相を含む、油中水型エマルション中に製剤化され得る。非限定的な例として、エマルションは、国

際公開第ＷＯ２０１０８７７９１号（その内容全体を参照により本明細書に援用する）に記載されている方法によって作製することができる。

【０７７９】

別の実施形態において、脂質製剤は、少なくともカチオン性脂質と、トランスフェクションを向上することができる脂質と、脂質部分に連結した親水性頭部基を含有する少なくとも１つの脂質とを含み得る（国際公開第ＷＯ２０１１０７６８０７号及び米国特許出願公開第２０１１０２００５８２号、それぞれの内容全体を参照により本明細書に援用する）。別の実施形態において、ポリヌクレオチドは、官能化脂質二重層との間に架橋を有し得る脂質小胞中に製剤化され得る（米国特許出願公開第２０１２０１７７７２４号参照、その内容全体を参照により本明細書に援用する）。

【０７８０】

一実施形態において、ポリヌクレオチドは、国際特許公開第ＷＯ２０１３０８６５２６号（その内容全体を参照により本明細書に援用する）に記載されているようなリポソーム中に製剤化され得る。ポリヌクレオチドは、国際特許公開第ＷＯ２０１３０８６５２６号（その内容全体を参照により本明細書に援用する）に記載されているように、逆ｐＨ勾配及び／または最適化された内部緩衝液組成物を使用して、リポソーム中に封入され得る。

【０７８１】

一実施形態において、ポリヌクレオチド医薬組成物は、限定するものではないが、ＤｉＬａ２リポソーム（Ｍａｒｉｎａ　Ｂｉｏｔｅｃｈ（Ｂｏｔｈｅｌｌ，ＷＡ））、ＳＭＡＲＴＩＣＬＥＳ（登録商標）（Ｍａｒｉｎａ　Ｂｉｏｔｅｃｈ（Ｂｏｔｈｅｌｌ，ＷＡ））、中性ＤＯＰＣ（１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン）系リポソーム（例えば、卵巣癌のためのｓｉＲＮＡ送達（Ｌａｎｄｅｎ　ｅｔ　ａｌ．Ｃａｎｃｅｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ＆Ｔｈｅｒａｐｙ　２００６　５（１２）１７０８－１７１３）、その全体を参照により本明細書に援用する）及びヒアルロナン被覆リポソーム（Ｑｕｉｅｔ　Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ（Ｉｓｒａｅｌ））などのリポソーム中に製剤化され得る。

【０７８２】

一実施形態において、カチオン性脂質は、米国特許出願公開第２０１３００９０３７２号（その内容全体を参照により本明細書に援用する）に記載されているものなどの低分子量カチオン性脂質であり得る。

【０７８３】

一実施形態において、ポリヌクレオチドは、官能化脂質二重層との間に架橋を有し得る脂質小胞中に製剤化され得る。

【０７８４】

一実施形態において、ポリヌクレオチドは、カチオン性脂質を含むリポソーム中に製剤化され得る。リポソームは、国際公開第ＷＯ２０１３００６８２５号（その全体を参照により本明細書に援用する）に記載されているように、カチオン性脂質中の窒素原子と、ＲＮＡ中のリン酸との比率（Ｎ：Ｐ比）が１：１～２０：１であるモル比を有し得る。別の実施形態において、リポソームは、２０：１超または１：１未満のＮ：Ｐ比を有し得る。

【０７８５】

一実施形態において、ポリヌクレオチドは、脂質ポリカチオン複合体中に製剤化され得る。脂質ポリカチオン複合体の形成は、当該技術分野において知られている方法及び／または米国特許出願公開第２０１２０１７８７０２号（その全体を参照により本明細書に援用する）に記載されているような方法によって達成することができる。非限定的な例として、ポリカチオンには、カチオン性のペプチドまたはポリペプチドを挙げることができ、限定するものではないが、ポリリシン、ポリオルニチン及び／またはポリアルギニンならびに国際公開第ＷＯ２０１２０１３３２６号または米国特許出願公開第ＵＳ２０１３０１４２８１８号（それぞれの全体を参照により本明細書に援用する）に記載されているカチオン性ペプチドなどがある。別の実施形態において、ポリヌクレオチドは、限定するものではないが、コレステロールまたはジオレオイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＯＰＥ）などの非カチオン性脂質を更に含み得る、脂質ポリカチオン複合体中に製剤化され得

る。
【０７８６】
一実施形態において、ポリヌクレオチドは、アミノアルコールリピドイド中に製剤化され得る。本開示で使用することができるアミノアルコールリピドイドは、米国特許第８，４５０，２９８号（その全体を参照により本明細書に援用する）に記載されている方法によって調製することができる。
【０７８７】
リポソーム製剤は、限定するものではないが、カチオン性脂質成分の選択、カチオン性脂質の飽和の程度、ＰＥＧ化の性質、全成分の比率、及び大きさなどの生物物理的パラメーターによる影響を受け得る。Ｓｅｍｐｌｅら（Ｓｅｍｐｌｅ ｅｔ ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈ．２０１０ ２８：１７２－１７６、その全体を参照により本明細書に援用する）による一例では、リポソーム製剤は、カチオン性脂質５７．１％、ジパルミトイルホスファチジルコリン７．１％、コレステロール３４．３％及びＰＥＧ－ｃ－ＤＭＡ１．４％で構成された。別の例として、カチオン性脂質の組成を変えると、ｓｉＲＮＡをより効率的に種々の抗原提示細胞に送達することができた（Ｂａｓｈａ ｅｔ ａｌ．Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ．２０１１ １９：２１８６－２２００、その全体を参照により本明細書に援用する）。いくつかの実施形態において、リポソーム製剤は、約３５～約４５％のカチオン性脂質、約４０％～約５０％のカチオン性脂質、約５０％～約６０％のカチオン性脂質及び／または約５５％～約６５％のカチオン性脂質を含み得る。いくつかの実施形態において、リポソーム中の脂質とｍＲＮＡの比は、約５：１～約２０：１、約１０：１～約２５：１、約１５：１～約３０：１及び／または少なくとも３０：１であり得る。
【０７８８】
いくつかの実施形態において、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）製剤におけるＰＥＧ比を増やしても減らしてもよく、かつ／またはＰＥＧ脂質の炭素鎖長をＣ１４からＣ１８に変更してＬＮＰ製剤の薬物動態及び／もしくは体内分布を変えてもよい。非限定的な例として、ＬＮＰ製剤は、カチオン性脂質、ＤＳＰＣ及びコレステロールと比較して、約０．５％～約３．０％、約１．０％～約３．５％、約１．５％～約４．０％、約２．０％～約４．５％、約２．５％～約５．０％及び／または約３．０％～約６．０％の脂質モル比のＰＥＧ－ｃ－ＤＯＭＧ（Ｒ－３－［（ω－メトキシ－ポリ（エチレングリコール）２０００）カルバモイル）］－１，２－ジミリスチルオキシプロピル－３－アミン）（本明細書中、ＰＥＧ－ＤＯＭＧとも称される）を含有し得る。別の実施形態において、ＰＥＧ－ｃ－ＤＯＭＧは、限定するものではないが、ＰＥＧ－ＤＳＧ（１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロール、メトキシポリエチレングリコール）、ＰＥＧ－ＤＭＧ（１，２－ジミリストイル－ｓｎ－グリセロール）及び／またはＰＥＧ－ＤＰＧ（１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロール、メトキシポリエチレングリコール）などのＰＥＧ脂質で置き換えられてもよい。カチオン性脂質は、限定するものではないが、ＤＬｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡ、ＤＬｉｎ－ＤＭＡ、Ｃ１２－２００及びＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡなどの当該技術分野において知られている任意の脂質から選択することができる。
【０７８９】
一実施形態において、ポリヌクレオチドは、国際公開第ＷＯ２０１２１７０９３０号（その内容全体を参照により本明細書に援用する）に記載されているものなどの脂質ナノ粒子中に製剤化され得る。
【０７９０】
一実施形態において、ポリヌクレオチドを含む製剤は、少なくとも１つの脂質を含むことができるナノ粒子である。脂質は、限定するものではないが、ＤＬｉｎ－ＤＭＡ、ＤＬｉｎ－Ｋ－ＤＭＡ、９８Ｎ１２－５、Ｃ１２－２００、ＤＬｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡ、ＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡ、ＤＯＤＭＡ、ＰＬＧＡ、ＰＥＧ、ＰＥＧ－ＤＭＧ、ＰＥＧ化脂質及びアミノアルコール脂質から選択することができる。別の態様において、脂質は、限定するものではないが、ＤＬｉｎ－ＤＭＡ、ＤＬｉｎ－Ｄ－ＤＭＡ、ＤＬｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡ、ＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡ、ＤＯＤＭＡ及びアミノアルコール脂質などのカチオン性

脂質であってよい。アミノアルコールカチオン性脂質は、米国特許出願公開第ＵＳ２０１３０１５０６２５号（その全体を参照により本明細書に援用する）に記載されている脂質であってもよく、かつ／または当該特許出願公開に記載されている方法によって作製されてもよい。非限定的な例として、カチオン性脂質は、２－アミノ－３－［（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イルオキシ］－２－｛［（９Ｚ，２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イルオキシ］メチル｝プロパン－１－オール（ＵＳ２０１３０１５０６２５の化合物１）、２－アミノ－３－［（９Ｚ）－オクタデカ－９－エン－１－イルオキシ］－２－｛［（９Ｚ）－オクタデカ－９－エン－１－イルオキシ］メチル｝プロパン－１－オール（ＵＳ２０１３０１５０６２５の化合物２）、２－アミノ－３－［（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イルオキシ］－２－［（オクチルオキシ）メチル］プロパン－１－オール（ＵＳ２０１３０１５０６２５の化合物３）、及び２－（ジメチルアミノ）－３－［（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イルオキシ］－２－｛［（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イルオキシ］メチル｝プロパン－１－オール（ＵＳ２０１３０１５０６２５の化合物４）、またはこれらの任意の薬学的に許容される塩もしくは立体異性体であり得る。

【０７９１】

脂質ナノ粒子製剤は、典型的に、脂質、特に、イオン性カチオン性脂質、例えば、２，２－ジリノレイル－４－ジメチルアミノエチル－［１，３］－ジオキソラン（ＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡ）、ジリノレイル－メチル－４－ジメチルアミノブチレート（ＤＬｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡ）またはジ（（Ｚ）－ノナ－２－エン－１－イル）９－（（４－（ジメチルアミノ）ブタノイル）オキシ）ヘプタデカンジオエート（Ｌ３１９）を含み、中性脂質のステロール及び粒子の凝集を減少させることができる分子、例えばＰＥＧ脂質またはＰＥＧ修飾脂質を更に含む。

【０７９２】

一実施形態において、脂質ナノ粒子製剤は、（ｉ）２，２－ジリノレイル－４－ジメチルアミノエチル－［１，３］－ジオキソラン（ＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡ）、ジリノレイル－メチル－４－ジメチルアミノブチレート（ＤＬｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡ）及びジ（（Ｚ）－ノナ－２－エン－１－イル）９－（（４－（ジメチルアミノ）ブタノイル）オキシ）ヘプタデカンジオエート（Ｌ３１９）からなる群から選択される少なくとも１つの脂質と、（ｉｉ）ＤＳＰＣ、ＤＰＰＣ、ＰＯＰＣ、ＤＯＰＥ及びＳＭから選択される中性脂質と、（ｉｉｉ）ステロール、例えば、コレステロールと、（ｉｖ）ＰＥＧ脂質、例えば、ＰＥＧ－ＤＭＧまたはＰＥＧ－ｃＤＭＡとから、カチオン性脂質約２０～６０％：中性脂質５～２５％：ステロール２５～５５％：ＰＥＧ脂質０．５～１５％のモル比で、本質的に構成される。

【０７９３】

一実施形態において、製剤は、モル基準で約２５％～約７５％、例えば、モル基準で約３５～約６５％、約４５～約６５％、約６０％、約５７．５％、約５０％または約４０％の２，２－ジリノレイル－４－ジメチルアミノエチル－［１，３］－ジオキソラン（ＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡ）、ジリノレイル－メチル－４－ジメチルアミノブチレート（ＤＬｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡ）及びジ（（Ｚ）－ノナ－２－エン－１－イル）９－（（４－（ジメチルアミノ）ブタノイル）オキシ）ヘプタデカンジオエート（Ｌ３１９）から選択されるカチオン性脂質を含む。

【０７９４】

一実施形態において、製剤は、モル基準で０．５％～約１５％、例えば、モル基準で約３～約１２％、約５～約１０％または約１５％、約１０％もしくは約７．５％の中性脂質を含む。例示的な中性脂質には、ＤＳＰＣ、ＰＯＰＣ、ＤＰＰＣ、ＤＯＰＥ及びＳＭが挙げられるが、これらに限定されない。一実施形態において、製剤は、モル基準で約５％～約５０％（例えば、モル基準で約１５～約４５％、約２０～約４０％、約４０％、約３８．５％、約３５％または約３１％のステロールを含む。例示的なステロールは、コレステロールである。一実施形態において、製剤は、モル基準で約０．５％～約２０％（例えば、

モル基準で約０．５～約１０％、約０．５～約５％、約１．５％、約０．５％、約１．５％、約３．５％または約５％のＰＥＧ脂質またはＰＥＧ修飾脂質を含む。一実施形態において、ＰＥＧ脂質またはＰＥＧ修飾脂質は、平均分子量が２，０００ＤａのＰＥＧ分子を含む。他の実施形態において、ＰＥＧ脂質またはＰＥＧ修飾脂質は、平均分子量が２，０００未満、例えば、約１，５００Ｄａ、約１，０００Ｄａまたは約５００ＤａのＰＥＧ分子を含む。例示的なＰＥＧ修飾脂質には、ＰＥＧ－ジステアロイルグリセロール（ＰＥＧ－ＤＭＧ）（本明細書中、ＰＥＧ－Ｃ１４またはＣ１４－ＰＥＧとも称される）、ＰＥＧ－ｃＤＭＡ（Ｒｅｙｅｓ ｅｔ ａｌ．Ｊ．Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ Ｒｅｌｅａｓｅ，１０７，２７６－２８７（２００５）において更に考察されている、その内容全体を参照により本明細書に援用する）が挙げられるが、これらに限定されない。

【０７９５】

一実施形態において、本開示の製剤は、モル基準で、２，２－ジリノレイル－４－ジメチルアミノエチル－［１，３］－ジオキソラン（ＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡ）、ジリノレイル－メチル－４－ジメチルアミノブチレート（ＤＬｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡ）及びジ（（Ｚ）－ノナ－２－エン－１－イル）９－（（４－（ジメチルアミノ）ブタノイル）オキシ）ヘプタデカンジオエート（Ｌ３１９）から選択される２５～７５％のカチオン性脂質と、０．５～１５％の中性脂質と、５～５０％のステロールと、０．５～２０％のＰＥＧ脂質またはＰＥＧ修飾脂質とを含む。

【０７９６】

一実施形態において、本開示の製剤は、モル基準で、２，２－ジリノレイル－４－ジメチルアミノエチル－［１，３］－ジオキソラン（ＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡ）、ジリノレイル－メチル－４－ジメチルアミノブチレート（ＤＬｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡ）及びジ（（Ｚ）－ノナ－２－エン－１－イル）９－（（４－（ジメチルアミノ）ブタノイル）オキシ）ヘプタデカンジオエート（Ｌ３１９）から選択される３５～６５％のカチオン性脂質と、３～１２％の中性脂質と、１５～４５％のステロールと、０．５～１０％のＰＥＧ脂質またはＰＥＧ修飾脂質とを含む。

【０７９７】

一実施形態において、本開示の製剤は、モル基準で、２，２－ジリノレイル－４－ジメチルアミノエチル－［１，３］－ジオキソラン（ＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡ）、ジリノレイル－メチル－４－ジメチルアミノブチレート（ＤＬｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡ）及びジ（（Ｚ）－ノナ－２－エン－１－イル）９－（（４－（ジメチルアミノ）ブタノイル）オキシ）ヘプタデカンジオエート（Ｌ３１９）から選択される４５～６５％のカチオン性脂質と、５～１０％の中性脂質と、２５～４０％のステロールと、０．５～１０％のＰＥＧ脂質またはＰＥＧ修飾脂質とを含む。

【０７９８】

一実施形態において、本開示の製剤は、モル基準で、２，２－ジリノレイル－４－ジメチルアミノエチル－［１，３］－ジオキソラン（ＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡ）、ジリノレイル－メチル－４－ジメチルアミノブチレート（ＤＬｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡ）及びジ（（Ｚ）－ノナ－２－エン－１－イル）９－（（４－（ジメチルアミノ）ブタノイル）オキシ）ヘプタデカンジオエート（Ｌ３１９）から選択される約６０％のカチオン性脂質と、約７．５％の中性脂質と、約３１％のステロールと、約１．５％のＰＥＧ脂質またはＰＥＧ修飾脂質とを含む。

【０７９９】

一実施形態において、本開示の製剤は、モル基準で、２，２－ジリノレイル－４－ジメチルアミノエチル－［１，３］－ジオキソラン（ＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡ）、ジリノレイル－メチル－４－ジメチルアミノブチレート（ＤＬｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡ）及びジ（（Ｚ）－ノナ－２－エン－１－イル）９－（（４－（ジメチルアミノ）ブタノイル）オキシ）ヘプタデカンジオエート（Ｌ３１９）から選択される約５０％のカチオン性脂質と、約１０％の中性脂質と、約３８．５％のステロールと、約１．５％のＰＥＧ脂質またはＰＥＧ修飾脂質とを含む。

【０８００】
一実施形態において、本開示の製剤は、モル基準で、２，２－ジリノレイル－４－ジメチルアミノエチル－［１，３］－ジオキソラン（ＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡ）、ジリノレイル－メチル－４－ジメチルアミノブチレート（ＤＬｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡ）及びジ（（Ｚ）－ノナ－２－エン－１－イル）９－（（４－（ジメチルアミノ）ブタノイル）オキシ）ヘプタデカンジオエート（Ｌ３１９）から選択される約５０％のカチオン性脂質と、約１０％の中性脂質と、約３５％のステロールと、約４．５％または約５％のＰＥＧ脂質またはＰＥＧ修飾脂質と、約０．５％の標的化脂質とを含む。
【０８０１】
一実施形態において、本開示の製剤は、モル基準で、２，２－ジリノレイル－４－ジメチルアミノエチル－［１，３］－ジオキソラン（ＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡ）、ジリノレイル－メチル－４－ジメチルアミノブチレート（ＤＬｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡ）及びジ（（Ｚ）－ノナ－２－エン－１－イル）９－（（４－（ジメチルアミノ）ブタノイル）オキシ）ヘプタデカンジオエート（Ｌ３１９）から選択される約４０％のカチオン性脂質と、約１５％の中性脂質と、約４０％のステロールと、約５％のＰＥＧ脂質またはＰＥＧ修飾脂質とを含む。
【０８０２】
一実施形態において、本開示の製剤は、モル基準で、２，２－ジリノレイル－４－ジメチルアミノエチル－［１，３］－ジオキソラン（ＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡ）、ジリノレイル－メチル－４－ジメチルアミノブチレート（ＤＬｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡ）及びジ（（Ｚ）－ノナ－２－エン－１－イル）９－（（４－（ジメチルアミノ）ブタノイル）オキシ）ヘプタデカンジオエート（Ｌ３１９）から選択される約５７．２％のカチオン性脂質と、約７．１％の中性脂質と、約３４．３％のステロールと、約１．４％のＰＥＧ脂質またはＰＥＧ修飾脂質とを含む。
【０８０３】
一実施形態において、本開示の製剤は、モル基準で、ＰＥＧ脂質、ＰＥＧ－ｃＤＭＡ（ＰＥＧ－ｃＤＭＡは、Ｒｅｙｅｓら（Ｊ．Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ　Ｒｅｌｅａｓｅ，１０７，２７６－２８７（２００５）、その内容全体を参照により本明細書に援用する）において更に考察されている）から選択される５７．５％のカチオン性脂質と、約７．５％の中性脂質と、約３１．５％のステロールと、約３．５％のＰＥＧ脂質またはＰＥＧ修飾脂質とを含む。
【０８０４】
いくつかの実施形態において、脂質ナノ粒子製剤は、カチオン性脂質約２０～７０％：中性脂質５～４５％：コレステロール２０～５５％：ＰＥＧ修飾脂質０．５～１５％のモル比の脂質混合物から本質的に構成される。いくつかの実施形態において、脂質ナノ粒子製剤は、カチオン性脂質約２０～６０％：中性脂質５～２５％：コレステロール２５～５５％：ＰＥＧ修飾脂質０．５～１５％のモル比の脂質混合物から本質的に構成される。
【０８０５】
具体的な実施形態において、脂質モル比は、およそ５０／１０／３８．５／１．５（ｍｏｌ％　カチオン性脂質／中性脂質（例えばＤＳＰＣ）／Ｃｈｏｌ／ＰＥＧ修飾脂質（例えばＰＥＧ－ＤＭＧ、ＰＥＧ－ＤＳＧまたはＰＥＧ－ＤＰＧ））、５７．２／７．１１３４．３／１．４（ｍｏｌ％　カチオン性脂質／中性脂質（例えばＤＰＰＣ）／Ｃｈｏｌ／ＰＥＧ修飾脂質（例えばＰＥＧ－ｃＤＭＡ））、４０／１５／４０／５（ｍｏｌ％　カチオン性脂質／中性脂質（例えばＤＳＰＣ）／Ｃｈｏｌ／ＰＥＧ修飾脂質（例えばＰＥＧ－ＤＭＧ））、５０／１０／３５／４．５／０．５（ｍｏｌ％　カチオン性脂質／中性脂質（例えばＤＳＰＣ）／Ｃｈｏｌ／ＰＥＧ修飾脂質（例えばＰＥＧ－ＤＳＧ））、５０／１０／３５／５（カチオン性脂質／中性脂質（例えばＤＳＰＣ）／Ｃｈｏｌ／ＰＥＧ修飾脂質（例えばＰＥＧ－ＤＭＧ））、４０／１０／４０／１０（ｍｏｌ％　カチオン性脂質／中性脂質（例えばＤＳＰＣ）／Ｃｈｏｌ／ＰＥＧ修飾脂質（例えばＰＥＧ－ＤＭＧまたはＰＥＧ－ｃＤＭＡ））、３５／１５／４０／１０（ｍｏｌ％　カチオン性脂質／中性脂質（

例えばＤＳＰＣ）／Ｃｈｏｌ／ＰＥＧ修飾脂質（例えばＰＥＧ－ＤＭＧまたはＰＥＧ－ｃＤＭＡ））、または５２／１３／３０／５（ｍｏｌ％ カチオン性脂質／中性脂質（例えばＤＳＰＣ）／Ｃｈｏｌ／ＰＥＧ修飾脂質（例えばＰＥＧ－ＤＭＧまたはＰＥＧ－ｃＤＭＡ）である。

【０８０６】

例示的な脂質ナノ粒子組成物及びその作製方法は、例えば、Ｓｅｍｐｌｅ ｅｔ ａｌ．（２０１０）Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２８：１７２－１７６、Ｊａｙａｒａｍａ ｅｔ ａｌ．（２０１２），Ａｎｇｅｗ．Ｃｈｅｍ．Ｉｎｔ．Ｅｄ．，５１：８５２９－８５３３、及びＭａｉｅｒ ｅｔ ａｌ．（２０１３）Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｔｈｅｒａｐｙ ２１，１５７０－１５７８（それぞれの内容全体を参照により本明細書に援用する）に記載されている。

【０８０７】

一実施形態において、本明細書に記載される脂質ナノ粒子製剤は、カチオン性脂質と、ＰＥＧ脂質と、構造脂質とを含み得、任意選択により、非カチオン性脂質を含み得る。非限定的な例として、脂質ナノ粒子は、約４０～６０％のカチオン性脂質と、約５～１５％の非カチオン性脂質と、約１～２％のＰＥＧ脂質と、約３０～５０％の構造脂質とを含み得る。別の非限定的な例として、脂質ナノ粒子は、カチオン性脂質約５０％と、非カチオン性脂質約１０％と、ＰＥＧ脂質約１．５％と、構造脂質約３８．５％とを含み得る。更に別の非限定的な例として、脂質ナノ粒子は、カチオン性脂質約５５％と、非カチオン性脂質約１０％と、ＰＥＧ脂質約２．５％と、構造脂質約３２．５％とを含み得る。一実施形態において、カチオン性脂質は、限定するものではないが、ＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡ、ＤＬｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡ及びＬ３１９などの本明細書に記載される任意のカチオン性脂質であってよい。

【０８０８】

一実施形態において、本明細書に記載される脂質ナノ粒子製剤は、４成分脂質ナノ粒子であり得る。脂質ナノ粒子は、カチオン性脂質と、非カチオン性脂質と、ＰＥＧ脂質と、構造脂質とを含み得る。非限定的な例として、脂質ナノ粒子は、約４０～６０％のカチオン性脂質と、約５～１５％の非カチオン性脂質と、約１～２％のＰＥＧ脂質と、約３０～５０％の構造脂質とを含み得る。別の非限定的な例として、脂質ナノ粒子は、カチオン性脂質約５０％と、非カチオン性脂質約１０％と、ＰＥＧ脂質約１．５％と、構造脂質約３８．５％とを含み得る。更に別の非限定的な例として、脂質ナノ粒子は、カチオン性脂質約５５％と、非カチオン性脂質約１０％と、ＰＥＧ脂質約２．５％と、構造脂質約３２．５％とを含み得る。一実施形態において、カチオン性脂質は、限定するものではないが、ＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡ、ＤＬｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡ及びＬ３１９などの本明細書に記載される任意のカチオン性脂質であってよい。

【０８０９】

一実施形態において、本明細書に記載される脂質ナノ粒子製剤は、カチオン性脂質と、非カチオン性脂質と、ＰＥＧ脂質と、構造脂質とを含み得る。非限定的な例として、脂質ナノ粒子は、約５０％のカチオン性脂質ＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡと、約１０％の非カチオン性脂質ＤＳＰＣと、約１．５％のＰＥＧ脂質ＰＥＧ－ＤＯＭＧと、約３８．５％の構造脂質コレステロールとを含む。非限定的な例として、脂質ナノ粒子は、約５０％のカチオン性脂質ＤＬｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡと、約１０％の非カチオン性脂質ＤＳＰＣと、約１．５％のＰＥＧ脂質ＰＥＧ－ＤＯＭＧと、約３８．５％の構造脂質コレステロールとを含む。非限定的な例として、脂質ナノ粒子は、約５０％のカチオン性脂質ＤＬｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡと、約１０％の非カチオン性脂質ＤＳＰＣと、約１．５％のＰＥＧ脂質ＰＥＧ－ＤＭＧと、約３８．５％の構造脂質コレステロールとを含む。更に別の非限定的な例として、脂質ナノ粒子は、約５５％のカチオン性脂質Ｌ３１９と、約１０％の非カチオン性脂質ＤＳＰＣと、約２．５％のＰＥＧ脂質ＰＥＧ－ＤＭＧと、約３２．５％の構造脂質コレステロールとを含む。

【０８１０】

一実施形態において、カチオン性脂質は、限定するものではないが、国際公開第ＷＯ２０１２０４０１８４号、同第ＷＯ２０１１１５３１２０号、同第ＷＯ２０１１１４９７３３号、同第ＷＯ２０１１０９０９６５号、同第ＷＯ２０１１０４３９１３号、同第ＷＯ２０１１０２２４６０号、同第ＷＯ２０１２０６１２５９号、同第ＷＯ２０１２０５４３６５号、同第ＷＯ２０１２０４４６３８号、同第ＷＯ２０１００８０７２４号、同第ＷＯ２０１０２１８６５号、同第ＷＯ２００８１０３２７６号、同第ＷＯ２０１３０８６３７３号及び同第ＷＯ２０１３０８６３５４号、米国特許第７，８９３，３０２号、同第７，４０４，９６９号、同第８，２８３，３３３号及び同第８，４６６，１２２号ならびに米国特許出願公開第ＵＳ２０１０００３６１１５号、同第ＵＳ２０１２０２０２８７１号、同第ＵＳ２０１３００６４８９４号、同第ＵＳ２０１３０１２９７８５号、同第ＵＳ２０１３０１５０６２５号、同第ＵＳ２０１３０１７８５４１号及び同第ＵＳ２０１３０２２５８３６号（それぞれの内容全体を参照により本明細書に援用する）に記載されているカチオン性脂質から選択することができる。別の実施形態において、カチオン性脂質は、限定するものではないが、国際公開第ＷＯ２０１２０４０１８４号、同第ＷＯ２０１１１５３１２０号、同第ＷＯ２０１１１４９７３３号、同第ＷＯ２０１１０９０９６５号、同第ＷＯ２０１１０４３９１３号、同第ＷＯ２０１１０２２４６０号、同第ＷＯ２０１２０６１２５９号、同第ＷＯ２０１２０５４３６５号、同第ＷＯ２０１２０４４６３８号及び同第ＷＯ２０１３１１６１２６号または米国特許出願公開第ＵＳ２０１３０１７８５４１号及び同第ＵＳ２０１３０２２５８３６号（それぞれの内容全体を参照により本明細書に援用する）に記載されている式Ａから選択することができる。更に別の実施形態において、カチオン性脂質は、限定するものではないが、国際公開第ＷＯ２００８１０３２７６号の式ＣＬＩ－ＣＬＸＸＩＸ、米国特許第７，８９３，３０２号の式ＣＬＩ－ＣＬＸＸＩＸ、米国特許第７，４０４，９６９号の式ＣＬＩ－ＣＬＸＸＸＸＩＩ、及び米国特許出願公開第ＵＳ２０１０００３６１１５号の式Ｉ～ＶＩ、米国特許出願公開第ＵＳ２０１３０１２３３８号の式Ｉ（それぞれの全体を参照により本明細書に援用する）から選択することができる。非限定的な例として、カチオン性脂質は、（２０Ｚ，２３Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルノナコサ－２０，２３－ジエン－１０－アミン、（１７Ｚ，２０Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメミルヘキサコサ－１７，２０－ジエン－９－アミン、（１Ｚ，１９Ｚ）－Ｎ５Ｎ－ジメチルペンタコサ－１６，１９－ジエン－８－アミン、（１３Ｚ，１６Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルドコサ－１３，１６－ジエン－５－アミン、（１２Ｚ，１５Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルヘニコサ－１２，１５－ジエン－４－アミン、（１４Ｚ，１７Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルトリコサ－１４，１７－ジエン－６－アミン、（１５Ｚ，１８Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルテトラコサ－１５，１８－ジエン－７－アミン、（１８Ｚ，２１Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルヘプタコサ－１８，２１－ジエン－１０－アミン、（１５Ｚ，１８Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルテトラコサ－１５，１８－ジエン－５－アミン、（１４Ｚ，１７Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルトリコサ－１４，１７－ジエン－４－アミン、（１９Ｚ，２２Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメイルオクタコサ－１９，２２－ジエン－９－アミン、（１８Ｚ，２１Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルヘプタコサ－１８，２１－ジエン－８－アミン、（１７Ｚ，２０Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルヘキサコサ－１７，２０－ジエン－７－アミン、（１６Ｚ，１９Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルペンタコサ－１６，１９－ジエン－６－アミン、（２２Ｚ，２５Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルヘントリアコンタ－２２，２５－ジエン－１０－アミン、（２１Ｚ，２４Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルトリアコンタ－２１，２４－ジエン－９－アミン、（１８Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルヘプタコサ－１８－エン－１０－アミン、（１７Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルヘキサコサ－１７－エン－９－アミン、（１９Ｚ，２２Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルオクタコサ－１９，２２－ジエン－７－アミン、Ｎ，Ｎ－ジメチルヘプタコサン－１０－アミン、（２０Ｚ，２３Ｚ）－Ｎ－エチル－Ｎ－メチルノナコサ－２０，２３－ジエン－１０－アミン、１－［（１１Ｚ，１４Ｚ）－1－ノニリコサ－１１，１４－ジエン－１－イル］ピロリジン、（２０Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルヘプタコサ－２０－エン－１０－アミン、（１５Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルエプタコサ－１５－エン－１０－アミン、（１４Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルノナコサ－１４－エン－１０－アミン、（１７Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルノナコサ－１７－エン－１０－

アミン、（２４Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルトリトリアコンター２４－エン－１０－アミン、（２０Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルノナコサ－２０－エン－１０－アミン、（２２Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルヘントリアコンター２２－エン－１０－アミン、（１６Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルペンタコサ－１６－エン－８－アミン、（１２Ｚ，１５Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－２－ノニルヘニコサ－１２，１５－ジエン－１－アミン、（１３Ｚ，１６Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－ノニルドコサ－１３，１６－ジエン－１－アミン、Ｎ，Ｎ－ジメチル－１－［（１Ｓ，２Ｒ）－２－オクチルシクロプロピル］エプタデカン－８－アミン、１－［（１Ｓ，２Ｒ）－２－ヘキシルシクロプロピル］－Ｎ，Ｎ－ジメチルノナデカン－１０－アミン、Ｎ，Ｎ－ジメチル－１－［（１Ｓ，２Ｒ）－２－オクチルシクロプロピル］ノナデカン－１０－アミン、Ｎ，Ｎ－ジメチル－２１－［（１Ｓ，２Ｒ）－２－オクチルシクロプロピル］ヘニコサン－１０－アミン、Ｎ，Ｎ－ジメチル－１－［（１Ｓ，２Ｓ）－２－｛［（１Ｒ，２Ｒ）－２－ペンチルシクロプロピル］メチル｝シクロプロピル］ノナデカン－１０－アミン，Ｎ，Ｎ－ジメチル－１－［（１Ｓ，２Ｒ）－２－オクチルシクロプロピル］ヘキサデカン－８－アミン、Ｎ，Ｎ－ジメチル－［（１Ｒ，２Ｓ）－２－ウンデシルシクロプロピル］テトラデカン－５－アミン、Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－｛７－［（１Ｓ，２Ｒ）－２－オクチルシクロプロピル］ヘプチル｝ドデカン－１－アミン、１－［（１Ｒ，２Ｓ）－２－ヘプチルシクロプロピル］－Ｎ，Ｎ－ジメチルオクタデカン－９－アミン、１－［（１Ｓ，２Ｒ）－２－デシルシクロプロピル］－Ｎ，Ｎ－ジメチルペンタデカン－６－アミン、Ｎ，Ｎ－ジメチル－ｌ－［（ｌＳ，２Ｒ）－２－オクチルシクロプロピル］ペンタデカン－８－アミン、Ｒ－Ｎ，Ｎ－ジメチル－１－［（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イルオキシ］－３－（オクチルオキシ）プロパン－２－アミン、Ｓ－Ｎ，Ｎ－ジメチル－１－［（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イルオキシ］－３－（オクチルオキシ）プロパン－２－アミン、１－｛２－［（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イルオキシ］－１－［（オクチルオキシ）メチル］エチル｝ピロリジン、（２Ｓ）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－１－［（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イルオキシ］－３－［（５Ｚ）－オクタ－５－エン－１－イルオキシ］プロパン－２－アミン、１－｛２－［（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イルオキシ］－１－［（オクチルオキシ）メチル］エチル｝アゼチジン、（２Ｓ）－１－（ヘキシルオキシ）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－［（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イルオキシ］プロパン－２－アミン、（２Ｓ）－１－（ヘプチルオキシ）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－［（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イルオキシ］プロパン－２－アミン、Ｎ，Ｎ－ジメチル－１－（ノニルオキシ）－３－［（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イルオキシ］プロパン－２－アミン、Ｎ，Ｎ－ジメチル－１－［（９Ｚ）－オクタデカ－９－エン－１－イルオキシ］－３－（オクチルオキシ）プロパン－２－アミン；（２Ｓ）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－１－［（６Ｚ，９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－６，９，１２－トリエン－１－イルオキシ］－３－（オクチルオキシ）プロパン－２－アミン、（２Ｓ）－１－［（１１Ｚ，１４Ｚ）－イコサ－１１，１４－ジエン－１－イルオキシ］－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－（ペンチルオキシ）プロパン－２－アミン、（２Ｓ）－１－（ヘキシルオキシ）－３－［（１１Ｚ，１４Ｚ）－イコサ－１１，１４－ジエン－１－イルオキシ］－Ｎ，Ｎ－ジメチルプロパン－２－アミン、１－［（１１Ｚ，１４Ｚ）－イコサ－１１，１４－ジエン－１－イルオキシ］－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－（オクチルオキシ）プロパン－２－アミン、１－［（１３Ｚ，１６Ｚ）－ドコサ－１３，１６－ジエン－１－イルオキシ］－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－（オクチルオキシ）プロパン－２－アミン、（２Ｓ）－１－［（１３Ｚ，１６Ｚ）－ドコサ－１３，１６－ジエン－１－イルオキシ］－３－（ヘキシルオキシ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルプロパン－２－アミン、（２Ｓ）－１－［（１３Ｚ）－ドコサ－１３－エン－１－イルオキシ］－３－（ヘキシルオキシ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルプロパン－２－アミン、１－［（１３Ｚ）－ドコサ－１３－エン－１－イルオキシ］－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－（オクチルオキシ）プロパン－２－アミン、１－［（９Ｚ）－ヘキサデカ－９－エン－１－イルオキシ］－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－（オクチルオキシ）プロパ

ン－２－アミン、（２Ｒ）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－Ｈ（１－メトイルオクチル）オキシ］－３－［（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イルオキシ］プロパン－２－アミン、（２Ｒ）－１－［（３，７－ジメチルオクチル）オキシ］－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－［（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イルオキシ］プロパン－２－アミン、Ｎ，Ｎ－ジメチル－１－（オクチルオキシ）－３－（｛８－［（１Ｓ，２Ｓ）－２－｛［（１Ｒ，２Ｒ）－２－ペンチルシクロプロピル］メチル｝シクロプロピル］オクチル｝オキシ）プロパン－２－アミン、Ｎ，Ｎ－ジメチル－１－｛［８－（２－オクリルシクロプロピル）オクチル］オキシ｝－３－（オクチルオキシ）プロパン－２－アミン及び（１１Ｅ，２０Ｚ，２３Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルノナコサ－１１，２０，２－トリエン－１０－アミンまたはこれらの薬学的に許容される塩もしくは立体異性体から選択することができる。

【０８１１】

一実施形態において、脂質は、国際公開第ＷＯ２０１２１７０８８９号（その全体を参照により本明細書に援用する）に記載されているものなどの切断可能な脂質であり得る。

【０８１２】

別の実施形態において、脂質は、限定するものではないが、米国特許出願公開第ＵＳ２０１３００６４８９４号の式（Ｉ）（その内容全体を参照により本明細書に援用する）などのカチオン性脂質であり得る。

【０８１３】

一実施形態において、カチオン性脂質は、当該技術分野において知られている方法ならびに／または国際公開第ＷＯ２０１２０４０１８４号、同第ＷＯ２０１１１５３１２０号、同第ＷＯ２０１１１４９７３３号、同第ＷＯ２０１１０９０９６５号、同第ＷＯ２０１１０４３９１３号、同第ＷＯ２０１１０２２４６０号、同第ＷＯ２０１２０６１２５９号、同第ＷＯ２０１２０５４３６５号、同第ＷＯ２０１２０４４６３８号、同第ＷＯ２０１００８０７２４号、同第ＷＯ２０１０２１８６５号、同第ＷＯ２０１３０８６３７３号及び同第ＷＯ２０１３０８６３５４号（それぞれの内容全体を参照により本明細書に援用する）に記載されているような方法によって合成することができる。

【０８１４】

別の実施形態において、カチオン性脂質は、トリアルキルカチオン性脂質であり得る。トリアルキルカチオン性脂質ならびにトリアルキルカチオン性脂質の製造方法及び使用方法の非限定的な例は、国際特許公開第ＷＯ２０１３１２６８０３号に記載されており、その内容全体を参照により本明細書に援用する。

【０８１５】

一実施形態において、ポリヌクレオチドのＬＮＰ製剤は、３％の脂質モル比でＰＥＧ－ｃ－ＤＯＭＧを含有し得る。別の実施形態において、ポリヌクレオチドのＬＮＰ製剤は、１．５％の脂質モル比でＰＥＧ－ｃ－ＤＯＭＧを含有し得る。

【０８１６】

一実施形態において、ポリヌクレオチドの医薬組成物は、国際公開第ＷＯ２０１２０９９７５５号（その内容全体を参照により本明細書に援用する）に記載されているＰＥＧ化脂質のうちの少なくとも１つを含み得る。

【０８１７】

一実施形態において、ＬＮＰ製剤は、ＰＥＧ－ＤＭＧ２０００（１，２－ジミリストイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホホエタノールアミン－Ｎ－［メトキシ（ポリエチレングリコール）－２０００）を含有し得る。一実施形態において、ＬＮＰ製剤は、ＰＥＧ－ＤＭＧ２０００と、当該技術分野において知られているカチオン性脂質と、少なくとも１つの他の構成成分とを含有し得る。別の実施形態において、ＬＮＰ製剤は、ＰＥＧ－ＤＭＧ２０００と、当該技術分野において知られているカチオン性脂質と、ＤＳＰＣと、コレステロールとを含有し得る。非限定的な例として、ＬＮＰ製剤は、ＰＥＧ－ＤＭＧ２０００と、ＤＬｉｎ－ＤＭＡと、ＤＳＰＣと、コレステロールとを含有し得る。別の非限定的な例として、ＬＮＰ製剤は、ＰＥＧ－ＤＭＧ２０００と、ＤＬｉｎ－ＤＭＡと、ＤＳＰＣと、コレ

ステロールとを、２：４０：１０：４８のモル比で含有し得る（例えば、Ｇｅａｌｌ ｅｔａｌ．，Ｎｏｎｖｉｒａｌ ｄｅｌｉｖｅｒｙ ｏｆ ｓｅｌｆ－ａｍｐｌｉｆｙｉｎｇ ＲＮＡ ｖａｃｃｉｎｅｓ，ＰＮＡＳ ２０１２；ＰＭＩＤ：２２９０８２９４参照、その全体を参照により本明細書に援用する）。

【０８１８】

一実施形態において、ＬＮＰ製剤は、国際公開第ＷＯ２０１１１２７２５５号または同第ＷＯ２００８１０３２７６号（それぞれの内容全体を参照により本明細書に援用する）に記載されている方法によって製剤化され得る。非限定的な例として、本明細書に記載されるポリヌクレオチドは、ＷＯ２０１１１２７２５５及び／またはＷＯ２００８１０３２７６（それぞれの内容全体を参照により本明細書に援用する）に記載されているように、ＬＮＰ製剤中に封入され得る。

【０８１９】

一実施形態において、本明細書に記載されるポリヌクレオチドは、米国特許出願公開第ＵＳ２０１２０２０７８４５号（その内容全体を参照により本明細書に援用する）に記載されているように、非経口経路によって送達されるナノ粒子中に製剤化され得る。

【０８２０】

一実施形態において、ポリヌクレオチドは、米国特許出願公開第ＵＳ２０１３０１５６８４５号または国際公開第ＷＯ２０１３０９３６４８号もしくは同第ＷＯ２０１２０２４５２６号（それぞれの全体を参照により本明細書に援用する）に記載されている方法によって作製された脂質ナノ粒子中に製剤化され得る。

【０８２１】

本明細書に記載される脂質ナノ粒子は、米国特許出願公開第ＵＳ２０１３０１６４４００号（その全体を参照により本明細書に援用する）に記載されているシステム及び／または方法によって、無菌環境で作製され得る。

【０８２２】

一実施形態において、ＬＮＰ製剤は、米国特許第８，４９２，３５９号（その内容全体を参照により本明細書に援用する）に記載されている核酸脂質粒子などのナノ粒子中に製剤化され得る。非限定的な例として、脂質粒子は、１つ以上の有効物質または治療薬と、粒子中に存在する総脂質のうち約５０モル％～約８５モル％を構成する１つ以上のカチオン性脂質と、粒子中に存在する総脂質のうち約１３モル％～約４９．５モル％を構成する１つ以上の非カチオン性脂質と、粒子中に存在する総脂質のうち約０．５モル％～約２モル％を構成する、粒子の凝集を阻害する１つ以上のコンジュゲート脂質とを含み得る。ナノ粒子中の核酸は、本明細書に記載されるポリヌクレオチドであり得、かつ／または当該技術分野において知られている。

【０８２３】

一実施形態において、ＬＮＰ製剤は、国際公開第ＷＯ２０１１１２７２５５号または同第ＷＯ２００８１０３２７６号（それぞれの内容全体を参照により本明細書に援用する）に記載されている方法によって製剤化され得る。非限定的な例として、本明細書に記載される修飾ＲＮＡは、ＷＯ２０１１１２７２５５及び／またはＷＯ２００８１０３２７６（それぞれの内容全体を参照により本明細書に援用する）に記載されているように、ＬＮＰ製剤中に封入され得る。

【０８２４】

一実施形態において、本明細書に記載されるＬＮＰ製剤は、ポリカチオン性組成物を含み得る。非限定的な例として、ポリカチオン性組成物は、米国特許出願公開第ＵＳ２００５０２２２０６４号（その内容全体を参照により本明細書に援用する）の式１～６０から選択することができる。別の実施形態において、ポリカチオン性組成物を含むＬＮＰ製剤は、本明細書に記載される修飾ＲＮＡのｉｎ ｖｉｖｏ送達及び／またはｉｎ ｖｉｔｒｏ送達用に使用することができる。

【０８２５】

一実施形態において、本明細書に記載されるＬＮＰ製剤は、透過性向上分子を追加で含み

得る。非限定的な透過性向上分子は、米国特許出願公開第ＵＳ２００５０２２２０６４号に記載されており、その内容全体を参照により本明細書に援用する。

【０８２６】

一実施形態において、ポリヌクレオチド医薬組成物は、限定するものではないが、ＤｉＬａ２リポソーム（Ｍａｒｉｎａ　Ｂｉｏｔｅｃｈ（Ｂｏｔｈｅｌｌ，ＷＡ））、ＳＭＡＲＴＩＣＬＥＳ（登録商標）（Ｍａｒｉｎａ　Ｂｉｏｔｅｃｈ（Ｂｏｔｈｅｌｌ，ＷＡ））、中性ＤＯＰＣ（１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン）系リポソーム（例えば、卵巣癌のためのｓｉＲＮＡ送達（Ｌａｎｄｅｎ　ｅｔ　ａｌ．Ｃａｎｃｅｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ＆Ｔｈｅｒａｐｙ　２００６　５（１２）１７０８－１７１３）、その全体を参照により本明細書に援用する）及びヒアルロナン被覆リポソーム（Ｑｕｉｅｔ　Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ（Ｉｓｒａｅｌ））などのリポソーム中に製剤化され得る。

【０８２７】

一実施形態において、ポリヌクレオチドは、米国特許出願公開第ＵＳ２０１２０６０２９３号（その全体を参照により本明細書に援用する）に記載されているような凍結乾燥ゲル相リポソーム組成物中に製剤化され得る。

【０８２８】

ナノ粒子製剤は、リン酸コンジュゲートを含み得る。リン酸コンジュゲートは、ｉｎ　ｖｉｖｏ循環時間を延長させ得、かつ／またはナノ粒子の標的化送達を増大させ得る。本開示で使用されるリン酸コンジュゲートは、国際出願第ＷＯ２０１３０３３４３８号または米国特許出願公開第ＵＳ２０１３０１９６９４８号（それぞれの内容全体を参照により本明細書に援用する）に記載されている方法によって作製することができる。非限定的な例として、リン酸コンジュゲートには、国際出願第ＷＯ２０１３０３３４３８号（その全体を参照により本明細書に援用する）に記載されている式のうちのいずれか１つの化合物を挙げることができる。

【０８２９】

ナノ粒子製剤は、ポリマーコンジュゲートを含み得る。ポリマーコンジュゲートは、水溶性コンジュゲートであり得る。ポリマーコンジュゲートは、米国特許出願公開第２０１３００５９３６０号（その内容全体を参照により本明細書に援用する）に記載されているような構造を有し得る。一態様において、本開示のポリヌクレオチドとのポリマーコンジュゲートは、米国特許出願公開第２０１３００７２７０９号（その全体を参照により本明細書に援用する）に記載されている方法及び／またはセグメント化ポリマー試薬を使用して作製することができる。別の態様において、ポリマーコンジュゲートは、限定するものではないが、米国特許出願公開第ＵＳ２０１３０１９６９４８号（その内容全体を参照により本明細書に援用する）に記載されているポリマーコンジュゲートなどのように、環部分を含むペンダント側鎖基を有し得る。

【０８３０】

ナノ粒子製剤は、対象における本開示のナノ粒子の送達を向上させるコンジュゲートを含み得る。更に、コンジュゲートは、対象におけるナノ粒子の食作用クリアランスを抑制し得る。一態様において、コンジュゲートは、ヒト膜タンパク質ＣＤ４７から設計された「自己」ペプチド（例えば、Ｒｏｄｒｉｇｕｅｚら（Ｓｃｉｅｎｃｅ　２０１３，３３９，９７１－９７５、その全体を参照により本明細書に援用する）によって記載された「自己」粒子）であり得る。Ｒｏｄｒｉｇｕｅｚらによって示されたように、自己ペプチドは、マクロファージが媒介するナノ粒子のクリアランスを遅延させ、ナノ粒子の送達を向上させた。別の態様において、コンジュゲートは、膜タンパク質ＣＤ４７であってもよい（例えば、Ｒｏｄｒｉｇｕｅｚ　ｅｔ　ａｌ．Ｓｃｉｅｎｃｅ　２０１３，３３９，９７１－９７５参照、その全体を参照により本明細書に援用する）。Ｒｏｄｒｉｇｕｅｚらは、ＣＤ４７が、「自己」ペプチドと同様に、スクランブルペプチド及びＰＥＧ被覆ナノ粒子と比較して、対象における循環粒子の比率を増大させ得ることを示した。

【０８３１】

一実施形態において、本開示のポリヌクレオチドは、対象における本開示のナノ粒子の送

達を向上させるコンジュゲートを含むナノ粒子中に製剤化される。コンジュゲートは、ＣＤ４７膜であってもよいし、コンジュゲートは、先に記載された「自己」ペプチドなどの、ＣＤ４７膜タンパク質に由来するものであってもよい。別の態様において、ナノ粒子は、ＰＥＧと、ＣＤ４７のコンジュゲートまたはその誘導体とを含み得る。更に別の実施形態において、ナノ粒子は、上述の「自己」ペプチドと、膜タンパク質ＣＤ４７の両方を含んでもよい。

【０８３２】

別の態様において、「自己」ペプチド及び／またはＣＤ４７タンパク質は、本開示のポリヌクレオチドの送達のために、本明細書に記載されているようなウイルス様粒子または偽ビリオンにコンジュゲートされ得る。

【０８３３】

別の実施形態において、医薬組成物は、本開示のポリヌクレオチドと、分解可能な結合を有し得るコンジュゲートとを含む。コンジュゲートの非限定的な例には、イオン性水素原子を含む芳香族部分、スペーサー部分及び水溶性ポリマーが挙げられる。非限定的な例として、分解可能な結合を有するコンジュゲートを含む医薬組成物及び当該医薬組成物を送達するための方法は、米国特許出願公開第ＵＳ２０１３０１８４４４３号に記載されており、その内容全体を参照により本明細書に援用する。

【０８３４】

ナノ粒子製剤は、炭水化物担体と、ポリヌクレオチドとを含む、炭水化物ナノ粒子であり得る。非限定的な例として、炭水化物担体には、無水物変性フィトグリコーゲンまたはグリコーゲン型物質、オクテニルコハク酸フィトグリコーゲン、フィトグリコーゲンβ－デキストリン、無水物変性フィトグリコーゲンβ－デキストリンを挙げることができるが、これらに限定されない（例えば、国際公開第ＷＯ２０１２１０９１２１参照、その内容全体を参照により本明細書に援用する）。

【０８３５】

本開示のナノ粒子製剤は、粒子の送達を改善するために、界面活性剤またはポリマーで被覆されてもよい。一実施形態において、ナノ粒子は、限定するものではないが、ＰＥＧコーティング及び／または中性の表面電荷を有するコーティングなどの親水性コーティングで被覆され得る。親水性コーティングは、限定するものではないが、ポリヌクレオチドなどの大きなペイロードを含むナノ粒子を中枢神経系内に送達するのに役立ち得る。非限定的な例として、親水性コーティングを含むナノ粒子及び当該ナノ粒子を作製する方法は、米国特許出願公開第ＵＳ２０１３０１８３２４４号に記載されており、その内容全体を参照により本明細書に援用する。

【０８３６】

一実施形態において、本開示の脂質ナノ粒子は、親水性ポリマー粒子であり得る。親水性ポリマー粒子及び親水性ポリマー粒子の作製方法の非限定的な例は、米国特許出願公開第ＵＳ２０１３０２１０９９１号に記載されており、その内容全体を参照により本明細書に援用する。

【０８３７】

別の実施形態において、本開示の脂質ナノ粒子は、疎水性ポリマー粒子であり得る。

【０８３８】

脂質ナノ粒子製剤は、カチオン性脂質を、迅速に排除される脂質ナノ粒子（ｒｅＬＮＰ）として知られる生分解性カチオン性脂質に置き換えることによって改善され得る。限定するものではないが、ＤＬｉｎＤＭＡ、ＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡ及びＤＬｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡなどのイオン性カチオン性脂質は、時間の経過とともに血漿中及び組織中に蓄積することがわかっており、潜在的な毒性原になり得る。迅速に排除される脂質の迅速な代謝により、ラットにおける脂質ナノ粒子の忍容性及び治療指数が１ｍｇ／ｋｇの用量から１０ｍｇ／ｋｇの用量の大きさで改善し得る。酵素的に分解されるエステル結合を含めると、ｒｅＬＮＰ製剤の活性を維持したまま、カチオン性構成成分の分解及び代謝プロファイルが改善し得る。エステル結合は、脂質鎖中に内在してもよいし、脂質鎖末端の終端に位

置してもよい。内部エステル結合は、脂質鎖中の任意の炭素を置き換えてもよい。
【０８３９】
一実施形態において、内部エステル結合は、飽和炭素のいずれの側に位置してもよい。
【０８４０】
脂質ナノ粒子は、脂質ナノ粒子が粘膜バリアを通過するように粒子の表面特性を操作して変更してもよい。粘液は、限定するものではないが、口腔（例えば、頬及び食道の膜ならびに扁桃腺組織）、眼、消化管（例えば、胃、小腸、大腸、結腸、直腸）、鼻、呼吸器（例えば、鼻、咽頭、気管及び気管支の膜）、生殖器（例えば、膣、子宮頸部及び尿道の膜）などの粘膜組織に位置する。１０～２００ｎｍよりも大きいナノ粒子は、薬物封入効率が高いことから使用され得るが、幅広い薬物の持続的送達をもたらす能力は、粘膜バリアを通過して迅速に拡散するには大きすぎると考えられている。粘液は、連続的に、分泌され、排出され、廃棄または消化され、再利用されるので、捕捉された粒子の大部分は、数秒内または数時間内に粘膜組織から除去され得る。低分子量ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）で高密度に被覆された大きなポリマーナノ粒子（直径２００ｎｍ～５００ｎｍ）は、水中で拡散する同粒子と比較してわずか１／４～１／６で粘液中に拡散した（Ｌａｉ ｅｔ ａｌ．ＰＮＡＳ ２００７ １０４（５）：１４８２－４８７；Ｌａｉ ｅｔ ａｌ．Ａｄｖ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖ Ｒｅｖ．２００９ ６１（２）：１５８－１７１、それぞれの全体を参照により本明細書に援用する）。ナノ粒子の輸送は、透過速度ならびに／または蛍光顕微鏡法、例えば、限定するものではないが、光褪色後蛍光回復法（ＦＲＡＰ）及び高解像多重粒子追跡法（ＭＰＴ）を使用して決定することができる。非限定的な例として、粘膜バリアを通過することができる組成物は、米国特許第８，２４１，６７０号または国際特許公開第ＷＯ２０１３１１００２８号（それぞれの内容全体を参照により本明細書に援用する）に記載されているように作製することができる。
【０８４１】
粘液を通過するように操作された脂質ナノ粒子は、ポリマー材料（すなわち、ポリマーコア）及び／またはポリマー－ビタミンコンジュゲート及び／またはトリブロックコポリマーを含み得る。ポリマー材料には、ポリアミン、ポリエーテル、ポリアミド、ポリエステル、ポリカルバメート、ポリ尿素、ポリカーボネート、ポリ（スチレン）、ポリイミド、ポリスルホン、ポリウレタン、ポリアセチレン、ポリエチレン、ポリエチレンイミン、ポリイソシアネート、ポリアクリレート、ポリメタクリレート、ポリアクリロニトリル及びポリアリレートが含まれ得るが、これらに限定されない。ポリマー材料は、生分解性及び／または生体適合性であり得る。生体適合性ポリマーの非限定的な例は、国際特許公開第ＷＯ２０１３１１６８０４号に記載されており、その内容全体を参照により本明細書に援用する。ポリマー材料は、更に、照射されてもよい。非限定的な例として、ポリマー材料は、ガンマ照射され得る（例えば、国際出願第ＷＯ２０１２８２１６５号参照、その全体を参照により本明細書に援用する）。具体的なポリマーの非限定的な例には、ポリ（カプロラクトン）（ＰＣＬ）、エチレンビニルアセテートポリマー（ＥＶＡ）、ポリ（乳酸）（ＰＬＡ）、ポリ（Ｌ－乳酸）（ＰＬＬＡ）、ポリ（グリコール酸）（ＰＧＡ）、ポリ（乳酸－ｃｏ－グリコール酸）（ＰＬＧＡ）、ポリ（Ｌ－乳酸－ｃｏ－グリコール酸）（ＰＬＬＧＡ）、ポリ（Ｄ，Ｌ－ラクチド）（ＰＤＬＡ）、ポリ（Ｌ－ラクチド）（ＰＬＬＡ）、ポリ（Ｄ，Ｌ－ラクチド－ｃｏ－カプロラクトン）、ポリ（Ｄ，Ｌ－ラクチド－ｃｏ－カプロラクトン－ｃｏ－グリコリド）、ポリ（Ｄ，Ｌ－ラクチド－ｃｏ－ＰＥＯ－ｃｏ－Ｄ，Ｌ－ラクチド）、ポリ（Ｄ，Ｌ－ラクチド－ｃｏ－ＰＰＯ－ｃｏ－Ｄ，Ｌ－ラクチド）、ポリアルキルシアノアクラレート、ポリウレタン、ポリ－Ｌ－リシン（ＰＬＬ）、ヒドロキシプロピルメタクリレート（ＨＰＭＡ）、ポリエチレングリコール、ポリ－Ｌ－グルタミン酸、ポリ（ヒドロキシ酸）、ポリ無水物、ポリオルトエステル、ポリ（エステルアミド）、ポリアミド、ポリ（エステルエーテル）、ポリカーボネート、ポリアルキレン、例えば、ポリエチレン及びポリプロピレン、ポリアルキレングリコール、例えば、ポリ（エチレングリコール）（ＰＥＧ）、ポリアルキレンオキシド（ＰＥＯ）、ポリアルキレンテレフタレート、例えば、ポリ（エチレンテレフタレート）、ポリビニルアルコール

（ＰＶＡ）、ポリビニルエーテル、ポリビニルエステル、例えば、ポリ（ビニルアセテート）、ポリビニルハライド、例えば、ポリ（ビニルクロリド）（ＰＶＣ）、ポリビニルピロリドン、ポリシロキサン、ポリスチレン（ＰＳ）、ポリウレタン、誘導体化セルロース、例えば、アルキルセルロース、ヒドロキシアルキルセルロース、セルロースエーテル、セルロースエステル、ニトロセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、カルボキシメチルセルロース、アクリル酸のポリマー、例えば、ポリ（メチル（メタ）アクリレート）（ＰＭＭＡ）、ポリ（エチル（メタ）アクリレート）、ポリ（ブチル（メタ）アクリレート）、ポリ（イソブチル（メタ）アクリレート）、ポリ（ヘキシル（メタ）アクリレート）、ポリ（イソデシル（メタ）アクリレート）、ポリ（ラウリル（メタ）アクリレート）、ポリ（フェニル（メタ）アクリレート）、ポリ（メチルアクリレート）、ポリ（イソプロピルアクリレート）、ポリ（イソブチルアクリレート）、ポリ（オクタデシルアクリレート）及びこれらのコポリマー及び混合物、ポリジオキサノン及びそのコポリマー、ポリヒドロキシアルカノエート、ポリプロピレンフマレート、ポリオキシメチレン、ポロキサマー、ポリ（オルト）エステル、ポリ（酪酸）、ポリ（吉草酸）、ポリ（ラクチド－ｃｏ－カプロラクトン）、ＰＥＧ－ＰＬＧＡ－ＰＥＧ、トリメチレンカーボネート、ポリビニルピロリドンが挙げられる。脂質ナノ粒子は、限定するものではないが、ブロックコポリマー（国際公開第ＷＯ２０１３０１２４７６号（その全体を参照により本明細書に援用する）に記載されている分岐ポリエーテル－ポリアミドブロックコポリマーなど）及び（ポリ（エチレングリコール））－（ポリ（プロピレンオキシド））－（ポリ（エチレングリコール））トリブロックコポリマー（例えば、米国特許出願公開第２０１２０１２１７１８号、米国特許出願公開第２０１００００３３３７号及び米国特許第８，２６３，６６５号参照、それぞれの全体を参照により本明細書に援用する）などのコポリマーで被覆され得、またはこれらと会合し得る。コポリマーは、ＧＲＡＳ（一般に安全と認められる）ポリマーであってよく、脂質ナノ粒子の形成は、新規の化学実体が生じないような方法で作製され得る。例えば、脂質ナノ粒子は、新規の化学実体を形成することなく、依然としてヒト粘液を迅速に通過することができる、ポロキサマー被覆ＰＬＧＡナノ粒子を含み得る（Ｙａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．Ａｎｇｅｗ．Ｃｈｅｍ．Ｉｎｔ．Ｅｄ．２０１１　５０：２５９７－２６００、その内容全体を参照により本明細書に援用する）。ヒト粘液を通過することができるナノ粒子を生成するための非限定的な拡張可能な方法は、Ｘｕらによって記載されている（例えば、Ｊ　Ｃｏｎｔｒｏｌ　Ｒｅｌｅａｓｅ　２０１３，１７０（２）：２７９－８６参照、その内容全体を参照により本明細書に援用する）。

【０８４２】

ポリマー－ビタミンコンジュゲートのビタミンは、ビタミンＥであり得る。コンジュゲートのビタミン部分は、限定するものではないが、ビタミンＡ、ビタミンＥ、他のビタミン、コレステロール、疎水性部分または他の界面活性剤の疎水性構成成分（例えば、ステロール鎖、脂肪酸、炭化水素鎖及びアルキレンオキシド鎖）などの他の好適な構成成分で置換されてもよい。

【０８４３】

粘液を通過するように操作された脂質ナノ粒子は、限定するものではないが、ポリヌクレオチド、アニオン性タンパク質（例えば、ウシ血清アルブミン）、界面活性剤（例えば、例えばジメチルジオクタデシル－臭化アンモニウムなどのカチオン性界面活性剤）、糖または糖誘導体（例えば、シクロデキストリン）、核酸、ポリマー（例えば、ヘパリン、ポリエチレングリコール及びポロキサマー）、粘液溶解剤（例えば、Ｎ－アセチルシステイン、ヨモギ、ブロメライン、パパイン、クレロデンドルム、アセチルシステイン、ブロムヘキシン、カルボシステイン、エプラジノン、メスナ、アンブロキソール、ソブレロール、ドミオドール、レトステイン、ステプロニン、チオプロニン、ゲルゾリン、チモシンβ４ドルナーゼアルファ、ネルテネキシン、エルドステイン）及びｒｈＤＮａｓｅを含む各種ＤＮａｓｅなどの表面改質剤を含み得る。表面改質剤は、粒子表面に埋め込むか、粒子表面にからませてもよいし、脂質ナノ粒子の表面上に配置してもよい（例えば、コーティング、吸着、共有結合または他のプロセスによって）（例えば、米国特許出願公開第２０

１００２１５５８０号及び米国特許出願公開第２００８０１６６４１４号及び同第ＵＳ２０１３０１６４３４３号参照、それぞれの内容全体を参照により本明細書に援用する）。

【０８４４】

一実施形態において、粘液を通過する脂質ナノ粒子は、本明細書に記載される少なくとも１つのポリヌクレオチドを含み得る。ポリヌクレオチドは、脂質ナノ粒子中に封入され得、かつ／または粒子の表面上に配置され得る。ポリヌクレオチドは、脂質ナノ粒子に共有結合的に結合され得る。粘液を通過する脂質ナノ粒子製剤は、複数のナノ粒子を含み得る。更に、製剤は、粘液と相互作用し、かつ周囲の粘液の構造特性及び／または付着性を粘膜付着を低減させるように変更して、粘液を通過する脂質ナノ粒子の粘膜組織への送達を増大させ得る、粒子を含有してもよい。

【０８４５】

別の実施形態において、粘液を通過する脂質ナノ粒子は、粘膜通過を向上させるコーティングを含む低張製剤であり得る。製剤は、送達される上皮に対して低張であり得る。低張製剤の非限定的な例は、国際特許公開第ＷＯ２０１３１１００２８号に認めることができ、その内容全体を参照により本明細書に援用する。

【０８４６】

一実施形態において、粘膜バリアを通過する送達を向上させるために、ポリヌクレオチド製剤は、低張液を含んでもよいし、低張液であってもよい。低張液は、限定するものではないが、粘液を通過する粒子などの粘液不活性粒子の膣上皮表面への到達可能速度を上げることがわかった（例えば、Ｅｎｓｉｇｎ ｅｔ ａｌ．Ｂｉｏｍａｔｅｒｉａｌｓ ２０１３ ３４（２８）：６９２２－９参照、その内容全体を参照により本明細書に援用する）。

【０８４７】

一実施形態において、ポリヌクレオチドは、限定するものではないが、Ｓｉｌｅｎｃｅ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ（Ｌｏｎｄｏｎ，Ｕｎｉｔｅｄ Ｋｉｎｇｄｏｍ）のＡＴＵＰＬＥＸ（商標）系、ＤＡＣＣ系、ＤＢＴＣ系及び他のｓｉＲＮＡリポプレックス技術、ＳＴＥＭＧＥＮＴ（登録商標）（Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ，ＭＡ）のＳＴＥＭＦＥＣＴ（商標）、ならびにポリエチレンイミン（ＰＥＩ）またはプロタミンベースの標的化及び非標的化核酸送達などのリポプレックスとして製剤化される（Ａｌｅｋｕ ｅｔ ａｌ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．２００８ ６８：９７８８－９７９８；Ｓｔｒｕｍｂｅｒｇ ｅｔ ａｌ．Ｉｎｔ Ｊ Ｃｌｉｎ Ｐｈａｒｍａｃｏｌ Ｔｈｅｒ ２０１２ ５０：７６－７８；Ｓａｎｔｅｌ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ ２００６ １３：１２２２－１２３４；Ｓａｎｔｅｌ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ ２００６ １３：１３６０－１３７０；Ｇｕｔｂｉｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｐｕｌｍ Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｔｈｅｒ．２０１０ ２３：３３４－３４４；Ｋａｕｆｍａｎｎ ｅｔ ａｌ．Ｍｉｃｒｏｖａｓｃ Ｒｅｓ ２０１０ ８０：２８６－２９３ Ｗｅｉｄｅ ｅｔ ａｌ．Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２００９ ３２：４９８－５０７；Ｗｅｉｄｅ ｅｔ ａｌ．Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２００８ ３１：１８０－１８８；Ｐａｓｃｏｌｏ Ｅｘｐｅｒｔ Ｏｐｉｎ．Ｂｉｏｌ．Ｔｈｅｒ．４：１２８５－１２９４；Ｆｏｔｉｎ－Ｍｌｅｃｚｅｋ ｅｔ ａｌ．，２０１１ Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．３４：１－１５；Ｓｏｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２００５，２３：７０９－７１７；Ｐｅｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ．２００７ ６；１０４：４０９５－４１００；ｄｅＦｏｕｇｅｒｏｌｌｅｓ Ｈｕｍ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．２００８ １９：１２５－１３２、これらの全ての全体を参照により本明細書に援用する）。

【０８４８】

一実施形態において、そのような製剤はまた、限定するものではないが、肝細胞、免疫細胞、腫瘍細胞、内皮細胞、抗原提示細胞及び白血球を含む様々な細胞種にｉｎ ｖｉｖｏで受動的または能動的に指向するように、構築または組成変更され得る（Ａｋｉｎｃ ｅｔ ａｌ．Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ．２０１０ １８：１３５７－１３６４；Ｓｏｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２００５ ２３：７０９－７１７；Ｊｕｄｇｅ ｅｔ

ａｌ．，Ｊ Ｃｌｉｎ Ｉｎｖｅｓｔ．２００９ １１９：６６１－６７３；Ｋａｕｆｍａｎｎ ｅｔ ａｌ．，Ｍｉｃｒｏｖａｓｃ Ｒｅｓ ２０１０ ８０：２８６－２９３；Ｓａｎｔｅｌ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ ２００６ １３：１２２２－１２３４；Ｓａｎｔｅｌ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ ２００６ １３：１３６０－１３７０；Ｇｕｔｂｉｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｐｕｌｍ Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｔｈｅｒ．２０１０ ２３：３３４－３４４；Ｂａｓｈａ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒ．２０１１ １９：２１８６－２２００；Ｆｅｎｓｋｅ ａｎｄ Ｃｕｌｌｉｓ，Ｅｘｐｅｒｔ Ｏｐｉｎ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖ．２００８ ５：２５－４４；Ｐｅｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ．２００８ ３１９：６２７－６３０；Ｐｅｅｒ ａｎｄ Ｌｉｅｂｅｒｍａｎ，Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．２０１１ １８：１１２７－１１３３、これらの全ての全体を参照により本明細書に援用する）。製剤の肝細胞への受動的標的化の一例には、アポリポタンパク質Ｅに結合し、ｉｎ ｖｉｖｏで当該製剤の肝細胞への結合及び取り込みを促進することが示されている、ＤＬｉｎ－ＤＭＡ、ＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡ及びＤＬｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡ系脂質ナノ粒子製剤が挙げられる（Ａｋｉｎｃ ｅｔ ａｌ．Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ．２０１０ １８：１３５７－１３６４、その全体を参照により本明細書に援用する）。製剤はまた、限定するものではないが、葉酸、トランスフェリン、Ｎ－アセチルガラクトサミン（ＧａｌＮＡｃ）及び抗体標的化アプローチによって例示されるように、その表面上に異なるリガンドを発現させることによって選択的に標的化され得る（Ｋｏｌｈａｔｋａｒ ｅｔ ａｌ．，Ｃｕｒｒ Ｄｒｕｇ Ｄｉｓｃｏｖ Ｔｅｃｈｎｏｌ．２０１１ ８：１９７－２０６；Ｍｕｓａｃｃｈｉｏ ａｎｄ Ｔｏｒｃｈｉｌｉｎ，Ｆｒｏｎｔ Ｂｉｏｓｃｉ．２０１１ １６：１３８８－１４１２；Ｙｕ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｍｅｍｂｒ Ｂｉｏｌ．２０１０ ２７：２８６－２９８；Ｐａｔｉｌ ｅｔ ａｌ．，Ｃｒｉｔ Ｒｅｖ Ｔｈｅｒ Ｄｒｕｇ Ｃａｒｒｉｅｒ Ｓｙｓｔ．２００８ ２５：１－６１；Ｂｅｎｏｉｔ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｍａｃｒｏｍｏｌｅｃｕｌｅｓ．２０１１ １２：２７０８－２７１４；Ｚｈａｏ ｅｔ ａｌ．，Ｅｘｐｅｒｔ Ｏｐｉｎ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖ．２００８ ５：３０９－３１９；Ａｋｉｎｃ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ．２０１０ １８：１３５７－１３６４；Ｓｒｉｎｉｖａｓａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ．２０１２ ８２０：１０５－１１６；Ｂｅｎ－Ａｒｉｅ ｅｔ ａｌ．，Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ．２０１２ ７５７：４９７－５０７；Ｐｅｅｒ ２０１０ Ｊ Ｃｏｎｔｒｏｌ Ｒｅｌｅａｓｅ．２０：６３－６８；Ｐｅｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ．２００７ １０４：４０９５－４１００；Ｋｉｍ ｅｔ ａｌ．，Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ．２０１１ ７２１：３３９－３５３；Ｓｕｂｒａｍａｎｙａ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ．２０１０ １８：２０２８－２０３７；Ｓｏｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２００５ ２３：７０９－７１７；Ｐｅｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ．２００８ ３１９：６２７－６３０；Ｐｅｅｒ ａｎｄ Ｌｉｅｂｅｒｍａｎ，Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．２０１１ １８：１１２７－１１３３、これらの全ての全体を参照により本明細書に援用する）。

【０８４９】

一実施形態において、ポリヌクレオチドは、固形脂質ナノ粒子として製剤化される。固形脂質ナノ粒子（ＳＬＮ）は、平均直径が１０～１０００ｎｍの球形であり得る。ＳＬＮは、親油性分子を可溶化することができ、かつ界面活性剤及び／または乳化剤で安定化し得る固形脂質コアマトリックスを有する。更なる実施形態において、脂質ナノ粒子は、自己組織化脂質ポリマーナノ粒子であり得る（Ｚｈａｎｇ ｅｔ ａｌ．，ＡＣＳ Ｎａｎｏ，２００８，２（８），ｐｐ １６９６－１７０２参照、その内容全体を参照により本明細書に援用する）。非限定的な例として、ＳＬＮは、国際特許公開第ＷＯ２０１３１０５１０１号（その内容全体を参照により本明細書に援用する）に記載されているＳＬＮであってもよい。別の非限定的な例として、ＳＬＮは、国際特許公開第ＷＯ２０１３１０５１０１号（その内容全体を参照により本明細書に援用する）に記載されている方法またはプロセスによって作製することができる。

【０８５０】

リポソーム、リポプレックスまたは脂質ナノ粒子を使用して、ポリヌクレオチドが目的とするタンパク質生産の効率を改善することができる。それは、これらの製剤が、ポリヌクレオチドによる細胞トランスフェクションを増加させ、かつ／またはコードタンパク質の翻訳を増加させることができるからである。かかる例の１つには、脂質封入を使用してポリプレックスプラスミドＤＮＡの効果的な全身送達を可能にすることがある（Ｈｅｙｅｓ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ．２００７ １５：７１３－７２０、その全体を参照により本明細書に援用する）。リポソーム、リポプレックスまたは脂質ナノ粒子はまた、ポリヌクレオチドの安定性を増大させるために使用することができる。

【０８５１】

一実施形態において、本開示のポリヌクレオチドは、制御放出及び／または標的化送達用に製剤化することができる。本明細書で使用されるとき、「制御放出」は、治療効果を達成する特定の放出パターンに一致する、医薬組成物または化合物の放出プロファイルを指す。一実施形態において、ポリヌクレオチドは、制御放出及び／または標的化送達のために、本明細書に記載され、かつ／または当該技術分野において知られている送達剤中に、封入され得る。本明細書で使用されるとき、「封入する」という用語は、閉じ込められること、取り囲むこと、または包み込むことを意味する。本開示の化合物の製剤に関するとき、封入は、実質的なものであっても、完全なものであっても、部分的なものであってもよい。「実質的に封入された」という用語は、本開示の医薬組成物または化合物の少なくとも５０、６０、７０、８０、８５、９０、９５、９６、９７、９８、９９、９９．９、９９．９超または９９．９９９％超が送達剤内に閉じ込められ、取り囲まれ、または包み込まれ得ることを意味する。「部分的な封入」は、本開示の医薬組成物または化合物の１０未満、１０、２０、３０、４０、５０以下が送達剤内に閉じ込められ、取り囲まれ、または包み込まれ得ることを意味する。有利には、封入は、蛍光及び／または電子顕微鏡写真を使用して本開示の医薬組成物または化合物の漏出または活性を測定することによって決定することができる。例えば、本開示の医薬組成物または化合物の少なくとも１、５、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、８５、９０、９５、９６、９７、９８、９９、９９．９、９９．９９または９９．９９％超が送達剤中に封入される。

【０８５２】

一実施形態において、制御放出製剤は、限定するものではないが、トリブロックコポリマーを含み得る。非限定的な例として、製剤は、２つの異なる種類のトリブロックコポリマーを含み得る（国際公開第ＷＯ２０１２１３１１０４号及び同第ＷＯ２０１２１３１１０６号、それぞれの内容全体を参照により本明細書に援用する）。

【０８５３】

別の実施形態において、ポリヌクレオチドは、脂質ナノ粒子中または迅速に排除される脂質ナノ粒子中に封入することができ、次いで、この脂質ナノ粒子または迅速に排除される脂質ナノ粒子は、本明細書に記載され、かつ／または当該技術分野において知られているポリマー、ヒドロゲル及び／または外科用シーラント内に封入され得る。非限定的な例として、ポリマー、ヒドロゲルまたは外科用シーラントは、ＰＬＧＡ、エチレンビニルアセテート（ＥＶＡｃ）、ポロキサマー、ＧＥＬＳＩＴＥ（登録商標）（Ｎａｎｏｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ，Ｉｎｃ．（Ａｌａｃｈｕａ，ＦＬ））、ＨＹＬＥＮＥＸ（登録商標）（Ｈａｌｏｚｙｍｅ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ（Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ ＣＡ））、フィブリノゲンポリマー（Ｅｔｈｉｃｏｎ Ｉｎｃ．（Ｃｏｒｎｅｌｉａ，ＧＡ））、ＴＩＳＳＥＬＬ（登録商標）（Ｂａｘｔｅｒ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ，Ｉｎｃ．（Ｄｅｅｒｆｉｅｌｄ，ＩＬ））、ＰＥＧ系シーラント及びＣＯＳＥＡＬ（登録商標）（Ｂａｘｔｅｒ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ，Ｉｎｃ．（Ｄｅｅｒｆｉｅｌｄ，ＩＬ））などの外科用シーラントであってよい。

【０８５４】

別の実施形態において、脂質ナノ粒子は、対象に注射されたときにゲルを形成し得る、当該技術分野において知られている任意のポリマー内に封入されてもよい。別の非限定的な例として、脂質ナノ粒子は、生分解性であり得るポリマーマトリックス内に封入されても

よい。

【０８５５】

一実施形態において、制御放出及び／または標的化送達のためのポリヌクレオチド製剤はまた、少なくとも１つの制御放出コーティングを含み得る。制御放出コーティングには、ＯＰＡＤＲＹ（登録商標）、ポリビニルピロリドン／ビニルアセテートコポリマー、ポリビニルピロリドン、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ＥＵＤＲＡＧＩＴ　ＲＬ（登録商標）、ＥＵＤＲＡＧＩＴ　ＲＳ（登録商標）、及びエチルセルロース水性分散体（ＡＱＵＡＣＯＡＴ（登録商標）及びＳＵＲＥＬＥＡＳＥ（登録商標））などのセルロース誘導体が含まれるが、これらに限定されない。

【０８５６】

一実施形態において、ポリヌクレオチド制御放出及び／または標的化送達製剤は、ポリカチオン性側鎖を含有し得る少なくとも１つの分解性ポリエステルを含み得る。分解性ポリエステルには、ポリ（セリンエステル）、ポリ（Ｌ－ラクチド－ｃｏ－Ｌ－リシン）、ポリ（４－ヒドロキシ－Ｌ－プロリンエステル）及びこれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。別の実施形態において、分解性ポリエステルは、ＰＥＧ化ポリマーを形成するためのＰＥＧコンジュゲートを含み得る。

【０８５７】

一実施形態において、少なくとも１つのポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチド制御放出及び／または標的化送達製剤は、米国特許第８，４０４，２２２号（その全体を参照により本明細書に援用する）に記載されているようなＰＥＧ及び／またはＰＥＧ関連ポリマー誘導体を少なくとも１つ含み得る。

【０８５８】

別の実施形態において、少なくとも１つのポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチド制御放出送達製剤は、ＵＳ２０１３０１３０３４８（その全体を参照により本明細書に援用する）に記載されている制御放出ポリマー系であってよい。

【０８５９】

一実施形態において、本開示のポリヌクレオチドは、治療用ナノ粒子中に封入され得、これは、本明細書中、「治療用ナノ粒子ポリヌクレオチド」と称される。治療用ナノ粒子は、本明細書に記載される方法及び当該技術分野において知られている方法、例えば、限定するものではないが、国際公開第ＷＯ２０１０００５７４０号、同第ＷＯ２０１００３０７６３号、同第ＷＯ２０１０００５７２１号、同第ＷＯ２０１０００５７２３号、同第ＷＯ２０１２０５４９２３号、米国特許出願公開第ＵＳ２０１１０２６２４９１号、同第ＵＳ２０１００１０４６４５号、同第ＵＳ２０１０００８７３３７号、同第ＵＳ２０１０００６８２８５号、同第ＵＳ２０１１０２７４７５９号、同第ＵＳ２０１０００６８２８６号、同第ＵＳ２０１２０２８８５４１号、同第ＵＳ２０１３０１２３３５１号及び同第ＵＳ２０１３０２３０５６７号ならびに米国特許第８，２０６，７４７号、同第８，２９３，２７６号、同第８，３１８，２０８号及び同第８，３１８，２１１号（それぞれの内容全体を参照により本明細書に援用する）に記載されている方法によって製剤化され得る。別の実施形態において、治療用ポリマーナノ粒子は、米国特許出願公開第ＵＳ２０１２０１４０７９０号（その内容全体を参照により本明細書に援用する）に記載されている方法によって特定することができる。

【０８６０】

一実施形態において、治療用ナノ粒子ポリヌクレオチドは、持続放出用に製剤化され得る。本明細書で使用されるとき、「持続放出」は、特定の一定期間にわたって、ある放出速度に従う、医薬組成物または化合物を指す。一定期間には、時間、日、週、月及び年が含まれるが、これらに限定されない。非限定的な例として、持続放出性ナノ粒子は、ポリマーと、限定するものではないが、本開示のポリヌクレオチドなどの治療薬とを含み得る（国際公開第２０１００７５０７２号ならびに米国特許出願公開第ＵＳ２０１００２１６８０４号、同第ＵＳ２０１１０２１７３７７号及び同第ＵＳ２０１２０２０１８５９号参照

、そのそれぞれの全体を参照により本明細書に援用する）。別の非限定的な例において、持続放出性製剤は、限定するものではないが、結晶、巨大分子ゲル及び／または微粒子懸濁液などの、持続的なバイオアベイラビリティを可能にする作用物質を含み得る（米国特許出願公開第ＵＳ２０１３０１５０２９５号参照、その内容全体を参照により本明細書に援用する）。

【０８６１】

一実施形態において、治療用ナノ粒子ポリヌクレオチドは、標的特異的になるように製剤化され得る。非限定的な例として、治療用ナノ粒子は、コルチコステロイドを含み得る（国際公開第ＷＯ２０１１０８４５１８号参照、その全体を参照により本明細書に援用する）。非限定的な例として、治療用ナノ粒子は、国際公開第ＷＯ２００８１２１９４９号、同第ＷＯ２０１０００５７２６号、同第ＷＯ２０１０００５７２５号、同第ＷＯ２０１１０８４５２１号ならびに米国特許出願公開第ＵＳ２０１０００６９４２６号、同第ＵＳ２０１２０００４２９３号及び同第ＵＳ２０１００１０４６５５号（それぞれの全体を参照により本明細書に援用する）に記載されているナノ粒子中に製剤化され得る。

【０８６２】

一実施形態において、本開示のナノ粒子は、ポリマーマトリックスを含み得る。非限定的な例として、ナノ粒子は、限定するものではないが、ポリエチレン、ポリカーボネート、ポリ無水物、ポリヒドロキシ酸、ポリプロピルフマレート、ポリカプロラクトン、ポリアミド、ポリアセタール、ポリエーテル、ポリエステル、ポリ（オルトエステル）、ポリシアノアクリレート、ポリビニルアルコール、ポリウレタン、ポリホスファゼン、ポリアクリレート、ポリメタクリレート、ポリシアノアクリレート、ポリ尿素、ポリスチレン、ポリアミン、ポリリシン、ポリ（エチレンイミン）、ポリ（セリンエステル）、ポリ（Ｌ－ラクチド－ｃｏ－Ｌ－リシン）、ポリ（４－ヒドロキシ－Ｌ－プロリンエステル）またはこれらの組み合わせなどの２つ以上のポリマーを含み得る。

【０８６３】

一実施形態において、治療用ナノ粒子は、ジブロックコポリマーを含む。一実施形態において、ジブロックコポリマーは、ＰＥＧを、限定するものではないが、ポリエチレン、ポリカーボネート、ポリ無水物、ポリヒドロキシ酸、ポリプロピルフマレート、ポリカプロラクトン、ポリアミド、ポリアセタール、ポリエーテル、ポリエステル、ポリ（オルトエステル）、ポリシアノアクリレート、ポリビニルアルコール、ポリウレタン、ポリホスファゼン、ポリアクリレート、ポリメタクリレート、ポリシアノアクリレート、ポリ尿素、ポリスチレン、ポリアミン、ポリリシン、ポリ（エチレンイミン）、ポリ（セリンエステル）、ポリ（Ｌ－ラクチド－ｃｏ－Ｌ－リシン）、ポリ（４－ヒドロキシ－Ｌ－プロリンエステル）またはこれらの組み合わせなどのポリマーとの組み合わせで含み得る。別の実施形態において、ジブロックコポリマーは、欧州特許出願公開（その内容全体を参照により本明細書に援用する）に記載されているジブロックコポリマーを含み得る。更に別の実施形態において、ジブロックコポリマーは、国際特許公開第ＷＯ２０１３１２００５２号（その内容全体を参照により本明細書に援用する）に記載されているものなどの高Ｘジブロックコポリマーであり得る。

【０８６４】

非限定的な例として、治療用ナノ粒子は、ＰＬＧＡ－ＰＥＧブロックコポリマーを含む（米国特許出願公開第ＵＳ２０１２０００４２９３号及び米国特許第８，２３６，３３０号参照、それぞれの全体を参照により本明細書に援用する）。別の非限定的な例において、治療用ナノ粒子は、ＰＥＧ及びＰＬＡまたはＰＥＧ及びＰＬＧＡのジブロックコポリマーを含むステルスナノ粒子である（米国特許第８，２４６，９６８号及び国際公開第ＷＯ２０１２１６６９２３号参照、それぞれの内容全体を参照により本明細書に援用する）。更に別の非限定的な例において、治療用ナノ粒子は、米国特許出願公開第ＵＳ２０１３０１７２４０６号（その内容全体を参照により本明細書に援用する）に記載されているようなステルスナノ粒子または標的特異型ステルスナノ粒子である。

【０８６５】

一実施形態において、治療用ナノ粒子は、マルチブロックコポリマーを含み得る（例えば、米国特許第８，２６３，６６５号及び同第８，２８７，９１０号ならびに米国特許出願公開第ＵＳ２０１３０１９５９８７号参照、それぞれの内容全体を参照により本明細書に援用する）。

【０８６６】

更に別の非限定的な例において、脂質ナノ粒子は、ブロックコポリマーＰＥＧ－ＰＬＧＡ－ＰＥＧを含む（例えば、感熱性ヒドロゲル（ＰＥＧ－ＰＬＧＡ－ＰＥＧ）は、Ｌｅｅ ｅｔ ａｌ．Ｔｈｅｒｍｏｓｅｎｓｉｔｉｖｅ Ｈｙｄｒｏｇｅｌ ａｓ ａ Ｔｇｆ－β１ Ｇｅｎｅ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ Ｖｅｈｉｃｌｅ Ｅｎｈａｎｃｅｓ Ｄｉａｂｅｔｉｃ Ｗｏｕｎｄ Ｈｅａｌｉｎｇ．Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，２００３ ２０（１２）：１９９５－２０００においてＴＧＦ－β１遺伝子の送達ビヒクルとして使用され、Ｌｉ ｅｔ ａｌ．Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ Ｇｅｎｅ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ Ｓｙｓｔｅｍ Ｂａｓｅｄ ｏｎ Ｔｈｅｒｍｏｓｅｎｓｉｔｉｖｅ Ｂｉｏｄｅｇｒａｄａｂｌｅ Ｈｙｄｒｏｇｅｌ．Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ２００３ ２０（６）：８８４－８８８、及び Ｃｈａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｎｏｎ－ｉｏｎｉｃ ａｍｐｈｉｐｈｉｌｉｃ ｂｉｏｄｅｇｒａｄａｂｌｅ ＰＥＧ－ＰＬＧＡ－ＰＥＧ ｃｏｐｏｌｙｍｅｒ ｅｎｈａｎｃｅｓ ｇｅｎｅ ｄｅｌｉｖｅｒｙ ｅｆｆｉｃｉｅｎｃｙ ｉｎ ｒａｔ ｓｋｅｌｅｔａｌ ｍｕｓｃｌｅ．Ｊ Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ Ｒｅｌｅａｓｅ．２００７ １１８：２４５－２５３において制御された遺伝子送達系として使用されたことを参照されたい、それぞれの全体を参照により本明細書に援用する）。本開示のポリヌクレオチドは、ＰＥＧ－ＰＬＧＡ－ＰＥＧブロックコポリマーを含む脂質ナノ粒子中に製剤化され得る。

【０８６７】

一実施形態において、治療用ナノ粒子は、マルチブロックコポリマーを含み得る（例えば、米国特許第８，２６３，６６５号及び同第８，２８７，９１０号ならびに米国特許出願公開第ＵＳ２０１３０１９５９８７号参照、それぞれの内容全体を参照により本明細書に援用する）。

【０８６８】

一実施形態において、本明細書に記載されるブロックコポリマーは、非ポリマーミセルとブロックコポリマーとを含むポリイオン複合体中に含まれていてもよい（例えば、米国特許出願公開第２０１２００７６８３６号参照、その全体を参照により本明細書に援用する）。

【０８６９】

一実施形態において、治療用ナノ粒子は、少なくとも１つのアクリルポリマーを含み得る。アクリルポリマーには、アクリル酸、メタクリル酸、アクリル酸とメタクリル酸のコポリマー、メチルメタクリレートコポリマー、エトキシエチルメタクリレート、シアノエチルメタクリレート、アミノアルキルメタクリレートコポリマー、ポリ（アクリル酸）、ポリ（メタクリル酸）、ポリシアノアクリレート及びこれらの組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。

【０８７０】

一実施形態において、治療用ナノ粒子は、少なくとも１つのポリ（ビニルエステル）ポリマーを含み得る。ポリ（ビニルエステル）ポリマーは、ランダムコポリマーなどのコポリマーであってよい。非限定的な例として、ランダムコポリマーは、国際出願第ＷＯ２０１３０３２８２９号または米国特許出願公開第ＵＳ２０１３０１２１９５４号（その内容全体を参照により本明細書に援用する））に記載されているものなどの構造を有し得る。一態様において、ポリ（ビニルエステル）ポリマーは、本明細書に記載されるポリヌクレオチドにコンジュゲートされ得る。別の態様において、本開示で使用することができるポリ（ビニルエステル）ポリマーは、記載されているものなどであってよい（その全体を参照により本明細書に援用する）。

【０８７１】

一実施形態において、治療用ナノ粒子は、少なくとも１つのジブロックコポリマーを含み得る。ジブロックコポリマーは、限定するものではないが、ポリ（乳）酸－ポリ（エチレン）グリコールコポリマーであってよい（例えば、国際特許公開第ＷＯ２０１３０４４２１９号参照、その全体を参照により本明細書に援用する）。

【０８７２】

一実施形態において、治療用ナノ粒子は、本明細書に記載され、かつまたは当該技術分野において知られている、少なくとも１つのカチオン性ポリマーを含み得る。

【０８７３】

一実施形態において、治療用ナノ粒子は、少なくとも１つのアミン含有ポリマー、限定するものではないが、ポリリシン、ポリエチレンイミン、ポリ（アミドアミン）デンドリマー、ポリ（β－アミノエステル）（例えば、米国特許第８，２８７，８４９号参照、その全体を参照により本明細書に援用する）及びこれらの組み合わせなどを含み得る。

【０８７４】

別の実施形態において、本明細書に記載されるナノ粒子は、国際特許出願ＷＯ２０１３０５９４９６号（その内容全体を参照により本明細書に援用する）に記載されているものなどのアミンカチオン性脂質を含み得る。一態様において、カチオン性脂質は、アミノ－アミンまたはアミノ－アミド部分を有し得る。

【０８７５】

一実施形態において、治療用ナノ粒子は、ポリカチオン性側鎖を含有し得る少なくとも１つの分解性ポリエステルを含み得る。分解性ポリエステルには、ポリ（セリンエステル）、ポリ（Ｌ－ラクチド－ｃｏ－Ｌ－リシン）、ポリ（４－ヒドロキシ－Ｌ－プロリンエステル）及びこれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。別の実施形態において、分解性ポリエステルは、ＰＥＧ化ポリマーを形成するためのＰＥＧコンジュゲートを含み得る。

【０８７６】

別の実施形態において、治療用ナノ粒子は、少なくとも１つの標的化リガンドのコンジュゲートを含み得る。標的化リガンドは、当該技術分野において知られている任意のリガンド、限定するものではないが、モノクローナル抗体などであってよい（Ｋｉｒｐｏｔｉｎ ｅｔ ａｌ，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．２００６ ６６：６７３２－６７４０、その全体を参照により本明細書に援用する）。

【０８７７】

一実施形態において、治療用ナノ粒子ポリヌクレオチド、例えば、少なくとも１つのポリヌクレオチドを含む治療用ナノ粒子は、米国特許第８，４０４，７９９号（その内容全体を参照により本明細書に援用する）においてＰｏｄｏｂｉｎｓｋｉらが記載した方法を使用して製剤化することができる。

【０８７８】

一実施形態において、ポリヌクレオチドは、合成ナノ担体中に封入され、当該担体に結合し、かつ／または当該担体と会合し得る。合成ナノ担体には、国際公開第ＷＯ２０１０００５７４０号、同第ＷＯ２０１００３０７６３号、同第ＷＯ２０１２１３５０１号、同第ＷＯ２０１２１４９２５２号、同第ＷＯ２０１２１４９２５５号、同第ＷＯ２０１２１４９２５９号、同第ＷＯ２０１２１４９２６５号、同第ＷＯ２０１２１４９２６８号、同第ＷＯ２０１２１４９２８２号、同第ＷＯ２０１２１４９３０１号、同第ＷＯ２０１２１４９３９３号、同第ＷＯ２０１２１４９４０５号、同第ＷＯ２０１２１４９４１１号、同第ＷＯ２０１２１４９４５４号及び同第ＷＯ２０１３０１９６６９号ならびに米国特許出願公開第ＵＳ２０１１０２６２４９１号、同第ＵＳ２０１００１０４６４５号、同第ＵＳ２０１０００８７３３７号及び同第ＵＳ２０１２０２４４２２２号（それぞれの全体を参照により本明細書に援用する）に記載のものが含まれるが、これらに限定されない。合成ナノ担体は、当該技術分野において知られている方法及び／または本明細書に記載される方法を使用して製剤化することができる。非限定的な例として、合成ナノ担体は、国際公開第ＷＯ２０１０００５７４０号、同第ＷＯ２０１００３０７６３号及び同第ＷＯ２０１２

１３５０１号ならびに米国特許出願公開第ＵＳ２０１１０２６２４９１号、同第ＵＳ２０１００１０４６４５号、同第ＵＳ２０１０００８７３３７号及び同第ＵＳ２０１２０２４４２２号（それぞれの全体を参照により本明細書に援用する）に記載されている方法によって製剤化することができる。別の実施形態において、合成ナノ担体製剤は、国際公開第ＷＯ２０１１０７２２１８号及び米国特許第８，２１１，４７３号（それぞれの内容全体を参照により本明細書に援用する）に記載されている方法によって凍結乾燥され得る。更に別の実施形態において、限定するものではないが、合成ナノ担体を含む本開示の製剤は、米国特許出願公開第ＵＳ２０１３０２３０５６８号（その内容全体を参照により本明細書に援用する）に記載されている方法によって凍結乾燥または再構成され得る。

【０８７９】

一実施形態において、合成ナノ担体は、本明細書に記載されるポリヌクレオチドを放出する反応基を含有し得る（国際公開第ＷＯ２０１２０９５２５５２号及び米国特許出願公開第ＵＳ２０１２０１７１２２９号参照、それぞれの全体を参照により本明細書に援用する）。

【０８８０】

一実施形態において、合成ナノ担体は、標的化放出用に製剤化され得る。一実施形態において、合成ナノ担体は、指定のｐＨで、かつ／または所望の時間間隔後にポリヌクレオチドを放出するように製剤化される。非限定的な例として、合成ナノ粒子は、ポリヌクレオチドを２４時間後、かつ／またはｐＨ４．５で放出するように製剤化され得る（国際公開第ＷＯ２０１０１３８１９３号及び同第ＷＯ２０１０１３８１９４号ならびに米国特許出願公開第ＵＳ２０１１００２０３８８号及び同第ＵＳ２０１１００２７２１７号参照、それぞれの全体を参照により本明細書に援用する）。

【０８８１】

一実施形態において、合成ナノ担体は、本明細書に記載されるポリヌクレオチドの制御放出及び／または持続放出用に製剤化され得る。非限定的な例として、持続放出用の合成ナノ担体は、当該技術分野において知られている方法、本明細書に記載される方法、ならびに／または国際公開第ＷＯ２０１０１３８１９２号及び米国特許出願公開第２０１００３０３８５０号（それぞれの全体を参照により本明細書に援用する）に記載されているような方法によって製剤化することができる。

【０８８２】

一実施形態において、ポリヌクレオチドは、制御放出及び／または持続放出用に製剤化され得、製剤は、結晶性側鎖（ＣＹＳＣ）ポリマーであるポリマーを少なくとも１つ含む。ＣＹＳＣポリマーは、米国特許第８，３９９，００７号に記載されており、その全体を参照により本明細書に援用する。

【０８８３】

一実施形態において、合成ナノ担体は、少なくとも１つのアジュバントをコードする少なくとも１つのポリヌクレオチドを含み得る。非限定的な例として、アジュバントは、ジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミド、ジメチルジオクタデシルアンモニウムクロリド、ジメチルジオクタデシルアンモニウムホスフェートまたはジメチルジオクタデシルアンモニウムアセテート（ＤＤＡ）、及びマイコバクテリウム総脂質抽出物の無極性分画または当該無極性分画の一部を含み得る（例えば、米国特許第８，２４１，６１０号参照、その全体を参照により本明細書に援用する）。別の実施形態において、合成ナノ担体は、少なくとも１つのポリヌクレオチドと、アジュバントとを含み得る。非限定的な例として、アジュバントを含む合成ナノ担体は、国際公開第ＷＯ２０１１１５０２４０号及び米国特許出願公開第ＵＳ２０１１０２９３７００号（それぞれの全体を参照により本明細書に援用する）に記載されている方法によって製剤化することができる。

【０８８４】

一実施形態において、合成ナノ担体は、ウイルス由来のペプチド、断片または領域をコードする少なくとも１つのポリヌクレオチドを封入し得る。非限定的な例として、合成ナノ担体には、国際公開第ＷＯ２０１２０２４６２１号、同第ＷＯ２０１２０２６２９号、同

第ＷＯ２０１２０２４６３２号ならびに米国特許出願公開第ＵＳ２０１２００６４１１０号、同第ＵＳ２０１２００５８１５３号及び同第ＵＳ２０１２００５８１５４号（それぞれの全体を参照により本明細書に援用する）に記載されているナノ担体を挙げることができるが、これらに限定されない。

【０８８５】

一実施形態において、合成ナノ担体は、体液性応答及び／または細胞傷害性Ｔリンパ球（ＣＴＬ）応答を誘起することが可能であり得るポリヌクレオチドに結合され得る（例えば、国際公開第ＷＯ２０１３０１９６６９号参照、その全体を参照により本明細書に援用する）。

【０８８６】

一実施形態において、ポリヌクレオチドは、双性イオン脂質中に封入され、当該脂質に結合し、かつ／または当該脂質と会合し得る。双性イオン脂質及び双性イオン脂質の使用方法の非限定的な例は、米国特許出願公開第ＵＳ２０１３０２１６６０７号に記載されており、その内容全体を参照により本明細書に援用する。一態様において、双性イオン脂質は、本明細書に記載されるリポソーム及び脂質ナノ粒子で使用することができる。

【０８８７】

一実施形態において、ポリヌクレオチドは、米国特許出願公開第ＵＳ２０１３０１９７１００号（その内容全体を参照により本明細書に援用する）に記載されているようなコロイドナノ担体中に製剤化され得る。

【０８８８】

一実施形態において、ナノ粒子は、経口投与用に最適化され得る。ナノ粒子は、限定するものではないが、キトサンまたはその誘導体などの少なくとも１つのカチオン性バイオポリマーを含み得る。非限定的な例として、ナノ粒子は、米国特許出願公開第２０１２０２８２３４３号（その全体を参照により本明細書に援用する）に記載されている方法によって製剤化することができる。

【０８８９】

いくつかの実施形態において、ＬＮＰは、脂質ＫＬ５２を含む（米国特許出願公開第２０１２／０２９５８３２号に開示されているアミノ脂質、その全体を参照により本明細書に明示的に援用する）。ＬＮＰ投与の活性及び／または安全性（ＡＬＴ／ＡＳＴ、白血球数及びサイトカイン誘導の１つ以上を調べることによって決定される）は、かかる脂質を組み込むことによって改善され得る。ＫＬ５２を含むＬＮＰは、静脈内及び／または１用量以上で投与され得る。いくつかの実施形態において、ＫＬ５２を含むＬＮＰの投与は、ＭＣ３を含むＬＮＰと比較して、同量または改善したｍＲＮＡ及び／またはタンパク質発現をもたらす。

【０８９０】

いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、更に小さなＬＮＰを使用して送達されてもよい。そのような粒子は、直径が０．１ｕｍ未満から最大１００ｎｍ、例えば、限定するものではないが、０．１ｕｍ未満、１．０ｕｍ未満、５ｕｍ未満、１０ｕｍ未満、１５ｕｍ未満、２０ｕｍ未満、２５ｕｍ未満、３０ｕｍ未満、３５ｕｍ未満、４０ｕｍ未満、５０ｕｍ未満、５５ｕｍ未満、６０ｕｍ未満、６５ｕｍ未満、７０ｕｍ未満、７５ｕｍ未満、８０ｕｍ未満、８５ｕｍ未満、９０ｕｍ未満、９５ｕｍ未満、１００ｕｍ未満、１２５ｕｍ未満、１５０ｕｍ未満、１７５ｕｍ未満、２００ｕｍ未満、２２５ｕｍ未満、２５０ｕｍ未満、２７５ｕｍ未満、３００ｕｍ未満、３２５ｕｍ未満、３５０ｕｍ未満、３７５ｕｍ未満、４００ｕｍ未満、４２５ｕｍ未満、４５０ｕｍ未満、４７５ｕｍ未満、５００ｕｍ未満、５２５ｕｍ未満、５５０ｕｍ未満、５７５ｕｍ未満、６００ｕｍ未満、６２５ｕｍ未満、６５０ｕｍ未満、６７５ｕｍ未満、７００ｕｍ未満、７２５ｕｍ未満、７５０ｕｍ未満、７７５ｕｍ未満、８００ｕｍ未満、８２５ｕｍ未満、８５０ｕｍ未満、８７５ｕｍ未満、９００ｕｍ未満、９２５ｕｍ未満、９５０ｕｍ未満または９７５ｕｍ未満であってよい。

【０８９１】

別の実施形態において、ポリヌクレオチドは、約１ｎｍ～約１００ｎｍ、約１ｎｍ～約１０ｎｍ、約１ｎｍ～約２０ｎｍ、約１ｎｍ～約３０ｎｍ、約１ｎｍ～約４０ｎｍ、約１ｎｍ～約５０ｎｍ、約１ｎｍ～約６０ｎｍ、約１ｎｍ～約７０ｎｍ、約１ｎｍ～約８０ｎｍ、約１ｎｍ～約９０ｎｍ、約５ｎｍ～約１００ｎｍ、約５ｎｍ～約１０ｎｍ、約５ｎｍ～約２０ｎｍ、約５ｎｍ～約３０ｎｍ、約５ｎｍ～約４０ｎｍ、約５ｎｍ～約５０ｎｍ、約５ｎｍ～約６０ｎｍ、約５ｎｍ～約７０ｎｍ、約５ｎｍ～約８０ｎｍ、約５ｎｍ～約９０ｎｍ、約１０～約５０ｎＭ、約２０～約５０ｎｍ、約３０～約５０ｎｍ、約４０～約５０ｎｍ、約２０～約６０ｎｍ、約３０～約６０ｎｍ、約４０～約６０ｎｍ、約２０～約７０ｎｍ、約３０～約７０ｎｍ、約４０～約７０ｎｍ、約５０～約７０ｎｍ、約６０～約７０ｎｍ、約２０～約８０ｎｍ、約３０～約８０ｎｍ、約４０～約８０ｎｍ、約５０～約８０ｎｍ、約６０～約８０ｎｍ、約２０～約９０ｎｍ、約３０～約９０ｎｍ、約４０～約９０ｎｍ、約５０～約９０ｎｍ、約６０～約９０ｎｍ及び／または約７０～約９０ｎｍの直径であり得る、更に小さなＬＮＰを使用して送達されてもよい。

【０８９２】

いくつかの実施形態において、そのようなＬＮＰは、マイクロ流体ミキサーを備える方法を使用して合成される。例示的なマイクロ流体ミキサーには、限定するものではないが、スリット型インターデジタルマイクロミキサーを挙げることができ、例えば、限定するものではないが、Ｍｉｃｒｏｉｎｎｏｖａ（Ａｌｌｅｒｈｅｉｌｉｇｅｎ ｂｅｉ Ｗｉｌｄｏｎ，Ａｕｓｔｒｉａ）製によるもの及び／またはジグザグヘリンボーンマイクロミキサー（ＳＨＭ）があり（Ｚｈｉｇａｌｔｓｅｖ，Ｉ．Ｖ．ｅｔ ａｌ．，Ｂｏｔｔｏｍ－ｕｐ ｄｅｓｉｇｎ ａｎｄ ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ ｏｆ ｌｉｍｉｔ ｓｉｚｅ ｌｉｐｉｄ ｎａｎｏｐａｒｔｉｃｌｅ ｓｙｓｔｅｍｓ ｗｉｔｈ ａｑｕｅｏｕｓ ａｎｄ ｔｒｉｇｌｙｃｅｒｉｄｅ ｃｏｒｅｓ ｕｓｉｎｇ ｍｉｌｌｉｓｅｃｏｎｄ ｍｉｃｒｏｆｌｕｉｄｉｃ ｍｉｘｉｎｇで公開されている（Ｌａｎｇｍｕｉｒ．２０１２．２８：３６３３－４０；Ｂｅｌｌｉｖｅａｕ，Ｎ．Ｍ．ｅｔ ａｌ．，Ｍｉｃｒｏｆｌｕｉｄｉｃ ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ ｏｆ ｈｉｇｈｌｙ ｐｏｔｅｎｔ ｌｉｍｉｔ－ｓｉｚｅ ｌｉｐｉｄ ｎａｎｏｐａｒｔｉｃｌｅｓ ｆｏｒ ｉｎ ｖｉｖｏ ｄｅｌｉｖｅｒｙ ｏｆ ｓｉＲＮＡ．Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｔｈｅｒａｐｙ－Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ．２０１２．１：ｅ３７；Ｃｈｅｎ，Ｄ．ｅｔ ａｌ．，Ｒａｐｉｄ ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ ｏｆ ｐｏｔｅｎｔ ｓｉＲＮＡ－ｃｏｎｔａｉｎｉｎｇ ｌｉｐｉｄ ｎａｎｏｐａｒｔｉｃｌｅｓ ｅｎａｂｌｅｄ ｂｙ ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ ｍｉｃｒｏｆｌｕｉｄｉｃ ｆｏｒｍｕｌａｔｉｏｎ．Ｊ Ａｍ Ｃｈｅｍ Ｓｏｃ．２０１２．１３４（１６）：６９４８－５１、それぞれの全体を参照により本明細書に援用する）。いくつかの実施形態において、ＳＨＭを備えるＬＮＰの生成方法は、少なくとも２つの投入流れの混合を更に含み、この混合は、微細構造誘導型カオス的移流（ＭＩＣＡ）によって生じる。この方法によれば、流体流れは、矢筈パターンで存在する流路を通って流れ、回転流を引き起こし、流体が互いに折り重なる。この方法はまた、流体が循環している間に表面が方向を変える、流体混合のための表面を含み得る。ＳＨＭを使用してＬＮＰを生成する方法には、米国特許出願公開第２００４／０２６２２２３号及び同第２０１２／０２７６２０９号（それぞれの全体を参照により本明細書に明示的に援用する）に開示されているものが含まれる。

【０８９３】

一実施形態において、本開示のポリヌクレオチドは、限定するものではないが、スリット型インターデジタル微細構造ミキサー（ＳＩＭＭ－Ｖ２）または標準スリット型インターデジタルマイクロミキサー（ＳＳＩＭＭ）またはキャタピラー（ＣＰＭＭ）またはジェット衝突（ＩＪＭＭ）（Ｉｎｓｔｉｔｕｔ ｆｕｒ Ｍｉｋｒｏｔｅｃｈｎｉｋ Ｍａｉｎｚ ＧｍｂＨ（Ｍａｉｎｚ Ｇｅｒｍａｎｙ）製）などのマイクロミキサーを使用して生成された脂質ナノ粒子中に製剤化され得る。

【０８９４】

一実施形態において、本開示のポリヌクレオチドは、マイクロ流体技術を使用して生成された脂質ナノ粒子中に製剤化され得る（Ｗｈｉｔｅｓｉｄｅｓ，Ｇｅｏｒｇｅ Ｍ．Ｔｈｅ

Ｏｒｉｇｉｎｓ ａｎｄ ｔｈｅ Ｆｕｔｕｒｅ ｏｆ Ｍｉｃｒｏｆｌｕｉｄｉｃｓ．Ｎａｔｕｒｅ，２００６ ４４２：３６８－３７３；及びＡｂｒａｈａｍ ｅｔ ａｌ．Ｃｈａｏｔｉｃ Ｍｉｘｅｒ ｆｏｒ Ｍｉｃｒｏｃｈａｎｎｅｌｓ．Ｓｃｉｅｎｃｅ，２００２ ２９５：６４７－６５１参照、それぞれの全体を参照により本明細書に援用する）。非限定的な例として、制御されたマイクロ流体製剤は、低レイノルズ数でマイクロ流路内の定常圧駆動流の流れを混合する受動的方法を伴う（例えば、Ａｂｒａｈａｍ ｅｔ ａｌ．Ｃｈａｏｔｉｃ Ｍｉｘｅｒ ｆｏｒ Ｍｉｃｒｏｃｈａｎｎｅｌｓ．Ｓｃｉｅｎｃｅ，２００２ ２９５：６４７－６５１参照、その全体を参照により本明細書に援用する）。

【０８９５】

一実施形態において、本開示のポリヌクレオチドは、限定するものではないが、Ｈａｒｖａｒｄ Ａｐｐａｒａｔｕｓ（Ｈｏｌｌｉｓｔｏｎ，ＭＡ）またはＤｏｌｏｍｉｔｅ Ｍｉｃｒｏｆｌｕｉｄｉｃｓ（Ｒｏｙｓｔｏｎ，ＵＫ）によるものなどのマイクロミキサーチップを使用して生成された脂質ナノ粒子中に製剤化され得る。マイクロミキサーチップは、分割及び再結合メカニズムにより２つ以上の流体流れを迅速に混合するために使用することができる。

【０８９６】

一実施形態において、本開示のポリヌクレオチドは、国際特許公開第ＷＯ２０１３０６３４６８号または米国特許第８，４４０，６１４号（それぞれの全体を参照により本明細書に援用する）に記載されている薬物封入マイクロスフェアを使用した送達用に製剤化され得る。マイクロスフェアは、国際特許公開第ＷＯ２０１３０６３４６８号（その内容全体を参照により本明細書に援用する）に記載されている式（Ｉ）、（ＩＩ）、（ＩＩＩ）、（ＩＶ）、（Ｖ）または（ＶＩ）の化合物を含み得る。別の態様において、本開示のポリヌクレオチドを細胞に送達するには、アミノ酸、ペプチド、ポリペプチド、脂質（ＡＰＰＬ）が有用である（国際特許公開第ＷＯ２０１３０６３４６８号参照、その内容全体を参照により本明細書に援用する）。

【０８９７】

一実施形態において、本開示のポリヌクレオチドは、限定するものではないが、約１０～約２０ｎｍ、約１０～約３０ｎｍ、約１０～約４０ｎｍ、約１０～約５０ｎｍ、約１０～約６０ｎｍ、約１０～約７０ｎｍ、約１０～約８０ｎｍ、約１０～約９０ｎｍ、約２０～約３０ｎｍ、約２０～約４０ｎｍ、約２０～約５０ｎｍ、約２０～約６０ｎｍ、約２０～約７０ｎｍ、約２０～約８０ｎｍ、約２０～約９０ｎｍ、約２０～約１００ｎｍ、約３０～約４０ｎｍ、約３０～約５０ｎｍ、約３０～約６０ｎｍ、約３０～約７０ｎｍ、約３０～約８０ｎｍ、約３０～約９０ｎｍ、約３０～約１００ｎｍ、約４０～約５０ｎｍ、約４０～約６０ｎｍ、約４０～約７０ｎｍ、約４０～約８０ｎｍ、約４０～約９０ｎｍ、約４０～約１００ｎｍ、約５０～約６０ｎｍ、約５０～約７０ｎｍ約５０～約８０ｎｍ、約５０～約９０ｎｍ、約５０～約１００ｎｍ、約６０～約７０ｎｍ、約６０～約８０ｎｍ、約６０～約９０ｎｍ、約６０～約１００ｎｍ、約７０～約８０ｎｍ、約７０～約９０ｎｍ、約７０～約１００ｎｍ、約８０～約９０ｎｍ、約８０～約１００ｎｍ及び／または約９０～約１００ｎｍなどの約１０～約１００ｎｍの直径を有する脂質ナノ粒子中に製剤化される。

【０８９８】

一実施形態において、脂質ナノ粒子は、約１０～５００ｎｍの直径を有する。

【０８９９】

一実施形態において、脂質ナノ粒子は、１００ｎｍ超、１５０ｎｍ超、２００ｎｍ超、２５０ｎｍ超、３００ｎｍ超、３５０ｎｍ超、４００ｎｍ超、４５０ｎｍ超、５００ｎｍ超、５５０ｎｍ超、６００ｎｍ超、６５０ｎｍ超、７００ｎｍ超、７５０ｎｍ超、８００ｎｍ超、８５０ｎｍ超、９００ｎｍ超、９５０ｎｍ超または１０００ｎｍ超の直径を有し得る。

【０９００】

一態様において、脂質ナノ粒子は、国際特許公開第ＷＯ２０１３０５９９２２号（その内

容全体を参照により本明細書に援用する）に記載されている限界寸法の脂質ナノ粒子であってよい。限界寸法の脂質ナノ粒子は、水性コアまたは疎水性コアを取り囲む脂質二重層を含み得、ここで、脂質二重層は、限定するものではないが、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、ジヒドロスフィンゴミエリン、セファリン、セレブロシド、Ｃ８～Ｃ２０の脂肪酸ジアシルホファチジルコリン及び１－パルミトイル－２－オレオイルホスファチジルコリン（ＰＯＰＣ）などのリン脂質を含み得る。別の態様において、限界寸法の脂質ナノ粒子は、限定するものではないが、ＤＬＰＥ－ＰＥＧ、ＤＭＰＥ－ＰＥＧ、ＤＰＰＣ－ＰＥＧ及びＤＳＰＥ－ＰＥＧなどのポリエチレングリコール脂質を含み得る。

【０９０１】

一実施形態において、ポリヌクレオチドは、国際特許公開第ＷＯ２０１３０６３５３０号（その内容全体を参照により本明細書に援用する）に記載されている送達方法を使用して、特定の場所に送達し、局在化させ、かつ／または集中させてもよい。非限定的な例として、ポリヌクレオチドを対象に送達する前に、それと同時に、またはその後に、空のポリマー粒子を対象に投与してもよい。空のポリマー粒子は、対象と接触すると、体積変化を起こし、対象内の特定の位置に、留まり、埋め込まれ、固定化され、または捕捉される。

【０９０２】

一実施形態において、ポリヌクレオチドは、有効物質放出系中に製剤化され得る（例えば、米国特許出願公開第ＵＳ２０１３０１０２５４５号参照、その内容全体を参照により本明細書に援用する）。有効物質放出系は、１）触媒活性をもつ核酸とハイブリダイズするオリゴヌクレオチドインヒビター鎖に結合した少なくとも１つのナノ粒子と、２）治療上有効な物質（例えば、本明細書に記載されるポリヌクレオチド）に結合した少なくとも１つの基質分子に結合した化合物とを含み得、ここで、治療上有効な物質は、触媒活性をもつ核酸による基質分子の切断によって放出される。

【０９０３】

一実施形態において、ポリヌクレオチドは、非細胞性物質を含む内側コアと、細胞膜を含む外表面とを含むナノ粒子中に製剤化され得る。細胞膜は、細胞由来でもよいし、ウイルス由来の膜であってもよい。非限定的な例として、ナノ粒子は、国際特許公開第ＷＯ２０１３０５２１６７号（その全体を参照により本明細書に援用する）に記載されている方法によって作製することができる。別の非限定的な例として、本明細書に記載されるポリヌクレオチドを送達するために、国際特許公開第ＷＯ２０１３０５２１６７号（その全体を参照により本明細書に援用する）に記載されているナノ粒子を使用してもよい。

【０９０４】

一実施形態において、ポリヌクレオチドは、多孔性ナノ粒子に担持された脂質二重層（プロトセル）中に製剤化され得る。プロトセルは、国際特許公開第ＷＯ２０１３０５６１３２号に記載されており、その内容全体を参照により本明細書に援用する。

【０９０５】

一実施形態において、本明細書に記載されるポリヌクレオチドは、米国特許第８，４２０，１２３号及び同第８，５１８，９６３号ならびに欧州特許第ＥＰ２０７３８４８Ｂ１号（それぞれの内容全体を参照により本明細書に援用する）に記載されているようなポリマーナノ粒子中、またはこれらに記載されているような方法によって作製されたポリマーナノ粒子中に製剤化され得る。非限定的な例として、米国特許第８，５１８，９６３号（その内容全体を参照により本明細書に援用する）に記載されているナノ粒子または当該特許に記載されている方法によって作製されたナノ粒子などのポリマーナノ粒子は、高いガラス転移温度を有し得る。別の非限定的な例として、経口製剤及び非経口製剤用のポリマーナノ粒子は、欧州特許第ＥＰ２０７３８４８Ｂ１号（その内容全体を参照により本明細書に援用する）に記載されている方法によって作製され得る。

【０９０６】

別の実施形態において、本明細書に記載されるポリヌクレオチドは、イメージングで使用されるナノ粒子中に製剤化され得る。ナノ粒子は、米国特許出願公開第ＵＳ２０１３０１

２９６３６号（その全体を参照により本明細書に援用する）に記載されているものなどのリポソームナノ粒子であってよい。非限定的な例として、リポソームは、ガドリニウム（ＩＩＩ）２－｛４，７－ビス－カルボキシメチル－１０－［（Ｎ，Ｎ－ジステアリルアミドメチル－Ｎ’－アミド－メチル］－１，４，７，１０－テトラ－アザシクロドデカ－１－イル｝－酢酸及び中性の完全に飽和したリン脂質成分を含み得る（例えば、米国特許出願公開第ＵＳ２０１３０１２９６３６号参照、その内容全体を参照により本明細書に援用する）。

【０９０７】

一実施形態において、本開示で使用することができるナノ粒子は、米国特許出願公開第ＵＳ２０１３０１３０３４８号（その内容全体を参照により本明細書に援用する）に記載されている方法によって形成される。

【０９０８】

本開示のナノ粒子は、限定するものではないが、欠乏すると貧血から神経管欠陥に及ぶ健康被害をもたらし得るものなどの栄養素を更に含み得る（例えば、国際特許公開第ＷＯ２０１３０７２９２９号に記載のナノ粒子参照、その内容全体を参照により本明細書に援用する）。非限定的な例として、栄養素は、第一鉄塩、第二鉄塩または元素状の鉄、ヨウ素、葉酸、ビタミンまたは微量栄養素であってよい。

【０９０９】

一実施形態において、本開示のポリヌクレオチドは、膨潤性ナノ粒子中に製剤化され得る。膨潤性ナノ粒子は、限定するものではないが、米国特許第８，４４０，２３１号（その内容全体を参照により本明細書に援用する）に記載されているものであってよい。非限定的な実施形態として、本開示のポリヌクレオチドを肺系統に送達するために、膨潤性ナノ粒子が使用され得る（例えば、米国特許第８，４４０，２３１号参照、その内容全体を参照により本明細書に援用する）。

【０９１０】

本開示のポリヌクレオチドは、限定するものではないが、米国特許第８，４４９，９１６号（その内容全体を参照により本明細書に援用する）に記載されるものなどのポリ酸無水物ナノ粒子中に製剤化され得る。

【０９１１】

本開示のナノ粒子及びマイクロ粒子を幾何学的に操作して、マクロファージ応答及び／または免疫応答を制御してもよい。一態様において、幾何学的に操作された粒子は、限定するものではないが、肺送達などの標的化送達用の本開示のポリヌクレオチドを組み込むために、様々な形状、大きさ及び／または表面電荷を有し得る（例えば、国際公開第ＷＯ２０１３０８２１１１号参照、その内容全体を参照により本明細書に援用する）。幾何学的に操作される粒子が有し得る他の物理的特徴には、細胞と組織との相互作用を変えることができる、窓形成、角度のあるアーム、非対称性及び表面粗さ、電荷が含まれるが、これらに限定されない。非限定的な例として、本開示のナノ粒子は、国際公開第ＷＯ２０１３０８２１１１号（その内容全体を参照により本明細書に援用する）に記載されている方法によって作製することができる。

【０９１２】

一実施形態において、本開示のナノ粒子は、限定するものではないが、国際公開第ＷＯ２０１３０９０６０１号（その内容全体を参照により本明細書に援用する）に記載されるものなどの水溶性ナノ粒子であってよい。ナノ粒子は、良好な水溶性を示すために、小型で双性イオンのリガンドを有する無機ナノ粒子であってもよい。ナノ粒子はまた、小さな流体力学的直径（ＨＤ）、時間、ｐＨ及び塩濃度に対する安定性、ならびに低レベルの非特異的タンパク質結合を有し得る。

【０９１３】

一実施形態において、本開示のナノ粒子は、米国特許出願公開第ＵＳ２０１３０１７２４０６号（その内容全体を参照により本明細書に援用する）に記載されている方法によって開発され得る。

【０９１４】
一実施形態において、本開示のナノ粒子は、限定するものではないが、米国特許出願公開第ＵＳ２０１３０１７２４０６号（その内容全体を参照により本明細書に援用する）に記載されているものなどのステルスナノ粒子または標的特異的ステルスナノ粒子である。本開示のナノ粒子は、米国特許出願公開第ＵＳ２０１３０１７２４０６号（その内容全体を参照により本明細書に援用する）に記載されている方法によって作製され得る。
【０９１５】
別の実施形態において、ステルスナノ粒子または標的特異的ステルスナノ粒子は、ポリマーマトリックスを含み得る。ポリマーマトリックスは、限定するものではないが、ポリエチレン、ポリカーボネート、ポリ酸無水物、ポリヒドロキシ酸、ポリプロピルフメレート、ポリカプロラクトン、ポリアミド、ポリアセタール、ポリエーテル、ポリエステル、ポリ（オルトエステル）、ポリシアノアクリレート、ポリビニルアルコール、ポリウレタン、ポリホスファゼン、ポリアクリレート、ポリメタクリレート、ポリシアノアクリレート、ポリ尿素、ポリスチレン、ポリアミン、ポリエステル、ポリ酸無水物、ポリエーテル、ポリウレタン、ポリメタクリレート、ポリアクリレート、ポリシアノアクリレートまたはこれらの組み合わせなどの２つ以上のポリマーを含み得る。
【０９１６】
一実施形態において、ナノ粒子は、高密度の核酸層を有するナノ粒子－核酸ハイブリッド構造であってよい。非限定的な例として、ナノ粒子－核酸ハイブリッド構造は、米国特許出願公開第ＵＳ２０１３０１７１６４６号（その内容全体を参照により本明細書に援用する）に記載されている方法によって作製することができる。ナノ粒子は、限定するものではないが、本明細書に記載されるポリヌクレオチド及び／または当該技術分野において知られているポリヌクレオチドなどの核酸を含み得る。
【０９１７】
本開示のナノ粒子の少なくとも１つは、コアナノ構造に埋め込まれてもよいし、ナノ構造内またはナノ構造表面上で少なくとも１つのペイロードを運搬または会合することが可能である、低密度の多孔性３Ｄ構造またはコーティングで被覆されてもよい。少なくとも１つのナノ粒子を含むナノ構造の非限定的な例は、国際特許公開第ＷＯ２０１３１２３５２３号に記載されており、その内容全体を参照により本明細書に援用する。
【０９１８】
アミノ酸脂質
本開示はまた、本明細書に記載されるポリヌクレオチド、すなわち、ＭＣＭポリペプチドをコードするＯＲＦを含むポリヌクレオチドの製剤を、アミノ酸脂質とともに含む、医薬組成物を含む。アミノ酸脂質は、アミノ酸残基と、１つ以上の親油性尾部とを含む、親油性化合物である。アミノ酸脂質及びアミノ酸脂質の作製方法の非限定的な例は、米国特許第８，５０１，８２４号に記載されており、その内容全体を参照により本明細書に援用する。
【０９１９】
いくつかの実施形態において、アミノ酸脂質は、親水性部分及び親油性部分を有する。親水性部分は、アミノ酸残基であり得、親油性部分は、少なくとも１つの親油性尾部を含み得る。
【０９２０】
いくつかの実施形態において、対象にポリヌクレオチドを送達するために、アミノ酸脂質製剤を使用することができる。
【０９２１】
別の実施形態において、アミノ酸脂質製剤は、ポリヌクレオチドに結合し、それを放出するアミノ酸脂質を含む放出可能な形態でポリヌクレオチドを送達することができる。非限定的な例として、ポリヌクレオチドの放出は、限定するものではないが、米国特許第７，０９８，０３２号、同第６，８９７，１９６号、同第６，４２６，０８６号、同第７，１３８，３８２号、同第５，５６３，２５０号及び同第５，５０５，９３１号（それぞれの

内容全体を参照により本明細書に援用する）に記載されているものなどの酸不安定性リンカーによってもたらすことができる。

【０９２２】

ポリマー、生分解性ナノ粒子及びコアシェルナノ粒子

本開示はまた、天然及び／または合成ポリマーを使用した、本明細書に記載されるポリヌクレオチド、すなわち、ＭＣＭポリペプチドをコードするＯＲＦを含むポリヌクレオチドの製剤を含む、医薬組成物を含む。送達のために使用することができるポリマーの非限定的な例には、ＭＩＲＵＳ（登録商標）Ｂｉｏ（Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ）及びＲｏｃｈｅ Ｍａｄｉｓｏｎ（Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ）によるＤＹＮＡＭＩＣ ＰＯＬＹＣＯＮＪＵＧＡＴＥ（登録商標）（Ａｒｒｏｗｈｅａｄ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｃｏｒｐ．（Ｐａｓａｄｅｎａ，ＣＡ））製剤、ＰＨＡＳＥＲＸ（商標）ポリマー製剤、例えば、限定するものではないが、ＳＭＡＲＴＴ ＰＯＬＹＭＥＲ ＴＥＣＨＮＯＬＯＧＹ（商標）（ＰＨＡＳＥＲＸ（登録商標）（Ｓｅａｔｔｌｅ，ＷＡ））、ＤＭＲＩ／ＤＯＰＥ、ポロキサマー、Ｖｉｃａｌ（ＳａｎＤｉｅｇｏ，ＣＡ）のＶＡＸＦＥＣＴＩＮ（登録商標）アジュバント、キトサン、Ｃａｌａｎｄｏ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ（Ｐａｓａｄｅｎａ，ＣＡ）のシクロデキストリン、デンドリマー及びポリ（乳酸－ｃｏ－グリコール酸）（ＰＬＧＡ）ポリマー、ＲＯＮＤＥＬ（商標）（ＲＮＡｉ／オリゴヌクレオチドナノ粒子送達）ポリマー（Ａｒｒｏｗｈｅａｄ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ（Ｐａｓａｄｅｎａ，ＣＡ））ならびにｐＨ応答性コブロックポリマー、例えば、限定するものではないが、ＰＨＡＳＥＲＸ（登録商標）（Ｓｅａｔｔｌｅ，ＷＡ）が挙げられるが、これらに限定されない。

【０９２３】

キトサン製剤の非限定的な例には、正電荷を帯びたキトサンのコアと、負電荷を帯びた基質の外側部分とが挙げられる（米国特許出願公開第２０１２０２５８１７６号、その全体を参照により本明細書に援用する）。キトサンには、Ｎ－トリメチルキトサン、モノ－Ｎ－カルボキシメチルキトサン（ＭＣＣ）、Ｎ－パルミトイルキトサン（ＮＰＣＳ）、ＥＤＴＡ－キトサン、低分子量キトサン、キトサン誘導体またはこれらの組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。

【０９２４】

いくつかの実施形態において、本開示で使用されるポリマーは、限定するものではないが、細菌などの望まれない物質がポリマーの表面に付着することを低減及び／または阻害するための処理を受けている。ポリマーは、当該技術分野において知られ、かつ／もしくは記載されている方法及び／または国際公開第ＷＯ２０１２１５０４６７号（その全体を参照により本明細書に援用する）に記載されている方法によって処理することができる。

【０９２５】

ＰＬＧＡ製剤の非限定的な例には、ＰＬＧＡ注射用デポ剤が挙げられるが、これらに限定されない（例えば、６６％Ｎ－メチル－２－ピロリドン（ＮＭＰ）中にＰＬＧＡを溶解することによって形成され、残りは水性溶媒及びロイプロリドのＥＬＩＧＡＲＤ（登録商標）である。注射すると、ＰＬＧＡ及びロイプロリドペプチドは、皮下腔に沈殿する）。

【０９２６】

これらのポリマー手法の多くは、オリゴヌクレオチドをｉｎ ｖｉｖｏで細胞質中に送達することにおいて有効性を示している（ｄｅＦｏｕｇｅｒｏｌｌｅｓ Ｈｕｍ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．２００８ １９：１２５－１３２において概説、その全体を参照により本明細書に援用する）。核酸（この場合、低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）を用いる）の強固なｉｎ ｖｉｖｏ送達をもたらした２つのポリマー手法は、動的ポリコンジュゲートとシクロデキストリン系ナノ粒子である（例えば、米国特許出願公開第ＵＳ２０１３０１５６７２１号参照、その全体を参照により本明細書に援用する）。これらの送達手法のうちの第１の手法は、動的ポリコンジュゲートを使用するものであり、ｉｎ ｖｉｖｏマウスにおいて、ｓｉＲＮＡを効果的に送達し、肝細胞中の内因性標的ｍＲＮＡをサイレンシングすることが示されている（Ｒｏｚｅｍａ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓ

ｃｉ ＵＳＡ．２００７ １０４：１２９８２－１２８８７、その全体を参照により本明細書に援用する）。この特殊な手法は、多成分ポリマー系であり、その主な特徴には、膜活性ポリマーに対して、核酸（この場合、ｓｉＲＮＡ）がジスルフィド結合を介して共有結合され、ＰＥＧ（電荷マスキング用）及びＮ－アセチルガラクトサミン（肝細胞標的化用）基の両方がｐＨ感受性結合を介して結合していることである（Ｒｏｚｅｍａ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ．２００７ １０４：１２９８２－１２８８７、その全体を参照により本明細書に援用する）。ポリマー複合体は、肝細胞に結合し、エンドソーム中に侵入すると、低ｐＨ環境中で分解され、ポリマーが正電荷を露出し、エンドソーム脱出と、ポリマーから細胞質へのｓｉＲＮＡの放出をもたらす。Ｎ－アセチルガラクトサミン基をマンノース基に置き換えると、アシアロ糖タンパク質受容体発現肝細胞から洞様血管内皮及びクッパー細胞へと標的を変更できることが示された。別のポリマー手法は、トランスフェリンを標的にしたシクロデキストリン含有ポリカチオンナノ粒子の使用を伴う。これらのナノ粒子は、トランスフェリン受容体を発現するユーイング肉腫腫瘍細胞において、ＥＷＳ－ＦＬＩ１遺伝子産物の標的化サイレンシングを示し（Ｈｕ－Ｌｉｅｓｋｏｖａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．２００５ ６５：８９８４－８９８２、その全体を参照により本明細書に援用する）、これらのナノ粒子中に製剤化されたｓｉＲＮＡは、非ヒト霊長類において良好な忍容性であった（Ｈｅｉｄｅｌ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ ２００７ １０４：５７１５－２１、その全体を参照により本明細書に援用する）。これらの送達戦略は双方とも、標的化送達機構及びエンドソーム脱出機構の両方を使用する合理的な手法を組み込んでいる。

【０９２７】

ポリマー製剤は、ポリヌクレオチドの持続放出または遅延放出を可能にし得る（例えば、筋肉内または皮下注射後）。ポリヌクレオチドに対する放出プロファイルの変更は、例えば、長期間にわたるコードタンパク質の翻訳をもたらすことができる。ポリマー製剤はまた、ポリヌクレオチドの安定性を増大させるために使用することができる。生分解性ポリマーは、ポリヌクレオチド以外の核酸を分解から保護するために以前から使用されており、ｉｎ ｖｉｖｏでペイロードの持続放出をもたらすことが示されている（Ｒｏｚｅｍａ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ．２００７ １０４：１２９８２－１２８８７；Ｓｕｌｌｉｖａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｅｘｐｅｒｔ Ｏｐｉｎ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖ．２０１０ ７：１４３３－１４４６；Ｃｏｎｖｅｒｔｉｎｅ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｍａｃｒｏｍｏｌｅｃｕｌｅｓ．２０１０ Ｏｃｔ １；Ｃｈｕ ｅｔ ａｌ．，Ａｃｃ Ｃｈｅｍ Ｒｅｓ．２０１２ Ｊａｎ １３；Ｍａｎｇａｎｉｅｌｌｏ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｍａｔｅｒｉａｌｓ．２０１２ ３３：２３０１－２３０９；Ｂｅｎｏｉｔ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｍａｃｒｏｍｏｌｅｃｕｌｅｓ．２０１１ １２：２７０８－２７１４；Ｓｉｎｇｈａ ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｔｈｅｒ．２０１１ ２：１３３－１４７；ｄｅＦｏｕｇｅｒｏｌｌｅｓ Ｈｕｍ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．２００８ １９：１２５－１３２；Ｓｃｈａｆｆｅｒｔ ａｎｄ Ｗａｇｎｅｒ，Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．２００８ １６：１１３１－１１３８；Ｃｈａｔｕｒｖｅｄｉ ｅｔ ａｌ．，Ｅｘｐｅｒｔ Ｏｐｉｎ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖ．２０１１ ８：１４５５－１４６８；Ｄａｖｉｓ，Ｍｏｌ Ｐｈａｒｍ．２００９ ６：６５９－６６８；Ｄａｖｉｓ，Ｎａｔｕｒｅ ２０１０ ４６４：１０６７－１０７０、それぞれの全体を参照により本明細書に援用する）。

【０９２８】

いくつかの実施形態において、医薬組成物は、持続放出性製剤であり得る。更なる実施形態において、持続放出性製剤は、皮下送達用であり得る。持続放出性製剤には、ＰＬＧＡミクロスフェア、エチレンビニルアセテート（ＥＶＡｃ）、ポロキサマー、ＧＥＬＳＩＴＥ（登録商標）（Ｎａｎｏｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ，Ｉｎｃ．（Ａｌａｃｈｕａ，ＦＬ））、ＨＹＬＥＮＥＸ（登録商標）（Ｈａｌｏｚｙｍｅ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ（Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ ＣＡ））、フィブリノゲンポリマー（Ｅｔｈｉｃｏｎ Ｉｎｃ．（Ｃｏｒｎｅｌｉａ，ＧＡ））、ＴＩＳＳＥＬＬ（登録商標）（Ｂａｘｔｅｒ Ｉｎｔｅｒｎａ

ｔｉｏｎａｌ，Ｉｎｃ．（Ｄｅｅｒｆｉｅｌｄ，ＩＬ））、ＰＥＧ系シーラント及びＣＯＳＥＡＬ（登録商標）（Ｂａｘｔｅｒ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ，Ｉｎｃ．（Ｄｅｅｒｆｉｅｌｄ，ＩＬ））などの外科用シーラントが含まれるが、これらに限定されない。

【０９２９】

非限定的な例として、修飾ｍＲＮＡは、調整可能な放出速度（例えば、数日及び数週間）を有するＰＬＧＡミクロスフェアを調製し、封入プロセス中における修飾ｍＲＮＡの完全性を維持しながら修飾ｍＲＮＡをＰＬＧＡミクロスフェア中に封入することによって、ＰＬＧＡミクロスフェア中に製剤化することができる。ＥＶＡｃは、前臨床の持続放出埋込用途において広範に使用されている非生分解性・生体適合性ポリマーである（例えば、長期放出製品である、緑内障のためのピロカルピン眼内挿入物Ｏｃｕｓｅｒｔまたは持続放出性プロゲステロン子宮内器具Ｐｒｏｇｅｓｔａｓｅｒｔ；経皮送達システムＴｅｓｔｏｄｅｒｍ、Ｄｕｒａｇｅｓｉｃ及びＳｅｌｅｇｉｌｉｎｅ；カテーテル）。ポロキサマーＦ－４０７　ＮＦは、ポリオキシエチレン－ポリオキシプロピレン－ポリオキシエチレンの親水性非イオン性界面活性剤トリブロックコポリマーであり、５℃未満の温度では粘性が低く、１５℃を超える温度では固形ゲルを形成する。ＰＥＧ系外科用シーラントは、送達デバイス中で混合される２つの合成ＰＥＧ成分を含み、１分で調製可能であり、３分でシーリングし、３０日以内に再吸収される。ＧＥＬＳＩＴＥ（登録商標）及び天然ポリマーは、投与部位でｉｎ－ｓｉｔｕゲル化することができる。これらは、イオン相互作用を介してタンパク質とペプチド治療薬候補と相互作用して、安定化効果をもたらすことが示されている。

【０９３０】

ポリマー製剤はまた、限定するものではないが、葉酸、トランスフェリン及びＮ－アセチルガラクトサミン（ＧａｌＮＡｃ）によって例示されるように、異なるリガンドを発現させることによって選択的に標的化することができる（Ｂｅｎｏｉｔ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｍａｃｒｏｍｏｌｅｃｕｌｅｓ．２０１１　１２：２７０８－２７１４；Ｒｏｚｅｍａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ　ＵＳＡ．２００７　１０４：１２９８２－１２８８７；Ｄａｖｉｓ，Ｍｏｌ　Ｐｈａｒｍ．２００９　６：６５９－６６８；Ｄａｖｉｓ，Ｎａｔｕｒｅ　２０１０　４６４：１０６７－１０７０、それぞれの全体を参照により本明細書に援用する）。

【０９３１】

本開示のポリヌクレオチドは、ポリマー化合物により、またはポリマー化合物中に製剤化され得る。ポリマーは、限定するものではないが、ポリエテン、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、ポリ（ｌ－リシン）（ＰＬＬ）、ＰＬＬにグラフトされたＰＥＧ、カチオン性リポポリマー、生分解性カチオン性リポポリマー、ポリエチレンイミン（ＰＥＩ）、架橋分岐状ポリ（アルキレンイミン）、ポリアミン誘導体、修飾ポロキサマー、生分解性ポリマー、弾性生分解性ポリマー、生分解性ブロックコポリマー、生分解性ランダムコポリマー、生分解性ポリエステルコポリマー、生分解性ポリエステルブロックコポリマー、生分解性ポリエステルブロックランダムコポリマー、マルチブロックコポリマー、線状生分解性コポリマー、ポリ［α－（４－アミノブチル）－Ｌ－グリコール酸）（ＰＡＧＡ）、生分解性架橋カチオン性マルチブロックコポリマー、ポリカーボネート、ポリ無水物、ポリヒドロキシ酸、ポリプロピルフマレート、ポリカプロラクトン、ポリアミド、ポリアセタール、ポリエーテル、ポリエステル、ポリ（オルトエステル）、ポリシアノアクリレート、ポリビニルアルコール、ポリウレタン、ポリホスファゼン、ポリアクリレート、ポリメタクリレート、ポリシアノアクリレート、ポリ尿素、ポリスチレン、ポリアミン、ポリリシン、ポリ（エチレンイミン）、ポリ（セリンエステル）、ポリ（Ｌ－ラクチド－ｃｏ－Ｌ－リシン）、ポリ（４－ヒドロキシ－Ｌ－プロリンエステル）アクリルポリマー、アミン含有ポリマー、デキストランポリマー、デキストランポリマー誘導体またはこれらの組み合わせなどの少なくとも１つのポリマーを含み得る。

【０９３２】

非限定的な例として、本開示のポリヌクレオチドは、米国特許第６，１７７，２７４号（

その全体を参照により本明細書に援用する）に記載されているようなＰＬＬとグラフト化されたＰＥＧのポリマー化合物とともに製剤化され得る。製剤は、ポリヌクレオチドのｉｎ ｖｉｔｒｏでの細胞トランスフェクションまたはポリヌクレオチドのｉｎ ｖｉｖｏ送達のために使用することができる。別の例において、ポリヌクレオチドは、カチオン性ポリマーを含む溶液もしくは媒体中、乾燥した医薬組成物中、または米国特許出願公開第２００９００４２８２９号及び同第２００９００４２８２５号（それぞれの全体を参照により本明細書に援用する）に記載されているような乾燥可能な溶液中に、懸濁してもよい。

【０９３３】

別の非限定的な例として、本開示のポリヌクレオチドは、ＰＬＧＡ－ＰＥＧブロックコポリマー（米国特許出願公開第ＵＳ２０１２０００４２９３号及び米国特許第８，２３６，３３０号参照、その全体を参照により本明細書に援用する）またはＰＬＧＡ－ＰＥＧ－ＰＬＧＡブロックコポリマー（米国特許第６，００４，５７３参照、その全体を参照により本明細書に援用する）とともに製剤化され得る。非限定的な例として、本開示のポリヌクレオチドは、ＰＥＧとＰＬＡまたはＰＥＧとＰＬＧＡのジブロックコポリマーとともに製剤化され得る（米国特許第８，２４６，９６８号参照、その全体を参照により本明細書に援用する）。

【０９３４】

核酸の送達、または疾患の治療及び／もしくは予防、埋込用もしくは注射用デバイスへの包含に、ポリアミン誘導体を使用してもよい（米国特許出願公開第２０１００２６０８１７号（現米国特許第８，４６０，６９６号）、それぞれの内容全体を参照により本明細書に援用する）。非限定的な例として、医薬組成物は、ポリヌクレオチドと、米国特許出願公開第２０１００２６０８１７号（現米国特許第８，４６０，６９６号、これらの内容全体を参照により本明細書に援用する）に記載されているポリアミン誘導体とを含み得る。非限定的な例として、本開示のポリヌクレオチドは、限定するものではないが、炭水化物ジアジドモノマーをオリゴアミン含有ジアルキン単位と組み合わせることによって調製された１，３－双極性付加ポリマーを含むポリマーなどのポリアミンポリマーを使用して送達され得る（米国特許第８，２３６，２８０号、その全体を参照により本明細書に援用する）。

【０９３５】

本開示のポリヌクレオチドは、少なくとも１つのアクリルポリマーとともに製剤化され得る。アクリルポリマーには、アクリル酸、メタクリル酸、アクリル酸とメタクリル酸のコポリマー、メチルメタクリレートコポリマー、エトキシエチルメタクリレート、シアノエチルメタクリレート、アミノアルキルメタクリレートコポリマー、ポリ（アクリル酸）、ポリ（メタクリル酸）、ポリシアノアクリレート及びこれらの組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。

【０９３６】

いくつかの実施形態において、本開示のポリヌクレオチドは、国際公開第ＷＯ２０１１１１５８６２号、同第ＷＯ２０１２０８２５７４号及び同第ＷＯ２０１２０６８１８７号ならびに米国特許出願公開第２０１２０２８３４２７号（それぞれの全体を参照により本明細書に援用する）に記載されている少なくとも１つのポリマー及び／またはその誘導体とともに製剤化され得る。別の実施形態において、本開示のポリヌクレオチドは、ＷＯ２０１１１１５８６２（その全体を参照により本明細書に援用する）に記載されている式Ｚのポリマーとともに製剤化され得る。更に別の実施形態において、ポリヌクレオチドは、国際公開第ＷＯ２０１２０８２５７４号または同第ＷＯ２０１２０６８１８７号及び米国特許出願公開第２０１２０２８３４２号（それぞれの全体を参照により本明細書に援用する）に記載されている式Ｚ、Ｚ'またはＺ''のポリマーとともに製剤化され得る。本開示の修飾ＲＮＡとともに製剤化されるポリマーは、国際公開第ＷＯ２０１２０８２５７４号または同第ＷＯ２０１２０６８１８７号（それぞれの全体を参照により本明細書に援用する）に記載されている方法によって合成することができる。

【０９３７】

本開示のポリヌクレオチドは、少なくとも１つのアクリルポリマーとともに製剤化され得る。アクリルポリマーには、アクリル酸、メタクリル酸、アクリル酸とメタクリル酸のコポリマー、メチルメタクリレートコポリマー、エトキシエチルメタクリレート、シアノエチルメタクリレート、アミノアルキルメタクリレートコポリマー、ポリ（アクリル酸）、ポリ（メタクリル酸）、ポリシアノアクリレート及びこれらの組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。

【０９３８】

本開示のポリヌクレオチドの製剤は、限定するものではないが、ポリリシン、ポリエチレンイミン、ポリ（アミドアミン）デンドリマー、ポリ（アミン－ｃｏ－エステル）またはこれらの組み合わせなどの少なくとも１つのアミン含有ポリマーを含み得る。非限定的な例として、ポリ（アミン－ｃｏ－エステル）は、国際公開第ＷＯ２０１３０８２５２９号（その内容全体を参照により本明細書に援用する）に記載されているポリマー及び／または当該国際公開に記載されている方法によって作製されたポリマーであってよい。

【０９３９】

例えば、本開示のポリヌクレオチドは、ポリ（アルキレンイミン）、生分解性カチオン性リポポリマー、生分解性ブロックコポリマー、生分解性ポリマー、もしくは生分解性ランダムコポリマー、生分解性ポリエステルブロックコポリマー、生分解性ポリエステルポリマー、生分解性ポリエステルランダムコポリマー、線状生分解性コポリマー、ＰＡＧＡ、生分解性架橋カチオン性マルチブロックコポリマーまたはこれらの組み合わせを含む、薬学的化合物中に製剤化され得る。生分解性カチオン性リポポリマーは、当該技術分野において知られている方法ならびに／または米国特許第６，６９６，０３８号、米国特許出願公開第２００３００７３６１９号及び同第２００４０１４２４７４号（それぞれの全体を参照により本明細書に援用する）に記載されている方法によって作製することができる。ポリ（アルキレンイミン）は、当該技術分野において知られている方法及び／または米国特許出願公開第２０１０００００４３１５号（その全体を参照により本明細書に援用する）に記載されているような方法を使用して作製することができる。生分解性ポリマー、生分解性ブロックコポリマー、生分解性ランダムコポリマー、生分解性ポリエステルブロックコポリマー、生分解性ポリエステルポリマーまたは生分解性ポリエステルランダムコポリマーは、当該技術分野において知られている方法ならびに／または米国特許第６，５１７，８６９号及び同第６，２６７，９８７号（それぞれの内容全体を参照により本明細書に援用する）に記載されているような方法を使用して作製することができる。線状生分解性コポリマーは、当該技術分野において知られている方法及び／または米国特許第６，６５２，８８６号に記載されているような方法を使用して作製することができる。ＰＡＧＡポリマーは、当該技術分野において知られている方法及び／または米国特許第６，２１７，９１２号（その全体を参照により本明細書に援用する）に記載されているような方法を使用して作製することができる。ＰＡＧＡポリマーは、限定するものではないが、ポリ－Ｌ－リシン、ポリアルギニン、ポリオルニチン、ヒストン、アビジン、プロタミン、ポリラクチド及びポリ（ラクチド－ｃｏ－グリコリド）などのポリマーとともにコポリマーまたはブロックコポリマーを形成するように、コポリマー化することができる。生分解性架橋カチオン性マルチブロックコポリマーは、当該技術分野において知られている方法及び／または米国特許第８，０５７，８２１号、同第８，４４４，９９２号もしくは米国特許出願公開第２０１２００９１４５号（それぞれの全体を参照により本明細書に援用する）に記載されているような方法によって作製することができる。例えば、マルチブロックコポリマーは、分岐状ポリエチレンイミンと比較して異なるパターンを有する線状ポリエチレンイミン（ＬＰＥＩ）ブロックを使用して合成することができる。更に、組成物または医薬組成物は、当該技術分野において知られている方法、本明細書に記載される方法、または米国特許出願公開第２０１０００００４３１５号もしくは米国特許第６，２６７，９８７号及び同第６，２１７，９１２号（それぞれの全体を参照により本明細書に援用する）に記載されているような方法によって作製することができる。

【０９４０】

本開示のポリヌクレオチドは、ポリカチオン性側鎖を含有し得る少なくとも１つの分解性ポリエステルとともに製剤化され得る。分解性ポリエステルには、ポリ（セリンエステル）、ポリ（Ｌ－ラクチド－ｃｏ－Ｌ－リシン）、ポリ（４－ヒドロキシ－Ｌ－プロリンエステル）及びこれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。別の実施形態において、分解性ポリエステルは、ＰＥＧ化ポリマーを形成するためのＰＥＧコンジュゲートを含み得る。

【０９４１】

本開示のポリヌクレオチドは、少なくとも１つの架橋性ポリエステルとともに製剤化され得る。架橋性ポリエステルには、当該技術分野において知られているもの及び米国特許出願公開第２０１２０２６９７６１号（その内容全体を参照により本明細書に援用する）に記載されているものが含まれる。

【０９４２】

本開示のポリヌクレオチドは、少なくとも１つのシクロデキストリンポリマー中に、または少なくとも１つのシクロデキストリンポリマーとともに製剤化され得る。シクロデキストリンポリマー及びシクロデキストリンポリマーの作製方法には、当該技術分野において知られているもの及び米国特許出願公開第２０１３０１８４４５３号（その内容全体を参照により本明細書に援用する）に記載されているものが含まれる。

【０９４３】

いくつかの実施形態において、本開示のポリヌクレオチドは、少なくとも１つの架橋型カチオン結合ポリマー中に、または少なくとも１つの架橋型カチオン結合ポリマーとともに製剤化され得る。架橋型カチオン結合ポリマー及び架橋型カチオン結合ポリマーの作製方法には、当該技術分野において知られているもの及び国際特許公開第ＷＯ２０１３１０６０７２号、同第ＷＯ２０１３１０６０７３号及び同第ＷＯ２０１３１０６０８６号（それぞれの内容全体を参照により本明細書に援用する）に記載されているものが含まれる。

【０９４４】

いくつかの実施形態において、本開示のポリヌクレオチドは、少なくとも１つの分岐状ポリマー中に、または少なくとも１つの分岐状ポリマーとともに製剤化され得る。分岐状ポリマー及び分岐状ポリマーの作製方法には、当該技術分野において知られているもの及び国際特許公開第ＷＯ２０１３１１３０７１号（それぞれの内容全体を参照により本明細書に援用する）に記載されているものが含まれる。

【０９４５】

いくつかの実施形態において、本開示のポリヌクレオチドは、少なくともＰＥＧ化アルブミンポリマー中に、または少なくともＰＥＧ化アルブミンポリマーとともに製剤化され得る。ＰＥＧ化アルブミンポリマー及びＰＥＧ化アルブミンポリマーの作製方法には、当該技術分野において知られているもの及び米国特許出願公開第ＵＳ２０１３０２３１２８７号（それぞれの内容全体を参照により本明細書に援用する）に記載されているものが含まれる。

【０９４６】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるポリマーは、脂質末端のＰＥＧにコンジュゲートされ得る。非限定的な例として、ＰＬＧＡを脂質末端のＰＥＧにコンジュゲートして、ＰＬＧＡ－ＤＳＰＥ－ＰＥＧを形成することができる。別の非限定的な例として、本開示とともに使用されるＰＥＧコンジュゲートは、国際公開第ＷＯ２００８１０３２７６号（その全体を参照により本明細書に援用する）に記載されている。ポリマーは、限定するものではないが、米国特許第８，２７３，３６３号（その全体を参照により本明細書に援用する）に記載されているコンジュゲートなどのリガンドコンジュゲートを使用してコンジュゲートすることができる。

【０９４７】

いくつかの実施形態において、本明細書で開示されるポリヌクレオチドは、投与前に、ＰＥＧまたはリン酸ナトリウム／炭酸ナトリウム溶液と混合され得る。別の実施形態において、目的のタンパク質をコードするポリヌクレオチドは、ＰＥＧと混合され、更にリン酸

ナトリウム／炭酸ナトリウム溶液と混合されてもよい。更に別の実施形態において、目的のタンパク質をコードするポリヌクレオチドがＰＥＧと混合され得、第２の目的のタンパク質をコードするポリヌクレオチドがリン酸ナトリウム／炭酸ナトリウム溶液と混合され得る。

【０９４８】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるポリヌクレオチドは、別の化合物とコンジュゲートされ得る。コンジュゲートの非限定的な例は、米国特許第７，９６４，５７８号及び同第７，８３３，９９２号に記載されており、それぞれの全体を参照により本明細書に援用する。別の実施形態において、本開示の修飾ＲＮＡは、米国特許第７，９６４，５７８号及び同第７，８３３，９９２号（それぞれの全体を参照により本明細書に援用する）に記載されている式１～１２２のコンジュゲートとコンジュゲートされ得る。本明細書に記載されるポリヌクレオチドは、限定するものではないが、金などの金属とコンジュゲートされ得る（例えば、Ｇｉｌｊｏｈａｎｎ　ｅｔ　ａｌ．Ｊｏｕｒｎ．Ａｍｅｒ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．２００９　１３１（６）：２０７２－２０７３参照、その全体を参照により本明細書に援用する）。別の実施形態において、本明細書に記載されるポリヌクレオチドは、金ナノ粒子にコンジュゲート及び／または封入され得る（国際公開第ＷＯ２０１２１６２６９号及び米国特許出願公開第２０１２０３０２９４０号及び同第ＵＳ２０１３０１７７５２３号、それぞれの内容全体を参照により本明細書に援用する）。

【０９４９】

米国特許出願公開第２０１００００４３１３号（その全体を参照により本明細書に援用する）に記載されているように、遺伝子送達組成物は、ヌクレオチド配列及びポロキサマーを含み得る。例えば、本開示のポリヌクレオチドは、米国特許出願公開第２０１００００４３１３号に記載されているポロキサマーを含む遺伝子送達組成物に使用され得る。

【０９５０】

いくつかの実施形態において、本開示のポリマー製剤は、カチオン性担体を含み得るポリマー製剤を、コレステロール及びポリエチレングリコール基に共有結合することができるカチオン性リポポリマーに接触させることによって安定化することができる。ポリマー製剤は、米国特許出願公開第２００９００４２８２９号（その全体を参照により本明細書に援用する）に記載されている方法を使用してカチオン性リポポリマーと接触させることができる。カチオン性担体には、ポリエチレンイミン、ポリ（トリメチレンイミン）、ポリ（テトラメチレンイミン）、ポリプロピレンイミン、アミノグリコシド－ポリアミン、ジデオキシ－ジアミノ－ｂ－シクロデキストリン、スペルミン、スペルミジン、ポリ（２－ジメチルアミノ）エチルメタクリレート、ポリ（リシン）、ポリ（ヒスチジン）、ポリ（アルギニン）、カチオン化ゼラチン、デンドリマー、キトサン、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）、Ｎ－［１－（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（ＤＯＴＭＡ）、１－［２－（オレオイルオキシ）エチル］－２－オレイル－３－（２－ヒドロキシエチル）イミダゾリニウムクロリド（ＤＯＴＩＭ）、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トリフルオロアセテート（ＤＯＳＰＡ）、３Ｂ－［Ｎ－（Ｎ’，Ｎ’－ジメチルアミノエタン）－カルバモイル］コレステロール塩酸塩（ＤＣ－コレステロールＨＣｌ）、ジヘプタデシルアミドグリシルスペルミジン（ＤＯＧＳ）、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）、Ｎ，Ｎ－ジオレイル－Ｎ，Ｎ－ジメチルアンモニウムクロリド（ＤＯＤＡＣ）及びこれらの組み合わせが含まれ得るが、これらに限定されない。非限定的な例として、ポリヌクレオチドは、米国特許出願公開第２０１３００６５９４２号（その全体を参照により本明細書に援用する）に記載されているものなどのカチオン性リポポリマーとともに製剤化され得る。

【０９５１】

本開示のポリヌクレオチドは、１つ以上のポリマーのポリプレックス中に製剤化され得る（例えば、米国特許第８，５０１，４７８号、米国特許出願公開第２０１２０２３７５６５号及び同第２０１２０２７０９２７号及び同第２０１３０１４９７８３号ならびに国際特許公開第ＷＯ２０１３０９０８６１号参照、それぞれの内容全体を参照により本明細書に援用する）。非限定的な例として、ポリプレックスは、国際公開第ＷＯ２０１３０９０８６１号（その内容全体を参照により本明細書に援用する）に記載されている新規α－アミノアミジンポリマーを使用して形成することができる。別の非限定的な例として、ポリプレックスは、米国特許第８，５０１，４７８号（その内容全体を参照により本明細書に援用する）に記載されているクリックポリマーを使用して形成することができる。

【０９５２】

いくつかの実施形態において、ポリプレックスは、２つ以上のカチオン性ポリマーを含む。カチオン性ポリマーは、線状ＰＥＩなどのポリ（エチレンイミン）（ＰＥＩ）を含み得る。別の実施形態において、ポリプレックスは、ｐ（ＴＥＴＡ／ＣＢＡ）、そのＰＥＧ化類似体ｐ（ＴＥＴＡ／ＣＢＡ）－ｇ－ＰＥＧ２ｋ及びこれらの混合物を含む（例えば、米国特許出願公開第ＵＳ２０１３０１４９７８３号参照、その内容全体を参照により本明細書に援用する）。

【０９５３】

本開示のポリヌクレオチドはまた、ポリマー、脂質及び／または他の生分解性物質、例えば限定するものではないが、リン酸カルシウムなどの組み合わせを使用して、ナノ粒子として製剤化され得る。コアシェル、ハイブリッド及び／または多層構造において、ナノ粒子を微調整してポリヌクレオチドの送達を可能にし、ポリヌクレオチドが増強され得るように、各構成成分を組み合わせることができる（Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｍａｔｅｒ．２００６ ５：７９１－７９６；Ｆｕｌｌｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｍａｔｅｒｉａｌｓ．２００８ ２９：１５２６－１５３２；ＤｅＫｏｋｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ａｄｖ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖ Ｒｅｖ．２０１１ ６３：７４８－７６１；Ｅｎｄｒｅｓ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｍａｔｅｒｉａｌｓ．２０１１ ３２：７７２１－７７３１；Ｓｕ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｐｈａｒｍ．２０１１ Ｊｕｎ ６；８（３）：７７４－８７、その全体を参照により本明細書に援用する）。非限定的な例として、ナノ粒子は、限定するものではないが、親水性－疎水性ポリマー（例えば、ＰＥＧ－ＰＬＧＡ）、疎水性ポリマー（例えば、ＰＥＧ）及び／または親水性ポリマーなどの複数のポリマーを含み得る（国際公開第ＷＯ２０１２０２２５１２９号、その内容全体を参照により本明細書に援用する）。

【０９５４】

別の非限定的な例として、ポリヌクレオチドのための親水性ポリマーを含むナノ粒子は、国際特許公開第ＷＯ２０１３１１９９３６号（その内容全体を参照により本明細書に援用する）に記載されるものまたは当該国際特許公開に記載されている方法によって作製されたものであってよい。

【０９５５】

いくつかの実施形態において、本開示で使用することができる生分解性ポリマーは、ポリ（エーテル無水物）ブロックコポリマーである。非限定的な例として、本明細書で使用される生分解性ポリマーは、国際特許公開第ＷＯ２００６０６３２４９号（その全体を参照により本明細書に援用する）に記載されているようなブロックコポリマーまたは国際特許公開第ＷＯ２００６０６３２４９号（その全体を参照により本明細書に援用する）に記載されている方法によって作製されたブロックコポリマーであってよい。

【０９５６】

別の実施形態において、本開示で使用することができる生分解性ポリマーは、アルキル及びシクロアルキルを末端とする生分解性脂質である。非限定的な例として、アルキル及びシクロアルキルを末端とする生分解性脂質は、国際公開第ＷＯ２０１３０８６３２２号に記載されているもの及び／または国際公開第ＷＯ２０１３０８６３２２号（その内容全体を参照により本明細書に援用する）に記載されている方法によって作製されたものであってよい。

【０９５７】
更に別の実施形態において、本開示で使用することができる生分解性ポリマーは、脂質部分に位置する生分解性基を１つ以上有するカチオン性脂質である。非限定的な例として、生分解性脂質は、米国特許出願公開第ＵＳ２０１３０１９５９２０号（その内容全体を参照により本明細書に援用する）に記載されているものであってよい。
【０９５８】
脂質及び／またはポリマーと組み合わせた生分解性リン酸カルシウムナノ粒子は、ｉｎｖｉｖｏでポリヌクレオチドを送達することが示されている。いくつかの実施形態において、アニスアミドなどの標的化リガンドもまた含有し得る、脂質被覆リン酸カルシウムナノ粒子を使用して、ポリヌクレオチド（本開示のポリヌクレオチド）を送達することができる。例えば、マウス転移性肺モデルにおいてｓｉＲＮＡを効果的に送達するために、脂質被覆リン酸カルシウムナノ粒子が使用された（Ｌｉ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｃｏｎｔｒ Ｒｅｌ．２０１０ １４２：４１６－４２１；Ｌｉ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｃｏｎｔｒ Ｒｅｌ．２０１２ １５８：１０８－１１４；Ｙａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ．２０１２ ２０：６０９－６１５、その全体を参照により本明細書に援用する）。この送達系は、ｓｉＲＮＡの送達を改善するために、標的化ナノ粒子と、エンドソーム脱出を向上させる成分であるリン酸カルシウムの両方を組み合わせている。
【０９５９】
いくつかの実施形態において、リン酸カルシウムをＰＥＧポリアニオンブロックコポリマーとともに使用して、ポリヌクレオチドを送達することができる（Ｋａｚｉｋａｗａ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｃｏｎｔｒ Ｒｅｌ．２００４ ９７：３４５－３５６；Ｋａｚｉｋａｗａ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｃｏｎｔｒ Ｒｅｌ．２００６ １１１：３６８－３７０、それぞれの内容全体を参照により本明細書に援用する）。
【０９６０】
いくつかの実施形態において、ＰＥＧ電荷変換ポリマー（Ｐｉｔｅｌｌａ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｍａｔｅｒｉａｌｓ．２０１１ ３２：３１０６－３１１４、その内容全体を参照により本明細書に援用する）を使用してナノ粒子を形成し、本開示のポリヌクレオチドを送達することができる。ＰＥＧ電荷変換ポリマーは、酸性ｐＨで切断されてポリカチオンになることによってエンドソーム脱出を向上させることで、ＰＥＧポリアニオンブロックコポリマーを改善することができる。
【０９６１】
いくつかの実施形態において、本開示で使用されるポリマーは、限定するものではないが、国際特許公開第ＷＯ２０１３０５５３３１号（その全体を参照により本明細書に援用する）に記載されているペンタブロックポリマーなどのペンタブロックポリマーであり得る。非限定的な例として、ペンタブロックポリマーは、ＰＧＡ－ＰＣＬ－ＰＥＧ－ＰＣＬ－ＰＧＡを含み、ＰＥＧはポリエチレングリコール、ＰＣＬはポリ（Ｅ－カプロラクトン）、ＰＧＡはポリ（グリコール酸）、ＰＬＡはポリ（乳酸）である。別の非限定的な例として、ペンタブロックポリマーは、ＰＥＧ－ＰＣＬ－ＰＬＡ－ＰＣＬ－ＰＥＧを含み、ＰＥＧはポリエチレングリコール、ＰＣＬはポリ（Ｅ－カプロラクトン）、ＰＧＡはポリ（グリコール酸）、ＰＬＡはポリ（乳酸）である。
【０９６２】
いくつかの実施形態において、本開示で使用することができるポリマーは、少なくとも１つのジエポキシド及び少なくとも１つのアミノグリコシドを含む（例えば、国際特許公開第ＷＯ２０１３０５５９７１号参照、その内容全体を参照により本明細書に援用する）。ジエポキシドは、１，４ブタンジオールジグリシジルエーテル（１，４Ｂ）、１，４－シクロヘキサンジメタノールジグリシジルエーテル（１，４Ｃ）、４－ビニルシクロヘキセンジエポキシド（４ＶＣＤ）、エチレングリコールジグリシジルエーテル（ＥＤＧＥ）、グリセロールジグリシジルエーテル（ＧＤＥ）、ネオペンチルグリコールジグリシジルエーテル（ＮＰＤＧＥ）、ポリ（エチレングリコール）ジグリシジルエーテル（ＰＥＧＤＥ）、ポリ（プロピレングリコール）ジグリシジルエーテル（ＰＰＧＤＥ）及びレゾルシノ

ールジグリシジルエーテル（ＲＤＥ）から選択することができるが、これらに限定されない。アミノグリコシドは、ストレプトマイシン、ネオマイシン、フラマイセチン、パロモマイシン、リボスタマイシン、カナマイシン、アミカシン、アルベカシン、ベカナマイシン、ジベカシン、トブラマイシン、スペクチノマイシン、ハイグロマイシン、ゲンタマイシン、ネチルマイシン、シソマイシン、イセパマイシン、ベルダマイシン、アストロマイシン及びアプラマイシンから選択することができるが、これらに限定されない。非限定的な例として、ポリマーは、国際特許公開第ＷＯ２０１３０５５９７１号（その内容全体を参照により本明細書に援用する）に記載されている方法によって作製することができる。別の非限定的な例として、少なくとも１つの少なくとも１つのジエポキシド及び少なくとも１つのアミノグリコシドを含むポリマーのいずれかを含む組成物は、国際特許公開第ＷＯ２０１３０５５９７１号（その内容全体を参照により本明細書に援用する）に記載されている方法によって作製することができる。

【０９６３】

いくつかの実施形態において、本開示で使用することができるポリマーは、架橋型ポリマーであり得る。非限定的な例として、架橋型ポリマーを使用して、米国特許第８，４１４，９２７号（その内容全体を参照により本明細書に援用する）に記載されているような粒子を形成することができる。別の非限定的な例として、架橋型ポリマーは、米国特許出願公開第ＵＳ２０１３０１７２６００号（その内容全体を参照により本明細書に援用する）に記載されている方法によって得ることができる。

【０９６４】

別の実施形態において、本開示で使用することができるポリマーは、米国特許第８，４６１，１３２号（その内容全体を参照により本明細書に援用する）に記載されているものなどの架橋型ポリマーであってよい。非限定的な例として、架橋型ポリマーは、体内組織を治療するための治療用組成物に使用することができる。治療用組成物は、注射またはカテーテル法などの当該技術分野において知られている各種方法及び／または本明細書に記載される各種方法を使用して、損傷を受けた組織に投与することができる。

【０９６５】

いくつかの実施形態において、本開示で使用することができるポリマーは、限定するものではないが、国際特許公開第ＷＯ２０１３０４９３２８号（その内容全体を参照により本明細書に援用する）に記載されているものなどのジ脂肪族置換ＰＥＧ化脂質であり得る。

【０９６６】

いくつかの実施形態において、ブロックコポリマーは、ＰＥＧ－ＰＬＧＡ－ＰＥＧ（例えば、感熱性ヒドロゲル（ＰＥＧ－ＰＬＧＡ－ＰＥＧ）は、Ｌｅｅ ｅｔ ａｌ．Ｔｈｅｒｍｏｓｅｎｓｉｔｉｖｅ Ｈｙｄｒｏｇｅｌ ａｓ ａ Ｔｇｆ－β１ Ｇｅｎｅ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ Ｖｅｈｉｃｌｅ Ｅｎｈａｎｃｅｓ Ｄｉａｂｅｔｉｃ Ｗｏｕｎｄ Ｈｅａｌｉｎｇ．Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，２００３ ２０（１２）：１９９５－２０００においてＴＧＦ－β１遺伝子の送達ビヒクルとして使用され、Ｌｉ ｅｔ ａｌ．Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ Ｇｅｎｅ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ Ｓｙｓｔｅｍ Ｂａｓｅｄ ｏｎ Ｔｈｅｒｍｏｓｅｎｓｉｔｉｖｅ Ｂｉｏｄｅｇｒａｄａｂｌｅ Ｈｙｄｒｏｇｅｌ．Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ２００３ ２０（６）：８８４－８８８及び Ｃｈａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｎｏｎ－ｉｏｎｉｃ ａｍｐｈｉｐｈｉｌｉｃ ｂｉｏｄｅｇｒａｄａｂｌｅ ＰＥＧ－ＰＬＧＡ－ＰＥＧ ｃｏｐｏｌｙｍｅｒ ｅｎｈａｎｃｅｓ ｇｅｎｅ ｄｅｌｉｖｅｒｙ ｅｆｆｉｃｉｅｎｃｙ ｉｎ ｒａｔ ｓｋｅｌｅｔａｌ ｍｕｓｃｌｅ．Ｊ Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ Ｒｅｌｅａｓｅ．２００７ １１８：２４５－２５３において制御された遺伝子送達系として使用されたことを参照されたい。それぞれの全体を参照により本明細書に援用する）であり、本開示で使用することができる。本開示は、限定するものではないが、筋肉内投与及び皮下投与などの投与用に、ＰＥＧ－ＰＬＧＡ－ＰＥＧとともに製剤化され得る。

【０９６７】

別の実施形態において、生分解性持続放出系を開発するために、ＰＥＧ－ＰＬＧＡ－ＰＥ

Ｇブロックコポリマーが本開示で使用される。一態様において、本開示のポリヌクレオチドは、投与前に、ブロックコポリマーと混合される。別の態様において、本開示のポリヌクレオチド酸は、ブロックコポリマーと同時投与される。

【０９６８】

いくつかの実施形態において、本開示で使用されるポリマーは、限定するものではないが、米国特許第ＵＳ８４５４９４６号（その内容全体を参照により本明細書に援用する）に記載されているような多官能性Ｎ－マレイミジルポリマー誘導体などの多官能性ポリマー誘導体であり得る。

【０９６９】

コアシェルナノ粒子の使用は、カチオン性架橋型ナノゲルコア及び様々なシェルを合成するために、ハイスループットアプローチに更に焦点を当てている（Ｓｉｅｇｗａｒｔ　ｅｔａｌ．，Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ　ＵＳＡ．２０１１　１０８：１２９９６－１３００１、その内容全体を参照により本明細書に援用する）。ポリマーナノ粒子の複合体形成、送達及び内在化は、ナノ粒子のコアとシェルの両構成成分の化学組成を変えることによって緻密に制御することができる。例えば、コアシェルナノ粒子は、ナノ粒子にコレステロールを共有結合させると、マウス肝細胞にｓｉＲＮＡを効率的に送達することができる。

【０９７０】

いくつかの実施形態において、中間ＰＬＧＡ層を含む中空脂質コアと、ＰＥＧを含有する外側中性脂質層とを使用して、ポリヌクレオチド（本開示のポリヌクレオチド）を送達することができる。非限定的な例として、ルシフェラーゼ発現腫瘍を担持するマウスにおいて、脂質－ポリマー－脂質ハイブリッドナノ粒子が、従来のリポプレックスと比較して、ルシフェラーゼ発現を有意に抑制することが確認された（Ｓｈｉ　ｅｔ　ａｌ，Ａｎｇｅｗ　Ｃｈｅｍ　Ｉｎｔ　Ｅｄ．２０１１　５０：７０２７－７０３１、その全体を参照により本明細書に援用する）。

【０９７１】

いくつかの実施形態において、脂質ナノ粒子は、本明細書で開示されるポリヌクレオチドのコアと、ポリマーシェルとを含み得る。ポリマーシェルは、本明細書に記載されるポリマー及び当該技術分野において知られているポリマーのいずれであってもよい。追加の実施形態において、ポリマーシェルを使用して、コア内のポリヌクレオチドを保護することができる。

【０９７２】

本開示のポリヌクレオチドとともに使用されるコアシェルナノ粒子は、米国特許第８，３１３，７７７号または国際特許公開第ＷＯ２０１３１２４８６７号（それぞれの内容全体を参照により本明細書に援用する）に記載されており、当該特許に記載されている方法によって形成することができる。

【０９７３】

いくつかの実施形態において、コアシェルナノ粒子は、本明細書で開示されるポリヌクレオチドのコアと、ポリマーシェルとを含み得る。ポリマーシェルは、本明細書に記載されるポリマー及び当該技術分野において知られているポリマーのいずれであってもよい。追加の実施形態において、ポリマーシェルを使用して、コア内のポリヌクレオチドを保護することができる。

【０９７４】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される製剤とともに使用されるポリマーは、国際公開第ＷＯ２０１１１２００５３号（その内容全体を参照により本明細書に援用する）に記載されているような修飾ポリマー（限定するものではないが、修飾ポリアセタールなど）であり得る。

【０９７５】

いくつかの実施形態において、製剤は、ポリマー担体と、少なくとも１つの核酸分子とを含む、ポリマー担体カーゴ複合体であり得る。ポリマー担体カーゴ複合体の非限定的な例

は、国際特許公開第ＷＯ２０１３１１３３２６号、同第ＷＯ２０１３１１３５０１号、同第ＷＯ２０１３１１３３２５号、同第ＷＯ２０１３１１３５０２号及び同第ＷＯ２０１３１１３７３６号ならびに欧州特許公開第ＥＰ２６２３１２１号に記載されており、それぞれの内容全体を参照により本明細書に援用する。一態様において、ポリマー担体カーゴ複合体は、限定するものではないが、国際特許公開第ＷＯ２０１３１１３３２５号及び同第ＷＯ２０１３１１３５０２号（それぞれの内容全体を参照により本明細書に援用する）に記載されているものなどの負電荷を帯びた核酸分子を含み得る。

【０９７６】

いくつかの実施形態において、医薬組成物は、本開示のポリヌクレオチドと、ポリマー担体カーゴ複合体とを含み得る（例えば、国際特許公開第ＷＯ２０１３１１３３２６号、同第ＷＯ２０１３１１３５０１号、同第ＷＯ２０１３１１３３２５号、同第ＷＯ２０１３１１３５０２号及び同第ＷＯ２０１３１１３７３６号ならびに欧州特許公開第ＥＰ２６２３１２１号に記載されている抗原参照、それぞれの内容全体を参照により本明細書に援用する）。

【０９７７】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される製剤とともに使用されるポリマーは、国際公開第ＷＯ２０１１１２００５３号（その内容全体を参照により本明細書に援用する）に記載されているような修飾ポリマー（限定するものではないが、修飾ポリアセタールなど）であり得る。

【０９７８】

ペプチド及びタンパク質

本開示はまた、１つ以上のペプチド及び／またはタンパク質を使用した、本明細書に記載されるポリヌクレオチド、すなわち、ＭＣＭポリペプチドをコードするＯＲＦを含むポリヌクレオチドの製剤を含む、医薬組成物を含む。本開示のポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチドによる細胞のトランスフェクションを増加させるために、ペプチド及び／またはタンパク質とともに製剤化され得る。いくつかの実施形態において、限定するものではないが、細胞内送達またはミトコンドリア送達を可能にするタンパク質及びペプチドなどのペプチドを使用して、医薬製剤を送達してもよい。

【０９７９】

ペプチドまたはタンパク質を含む本開示の製剤は、ポリヌクレオチドによる細胞トランスフェクションを増加させ、ポリヌクレオチドの体内分布を変え（例えば、特定の組織または細胞種を標的にすることによって）、かつ／またはコードタンパク質の翻訳を増加させるために使用することができる（例えば、国際公開第ＷＯ２０１２１１０６３６号及び同第ＷＯ２０１３１２３２９８号参照、その内容全体を参照により本明細書に援用する）。

【０９８０】

いくつかの実施形態において、細胞透過性ペプチドは、米国特許出願公開第ＵＳ２０１３０１２９７２６号、同第ＵＳ２０１３０１３７６４４号及び同第ＵＳ２０１３０１６４２１９号（それぞれの全体を参照により本明細書に援用する）に記載されているものであり得るが、これらに限定されない。

【０９８１】

自己組織化高分子

本開示はまた、本明細書に記載されるポリヌクレオチド、すなわち、ＭＣＭポリペプチドをコードするＯＲＦを含むポリヌクレオチドの製剤を、送達用両親媒性高分子（ＡＭ）とともに含む、医薬組成物を含む。ＡＭは、ポリ（エチレングリコール）に共有結合したアルキル化糖骨格を有する、生体適合性両親媒性ポリマーを含む。水溶液中で、ＡＭは自己組織化してミセルを形成する。ＡＭの形成方法及びＡＭの非限定的な例は、米国特許出願公開第ＵＳ２０１３０２１７７５３号に記載されており、その内容全体を参照により本明細書に援用する。

【０９８２】

カチオン及びアニオン

本開示はまた、本明細書に記載されるポリヌクレオチド、すなわち、ＭＣＭポリペプチドをコードするＯＲＦを含むポリヌクレオチドの製剤を、カチオンまたはアニオンとともに含む、医薬組成物を含む。いくつかの実施形態において、製剤は、限定するものではないが、Ｚｎ２＋、Ｃａ２＋、Ｃｕ２＋、Ｍｇ＋及びこれらの組み合わせなどの金属カチオンを含む。非限定的な例として、製剤は、ポリマーと、金属カチオンと錯形成したポリヌクレオチドとを含み得る（例えば、米国特許第６，２６５，３８９号及び同第６，５５５，５２５号参照、それぞれの全体を参照により本明細書に援用する）。

【０９８３】

いくつかの実施形態において、二価及び一価のカチオンの組み合わせを含むカチオン性ナノ粒子が、ポリヌクレオチドとともに製剤化され得る。そのようなナノ粒子は、所定期間（例えば、数時間、数日など）にわたって溶液中で自然発生的に形成され得る。そのようなナノ粒子は、二価カチオン単独の存在下、または一価カチオン単独の存在下では形成されない。カチオン性ナノ粒子またはカチオン性ナノ粒子を含む１つ以上のデポ剤でのポリヌクレオチドの送達は、長時間作用型デポ剤として作用し、かつ／またはヌクレアーゼによる分解速度を低下させることによって、ポリヌクレオチドのバイオアベイラビリティを改善することができる。

【０９８４】

懸濁製剤

本開示はまた、本明細書に記載されるポリヌクレオチド、すなわち、ＭＣＭポリペプチドをコードするＯＲＦを含むポリヌクレオチドの製剤を含む、懸濁液の医薬組成物を含む。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド、水不混和性油デポ剤、界面活性剤及び／もしくは補助界面活性剤ならびに／または共溶媒を含む、懸濁製剤が提供される。油と界面活性剤の組み合わせは、ポリヌクレオチドとの懸濁製剤を可能にし得る。水不混和性デポ剤でのポリヌクレオチドの送達は、デポ剤から周囲の生理学的環境にｍＲＮＡが持続放出されることによりバイオアベイラビリティを改善し、ヌクレアーゼによるポリヌクレオチド分解を阻害するために使用することができる。

【０９８５】

いくつかの実施形態において、ｍＲＮＡの懸濁製剤は、ポリヌクレオチド、油性溶液及び界面活性剤の組み合わせを使用して調製することができる。そのような製剤は、ポリヌクレオチドを含む水相と、油及び界面活性剤を含む油性相とを含む二液系として調製することができる。懸濁製剤のための例示的な油には、ゴマ油及びＭｉｇｌｙｏｌ（飽和ココナツ油及びパーム核油に由来するカプリル脂肪酸及びカプリン脂肪酸とグリセリンまたはプロピレングリコールのエステルを含む）、トウモロコシ油、大豆油、ピーナッツ油、蜜蝋及び／またはパーム核油を挙げることができるが、これらに限定されない。例示的な界面活性剤には、Ｃｒｅｍｏｐｈｏｒ、ポリソルベート２０、ポリソルベート８０、ポリエチレングリコール、トランスクトール、Ｃａｐｍｕｌ（登録商標）、ラブラソール、ミリスチン酸イソプロピル及び／またはＳｐａｎ８０を挙げることができるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、懸濁液は、限定するものではないが、エタノール、グリセロール及び／またはプロピレングリコールを含む、共溶媒を含み得る。

【０９８６】

懸濁剤は、最初に、ポリヌクレオチドの水溶液を含むポリヌクレオチド製剤と、１つ以上の界面活性剤を含む油性相とを調製することによって形成され得る。懸濁剤の形成は、２つの相（水性及び油性）を混合する結果として生じる。いくつかの実施形態において、そのような懸濁剤を水相に加えて、水中油型エマルションを形成してもよい。いくつかの実施形態において、懸濁剤の水相への添加は、水中油型エマルションの形成をもたらし、そのエマルション中で、ポリヌクレオチドを含む油性相は、ナノメートルサイズの液滴からマイクロメートルサイズの液滴の範囲であり得る液滴を形成する。いくつかの実施形態において、油相中にポリヌクレオチドを懸濁させ、かつ／または水性環境中に添加した際に水中油型エマルションを形成するように、油、界面活性剤、補助界面活性剤及び／または共溶媒の特定の組み合わせが利用される。

【０９８７】
いくつかの実施形態において、懸濁剤は、周囲環境へのポリヌクレオチドの放出調節を提供することができる。そのような実施形態において、ポリヌクレオチド放出は、水不混和性デポ剤からの拡散と、その後の周囲環境（例えば、水性環境）への再可溶化によって調節され得る。
【０９８８】
いくつかの実施形態において、水不混和性デポ剤内のポリヌクレオチド（例えば、油相内に懸濁）は、ポリヌクレオチド安定性を変更することができる（例えば、ヌクレアーゼによる分解の変更）。
【０９８９】
いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、注射時に（例えば、水相に添加されたときに）、自然発生的にエマルションを形成するように製剤化され得る。そのような粒子形成は、油相から水相へのポリヌクレオチド放出のために、高い表面積対体積比をもたらし得る。
【０９９０】
いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、限定するものではないが、米国特許第８，４９６，９４５号（その内容全体を参照により本明細書に援用する）に記載されているナノエマルションなどのナノエマルション中に製剤化され得る。ナノエマルションは、本明細書に記載されるナノ粒子を含み得る。非限定的な例として、ナノ粒子は、脂質または界面活性剤層で取り囲まれるか、被覆されていてもよい液体疎水性コアを含み得る。脂質または界面活性剤層は、少なくとも１つの膜組み込みペプチドを含み得、また標的化リガンドも含み得る（例えば、米国特許第８，４９６，９４５号参照、その内容全体を参照により本明細書に援用する）。
【０９９１】
半固形組成物
本開示はまた、本明細書に記載されるポリヌクレオチド、すなわち、ＭＣＭポリペプチドをコードするＯＲＦを含むポリヌクレオチドの製剤を含む、半固形組成物の医薬組成物を含む。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、半固形組成物を形成するために、疎水性マトリックスとともに製剤化され得る。非限定的な例として、半固形組成物またはパスタ様組成物は、国際特許公開第ＷＯ２０１３０７６０４号（その全体を参照により本明細書に援用する）に記載されている方法によって作製することができる。半固形組成物は、国際特許公開第ＷＯ２０１３０７６０４号（その全体を参照により本明細書に援用する）に記載されているような持続放出性製剤であり得る。
【０９９２】
別の実施形態において、半固形組成物は、当該組成物の周りに形成された微孔性膜または生分解性ポリマーを更に有し得る（例えば、国際特許公開第ＷＯ２０１３０７６０４参照、その全体を参照により本明細書に援用する）。
【０９９３】
本開示のポリヌクレオチドを使用した半固形組成物は、国際特許公開第ＷＯ２０１３０７６０４号（その全体を参照により本明細書に援用する）に記載されるような半固形混合物の特徴を有し得る（例えば、少なくとも１０$^{-4}$Ｎ・ｍｍ$^{-2}$の弾性率、及び／または少なくとも１００ｍＰａ・ｓの粘性）。
【０９９４】
外科用シーラント：ゲル及びヒドロゲル
本開示はまた、本明細書に記載されるポリヌクレオチド、すなわち、ＭＣＭポリペプチドをコードするＯＲＦを含むポリヌクレオチドの製剤を、外科用シーラントとともに含む、医薬組成物を含む。いくつかの実施形態において、本明細書で開示されるポリヌクレオチドは、対象に注射されたときにゲルを形成することができる、当該技術分野において知られている任意のヒドロゲル中に封入され得る。ゲル及びヒドロゲルなどの外科用シーラントは、国際特許出願ＰＣＴ／ＵＳ２０１４／０２７０７７号に記載されており、その内容

全体を参照により本明細書に援用する。
【０９９５】
コンジュゲート
本開示は、本明細書に記載されるポリヌクレオチド、すなわち、ＭＣＭポリペプチドをコードするＯＲＦを含むポリヌクレオチドのコンジュゲートを含む、医薬組成物を含む。本開示のポリヌクレオチドは、担体もしくは標的化基に共有結合したポリヌクレオチド、または融合タンパク質を一緒に産生する２つのコーディング領域を含む（例えば、標的化基及び治療用タンパク質またはペプチドを有する）ポリヌクレオチドなどのコンジュゲートを含む。
【０９９６】
本開示のコンジュゲートには、タンパク質（例えば、ヒト血清アルブミン（ＨＳＡ）、低密度リポタンパク質（ＬＤＬ）、高密度リポタンパク質（ＨＤＬ）、またはグロブリン）、炭水化物（例えば、デキストラン、プルラン、キチン、キトサン、イヌリン、シクロデキストリンまたはヒアルロン酸）、または脂質などの天然物質が含まれる。リガンドはまた、合成ポリマー、例えば、合成ポリアミノ酸、オリゴヌクレオチド（例えば、アプタマー）などの組み換え分子または合成分子であり得る。ポリアミノ酸の例には、ポリリシン（ＰＬＬ）、ポリＬ－アスパラギン酸、ポリＬ－グルタミン酸、スチレン－無水マレイン酸コポリマー、ポリ（Ｌ－ラクチド－ｃｏ－グリコリド）コポリマー、ジビニルエーテル－無水マレイン酸コポリマー、Ｎ－（２－ヒドロキシプロピル）メタクリルアミドコポリマー（ＨＭＰＡ）、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、ポリビニルアルコール（ＰＶＡ）、ポリウレタン、ポリ（２－エチルアクリル酸）、Ｎ－イソプロピルアクリルアミドポリマーまたはポリホスファジンが挙げられる。ポリアミンの例には、ポリエチレンイミン、ポリリシン（ＰＬＬ）、スペルミン、スペルミジン、ポリアミン、偽ペプチド－ポリアミン、ペプチド模倣ポリアミン、デンドリマーポリアミン、アルギニン、アミジン、プロタミン、カチオン性脂質、カチオン性ポルフィリン、ポリアミンの四級塩またはα螺旋状ペプチドが挙げられる。
【０９９７】
いくつかの実施形態において、本開示のコンジュゲートは、本開示のポリヌクレオチドの担体として機能し得る。コンジュゲートは、限定するものではないが、ポリ（エチレングリコール）にグラフト化され得る、ポリアミン、ポリリシン、ポリアルキレンイミン及びポリエチレンイミンなどのカチオン性ポリマーを含み得る。非限定的な例として、コンジュゲートは、米国特許第６，５８６，５２４号（その全体を参照により本明細書に援用する）に記載されているポリマーコンジュゲート及びポリマーコンジュゲートの合成方法に類似のものであってよい。
【０９９８】
基質にコンジュゲートするための方法の非限定的な例は、米国特許出願公開第ＵＳ２０１３０２１１２４９号に記載されており、その内容全体を参照により本明細書に援用する。当該方法を使用して、ポリヌクレオチドを含む、コンジュゲートされたポリマー粒子を作製することができる。
【０９９９】
コンジュゲートはまた、標的化基、例えば、細胞または組織標的化物質、例えば、レクチン、糖タンパク質、脂質またはタンパク質、例えば、腎細胞などの特定細胞種に結合する抗体を含み得る。標的化基は、サイロトロピン、メラノトロピン、レクチン、糖タンパク質、サーファクタントプロテインＡ、ムチン炭水化物、多価ラクトース、多価ガラクトース、Ｎ－アセチル－ガラクトサミン、Ｎ－アセチル－グルコサミン多価マンノース、多価フコース、グリコシル化ポリアミノ酸、多価ガラクトース、トランスフェリン、ビスホスホネート、ポリグルタミン酸、ポリアスパラギン酸、脂質、コレステロール、ステロイド、胆汁酸、葉酸、ビタミンＢ１２、ビオチン、ＲＧＤペプチド、ＲＧＤペプチドミメティックまたはアプタマーであってよい。
【１０００】

標的化基は、タンパク質、例えば、糖タンパク質もしくはペプチド、例えば、共リガンドに対して特異的親和性を有する分子、または抗体、例えば、がん細胞、内皮細胞もしくは骨細胞などの特定細胞種に結合する抗体であってよい。標的化基にはまた、ホルモン及びホルモン受容体が含まれ得る。これらには、脂質、レクチン、炭水化物、ビタミン、補因子、多価ラクトース、多価ガラクトース、Ｎ－アセチル－ガラクトサミン、Ｎ－アセチル－グルコサミン　多価マンノース、多価フルコースまたはアプタマーなどの非ペプチド種が含まれ得る。リガンドは、例えば、リポ多糖体またはｐ３８　ＭＡＰキナーゼのアクチベーターであり得る。

【１００１】

標的化基は、特定の受容体を標的にすることができる任意のリガンドであり得る。例としては、限定するものではないが、葉酸、ＧａｌＮＡｃ、ガラクトース、マンノース、マンノース－６Ｐ、アパタマー、インテグリン受容体リガンド、ケモカイン受容体リガンド、トランスフェリン、ビオチン、セロトニン受容体リガンド、ＰＳＭＡ、エンドセリン、ＧＣＰＩＩ、ソマトスタチン、ＬＤＬ及びＨＤＬリガンドが挙げられる。具体的な実施形態において、標的化基は、アプタマーである。アプタマーは、非修飾であってもよいし、本明細書で開示される修飾の任意の組み合わせを有してもよい。

【１００２】

非限定的な例として、標的化基は、血液中枢神経系関門を通過する標的化送達のためのグルタチオン受容体（ＧＲ）結合コンジュゲートであり得る（例えば、米国特許出願公開第ＵＳ２０１３０２１６６１０１２号参照、その内容全体を参照により本明細書に援用する）。

【１００３】

いくつかの実施形態において、本開示のコンジュゲートは、相乗性生体分子ポリマーコンジュゲートであり得る。相乗性生体分子ポリマーコンジュゲートは、より大きな治療有効性をもたらすための長時間作用性連続放出系であり得る。相乗性生体分子ポリマーコンジュゲートは、米国特許出願公開第ＵＳ２０１３０１９５７９９号（その内容全体を参照により本明細書に援用する）に記載されているものであってよい。

【１００４】

別の実施形態において、本開示で使用することができるコンジュゲートは、アプタマーコンジュゲートであり得る。アパタマーコンジュゲートの非限定的な例は、国際特許公開第ＷＯ２０１２０４０５２４号に記載されており、その内容全体を参照により本明細書に援用する。アプタマーコンジュゲートを使用して、ポリヌクレオチドを含む製剤の標的化送達を提供することができる。

【１００５】

いくつかの実施形態において、本開示で使用することができるコンジュゲートは、アミン含有ポリマーコンジュゲートであり得る。アミン含有ポリマーコンジュゲートの非限定的な例は、米国特許第ＵＳ８，５０７，６５３号に記載されており、その内容全体を参照により本明細書に援用する。

【１００６】

いくつかの実施形態において、本開示の医薬組成物は、限定するものではないが、ロックド核酸に類似した修飾などの化学修飾を含み得る。

【１００７】

Ｓａｎｔａｒｉｓによるものなどのロックド核酸（ＬＮＡ）の調製を教示する代表的な米国特許には、次のものが挙げられるが、これらに限定されない：米国特許第６，２６８，４９０号、同第６，６７０，４６１号、同第６，７９４，４９９号、同第６，９９８，４８４号、同第７，０５３，２０７号、同第７，０８４，１２５号及び同第７，３９９，８４５号（それぞれの全体を参照により本明細書に援用する）。

【１００８】

ＰＮＡ化合物の調製を教示する代表的な米国特許には、米国特許第５，５３９，０８２号、同第５，７１４，３３１号及び同第５，７１９，２６２号（それぞれを参照により本明

細書に援用する）が挙げられるが、これらに限定されない。ＰＮＡ化合物の更なる教示は、例えば、Ｎｉｅｌｓｅｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ，１９９１，２５４，１４９７－１５００に認めることができる。

【１００９】

本開示で取り上げられるいくつかの実施形態は、ホスホロチオエート骨格を含むポリヌクレオチド、ならびに他の修飾骨格、特に、先述の米国特許第５，４８９，６７７号の－ＣＨ２－ＮＨ－ＣＨ２－、－ＣＨ２－Ｎ（ＣＨ３）－Ｏ－ＣＨ２－［メチレン（メチルイミノ）またはＭＭＩ骨格として知られる］、－ＣＨ２－Ｏ－Ｎ（ＣＨ３）－ＣＨ２－、－ＣＨ２－Ｎ（ＣＨ３）－Ｎ（ＣＨ３）－ＣＨ２－及び－Ｎ（ＣＨ３）－ＣＨ２－ＣＨ２－［天然ホスホジエステル骨格は－Ｏ－Ｐ（Ｏ）２－Ｏ－ＣＨ２－で表される］及び上述の米国特許第５，６０２，２４０号のアミド骨格を含むオリゴヌクレオシドを含む。いくつかの実施形態において、本明細書で取り上げられるポリヌクレオチドは、上述の米国特許第５，０３４，５０６号のモルホリノ骨格構造を有する。

【１０１０】

２'位における修飾もまた送達を促進し得る。例えば、２'位における修飾は、ポリペプチドコーディング配列中に位置せず、すなわち、翻訳可能領域中に位置しない。２'位における修飾は、５'ＵＴＲ、３'ＵＴＲ及び／またはテーリング領域中に位置し得る。２'位における修飾は、次のうちの１つを２'位に含み得る：Ｈ（すなわち、２'－デオキシ）；Ｆ；Ｏ－、Ｓ－もしくはＮ－アルキル；Ｏ－、Ｓ－もしくはＮ－アルケニル；Ｏ－、Ｓ－もしくはＮ－アルキニル；またはＯ－アルキル－Ｏ－アルキル（ここで、アルキル、アルケニル及びアルキニルは、置換または無置換のＣ１～Ｃ１０アルキルまたはＣ２～Ｃ１０アルケニル及びアルキニルであってよい）。例示的な好適な修飾には、Ｏ［（ＣＨ２）ｎＯ］ｍＣＨ３、Ｏ（ＣＨ２）．ｎＯＣＨ３、Ｏ（ＣＨ２）ｎＮＨ２、Ｏ（ＣＨ２）ｎＣＨ３、Ｏ（ＣＨ２）ｎＯＮＨ２、及びＯ（ＣＨ２）ｎＯＮ［（ＣＨ２）ｎＣＨ３）］２（ここで、ｎ及びｍは、１～約１０である）が挙げられる。他の実施形態において、ポリヌクレオチドは、次のうちの１つを２'位に含み得る：Ｃ１～Ｃ１０低級アルキル、置換低級アルキル、アルカリル、アラルキル、Ｏ－アルカリルまたはＯ－アラルキル、ＳＨ、ＳＣＨ３、ＯＣＮ、Ｃｌ、Ｂｒ、ＣＮ、ＣＦ３、ＯＣＦ３、ＳＯＣＨ３、ＳＯ２ＣＨ３、ＯＮＯ２、ＮＯ２、Ｎ３、ＮＨ２、ヘテロシクロアルキル、ヘテロシクロアルカリル、アミノアルキルアミノ、ポリアルキルアミノ、置換シリル、ＲＮＡ切断基、レポーター基、インターカレーター、薬物動態特性を改善する基または薬力学的特性を改善する基及び類似の特性を有する他の置換基。いくつかの実施形態において、修飾には、２'－メトキシエトキシ（２'－Ｏ－ＣＨ２ＣＨ２ＯＣＨ３、また２'－Ｏ－（２－メトキシエチル）または２'－ＭＯＥとしても知られる）（Ｍａｒｔｉｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｈｅｌｖ．Ｃｈｉｍ．Ａｃｔａ，１９９５，７８：４８６－５０４）、すなわち、アルコキシ－アルコキシ基が含まれる。別の例示的な修飾には、本明細書の以下の実施例に記載されているような２'－ジメチルアミノオキシエトキシ、すなわち、Ｏ（ＣＨ２）２ＯＮ（ＣＨ３）２基（２'－ＤＭＡＯＥとしても知られる）及び本明細書の以下の実施例にも記載されているような２'－ジメチルアミノエトキシエトキシ（当該技術分野において２'－Ｏ－ジメチルアミノエトキシエチルまたは２'－ＤＭＡＥＯＥとしても知られる）、すなわち、２'－Ｏ－ＣＨ２－Ｏ－ＣＨ２－Ｎ（ＣＨ２）２が挙げられる。他の修飾には、２'－メトキシ（２'－ＯＣＨ３）、２'－アミノプロポキシ（２'－ＯＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２ＮＨ２）及び２'－フルオロ（２'－Ｆ）が含まれる。また、類似の修飾を他の位置、特に３'末端ヌクレオチド上または２'－５'結合ｄｓＲＮＡ中の糖の３’位、及び５'末端ヌクレオチドの５’位に行ってもよい。本開示のポリヌクレオチドはまた、ペントフラノシル糖に代えて、シクロブチル部分などの糖模倣体を有し得る。そのような修飾糖構造の調製を教示する代表的な米国特許には、米国特許第４，９８１，９５７号、同第５，１１８，８００号、同第５，３１９，０８０号、同第５，３５９，０４４号、同第５，３９３，８７８号、同第５，４４６，１３７号、同第５，４６６，７８６号、同第５，５１４，７８５号、同第５，５１９，１３４号、同第５，５６７，８１１号、同第５，５７６，４２７号、同第５，５９１，７２２号、同第５，５９７，９

０９号、同第５，６１０，３００号、同第５，６２７，０５３号、同第５，６３９，８７３号、同第５，６４６，２６５号、同第５，６５８，８７３号、同第５，６７０，６３３号及び同第５，７００，９２０号（それぞれの内容全体を参照により本明細書に援用する）が挙げられるが、これらに限定されない。

【１０１１】

更に他の実施形態において、ポリヌクレオチドは、細胞透過性ポリペプチドに共有結合的にコンジュゲートされる。細胞透過性ペプチドはまた、シグナル配列またはターゲティング配列を含み得る。本開示のコンジュゲートは、安定性を高め、細胞トランスフェクションを増加させ、かつ／または体内分布を変える（例えば、特定の組織または細胞種に標的化する）ように設計することができる。

【１０１２】

いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、送達を高めるための作用物質にコンジュゲートされ得る。非限定的な例として、作用物質は、国際公開第ＷＯ２０１１０６２９６５号（その全体を参照により本明細書に援用する）に記載されているような標的化ブロックを有する標的化モノマーまたはポリマーなどのモノマーまたはポリマーであり得る。別の非限定的な例において、作用物質は、本開示のポリヌクレオチドに共有結合される輸送作用物質であり得る（例えば、米国特許第６，８３５．３９３号及び同第７，３７４，７７８号参照、それぞれの全体を参照により本明細書に援用する）。更に別の非限定的な例において、作用物質は、米国特許第７，７３７，１０８号及び同第８，００３，１２９号（それぞれの全体を参照により本明細書に援用する）に記載されているものなどの膜関門輸送促進作用物質であり得る。

【１０１３】

別の実施形態において、ポリヌクレオチドは、ＳＭＡＲＴＴ　ＰＯＬＹＭＥＲ　ＴＥＣＨＮＯＬＯＧＹ（登録商標）（ＰＨＡＳＥＲＸ（登録商標），Ｉｎｃ．（Ｓｅａｔｔｌｅ，ＷＡ））にコンジュゲートされ得る。

【１０１４】

別の態様において、コンジュゲートは、組織または器官中でニューロンにナノ粒子を選択的に誘導するペプチドであり得る。非限定的な例として、使用されるペプチドは、米国特許出願公開第ＵＳ２０１３０１２９６２７号（その全体を参照により本明細書に援用する）に記載されているペプチドであり得るが、これらに限定されない。

【１０１５】

更に別の態様において、コンジュゲートは、血液脳関門の通過を助けることができるペプチドであり得る。

【１０１６】

ナノ粒子製剤

自己組織化ナノ粒子

本開示はまた、本明細書に記載されるポリヌクレオチド、すなわち、ＭＣＭポリペプチドをコードするＯＲＦを含むポリヌクレオチドの製剤を、自己組織化ナノ粒子とともに含む、医薬組成物を含む。核酸自己組織化ナノ粒子は、国際特許出願第ＰＣＴ／ＵＳ２０１４／０２７０７７号（その内容全体を参照により本明細書に援用する）の段落［０００７４０］～［０００７４３］に記載されている。ポリマー系自己組織化ナノ粒子は、国際特許出願第ＰＣＴ／ＵＳ２０１４／０２７０７７号に記載されており、その内容全体を参照により本明細書に援用する。

【１０１７】

ナノ粒子模倣体

本開示は、本明細書に記載されるポリヌクレオチド、すなわち、ＭＣＭポリペプチドをコードするＯＲＦを含むポリヌクレオチドのナノ粒子模倣体製剤を含む、医薬組成物を含む。いくつかの実施形態において、本開示のポリヌクレオチドは、ナノ粒子模倣体中に封入され、及び／またはナノ粒子模倣体に吸収される。ナノ粒子模倣体は、限定するものではないが、病原体、ウイルス、細菌、真菌、寄生生物、プリオン及び細胞などの送達機能生

物または粒子を模倣することができる。非限定的な例として、本開示のポリヌクレオチドは、ウイルスの送達機能を模倣することができる非ヴィロン粒子中に封入され得る（国際公開第ＷＯ２０１２００６３７６号ならびに米国特許出願公開第ＵＳ２０１３０１７１２４１号及び同第ＵＳ２０１３０１９５９６８号参照、それぞれの内容全体を参照により本明細書に援用する）。

【１０１８】

ナノチューブ

本開示は、本明細書に記載されるポリヌクレオチド、すなわち、ＭＣＭポリペプチドをコードするＯＲＦを含むポリヌクレオチドのナノチューブ製剤を含む、医薬組成物を含む。本開示のポリヌクレオチドは、限定するものではないが、ロゼットナノチューブ、リンカーを含む対塩基を有するロゼットナノチューブ、カーボンナノチューブ及び／または単層カーボンナノチューブなどの少なくとも１つのナノチューブに付着または別様に結合することができる。ポリヌクレオチドは、限定するものではないが、立体結合力、イオン結合力、共有結合力及び／または他の力などの力を介してナノチューブに結合され得る。ナノチューブ及びポリヌクレオチドを含むナノチューブ製剤は、国際特許出願第ＰＣＴ／ＵＳ２０１４／０２７０７７号に記載されており、その内容全体を参照により本明細書に援用する。

【１０１９】

無機ナノ粒子

本開示はまた、本明細書に記載されるポリヌクレオチド、すなわち、ＭＣＭポリペプチドをコードするＯＲＦを含むポリヌクレオチドの製剤を含む、無機ナノ粒子の医薬組成物を含む。例示的な方法は、米国特許第８，２５７，７４５号に提供されており、その全体を参照により本明細書に援用する。無機ナノ粒子には、水膨潤性のクレイ物質が含まれ得るが、これらに限定されない。非限定的な例として、無機ナノ粒子には、単純なケイ酸塩から作製される合成スメクタイトクレイが挙げられる（例えば、米国特許第５，５８５，１０８号及び同第８，２５７，７４５号参照、それぞれの全体を参照により本明細書に援用する）。

【１０２０】

いくつかの実施形態において、無機ナノ粒子は、本明細書で開示されるポリヌクレオチドのコアと、ポリマーシェルとを含み得る。ポリマーシェルは、本明細書に記載されるポリマー及び当該技術分野において知られているポリマーのいずれであってもよい。追加の実施形態において、ポリマーシェルを使用して、コア内のポリヌクレオチドを保護することができる。

【１０２１】

半導電性及び金属性ナノ粒子

本開示はまた、本明細書に記載されるポリヌクレオチド、すなわち、ＭＣＭポリペプチドをコードするＯＲＦを含むポリヌクレオチドの製剤を、半導電性または金属性材料を含む水分散性ナノ粒子（米国特許出願公開第２０１２０２２８５６５号、その全体を参照により本明細書に援用する）とともに含むか、磁性ナノ粒子中に形成される（米国特許出願公開第２０１２０２６５００１号及び同第２０１２０２８３５０３号、それぞれの全体を参照により本明細書に援用する）医薬組成物を含む。水分散性ナノ粒子は、疎水性ナノ粒子または親水性ナノ粒子であり得る。

【１０２２】

いくつかの実施形態において、半導電性及び／または金属性ナノ粒子は、本明細書で開示されるポリヌクレオチドのコアと、ポリマーシェルとを含み得る。ポリマーシェルは、本明細書に記載されるポリマー及び当該技術分野において知られているポリマーのいずれであってもよい。追加の実施形態において、ポリマーシェルを使用して、コア内のポリヌクレオチドを保護することができる。

【１０２３】

成形ナノ粒子及び微粒子

本開示はまた、本明細書に記載されるポリヌクレオチド、すなわち、ＭＣＭポリペプチドをコードするＯＲＦを含むポリヌクレオチドの製剤を含む、ナノ粒子及び／またはマイクロ粒子の医薬組成物を含む。これらのナノ粒子及び／またはマイクロ粒子は、任意の大きさ形状及び化学的性質に成形され得る。一例として、ナノ粒子及び／またはマイクロ粒子は、ＬＩＱＵＩＤＡ　ＴＥＣＨＮＯＬＯＧＩＥＳ（登録商標）（Ｍｏｒｒｉｓｖｉｌｌｅ，ＮＣ）によるＰＲＩＮＴ（登録商標）技術を使用して作製することができる（例えば、国際公開第ＷＯ２００７０２４３２３号参照、その内容全体を参照により本明細書に援用する）。

【１０２４】

いくつかの実施形態において、成形ナノ粒子は、本明細書で開示されるポリヌクレオチドのコアと、ポリマーシェルとを含み得る。ポリマーシェルは、本明細書に記載されるポリマー及び当該技術分野において知られているポリマーのいずれであってもよい。追加の実施形態において、ポリマーシェルを使用して、コア内のポリヌクレオチドを保護することができる。

【１０２５】

いくつかの実施形態において、本開示のポリヌクレオチドは、マイクロ粒子中に製剤化され得る。マイクロ粒子は、ポリヌクレオチドのコアと、生体適合性及び／または生分解性ポリマーの外層とを含有し得る。非限定的な例として、本開示とともに使用することができるマイクロ粒子は、米国特許第８，４６０，７０９号、米国特許出願公開第ＵＳ２０１３０１２９８３０号及び国際特許公開第ＷＯ２０１３０７５０６８号（それぞれの全体を参照により本明細書に援用する）に記載されているものであってよい。別の非限定的な例として、マイクロ粒子は、所望の期間にわたって本開示のポリヌクレオチドの放出を延長するように設計することができる（例えば、米国特許出願公開第ＵＳ２０１３０１２９８３０号（その全体を参照により本明細書に援用する）における治療用タンパク質の長期放出を参照されたい）。

【１０２６】

本開示とともに使用されるマイクロ粒子は、少なくとも１マイクロメートル～少なくとも１００マイクロメートル（例えば、少なくとも１マイクロメートル、少なくとも５マイクロメートル、少なくとも１０マイクロメートル、少なくとも１５マイクロメートル、少なくとも２０マイクロメートル、少なくとも２５マイクロメートル、少なくとも３０マイクロメートル、少なくとも３５マイクロメートル、少なくとも４０マイクロメートル、少なくとも４５マイクロメートル、少なくとも５０マイクロメートル、少なくとも５５マイクロメートル、少なくとも６０マイクロメートル、少なくとも６５マイクロメートル、少なくとも７０マイクロメートル、少なくとも７５マイクロメートル、少なくとも８０マイクロメートル、少なくとも８５マイクロメートル、少なくとも９０マイクロメートル、少なくとも９５マイクロメートル、少なくとも９７マイクロメートル、少なくとも９９マイクロメートル及び少なくとも１００マイクロメートル）の直径を有し得る。

【１０２７】

ＮａｎｏＪａｃｋｅｔ及びＮａｎｏＬｉｐｏｓｏｍｅ

本開示はまた、本明細書に記載されるポリヌクレオチド、すなわち、ＭＣＭポリペプチドをコードするＯＲＦを含むポリヌクレオチドの製剤を、Ｋｅｙｓｔｏｎｅ　Ｎａｎｏ（Ｓｔａｔｅ　Ｃｏｌｌｅｇｅ，ＰＡ）によるＮａｎｏＪａｃｋｅｔ及びＮａｎｏＬｉｐｏｓｏｍｅとともに含む、医薬組成物を含む。ＮａｎｏＪａｃｋｅｔは、カルシウム、リン酸を含む体内で天然に認められる化合物からできており、また少量のケイ酸塩も含み得る。Ｎａｎｏｊａｃｋｅｔは、サイズが５～５０ｎｍの範囲であり得、限定するものではないが、ポリヌクレオチドなどの親水性及び疎水性化合物を送達するために使用することができる。

【１０２８】

ＮａｎｏＬｉｐｏｓｏｍｅは、限定するものではないが、体内で天然に生じる脂質などの脂質からできている。ＮａｎｏＬｉｐｏｓｏｍｅは、サイズが６０～８０ｎｍの範囲であ

り得、限定するものではないが、ポリヌクレオチドなどの親水性及び疎水性化合物を送達するために使用することができる。一態様において、本明細書で開示されるポリヌクレオチドは、限定するものではないが、Ｃｅｒａｍｉｄｅ ＮａｎｏＬｉｐｏｓｏｍｅなどのＮａｎｏＬｉｐｏｓｏｍｅ中に製剤化され得る。細胞

【１０２９】

本開示はまた、本明細書に記載されるポリヌクレオチド、すなわち、ＭＣＭポリペプチドをコードするＯＲＦを含むポリヌクレオチドを含む、細胞を含む。本開示のポリヌクレオチドは、ｅｘ ｖｉｖｏで細胞にトランスフェクトすることができ、その後、対象に移植される。非限定的な例として、医薬組成物は、修飾ＲＮＡを肝臓及び骨髄細胞に送達するための赤血球、ウイルス様粒子（ＶＬＰ）内の修飾ＲＮＡを送達するためのビロソーム、ならびに限定するものではないが、ＭＡＸＣＹＴＥ（登録商標）（Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｕｒｇ，ＭＤ）及びＥＲＹＴＥＣＨ（登録商標）（Ｌｙｏｎ，Ｆｒａｎｃｅ）によるものなどの修飾ＲＮＡを送達するためにエレクトロポレーション処理された細胞を含み得る。ポリヌクレオチド以外のペイロードを送達するための赤血球、ウイルス性粒子及びエレクトロポレーション処理された細胞の使用例が報告されている（Ｇｏｄｆｒｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｅｘｐｅｒｔ Ｏｐｉｎ Ｂｉｏｌ Ｔｈｅｒ．２０１２ １２：１２７－１３３；Ｆａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｅｘｐｅｒｔ Ｏｐｉｎ Ｂｉｏｌ Ｔｈｅｒ．２０１２ １２：３８５－３８９；Ｈｕ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ．２０１１ １０８：１０９８０－１０９８５；Ｌｕｎｄ ｅｔ ａｌ．，Ｐｈａｒｍ Ｒｅｓ．２０１０ ２７：４００－４２０；Ｈｕｃｋｒｉｅｄｅ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｌｉｐｏｓｏｍｅ Ｒｅｓ．２００７；１７：３９－４７；Ｃｕｓｉ，Ｈｕｍ Ｖａｃｃｉｎ．２００６ ２：１－７；ｄｅ Ｊｏｎｇｅ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．２００６ １３：４００－４１１、これらの全ての全体を参照により本明細書に援用する）。

【１０３０】

ポリヌクレオチドは、国際公開第ＷＯ２０１１０８５２３１号及び同第ＷＯ２０１３１１６６５６号ならびに米国特許出願公開第２０１１０１７１２４８号（それぞれの内容全体を参照により本明細書に援用する）に記載されている方法によって合成された合成ＶＬＰで送達され得る。

【１０３１】

本開示のポリヌクレオチドの細胞ベース製剤は、細胞トランスフェクションを確実にし（例えば、細胞内担体）、ポリヌクレオチドの体内分布を変え（例えば、細胞担体を特定の組織または細胞種に標的化することによって）、かつ／またはコードタンパク質の翻訳を増加させるために使用することができる。

【１０３２】

核酸を細胞に導入するには、ウイルス及び非ウイルス媒介性技法を含む、種々の方法が当該技術分野において知られており、好適である。典型的な非ウイルス媒介性技法の例には、エレクトロポレーション、リン酸カルシウムによる移入、ヌクレオフェクション、ソノポレーション、ヒートショック、マグネトフェクション、リポソームによる移入、マイクロインジェクション、微粒子銃による移入（ナノ粒子）、カチオン性ポリマーによる移入（ＤＥＡＥ－デキストラン、ポリエチレンイミン、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）など）または細胞融合が挙げられるが、これらに限定されない。

【１０３３】

ソノポレーションまたは細胞超音波処理の技法は、細胞原形質膜の透過性を変更するために音波（例えば、超音波の周波数）を使用するものである。ソノポレーション法は、当業者に知られており、ｉｎ ｖｉｖｏで核酸を送達するために使用される（Ｙｏｏｎ ａｎｄ Ｐａｒｋ，Ｅｘｐｅｒｔ Ｏｐｉｎ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖ．２０１０ ７：３２１－３３０；Ｐｏｓｔｅｍａ ａｎｄ Ｇｉｌｊａ，Ｃｕｒｒ Ｐｈａｒｍ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２００７ ８：３５５－３６１；Ｎｅｗｍａｎ ａｎｄ Ｂｅｔｔｉｎｇｅｒ，Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．２００７ １４：４６５－４７５、これらの全ての全体を参照により本明細書に援用する）。ソノポレーション法は、当該技術分野において知られており、また、例え

ば、細菌に関する場合には、米国特許出願公開第２０１００１９６９８３号において、他の細胞種に関する場合には、例えば、米国特許出願公開第２０１００００９４２４号において教示されている（それぞれの全体を参照により本明細書に援用する）。

【１０３４】

エレクトロポレーション法もまた当該技術分野においてよく知られており、ｉｎ ｖｉｖｏ及び臨床的に核酸を送達するのに使用される（Ａｎｄｒｅ ｅｔ ａｌ．，Ｃｕｒｒ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．２０１０ １０：２６７－２８０；Ｃｈｉａｒｅｌｌａ ｅｔ ａｌ．，Ｃｕｒｒ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．２０１０ １０：２８１－２８６；Ｈｏｊｍａｎ，Ｃｕｒｒ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．２０１０ １０：１２８－１３８、これらの全ての全体を参照により本明細書に援用する）。エレクトロポレーション装置は、限定するものではないが、ＢＴＸ（登録商標）Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ（Ｈｏｌｌｉｓｔｏｎ，ＭＡ）（例えば、ＡｇｉｌｅＰｕｌｓｅ Ｉｎ Ｖｉｖｏ Ｓｙｓｔｅｍ）及びＩｎｏｖｉｏ（Ｂｌｕｅ Ｂｅｌｌ，ＰＡ）（例えば、Ｉｎｏｖｉｏ ＳＰ－５Ｐ筋肉内送達装置またはＣＥＬＬＥＣＴＲＡ（登録商標）３０００皮内送達装置）を含め、世界の多くの企業によって販売されている。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、エレクトロポレーションによって送達され得る。

【１０３５】

いくつかの実施形態において、細胞は、哺乳動物細胞、細菌細胞、植物、微生物、藻類及び真菌細胞からなる群から選択される。いくつかの実施形態において、細胞は、限定するものではないが、ヒト、マウス、ラット、ヤギ、ウマ、ウサギ、ハムスターまたはウシの細胞などの哺乳動物細胞である。更なる実施形態において、細胞は、限定するものではないが、ＨｅＬａ、ＮＳ０、ＳＰ２／０、ＫＥＫ２９３Ｔ、Ｖｅｒｏ、Ｃａｃｏ、Ｃａｃｏ－２、ＭＤＣＫ、ＣＯＳ－１、ＣＯＳ－７、Ｋ５６２、Ｊｕｒｋａｔ、ＣＨＯ－Ｋ１、ＤＧ４４、ＣＨＯＫ１ＳＶ、ＣＨＯ－Ｓ、Ｈｕｖｅｃ、ＣＶ－１、Ｈｕｈ－７、ＮＩＨ３Ｔ３、ＨＥＫ２９３、２９３、Ａ５４９、ＨｅｐＧ２、ＩＭＲ－９０、ＭＣＦ－７、Ｕ－２０Ｓ、Ｐｅｒ．Ｃ６、ＳＦ９、ＳＦ２１またはチャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞を含む、確立された細胞系に由来し得る。

【１０３６】

特定の実施形態において、細胞は、限定するものではないが、クリソスポリウム属細胞、アスペルギルス属細胞、トリコデルマ属細胞、ディクチオステリウム属細胞、カンジダ属細胞、サッカロミセス属細胞、シゾサッカロマイセス属細胞及びペニシリウム属細胞などの真菌細胞である。

【１０３７】

特定の実施形態において、細胞は、限定するものではないが、Ｅ．ｃｏｌｉ、Ｂ．ｓｕｂｔｉｌｉｓまたはＢＬ２１細胞などの細菌細胞である。本開示の方法によってトランスフェクトされる初代細胞及び二代細胞は、種々の組織から得ることができ、培養中に維持され得る全ての細胞種を含むが、これらに限定されない。例えば、本開示の方法によってトランスフェクトされ得る初代細胞及び二代細胞には、線維芽細胞、ケラチノサイト、上皮細胞（例えば、乳腺上皮細胞、腸管上皮細胞）、内皮細胞、グリア細胞、神経細胞、血液形成要素（例えば、リンパ球、骨髄細胞）、筋肉細胞及びこれらの体細胞種の前駆体が挙げられるが、これらに限定されない。初代細胞はまた、同一生物種または別の生物種（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ネコ、イヌ、ブタ、ウシ、トリ、ヒツジ、ヤギ、ウマ）のドナーから得ることもできる。

【１０３８】

ミニ細胞

本開示はまた、本明細書に記載されるポリヌクレオチド、すなわち、ＭＣＭポリペプチドをコードするＯＲＦを含むポリヌクレオチドを含む、ミニ細胞を含む。一態様において、ポリヌクレオチドは、細菌ミニ細胞中に製剤化され得る。非限定的な例として、細菌ミニ細胞は、国際公開第ＷＯ２０１３０８８２５０号または米国特許出願公開第ＵＳ２０１３０１７７４９９号（それぞれの内容全体を参照により本明細書に援用する）に記載されて

いるものであり得る。
【１０３９】
マイクロ器官
本開示はまた、本明細書に記載されるポリヌクレオチド、すなわち、ＭＣＭポリペプチドをコードするＯＲＦを含むポリヌクレオチドを含有するマイクロ器官を含む。ポリヌクレオチドをマイクロ器官中に含有させることができ、次いで、持続性治療用製剤中のコードされた目的のポリペプチドを発現させることができる。マイクロ器官及びその製剤は、国際特許出願第ＰＣＴ／ＵＳ２０１４／０２７０７７号に記載されており、その内容全体を参照により本明細書に援用する。
【１０４０】
エキソソーム
本開示はまた、本明細書に記載されるポリヌクレオチド、すなわち、ＭＣＭポリペプチドをコードするＯＲＦを含むポリヌクレオチドの製剤を含む、エキソソームの医薬組成物を含む。エキソソームには、少なくとも１つのポリヌクレオチドがロードされ、細胞、組織及び／または生物に送達することができる。非限定的な例として、ポリヌクレオチドは、国際公開第ＷＯ２０１３０８４０００号（その全体を参照により本明細書に援用する）に記載されているエキソソーム中にロードされ得る。
【１０４１】
偽ビリオン
本開示はまた、本明細書に記載されるポリヌクレオチド、すなわち、ＭＣＭポリペプチドをコードするＯＲＦを含むポリヌクレオチドの製剤を含む、偽ビリオン（例えば、プソイドビリオン）の医薬組成物を含む。非限定的な例として、偽ビリオンは、Ａｕｒａ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ（Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ，ＭＡ）によって開発され、かつ／または記載されているものであってよい。一態様において、偽ビリオンは、ケラチノサイト及び基底膜に薬物を送達するために開発することができる（例えば、米国特許出願公開第ＵＳ２０１３００１２４５０号、同第ＵＳ２０１３００１２５６６号、同第ＵＳ２１０３００１２４２６号及び同第ＵＳ２０１２０２０７８４０号ならびに国際公開第ＷＯ２０１３００９７１７号参照、それぞれの全体を参照により本明細書に援用する）。
【１０４２】
いくつかの実施形態において、本開示のポリヌクレオチドを送達するために使用される偽ビリオンは、限定するものではないが、ヘルペスウイルス及びパピローマウイルスなどのウイルスに由来し得る（例えば米国特許出願公開第ＵＳ２０１３００１２４５０号、同第ＵＳ２０１３００１２５６６号、同第ＵＳ２１０３００１２４２６号及び同第ＵＳ２０１２０２０７８４０号及び国際公開第ＷＯ２０１３００９７１７号、そのそれぞれの全体を参照により本明細書に援用する；ならびにＭａ ｅｔ ａｌ．ＨＰＶ ｐｓｅｕｄｏｖｉｒｉｏｎｓ ａｓ ＤＮＡ ｄｅｌｉｖｅｒｙ ｖｅｈｉｃｌｅｓ．Ｔｈｅｒ Ｄｅｌｉｖ．２０１１：２（４）：４２７－４３０；Ｋｉｎｅｓ ｅｔ ａｌ．Ｔｈｅ ｉｎｉｔｉａｌ ｓｔｅｐｓ ｌｅａｄｉｎｇ ｔｏ ｐａｐｉｌｌｏｍａｖｉｒｕｓ ｉｎｆｅｃｔｉｏｎ ｏｃｃｕｒ ｏｎ ｔｈｅ ｂａｓｅｍｅｎｔ ｍｅｍｂｒａｎｅ ｐｒｉｏｒ ｔｏ ｃｅｌｌ ｓｕｒｆａｃｅ ｂｉｎｄｉｎｇ．ＰＮＡＳ ２００９：１０６（４８），２０４５８－２０４６３；Ｒｏｂｅｒｔｓ ｅｔ ａｌ．Ｇｅｎｉｔａｌ ｔｒａｎｓｍｉｓｓｉｏｎ ｏｆ ＨＰＶ ｉｎ ａ ｍｏｕｓｅ ｍｏｄｅｌ ｉｓ ｐｏｔｅｎｔｉａｔｅｄ ｂｙ ｎｏｎｏｘｙｎｏｌ－９ ａｎｄ ｉｎｈｉｂｉｔｅｄ ｂｙ ｃａｒｒａｇｅｅｎａｎ．Ｎａｔｕｒｅ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ．２００７：１３（７）８５７－８６１；Ｇｏｒｄｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｔａｒｇｅｔｉｎｇ ｔｈｅ Ｖａｇｉｎａｌ Ｍｕｃｏｓａ ｗｉｔｈ Ｈｕｍａｎ Ｐａｐｉｌｌｏｍａｖｉｒｕｓ Ｐｓｅｕｄｏｖｉｒｉｏｎ Ｖａｃｃｉｎｅｓ ｄｅｌｉｖｅｒｉｎｇ ＳＩＶ ＤＮＡ．Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ．２０１２ １８８（２）７１４－７２３；Ｃｕｂｕｒｕ ｅｔ ａｌ．，Ｉｎｔｒａｖａｇｉｎａｌ ｉｍｍｕｎｉｚａｔｉｏｎ ｗｉｔｈ ＨＰＶ ｖｅｃｔｏｒｓ ｉｎｄｕｃｅｓ ｔｉｓｓｕｅ－ｒｅｓｉｄｅｎｔ ＣＤ８＋ Ｔ ｃｅｌｌ ｒｅｓｐｏｎｓｅｓ．Ｔｈｅ Ｊｏｕｒｎ

ａｌ ｏｆ Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｉｎｖｅｓｔｉｇａｔｉｏｎ．２０１２：１２２（１２）４６０６－４６２０；Ｈｕｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｏｖａｒｉａｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ Ｕｓｉｎｇ ＨＰＶ－１６ Ｐｓｅｕｄｏｖｉｒｉｏｎ Ｃａｒｒｙｉｎｇ ｔｈｅ ＨＳＶ－ｔｋ Ｇｅｎｅ．ＰＬｏＳ ＯＮＥ．２０１２：７（７）ｅ４０９８３；Ｊｏｈｎｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｒｏｌｅ ｏｆ Ｈｅｐａｒａｎ Ｓｕｌｆａｔｅ ｉｎ Ａｔｔａｃｈｍｅｎｔ ｔｏ ａｎｄ Ｉｎｆｅｃｔｉｏｎ ｏｆ ｔｈｅ Ｍｕｒｉｎｅ Ｆｅｍａｌｅ Ｇｅｎｉｔａｌ Ｔｒａｃｔ ｂｙ Ｈｕｍａｎ Ｐａｐｉｌｌｏｍａｖｉｒｕｓ．Ｊ Ｖｉｒｏｌｏｇｙ．２００９：８３（５）２０６７－２０７４参照、それぞれの全体を参照により本明細書に援用する）。

【１０４３】

偽ビリオンは、米国特許出願公開第ＵＳ２０１２００１５８９９号及び同第及びＵＳ２０１３０１７７５８７号ならびに国際特許公開第ＷＯ２０１００４７８３９号、同第ＷＯ２０１３１１６６５６号、同第ＷＯ２０１３１０６５２５号及び同第ＷＯ２０１３１２２２６２号（そのそれぞれの内容全体を参照により本明細書に援用する）に記載されている方法によって調製されたウイルス様粒子（ＶＬＰ）であってよい。一態様において、ＶＬＰは、バクテリオファージであるＭＳ、Ｑβ、Ｒ１７、ｆｒ、ＧＡ、Ｓｐ、ＭＩ、Ｉ、ＭＸＩ、ＮＬ９５、ＡＰ２０５、ｆ２、ＰＰ７、ならびに植物ウイルスであるカブクリンクルウイルス（ＴＣＶ）、トマト畑スタントウイルス（ＴＢＳＶ）、南方豆モザイクウイルス（ＳＢＭＶ）、及びソラマメモットルウイルス、ブロムモザイクウイルス、カシアレッドブロッチウイルス、ササゲクロロティックモットルウイルス（ＣＣＭＶ）、メランドリウムイエローフレックウイルス及びクレイトニア潜伏ウイルスを含むブロモウイルス属のメンバーであり得るが、これらに限定されない。別の態様において、ＶＬＰは、米国特許出願公開第ＵＳ２０１３０１７７５８７号または米国特許第８，５０６，９６７号（それぞれの内容全体を参照により本明細書に援用する）に記載されているインフルエンザウイルスに由来し得る。更に別の態様において、ＶＬＰは、国際特許公開第ＷＯ２０１３１１６６５６号（その内容全体を参照により本明細書に援用する）に記載されているものなどの、脂質膜または粒子外側に係留されたＢ７－１及び／またはＢ７－２分子を含み得る。一態様において、ＶＬＰは、国際特許公開第ＷＯ２０１２０４９３６６号（その内容全体を参照により本明細書に援用する）に記載されているＶＬＰなどのように、ノロウイルス、ロタウイルス組み換えＶＰ６タンパク質または二層ＶＰ２／ＶＰ６に由来し得る。

【１０４４】

偽ビリオンは、限定するものではないが、国際公開第ＷＯ２０１０１２０２６６号及び米国特許出願公開第ＵＳ２０１２０１７１２９０号（それぞれの全体を参照により本明細書に援用する）、ならびにＭａ ｅｔ ａｌ．ＨＰＶ ｐｓｅｕｄｏｖｉｒｉｏｎｓ ａｓ ＤＮＡ ｄｅｌｉｖｅｒｙ ｖｅｈｉｃｌｅｓ．Ｔｈｅｒ Ｄｅｌｉｖ．２０１１：２（４）：４２７－４３０；Ｋｉｎｅｓ ｅｔ ａｌ．Ｔｈｅ ｉｎｉｔｉａｌ ｓｔｅｐｓ ｌｅａｄｉｎｇ ｔｏ ｐａｐｉｌｌｏｍａｖｉｒｕｓ ｉｎｆｅｃｔｉｏｎ ｏｃｃｕｒ ｏｎ ｔｈｅ ｂａｓｅｍｅｎｔ ｍｅｍｂｒａｎｅ ｐｒｉｏｒ ｔｏ ｃｅｌｌ ｓｕｒｆａｃｅ ｂｉｎｄｉｎｇ．ＰＮＡＳ ２００９：１０６（４８），２０４５８－２０４６３；Ｒｏｂｅｒｔｓ ｅｔ ａｌ．Ｇｅｎｉｔａｌ ｔｒａｎｓｍｉｓｓｉｏｎ ｏｆ ＨＰＶ ｉｎ ａ ｍｏｕｓｅ ｍｏｄｅｌ ｉｓ ｐｏｔｅｎｔｉａｔｅｄ ｂｙ ｎｏｎｏｘｙｎｏｌ－９ ａｎｄ ｉｎｈｉｂｉｔｅｄ ｂｙ ｃａｒｒａｇｅｅｎａｎ．Ｎａｔｕｒｅ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ．２００７：１３（７）８５７－８６１；Ｇｏｒｄｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｔａｒｇｅｔｉｎｇ ｔｈｅ Ｖａｇｉｎａｌ Ｍｕｃｏｓａ ｗｉｔｈ Ｈｕｍａｎ Ｐａｐｉｌｌｏｍａｖｉｒｕｓ Ｐｓｅｕｄｏｖｉｒｉｏｎ Ｖａｃｃｉｎｅｓ ｄｅｌｉｖｅｒｉｎｇ ＳＩＶ ＤＮＡ．Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ．２０１２ １８８（２）７１４－７２３；Ｃｕｂｕｒｕ ｅｔ ａｌ．，Ｉｎｔｒａｖａｇｉｎａｌ ｉｍｍｕｎｉｚａｔｉｏｎ ｗｉｔｈ ＨＰＶ ｖｅｃｔｏｒｓ ｉｎｄｕｃｅｓ ｔｉｓｓｕｅ－ｒｅｓｉｄｅｎｔ ＣＤ８＋ Ｔ ｃｅｌｌ ｒｅｓｐｏｎｓｅｓ．Ｔｈｅ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｉｎｖｅｓｔｉｇａｔｉｏｎ．２０１２：１２２（１２）４６０６－４６２０；

Ｈｕｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｏｖａｒｉａｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ Ｕｓｉｎｇ ＨＰＶ－１６ Ｐｓｅｕｄｏｖｉｒｉｏｎ Ｃａｒｒｙｉｎｇ ｔｈｅ ＨＳＶ－ｔｋ Ｇｅｎｅ．ＰＬｏＳ ＯＮＥ．２０１２：７（７）ｅ４０９８３；Ｊｏｈｎｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｒｏｌｅ ｏｆ Ｈｅｐａｒａｎ Ｓｕｌｆａｔｅ ｉｎ Ａｔｔａｃｈｍｅｎｔ ｔｏ ａｎｄ Ｉｎｆｅｃｔｉｏｎ ｏｆ ｔｈｅ Ｍｕｒｉｎｅ Ｆｅｍａｌｅ Ｇｅｎｉｔａｌ Ｔｒａｃｔ ｂｙ Ｈｕｍａｎ Ｐａｐｉｌｌｏｍａｖｉｒｕｓ．Ｊ Ｖｉｒｏｌｏｇｙ．２００９：８３（５）２０６７－２０７４（それぞれの全体を参照により本明細書に援用する）に記載されているものなどのヒトパピローマウイルス様粒子であり得る。

【１０４５】

一態様において、偽ビリオンは、限定するものではないが、米国特許出願公開第ＵＳ２０１３０１１６４０８号及び同第ＵＳ２０１３０１１５２４７号（それぞれの全体を参照により本明細書に援用する）に記載されているものなどのビリオン由来ナノ粒子であり得る。ビリオン由来ナノ粒子は、米国特許出願公開第ＵＳ２０１３０１１６４０８号及び同第ＵＳ２０１３０１１５２４７号または国際特許公開第ＷＯ２０１３１１９８７７号（それぞれの全体を参照により本明細書に援用する）に記載されている方法によって作製することができる。

【１０４６】

いくつかの実施形態において、ウイルス様粒子（ＶＬＰ）は、自己組織化粒子であり得る。自己組織化ＶＬＰ及び自己組織化ＶＬＰの作製方法の非限定的な例は、国際特許公開第ＷＯ２０１３１２２２６２号に記載されており、その内容全体を参照により本明細書に援用する。

【１０４７】

シルクベース送達

本開示はまた、本明細書に記載されるポリヌクレオチド、すなわち、ＭＣＭポリペプチドをコードするＯＲＦを含むポリヌクレオチドのシルクベース送達用に製剤化された医薬組成物を含む。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、持続放出性シルクベース送達系に製剤化され得る。シルクベース送達系は、シルクフィブロイン溶液を、限定するものではないが、本明細書に記載されるポリヌクレオチド及び／または当該技術分野において知られているポリヌクレオチドなどの治療薬と接触させることによって形成することができる。非限定的な例として、本開示に使用することができる持続放出性シルクベース送達系及び当該系の作製方法は、米国特許出願公開第ＵＳ２０１３０１７７６１１号に記載されており、その内容全体を参照により本明細書に援用する。

【１０４８】

マイクロ粒子

本開示は、本明細書に記載されるポリヌクレオチド、すなわち、ＭＣＭポリペプチドをコードするＯＲＦを含むポリヌクレオチドのマイクロ粒子製剤を含む、医薬組成物を含む。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドを含む製剤は、マイクロ粒子を含み得る。マイクロ粒子は、本明細書に記載されるポリマー及び／または当該技術分野において知られているポリマー、限定するものではないが、ポリ（α－ヒドロキシ酸）、ポリヒドロキシ酪酸、ポリカプロラクトン、ポリオルトエステル及びポリ酸無水物などを含み得る。マイクロ粒子は、ポリヌクレオチドなどの生物学的に活性な分子を吸着する吸着性表面を有し得る。非限定的な例として、本開示とともに使用される微粒子及び微粒子の作製方法は、米国特許出願公開第ＵＳ２０１３１９５９２３号及び同第ＵＳ２０１３０１９５８９８号ならびに米国特許第８，３０９，１３９号及び同第８，２０６，７４９号に記載されており、それぞれの内容全体を参照により本明細書に援用する。

【１０４９】

別の実施形態において、製剤は、マイクロ粒子及びポリヌクレオチドを含むマイクロエマルションであり得る。非限定的な例として、マイクロ粒子を含むマイクロエマルションは、米国特許出願公開第ＵＳ２０１３１９５９２３号及び同第ＵＳ２０１３０１９５８９８

号ならびに米国特許第８，３０９，１３９号及び同第８，２０６，７４９号に記載されており、それぞれの内容全体を参照により本明細書に援用する。

【１０５０】

微小胞

本開示は、本明細書に記載されるポリヌクレオチド、すなわち、ＭＣＭポリペプチドをコードするＯＲＦを含むポリヌクレオチドの微小胞ベース製剤を含む、医薬組成物を含む。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、微小胞中に製剤化され得る。微小胞の非限定的な例には、米国特許出願公開第ＵＳ２０１３０２０９５４４号（その内容全体を参照により本明細書に援用する）に記載のものが挙げられる。

【１０５１】

いくつかの実施形態において、微小胞は、ＡＲＲＤＣ１による微小胞（ＡＲＭＭ）である。ＡＲＭＭ及びＡＲＭＭの作製方法の非限定的な例は、国際特許公開第ＷＯ２０１３１１９６０２号に記載されており、その内容全体を参照により本明細書に援用する。

【１０５２】

高分子電解質複合体

本開示はまた、本明細書に記載されるポリヌクレオチド、すなわち、ＭＣＭポリペプチドをコードするＯＲＦを含むポリヌクレオチドの製剤を含む、高分子電解質複合体の医薬組成物を含む。高分子電解質複合体は、電荷動的ポリマーが１つ以上のアニオン性分子と複合体化するときに形成される。電荷動的ポリマー及び高分子電解質複合体ならびに高分子電解質複合体の作製方法の非限定的な例は、米国特許第８，５２４，３６８号に記載されており、その内容全体を参照により本明細書に援用する。

【１０５３】

結晶性ポリマー系

本開示はまた、本明細書に記載されるポリヌクレオチド、すなわち、ＭＣＭポリペプチドをコードするＯＲＦを含むポリヌクレオチドの製剤を含む、結晶性ポリマー系の医薬組成物を含む。結晶性ポリマー系は、結晶性部分及び／または結晶性部分を含む末端単位を有するポリマーである。「ＣＹＣポリマー」結晶性ポリマー系と称される、結晶性部分及び／または結晶性部分を含む末端単位を有するポリマーならびに当該ポリマー及び当該系の作製方法の非限定的な例は、米国特許第ＵＳ８，５２４，２５９号に記載されており、その内容全体を参照により本明細書に援用する。

【１０５４】

ｍＲＮＡのための抗凍結剤

本開示はまた、本明細書に記載されるポリヌクレオチド、すなわち、ＭＣＭポリペプチドをコードするＯＲＦを含むポリヌクレオチドの製剤を、抗凍結剤とともに含む、医薬組成物を含む。本明細書で使用されるとき、「抗凍結剤」という用語は、所与の物質と組み合わされたとき、凍結時に物質に対して生じる損傷を低減または排除するのを助ける１つ以上の作用物質を指す。いくつかの実施形態において、抗凍結剤は、凍結中のポリヌクレオチドを安定化させるために、ポリヌクレオチドと組み合わされる。－２０℃～－８０℃でのｍＲＮＡの凍結保存は、ポリヌクレオチドの長期安定性（例えば、３６ヶ月）に有利であり得る。いくつかの実施形態において、凍結／解凍サイクル中及び凍結保存条件下のポリヌクレオチドを安定化させるために、抗凍結剤をポリヌクレオチド製剤中に含める。本開示の抗凍結剤には、スクロース、トレハロース、ラクトース、グリセロール、デキストロース、ラフィノース及び／またはマンニトールが含まれ得るが、これらに限定されない。トレハロースは、米国食品医薬品局によりＧＲＡＳ（一般に安全と認められる）と記載され、市販の医薬製剤に一般に使用されている。

【１０５５】

増量剤

本開示はまた、本明細書に記載されるポリヌクレオチド、すなわち、ＭＣＭポリペプチドをコードするＯＲＦを含むポリヌクレオチドの製剤を、増量剤とともに含む、医薬組成物を含む。本明細書で使用されるとき、「増量剤」という用語は、製剤に、所望の粘稠度及

び／または製剤成分の安定化をもたらすために製剤中に包含される、１つ以上の作用物質を指す。いくつかの実施形態において、「薬学的に洗練された」ケーキをもたらし、長期保存（例えば、３６ヶ月）中の凍結乾燥ポリヌクレオチドを安定化させるために、凍結乾燥ポリヌクレオチド製剤中に増量剤を含める。本開示の増量剤には、スクロース、トレハロース、マンニトール、グリシン、ラクトース及び／またはラフィノースが含まれ得るが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、凍結中のポリヌクレオチドを安定化させ、また凍結乾燥のための増量剤をもたらすために、抗凍結剤と増量剤（例えば、スクロース／グリシンまたはトレハロース／マンニトール）の組み合わせを含めることができる。

【１０５６】

本開示のポリヌクレオチドの製剤及び製剤化方法の非限定的な例は、２０１２年１２月１４日に出願された国際公開第ＷＯ２０１３０９０６４８号（それぞれの内容全体を参照により本明細書に援用する）にも提供されている。

【１０５７】

不活性成分

本開示はまた、本明細書に記載されるポリヌクレオチド、すなわち、ＭＣＭポリペプチドをコードするＯＲＦを含むポリヌクレオチドの製剤を、不活性成分である少なくとも１つの賦形剤とともに含む、医薬組成物を含む。本明細書で使用されるとき、「不活性成分」という用語は、製剤中に含まれる１つ以上の不活性物質を指す。いくつかの実施形態において、本開示の製剤に使用することができる不活性成分の全てまたは一部は、米国食品医薬品局（ＦＤＡ）によって承認されてもよいし、承認されなくてもよい。不活性成分及び不活性成分が製剤化され得る投与経路の非包括的な一覧は、国際出願第ＰＣＴ／ＵＳ２０１４／０２７０７７号に記載されている。

【１０５８】

ＶＩＩ．ポリヌクレオチドの使用方法

本開示のポリヌクレオチド（すなわち、ＭＣＭポリペプチドをコードするＯＲＦを含むポリヌクレオチド）は、治療上有効な効果をもたらす任意の経路によって投与され得る。これらには、経腸（腸管へ）、経胃腸、硬膜外（硬膜へ）、経口（口を介して）、経皮、硬膜周囲、脳内（大脳へ）、側脳室内（脳室へ）、皮膚上（皮膚への適用）、皮内（皮膚自体へ）、皮下（皮膚の下）、経鼻投与（鼻を介して）、静脈内（静脈へ）、静脈ボーラス、点滴、動脈内（動脈へ）、筋肉内（筋肉へ）、心臓内（心臓へ）、骨内注入（骨髄へ）、髄腔内（脊椎管へ）、腹腔内（腹膜への注入または注射）、膀胱内注入、硝子体内（眼を介して）、空洞内注射（病的空洞へ）、腔内（陰茎基部へ）、膣内投与、子宮内、羊膜外投与、経皮（全身分布のための傷のない皮膚を介した拡散）、経粘膜（粘膜を介した拡散）、経膣、吹送（鼻からの吸引）、舌下、唇下、浣腸、点眼（結膜上へ）、点耳、耳介（耳内または耳を介して）、頬側（頬に向けて）、結膜、皮膚、歯（１本以上の歯へ）、電気浸透、子宮頸管内、副鼻腔内、気管内、体外、血液透析、浸潤、間質内、腹腔内、羊膜内、関節内、胆管内、気管支内、滑液包内、軟骨内（軟骨内部）、尾骨内（ウマ尾内部）、大槽内（小脳延髄大槽内部）、角膜内（角膜内部）、歯冠内、冠内（冠動脈内部）、陰茎海綿体内（陰茎の陰核海綿体の膨張性空隙内部）、椎間板内（椎間板内部）、導管内（腺導管内部）、十二指腸内（十二指腸内部）、硬膜内（硬膜内部または下）、表皮内（表皮へ）、食道内（食道へ）、胃内（胃内部）、歯肉内（歯肉内部）、回腸内（小腸遠位部分内部）、病巣内（局在性病変の内部または直接導入）、管腔内（管腔内部）、リンパ管内（リンパ内部）、髄内（骨髄腔内部）、髄膜内（髄膜内部）、眼内（眼内部）、卵巣内（卵巣内部）、心膜内（心膜内部）、胸膜内（胸膜内部）、前立腺内（前立腺腺内部）、肺内（肺またはその気管支内部）、副鼻腔内（鼻洞または眼窩周囲洞内部）、脊髄内（脊柱内部）、滑液嚢内（関節の滑液腔内部）、腱内（腱内部）、精巣内（精巣内部）、髄腔内（脳脊髄軸の任意のレベルにおける脳脊髄液内部）、胸郭内（胸郭内部）、小管内（器官細管内部）、腫瘍内（腫瘍内部）、鼓室内（中耳内部）、血管内（１以上の血管内部）、脳室内（脳室内部）、イオントフォレシス（電流を用いるもので、可溶性塩イオンが

体内組織に移動する）、灌注（開放創傷または体腔を洗浄または洗い流す）、喉頭（喉頭に直接）、経鼻胃（鼻を介して胃内に）、密封包帯法（次いで領域を塞ぐ包帯剤で被覆する局所投与経路）、眼部（外眼部へ）、中咽頭（口及び咽頭に直接）、非経口、経皮、関節周囲、硬膜周囲、神経周囲、歯周、直腸、呼吸器（局所性または全身性効果のために口または鼻から吸入することによる気道内部）、眼球後（脳橋背後または眼球背後）、心筋内（心筋内）、軟組織、クモ膜下、結膜下、粘膜下、局所、経胎盤（胎盤を介してまたは通して）、経気管（気管壁を介して）、経鼓膜（鼓室を通してまたは介して）、尿管（尿管へ）、尿道（尿道へ）、膣、仙骨ブロック、診断、神経ブロック、胆管灌流、心臓灌流、フォトフェレーシスまたは脊椎が含まれるが、これらに限定されない。具体的な一実施形態において、組成物は、血液脳関門、血管関門または他の上皮関門を通過できるような方法で投与され得る。いくつかの実施形態において、ある投与経路のための製剤は、少なくとも１つの不活性成分を含み得る。

【１０５９】

本開示のポリヌクレオチドは、細胞にネイキッドで送達され得る。本明細書で使用されるとき、「ネイキッド」は、トランスフェクションを促進する作用物質を含まずにポリヌクレオチドを送達することを指す。例えば、細胞に送達されるポリヌクレオチドは、修飾を含有しなくてもよい。ネイキッドのポリヌクレオチドは、当該技術分野において知られ、本明細書に記載される投与経路を使用して、細胞に送達され得る。

【１０６０】

本開示のポリヌクレオチドは、本明細書に記載される方法を使用して製剤化することができる。製剤は、修飾及び／または非修飾であり得るポリヌクレオチドを含有し得る。製剤は、細胞透過剤、薬学的に許容される担体、送達剤、生体内分解性または生体適合性ポリマー、溶媒及び持続放出送達デポ剤を更に含み得るが、これらに限定されない。製剤化されたポリヌクレオチドは、当該技術分野において知られ、本明細書に記載される投与経路を使用して、細胞に送達され得る。

【１０６１】

組成物はまた、限定するものではないが、直接浸漬または薬浴、カテーテル経由、ゲル剤、散剤、軟膏剤、クリーム剤、ゲル剤、ローション剤及び／または滴剤によること、組成物を被覆または浸漬したファブリック材料または生分解性材料などの基材を使用することなどを含む、当該技術分野における複数の方法のいずれかにおける、器官または組織への直接送達用に製剤化され得る。

【１０６２】

非経口投与及び注射投与

本開示は、非経口投与及び注射投与に好適な形態での本開示のポリヌクレオチド（すなわち、ＭＣＭポリペプチドをコードするＯＲＦを含むポリヌクレオチド）の送達を包含する。非経口投与用の液体製剤には、薬学的に許容されるエマルション、マイクロエマルション、液剤、懸濁剤、シロップ剤、及び／またはエリキシル剤が含まれるが、これらに限定されない。液体製剤は、有効成分に加えて、当該技術分野において一般的に使用される不活性希釈剤（例えば、水または他の溶媒など）、可溶化剤及び乳化剤、例えば、エチルアルコール、イソプロピルアルコール、炭酸エチル、酢酸エチル、ベンジルアルコール、安息香酸ベンジル、プロピレングリコール、１，３－ブチレングリコール、ジメチルホルムアミド、油（特に、綿実油、落花生油、トウモロコシ油、麦芽油、オリーブ油、ヒマシ油及びゴマ油）、グリセロール、テトラヒドロフルフリルアルコール、ポリエチレングリコール及びソルビタンの脂肪酸エステルならびにこれらの混合物を含み得る。経口用組成物は、不活性希釈剤の他に、湿潤剤、乳化剤及び懸濁化剤、甘味剤、矯味剤ならびに／または着香剤などの補助剤を含み得る。非経口投与のためのある特定の実施形態において、組成物は、ＣＲＥＭＯＰＨＯＲ（登録商標）、アルコール、油、改質油、グリコール、ポリソルベート、シクロデキストリン、ポリマー及び／またはこれらの組み合わせなどの可溶化剤と混合される。

【１０６３】

非経口投与用の医薬組成物は、少なくとも１つの不活性成分を含み得る。使用される不活性成分のいずれも、米国食品医薬品局（ＦＤＡ）によって承認されていてもよいし、承認されていなくてもよい。非経口投与用の医薬組成物に使用される不活性成分の非包括的な一覧には、塩酸、マンニトール、窒素、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム及び水酸化ナトリウムが含まれる。

【１０６４】

注射用製剤、例えば、無菌注射用水性または油性懸濁剤は、既知の技術に従って、好適な分散剤、湿潤剤及び／または懸濁化剤を使用して製剤化することができる。無菌注射用製剤は、非経口的に許容される無毒の希釈剤及び／または溶媒中（例えば、１，３－ブタンジオール中溶液）の無菌注射用液剤、懸濁剤及び／または乳濁剤であり得る。使用され得る許容されるビヒクル及び溶媒は、水、Ｕ．Ｓ．Ｐ．リンゲル溶液及び等張性塩化ナトリウム溶液である。溶媒または懸濁媒には、無菌不揮発性油が慣習的に利用されている。この目的のために、合成モノジグリセリドまたはジグリセリドを含む、任意の無刺激性不揮発性油を利用することができる。オレイン酸などの脂肪酸が注射剤の調製に使用され得る。無菌製剤はまた、局所麻酔剤、保存剤及び緩衝剤などの補助剤を含み得る。

【１０６５】

注射製剤は、例えば、細菌保持フィルターに通す濾過によって無菌化され得、かつ／または使用直前に滅菌水もしくは他の無菌注射用媒体中に溶解もしくは分散することができる無菌固形組成物の形態である無菌剤を組み込むことによって無菌化され得る。

【１０６６】

注射製剤は、組織、器官及び／または対象の領域中への直接注射用であり得る。非限定的な例として、虚血領域への心筋内注射によって、組織、器官及び／または対象に製剤を直接注射してもよい（例えば、Ｚａｎｇｉ　ｅｔ　ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　２０１３参照、その内容全体を参照により本明細書に援用する）。

【１０６７】

有効成分の効果を延長させるために、皮下または筋肉内注射からの有効成分の吸収を遅らせることが望ましいことがある。これは、水溶性の低い結晶性または非晶質物質の液体懸濁剤の使用によって達成することができる。次いで、薬剤の吸収速度は、溶解速度に左右され、溶解速度は、結晶サイズ及び結晶形態に依存し得る。あるいは、非経口投与される薬物形態の吸収遅延は、油性ビヒクル中に薬物を溶解または懸濁することによって達成される。注射用デポ形態は、ポリラクチド－ポリグリコリドなどの生分解性ポリマー中に薬物のマイクロカプセルマトリックスを形成することによって作製することができる。薬物とポリマーの比及び使用される特定のポリマーの性質に応じて、薬物の放出速度を制御することができる。他の生分解性ポリマーの例には、ポリ（オルトエステル）及びポリ（無水物）が挙げられる。注射用デポ製剤は、体内組織に適合するリポソームまたはマイクロエマルション中に薬物を封入することによって調製される。

【１０６８】

治療用途

本開示のポリヌクレオチドは、メチルマロニルＣｏＡムターゼ（ＭＣＭ）ポリペプチドをコードするｍＲＮＡを含むポリヌクレオチド分子の調製、製造及び治療的使用に使用される。いくつかの実施形態において、本開示のポリヌクレオチドは、ＭＣＭに関連する疾患、障害または状態の治療及び／または予防に使用することができる。典型的に、排他的にではないが、本開示のポリヌクレオチドは、メチルマロン酸血症の治療及び／または予防に使用することができる。いくつかの実施形態において、ヌクレオチドは、、メチルマロン酸のレベルを減少させることを、それを必要とする対象において行うための方法にて使用される。例えば、本開示の一態様は、ＭＣＭをコードするポリヌクレオチドを含む組成物を対象に投与することにより、当該対象におけるメチルマロン酸血症の症状を軽減する方法を提供する。

【１０６９】

いくつかの実施形態において、本開示のポリヌクレオチドは、メチルマロン酸血症に関連

する代謝産物のレベルを減少させる方法に使用され、当該方法は、ＭＣＭポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの有効量を対象に投与することを含む。いくつかの実施形態において、有効量のポリヌクレオチドの投与により、対象において、メチルマロン酸、プロピオニルカルニチン、アセチルカルニチン、プロピオニルＣｏＡ、Ｄ－メチルマロニルＣｏＡ、Ｌ－メチルマロニルＣｏＡまたはこれらの組み合わせなどのメチルマロン酸血症のバイオマーカーレベルが減少する。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドの投与により、ポリヌクレオチドの投与後の短時間内にメチルマロン酸血症の１つ以上のバイオマーカーのレベルが減少する。

【１０７０】

いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドの投与により、対象の細胞におけるメチルマロニルＣｏＡムターゼの発現が減少する。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドの投与により、対象のＭＣＭ酵素活性が増大する。例えば、いくつかの実施形態において、本開示のポリヌクレオチドは、ＭＣＭをコードするｍＲＮＡを含む組成物を対象に投与する方法に使用され、当該方法により、対象の少なくともいくつかの細胞のＭＣＭ酵素活性が増大する。いくつかの実施形態において、ＭＣＭをコードするｍＲＮＡを含む組成物を対象に投与することにより、対象の細胞のＭＣＭ酵素活性が少なくとも１０％、少なくとも２５％、少なくとも５０％、少なくとも７５％、少なくとも１００％または１００％を超えて増加する。いくつかの実施形態において、ＭＣＭをコードするｍＲＮＡを含む組成物を対象に投与することにより、対象の細胞のＭＣＭ酵素活性が、正常な対象、例えば、ＭＭＡに罹患していない正常なヒトにおいて予想される活性レベルの少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％または１００％以上のレベルまで増加する。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドの投与により、対象の細胞のうちの少なくともいくつかでメチルマロニルＣｏＡムターゼが発現され、有効なメチルマロニルＣｏＡ代謝が生じることが可能な十分な期間持続する。

【１０７１】

いくつかの実施形態において、コードされたポリペプチドの発現が増加する。いくつかの実施形態において、ＩＶＴポリヌクレオチドは、細胞に導入されたとき、当該細胞のＭＣＭ発現レベルを、例えば、２０～５０％、少なくとも２０％、少なくとも２５％、少なくとも３０％、少なくとも３５％、少なくとも４０％、少なくとも４５％または少なくとも５０％増加させる。

【１０７２】

いくつかの実施形態において、方法または使用は、ポリヌクレオチド、例えば、配列番号１～２０７、７３２～７６５及び７７２からなる群から選択されるポリヌクレオチドに対して、かなりの配列類似性を有するＯＲＦを含む、ｍＲＮＡを投与することを含み、当該ＯＲＦは、ＭＣＭポリペプチドをコードする。本開示の他の態様は、ポリヌクレオチド含有細胞を哺乳動物対象に移植することに関する。哺乳動物対象への細胞の投与には、当業者に知られており、局所移植（例えば、局所または皮下投与）、器官送達または全身注射（例えば、静脈内注射または吸入）、及び薬学的に許容される担体中の細胞製剤が含まれるが、これらに限定されない。ポリヌクレオチドを含有するそのような組成物は、筋肉内、経動脈的、腹腔内、静脈内、鼻腔内、皮下、内視鏡的、経皮、または髄腔内の投与用に製剤化され得る。

【１０７３】

いくつかの実施形態において、組成物は、長期放出用に製剤化され得る。

【１０７４】

いくつかの実施形態において、本方法は、Ｌ－メチルマロニルＣｏＡからスクシニルＣｏＡへの変換を、少なくとも０．１％、０．５％、１％、２％、２．５％、５％、１０％、２０％、２５％、３０％、３５％４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％またはそれ以上触媒することができる。いくつかの実施形態において、方法は、Ｌ－メチルマロニルＣｏＡからスクシニルＣｏＡへの変換を、０．

１％～５％、５％～２５％、１０％～２５％、１０％～３０％、２０％～４０％、１０％～５０％、２０％～５０％、１０％～７５％、２０％～７５％、３０％～７５％、３０％～８５％、または２５％～１００％の範囲で触媒することができる。

【１０７５】

いくつかの実施形態において、方法は、ＡｄｏＣｂｌの合成に十分な酵素活性の少なくとも０．１％、０．５％、１％、２％、２．５％、５％、１０％、２０％、２５％、３０％、３５％４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％またはそれ以上を達成する。いくつかの実施形態において、方法は、アデノシルコバラミン（ＡｄｏＣｂｌ）の合成に十分な酵素活性を、０．１％～５％、５％～２５％、１０％～２５％、１０％～３０％、２０％～４０％、１０％～５０％、２０％～５０％、１０％～７５％、２０％～７５％、３０％～７５％、３０％～８５％、または２５％～１００％の範囲で達成する。

【１０７６】

いくつかの実施形態において、方法は、健康な個体にみられるアデノシルコバラミン（ＡｄｏＣｂｌ）の活性形態の少なくとも０．１％、０．５％、１％、２％、２．５％、５％、１０％、２０％、２５％、３０％、３５％４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％またはそれ以上を合成するのに十分な酵素活性を達成する。いくつかの実施形態において、方法は、健康な個体にみられるＡｄｏＣｂｌの活性形態の０．１％～５％、５％～２５％、１０％～２５％、１０％～３０％、２０％～４０％、１０％～５０％、２０％～５０％、１０％～７５％、２０％～７５％、３０％～７５％、３０％～８５％、または２５％～１００％の範囲を合成するのに十分な酵素活性を達成する。

【１０７７】

いくつかの実施形態において、方法は、それを必要とする患者に別の治療法と組み合わせてポリヌクレオチドを投与することを伴う。そのような方法は、追加の治療法を実施する前、それと同時、またはその後にポリヌクレオチドを投与することを伴い得る。いくつかの実施形態において、そのような方法は、相加効果または相乗効果を有する。いくつかの実施形態において、ＭＭＡを治療するための方法であって、それを必要とする患者に、ＭＣＭポリペプチドをコードする有効量のポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡ）を投与することと、有効量の別の治療法を実施することとを含む、当該方法が本明細書で提示される。そのような他の治療法の例には、コバラミンサプリメント、カルニチンサプリメント及び抗生物質が挙げられるが、これらに限定されない。別の具体的な実施形態において、ＭＭＡを治療するための方法であて、それを必要とする患者にＭＣＭポリペプチドをコードする有効量のポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡ）を投与することと、低タンパク質食を維持することとを含む、当該方法が本明細書で提示される。

【１０７８】

いくつかの実施形態において、ＭＣＭポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡ）またはその医薬組成物を患者に投与することを伴う治療クールの前、最中及び／または後に、患者の生体試料（例えば、血液、血漿、血清、脳脊髄液、尿または任意の他の生体液）中のメチルマロン酸の濃度がモニターされる。いくつかの実施形態において、ＭＣＭポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡ）またはその医薬組成物を患者に投与することを伴う治療クールの前、最中及び／または後に、患者の生体試料（例えば、尿、血液、血漿、血清、脳脊髄液または任意の他の生体液）中のメチルクエン酸の濃度がモニターされる。いくつかの実施形態において、ＭＣＭポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡ）またはその医薬組成物を患者に投与することを伴う治療クールの前、最中及び／または後に、患者の生体試料（例えば、血液、血漿、血清、脳脊髄液、尿または任意の他の生体液）中のプロピオニルカルニチンの濃度がモニターされる。いくつかの実施形態において、ＭＣＭポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡ）またはその医薬組成物を患者に投与することを伴う治療クールの前、最中及び／または後に、赤血球中の奇数長鎖脂肪酸（ＯＬＣＦＡ）レ

ベルがモニターされる。いくつかの実施形態において、ＭＣＭポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡ）またはその医薬組成物を患者に投与することを伴う治療クールの前、最中及び／または後に、尿中尿素：メチルマロン酸比がモニターされる。ＭＣＭポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡ）またはその医薬組成物の患者への投与量、投与頻度及び／または投与期間は、メチルマロン酸、メチルクエン酸もしくはプロピオニルカルニチンの濃度、赤血球中の奇数長鎖脂肪酸（ＯＬＣＦＡ）レベルまたは尿中尿素：メチルマロン酸比の結果により変更され得る。あるいは、これらのモニタリングパラメーター（例えば、メチルマロン酸、メチルクエン酸もしくはプロピオニルカルニチンの濃度、赤血球中の奇数長鎖脂肪酸（ＯＬＣＦＡ）レベルまたは尿中尿素：メチルマロン酸比）のうちの１つ以上における変化は、ＭＣＭポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡ）またはその医薬組成物の投与を伴う治療クールがＭＭＡの治療に有効であることを示し得る。

【１０７９】

具体的な一実施形態において、（ａ）ＭＣＭポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡ）またはその医薬組成物の１用量以上をそれを必要とする患者に投与することと、（ｂ）ステップ（ａ）の前及び／または後に、メチルマロン酸、メチルクエン酸もしくはプロピオニルカルニチンの濃度（例えば、血漿、血清、脳脊髄液、尿またはの他の生体液などの生体試料で検出）、赤血球中の奇数長鎖脂肪酸（ＯＬＣＦＡ）レベルまたは尿中尿素：メチルマロン酸比をモニターすることとを含む、ＭＭＡを治療するための方法が本明細書で提示される。いくつかの実施形態において、ステップ（ｂ）は、メチルマロン酸の濃度をモニターすることを含む。いくつかの実施形態において、ステップ（ｂ）は、メチルマロン酸、メチルクエン酸及び／またはプロピオニルカルニチンの濃度をモニターすることを含む。いくつかの実施形態において、モニタリングステップ（ｂ）は、ＭＣＭポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡ）の投与のある特定の用量回数（例えば、１、２、４、６、８、１０、１２、１４、１５もしくは２０回以上の用量回数；または２～４、２～８、２～２０もしくは２～３０回）の前及び／もしくは後、またはある特定の期間後（例えば、１、２、３、４、５、６もしくは７日後；または１、２、３、４、５、１０、１５、２０、３０、４０、４５、４８もしくは５０週間後）に実施される。いくつかの実施形態において、これらのモニタリングパラメーターのうちの１つ以上は、ＭＣＭポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡ）またはその医薬組成物の投与前に検出される。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドまたはその医薬組成物の投与後における、メチルマロン酸、メチルクエン酸もしくはプロピオニルカルニチンの濃度の減少、または赤血球中の奇数長鎖脂肪酸（ＯＬＣＦＡ）レベルの減少は、当該治療クールがＭＭＡの治療に有効であることを示す。いくつかの実施形態において、ＭＣＭポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡ）またはその医薬組成物の投与後における、尿中尿素：メチルマロン酸比の増加は、当該治療クールがＭＭＡの治療に有効であることを示す。

【１０８０】

患者のメチルマロン酸、メチルクエン酸もしくはプロピオニルカルニチンの濃度、赤血球中の奇数長鎖脂肪酸（ＯＬＣＦＡ）レベル、または尿中尿素：メチルマロン酸比は、当業者に知られている任意の技術によって検出され得る。いくつかの実施形態において、患者におけるメチルマロン酸、メチルクエン酸またはプロピオニルカルニチンの濃度を検出するための方法は、患者から組織または体液試料を得ることと、生体試料（例えば、血漿血清試料、脳脊髄液、尿または他の生体液由来）をある特定の種類の処理（例えば、遠心分離）に供し、かつ、例えば、標準ガスクロマトグラフィー／質量分析計（ＧＣ／ＭＳ）安定同位体希釈法、正化学イオン化ガスクロマトグラフィー質量分析法（ＣＩ　ＧＣ－ＭＳ）分光法（例えば、ＵＶ分光法）または高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）の使用による検出に供して、生体試料中のメチルマロン酸、メチルクエン酸、プロピオニルカルニチンまたは尿素の濃度を検出することとを伴う。

【１０８１】

いくつかの実施形態において、本明細書で提供されるＭＭＡを治療するための方法は、ＭＭＡに関連する１つ、２つまたはそれ以上の症状を軽減または管理する。ＭＭＡの１つ、２つまたはそれ以上の症状の軽減または管理は、ＭＭＡの治療に対するポリヌクレオチドの有効性の臨床エンドポイントに使用され得る。いくつかの実施形態において、本明細書で提供されるＭＭＡを治療するための方法は、ＭＭＡに関連する１つ以上の症状の継続期間及び／または重症度を低減する。いくつかの実施形態において、本明細書で提供されるＭＭＡを治療するための方法は、ＭＭＡに関連する１つ以上の症状の発症、進行及び／または再発を阻害する。いくつかの実施形態において、本明細書で提供されるＭＭＡを治療するための方法は、ＭＭＡに関連する症状の数を減少させる。いくつかの実施形態において、本明細書で提供されるＭＭＡを治療するための方法は、ＭＭＡに関連する１つ以上の症状の進行を阻害または減少させる。

【１０８２】

ＭＭＡに関連する症状には、無呼吸、高アンモニア血症、代謝性アシドーシス、嗜眠、嘔吐、脱水、緊張低下、低血糖症、反復酵母感染、腎障害、精神遅滞、発育遅延、痙攣、運動障害、急性脳症、顔面異形症（例えば、広い額、広い鼻橋、内眼角贅皮、長く滑らかな人中または三角形の口）、脳卒中、皮膚損傷（例えば、モニリア症）、偶発的肝腫大、舞踏アテトーゼの急性発症、ジストニア、嚥下困難、構音障害、成長障害（例えば、成長不全）、腎臓疾患または腎不全、組織損傷、摂食障害、認知障害、一般的感染症によって惹起される代謝性発作及び糸球体濾過量（ＧＦＲ）の減少が含まれるが、これらに限定されない。

【１０８３】

いくつかの実施形態において、本明細書で提供されるＭＭＡを治療するための方法は、次のうちの１つ、２つまたはそれ以上を低減または排除する：ＭＭＡに関連する代謝性アシドーシス、発育不全、運動障害、代謝代償不全エピソード（例えば、エピソードの頻度及び／または回数）、皮膚損傷、緊張低下、痙攣及び腎障害。いくつかの実施形態において、本明細書で提供されるＭＭＡを治療するための方法は、ＭＭＡと診断された患者における腎機能、発育、認知能力及び運動を改善する。

【１０８４】

いくつかの実施形態において、ＭＭＡ本明細書で提供されるＭＭＡを治療するための方法は、ＭＭＡと診断された患者の入院（例えば、入院頻度または入院継続期間）を減少させる。いくつかの実施形態において、本明細書で提供されるＭＭＡを治療するための方法は、ＭＭＡと診断された患者の入院期間を減少させる。いくつかの実施形態において、本明細書で提供されるＭＭＡを治療するための方法は、入院率を減少させる。

【１０８５】

いくつかの実施形態において、本明細書で提供される方法は、ＭＭＡと診断された患者の生存を増大させる。いくつかの実施形態において、本明細書で提供されるＭＭＡを治療するための方法は、ＭＭＡと診断された対象の死亡率を減少させる。いくつかの実施形態において、本明細書で提供されるＭＭＡを治療するための方法は、ＭＭＡ患者の無症状生存を増大させる。いくつかの実施形態において、本明細書で提供されるＭＭＡを治療するための方法は、患者のＭＭＡを治癒するのではなく、疾患の進行または悪化を阻害する。いくつかの実施形態において、本明細書で提供されるＭＭＡを治療するための方法は、別の治療法の治療効果を向上または改善する。

【１０８６】

いくつかの実施形態において、本明細書で提供されるＭＭＡを治療するための方法は、対象における血漿中メチルマロン酸の濃度を、当該技術分野においてよく知られている方法または本明細書に記載される方法によって評価したとき、ＭＣＭポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡ）の投与前のそれぞれの濃度に対して、少なくとも約５％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、８０％、８５％、９０％、９５％もしくは１００％、または５％～５０％、１０％～５０％、２０％～５０％、２０％～７５％、２５％～７５％、２

５％～９０％もしくは１０％～９９％の範囲で減少させる。いくつかの実施形態において、本明細書で提供されるＭＭＡを治療するための方法は、対象における尿中メチルマロン酸の濃度を、当該技術分野においてよく知られている方法または本明細書に記載される方法によって評価したとき、ＭＣＭポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡ）の投与前のそれぞれの濃度に対して、少なくとも約５％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、８０％、８５％、９０％、９５％もしくは１００％、または５％～５０％、１０％～５０％、２０％～５０％、２０％～７５％、２５％～７５％、２５％～９０％もしくは１０％～９９％の範囲で減少させる。

【１０８７】

いくつかの実施形態において、本明細書で提供されるＭＭＡを治療するための方法は、対象における尿中メチルマロン酸の代謝産物の濃度を、当該技術分野においてよく知られている方法または本明細書に記載される方法によって評価したとき、ＭＣＭポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡ）の投与前のそれぞれの濃度に対して、少なくとも約５％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、８０％、８５％、９０％、９５％もしくは１００％、または５％～５０％、１０％～５０％、２０％～５０％、２０％～７５％、２５％～７５％、２５％～９０％もしくは１０％～９９％の範囲で減少させる。いくつかの実施形態において、本明細書で提供されるＭＭＡを治療するための方法は、対象における血漿中プロピオニルカルニチンの濃度を、当該技術分野においてよく知られている方法または本明細書に記載される方法によって評価したとき、ＭＣＭポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡ）の投与前のそれぞれの濃度に対して、少なくとも約５％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、８０％、８５％、９０％、９５％もしくは１００％、または５％～５０％、１０％～５０％、２０％～５０％、２０％～７５％、２５％～７５％、２５％～９０％もしくは１０％～９９％の範囲で減少させる。いくつかの実施形態において、本明細書で提供されるＭＭＡを治療するための方法は、対象における尿中メチルクエン酸の濃度を、当該技術分野においてよく知られている方法または本明細書に記載される方法によって評価したとき、ＭＣＭポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡ）の投与前のそれぞれの濃度に対して、少なくとも約５％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、８０％、８５％、９０％、９５％もしくは１００％、または１０％～５０％、２０％～５０％、２０％～７５％、２５％～７５％、２５％～９０％もしくは１０％～９９％の範囲で減少させる。

【１０８８】

いくつかの実施形態において、本明細書で提供されるＭＭＡを治療するための方法は、対象における赤血球中の奇数長鎖脂肪酸レベルを、当該技術分野においてよく知られている方法または本明細書に記載される方法によって評価したとき、ＭＣＭポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡ）の投与前のそれぞれの濃度に対して、少なくとも約５％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、８０％、８５％、９０％、９５％もしくは１００％、または１０％～５０％、２０％～５０％、２０％～７５％、２５％～７５％、２５％～９０％もしくは１０％～９９％の範囲で減少させる。いくつかの実施形態において、本明細書で提供されるＭＭＡを治療するための方法は、対象における尿中尿素:メチルマロン酸比を、当該技術分野においてよく知られている方法または本明細書に記載される方法によって評価したとき、ＭＣＭポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡ）の投与前のそれぞれの濃度に対して、少なくとも約５％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、８０％、８５％、９０％、９５％もしくは１００％、または１０％～５０％、２０％～５０％、２０％～７５％、２５％～７５％、２５％～９０％もしくは１０％～９９％の範囲で増加させる。

【１０８９】

いくつかの実施形態において、本明細書で提供されるＭＭＡを治療するための方法は、対象における細胞酵素活性を、当該技術分野においてよく知られている方法または本明細書に記載される方法によって評価したとき、ＭＣＭポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡ）の投与前のそれぞれの濃度に対して、少なくとも約５％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、８０％、８５％、９０％、９５％もしくは１００％、または１０％～５０％、２０％～５０％、２０％～７５％、２５％～７５％、２５％～９０％もしくは１０％～９９％の範囲で増加させる。ある特定の実施形態において、細胞酵素活性の増加は、対象から細胞（例えば、線維芽細胞またはリンパ球）を取得し、その細胞をポリヌクレオチドの存在下または非存在下で培養し、ＭＣＭポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡ）の存在下における細胞酵素活性と、ポリヌクレオチドの非存在下における細胞酵素活性とを比較することによって決定される。細胞酵素活性を測定するための技術は、当該技術分野において知られており、本明細書に記載される（例えば、以下のセクション６参照）。

【１０９０】

いくつかの態様において、本明細書で提供されるＭＭＡを治療するための方法は、対象の発育機能または認知機能を改善する。いくつかの態様において、本明細書で提供されるＭＭＡを治療するための方法は、当該技術分野においてよく知られている方法によって評価したとき、対象による筋収縮の制御を改善する。いくつかの実施形態において、本明細書で提供されるＭＭＡを治療するための方法は、腎機能を改善する。いくつかの実施形態において、本明細書で提供されるＭＭＡを治療するための方法は、腎臓移植、肝臓移植またはその両方の必要性を減少させる。いくつかの実施形態において、本明細書で提供されるＭＭＡを治療するための方法は、入院の必要性を減少させる。いくつかの実施形態において、本明細書で提供されるＭＭＡを治療するための方法は、入院期間及び／または入院頻度を減少させる。

【１０９１】

いくつかの実施形態では、対象はヒト男性である。いくつかの実施形態では、対象はヒト女性である。いくつかの実施形態において、本明細書で提供される方法に従ってＭＭＡの治療がなされる対象は、胎児である。本実施形態によれば、ポリヌクレオチドが胎盤を通過して胎児に届くような方法で、妊娠女性にポリヌクレオチドが投与され得る。あるいは、ポリヌクレオチドは、例えば、注射によって、胎児に直接投与され得る。いくつかの実施形態において、本明細書で提供される方法に従ってＭＭＡの治療がなされる対象は、ヒト乳幼児である。一実施形態において、本明細書で提供される方法に従ってＭＭＡの治療がなされる対象は、高齢のヒトである。別の実施形態において、本明細書で提供される方法に従ってＭＭＡの治療がなされる対象は、ヒト成人である。別の実施形態において、本明細書で提供される方法に従ってＭＭＡの治療がなされる対象は、ヒト小児である。別の実施形態において、本明細書で提供される方法に従ってＭＭＡの治療がなされる対象は、ヒト幼児である。

【１０９２】

具体的な一実施形態において、本明細書で提供される方法に従ってＭＭＡの治療がなされる対象は、５歳未満のヒトである。別の具体的な実施形態において、本明細書で提供される方法に従ってＭＭＡの治療がなされる対象は、５歳を超えるヒトである。具体的な一実施形態において、本明細書で提供される方法に従ってＭＭＡの治療がなされる対象は、５歳未満、５歳を超える、または１８歳以上のヒトである。

【１０９３】

いくつかの実施形態において、本明細書で提供される方法に従ってＭＭＡの治療がなされる対象には、ＭＣＭポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡ）もしくはその医薬組成物、または併用療法が、ポリヌクレオチド以外の治療法に対する任意の有害作用または不耐性が生じるまで、施される。いくつかの実施形態において、本明細書で提供される方法に従ってＭＭＡの治療がなされる対象は、難治性患者である。特定の

実施形態において、難治性患者は、標準療法（例えば、カルニチンまたはコバラミンサプリメント）に不応性であるＭＭＡ患者である。

【１０９４】

いくつかの実施形態において、本明細書で提供される方法に従ってＭＭＡの治療がなされる対象は、ポリヌクレオチドによる治療以外の治療法に対して不応性であることが判明しており、これらの治療法をもう受けていないヒトである。いくつかの実施形態において、本明細書で提供される方法に従ってＭＭＡの治療がなされる対象は、カルニチンサプリメント、コバラミンサプリメント、抗生物質、腎臓移植及び／または肝臓移植などの１つ以上の従来のＭＭＡ療法を既に受けているヒトである。いくつかの実施形態において、本明細書で提供される方法に従ってＭＭＡの治療がなされる対象は、低タンパク質食を受けているヒトである。いくつかの実施形態において、本明細書で提供される方法に従ってＭＭＡの治療がなされる対象は、イソロイシン、トレオニン、メチオニン及びバリンを含有する物質を避ける食事を受けているヒトである。

【１０９５】

いくつかの実施形態において、本明細書で提供される方法に従ってＭＭＡの治療がなされる対象は、従来の治療法による有害反応を受けやすいヒトである。いくつかの実施形態において、本明細書で提供される方法に従ってＭＭＡの治療がなされる対象は、ポリヌクレオチドまたはその医薬組成物の投与前に、ある治療法、例えば、カルニチンサプリメント、コバラミンサプリメント、抗生物質、腎臓移植及び／または肝臓移植を受けたことがないヒトである。いくつかの実施形態において、本明細書で提供される方法に従ってＭＭＡの治療がなされる対象は、ポリヌクレオチドまたはその医薬組成物の投与前に、ある治療法を受けたことがあるヒトである。いくつかの実施形態において、本明細書で提供される方法に従ってＭＭＡの治療がなされる対象は、前治療による有害な副作用を経験したことがあるか、ヒトに対する毒性が許容できないレベルであるために前治療を中止したヒトである。

【１０９６】

いくつかの実施形態において、本明細書で提供される方法に従ってＭＭＡの治療がなされる対象は、メチルマロニルＣｏＡムターゼ（ＭＣＭ）が完全欠損（ｍｕｔ０）または部分欠損（ｍｕｔ－）していると診断されたヒトである。ＭＣＭをコードする遺伝子は、ＭＵＴ遺伝子と呼ばれ、染色体６ｐ２１．１に位置する。

【１０９７】

用量及び投与

本明細書で提供されるＭＭＡを治療するための方法によれば、ＭＣＭポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡ）またはその医薬組成物は、様々な経路によって、有益な効果または治療効果をもたらす量で、それを必要とする対象に投与され得る。ＭＣＭポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡ）またはその医薬組成物は、本明細書で提供されるＭＭＡを治療するための方法に従って、それを必要とする対象に、静脈内投与され得る。

【１０９８】

ＭＣＭポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡ）を１つ以上の追加療法と組み合わせて投与することを伴う、本明細書で提供されるＭＭＡを治療するための方法によれば、ＭＣＭポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡ）及び１つ以上の追加療法は、同じ投与経路または異なる投与経路によって投与され得る。

【１０９９】

ＭＣＭポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡ）またはその医薬組成物の投与用量及び投与頻度は、本明細書で提供されるＭＭＡを治療するための方法に従って、それを必要とする対象に投与され、あらゆる副作用を最小限に抑えつつ、有効なものであり得る。ＭＣＭポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡ）またはその医薬組成物の正確な投与用量及び投与頻度は、治療を必要とする対象に関連する要因を考慮して、医師によって決定され得る。考慮され得る要因には、病状の重症度

、対象の全般的な健康状態、対象の年齢、体重及び性別、食事、投与の時間及び頻度、薬物併用（複数可）、反応感受性、ならびに治療法に対する耐性／応答が含まれる。ＭＣＭポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡ）またはその医薬組成物の投与用量及び投与頻度は、ポリヌクレオチドの十分なレベルをもたらすために、または所望の効果を維持するために、時間の経過とともに調整され得る。

【１１００】

いくつかの実施形態において、ＭＣＭポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡ）またはその医薬組成物は、次のうちの１つ以上を達成する投与用量及び投与頻度で、本明細書で提供されるＭＭＡを治療するための方法に従って、それを必要とする対象に投与される。（ｉ）１つ以上のＭＭＡ症状の重症度の低減または改善、（ｉｉ）ＭＭＡに関連する１つ以上の症状の継続期間の減少、（ｉｉｉ）ＭＭＡに関連する症状の再発の予防、（ｉｖ）対象の入院の減少、（ｖ）入院期間の減少、（ｖｉ）対象の生存の増加、（ｖｉｉ）別の治療法の治療効果の向上または改善、（ｖｉｉｉ）発育能力または認知能力の改善、（ｉｘ）代謝代償不全エピソードの頻度及び／または回数の減少、（ｘ）筋収縮の制御の改善、（ｘｉ）死亡率の減少、（ｘｉｉ）患者の生存率の増加、（ｘｉｉｉ）入院率の減少、（ｘｉｖ）ＭＭＡに関連する１つ以上の症状の進展または発症の阻害、（ｘｖ）ＭＭＡに関連する症状の数の減少、（ｘｖｉ）生体液（例えば、血漿または尿）中のメチルマロン酸の濃度の減少、（ｘｖｉｉ）生体液（例えば、血漿または尿）中のプロピオニルカルニチンまたはメチルクエン酸などのメチルマロン酸の代謝産物の濃度の減少、（ｘｖｉｉｉ）赤血球中の奇数長鎖脂肪酸レベルの減少、（ｘｉｘ）尿中尿素：メチルマロン酸比の増加、（ｘｘ）ＭＭＡ患者の無症状生存の増加、（ｘｘｉ）腎機能の改善、ならびに（ｘｘｉｉ）当該技術分野においてよく知られている方法によって評価したときの生活の質の改善。

【１１０１】

いくつかの実施形態において、ＭＣＭポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡ）またはその医薬組成物は、本明細書で提供されるＭＭＡを治療するための方法に従って、それを必要とする対象に、１日に１回投与される。いくつかの実施形態において、ＭＣＭポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡ）またはその医薬組成物は、本明細書で提供されるＭＭＡを治療するための方法に従って、それを必要とする対象に、２日に１回投与される。いくつかの実施形態において、ＭＣＭポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡ）またはその医薬組成物は、本明細書で提供されるＭＭＡを治療するための方法に従って、それを必要とする対象に、３日に１回投与される。いくつかの実施形態において、ＭＣＭポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡ）またはその医薬組成物は、本明細書で提供されるＭＭＡを治療するための方法に従って、それを必要とする対象に、４日に１回投与される。いくつかの実施形態において、ＭＣＭポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡ）またはその医薬組成物は、本明細書で提供されるＭＭＡを治療するための方法に従って、それを必要とする対象に、５日に１回投与される。いくつかの実施形態において、ＭＣＭポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡ）またはその医薬組成物は、本明細書で提供されるＭＭＡを治療するための方法に従って、それを必要とする対象に、６日に１回投与される。いくつかの実施形態において、ＭＣＭポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡ）またはその医薬組成物は、本明細書で提供されるＭＭＡを治療するための方法に従って、それを必要とする対象に、週に１回投与される。いくつかの実施形態において、ＭＣＭポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡ）またはその医薬組成物は、本明細書で提供されるＭＭＡを治療するための方法に従って、それを必要とする対象に、２週に１回投与される。いくつかの実施形態において、ＭＣＭポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡ）またはその医薬組成物は、本明細書で提供されるＭＭＡを治療するための方法に従って、それを必要とする対象に、３週に１回投与される。いくつかの実施形態において、ＭＣＭポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡ）またはそ

の医薬組成物は、本明細書で提供されるＭＭＡを治療するための方法に従って、それを必要とする対象に、月に１回投与される。いくつかの実施形態において、ＭＣＭポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡ）またはその医薬組成物は、本明細書で提供されるＭＭＡを治療するための方法に従って、それを必要とする対象に、罹患しているＭＭＡ患者における症状の減少を維持するのに十分な月間スケジュールで投与される。いくつかの実施形態において、ＭＣＭポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡ）またはその医薬組成物が、本明細書で提供されるＭＭＡを治療するための方法に従って、それを必要とする対象に、ある特定の期間にわたって毎日投与される、継続療法のための方法が本明細書で提供される。いくつかの実施形態において、ＭＣＭポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡ）またはその医薬組成物は、以後２４時間内に毎日、毎週、毎月または毎年継続して投与される。

【１１０２】

治療法の治療クール期間は、１週間、２週間、３週間、４週間、５週間、６週間、７週間、８週間、９週間、１０週間、１１週間、１２週間、１３週間、１４週間、４ヶ月、５ヶ月、６ヶ月、７ヶ月、８ヶ月、９ヶ月、１０ヶ月、１１ヶ月、１年、２年、３年、４年、５年またはそれ以上の範囲であり得る。治療期間は、１日、１週間、２週間、３週間、４週間、５週間、６週間、７週間、８週間、９週間、１０週間、１１週間、１２週間、１３週間、１４週間、４ヶ月、５ヶ月、６ヶ月、７ヶ月、８ヶ月、９ヶ月、１０ヶ月、１１ヶ月、１年、２年、３年、４年、５年またはそれ以上の範囲であり得る休薬期間によって中断されてもよい。そのような決定は、当業者（例えば、医師）によってなされ得る。いくつかの実施形態において、治療は、断続的であり、治療期間の後に治療のない期間が続く。継続治療は、１日以上、数ヶ月、数週または数年、中断されてもよい。継続治療はまた、１日以上、数ヶ月、数週または数年間継続する休薬期間が続いてもよく、休薬期間の後に継続治療が再開される。

【１１０３】

具体的な実施形態において、ポリヌクレオチドまたはその医薬組成物は、約０．０１～１０ｍｇ／ｋｇの用量で投与される。具体的な実施形態において、ポリヌクレオチドまたはその医薬組成物は、約０．０１ｍｇ／ｋｇ、０．０２ｍｇ／ｋｇ、０．０３ｍｇ／ｋｇ、０．０４ｍｇ／ｋｇ、０．０５ｍｇ／ｋｇ、０．０６ｍｇ／ｋｇ、０．０７ｍｇ／ｋｇ、０．０８、ｍｇ／ｋｇ、０．０９ｍｇ／ｋｇ、０．１ｍｇ／ｋｇ、約０．２ｍｇ／ｋｇ、約０．３ｍｇ／ｋｇ、約０．４ｍｇ／ｋｇ、約０．５ｍｇ／ｋｇ、約０．６ｍｇ／ｋｇ、約０．７ｍｇ／ｋｇ、約０．８ｍｇ／ｋｇ、０．９ｍｇ／ｋｇ、１．０ｍｇ／ｋｇ、約１．１ｍｇ／ｋｇ、１．２ｍｇ／ｋｇ、１．３ｍｇ／ｋｇ、約１．４ｍｇ／ｋｇ、１．５ｍｇ／ｋｇ、１．６ｍｇ／ｋｇ、約１．７ｍｇ／ｋｇ、１．８ｍｇ／ｋｇ、１．９ｍｇ／ｋｇ、約２．０ｍｇ／ｋｇ、２．１ｍｇ／ｋｇ、２．２ｍｇ／ｋｇ、約２．３ｍｇ／ｋｇ、２．４ｍｇ／ｋｇ、２．５ｍｇ／ｋｇ、３．０ｍｇ／ｋｇ、３．５ｍｇ／ｋｇ、４．０ｍｇ／ｋｇまたは約５．０ｍｇ／ｋｇの用量で投与される。具体的な実施形態において、ポリヌクレオチドまたはその医薬組成物は、約０．０１～２ｍｇ／ｋｇの用量で投与される。具体的な実施形態において、ポリヌクレオチドまたはその医薬組成物は、約０．０２～１ｍｇ／ｋｇの用量で投与される。具体的な実施形態において、ポリヌクレオチドまたはその医薬組成物は、約０．０２～１ｍｇ／ｋｇの用量で投与される。具体的な実施形態において、ポリヌクレオチドまたはその医薬組成物は、約０．０２～０．５ｍｇ／ｋｇの用量で投与される。具体的な実施形態において、ポリヌクレオチドまたはその医薬組成物は、約０．０３～０．５ｍｇ／ｋｇの用量で投与される。具体的な実施形態において、ポリヌクレオチドまたはその医薬組成物は、約０．０４～０．５ｍｇ／ｋｇの用量で投与される。具体的な実施形態において、ポリヌクレオチドまたはその医薬組成物は、約０．０５～０．５ｍｇ／ｋｇの用量で投与される。

【１１０４】

具体的な実施形態において、ポリヌクレオチドまたはその医薬組成物は、約０．０２～０．５ｍｇ／ｋｇの用量で投与される。具体的な実施形態において、ポリヌクレオチドまた

はその医薬組成物は、約０．０２～０．１あるいは０．２ｍｇ／ｋｇの用量で投与される。具体的な実施形態において、ポリヌクレオチドまたはその医薬組成物は、約０．０２～０．１あるいは０．２ｍｇ／ｋｇの用量で投与される。具体的な実施形態において、ポリヌクレオチドまたはその医薬組成物は、約０．０３～０．１あるいは０．２ｍｇ／ｋｇの用量で投与される。具体的な実施形態において、ポリヌクレオチドまたはその医薬組成物は、約０．０４～０．１あるいは０．２ｍｇ／ｋｇの用量で投与される。具体的な実施形態において、ポリヌクレオチドまたはその医薬組成物は、約０．０５～０．１あるいは０．２ｍｇ／ｋｇの用量で投与される。

【１１０５】

他の実施形態において、本開示のポリヌクレオチドの有効用量は、０．１ｍｇ／ｋｇ～１．０ｍｇ／ｋｇ、０．１ｍｇ／ｋｇ～１０ｍｇ／ｋｇ、０．１ｍｇ／ｋｇ～２ｍｇ／ｋｇ、０．１ｍｇ／ｋｇ～５ｍｇ／ｋｇ、１ｍｇ／ｋｇ～５ｍｇ／ｋｇ、または１ｍｇ／ｋｇ～３ｍｇ／ｋｇである。いくつかの実施形態において、有効用量は、投与後の血漿中ＭＭＡレベルを投与前の血漿中ＭＭＡレベルと比較して少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％または少なくとも９５％減少させるのに十分なものである。他の実施形態において、血漿中ＭＭＡレベルは、投与前の血漿中ＭＭＡレベルと比較して、約７５％～８５％減少する。

【１１０６】

他の実施形態において、有効用量は、投与後の血漿中ＭＭＡレベルを約５μｍｏｌ／Ｌ、約４．５μｍｏｌ／Ｌ、約４μｍｏｌ／Ｌ、約３．５μｍｏｌ／Ｌ、約３μｍｏｌ／Ｌ、約２．５μｍｏｌ／Ｌ、約２μｍｏｌ／Ｌ、約１．５μｍｏｌ／Ｌ、約１μｍｏｌ／Ｌ、約０．９μｍｏｌ／Ｌ、約０．８μｍｏｌ／Ｌ、約０．７μｍｏｌ／Ｌ、約０．６μｍｏｌ／Ｌ、約０．５μｍｏｌ／Ｌ、約０．４μｍｏｌ／Ｌ、約０．３μｍｏｌ／Ｌ、または０．２７μｍｏｌ／Ｌよりも低く維持するのに十分なものである。

【１１０７】

ある特定の実施形態において、有効用量は、尿中ＭＭＡレベルを、２０００ｍｍｏｌ／ｍｏｌクレアチニン未満、１９００ｍｍｏｌ／ｍｏｌクレアチニン未満、１８００ｍｍｏｌ／ｍｏｌクレアチニン未満、１７００ｍｍｏｌ／ｍｏｌクレアチニン未満、１６００ｍｍｏｌ／ｍｏｌクレアチニン未満、１５００ｍｍｏｌ／ｍｏｌクレアチニン未満、１４００ｍｍｏｌ／ｍｏｌクレアチニン未満、１３００ｍｍｏｌ／ｍｏｌクレアチニン未満、１２００ｍｍｏｌ／ｍｏｌクレアチニン未満、１１００ｍｍｏｌ／ｍｏｌクレアチニン未満、１０００ｍｍｏｌ／ｍｏｌクレアチニン未満、９００ｍｍｏｌ／ｍｏｌクレアチニン、８００ｍｍｏｌ／ｍｏｌクレアチニン、７００ｍｍｏｌ／ｍｏｌクレアチニン、６００ｍｍｏｌ／ｍｏｌクレアチニン、５００ｍｍｏｌ／ｍｏｌクレアチニン、４００ｍｍｏｌ／ｍｏｌクレアチニン、３００ｍｍｏｌ／ｍｏｌクレアチニン、２００ｍｍｏｌ／ｍｏｌクレアチニン、１００ｍｍｏｌ／ｍｏｌクレアチニン、９０ｍｍｏｌ／ｍｏｌクレアチニン、８０ｍｍｏｌ／ｍｏｌクレアチニン、７０ｍｍｏｌ／ｍｏｌクレアチニン、６０ｍｍｏｌ／ｍｏｌクレアチニン、５０ｍｍｏｌ／ｍｏｌクレアチニン、４０ｍｍｏｌ／ｍｏｌクレアチニン、３０ｍｍｏｌ／ｍｏｌクレアチニン、２０ｍｍｏｌ／ｍｏｌクレアチニン、１０ｍｍｏｌ／ｍｏｌクレアチニン、９ｍｍｏｌ／ｍｏｌクレアチニン、８ｍｍｏｌ／ｍｏｌクレアチニン、７ｍｍｏｌ／ｍｏｌクレアチニン、６ｍｍｏｌ／ｍｏｌクレアチニン、５ｍｍｏｌ／ｍｏｌクレアチニン、４ｍｍｏｌ／ｍｏｌクレアチニン、３ｍｍｏｌ／ｍｏｌクレアチニン、２ｍｍｏｌ／ｍｏｌクレアチニン、または１ｍｍｏｌ／ｍｏｌクレアチニンに維持するのに十分なものである。

【１１０８】

いくつかの実施形態において、本明細書で提示されるＭＭＡを治療するための方法は、ＭＣＭポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡ）または医薬組成物の有効量を１用量以上で、それを必要とする対象に投与することを伴い、有効量は、各用量で同じであっても同じでなくてもよい。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドまたはその医薬組成物の初回用量が第１の期間わたってそれを必要とする対象に投与さ

れ、その後、第２の用量のポリヌクレオチドが第２の期間にわたって対象に投与される。初回用量は、第２の用量よりも多くてもよいし、第２の用量よりも少なくてもよい。同様に、第３の用量のポリヌクレオチドが第３の期間にわたってそれを必要とする対象に投与されてもよい。

【１１０９】

本明細書で提示されるＭＭＡを治療するための方法に従ってポリヌクレオチドまたはその医薬組成物がそれを必要とする対象に投与される期間は、有効であるとみなされる期間であり得る。いくつかの実施形態において、本明細書で提示されるＭＭＡを治療するための方法は、ＭＭＡに関連する症状の重症度及び／または数が減少するまでの期間、ポリヌクレオチドまたはその医薬組成物を投与することを伴う。

【１１１０】

それを必要とする患者に投与されるポリヌクレオチドまたはその医薬組成物の量は、対象の患者の実際の体重または対象の患者集団の平均体重に基づくか、計算され得ることが理解されるであろう。

【１１１１】

併用療法

ＭＣＭポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡ）を１つ以上の追加療法と組み合わせて、それを必要とする対象に投与することを伴う、ＭＭＡの治療のための併用療法が本明細書で提示される。具体的な一実施形態において、有効量のＭＣＭポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡ）を有効量の別の治療法と組み合わせて、それを必要とする対象に投与することを伴う、ＭＭＡの治療のための併用療法が本明細書で提示される。そのような他の治療法の具体例には、カルニチンサプリメント（Ｌ－カルニチンなど）、コバラミンサプリメント及び抗生物質（メトロニダゾールなど）が挙げられるが、これらに限定されない。

【１１１２】

本明細書で提供される併用療法は、ポリヌクレオチドまたはその医薬組成物を、ＭＭＡに対する従来の治療法または既知の治療法と組み合わせて、それを必要とする対象に投与することを伴う。ＭＭＡに対する現在の治療法には、カルニチンサプリメント、コバラミンサプリメント及び抗生物質が含まれる。ＭＭＡまたはそれに関連する状態に対する他の治療法は、症状の抑制または緩和、例えば、痙攣抑制治療を目的にする。したがって、いくつかの実施形態において、本明細書で提供される併用療法は、それを必要とする対象に、鎮痛剤、てんかん発作のための薬剤、またはＭＭＡに関連する症状もしくはそれに関連する状態の軽減もしくは抑制を目的にする他の治療法を施すことを伴う。

【１１１３】

いくつかの実施形態において、本明細書で提供されるＭＭＡを治療するための方法は、ＭＣＭポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡ）を、当該ポリヌクレオチドを追加療法と組み合わせて投与する前に、単剤としてある期間投与することを含む。いくつかの実施形態において、本明細書で提供されるＭＭＡを治療するための方法は、ＭＣＭポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡ）を追加療法と組み合わせて投与する前に、追加療法のみをある期間実施することを含む。

【１１１４】

いくつかの実施形態において、本明細書で提示される方法に従ったＭＣＭポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡ）及び１つ以上の追加療法の実施は、ポリヌクレオチドまたは当該１つ以上の追加療法の単独の実施と比べて、相加効果を有する。いくつかの実施形態において、本明細書で提示される方法に従ったＭＣＭポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡ）及び１つ以上の追加療法の実施は、ポリヌクレオチドまたは当該１つ以上の追加療法の単独の実施と比べて、相乗効果を有する。

【１１１５】

ＭＣＭポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡ）と１つ以上の追

加療法の組み合わせは、同じ医薬組成物中で対象に投与され得る。あるいは、ＭＣＭポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡ）と１つ以上の追加療法は、異なる医薬組成物で対象に同時に投与され得る。ＭＣＭポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡ）と１つ以上の追加療法は、異なる医薬組成物で対象に順次投与され得る。ＭＣＭポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡ）及び１つ以上の追加療法はまた、同じ投与経路または異なる投与経路で対象に投与され得る。

【１１１６】

いくつかの実施形態において、本明細書で提供される併用療法は、それを必要とする対象に、ＭＣＭポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡ）またはその医薬組成物を、次のもの：カルニチンサプリメント（例えば、Ｌ－カルニチン）、コバラミンサプリメント及び抗生物質のうちの１つ以上と組み合わせて投与することを伴う。いくつかの実施形態において、本明細書で提供される併用療法は、それを必要とする対象に、ＭＣＭポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡ）またはその医薬組成物を、臓器移植（例えば、腎臓、肝臓または腎臓及び肝臓の移植）と組み合わせて投与することを伴う。

【１１１７】

臨床目的

ＭＭＡを治療するためのポリヌクレオチドの有効性は、血漿メチルマロン酸の減少に対するポリヌクレオチドの作用を決定することによって評価され得る。ＭＭＡを治療するためのポリヌクレオチドの有効性は、（ｉ）尿中メチルクエン酸レベルに対する効果を決定すること、（ｉｉ）血漿中プロピオニルカルニチンレベルに対する効果を決定すること、（ｉｉｉ）赤血球中の奇数長鎖脂肪酸レベルに対する効果を評価すること、（ｉｖ）尿中尿素：メチルマロン酸比に対する効果を決定すること、（ｖ）ＭＭＡの対象に由来する培養した線維芽細胞及びリンパ球の酵素活性に対する効果を決定すること、（ｖｉ）対象の発育能力及び認知能力に対する効果を評価すること、（ｖｉｉ）ジストニア評価スケールに対する効果を評価すること、（ｖｉｉｉ）あらゆる代謝代償不全エピソードの発生に対する効果を評価すること、（ｉｘ）ポリヌクレオチドの安全性プロファイルを評価すること、（ｘ）ポリヌクレオチドによる治療の順守を評価すること、ならびに（ｘｉ）経時的なポリヌクレオチドの血漿曝露を決定することによって評価することもできる。

【１１１８】

臨床エンドポイント

ＭＭＡを治療するためのポリヌクレオチドの有効性に関する主要臨床エンドポイントには、血漿中メチルマロン酸レベルの減少が含まれる。ＭＭＡを治療するためのポリヌクレオチドの有効性に関する他の臨床エンドポイントには、尿中メチルマロン酸レベルの減少、尿中メチルクエン酸の減少、血漿中プロピオニルカルニチンの減少、赤血球中の奇数長鎖脂肪酸レベルの減少、尿素：メチルマロン酸比の増加、及び検証済み生物分析法によって評価したときのポリヌクレオチドの血漿中濃度に基づいた薬物動態パラメーター、例えば、最高血漿中濃度到達時間（Ｔｍａｘ）、Ｃｍａｘ、ＡＵＣ、終末消失半減期（ｔ１／２）が含まれ得る。

【１１１９】

血漿中メチルマロン酸レベル

関連する酵素または因子（例えば、ＭＣＭ）の活性を増加させるポリヌクレオチドの有効性を示すために、血漿中メチルマロン酸レベルを使用することができる。正常血漿中メチルマロン酸レベルは、約０．２７μｍｏｌ／Ｌ未満である（Ｆｏｗｌｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，２００８，Ｊ．Ｉｎｈｅｒｉｔ．Ｍｅｔａｂ．Ｄｉｓ．３１：３５０－３６０）。血漿中メチルマロン酸レベルは、ＭＭＡ患者で上昇し、通常、コバラミン非応答性患者で約１００～約１．０００μｍｏｌ／Ｌ、コバラミン応答性患者で約５～約１００μｍｏｌ／Ｌの範囲である（Ｖｅｎｄｉｔｔｉ，２００７，Ｇｅｎｅ　Ｒｅｖｉｅｗｓ）。メチルマロン酸は、腎毒性であると考えられ、メチルマロン酸、プロピオニルＣｏＡ及び２メチルクエ

ン酸の中枢神経系の蓄積は、ＭＭＡの慢性神経合併症の基礎になると思われる（Ｍｏｒａｔｈ ｅｔ ａｌ．，２００８，Ｊ．Ｉｎｈｅｒｉｔ．Ｍｅｔａｂ．Ｄｉｓ．３１：３５－４３）。血漿中または尿中メチルマロン酸レベルの３０％を超える減少は、臨床的に意義のある差と考えられている（Ｚｗｉｃｋｌｅｒ ｅｔ ａｌ．，２００８，Ｊ．Ｉｎｈｅｒｉｔ．Ｍｅｔａｂ．Ｄｉｓ．３１：３６１－３６７）。

【１１２０】

血液が採取され得、標準ガスクロマトグラフィー／質量分析計（ＧＣ／ＭＳ）安定同位体希釈法を使用して血漿中メチルマロン酸濃度を決定することができる。

【１１２１】

尿中メチルマロン酸レベル

関連する酵素または因子（例えば、ＭＣＭ）の活性を増加させるポリヌクレオチドの有効性を示すために、尿中メチルマロン酸レベルを使用することができる。正常尿中メチルマロン酸レベルは、４ｍｍｏｌ／ｍｏｌクレアチニン未満であり（Ｖｅｎｄｉｔｔｉ，２００７，Ｇｅｎｅ Ｒｅｖｉｅｗｓ）、ＭＭＡでは、このレベルが著しく上昇する。一般に、重症度の高いＭＭＡタイプであるｍｕｔ０及びｃｂｌＢは、重症度の低いタイプであるｍｕｔ－及びｃｂｌＡ（＜１，０００～＞５，０００ｍｏｌ／ｍｏｌクレアチニン）と比較して、尿中メチルマロン酸レベルがより高い（約５，０００～＞１０．０００ｍｍｏｌ／ｍｏｌクレアチニン）（Ｈｏｒｓｔｅｒ ｅｔ ａｌ．，２００７，Ｐｅｄｉａｔｒ．Ｒｅｓ．６２：２２５－２３０；Ｆｏｗｌｅｒ ｅｔ ａｌ．，２００８，Ｊ．Ｉｎｈｅｒｉｔ．Ｍｅｔａｂ．Ｄｉｓ．３１：３５０－３６０）。尿中メチルマロン酸レベルが－２．０００ｍｍｏｌ／ｍｏｌクレアチニンを下回る患者では、慢性腎不全が生じないことが観察されている（Ｈｏｒｓｔｅｒ ｅｔ ａｌ．，２００７，Ｐｅｄｉａｔｒ．Ｒｅｓ．６２：２２５－２３０）。

【１１２２】

尿が採取され得、標準ガスクロマトグラフィー／質量分析計（ＧＣ／ＭＳ）安定同位体希釈法を使用して尿中メチルマロン酸濃度を決定することができる。

【１１２３】

血漿中プロピオニルカルニチン、尿中メチルクエン酸、赤血球中ＯＬＣＦＡ、尿中尿素：メチルマロン酸比

血漿中プロピオニルカルニチン及び尿中メチルクエン酸は、メチルマロン酸代謝産物であり、関連する酵素または因子（例えば、ＭＣＭ）の活性を増加させる、ＭＣＭポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡ）の有効性を示すために使用することができる。腎不全がある場合には、尿中メチルマロン酸よりも血漿中プロピオニルカルニチンのほうが有用な測定値であり得ることが示唆されている（Ｈｏｒｓｔｅｒ ｅｔ ａｌ．，２００７，Ｐｅｄｉａｔｒ．Ｒｅｓ．６２：２２５－２３０）。尿中メチルクエン酸は、メチルマロン酸レベルの上昇状態において、上昇することがわかっている（Ｆｏｗｌｅｒ ｅｔ ａｌ．，２００８，Ｊ．Ｉｎｈｅｒｉｔ．Ｍｅｔａｂ．Ｄｉｓ．３１：３５０－３６０）。血液及び尿が採取され得、標準技術を使用して、血漿中プロピオニルカルニチンレベル及び尿中メチルクエン酸レベルをそれぞれ決定することができる。

【１１２４】

ＯＬＣＦＡは、赤血球膜脂質で測定され、関連する酵素または因子（例えば、ＭＣＭ）の活性を増加させる、ＭＣＭポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡ）の有効性を示すために使用することができる。赤血球中ＯＬＣＦＡ値は、疾患の重症度と、ＭＭＡにおける食事制限の質の両方を反映する（Ｍｅｒｉｎｅｒｏ ｅｔ ａｌ．，２００８，Ｊ．Ｉｎｈｅｒｉｔ．Ｍｅｔａｂ．Ｄｉｓ．３１：５５－６６）。このパラメーターは、細胞のプロピオニルＣｏＡ負荷及び有機酸血症における長期代謝制御の指標である（Ｍｅｒｉｎｅｒｏ ｅｔ ａｌ．，２００８，Ｊ．Ｉｎｈｅｒｉｔ．Ｍｅｔａｂ．Ｄｉｓ．３１：５５－６６；Ｓｐｅｒｌ ｅｔ ａｌ．，２０００，Ｅｕｒ．Ｊ．Ｐｅｄｉａｔｒ．１５９：５４－８８）。赤血球中ＯＬＣＦＡ濃度を決定するための標準的方法を使用することができる。

【１１２５】
ＭＣＭポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡ）の投与後におけるベースラインと比較した尿中尿素：メチルマロン酸比の増加は、欠損している酵素または因子（ＭＣＭ、ｃｂｌＡまたはｃｂｌＢ）の活性の増加を示し得る。タンパク質の異化作用は、尿素及びメチルマロン酸の両方の生成をもたらす。これらの異化産物の値は、食物タンパク質の摂取により変動し得る。メチルマロン酸の供給源が主に天然タンパク質である場合、すなわち、酵素活性のない患者（例えば、ｍｕｔ０患者）において、尿中尿素：メチルマロン酸の比は、およそ３．５である。残留酵素活性がある場合（例えば、コバラミン感受性患者に対するビタミンＢ１２の投与）、その比は、一般に、＞５である。アミノ酸サプリメントを摂取している患者は、メチルマロン酸よりも尿素の生成が多く、５を超える尿素：ＭＭＡ比を有し得る。しかしながら、このカテゴリーの患者であっても、欠陥のある酵素または因子の活性が増加する場合、尿素：ＭＭＡ比は、増加し得る（Ｖａｌａｙａｎｎｏｐｏｕｌｏｓ ｅｔ ａｌ．，Ａｎｎｕａｌ Ｓｙｍｐｏｓｉｕｍ ｏｆ ｔｈｅ Ｓｏｃｉｅｔｙ ｆｏｒ ｔｈｅ Ｓｔｕｄｙ ｏｆ Ｉｎｂｏｒｎ Ｅｒｒｏｒｓ ｏｆ Ｍｅｔａｂｏｌｉｓｍ，Ａｍｓｔｅｒｄａｍ，Ｔｈｅ Ｎｅｔｈｅｒｌａｎｄｓ，Ｓｅｐｔｅｍｂｅｒ ２００４）。
【１１２６】
ＶＩＩＩ．キット及びデバイス
キット
本開示は、特許請求される本開示のヌクレオチドを簡便に及び／または効果的に使用するための様々なキットを提供する。典型的に、キットは、使用者による、対象（複数可）の複数回の治療の実施及び／または複数回の実験の実施を可能にする、十分な量及び／または数の構成成分を含み得る。
【１１２７】
一態様において、本開示は、本開示の分子（ポリヌクレオチド）を含むキットを提供する。
【１１２８】
当該キットは、翻訳可能領域を含む第１のポリヌクレオチドを含む、タンパク質生産のためのものであり得る。キットは、包装及び説明書ならびに／または製剤組成物を形成するための送達剤を更に含み得る。送達剤は、生理食塩水、緩衝液、リピドイドまたは本明細書で開示される任意の送達剤を含み得る。
【１１２９】
いくつかの実施形態において、緩衝液は、塩化ナトリウム、塩化カルシウム、リン酸及び／またはＥＤＴＡを含み得る。別の実施形態において、緩衝液には、生理食塩水、２ｍＭカルシウム添加生理食塩水、５％スクロース、２ｍＭカルシウム添加５％スクロース、５％マンニトール、２ｍＭカルシウム添加５％マンニトール、乳酸リンゲル液、塩化ナトリウム、２ｍＭカルシウム添加塩化ナトリウム及びマンノースが含まれ得るが、これらに限定されない（例えば、米国特許出願公開第２０１２０２５８０４６号参照、その全体を参照により本明細書に援用する）。更なる実施形態において、緩衝液は、沈殿させてもよいし、凍結乾燥してもよい。各構成成分の量は、再現可能な一貫した高濃度の生理食塩水または単純な緩衝液配合物を可能にするように変更することができる。構成成分はまた、一定期間にわたって、及び／または様々な条件下で、緩衝液中の修飾ＲＮＡの安定性を増大させるために、変更してもよい。一態様において、本開示は、標的細胞に導入されると、翻訳可能領域にコードされたタンパク質の所望量を生産するのに有効な量で提供される、翻訳可能領域を含むポリヌクレオチドと、細胞の自然免疫応答を実質的に阻害するのに有効な量で提供される、阻害核酸を含む第２のポリヌクレオチドと、包装及び説明書とを含む、タンパク質生産のためのキットを提供する。
【１１３０】
一態様において、本開示は、翻訳可能領域を含むポリヌクレオチドと、包装及び説明書とを含む、タンパク質生産のためのキットを提供し、当該ポリヌクレオチドは、細胞ヌクレアーゼによる分解の減少を示す。

【１１３１】
一態様において、本開示は、翻訳可能領域を含むポリヌクレオチドと、第１の核酸の翻訳可能領域の翻訳に適した哺乳動物細胞とを含む、タンパク質生産のためのキットを提供し、当該ポリヌクレオチドは、細胞ヌクレアーゼによる分解の減少を示す。
【１１３２】
デバイス
本開示は、目的のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを組み込むことができるデバイスを提供する。これらのデバイスは、ヒト患者などのそれを必要とする対象に即座に送達することができる製剤中にポリヌクレオチドを合成するための試薬を安定した製剤中に含有する。
【１１３３】
投与用デバイスは、本明細書で教示される単回、複数回または分割投与レジメンに従って、本開示のポリヌクレオチドを送達するために用いることができる。そのようなデバイスは、例えば、２０１３年３月９日に出願された国際出願第ＰＣＴ／ＵＳ２０１３／３００６２号に教示されており、その内容全体を参照により本明細書に援用する。
【１１３４】
当該技術分野において知られている、細胞、器官及び組織への複数回投与のための方法及びデバイスは、本開示の実施形態として本明細書で開示される方法及び組成物とともに使用することが企図される。これらには、例えば、複数の針を有する方法及びデバイス、ハイブリッドデバイス（例えば、ルーメンまたはカテーテルを用いるもの）ならびに熱、電流または放射線駆動機構を利用するデバイスが含まれる。
【１１３５】
本開示によれば、これらの複数回投与デバイスを利用して、本明細書で企図される単回用量、複数回用量または分割用量を送達することができる。そのようなデバイスは、例えば、２０１３年３月９日に出願された国際出願第ＰＣＴ／ＵＳ２０１３／３００６２号に教示されており、その内容全体を参照により本明細書に援用する。
【１１３６】
いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、少なくとも３本の針を介して、任意選択により隣接する３つの異なる部位に、同時または６０分以内に皮下または筋肉内投与される（例えば、４、５、６、７、８、９または１０の部位への同時または６０分以内の投与）。
【１１３７】
カテーテル及び／またはルーメンを利用する方法及びデバイス
単回、複数回または分割投与スケジュールで本開示のポリヌクレオチドを投与するために、カテーテル及びルーメンを使用する方法及びデバイスを用いることができる。そのような方法及びデバイスは、２０１３年３月９日に出願された国際出願第ＰＣＴ／ＵＳ２０１３／３００６２号（代理人整理番号Ｍ３００）に記載されており、その内容全体を参照により本明細書に援用する。
【１１３８】
電流を利用する方法及びデバイス
本明細書で教示される単回、複数回または分割投与レジメンに従って、本開示のポリヌクレオチドを送達するために、電流を利用する方法及びデバイスを用いることができる。そのような方法及びデバイスは、２０１３年３月９日に出願された国際出願第ＰＣＴ／ＵＳ２０１３／３００６２号（代理人整理番号Ｍ３００）に記載されており、その内容全体を参照により本明細書に援用する。
【１１３９】
ＩＸ．定義
本開示が容易に理解されるように、ある特定の用語について最初に定義する。本出願で使用されるとき、本明細書で別途明記されている場合を除いて、以下の用語のそれぞれは、以下に記載される意味を有するものとする。更なる定義については、本願中に記載される。

【１１４０】
本開示は、群の正確に１つの構成要素が、所与の生成物またはプロセス中に存在するか、用いられるか、いずれにせよこれらに関連している実施形態を含む。本開示は、群の構成要素の２つ以上または全てが、所与の生成物またはプロセス中に存在するか、用いられるか、いずれにせよこれらに関連している実施形態を含む。
【１１４１】
本明細書及び添付の特許請求の範囲において、単数形「ａ」、「ａｎ」及び「ｔｈｅ」は、文脈により別途明示される場合を除き、複数の指示対象を含む。「ａ」（または「ａｎ」）という用語、また「１つ以上の」及び「少なくとも１つの」という用語は、本明細書中、区別なく使用され得る。ある特定の態様において、「ａ」または「ａｎ」という用語は、「１つ」を意味する。他の態様において、「ａ」または「ａｎ」という用語は、「２つ以上の」または「複数」を含む。
【１１４２】
更に、「及び／または」は、本明細書で使用される場合、２つの指定された特徴または構成成分のそれぞれの、もう一方を伴うまたは伴わない、具体的開示とみなされるものとする。したがって、本明細書において「Ａ及び／またはＢ」などの文言中で使用される「及び／または」という用語は、「Ａ及びＢ」、「ＡまたはＢ」、「Ａ」（単独）及び「Ｂ」（単独）を含むことが意図される。同様に、「Ａ、Ｂ及び／またはＣ」などの文言中で使用される「及び／または」という用語は、次の態様のそれぞれ包含することが意図される：Ａ、Ｂ及びＣ；Ａ、ＢまたはＣ；ＡまたはＣ；ＡまたはＢ；ＢまたはＣ；Ａ及びＣ；Ａ及びＢ；Ｂ及びＣ；Ａ（単独）；Ｂ（単独）；ならびにＣ（単独）。
【１１４３】
別途の定義がない限り、本明細書で使用される全ての科学技術用語は、本開示が関係する技術分野の当業者によって一般的に理解されている意味と同一の意味を有する。例えば、Ｃｏｎｃｉｓｅ Ｄｉｃｔｉｏｎａｒｙ ｏｆ Ｂｉｏｍｅｄｉｃｉｎｅ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｊｕｏ，Ｐｅｉ－Ｓｈｏｗ，２ｎｄ ｅｄ．，２００２，ＣＲＣ Ｐｒｅｓｓ；Ｔｈｅ Ｄｉｃｔｉｏｎａｒｙ ｏｆ Ｃｅｌｌ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，３ｒｄ ｅｄ．，１９９９，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ；及びｔｈｅ Ｏｘｆｏｒｄ Ｄｉｃｔｉｏｎａｒｙ Ｏｆ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ Ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｒｅｖｉｓｅｄ，２０００，Ｏｘｆｏｒｄ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒｅｓｓは、本開示で使用される用語の多くに関する一般的な辞書を当業者に提供するものである。
【１１４４】
態様が「含む」という用語を用いて本明細書で記載されている場合には必ず、「～からなる」及び／または「～から本質的になる」という用語で記載される類似の態様もまた提供される。
【１１４５】
単位、接頭辞及び記号は、国際単位系（ＳＩ）に認められた形態で示される。数値範囲は、その範囲を定義する数を含む。値の範囲が列挙される場合、その範囲の列挙された上限値と下限値の間にある各整数値及びその各小数も、これらの値の間にあるそれぞれの部分範囲とともに、具体的に開示されることを理解されたい。任意の範囲の上限値及び下限値は、その範囲から独立して包含または除外することができ、どちらか一方またはその両方を含むか、いずれも含まない各範囲も本開示の範囲に包含される。値が明示的に列挙される場合、列挙された値とほぼ同じ大きさまたは量である値も本開示の範囲内であることを理解されたい。組み合わせが開示される場合、当該組み合わせの要素のそれぞれの部分的組み合わせも具体的に開示され、本開示の範囲内である。逆に、異なる要素または要素群が個々に開示される場合、その組み合わせも開示される。本開示の任意の要素が複数の代替物を有するものとして開示される場合、各代替物が、単独で、または他の代替物との任意の組み合わせで除外される開示の例もまた本明細書に開示され、開示の２つ以上の要素がそのような除外を有し得、そのような除外を有する要素の全ての組み合わせが本明細書

に開示される。
【１１４６】
ヌクレオチドは、一般に認められている一文字記号で言及される。特に指定のない限り、核酸は、５’から３’に向けて左から右に記述される。ヌクレオチドは、本明細書において、ＩＵＰＡＣ－ＩＵＢ生化学命名委員会によって推奨される、一般的に知られている一文字で言及される。したがって、Ａはアデニンを表し、Ｃはシトシンを表し、Ｇはグアニンを表し、Ｔはチミンを表し、Ｕはウラシルを表す。
【１１４７】
アミノ酸は、本明細書において、ＩＵＰＡＣ－ＩＵＢ生化学命名委員会によって推奨される、一般的に知られている三文字表記または一文字表記のいずれかで言及される。特に指定のない限り、アミノ酸配列は、アミノからカルボキシに向けて左から右に記述される。
【１１４８】
本明細書中の様々な箇所において、本開示の化合物の置換基は、群または範囲で開示される。本開示は、そのような群または範囲の要素のそれぞれ及び個々の部分的組み合わせを含むことが特に意図される。
【１１４９】
約：本明細書で使用されるとき、「約」という用語は、列挙される値の＋／－１０％を意味する。
【１１５０】
組み合わせての投与：本明細書で使用されるとき、「組み合わせての投与」または「組み合わせ投与」という用語は、２つ以上の作用物質が、患者に対する各作用物質の効果が重なり得るように、同時にまたはある間隔内で対象に投与されることを意味する。いくつかの実施形態において、それぞれが互いに約６０、３０、１５、１０、５または１分以内に投与される。いくつかの実施形態において、作用物質の投与は、組み合わせ作用（例えば、相乗作用）が達成されるように、互いに十分に近接した間隔である。
【１１５１】
アミノ酸置換：「アミノ酸置換」という用語は、親配列（例えば、コンセンサス配列）中に存在するアミノ酸残基を別のアミノ酸残基に置き換えることを指す。アミノ酸は、親配列において、例えば、化学ペプチド合成または当該技術分野において知られている組み換え法によって、置換され得る。したがって、「位置Ｘの置換」への言及は、位置Ｘに存在するアミノ酸を代替アミノ酸残基で置換することを指す。いくつかの態様において、置換パターンは、式ＡｎＹに従って記述することができ、ここで、Ａは、位置ｎに天然に存在するアミノ酸に対応する一文字記号であり、Ｙは、置換アミノ酸残基である。他の態様において、置換パターンは、式Ａｎ（ＹＺ）に従って記述することができ、ここで、Ａは、位置Ｘに天然に存在するアミノ酸を置換するアミノ酸残基に対応する一文字記号であり、Ｙ及びＺは、代替置換アミノ酸残基である。すなわち、本開示との関係において、置換は（アミノ酸置換と称される場合であっても）、核酸レベルで行われ、すなわち、アミノ酸残基を代替アミノ酸残基で置換することは、第１のアミノ酸をコードするコドンを、第２のアミノ酸をコードするコドンで置換することによって実施される。
【１１５２】
動物：本明細書で使用されるとき、「動物」という用語は、動物界の任意の一員を指す。いくつかの実施形態において、「動物」は、あらゆる発達段階のヒトを指す。いくつかの実施形態において、「動物」は、あらゆる発達段階の非ヒト動物を指す。特定の実施形態において、非ヒト動物は、哺乳動物（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。いくつかの実施形態において、動物には、哺乳類、鳥類、爬虫類、両生類、魚類及び蠕虫が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、動物は、トランスジェニック動物、遺伝子操作動物またはクローンである。
【１１５３】
およそ：本明細書で使用されるとき、「およそ」という用語は、１つ以上の目的とする値

に適用されるとき、指定された参照値と同様である値を指す。ある特定の実施形態において、「およそ」という用語は、別途の指定がない限りまたは文脈から明らかでない限り、指定された参照値のいずれかの方向（より大きいまたはより小さい）の２５％、２０％、１９％、１８％、１７％、１６％、１５％、１４％、１３％、１２％、１１％、１０％、９％、８％、７％、６％、５％、４％、３％、２％、１％以下の範囲内に含まれる値の範囲を指す（当該数字が可能な値の１００％を超える場合は除く）。

【１１５４】

関連する：疾患に関して本明細書で使用されるとき、「関連する」という用語は、問題の症状、測定値、特性または特徴が当該疾患の診断、発症、存在または進行に関連していることを意味する。関連は、疾患と因果関係がある場合もあるが、そうである必要はない。

【１１５５】

２つ以上の部分に関して使用されるとき、「会合する」、「コンジュゲートされる」、「連結される」、「結合される」及び「係留される」という用語は、２つ以上の部分に関して使用されるとき、これらの部分が、直接的に、または連結物質として働く１つ以上の追加部分を介するかのいずれかで、互いに物理的に会合または接続し、その構造が使用される条件下、例えば、生理学的条件下で、これらの部分が物理的に会合した状態を維持するような十分に安定した構造を形成することを意味する。「会合」は、厳密に、直接的な共有化学結合によるものでなくてもよい。「会合した」実体が物理的に会合した状態を維持するような十分に安定した結合性に基づいた、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も示唆され得る。

【１１５６】

二機能性：本明細書で使用されるとき、「二機能性」という用語は、少なくとも２つの機能を有することができるか、２つの機能を維持する、任意の物質、分子または部分を指す。機能は、同じ結果または異なる結果をもたらし得る。機能を生み出す構造は、同じである場合もあれば、異なる場合もある。例えば、本開示の二機能性修飾ＲＮＡは、細胞傷害性ペプチド（第１の機能）をコードし得、コーディングＲＮＡを含むヌクレオシドは、それ自体が細胞傷害性（第２の機能）である。この例において、二機能性修飾ＲＮＡのがん細胞への送達は、がんを改善または治療することができるペプチドまたはタンパク質分子を生産するだけでなく、修飾ＲＮＡの翻訳の代わりに分解が生じる場合には、細胞にヌクレオシドの細胞傷害性ペイロードを送達する。

【１１５７】

生体適合性：本明細書で使用されるとき、「生体適合性」という用語は、損傷、毒性または免疫系による拒否のリスクをほとんどまたは全くもたらさずに、生きている細胞、組織、器官または系に適合することを意味する。

【１１５８】

生分解性：本明細書で使用されるとき、「生分解性」という用語は、生物の作用によって無害の生成物に分解可能であることを意味する。

【１１５９】

生物学的に活性：本明細書で使用されるとき、「生物学的に活性」という文言は、生体系及び／または生物中で活性を有する任意の物質の特徴を指す。例えば、生物に投与されたときに、その生物に対する生物学的作用を有する物質は、生物学的に活性であるとみなされる。具体的な実施形態において、本開示のポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチドのほんの一部分であっても、生物学的に活性であるか、生物学的に関連があるとみなされる活性を模倣する場合には、生物学的に活性とみなされ得る。

【１１６０】

キメラ：本明細書で使用されるとき、「キメラ」は、２つ以上の不均等または不均一な部分または領域を有する実体である。

【１１６１】

保存的アミノ酸置換：「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が、類似の側鎖を有するアミノ酸残基で置き換えられたものである。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリ

ーは、当該技術分野において定義されており、塩基性側鎖（例えば、リシン、アルギニン、またはヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、アスパラギン酸またはグルタミン酸）、無電荷極性側鎖（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシンまたはシステイン）、非極性側鎖（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニンまたはトリプトファン）、β分岐状側鎖（例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン）及び芳香族側鎖（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファンまたはヒスチジン）が含まれる。したがって、ポリペプチド中のアミノ酸が同じ側鎖ファミリーの別のアミノ酸で置き換えられる場合、そのアミノ酸置換は、保存的であるとみなされる。別の態様において、一続きのアミノ酸は、側鎖ファミリーメンバーの順序及び／または組成が異なる構造的に類似した一続きのアミノ酸で保存的に置き換えることができる。

【１１６２】

非保存的アミノ酸置換には、（ｉ）正電荷の側鎖を有する残基（例えば、Ａｒｇ、ＨｉｓまたはＬｙｓ）を負電荷の残基（例えば、ＧｌｕまたはＡｓｐ）で置換したものもしくは置換されたもの、（ｉｉ）親水性残基（例えば、ＳｅｒまたはＴｈｒ）を疎水性残基（例えば、Ａｌａ、Ｌｅｕ、Ｉｌｅ、ＰｈｅまたはＶａｌ）で置換したものもしくは置換されたもの、（ｉｉｉ）システインもしくはプロリンを任意の他の残基で置換したものもしくは置換されたもの、または（ｉｖ）嵩高い疎水性もしくは芳香族側鎖を有する残基（例えば、Ｖａｌ、Ｈｉｓ、ＩｌｅまたはＴｒｐ）を、小さい側鎖を有する残基（例えば、ＡｌａまたはＳｅｒ）もしくは側鎖のない残基（例えば、Ｇｌｙ）で置換したものもしくは置換されたものが含まれる。

【１１６３】

他のアミノ酸置換は、当業者であれば、容易に特定できる。例えば、アミノ酸アラニンの場合、置換は、Ｄ－アラニン、グリシン、β－アラニン、Ｌ－システイン及びＤ－システインのうちのいずれか１つから行うことができる。リシンの場合、置換は、Ｄ－リシン、アルギニン、Ｄ－アルギニン、ホモ－アルギニン、メチオニン、Ｄ－メチオニン、オルニチンまたはＤ－オルニチンのうちのいずれか１つであり得る。一般に、単離ポリペプチドの特性に変化を誘導することが予測され得る、機能的に重要な領域中の置換には、（ｉ）極性残基（例えば、セリンまたはトレオニン）を疎水性残基（例えば、ロイシン、イソロイシン、フェニルアラニンまたはアラニン）で置換したもの（または置換されたもの）、（ｉｉ）システイン残基を任意の他の残基で置換したもの（または置換されたもの）、（ｉｉｉ）正電荷の側鎖を有する残基（例えば、リシン、アルギニンまたはヒスチジン）を負電荷の側鎖を有する残基（例えば、グルタミン酸またはアスパラギン酸）で置換したもの（または置換されたもの）、または（ｉｖ）嵩高い側鎖を有する残基（例えば、フェニルアラニン）をそのような側鎖を有しない残基（例えば、グリシン）で置換したもの（または置換されたもの）がある。また、前述の非保存的置換のうちの１つがタンパク質の機能的特性を変更し得る可能性は、そのタンパク質の機能的に重要な領域に対する置換の位置に相関し、したがって、いくつかの非保存的置換は、生物学的特性にほとんどまたは全く影響しないことがある。

【１１６４】

保存された：本明細書で使用されるとき、「保存された」という用語は、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のそれぞれが、比較される２つ以上の配列の同じ位置で変更がないものを指す。比較的保存されたヌクレオチドまたはアミノ酸は、配列中の他の箇所に現れるヌクレオチドまたはアミノ酸よりも、多くの関連配列中で保存されているものである。

【１１６５】

いくつかの実施形態において、２つ以上の配列は、互いに１００％同一である場合、「完全に保存された」と言われる。いくつかの実施形態において、２つ以上の配列は、互いに少なくとも７０％同一、少なくとも８０％同一、少なくとも９０％同一、または少なくとも９５％同一である場合、「高度に保存された」と言われる。いくつかの実施形態におい

て、２つ以上の配列は、互いに約７０％同一、約８０％同一、約９０％同一、約９５％、約９８％、または約９９％同一である場合、「高度に保存された」と言われる。いくつかの実施形態において、２つ以上の配列は、互いに少なくとも３０％同一、少なくとも４０％同一、少なくとも５０％同一、少なくとも６０％同一、少なくとも７０％同一、少なくとも８０％同一、少なくとも９０％同一、または少なくとも９５％同一である場合、「保存された」と言われる。いくつかの実施形態において、２つ以上の配列は、互いに約３０％同一、約４０％同一、約５０％同一、約６０％同一、約７０％同一、約８０％同一、約９０％同一、約９５％同一、約９８％同一、または約９９％同一である場合、「保存された」と言われる。配列の保存は、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの全長に適用されてもよいし、その部分、領域または特徴に適用されてもよい。

【１１６６】

制御放出：本明細書で使用されるとき、「制御放出」という用語は、治療効果を達成する特定の放出パターンに一致する、医薬組成物または化合物の放出プロファイルを指す。

【１１６７】

環状または環化：本明細書で使用されるとき、「環状」という用語は、連続的なループの存在を指す。環状分子は、円形である必要はなく、連結されて、途切れのないサブユニットの鎖を形成すればよい。本開示の操作されたＲＮＡまたはｍＲＮＡなどの環状分子は、単一単位または多量体であってもよいし、複合体または更なる高次構造の１つ以上の構成成分を含んでもよい。

【１１６８】

細胞傷害性：本明細書で使用されるとき、「細胞傷害性」は、細胞（例えば、哺乳動物細胞（例えば、ヒト細胞））、バクテリア、ウイルス、真菌、原生動物、寄生虫、プリオンまたはこれらの組み合わせを死滅させるか、これらにに対して有害作用、毒性作用または致命的作用を引き起こすことを指す。

【１１６９】

送達：本明細書で使用されるとき、「送達」は、化合物、物質、実体、部分、カーゴまたはペイロードを送達する行為または方法を指す。

【１１７０】

送達剤：本明細書で使用されるとき、「送達剤」は、ポリヌクレオチドの標的細胞へのｉｎ　ｖｉｖｏ送達を少なくとも部分的に促進する任意の物質を指す。

【１１７１】

不安定化：本明細書で使用されるとき、「不安定」、「不安定化する」または「不安定化領域」という用語は、同じ領域または分子の出発形態、野生型または天然形態よりも不安定な領域または分子を意味する。

【１１７２】

検出可能標識：本明細書で使用されるとき、「検出可能標識」は、Ｘ線撮影法、蛍光、化学ルミネセンス、酵素活性、吸光度などを含む当該技術分野において知られている方法によって容易に検出される、別の実体に付着するか、組み込まれるか、会合する１つ以上のマーカー、シグナルまたは部分を指す。検出可能標識には、放射性同位体、フルオロフォア、発色団、酵素、色素、金属イオン、ビオチン、アビジン、ストレプトアビジン及びハプテンなどのリガンド、量子ドットなどが含まれる。検出可能標識は、本明細書で開示されるペプチドまたはタンパク質の任意の位置に配置され得る。標識は、アミノ酸、ペプチドまたはタンパク質内であってもよいし、Ｎ末端またはＣ末端に配置されてもよい。

【１１７３】

ジアステレオマー：本明細書で使用されるとき、「ジアステレオマー」という用語は、互いに鏡像でなく、互いに重なり合わない立体異性体を意味する。

【１１７４】

消化：本明細書で使用されるとき、「消化」という用語は、小片または小成分への分割を意味する。ポリペプチドまたはタンパク質に関する場合、消化は、ペプチドの生成をもたらす。

【１１７５】
遠位：本明細書で使用されるとき、「遠位」という用語は、中心から離れて、または目的の地点もしくは領域から離れて位置することを意味する。
【１１７６】
投与レジメン：本明細書で使用されるとき、「投与レジメン」は、投与計画、または医師が定めた治療、予防もしくは緩和ケアの計画である。
【１１７７】
有効量：本明細書で使用されるとき、作用物質の「有効量」という用語は、有益な結果または所望の結果、例えば、臨床結果をもたらすのに十分な量であり、したがって、「有効量」は、それが適用される状況に依存する。「有効量」という用語は、「有効用量」、「治療上有効な量」または「治療上有効な用量」と区別なく使用され得る。
【１１７８】
エナンチオマー：本明細書で使用されるとき、「エナンチオマー」という用語は、少なくとも８０％（すなわち、少なくとも９０％が一方のエナンチオマーであり、最大１０％が他方のエナンチオマー）、少なくとも９０％、または少なくとも９８％の光学的純度またはエナンチオマー過剰率（当該技術分野において標準的な方法によって測定した場合）を有する、本開示の化合物の個々の光学活性形態を意味する。
【１１７９】
封入する：本明細書で使用されるとき、「封入する」という用語は、閉じ込められること、取り囲むこと、または包み込むことを意味する。
【１１８０】
コードタンパク質切断シグナル：本明細書で使用されるとき、「コードタンパク質切断シグナル」は、タンパク質切断シグナルをコードするヌクレオチド配列を指す。
【１１８１】
操作された：本明細書で使用されるとき、本開示の実施形態は、構造的または化学的を問わず、出発点、野生型または天然分子とは異なる特徴または特性を有するように設計された場合、「操作された」ものである。
【１１８２】
有効量：本明細書で使用されるとき、作用物質の「有効量」という用語は、有益な結果または所望の結果、例えば、臨床結果をもたらすのに十分な量であり、したがって、「有効量」は、それが適用される状況に依存する。例えば、高コレステロールを治療する作用物質を投与する場合、作用物質の有効量は、作用物質の投与なしで得られる応答と比較して、例えば、本明細書で定義されるような高コレステロールの治療を達成するのに十分な量である。
【１１８３】
エキソソーム：本明細書で使用されるとき、「エキソソーム」は、哺乳動物細胞によって分泌される小胞またはＲＮＡ分解に関与する複合体である。
【１１８４】
発現：本明細書で使用されるとき、核酸配列の「発現」は、次のイベントのうちの１つ以上を指す：（１）ＤＮＡ配列からＲＮＡ鋳型の生成（例えば、転写による）、（２）ＲＮＡ転写物のプロセシング（例えば、スプライシング、編集、５’キャップ形成及び／または３’末端プロセシングによる）、（３）ＲＮＡのポリペプチドまたはタンパク質への翻訳、及び（４）ポリペプチドまたはタンパク質の翻訳後修飾。
【１１８５】
特徴：本明細書で使用されるとき、「特徴」は、特色、特性または特有の要素を指す。
【１１８６】
製剤：本明細書で使用されるとき、「製剤」は、少なくともポリヌクレオチド及び送達剤を含む。
【１１８７】
断片：「断片」は、本明細書で使用されるとき、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完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み得る。

【１１８８】

機能的：本明細書で使用するとき、「機能的」生体分子は、それを特徴付ける特性及び／または活性を呈する形態にある、生体分子である。

【１１８９】

相同性：本明細書で使用されるとき、「相同性」という用語は、高分子間、例えば、核酸分子（例えば、ＤＮＡ分子及び／またはＲＮＡ分子）間及び／またはポリペプチド分子間の全体的な関係性を指す。いくつかの実施形態において、高分子は、その配列が少なくとも２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％または９９％同一または類似であれば、互いに「相同」であるとみなされる。「相同」という用語は、必然的に、少なくとも２つの配列（ポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列）間の比較を指す。本開示によれば、２つのポリヌクレオチド配列は、当該配列がコードするポリペプチドが、少なくとも約２０アミノ酸の少なくとも１つのストレッチについて、少なくとも約５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％または更には９９％であれば、相同であるとみなされる。いくつかの実施形態において、相同なポリヌクレオチド配列は、一意に指定された少なくとも４～５アミノ酸のストレッチをコードする能力によって特徴付けられる。６０ヌクレオチド長未満のポリヌクレオチド配列の場合、相同性は、一意に指定された少なくとも４～５アミノ酸のストレッチをコードする能力によって決定される。本開示によれば、２つのタンパク質配列は、タンパク質が、少なくとも約２０アミノ酸の少なくとも１つのストレッチについて、少なくとも約５０％、６０％、７０％、８０％または９０％同一であれば、相同であるとみなされる。

【１１９０】

同一性：本明細書で使用されるとき、「同一性」という用語は、高分子間、例えば、ポリヌクレオチド分子（例えば、ＤＮＡ分子及び／またはＲＮＡ分子）間及び／またはポリペプチド分子間の全体的な関係性を指す。同一性パーセントは、２つのＤＮＡ分子間、２つのＲＮＡ分子間、及びＤＮＡ分子とＲＮＡ分子との間で算出することができる。ＤＮＡとＲＮＡを比較する場合、Ｔは、Ｕとみなされる（または逆の場合も同様）。

【１１９１】

２つのポリヌクレオチド配列の同一性パーセントの算出は、例えば、最適な比較成果を得るように２つの配列を整列させることによって実施することができる（例えば、最適アライメントを得るために、第１と第２の核酸配列の一方または両方にギャップを導入することができ、比較目的のために非同一配列を無視することができる）。ある特定の実施形態において、比較目的で整列される配列の長さは、参照配列の長さに対して、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９５％または１００％である。次いで、対応するヌクレオチド位置にあるヌクレオチドが比較される。第１の配列中の位置が、第２の配列中の対応する位置と同じヌクレオチドで占められている場合、その分子は、その位置で同一である。２つの配列間の同一性パーセントは、２つの配列の最適アライメントのために導入する必要があるギャップの数及び各ギャップの長さを考慮に入れた、配列が共有する同一である位置の数に応じて決まる。配列の比較及び２つの配列間の同一性パーセントの決定は、数学的アルゴリズムを使用して達成することができる。例えば、２つのヌクレオチド配列間の同一性パーセントは、Ｃｏｍｐｕｔａｔｉｏｎａｌ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｌｅｓｋ，Ａ．Ｍ．，ｅｄ．，Ｏｘｆｏｒｄ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，１９８８；Ｂｉｏｃｏｍｐｕｔｉｎｇ：Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ ａｎｄ Ｇｅｎｏｍｅ Ｐｒｏｊｅｃｔｓ，Ｓｍｉｔｈ，Ｄ．Ｗ．，ｅｄ．，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，１９９３；Ｓｅｑｕｅｎｃｅ Ａｎａｌｙｓｉｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，ｖｏｎ Ｈｅｉｎｊｅ，Ｇ．，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，１９８７；Ｃｏｍｐｕｔｅｒ Ａｎａｌｙｓｉｓ ｏｆ

Ｓｅｑｕｅｎｃｅ Ｄａｔａ，Ｐａｒｔ Ｉ，Ｇｒｉｆｆｉｎ，Ａ．Ｍ．，ａｎｄ Ｇｒｉｆｆｉｎ，Ｈ．Ｇ．，ｅｄｓ．，Ｈｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ Ｊｅｒｓｅｙ，１９９４；及びＳｅｑｕｅｎｃｅ Ａｎａｌｙｓｉｓ Ｐｒｉｍｅｒ，Ｇｒｉｂｓｋｏｖ，Ｍ．ａｎｄ Ｄｅｖｅｒｅｕｘ，Ｊ．，ｅｄｓ．，Ｍ Ｓｔｏｃｋｔｏｎ Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，１９９１（それぞれを参照により本明細書に援用する）に記載されているものなどの方法を使用して決定することができる。例えば、２つのヌクレオチド配列間の同一性パーセントは、Ｍｅｙｅｒｓ及びＭｉｌｌｅｒのアルゴリズム（ＣＡＢＩＯＳ，１９８９，４：１１－１７）を使用して決定することができ、これは、ＰＡＭ１２０重み付き残基表、ギャップ長ペナルティ１２及びギャップペナルティ４を使用する、ＡＬＩＧＮプログラム（バージョン２．０）に組み込まれている。２つのヌクレオチド配列間の同一性パーセントは、あるいは、ＮＷＳｇａｐｄｎａ．ＣＭＰ行列を使用するＧＣＧソフトウェアパッケージのＧＡＰプログラムを使用して決定することができる。配列間の同一性パーセントを決定するために一般に用いられる方法には、Ｃａｒｉｌｌｏ，Ｈ．，ａｎｄ Ｌｉｐｍａｎ，Ｄ．，ＳＩＡＭ Ｊ Ａｐｐｌｉｅｄ Ｍａｔｈ．，４８：１０７３（１９８８）（参照により本明細書に援用する）に開示されているものが含まれるが、これらに限定されない。同一性を決定するための技術は公的に利用可能なコンピュータープログラムにまとめられている。２つの配列間の相同性を決定する例示的なコンピューターソフトウェアには、ＧＣＧプログラムパッケージ（Ｄｅｖｅｒｅｕｘ，Ｊ．，ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，１２（１），３８７（１９８４））、ＢＬＡＳＴＰ、ＢＬＡＳＴＮ及びＦＡＳＴＡ（Ａｌｔｓｃｈｕｌ，Ｓ．Ｆ．ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌｅｃ．Ｂｉｏｌ．，２１５，４０３（１９９０））が挙げられるが、これらに限定されない。

【１１９２】

インタクト：本明細書で使用されるとき、ポリペプチドとの関係において、「インタクト」という用語は、野生型タンパク質に対応するアミノ酸、例えば、変異も置換もされていない野生型アミノ酸を保持していることを意味する。

【１１９３】

異性体：本明細書で使用されるとき、「異性体」という用語は、本開示の任意の化合物のあらゆる互変異性体、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及び／または二重結合を有し得、したがって、二重結合異性体（すなわち、幾何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、本明細書で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、立体異性体的に純粋な形態（例えば、幾何的に純粋、エナンチオマー的に純粋またはジアステレオマー的に純粋な形態）と、エナンチオマー混合物及び立体異性体混合物（例えば、ラセミ体）との両方を包含する。本開示の化合物のエナンチオマー混合物及び立体異性体混合物は、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、キラル塩錯体としての化合物の結晶化、またはキラル溶媒中の化合物の結晶化などのよく知られている方法によって、それらの構成成分のエナンチオマーまたは立体異性体に分割することができる。エナンチオマー及び立体異性体はまた、よく知られている非対称合成法によって、立体異性体的またはエナンチオマー的に純粋な中間体、試薬及び触媒から得ることもできる。

【１１９４】

ｉｎ ｖｉｔｒｏ：本明細書で使用されるとき、「ｉｎ ｖｉｔｒｏ」という用語は、生物（例えば、動物、植物または微生物）内ではなく、人工環境、例えば、試験管または反応容器中、細胞培養物中、ペトリ皿中などで生じる事象を指す。

【１１９５】

ｉｎ ｖｉｖｏ：本明細書で使用されるとき、「ｉｎ ｖｉｖｏ」という用語は、生物（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）内で生じる事象を指す。

【１１９６】
単離された：本明細書で使用されるとき、「単離された」という用語は、会合していた（自然または実験設定であるかを問わない）構成成分の少なくとも一部から分離された物質または実体を指す。単離された物質は、会合していた物質に対して、様々なレベルの純度を有し得る。単離された物質及び／または実体は、最初に会合していた他の構成成分の少なくとも約１０％、約２０％、約３０％、約４０％、約５０％、約６０％、約７０％、約８０％、約９０％またはそれ以上から分離され得る。いくつかの実施形態において、単離された作用物質は、約８０％超、約８５％超、約９０％超、約９１％超、約９２％超、約９３％超、約９４％超、約９５％超、約９６％超、約９７％超、約９８％超、約９９％超または約９９％超の純度である。本明細書で使用する場合、物質は、それが実質的に他の構成成分を含まないならば、「純粋」である。実質的に単離された：「実質的に単離された」とは、化合物が、それが形成または検出された環境から実質的に分離されることを意味する。部分的分離には、例えば、本開示の化合物が豊富な組成物が含まれ得る。部分的分離には、少なくとも約５０重量％、少なくとも約６０重量％、少なくとも約７０重量％、少なくとも約８０重量％、少なくとも約９０重量％、少なくとも約９５重量％、少なくとも約９７重量％、または少なくとも約９９重量％の本開示の化合物またはその塩を含有する組成物が含まれ得る。
【１１９７】
「単離された」本明細書で開示されるポリヌクレオチド、ベクター、ポリペプチド、細胞または任意の組成物は、天然には存在しない形態であるポリヌクレオチド、ベクター、ポリペプチド、細胞または組成物である。単離されたポリヌクレオチド、ベクター、ポリペプチドまたは組成物は、もはや天然に存在する形態ではない程度にまで精製されたものを含む。いくつかの態様において、単離されたポリヌクレオチド、ベクター、ポリペプチドまたは組成物は、実質的に純粋である。
【１１９８】
リンカー：本明細書で使用されるとき、「リンカー」は、原子団、例えば、１０～１，０００個の原子を指し、限定するものではないが、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、カルボニル及びイミンなどの原子または基から構成され得る。リンカーは、第１の末端が核酸塩基または糖部分上の修飾ヌクレオシドまたはヌクレオチドに結合することができ、第２の末端がペイロード（例えば、検出可能な物質または治療薬）に結合することができる。リンカーは、核酸配列への組み込みに干渉しない程度の長さであり得る。リンカーは、ポリヌクレオチド多量体（例えば、２つ以上のキメラポリヌクレオチド分子またはＩＶＴポリヌクレオチドの連結による）またはポリヌクレオチドコンジュゲートを形成するため、及び本明細書に記載されるようなペイロードを投与するためなどの任意の有用な目的のために使用することができる。リンカーに組み込むことが出来る化学基の例には、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、アルキレン、ヘテロアルキレン、アリールまたはヘテロシクリル（これらの各々は、本明細書に記載されるように、任意選択により置換可能である）が挙げられるが、これらに限定されない。リンカーの例には、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モノマー単位、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）ならびにデキストランポリマー及びその誘導体が挙げられるが、これらに限定されない。他の例には、還元剤または光分解を使用して切断することができる、例えば、ジスルフィド結合（－Ｓ－Ｓ－）またはアゾ結合（－Ｎ＝Ｎ－）などのリンカー内の切断可能部分が挙げられるが、これらに限定されない。選択的に切断可能な結合の非限定的な例には、例えばトリス（２－カルボキシエチル）ホスフィン（ＴＣＥＰ）または他の還元剤及び／もしくは光分解の使用によって切断することができるアミド結合、更に、例えば酸性または塩基性加水分解によって切断することができるエステル結合が挙げられる。
【１１９９】

ＭＣＭ関連疾患：本明細書で使用されるとき、「ＭＣＭ関連疾患」または「ＭＣＭ関連障害」は、異常なＭＣＭ活性（例えば、活性の低下または活性の上昇）から生じる疾患または障害をそれぞれ指す。非限定的な例として、メチルマロン酸血症は、ＭＣＭ関連疾患である。

【１２００】

ミトコンドリア輸送ペプチド：本明細書で使用されるとき、「ミトコンドリア輸送ペプチド」、「ミトコンドリア標的化ペプチド」及び「ミトコンドリアターゲティング配列」という用語は、大きなポリペプチドの一部であり、その大きなポリペプチドのミトコンドリアへの輸送または局在を誘導するアミノ酸配列（またはかかるアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド）を指す。

【１２０１】

修飾された：本明細書で使用されるとき、「修飾された」は、本開示の分子の状態または構造の変更を指す。分子は、化学的、構造的及び機能的な修飾を含む、多くの様式で修飾され得る。いくつかの実施形態において、本開示のｍＲＮＡ分子は、例えば、天然リボヌクレオチドＡ、Ｕ、Ｇ及びＣに関係する場合、非天然ヌクレオシド及び／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的ヌクレオチドは、Ａ、Ｃ、Ｇ、Ｕリボヌクレオチドの化学構造と異なるが、「修飾」とはみなされない。

【１２０２】

粘液：本明細書で使用されるとき、「粘液」は、粘性があり、ムチン糖タンパク質を含む、天然物質を指す。

【１２０３】

天然本明細書で使用されるとき、「天然」は、人工的な支援を必要とせずに天然に存在することを意味する。

【１２０４】

非ヒト脊椎動物：本明細書で使用されるとき、「非ヒト脊椎動物」は、野生種及び家畜化された種を含む、ヒト以外の全ての脊椎動物を含む。非ヒト脊椎動物の例には、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、ウサギ、トナカイ、ヒツジ、水牛及びヤクなどの哺乳動物が挙げられるが、これらに限定されない。

【１２０５】

核酸配列：「核酸配列」及び「ヌクレオチド配列」という用語は、区別なく使用され、連続する核酸配列を指す。配列は、一本鎖または二本鎖のＤＮＡまたはＲＮＡ（例えば、ｍＲＮＡ）のいずれかであり得る。

【１２０６】

「核酸」という用語は、その最も広い意味で、ヌクレオチドの重合体を含む任意の化合物及び／または物質を含む。これらの重合体は、多くの場合、ポリヌクレオチドと呼ばれる。本開示の例示的な核酸またはポリヌクレオチドには、リボ核酸（ＲＮＡ）、デオキシリボ核酸（ＤＮＡ）、トレオース核酸（ＴＮＡ）、グリコール核酸（ＧＮＡ）、ペプチド核酸（ＰＮＡ）、ロックド核酸（ＬＮＡ、例えば、β－Ｄ－リボ配置を有するＬＮＡ、α－Ｌ－リボ配置を有するα－ＬＮＡ（ＬＮＡのジアステレオマー）、２’－アミノ官能基を有する２’－アミノ－ＬＮＡ、及び２’－アミノ官能基を有する２’－アミノ－α－ＬＮＡを含む）エチレン核酸（ＥＮＡ）、シクロヘキセニル核酸（ＣｅＮＡ）またはこれらのハイブリッドもしくは組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。

【１２０７】

「～をコードしているヌクレオチド配列」及びそのバリアントという文言は、本明細書で記載されるポリペプチドまたはその機能性断片をコードするヌクレオチド配列を含む、核酸（例えば、ｍＲＮＡまたはＤＮＡ分子）コーディング配列を指す。コーディング配列は、核酸が投与される個体または哺乳動物の細胞中の発現を誘導することができるプロモーター及びポリアデニル化シグナルを含む調節エレメントと機能的に連結された、開始及び終了シグナルを更に含み得る。コーディング配列は、シグナルペプチドまたはターゲティ

ングペプチド、例えば、ミトコンドリア輸送ペプチドをコードする配列を更に含み得る。
【１２０８】
オフターゲット：本明細書で使用されるとき、「オフターゲット」は、任意の１つ以上の標的、遺伝子または細胞転写物に対する意図しない作用を指す。
【１２０９】
オープンリーディングフレーム：本明細書で使用されるとき、「オープンリーディングフレーム」または「ＯＲＦ」は、所与のリーディングフレーム内に終止コドンを含有しない配列を指す。
【１２１０】
機能的に連結された：本明細書で使用されるとき、「機能的に連結された」という文言は、２つ以上の分子、構築物、転写物、実体、部分などの間の機能的接続を指す。
【１２１１】
任意選択により置換される：「任意選択により置換されるＸ」（例えば、任意選択により置換されるアルキル）という形態の文言は、本明細書中、「Ｘ（式中、Ｘは、任意選択により置換される）」（例えば、「アルキル（当該アルキルは、任意選択により置換される」）と同等であることが意図される。特徴「Ｘ」（例えば、アルキル）自体が任意選択であることを意味するものではない。
【１２１２】
本明細書で使用されるとき、ポリヌクレオチドの「部分」または「領域」は、ポリヌクレオチドの完全長よりも短いポリヌクレオチドの任意の部分として定義される。
【１２１３】
ペプチド：本明細書で使用されるとき、「ペプチド」は、５０アミノ酸長以下、例えば、約５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５または５０アミノ酸長である。
【１２１４】
患者：本明細書で使用されるとき、「患者」は、治療を求め得るか、治療を必要とし得るか、治療を要するか、治療を受けているか、治療を受ける予定である対象、または特定の疾患もしくは状態の熟練専門家によるケアを受けている対象を指す。
【１２１５】
薬学的に許容される：「薬学的に許容される」という語句は、本明細書において、適切な医学的判断の範囲内で、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を伴うことなく、妥当な利益／リスク比に見合った、ヒト及び動物の組織との接触に使用するのに適した化合物、物質、組成物及び／または剤形を指すために使用される。
【１２１６】
薬学的に許容される賦形剤：「薬学的に許容される賦形剤」という文言は、本明細書で使用されるとき、患者において実質的に無毒及び非炎症性の特性を有する、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）を指す。賦形剤には、例えば、接着防止剤、抗酸化剤、結合剤、コーティング剤、圧縮助剤、崩壊剤、色素（着色料）、皮膚軟化剤、乳化剤、増量剤（希釈剤）、皮膜形成剤またはコーティング剤、風味料、香料、滑剤（流動促進剤）、滑沢剤、保存剤、印刷インク、吸着剤、懸濁化剤または分散剤、甘味料及び水和水が含まれ得る。例示的な賦形剤には、ブチル化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、架橋型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、α化デンプン、プロピルパラベン、パルミチン酸レチニル、セラック、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、デンプングリコール酸ナトリウム、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及びキシリトールが挙げられ

るが、これらに限定されない。

【１２１７】

薬学的に許容される塩：本開示はまた、本明細書に記載される化合物の薬学的に許容される塩を含む。本明細書で使用されるとき、「薬学的に許容される塩」は、本開示の化合物の誘導体を指し、ここで、親化合物は、既存の酸または塩基部分をその塩形態にすることによって（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）、変更される。薬学的に許容される塩の例には、アミンなどの塩基性残基の無機酸塩または有機酸塩、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。例示的な酸付加塩には、酢酸塩、酢酸、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、ベンゼンスルホン酸、安息香酸塩、硫酸水素塩、ホウ酸塩、酪酸塩、ショウノウ酸塩、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、グリセロリン酸塩、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、吉草酸塩などが挙げられる。代表的なアルカリ金属またはアルカリ土類金属の塩には、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、更には、限定するものではないが、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、エチルアミンなどを含む、無毒性アンモニウム、四級アンモニウム及びアミンカチオンが挙げられる。本開示の薬学的に許容される塩には、例えば、無毒性無機酸または有機酸から形成される、親化合物の従来の無毒性塩が含まれる。本開示の薬学的に許容される塩は、塩基性または酸性部分を含有する親化合物から従来の化学的方法によって合成することができる。一般に、そのような塩は、水もしくは有機溶媒中、または２つの混合液中で、これらの化合物の遊離酸または遊離塩基形態を適切な塩基または酸の化学量論量と反応させることによって調製することができる。一般に、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溶媒が使用される。好適な塩の一覧は、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ'ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，１７ｔｈ ｅｄ．，Ｍａｃｋ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏｍｐａｎｙ，Ｅａｓｔｏｎ，Ｐａ．，１９８５，ｐ．１４１８，Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓａｌｔｓ：Ｐｒｏｐｅｒｔｉｅｓ，Ｓｅｌｅｃｔｉｏｎ，ａｎｄ Ｕｓｅ，Ｐ．Ｈ．Ｓｔａｈｌ ａｎｄ Ｃ．Ｇ．Ｗｅｒｍｕｔｈ（ｅｄｓ．），Ｗｉｌｅｙ－ＶＣＨ，２００８、及びＢｅｒｇｅ ｅｔ ａｌ．，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅ，６６，１－１９（１９７７）に認められ、それぞれの全体を参照により本明細書に援用する。

【１２１８】

薬学的に許容される溶媒和物：「薬学的に許容される溶媒和物」という用語は、本明細書で使用されるとき、好適な溶媒分子が結晶格子中に取り込まれている、本開示の化合物を意味する。好適な溶媒は、投与量で生理学的に耐容性である。例えば、溶媒和物は、有機溶媒、水またはこれらの混合物を含む溶液からの結晶化、再結晶化または析出によって調製することができる。好適な溶媒の例は、エタノール、水（例えば、一水和物、二水和物及び三水和物）、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。

【１２１９】

薬物動態：本明細書で使用されるとき、「薬物動態」は、生体に投与された物質の運命決定に関係する、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、代謝及び排泄の程度及び速度を含む複数の領域に分類される。これは、一般的にＡＤＭＥと呼ばれ、（Ａ）吸収は、物質が血液循環に入る過程であり、（Ｄ）分布は、体液及び身体組織全体にわたる物質の分散または伝播であり、（Ｍ）代謝（または生体内変化）は、親化合物の娘代謝産物への不可逆的変換であり、（Ｅ）排泄（または排除）は、身体からの物質の排除を指す。稀に、一部の薬物は、体内組織中に不可逆的に蓄積する。

【１２２０】

物理化学：本明細書で使用されるとき、「物理化学」は、物理特性及び／もしくは化学特性、またはこれらの特性に関することを意味する。

【１２２１】

ポリヌクレオチド：本明細書で使用される「ポリヌクレオチド」という用語は、リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド、これらの類似体またはこれらの混合物を含む、任意の長さのヌクレオチド重合体を指す。この用語は、分子の一次構造を指す。したがって、この用語は、三本鎖、二本鎖及び一本鎖デオキシリボ核酸（「ＤＮＡ」）、ならびに三本鎖、二本鎖及び一本鎖リボ核酸（「ＲＮＡ」）を含む。また、ポリヌクレオチドの修飾型（例えば、アルキル化及び／またはキャッピングによる修飾）及び非修飾型も含まれる。更に詳細には、「ポリヌクレオチド」という用語は、ポリデオキシリボヌクレオチド（２－デオキシ－Ｄ－リボース含有）、ポリリボヌクレオチド（Ｄ－リボース含有）（ｔＲＮＡ、ｒＲＮＡ、ｈＲＮＡ、ｓｉＲＮＡ及びｍＲＮＡ（スプライシングを受けているか受けていないかを問わない）を含む）、Ｎ－またはＣ－グリコシドのプリン塩基またはピリミジン塩基である任意の他のタイプのポリヌクレオチド、ならびに非ヌクレオチド骨格を含有する他の高分子、例えば、ポリアミド（例えば、ペプチド核酸「ＰＮＡ」）及びポリモルホリノ高分子、ならびに他の配列特異的な合成核酸高分子（ただし、高分子が、ＤＮＡ及びＲＮＡにみられるような塩基対合及び塩基スタッキングを可能にする立体配置で核酸塩基を含有することを条件とする）を含む。特定の態様において、ポリヌクレオチドは、ｍＲＮＡを含む。他の態様において、ｍＲＮＡは、合成ｍＲＮＡである。いくつかの態様において、合成ｍＲＮＡは、少なくとも１つの非天然核酸塩基を含む。いくつかの態様において、ある特定の種類の全ての核酸塩基が非天然核酸塩基で置き換えられている（例えば、本明細書で開示されるポリヌクレオチド中の全てのウリジンが非天然核酸塩基、例えば、５－メトキシウリジンで置換され得る）。いくつかの態様において、ポリヌクレオチド（例えば、合成ＲＮＡまたは合成ＤＮＡ）は、合成ＤＮＡの場合、天然核酸塩基のみ、すなわち、Ａ、Ｃ、Ｔ及びＵを含み、合成ＲＮＡの場合、Ａ、Ｃ、Ｔ及びＵを含む。

【１２２２】

当業者であれば、本明細書で開示されるコドンマップ中にはＴ塩基がＤＮＡに存在するが、対応するＲＮＡでは、Ｔ塩基は、Ｕ塩基に置き換えられることを理解するであろう。例えば、本明細書で開示されるＤＮＡ形態（例えば、ベクターまたはｉｎ　ｖｉｔｒｏ翻訳（ＩＶＴ）鋳型）中のコドンヌクレオチド配列は、その対応する転写ｍＲＮＡでＵ塩基に転写されるＴ塩基を有する。この点に関して、配列最適化されたＤＮＡ配列（Ｔを含む）と、それに対応するＲＮＡ配列（Ｕを含む）の両配列は、本開示の配列最適化ヌクレオチド配列とみなされる。また、当業者であれば、１つ以上の塩基を非天然塩基に置き換えることによって同等のコドンマップを作成できることも理解するであろう。したがって、例えば、ＴＴＣコドン（ＤＮＡマップ）は、ＵＵＣコドン（ＲＮＡマップ）に対応し、ＵＵＣコドンは、ΨΨＣコドン（Ｕがプソイドウリジンで置換されたＲＮＡマップ）に対応する。

【１２２３】

標準的なＡ－Ｔ及びＧ－Ｃ塩基対は、チミジンのＮ３－Ｈ及びＣ４－オキシと、アデノシ

ンのＮ１及びＣ６－ＮＨ２のそれぞれの間、更に、シチジンのＣ２－オキシ、Ｎ３及びＣ４－ＮＨ２と、グアノシンのＣ２－ＮＨ２、Ｎ’－Ｈ及びＣ６－オキシのそれぞれの間に水素結合の形成が可能な条件下で形成される。したがって、例えば、グアノシン（２－アミノ－６－オキシ－９－β－Ｄ－リボフラノシル－プリン）を修飾して、イソグアノシン（２－オキシ－６－アミノ－９－β－Ｄ－リボフラノシル－プリン）を形成することができる。かかる修飾では、シトシンとの標準的な塩基対を効率的に形成しないヌクレオシド塩基が生じる。一方、イソシトシン（１－β－Ｄ－リボフラノシル－２－アミノ－４－オキシ－ピリミジン－）を形成するシトシン（１－β－Ｄ－リボフラノシル－２－オキシ－４－アミノ－ピリミジン）の修飾では、グアノシンと効率的に塩基対合しないが、イソグアノシンと塩基対を形成する修飾ヌクレオチドが生じる（Ｃｏｌｌｉｎｓらの米国特許第５，６８１，７０２号、その全体を参照により本明細書に援用する）。イソシトシンは、Ｓｉｇｍａ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｃｏ．（Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，Ｍｏ．）から入手可能であり、イソシチジンは、Ｓｗｉｔｚｅｒ ｅｔ ａｌ．（１９９３）Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ３２：１０４８９－１０４９６及び当該文献中で引用されている参考文献に記載されている方法によって調製することができ、２’－デオキシ－５－メチル－イソシチジンは、Ｔｏｒ ｅｔ ａｌ．，１９９３，Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．１１５：４４６１－４４６７及び当該文献中で引用されている参考文献の方法によって調製することができ、イソグアニンヌクレオチドは、Ｓｗｉｔｚｅｒ ｅｔ ａｌ．，１９９３（上掲）及びＭａｎｔｓｃｈ ｅｔ ａｌ．，１９９３，Ｂｉｏｃｈｅｍ．１４：５５９３－５６０１に記載されている方法またはＣｏｌｌｉｎｓらの米国特許第５，７８０，６１０号に記載されている方法を使用して調製することができる（それぞれの全体を参照により本明細書に援用する）。他の非天然塩基対は、Ｐｉｃｃｉｒｉｌｌｉ ｅｔ ａｌ．，１９９０，Ｎａｔｕｒｅ ３４３：３３－３７（その全体を参照により本明細書に援用する）に記載されている、２，６－ジアミノピリミジン及びその相補体（１－メチルピラゾロ－［４，３］ピリミジン－５，７－（４Ｈ，６Ｈ）－ジオンの合成に関する方法によって合成することができる。独特な塩基対を形成する、他のそのような修飾ヌクレオチド単位については、知られており、Ｌｅａｃｈ ｅｔ ａｌ．（１９９２）Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．１１４：３６７５－３６８３及びＳｗｉｔｚｅｒ ｅｔ ａｌ（上掲）に記載されているものなどがある。

【１２２４】

ポリペプチド：本明細書で使用されるとき、「ポリペプチド」は、ほとんどの場合、ペプチド結合によって一緒に連結されたアミノ酸残基（天然または非天然）の重合体を指す。この用語は、本明細書で使用されるとき、任意の大きさ、構造または機能のタンパク質、ポリペプチド及びペプチドを指す。したがって、ポリペプチドには、遺伝子産物、天然ポリペプチド、合成ポリペプチド、ホモログ、オルソログ、パラログ、断片ならびに前述の他の等価物、バリアント及びアナログが含まれる。ポリペプチドは、単一分子であってもよいし、二量体、三量体または四量体などの多分子複合体であってもよい。ポリペプチドはまた、単鎖ポリペプチドまたは多鎖ポリペプチドを含み得、会合または連結され得る。多鎖ポリペプチドには、最も一般的に、ジスルフィド結合が認められる。ポリペプチドという用語は、１つ以上のアミノ酸残基が、対応する天然アミノ酸の人工化学的類似体になっている、アミノ酸高分子にも適用される。

【１２２５】

ポリペプチドという用語はまた、自然にまたは介入により、例えば、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質化、アセチル化、リン酸化または任意の他の操作もしくは修飾（標識要素との結合など）により修飾されたアミノ酸高分子も包含する。この定義にはまた、例えば、アミノ酸の１つ以上の類似体（例えば、ホモシステイン、オルニチン、ｐ－アセチルフェニルアラニン、Ｄ－アミノ酸及びクレアチンなどの非天然アミノ酸を含む），及び当該技術分野において知られている他の修飾を含有するポリペプチドも含まれる。

【１２２６】

ポリペプチドバリアント：本明細書で使用されるとき、「ポリペプチドバリアント」という用語は、そのアミノ酸配列が天然配列または参照配列とは異なる分子を指す。アミノ酸

配列バリアントは、天然配列または参照配列と比較して、アミノ酸配列内のある特定の位置に置換、欠失及び／または挿入を有し得る。通常、バリアントは、天然配列または参照配列に対して、少なくとも約５０％の同一性（相同性）、少なくとも約６０％の同一性、少なくとも約７０％の同一性、少なくとも約８０％の同一性、少なくとも約９０％の同一性、少なくとも約９５％の同一性、少なくとも約９９％の同一性を有し得る。いくつかの実施形態において、天然配列または参照配列に対して、少なくとも約８０％、または少なくとも約９０％の同一性（相同性）であり得る。

【１２２７】

単位薬物当たりのポリペプチド（ＰＵＤ）：本明細書で使用されるとき、ＰＵＤまたは単位薬物当たりの生成物は、体液中の測定値で割った、通常、ｐｍｏｌ／ｍＬ、ｍｍｏｌ／ｍＬなどの濃度で定義される、体液または組織中で測定された生成物（ポリペプチドなど）の総一日用量（通常１ｍｇ、ｐｇ、ｋｇなど）の細分割された部分として定義される。

【１２２８】

予防すること：本明細書で使用されるとき、「予防すること」という用語は、感染症、疾患、障害及び／もしくは状態の発生を部分的もしくは完全に遅らせること；特定の感染症、疾患、障害及び／もしくは状態の１つ以上の症状、特徴もしくは臨床徴候の発生を部分的もしくは完全に遅らせること；特定の感染症、疾患、障害及び／もしくは状態の１つ以上の症状、特徴もしくは徴候の発生を部分的もしくは完全に遅らせること；感染症からの特定の疾患、障害及び／もしくは状態の進行を部分的もしくは完全に遅らせること；ならびに／または感染症、疾患、障害及び／もしくは状態に関連する病変の発生リスクを低下させることを指す。

【１２２９】

プロドラッグ：本開示はまた、本明細書に記載される化合物のプロドラッグを含む。本明細書で使用されるとき、「プロドラッグ」は、化学的または物理的変化に応じて治療薬として作用する物質、分子または実体に属する形態にある、任意の物質、分子または実体を指す。プロドラッグは、何らかの方法で共有結合または封鎖され得、哺乳動物対象への投与前、投与時、または投与後に、有効薬物部分を放出するか、有効薬物部分に変換される。プロドラッグは、通常の操作またはｉｎ ｖｉｖｏのいずれかで、修飾が切断されて親化合物になるように化合物中に存在する官能基を修飾することによって、調製することができる。プロドラッグには、ヒドロキシル基、アミノ基、スルフヒドリル基またはカルボキシル基が任意の基に結合された化合物であって、哺乳動物対象に投与されると、それぞれ遊離ヒドロキシル基、遊離アミノ基、遊離スルフヒドリル基または遊離カルボキシル基を形成するように切断される化合物が含まれる。プロドラッグの調製及び使用は、Ｔ．Ｈｉｇｕｃｈｉ ａｎｄ Ｖ．Ｓｔｅｌｌａ，“Ｐｒｏ－ｄｒｕｇｓ ａｓ Ｎｏｖｅｌ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ Ｓｙｓｔｅｍｓ，” Ｖｏｌ．１４ ｏｆ ｔｈｅ Ａ．Ｃ．Ｓ．Ｓｙｍｐｏｓｉｕｍ Ｓｅｒｉｅｓ、及びＢｉｏｒｅｖｅｒｓｉｂｌｅ Ｃａｒｒｉｅｒｓ ｉｎ Ｄｒｕｇ Ｄｅｓｉｇｎ，ｅｄ．Ｅｄｗａｒｄ Ｂ．Ｒｏｃｈｅ，Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ａｓｓｏｃｉａｔｉｏｎ ａｎｄ Ｐｅｒｇａｍｏｎ Ｐｒｅｓｓ，１９８７において考察されており、これら両方の全体を参照により本明細書に援用する。

【１２３０】

増殖する：本明細書で使用されるとき、「増殖する」という用語は、成長、拡大もしくは増大すること、または急速な成長、拡大もしくは増大を起こすことを意味する。「増殖性」は、増殖する能力を有することを意味する。「抗増殖性」は、増殖特性に反するか、増殖特性に関係しない特性を有することを意味する。

【１２３１】

予防：本明細書で使用されるとき、「予防」は、疾患の蔓延を防ぐために使用される治療薬または方法を指す。

【１２３２】

予防法：本明細書で使用されるとき、「予防法」は、健康を維持し、疾患の蔓延を防ぐた

めに取られる手段を指す。「免疫予防法」は、疾患の蔓延を防ぐために、能動的または受動的免疫を生じる手段を指す。

【１２３３】

タンパク質切断部位：本明細書で使用されるとき、「タンパク質切断部位」は、化学的、酵素的または光化学的手段によって、アミノ酸鎖の制御された切断を達成することができる部位を指す。

【１２３４】

タンパク質切断シグナル：本明細書で使用されるとき、「タンパク質切断シグナル」は、切断のためのポリペプチドにフラグまたはマークを付ける、少なくとも１つのアミノ酸を指す。

【１２３５】

目的のタンパク質：本明細書で使用されるとき、「目的のタンパク質」または「所望のタンパク質」という用語は、本明細書で提供されるもの、ならびにその断片、変異体、バリアント及び改変体を含む。

【１２３６】

近位：本明細書で使用されるとき、「近位」という用語は、中心または目的の地点もしくは領域の近くに位置することを意味する。

【１２３７】

プソイドウリジン：本明細書で使用されるとき、プソイドウリジンは、ヌクレオシドウリジンのＣ－グリコシド異性体を指す。「プソイドウリジン類似体」は、プソイドウリジンの任意の修飾、バリアント、アイソフォームまたは誘導体である。例えば、プソイドウリジン類似体には、１－カルボキシメチル－プソイドウリジン、１－プロピニル－プソイドウリジン、１－タウリノメチル－プソイドウリジン、１－タウリノメチル－４－チオ－プソイドウリジン、１－メチルプソイドウリジン（ｍ^{1}ψ）、１－メチル－４－チオ－プソイドウリジン（ｍ^{1}ｓ^{4}ψ）、４－チオ－１－メチル－プソイドウリジン、３－メチル－プソイドウリジン（ｍ^{3}ψ）、２－チオ－１－メチル－プソイドウリジン、１－メチル－１－デアザ－プソイドウリジン、２－チオ－１－メチル－１－デアザ－プソイドウリジン、ジヒドロプソイドウリジン、２－チオ－ジヒドロプソイドウリジン、２－メトキシウリジン、２－メトキシ－４－チオ－ウリジン、４－メトキシ－プソイドウリジン、４－メトキシ－２－チオ－プソイドウリジン、Ｎ１－メチル－プソイドウリジン、１－メチル－３－（３－アミノ－３－カルボキシプロピル）プソイドウリジン（ａｃｐ^{3}ψ）、及び２’－Ｏ－メチル－プソイドウリジン（ψｍ）が挙げられるが、これらに限定されない。

【１２３８】

精製された：本明細書で使用されるとき、「精製する」、「精製された」、「精製」は、実質的に純粋にするか、不必要な構成成分、物質汚染、混合物または不完全性を除去することを意味する。

【１２３９】

反復トランスフェクション：本明細書で使用されるとき、「反復トランスフェクション」という用語は、同一細胞培養物に対するポリヌクレオチドの複数回のトランスフェクションを指す。細胞培養物は、少なくとも２回、少なくとも３回、少なくとも４回、少なくとも５回、少なくとも６回、少なくとも７回、少なくとも８回、少なくとも９回、少なくとも１０回、少なくとも１１回、少なくとも１２回、少なくとも１３回、少なくとも１４回、少なくとも１５回、少なくとも１６回、少なくとも１７回少なくとも１８回、少なくとも１９回、少なくとも２０回、少なくとも２５回、少なくとも３０回、少なくとも３５回、少なくとも４０回、少なくとも４５回、少なくとも５０回またはそれ以上トランスフェクトされ得る。

【１２４０】

試料：本明細書で使用されるとき、「試料」または「生体試料」という用語は、その組織、細胞または構成成分（例えば、限定するものではないが、血液、粘液、リンパ液、滑液、脳脊髄液、唾液、羊水、臍帯血、尿、膣液及び精液を含む、体液）の一部を指す。試料

は、更に、生物全体、またはその組織、細胞もしくは構成成分の一部、またはその画分もしくは部分（限定するものではないが、例えば、血漿、血清、骨髄液、リンパ液、皮膚の外部切片、呼吸器、腸管及び尿生殖路、涙、唾液、乳、血液細胞、腫瘍、器官を含む）から調製されたホモジネート、溶解物または抽出物を含み得る。試料は、更に、タンパク質または核酸分子などの細胞構成成分を含有し得る、普通ブイヨン培地またはゲルなどの培地を指す。

【１２４１】

シグナル配列：本明細書で使用されるとき、「シグナル配列」という文言は、タンパク質の輸送または局在化を誘導することができる配列を指す。

【１２４２】

単回単位用量：本明細書で使用されるとき、「単回単位用量」は、１回用量／１回／単一経路／単一接触点で投与される、すなわち、１回の投与事象で投与される、任意の治療薬の用量である。

【１２４３】

類似性：本明細書で使用されるとき、「類似性」という用語は、高分子間、例えば、ポリヌクレオチド分子（例えば、ＤＮＡ分子及び／またはＲＮＡ分子）間及び／またはポリペプチド分子間の全体的な関係性を指す。高分子の互いの類似性パーセントの算出は、同一性パーセントの算出と同様の方法で実施することができるが、当該技術分野において理解されているように、類似性パーセントの算出には、保存的置換が考慮される点を除く。

【１２４４】

分割用量：本明細書で使用されるとき、「分割用量」は、単回単位用量または総一日用量を２つ以上の用量に分割することである。

【１２４５】

安定した：本明細書で使用されるとき、「安定した」は、反応混合物から有用な程度の純度への単離に耐え抜くのに十分強固であり、ある場合には、有効な治療薬への製剤化が可能である、化合物を指す。

【１２４６】

安定化された：本明細書で使用されるとき、「安定化する」、「安定化された」、「安定化領域」という用語は、安定にすること、または安定した状態になることを意味する。

【１２４７】

立体異性体：本明細書で使用されるとき、「立体異性体」という用語は、化合物（例えば、本明細書に記載される任意の式の化合物）が有し得る、可能性のある全ての種々の異性体及び立体配座型、特に、可能性のある全ての立体化学的及び立体配座的異性体の形態、全てのジアステレオマー、エナンチオマーならびに／または基礎となる分子構造の配座異性体を指す。本開示のいくつかの化合物は、種々の互変異性形態で存在し得、後者の全てが本開示の範囲内に含まれる。

【１２４８】

対象：本明細書で使用されるとき、「対象」または「患者」という用語は、例えば、実験、診察、予防及び／または治療の目的のために、本開示による組成物が投与され得る、あらゆる生物を指す。典型的な対象には、動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、非ヒト霊長類及びヒトなどの哺乳類）が含まれる。

【１２４９】

実質的に：本明細書で使用されるとき、「実質的に」という用語は、目的の特徴または特性の全体またはほぼ全体の範囲または程度を示す定性的な条件を指す。生物学分野の当業者であれば、生物学的及び化学的現象が完了すること及び／もしくは完全なものまで進行すること、または絶対的な結果を達成することもしくは回避することは、あっても稀であることを理解するであろう。したがって、「実質的に」という用語は、多くの生物学的及び化学的現象につきものの完全性の潜在的欠如を補足するために本明細書で使用される。

【１２５０】

実質的に等しい：本明細書で使用されるとき、投与間の時間的差に関するとき、当該用語

は、＋／－２％を意味する。
【１２５１】
実質的に同時に：本明細書で使用されるとき、かつ複数回の投与に関するとき、当該用語は、２秒以内を意味する。
【１２５２】
罹患している：疾患、障害及び／または状態に「罹患している」個体は、疾患、障害及び／または状態の１つ以上の症状についての診断を受けているか、これを呈している。
【１２５３】
罹患しやすい：疾患、障害及び／または状態に「罹患しやすい」個体は、疾患、障害及び／もしくは状態の症状についての診断を受けておらず、かつ／または症状を呈していなくてもよいが、疾患またはその症状を生じる傾向を持っている。いくつかの実施形態において、疾患、障害及び／または状態（例えば、がん）に罹患しやすい個体は、次のもの：（１）疾患、障害及び／または状態の発生に関連する遺伝子突然変異、（２）疾患、障害及び／または状態の発生に関連する遺伝子多型、（３）疾患、障害及び／または状態に関連するタンパク質及び／または核酸の発現及び／または活性の増加及び／または減少、（４）疾患、障害及び／または状態の発生に関連する嗜癖及び／または生活習慣、（５）疾患、障害及び／または状態の家族歴、ならびに（６）疾患、障害及び／または状態の発生に関連する微生物への曝露及び／またはそれによる感染のうちの１つ以上を特徴にし得る。いくつかの実施形態において、疾患、障害及び／または状態に罹患しやすい個体は、疾患、障害及び／または状態を発生し得る。いくつかの実施形態において、疾患、障害及び／または状態に罹患しやすい個体は、疾患、障害及び／または状態を発生しない。
【１２５４】
持続放出：本明細書で使用されるとき、「持続放出」という用語は、特定の一定期間にわたる放出速度に従う、医薬組成物または化合物の放出プロファイルを指す。
【１２５５】
合成：「合成」という用語は、人の手によって、生産、調製及び／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またはポリペプチドまたは他の分子の合成は、化学的または酵素的であり得る。
【１２５６】
標的細胞：本明細書で使用されるとき、「標的細胞」は、１つ以上の任意の目的の細胞を指す。細胞は、ｉｎ ｖｉｔｒｏ、ｉｎ ｖｉｖｏ、ｉｎ ｓｉｔｕまたは生物の組織もしくは器官に認められ得る。生物は、動物、例えば、哺乳動物、ヒトまたは患者であり得る。
【１２５７】
ターゲティング配列：本明細書で使用されるとき、「ターゲティング配列」という文言は、タンパク質の輸送または局在化を誘導することができる配列を指す。
【１２５８】
治療薬：「治療薬」という用語は、対象に投与されたとき、治療的、診療的及び／もしくは予防的効果を有し、かつ／もしくは所望の生物学的及び／もしくは薬理学的効果を誘起する、任意の作用物質を指す。
【１２５９】
治療上有効な量：本明細書で使用されるとき、「治療上有効な量」という用語は、感染症、疾患、障害及び／または状態に罹患しているか、罹患しやすい対象に投与されたとき、その感染症、疾患、障害及び／または状態を治療し、症状改善し、診断し、予防し、かつ／またはその発生を遅延させるのに十分である、送達される作用物質（例えば、核酸、薬物、治療薬、診断薬、予防薬など）の量を意味する。
【１２６０】
治療上有効な効果：本明細書で使用されるとき、「治療上有効な効果」という用語は、感染症、疾患、障害及び／または状態に罹患しているか、罹患しやすい対象において、その感染症、疾患、障害及び／または状態を治療し、症状改善し、診断し、予防し、かつ／またはその発生を遅延させるのに十分である効果を意味する。

【１２６１】
総一日用量：本明細書で使用されるとき、「総一日用量」は、２４時間の期間内に投与または処方される量である。総一日用量は、単回単位用量として投与され得る。
【１２６２】
転写因子：本明細書で使用されるとき、「転写因子」という用語は、例えば、転写の活性化または抑制による、ＤＮＡのＲＮＡへの転写を制御するＤＮＡ結合タンパク質を指す。いくつかの転写因子は、単独で転写制御をもたらすが、他の転写因子は、他のタンパク質と協調して作用する。いくつかの転写因子は、ある特定の条件下で、転写の活性化と抑制の両方を行うことができる。一般に、転写因子は、標的遺伝子の制御領域中にある、特定の標的配列または特定のコンセンサス配列に高度に類似した配列と結合する。転写因子は、単独で、または他の分子との複合体で、標的遺伝子の転写を制御することができる。
【１２６３】
転写：本明細書で使用されるとき、「転写」という用語は、外因性核酸を細胞中に導入する方法を指す。トランスフェクションの方法には、化学的方法、物理的処理及びカチオン性脂質または混合物が含まれるが、これらに限定されない。
【１２６４】
治療すること：本明細書で使用されるとき、「治療すること」または「治療」または「治療法」という用語は、特定の感染症、疾患、障害及び／または状態の１つ以上の症状または特徴を、部分的または完全に、軽減し、寛解し、改善し、緩和し、発生を遅延し、進行を阻害し、重症度を低減させ、かつ／または発症率を低下させることを指す。治療は、疾患、障害及び／または状態に関連する病変発生のリスクを低下させる目的で、疾患、障害及び／もしくは状態の徴候を呈していない対象、ならびに／または疾患、障害及び／もしくは状態の初期徴候のみを呈している対象に施され得る。
【１２６５】
非修飾：本明細書で使用されるとき、「非修飾」は、何らかの方法で変化させる以前の任意の物質、化合物または分子を指す。非修飾は、生体分子の野生型または天然型を指し得るが、必ずしもそうである必要はない。分子は、一連の修飾を受けてもよく、これにより、各修飾分子が、後続の修飾のための「非修飾」出発分子として機能する場合もある。
【１２６６】
ウイルス性タンパク質：本明細書で使用されるとき、「ウイルス性タンパク質」という文言は、ウイルスを起源とする任意のタンパク質を意味する。
【１２６７】
Ｘ．関連出願の相互参照
本出願は、２０１５年１２月１７日出願の米国仮特許出願第６２／２６９，０８９号（表題：Ｐｏｌｙｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ Ｅｎｃｏｄｉｎｇ Ｍｅｔｈｙｌｍａｌｏｎｙｌ－ＣｏＡ Ｍｕｔａｓｅ）、２０１５年１２月１７日出願の米国仮特許出願第６２／２６９，０９２号（表題：Ｍｅｔｈｏｄｓ ｏｆ Ｕｓｉｎｇ ＭＣＭ－Ｅｎｃｏｎｄｉｎｇ Ｐｏｌｙｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ）、２０１５年１２月３０日出願の米国仮特許出願第６２／２７３，１１２号（表題：Ｐｏｌｙｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ Ｅｎｃｏｄｉｎｇ Ｍｅｔｈｙｌｍａｌｏｎｙｌ－ＣｏＡ Ｍｕｔａｓｅ）、２０１５年１２月３０日出願の米国仮特許出願第６２／２７３，１０８号（表題：Ｍｅｔｈｏｄｓ ｏｆ Ｕｓｉｎｇ ＭＣＭ－Ｅｎｃｏｎｄｉｎｇ Ｐｏｌｙｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ）、２０１６年1月４日出願の米国仮特許出願第６２／２７４，７２７号（表題：Ｐｏｌｙｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ Ｅｎｃｏｄｉｎｇ Ｍｅｔｈｙｌｍａｌｏｎｙｌ－ＣｏＡ Ｍｕｔａｓｅ）、２０１６年1月４日出願の米国仮特許出願第６２／２７４，７３３号（表題：Ｍｅｔｈｏｄｓ ｏｆ Ｕｓｉｎｇ ＭＣＭ－Ｅｎｃｏｎｄｉｎｇ Ｐｏｌｙｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ）、２０１６年1月４日出願の米国仮特許出願第６２／２７４，７２２号（表題：Ｐｏｌｙｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ Ｅｎｃｏｄｉｎｇ Ｍｅｔｈｙｌｍａｌｏｎｙｌ－ＣｏＡ Ｍｕｔａｓｅ）、２０１６年1月４日出願の米国仮特許出願第６２／２７４，７２６号（表題：Ｍｅｔｈｏｄｓ ｏｆ Ｕｓｉｎｇ ＭＣＭ－Ｅｎｃｏｎｄｉｎｇ Ｐｏｌｙｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ）、２

０１６年５月１８日出願の米国仮特許出願第６２／３３８，４７８号（表題：Ｐｏｌｙｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ Ｅｎｃｏｄｉｎｇ Ｍｅｔｈｙｌｍａｌｏｎｙｌ－ＣｏＡ Ｍｕｔａｓｅ）、２０１６年５月１８日出願の米国仮特許出願第６２／３３８，４５６号（表題：Ｐｏｌｙｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ Ｅｎｃｏｄｉｎｇ Ｍｅｔｈｙｌｍａｌｏｎｙｌ－ＣｏＡ Ｍｕｔａｓｅ）、及び２０１６年１０月１４日出願の米国仮特許出願第６２／４０９，３４３号（表題：Ｐｏｌｙｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ Ｅｎｃｏｄｉｎｇ Ｍｅｔｈｙｌｍａｌｏｎｙｌ－ＣｏＡ Ｍｕｔａｓｅ）の優先権を主張するものであり、各出願の内容全体を参照により本明細書に援用する。

【１２６８】

ＸＩ．電子的に提出された配列表への言及

本出願とともに提出された電子的に提出された配列表（名称：「３５２９＿０５２ＰＣ０７＿ＳｅｑＬｉｓｔｉｎｇ＿ＳＴ２５．ｔｘｔ」、サイズ：１，０８０，５７２バイト、作成日：２０１６年１２月１６日）の内容は、その全体を参照により援用する。

【１２６９】

ＸＩＩ．等価物及び範囲

当業者であれば、通常の実験を用いるだけで、本明細書に記載される本開示による具体的な実施形態の等価物を数多く認識または確認できるであろう。本開示の範囲は、上述の「発明を実施するための形態」に限定されるものではなく、添付する特許請求の範囲に記載される。

【１２７０】

特許請求の範囲において、「ａ」、「ａｎ」及び「ｔｈｅ」などの冠詞は、別途反する指示がない限り、または文脈から明らかである場合を除き、１つまたは２つ以上を意味し得る。１つ以上の群の構成要素間に「または」が含まれる特許請求の範囲または説明は、別途反する指示がない限り、または文脈から明らかである場合を除き、その群の構成要素のうちの１つ、２つ以上または全てが所与の生成物またはプロセス中に存在するか、用いられるか、いずれにせよこれらに関連する場合、満たされるものとみなされる。本開示は、正確に１つの群の構成要素が、所与の生成物またはプロセス中に存在するか、用いられるか、いずれにせよこれらに関連している、実施形態を含む。本開示は、群の構成要素のうちのの２つ以上または全てが、所与の生成物またはプロセス中に存在するか、用いられるか、いずれにせよこれらに関連している、実施形態を含む。

【１２７１】

「含む」という用語は、非限定であることが意図され、追加の要素またはステップの包含を認めるが、必ずしもそれを必要としないことにも留意されたい。「含む」という用語が本明細書で使用されるとき、「～からなる」という用語も包含され、開示される。

【１２７２】

範囲が記載される場合、端点も包含される。更に、特に指定のない限り、または文脈及び当業者の理解から明らかである場合を除き、範囲として表される値は、文脈により別途明示がない限り、その範囲の下限の単位の１／１０まで、本開示の様々な実施形態における指定範囲内の任意の特定値またはサブ範囲を想定し得るものと理解される。

【１２７３】

加えて、従来技術の範囲内に含まれる本開示の任意の特定の実施形態は、任意の１つ以上の請求項から明確に除外されてもよいことを理解すべきである。そのような実施形態は、当業者に知られていると考えられるので、当該除外が本明細書中に明示的に記載されていない場合であっても、除外され得る。本開示の組成物の任意の特定の実施形態（例えば、任意の核酸またはそれにコードされるタンパク質、任意の作製方法、任意の使用方法など）は、従来技術の存在に関係するかどうかにかかわらず、任意の理由で、任意の１つ以上の請求項から除外することができる。

【１２７４】

引用される全ての情報源、例えば、本明細書で引用される参考文献、公開物、データベース、データベースの事項及び技術は、引用中に明示的に記載されていない場合であっても

、参照により本出願に援用される。引用された情報源と本出願の記述に矛盾が生じる場合は、本出願の記述が優先されるものとする。

【１２７５】

セクション及び表見出しは、限定を意図するものではない。

【実施例】

【１２７６】

実施例１．キメラポリヌクレオチド合成

三リン酸経路

三リン酸化学反応を使用して、キメラポリヌクレオチドの２つの領域または部分を連結またはライゲートすることができる。本方法によれば、５'リン酸及び末端３'ｄｅｓＯＨまたは遮断ＯＨにより、１００ヌクレオチド以下の第１の領域または部分を、化学的に合成することができる。領域が８０ヌクレオチドよりも長い場合、ライゲーション用の２つの鎖として合成してもよい。

【１２７７】

ｉｎ　ｖｉｔｒｏ転写（ＩＶＴ）を使用して第１の領域または部分を非位置的に改変された領域または部分として合成する場合、５’リン酸への変換と、それに続く３’末端キャッピングとが行われ得る。一リン酸保護基は、当該技術分野において知られているもののいずれかから選択することができる。

【１２７８】

キメラポリヌクレオチドの第２の領域または部分は、化学合成またはＩＶＴ方法のいずれかを使用して合成することができる。ＩＶＴ方法は、修飾されたキャップを有するプライマーを利用することができるＲＮＡポリメラーゼを含み得る。あるいは、８０ヌクレオチドまでのキャップを化学的に合成し、ＩＶＴ領域またはＩＶＴ部分に連結してもよい。

【１２７９】

ライゲーション法では、ＤＮＡ　Ｔ４リガーゼによるライゲーションと、それに続くＤＮＡｓｅ処理により、コンカテマー化が容易に回避されるものであることに留意されたい。

【１２８０】

キメラポリヌクレオチド全体をリン酸－糖骨格で作製する必要はない。領域または部分のうちの１つがポリペプチドをコードする場合、かかる領域または部分は、リン酸－糖骨格を含み得る。

【１２８１】

次に、任意の既知のクリックケミストリー、オルトクリックケミストリー、ソルリンク（ｓｏｌｕｌｉｎｋ）または当業者に知られている他のバイオコンジュゲート化学反応を使用して、ライゲーションを行うことができる。

【１２８２】

合成経路

一連の出発セグメントを使用してキメラポリヌクレオチドを作製することができる。かかるセグメントには、以下が含まれる：

（ａ）通常の３’ＯＨを含む、キャップ及び保護された５’セグメント（ＳＥＧ．１）、

（ｂ）ポリペプチドのコーディング領域を含み得、通常の３'ＯＨを含む、５'三リン酸セグメント（ＳＥＧ．２）

（ｃ）コルジセピンを含むか、３’ＯＨを含まない、キメラポリヌクレオチドの３’端（例えばテール）用の５’リン酸セグメント（ＳＥＧ．３）。

【１２８３】

合成（化学的合成またはＩＶＴ合成）後に、セグメント３（ＳＥＧ．３）をコルジセピンで処理し、次いで、ピロホスファターゼで処理して、５’リン酸を生成させる。

【１２８４】

次いで、ＲＮＡリガーゼを使用して、セグメント２（ＳＥＧ．２）をＳＥＧ．３にライゲーションすることができる。次いで、ライゲーションされたポリヌクレオチドを精製し、ピロホスファターゼで処理して、二リン酸を切断する。次いで、処理されたＳＥＧ．２－

ＳＥＧ．３構築物を精製し、５’末端にＳＥＧ．１をライゲーションする。キメラポリヌクレオチドの更なる精製ステップが実施されてもよい。

【１２８５】

キメラポリヌクレオチドがポリペプチドをコードする場合、ライゲーションされたセグメントまたは連結されたセグメントは、次のように表すことができる。５’ＵＴＲ（ＳＥＧ．１）、オープンリーディングフレームまたはＯＲＦ（ＳＥＧ．２）及び３’ＵＴＲ＋ポリＡ（ＳＥＧ．３）。

【１２８６】

各工程の収率は、９０～９５％にもなり得る。

【１２８７】

実施例２：ｃＤＮＡ生成のためのＰＣＲ

ｃＤＮＡを調製するためのＰＣＲ工程は、Ｋａｐａ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ（Ｗｏｂｕｒｎ，ＭＡ）による２×　ＫＡＰＡ　ＨＩＦＩ（商標）ＨｏｔＳｔａｒｔ　ＲｅａｄｙＭｉｘを使用して実施することができる。このシステムは、２×　ＫＡＰＡ　ＲｅａｄｙＭｉｘ　１２．５μｌ、フォワードプライマー（１０μＭ）０．７５μｌ、リバースプライマー（１０μＭ）０．７５μｌ、鋳型ｃＤＮＡ－１００ｎｇを含み、ｄＨ$_2$Ｏで２５．０μｌに希釈される。ＰＣＲ反応条件は、９５℃で５分、９８℃で２０秒、次に５８℃で１５秒、次に７２℃で４５秒を２５サイクル、次に７２℃で５分、次に終了まで４℃であってよい。

【１２８８】

本開示のリバースプライマーは、ｍＲＮＡ中のポリＡ１２０のためにポリＴ１２０を組み込む。より長いまたはより短いポリ（Ｔ）区画を有する他のリバースプライマーを使用して、ポリヌクレオチドｍＲＮＡ中のポリ（Ａ）テールの長さを調節することができる。

【１２８９】

ＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎのＰＵＲＥＬＩＮＫ（商標）ＰＣＲ　Ｍｉｃｒｏ　Ｋｉｔ（Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）を製造元の説明書に従って使用して、反応をクリーンアップすることができる（５μｇまで）。より大きな反応には、容量がより大きい製品を使用したクリーンアップが必要とされ得る。クリーンアップに続いて、ＮＡＮＯＤＲＯＰ（商標）を使用してｃＤＮＡを定量し、アガロースゲル電気泳動で分析して、当該ｃＤＮＡが予想サイズであることを確認することができる。次いで、ｃＤＮＡをシーケンシング解析に供した後、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ転写反応に進む。

【１２９０】

実施例３．ｉｎ　ｖｉｔｒｏ転写（ＩＶＴ）

ｉｎ　ｖｉｔｒｏ転写反応により、均一に修飾されたポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドを生成することができる。そのような均一に修飾されたポリヌクレオチドは、本開示のポリヌクレオチドの領域または部分を含み得る。投入されるヌクレオチド三リン酸（ＮＴＰ）混合物は、天然及び非天然ＮＴＰを使用して作製することができる。

【１２９１】

典型的なｉｎ　ｖｉｔｒｏ転写反応は、次を含み得る。

１ 鋳型ｃＤＮＡ　１．０μｇ

２ １０×転写バッファー（４００ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８．０）、１９０ｍＭ　ＭｇＣｌ$_2$、５０ｍＭ　ＤＴＴ、１０ｍＭ　スペルミジン）２．０μｌ

３ カスタムＮＴＰ（各２５ｍＭ）７．２μｌ

４ ＲＮａｓｅ阻害剤　２０Ｕ

５ Ｔ７　ＲＮＡポリメラーゼ　３０００Ｕ

６ ｄＨ$_2$Ｏ　最大２０．０μｌ、及び

７ ３７℃で３時間～５時間のインキュベーション。

【１２９２】

粗ＩＶＴ混合物は、翌日のクリーンアップに備えて、４℃で終夜保存され得る。次いで、１ＵのＲＮａｓｅ不含有ＤＮａｓｅを使用して、元の鋳型を消化する。３７℃で１５分のインキュベーション後に、ＡｍｂｉｏｎのＭＥＧＡＣＬＥＡＲ（商標）キット（Ａｕｓｔ

ｉｎ，ＴＸ）を製造元の説明書に従って使用して、ｍＲＮＡを精製することができる。このキットは５００μｇまでのＲＮＡを精製することができる。このクリーンアップに続いて、ＮａｎｏＤｒｏｐを使用してＲＮＡを定量し、アガロースゲル電気泳動で分析して、ＲＮＡが適切なサイズであり、かつＲＮＡの分解が起きていないことを確認することができる。

【１２９３】

実施例４．酵素キャッピング

ポリヌクレオチドのキャッピングは、ＩＶＴ　ＲＮＡ　６０μｇ～１８０μｇ及びｄＨ$_2$Ｏ（最大７２μｌ）を含む混合物を用いて実施することができる。混合物を６５℃で５分間インキュベートしてＲＮＡを変性させた後、これを直ちに氷に移すことができる。

【１２９４】

次いで、本プロトコルは、１０×キャッピングバッファー（０．５Ｍ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８．０）、６０ｍＭ　ＫＣｌ、１２．５ｍＭ　ＭｇＣｌ$_2$）（１０．０μｌ）、２０ｍＭ　ＧＴＰ（５．０μｌ）、２０ｍＭ　Ｓ－アデノシルメチオニン（２．５μｌ）、ＲＮａｓｅ阻害剤（１００Ｕ）、２’－Ｏ－メチルトランスフェラーゼ（４００Ｕ）、ワクシニアキャッピング酵素（グアニリルトランスフェラーゼ）（４０Ｕ）、ｄＨ$_2$Ｏ（最大２８μｌ）の混合と、ＲＮＡが６０μｇの場合は３０分間、ＲＮＡが１８０μｇの場合は最大２時間の３７℃でのインキュベーションとを伴い得る。

【１２９５】

次いで、ＡｍｂｉｏｎのＭＥＧＡＣＬＥＡＲ（商標）キット（Ａｕｓｔｉｎ，ＴＸ）を製造元の説明書に従って使用して、ポリヌクレオチドを精製することができる。このクリーンアップに続いて、ＮａｎｏＤｒｏｐ（商標）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ，Ｗａｌｔｈａｍ，ＭＡ）を使用してＲＮＡを定量し、アガロースゲル電気泳動で分析して、ＲＮＡが適切なサイズであり、かつＲＮＡの分解が起きていないことを確認することができる。ＲＮＡ産物はまた、逆転写ＰＣＲを行ってシーケンシング用のｃＤＮＡを生成させることで、配列決定を行ってもよい。

【１２９６】

実施例５．ポリＡテーリング反応

ｃＤＮＡ中にポリＴがない場合は、最終産物のクリーニング前にポリＡテーリング反応を実施する必要がある。これは、キャップされたＩＶＴ　ＲＮＡ（１００μｌ）、ＲＮａｓｅ阻害剤（２０Ｕ）、１０×テーリングバッファー（０．５Ｍ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８．０）、２．５Ｍ　ＮａＣｌ、１００ｍＭ　ＭｇＣｌ$_2$）（１２．０μｌ）、２０ｍＭ　ＡＴＰ（６．０μｌ）、ポリＡポリメラーゼ（２０Ｕ）、ｄＨ$_2$Ｏ（最大１２３．５μｌ）を混合し、３７℃で３０分間インキュベートすることによって行うことができる。ポリＡテールが転写産物中に既に存在する場合には、テーリング反応を飛ばして、ＡｍｂｉｏｎのＭＥＧＡＣＬＥＡＲ（商標）キット（Ａｕｓｔｉｎ，ＴＸ）によるクリーンアップ（５００μｇまで）に直接進むことができる。ポリ－Ａポリメラーゼは、ある場合には、酵母中で発現された組み換え酵素である。

【１２９７】

ポリＡテーリング反応の処理能力または完全性は、常に正確なサイズのポリＡテールをもたらすとは限らないことを理解されたい。したがって、およそ４０～２００ヌクレオチド、例えば、約４０、５０、６０、７０、８０、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、１００、１０１、１０２、１０３、１０４、１０５、１０６、１０７、１０８、１０９、１１０、１５０～１６５、１５５、１５６、１５７、１５８、１５９、１６０、１６１、１６２、１６３、１６４または１６５のポリＡテールは、本開示の範囲内である。

【１２９８】

実施例６．天然５’キャップ及び５’キャップ類似体

ポリヌクレオチドの５’キャッピングは、次の化学的ＲＮＡキャップアナログを製造元のプロトコルに従って使用して５’－グアノシンキャップ構造を生じさせることで、ｉｎ　ｖｉ

ｔｒｏ転写反応中に同時に達成することができる：３´－Ｏ－Ｍｅ－ｍ７Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）Ｇ［ＡＲＣＡキャップ］、Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）Ａ、Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）Ｇ、ｍ７Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）Ａ、ｍ７Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）Ｇ（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ ＢｉｏＬａｂｓ（Ｉｐｓｗｉｃｈ，ＭＡ））。修飾ＲＮＡの５’キャッピングは、ワクシニアウイルスキャッピング酵素を使用して「キャップ０」構造：ｍ７Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）Ｇ（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ ＢｉｏＬａｂｓ（Ｉｐｓｗｉｃｈ，ＭＡ））を生じさせることによって転写後に達成され得る。キャップ１構造は、ワクシニアウイルスキャッピング酵素と２’－Ｏメチルトランスフェラーゼの両方を使用してｍ７Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）Ｇ－２’－Ｏ－メチルを生じさせることで生成することができる。キャップ２構造は、キャップ１構造から、２’－Ｏメチルトランスフェラーゼを使用して３番目の５’－ヌクレオチドを２’－Ｏ－メチル化することによって生成することができる。キャップ３構造は、キャップ２構造から、２’－Ｏメチルトランスフェラーゼを使用して４番目の５’－ヌクレオチドを２’－Ｏ－メチル化することによって生成することができる。酵素は、組み換え供給源に由来し得る。

【１２９９】

修飾ｍＲＮＡは、哺乳動物細胞にトランスフェクトされた場合、１２～１８時間または１８時間超、例えば、２４、３６、４８、６０、７２もしくは７２時間超の安定性を有し得る。

【１３００】

実施例７．キャッピングアッセイ

Ａ．タンパク質発現アッセイ

本明細書で教示されるキャップのいずれかを含有し、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを、等しい濃度で細胞にトランスフェクトすることができる。トランスフェクションから６、１２、２４及び／または３６時間後に、培養培地中に分泌されたタンパク質の量を、ＥＬＩＳＡによってアッセイすることができる。より高いレベルのタンパク質を培地中に分泌する合成ポリヌクレオチドは、より高い翻訳能力のあるキャップ構造を有する合成ポリヌクレオチドに該当する。

【１３０１】

Ｂ．純度分析合成

本明細書で教示されるキャップのいずれかを含有し、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、変性アガロース尿素ゲル電気泳動またはＨＰＬＣ分析を使用して、純度について比較することができる。電気泳動で単一の統合されたバンドを有するポリヌクレオチドは、複数のバンドまたは縞状のバンドを有するポリヌクレオチドと比較して、純度の高い生成物に該当する。単一のＨＰＬＣピークを有する合成修飾ポリヌクレオチドも、純度の高い生成物に該当する。キャッピング反応の効率が高いほど、より純粋なポリヌクレオチド集団を与える。

【１３０２】

Ｃ．サイトカイン分析

本明細書で教示されるキャップのいずれかを含有し、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、複数の濃度で細胞にトランスフェクトすることができる。トランスフェクションから６、１２、２４及び／または３６時間後に、培養培地中に分泌されたＴＮＦ－α及びＩＦＮ－βなどの炎症促進性サイトカインの量を、ＥＬＩＳＡによってアッセイすることができる。より高いレベルの炎症誘発性サイトカインを培地中に分泌させるポリヌクレオチドは、免疫活性化キャップ構造を含有するポリヌクレオチドに該当する。

【１３０３】

Ｄ．キャッピング反応効率

本明細書で教示されるキャップのいずれかを含有し、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、ヌクレアーゼ処理後のＬＣ－ＭＳによって、キャッピング反応効率について分析することができる。キャップされたポリヌクレオチドのヌクレアーゼ処理により、ＬＣ－ＭＳによって検出可能である、遊離ヌクレオチドとキャップされた５’－５－三リン酸

キャップ構造との混合物が得られる。ＬＣ－ＭＳスペクトルにおけるキャップされた生成物の量は、反応からの総ポリヌクレオチドのパーセントとして表すことができ、キャッピング反応効率に対応する。キャッピング反応効率の高いキャップ構造は、ＬＣ－ＭＳによると、キャップされた生成物の量が多い。

【１３０４】

実施例８．修飾ＲＮＡまたはＲＴ　ＰＣＲ産物のアガロースゲル電気泳動

個々のポリヌクレオチド（体積２０μｌ中２００～４００ｎｇ）または逆転写されたＰＣＲ産物（２００～４００ｎｇ）を、非変性１．２％アガロースＥ－Ｇｅｌ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ（Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ））上のウェルにローディングし、製造元のプロトコルに従って１２～１５分間、泳動する。

【１３０５】

実施例９．Ｎａｎｏｄｒｏｐによる修飾ＲＮＡの定量及びＵＶスペクトルデータ

ＴＥバッファー（１μｌ）中の修飾ポリヌクレオチドをＮａｎｏｄｒｏｐＵＶ吸光度測定に使用して、化学合成またはｉｎ　ｖｉｔｒｏ転写反応からの各ポリヌクレオチドの収率を定量することができる。

【１３０６】

実施例１０．リピドイドを使用した修飾ｍＲＮＡの製剤化

ポリヌクレオチドは、設定した比で、ポリヌクレオチドをリピドイドと混合した後、細胞に加えることによって、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ実験用に製剤化することができる。ｉｎ　ｖｉｖｏ製剤は、全身循環を促進するために追加成分の添加を必要とすることがある。これらのリピドイドのｉｎ　ｖｉｖｏ作用に好適な粒子を形成する能力を試験するために、ｓｉＲＮＡ－リピドイド製剤に使用される標準的な製剤化プロセスを出発点として使用することができる。粒子の形成後に、ポリヌクレオチドを加えて、複合体と一体化させてもよい。封入効率は、標準的な色素排除アッセイを使用して決定することができる。

【１３０７】

実施例１１．タンパク質発現のについてのスクリーニング方法

Ａ．エレクトロスプレーイオン化

対象に投与したポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質を含有し得る生体試料を調製し、これを、１、２、３または４台の質量分析部を使用するエレクトロスプレーイオン化（ＥＳＩ）に関する製造元のプロトコルに従って解析することができる。生体試料はまた、タンデムＥＳＩ質量分析システムを使用して解析することもできる。

【１３０８】

タンパク質断片またはタンパク質全体のパターンを所与のタンパク質に関する既知の対照と比較することができ、比較によってタンパク質が何であるかを決定することができる。

【１３０９】

Ｂ．マトリックス支援レーザー脱離／イオン化

対象に投与した１つ以上のポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質を含有し得る生体試料を調製し、これを、マトリックス支援レーザー脱離イオン化（ＭＡＬＤＩ）に関する製造元のプロトコルに従って解析することができる。

【１３１０】

タンパク質断片またはタンパク質全体のパターンを所与のタンパク質に関する既知の対照と比較することができ、比較によってタンパク質が何であるかを決定することができる。

【１３１１】

Ｃ．液体クロマトグラフィー／質量分析／質量分析

１つ以上のポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質を含有し得る生体試料をトリプシン酵素で処理し、生体試料中に含有されるタンパク質を消化することができる。得られたペプチドを液体クロマトグラフィー／質量分析／質量分析（ＬＣ／ＭＳ／ＭＳ）によって解析することができる。ペプチドは、質量分析計でフラグメント化され、コンピューターアルゴリズムを介してタンパク質配列データベースと照合され得る診断パターンを得ることができる。消化された試料は、所与のタンパク質に関して、１ｎｇ以下の出発物

質を達成するように希釈され得る。単純な緩衝液バックグラウンド（例えば、水または揮発性塩）を含有する生体試料は、直接溶液内消化を適用できるが、より複雑なバックグラウンド（例えば、界面活性剤、不揮発性塩、グリセロール）では、試料解析を容易にするために、追加のクリーンアップステップを必要とする。

【１３１２】

タンパク質断片またはタンパク質全体のパターンを所与のタンパク質に関する既知の対照と比較することができ、比較によってタンパク質が何であるかを決定することができる。

【１３１３】

実施例１２．ＭＣＭをコードするｍＲＮＡの合成

ＭＣＭポリペプチドをコードする配列最適化ポリヌクレオチド、すなわち、配列番号１～２０７、７３２～７６５及び７７２を実施例１～１２に記載されているように合成する。

【１３１４】

更に、マウスＭＣＭ及びヒトＭＣＭをコードする両ｍＲＮＡを以下に記載される実施例１３～１９のために調製した。これらは、実施例１～１２に記載のとおりに合成した。

【１３１５】

ヒトＭＣＭをコードするｍＲＮＡ（「ｈＭＣＭ－ｍＲＮＡ」）は、ＭＣＭの天然Ｖ６７１変異体をコードするように構築した。ｈＭＣＭ－ｍＲＮＡのヌクレオチド配列は、配列番号２４９に記載されている。ｈＭＣＭ－ｍＲＮＡ配列は、５'及び３'ＵＴＲ領域（それぞれ配列番号２６６及び２６７）の両方を含む。

５’ＵＴＲ：ＴＣＡＡＧＣＴＴＴＴＧＧＡＣＣＣＴＣＧＴＡＣＡＧＡＡＧＣＴＡＡＴＡＣＧＡＣＴＣＡＣＴＡＴＡＧＧＧＡＡＡＴＡＡＧＡＧＡＧＡＡＡＡＧＡＡＧＡＧＴＡＡＧＡＡＧＡＡＡＴＡＴＡＡＧＡＧＣＣＡＣＣ

３’ＵＴＲ：ＴＧＡＴＡＡＴＡＧＧＣＴＧＧＡＧＣＣＴＣＧＧＴＧＧＣＣＡＴＧＣＴＴＣＴＴＧＣＣＣＣＴＴＧＧＧＣＣＴＣＣＣＣＣＣＡＧＣＣＣＣＴＣＣＴＣＣＣＣＴＴＣＣＴＧＣＡＣＣＣＧＴＡＣＣＣＣＣＧＴＧＧＴＣＴＴＴＧＡＡＴＡＡＡＧＴＣＴＧＡＧＴＧＧＧＣＧＧＣ

【１３１６】

また、マウスＭＣＭをコードするｍＲＮＡ（「ｍＭＣＭ－ｍＲＮＡ」）を標準的な分子生物学的技術を使用して構築した。ｍＭＣＭ－ｍＲＮＡのヌクレオチド配列は、配列番号２５０に記載されており、マウスＭＣＭ（配列番号２６８）をコードする。ｍＭＣＭ－ｍＲＮＡ配列は、ｈＭＣＭ－ｍＲＮＡと同じ５'及び３'ＵＴＲ領域を含む。

【１３１７】

ｈＭＣＭ－ｍＲＮＡ及びｍＭＣＭ－ｍＲＮＡは、いずれも修飾ｍＲＮＡとして調製した。具体的には、ｍＲＮＡがウリジンの代わりに確実に１－メチル－プソイドウリジンを１００％含有するように、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ翻訳中に、１－メチル－プソイドＵＴＰを使用して修飾ｍＲＮＡを生成した。更に、ｈＭＣＭ－ｍＲＮＡ及びｍＭＣＭ－ｍＲＮＡは両方とも１００ヌクレオチドポリＡテールを導入したプライマーを用いて合成し、また、両ｍＲＮＡ上に、ワクシニアウイルスキャッピング酵素及び２’－Ｏメチル－トランスフェラーゼを使用して、ｍ７Ｇ（５'）ｐｐｐ（５'）Ｇ－２’－Ｏ－メチルを生成するようにキャップ１構造を生成した。

【１３１８】

実施例１３．ｉｎ　ｖｉｔｒｏにおける内因性ＭＣＭ発現の検出

マウス起源及びヒト起源に由来する両方の細胞を含む、種々の細胞株でＭＣＭ発現を特徴付けた。試験した細胞株には、Ｈｅｐａ１－６（マウス）、ＨｅｐＧ２（ヒト）、ＳＮＵ４２３（ヒト）及びＨｅＬａ細胞を含めた。細胞を標準条件下で培養し、細胞を溶解緩衝液中に入れることによって、細胞抽出物を得た。比較する目的で、マウス肝臓に由来するミトコンドリア抽出物も同様に調製した。肝臓抽出物を調製するために、０．１モルのＴｒｉｚｍａベースの ＭＯＰＳ（３－（Ｎ－モルホリノ）プロパンスルホン酸）で中性ｐＨに調整した氷冷スクロース含有低張緩衝液中で全肝臓をホモジナイズした。肝臓ホモジネートを冷却卓上遠心分離器で６００ｇで遠心分離し、核分画を除去した。次いで、透明溶

解液を７０００ｇで遠心分離することによって、ミトコンドリア分画を回収した。
【１３１９】
ＭＣＭの発現を分析するために、各溶解物１５μｇを、ドデシル硫酸リチウム試料ローディングバッファーを用いて４０μＬの容量に調製し、標準的なウェスタンブロット分析に供した。ＭＣＭの検出のために使用した抗体は、希釈１：１０００の抗メチルマロニルＣｏＡムターゼ（マウスポリクローナル、Ａｂ６７８６９；Ａｂｃａｍ（登録商標））であった。ロード対照の検出のために使用した抗体は、抗シトラーゼシンターゼ（ウサギポリクローナル；ＰＡ５－２２１２６、Ｔｈｅｒｍｏ－Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ（登録商標））であった。図１中、抗ＭＣＭによって生じたシグナルを緑で示し、抗クエン酸シンターゼシグナルを赤で示す。図１は、マウス肝臓由来細胞株及びヒト肝臓由来細胞株の両方を含む全ての試験細胞株で、ＭＣＭが認められたことを示している。全ての細胞株について、ＭＣＭの発現は、対照のクエン酸シンターゼシグナルに対してほぼ同じ割合であったが、ＨｅＬａ細胞では、より少ないシグナルが観察された。図１はまた、細胞株がマウス肝臓ミトコンドリアミトコンドリア抽出物と同等のレベルでＭＣＭを発現したことを示している。
【１３２０】
内因性ＭＣＭの局在について調べるために、ＨｅＬａ細胞に対して免疫蛍光法を実施した。ＭＣＭ発現は、抗メチルマロニルＣｏＡムターゼ（マウスモノクローナル、Ａｂ６７８６９、Ａｂｃａｍ（登録商標））を使用して検出し、ミトコンドリアは、Ｍｉｔｏｔｒａｃｋｅｒを使用して検出し、ＤＡＰＩで核を染色した。Ｚｅｉｓｓ　ＥＬＹＲＡイメージングシステムで画像解析を実施した。図２（Ａ）～（Ｃ）に示されるように、ＨｅＬａ免疫蛍光染色は、ミトコンドリア（赤）とＭＣＭ免疫蛍光（緑）との間で広範な共局在を示しているが、核（ＤＡＰＩ染色）とＭＣＭとの間の共局在はほとんどまたは全くない。内因性ＭＣＭの大部分がミトコンドリアに局在するという知見は、ＭＣＭの既知の代謝機能及び局在と一致する。
【１３２１】
実施例１４．ＨｅＬａ細胞におけるＭＣＭのｉｎ　ｖｉｔｒｏ発現
ＨｅＬａ細胞におけるヒトＭＣＭのｉｎ　ｖｉｔｒｏ発現を測定するために、これらの細胞をトランスフェクションの１日前に１２ウェルプレート（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ（Ｓａｎ　Ｊｏｓｅ，ＵＳＡ））に播種した。ヒトＭＣＭ（配列番号２４９）またはＧＦＰ対照（配列番号２６９をコード）を含むｍＲＮＡ製剤を、１ウェル当たりＯＰＴＩ－ＭＥＭ　６０μＬ中で、ｍＲＮＡ　８００ｎｇ及びＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎ　２０００　２μＬを使用してトランスフェクションし、インキュベートした。２４時間後、一定量の溶解緩衝液を使用して各ウェルの細胞を溶解した。比較する目的で、マウス肝臓ミトコンドリア抽出物も実施例１３に記載するとおりに調製した。ＢＣＡアッセイを製造元の説明書に従って使用して、それぞれのタンパク質濃度を決定した。ＭＣＭの発現を分析するために、各溶解物（２４μｇ）の同等のロードをローディングバッファーで調製し、標準的なウェスタンブロット分析に供した。ＭＣＭの検出のために使用した抗体は、希釈１：１０００の抗メチルマロニルＣｏＡムターゼ（ウサギモノクローナル、ａｂ１３３６７２、Ａｂｃａｍ（登録商標））であった。
【１３２２】
得られたウェスタンブロットを図３に示す。図３は、ｈＭＣＭ配列（配列番号２４９）を含むｍＲＮＡ製剤の導入が、対照構築物をトランスフェクトした細胞に比べて、ＨｅＬａ細胞において、ＭＣＭ発現のレベルを大幅に増加させたことを示している。ＭＣＭをコードするｍＲＮＡの導入後に観察されたＭＣＭ発現レベルは、肝臓ミトコンドリアミトコンドリア抽出物中に存在するレベルよりも更に高かった。図１は、少なくともいくつかの内因性ＭＣＭがＨｅＬａ細胞中に存在することを示したが、図３は、ｈＭＣＭを含むｍＲＮＡの導入後のＭＣＭ発現レベルがベースラインをはるかに上回ることを示している。
【１３２３】
実施例１５．ＨｅＬａ細胞におけるＭＣＭのｉｎ　ｖｉｔｒｏ活性

図３のウェスタンブロットにより、ＭＣＭが、ＭＣＭ配列を含むｍＲＮＡの導入後に発現されることが示されたが、図３は、外因性発現ＭＣＭが活性であるかどうかについて対処していない。この疑問に答えるために、ＭＣＭのｉｎ　ｖｉｔｒｏ活性アッセイを実施した。

【１３２４】

Ａ．発現

ＨｅＬａ細胞にヒトＭＣＭ（配列番号２４９）またはＧＦＰ対照（配列番号２６９をコード）を含むｍＲＮＡ製剤をトランスフェクトし、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎ　２０００を用いてトランスフェクトし、上の実施例１４に記載のとおりに溶解した。比較する目的で、マウス肝臓ミトコンドリア抽出物も上の実施例１３に記載するとおりに調製した。

【１３２５】

Ｂ．活性アッセイ

外因性ＭＣＭが機能し得るどうかを評価するために、トランスフェクトしたＨｅＬａ細胞溶解物を酵素活性源として使用してｉｎ　ｖｉｔｒｏ活性アッセイを実施した。初めに、タンパク質１３２μｇを含有する６０μＬの溶解物を３０μＬのＭＣＭ補酵素アドコバリミン（蒸留水中１ｍＭ）と３７℃で５分間混合した。次いで、同量のＤＬ－２－［メチル－１４Ｃ］－メチルマロニルＣｏＡ（５０～６０ｍＣｉ／ｍｍｏｌ、Ｃａｔ　ＡＲＣ０８４７、Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｒａｄｉｏｌａｂｅｌｅｄ　Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ）を各反応物に加え、これを更に３７℃で１０分間インキュベートした。５０μＬの１００ｇ／ＬＴＣＡを添加して反応を停止し、ボルテックスにかけた。次いで、反応チューブを１３，０００ｇで１分間、遠心分離し、上清を、ＨＰＬＣによる分離及び定量を使用して、［１４Ｃ］－スクシニルＣｏＡの存在について解析した。具体的には、各活性反応物の上清２０μＬを、クォータナリポンプ、マルチサンプラー、サーモスタットカラムコンパートメント、Ｐｏｒｏｓｈｅｌｌ　ＥＣ－Ｃ１８　１２０　ＨＰＬＣカラム及びＯｐｅｎＬＡＢ　Ｃｈｒｏｍａｔｏｇｒａｐｈｙ　Ｄａｔａ　Ｓｙｓｔｅｍによって制御される放射照度検出器を備えるＨＰＬＣシステム（全て製造元の推奨に従って使用）を使用して解析した。溶出は、直線メタノールグラジエント：０～１５分（溶媒Ａ：９５％　１００ｍＭ酢酸／１００ｍＭリン酸ナトリウム緩衝液（ｐＨ７．０））及び１５～２５分（５％の１８％ｖ／ｖメタノール／水溶液を含む９５％溶媒Ａ）、流量０．５ｍＬ／分で行った。

【１３２６】

図４は、対照のトランスフェクトＨｅＬａ細胞において検出されたＭＣＭ活性が非常に低いか全くなかったことを示している。しかし、図４はまた、ｈＭＣＭをコードするｍＲＮＡによるトランスフェクションが、ほぼ０．２ｍＭ／分／ｍｇのＭＣＭ活性をもたらしたことも示している。ｈＭＣＭをコードするｍＲＮＡによるトランスフェクションによって生成された細胞溶解物のＭＣＭ活性は、マウス肝臓ミトコンドリア抽出物において観察された活性のほぼ半分であった。

【１３２７】

実施例１６．ＭＣＭのｉｎ　ｖｉｔｒｏ発現の測定

正常対照（ＮＨＤＦ）及びＭＭＡ患者（ＧＭ５０及びＧＭ１６７３）に由来するＨｅｐａ１－６細胞及び線維芽細胞の外因性ＭＣＭを発現する能力について試験した。

【１３２８】

ヒトＭＣＭ（配列番号２４９）、マウスＭＣＭ（配列番号２５０）またはＧＦＰ対照（配列番号２６９をコード）を含むｍＲＮＡ製剤を、標準プロトコルを使用するエレクトロポレーションによって、細胞にトランスフェクトした。各構築物を個別に試験した。２４時間のインキュベーション後、細胞を溶解し、各溶解物中のタンパク質濃度をＢＣＡアッセイによって測定した。ＭＣＭの発現を分析するために、各溶解物（２６μｇ）の同等のロードをローディングバッファーで調製し、標準的なウェスタンブロット分析に供した。ＭＣＭの検出のために使用した抗体は、希釈１：１０００の抗メチルマロニルＣｏＡムターゼ（マウスモノクローナル；抗ＭＵＴ　ＴＲＵＥＭＡＢ抗体クローンＯＴＩ２Ｃ８、ＯｒｉＧｅｎｅ（登録商標））であった。ロード対照の検出のために使用した抗体は、抗シト

ラーゼシンターゼ（ウサギポリクローナル、ＭＡ５－１７６２５、Ｐｉｅｒｃｅ（登録商標））であった。

【１３２９】

図５は、ヒトＭＣＭ配列（配列番号２４９）を含有する製剤の導入が、対照構築物をトランスフェクトした細胞に比べて、正常ヒト細胞及びＭＭＡ患者由来細胞において、ＭＣＭ発現のレベルを大幅に増加させたことを示している。ｈＭＣＭをコードするｍＲＮＡの導入後に観察されたＭＣＭ発現レベルの増加は、ｈＭＣＭをコードするｍＲＮＡをトランスフェクトした細胞の図５におけるＭＣＭバンドの出現に反映されている。マウスＭＣＭ（配列番号２５０）によるトランスフェクション後には、ＭＣＭレベルに有意差は認められなかったが、これは、ＭＣＭ抗体とヒト形態の酵素のみの特異的相互作用に起因し得ると思われる。

【１３３０】

図６Ａ～６Ｄは、ｅＧＦＰまたはＭＣＭ ｍＲＮＡをトランスフェクトしたヒト線維芽細胞におけるＭＣＭとミトコンドリアの共局在を示す。ミトコンドリアにおけるｍＲＮＡコードｈＭＣＭの局在を調べるために、１×１０６個のＭＣＭ欠失患者線維芽細胞（ＧＭ０１６７３）に１μｇのｈＭＣＭ ｍＲＮＡをトランスフェクトした。トランスフェクションから２４時間後、細胞を２００ｎＭ Ｍｉｔｏ Ｔｒａｃｋｅｒ Ｒｅｄ ＣＭＸＲｏｓ（Ｍ７５１２、ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）とともに３０分間インキュベートしてミトコンドリアを表し、抗ＭＣＭマウスｍＡｂ（ＴＡ５０６８７３、Ｏｒｉｇｅｎｅ）で染色して細胞局在を調べた。図６Ａ及び６Ｃは、ｅＧＦＰをコードするｍＲＮＡをトランスフェクトした患者由来線維芽細胞から得た画像である。図６Ｂ及び６Ｄは、ｈＭＣＭをコードするｍＲＮＡをトランスフェクトした患者由来線維芽細胞から得た画像である。ＭＣＭとミトコンドリアの共局在が観察されたことから、発現されたＭＣＭタンパク質は、ミトコンドリアの内部に存在することが示唆される。

【１３３１】

実施例１７．ＭＣＭのｉｎ ｖｉｔｒｏ活性の測定

Ａ．発現

正常ヒト対照（ＮＨＤＦ）及びＭＭＡ患者（ＧＭ５０及びＧＭ１６７３）に由来するＨｅｐａ１－６細胞及び線維芽細胞を培養した。ヒトＭＣＭ（配列番号２４９）、マウスＭＣＭ（配列番号２５０）またはＧＦＰ対照（配列番号２６９をコード）を含むｍＲＮＡ製剤を、標準プロトコルを使用するエレクトロポレーションによって、細胞にトランスフェクトした。

【１３３２】

Ｂ．活性アッセイ

外因性ＭＣＭが機能し得るどうかを評価するために、トランスフェクトした細胞溶解物を酵素活性源として使用してｉｎ ｖｉｔｒｏ活性アッセイを実施した。初めに、タンパク質１００μｇを含有する６０μＬの溶解物を３０μＬのＭＣＭ補酵素アドコバリミン（蒸留水中１ｍＭ）と３７℃で５分間混合した。次いで、同量のＤＬ－２－［メチル－１４Ｃ］－メチルマロニルＣｏＡ（５０～６０ｍＣｉ／ｍｍｏｌ、Ｃａｔ ＡＲＣ０８４７、Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｒａｄｉｏｌａｂｅｌｅｄ Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ）を各反応物に加え、これを更に３７℃で１０分間インキュベートした。５０μＬの１００ｇ／ＬＴＣＡを添加して反応を停止し、ボルテックスにかけた。次いで、反応チューブを１３，０００ｇで１分間、遠心分離し、上清を、ＨＰＬＣによる分離及び定量を使用して、［１４Ｃ］－スクシニルＣｏＡの存在について解析した。具体的には、各活性反応物の上清２０μＬを、クォータナリポンプ、マルチサンプラー、サーモスタットカラムコンパートメント、Ｐｏｒｏｓｈｅｌｌ ＥＣ－Ｃ１８ １２０ ＨＰＬＣカラム及びＯｐｅｎＬＡＢ Ｃｈｒｏｍａｔｏｇｒａｐｈｙ Ｄａｔａ Ｓｙｓｔｅｍによって制御される放射照度検出器を備えるＨＰＬＣシステム（全て製造元の推奨に従って使用）を使用して解析した。溶出は、直線メタノールグラジエント：０～１５分（溶媒Ａ：９５％ １００ｍＭ酢酸／１００ｍＭリン酸ナトリウム緩衝液（ｐＨ７．０））及び１５～２５分（５％の１８％ｖ／ｖメタノール／

水溶液を含む９５％溶媒Ａ）、流量０．５ｍＬ／分で行った。
【１３３３】
図７は、各試験細胞株について、マウスＭＣＭまたはヒトＭＣＭのいずれかをコードしているｍＲＮＡによるトランスフェクションが、全ての試験細胞種において、ＭＣＭ活性のレベルが増加したことを示している。したがって、このデータは、ＭＣＭをコードするｍＲＮＡのトランスフェクションが、Ｈｅｐａ１－６細胞、正常ヒト対象由来線維芽細胞及びＭＭＡ患者由来線維芽細胞において、活性ＭＭ酵素の発現をもたらすことを実証している。更に、ヒトＭＣＭは、Ｈｅｐａ１－６細胞にトランスフェクトしたとき、マウスＭＣＭよりもＭＣＭ活性を大きく増加させた。
【１３３４】
実施例１８．ＭＣＭのｉｎ　ｖｉｖｏ発現の増加
ＭＣＭ含有ｍＲＮＡがｉｎ　ｖｉｖｏでＭＣＭ発現を促進する能力を評価するために、ヒトＭＣＭ（配列番号２４９）をコードするｍＲＮＡをＣ５７Ｂ／Ｌ６マウスに導入した。Ｃ５７Ｂ／Ｌ６マウスに対照ｍＲＮＡ（ＮＴ－ＦＩＸ）またはｈＭＣＭ　ｍＲＮＡのいずれかを０．５ｍｇ／ｋｇで静脈内注射した。ｍＲＮＡは、マウスへの送達用に、脂質ナノ粒子中に製剤化した。マウスを２４時間または４８時間後に　　殺し、肝臓溶解物中のＭＣＭタンパク質レベルをキャピラリー電気泳動（ＣＥ）によって決定した。ローディングコントロールとして使用するために、クエン酸シンターゼ発現を調べた。対照のＮＴ－ＦＩＸ注射の場合、マウス４匹を各時点について試験した。ｈＭＣＭ　ｍＲＮＡ注射の場合、マウス６匹を各時点について試験した。
【１３３５】
図８Ａ及び８Ｂに示されるように、ＭＣＭ発現は、ヒトＭＣＭをコードするｍＲＮＡを注射した全てのマウスで劇的に増加した。ＭＣＭ発現は、２４時間の時点でピークに達し、４８時間でも対照マウスより依然として高かった。各実験条件のマウス間で観察された変動は相対的に低レベルであり、ＭＣＭをコードするｍＲＮＡによる処置により、ＭＣＭの発現を確実に誘導することができることを示している。
【１３３６】
実施例１９．ヒトＭＣＭ変異体構築物
本開示によれば、ポリヌクレオチドは、ヒトＭＣＭをコードする連結されたヌクレオシドの少なくとも第１の領域を含み得る。本開示の例示的なヒトＭＣＭタンパク質配列が、上の表３に列挙されている。
【１３３７】
実施例２０．ＭＣＫマウスモデルにおけるＭＭＡレベル及び体重変化
ＭＭＡ（Ｍｕｔ－／－；ＴｇＩＮＳ－ＭＣＫ－Ｍｕｔ）のＭＣＫマウスモデルは、文献で知られており、ＭＣＭの基質結合ポケットをコードするＭＣＭアレルのエクソン３を欠いている。Ｍａｎｏｌｉ　２０１３（ＰＮＡＳ　１１０（３３）：１３５５２－１３５５７（２０１３）；及びＨａｒｒｉｎｇｔｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，“Ｓｔａｂｌｅ　Ｉｓｏｔｏｐｅ　Ｂｒｅａｔｈ　Ｔｅｓｔｓ　ｔｏ　Ａｓｓｅｓｓ　Ｍｅｔａｂｏｌｉｔｅ　Ｆｌｕｘ　ｉｎ　Ｍｅｔｈｙｌｍａｌｏｎｉｃ　Ａｃｉｄｅｍｉａ（ＭＭＡ）”，Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｓｏｃｉｅｔｙ　ｏｆ　Ｈｕｍａｎ　Ｇｅｎｅｔｉｃｓ，Ａｂｓｔｒａｃｔ，２０１４（これらの全体を参照により本明細書に援用する）。ＭＣＭノックアウトマウスは、浸透度が半分の致死性新生児型の表現型を示し、ほとんどのマウスが新生児期初期に死亡する。このマウスモデルは、ＷＯ２０１４／１４３８８４Ａ２に記載されており、その全体を参照により本明細書に援用する。ノックアウトに関連する表現型が極度であると試験が難しくなるので、研究者らは、ヒトＭＭＡに関連する突然変異を模倣する変異体の組織特異的発現または発現によるトランスジェニック機能回復によって、部分的に機能回復したＭＣＭノックアウトマウスを作製した。例えば、筋肉特異的クレアチンキナーゼプロモーターの制御下で、ノックアウトバックグラウンドでＭＣＭを発現するトランスジェニックマウス（「ＭＣＫマウス」）は、生存し続けるが、重度の代謝性混乱及び成長異常を依然として示す。
【１３３８】

ヒトＭＣＭをコードするｍＲＮＡの有効性をＭＭＡ（Ｍｕｔ－／－；ＴｇＩＮＳ－ＭＣＫ－Ｍｕｔ）のＭＣＫマウスモデルで評価した（Ｎ＝３～４）。ＭＣＫマウスに対照ｍＲＮＡ（ＮＴ－ＦＩＸ）またはコドン最適化ヒトＭＣＭ　ｍＲＮＡのいずれかを０．１６ｍｇ／ｋｇで静脈内注射した。ＭＣＭ　ｍＲＮＡ（配列番号７３４、図９）を０．１６ｍｇ／ｋｇで５回注射し、ＭＣＭ　ｍＲＮＡ（配列番号７３５、図１０）を０．２ｍｇ／ｋｇで２回注射した。ｍＲＮＡは、マウスへの尾静脈注射送達用に、脂質ナノ粒子（化合物１８）中に製剤化した。血漿を週２回、投与後３日目及び６日目に採取した。血漿中ＭＭＡをＬＣ－ＭＳ／ＭＳによって決定した。体重を投与時に週２回測定した。マウスは、本試験の終了時に　　殺せず、他の試験に使用した。３回目の予定注射時（１５日目）に、これまで対照ｍＲＮＡを投与していたマウスの１匹をｈＭＣＭ　ｍＲＮＡの投与に変更した。対照ｍＲＮＡを投与した他のマウスは死亡した。この試験は、メチルマロン酸血症（ＭＭＡ－ｅｍｉａ）の動物モデルにおいて、ｈＭＣＭ　ｍＲＮＡの反復静脈内投与が生化学的異常及び成長異常を正したことを示した。

【１３３９】

骨格筋中のＭＣＭ発現は、ＭＣＫマウスを新生児致死性から救うものであるが、これらのマウスは、メチルマロン酸血症患者において観察される臨床的特徴に類似する重度の代謝性混乱及び成長遅延を示す。本実施例において、化合物１８のＬＮＰに封入したｈＭＣＭ　ｍＲＮＡ（ｍｏ５Ｕで完全に修飾）の反復ＩＶ投与について調査し、ｍＲＮＡ治療法が生化学的異常及び成長異常を正すことができるかどうか決定した。ｈＭＣＭ　ｍＲＮＡ（配列番号７３４をコード）またはビヒクル対照（翻訳されない第ＩＸ因子、ＮＴＦＩＸ）ｍＲＮＡ　０．１６ｍｇ／ｋｇのＩＶ注射をＭＣＫマウスに毎週投与した。ｈＭＣＭ　ｍＲＮＡ注射を受けたＭＣＫマウスは、処置期間全体を通して、各投与後３日目及び６日目に血漿中ＭＭＡレベルの減少を示した（図１６Ａ）。重要なことに、処置したＭＣＫマウスは、体重増加も示し、血漿中ＭＭＡレベルの減少と相関した（図１６Ｂ）。対照的に、ビヒクルｍＲＮＡ対照（ＮＴＦＩＸ）を投与したＭＣＫマウスは、２回の投与後に、血漿中ＭＭＡレベルの減少も体重の増加も示さなかった（図１６Ａ）。実際、ＮＴＦＩＸ注射の２回のＩＶ投与後、ＭＣＫマウスの１匹は、おそらく代謝代償不全により死亡したが、死因は不明である。ＭＣＫマウスの更なる欠損を示すために、ビヒクル対照（ＮＴＦＩＸ）ｍＲＮＡで処置したマウスをｈＭＣＭ　ｍＲＮＡ治療法に切り替えた。興味深いことに、ＭＣＫマウスがｈＭＣＭ　ｍＲＮＡ処置を受け始めると、このマウスの血漿中ＭＭＡレベルが、３日以内に、８３５μＭから１５３μＭに急速に減少した（図１６Ａ）。更に、このマウスは、ｈＭＣＭ　ｍＲＮＡ治療法に切り替えた後、たった１週間で、体重が４．８ｇ増えた。５回のＩＶ投与後、ＭＣＫマウスに１０日間のウォッシュアウト期間を与えた（図１６Ｂ）。興味深いことに、これらのマウスにおいて、最後のｈＭＣＭ　ｍＲＮＡ注射から１０日後に、血漿ＭＭＡの９５５＋／－ＳＤμＭへの部分的なリバウンドがあった（図１６Ａ）。更に、このウォッシュアウト期間中、６日目～１０日目に、これらのマウスで体重の減少が観察された（０．１３＋／－ＳＤ～２．８＋／－ＳＤｇ）（図１６Ｂ）。１０日のウォッシュアウト後、ＭＣＫマウスにｈＭＣＭ　ｍＲＮＡ（配列番号７３４をコード）０．２ｍｇ／ｋｇ　ＩＶを再投与すると、４日で、血漿中ＭＭＡレベルは、２２６＋／－μＭに減少し、体重は、１．３８＋／－ｇから３．８１＋／－ｇに増加した。これらのデータは、ＬＮＰ製剤化ｈＭＣＭ　ｍＲＮＡが、より重度のＭｕｔ０亜型のこのメチルマロン酸血症マウスモデルにおいて、血漿中ＭＭＡレベルを下げるのに効果的であり、同時に体重を増加させることを示している。

【１３４０】

実施例２１．正常マウス及びヒト肝臓における内因性ＭＣＭと比較した、コドン最適化ＭＣＭヒトｍＲＮＡを投与した野生型マウスの肝臓中のＭＣＭ発現

ｉｎ　ｖｉｖｏでのＭＣＭ発現を評価するために、コドン最適化ＭＣＭヒトｍＲＮＡ（配列番号７３４）を野生型ＣＤ１マウス中に導入した。コドン最適化ＭＣＭ　ｍＲＮＡ（配列番号７３４）を０．２ｍｇ／ｋｇの単回投与でＣＤ１マウスに静脈内注射した。ｍＲＮＡは、マウスへの尾静脈注射送達用に、脂質ナノ粒子（化合物１８）中に製剤化した（Ｎ

＝３）。マウスを投与から２４時間後に　　殺し、肝臓溶解物中のＭＣＭタンパク質レベルをＬＣ－ＭＳ／ＭＳによって決定した。図１７に示されるように、野生型マウスに０．２ｍｇ／ｋｇを投与すると、ヒト及び正常マウス肝臓で認められる内因性ＭＣＭよりも高い、ヒトＭＣＭの豊富な発現が生じた。

【１３４１】

実施例２２．コドン最適化ＭＣＭ　ｍＲＮＡを投与したマウスの肝臓におけるＭＣＭ発現

ＬＮＰは、ｈＭＵＴ　ｍＲＮＡを封入し、ｍＲＮＡを肝臓に分布させ、続いて、ｍＲＮＡは、その機能性タンパク質に翻訳される。ｍＲＮＡ及びタンパク質生成物の半減期は、ｍＲＮＡ系治療薬の薬物動態に関する重要な決定因子である。ｈＭＵＴ　ｍＲＮＡ、ＬＮＰ及びコードされたＭＵＴタンパク質の動力学を把握するために、野生型ＣＤ１マウスでＰＫ試験を実施した。マウスには、ｈＭＵＴ　ｍＲＮＡまたはビヒクル対照（ＮＴＦＩＸ）ｍＲＮＡ　０．５ｍｇ／ｋｇを単回ＩＶボーラスで投与した。これらのデータは、投与２時間後、ＬＮＰが肝臓で９３９ｎｇ／ｇ検出され、６時間でＬＮＰ濃度はほぼ９８．５％に減少したことを示した（図１８Ａ）。１６時間で、ＬＮＰ濃度は肝臓で検出できないことから、ＬＮＰは極めて分解性であり、肝臓で迅速に除去されることが示唆される。図１８Ｂに示されるように、ｈＭＵＴ　ｍＲＮＡも同様に迅速に除去され、単回ＩＶ　ｈＭＵＴ　ｍＲＮＡ投与から６時間後、ｈＭｕｔ　ｍＲＮＡレベルが急激に低下した（図１８Ｂ）。９８％を超えるＭｕｔ　ｍＲＮＡが、投与から４８時間後に除去された。対照的に、ヒトＭＵＴタンパク質は、迅速に発現され、極めて長い半減期を示した（図１８Ｃ）。ヒトＭＵＴタンパク質は、ｈＭＵＴ　ＩＶ　ｍＲＮＡ投与後２時間、検出可能であり、１６時間でピークに達する（図１８Ｃ）。これらのデータは、ヒトＭｕｔの半減期は、発現した場合、およそ１．６日であることを示唆した。データは、肝臓のｍＲＮＡレベルの減少を示し、約２日でベースラインのレベルに達する。ＭＣＭをコードするｍＲＮＡの単回投与後５日までのＭＣＭタンパク質の持続的発現は、ヒトにおける治療上有効な用量を達成するには週１回投与が潜在的に許容される投与レジメンであるＭＭＡ患者の治療において、潜在的利点を示す。

【１３４２】

実施例２３．脂質ナノ粒子の定量化ならびに腎臓、肝臓及び脾臓の分析

脂質ナノ粒子の定量、腎臓のｉｎ　ｓｉｔｕハイブリダイゼーション及び脾臓のｂＤＮＡに関するｉｎ　ｖｉｖｏ分析を評価する。コドン最適化ＭＣＭ　ｍＲＮＡ（配列番号７３５）をＣＤ１マウスに投与する。ＣＤ１マウスに対照ｍＲＮＡ（ＮＴ－ＦＩＸ）またはコドン最適化ＭＣＭ　ｍＲＮＡのいずれかを０．５ｍｇ／ｋｇで静脈内注射する。ｍＲＮＡは、マウスへの尾静脈注射送達用に、脂質ナノ粒子（化合物１８）中に製剤化した。２、６、１６、２４、４８、７２、１２０または１６８時間後にマウスを　　殺する（Ｎ＝３／時点）。初期の時点（２、６、及び１６時間）で脂質ナノ粒子を定量する。腎臓のＩＳＨならびに肝臓及び脾臓のｂＤＮＡを分析して、無処置のＣＤ１マウスと比較する。

【１３４３】

実施例２４．ＭＣＭをコードするｍＲＮＡのｉｎ　ｖｉｖｏ送達

ｉｎ　ｖｉｖｏでＭＣＭを送達する方法を評価するために、コドン最適化ＭＣＭヒトｍＲＮＡ、すなわち、ｍＲＮＡ１、ｍＲＮＡ２、ｍＲＮＡ３、ｍＲＮＡ４及びｍＲＮＡ５（それぞれ配列番号７７５、７７６、７７７、７３４及び７７８）またはビヒクル対照（翻訳されない第ＩＸ因子、ＮＴＦＩＸ）ｍＲＮＡを野生型ＣＤ１マウスに導入した。ｍＲＮＡを０．２ｍｇ／ｋｇの単回投与でマウスに静脈内注射した。ｍＲＮＡは、マウスへの尾静脈注射送達用に製剤化した（１製剤当たりＮ＝３）。組成物は、ＭＣ３または化合物１８のいずれを用いて製剤化した。マウスを投与から２４時間後に　　殺し、肝臓溶解物中のＭＣＭタンパク質レベルをウェスタンブロットによって決定した。図１９Ａは、各溶解物を同量ローディングしたウェスタンブロットである。図１９Ｂは、図１９Ａのウェスタンブロットにおける発現パターンの定量である。図１９Ａ及び１９Ｂに示されるように、ＭＣ３製剤と化合物１８製剤の両製剤は、ＭＣＭをコードするｍＲＮＡの送達及び発現の促進に有効であった。ＭＣＭをコードするｍＲＮＡを野生型マウスに送達すると、ヒトＭＣＭ

の発現が、対照マウスにおける内因性ＭＣＭの発現よりもはるかに高いレベルで生じた。

【１３４４】

実施例２４．ｉｎ　ｖｉｖｏにおけるＭＭＡレベル及びＭＣＫマウスにおける体重の影響

ｈＭＣＭ　ｍＲＮＡ　０．２ｍｇ／ｋｇのＩＶ注射をＭＣＫマウス２匹に毎週投与し、他の２匹には、ビヒクル対照（翻訳されない第ＩＸ因子、ＮＴＦＩＸ）ｍＲＮＡを０．２ｍｇ／ｋｇで投与した。試験には、２回の投与を含める。ｈＭＣＭ　ｍＲＮＡ注射を受けたＭＣＫマウスは、各投与後３日目に血漿中ＭＭＡレベルの減少を示した（図２０Ａ）。重要なことに、処置したＭＣＫマウスは、著しい体重増加も示し、血漿中ＭＭＡレベルの減少と相関した。図２０Ｂを参照されたい。対照的に、ビヒクルｍＲＮＡ対照（ＮＴＦＩＸ）を投与したＭＣＫマウスは、２回の投与後に、血漿中ＭＭＡレベルの著しい減少も体重の増加も示さなかった。ビヒクル対照を投与したＭＣＫマウスの１匹が死亡した。

【１３４５】

ある特定の例示的なｍＲＮＡ配列を以下に示す。

【表５４】

ｈＭＣＭ　ｍＲＮＡ（配列番号７６９）	ＴＣＡＡＧＣＴＴＴＴＧＧＡＣＣＣＴＣＧＴＡＣＡＧＡＡＧＣＴＡＡＴ ＡＣＧＡＣＴＣＡＣＴＡＴＡＧＧＧＡＡＡＴＡＡＧＡＧＡＧＡＡＡＡＧ ＡＡＧＡＧＴＡＡＧＡＡＧＡＡＡＴＡＴＡＡＧＡＧＣＣＡＣＣＡＴＧＣ ＴＧＣＧＧＧＣＣＡＡＧＡＡＣＣＡＧＣＴＧＴＴＣＣＴＧＣＴＧＡＧＣ ＣＣＴＣＡＣＴＡＣＣＴＧＣＧＧＣＡＧＧＴＧＡＡＧＧＡＧＡＧＣＡＧ ＣＧＧＣＡＧＣＣＧＧＣＴＧＡＴＣＣＡＧＣＡＧＣＧＧＣＴＧＣＴＧＣ ＡＣＣＡＧＣＡＧＣＡＧＣＣＣＣＴＧＣＡＣＣＣＣＧＡＧＴＧＧＧＣＣ ＧＣＣＣＴＧＧＣＣＡＡＧＡＡＧＣＡＧＣＴＧＡＡＧＧＧＣＡＡＧＡＡ ＣＣＣＣＧＡＧＧＡＣＣＴＧＡＴＣＴＧＧＣＡＣＡＣＧＣＣＣＧＡＧＧ ＧＣＡＴＣＡＧＣＡＴＣＡＡＧＣＣＣＣＴＧＴＡＣＡＧＣＡＡＧＣＧＧ ＧＡＣＡＣＣＡＴＧＧＡＣＣＴＧＣＣＣＧＡＧＧＡＧＣＴＧＣＣＣＧＧ ＣＧＴＧＡＡＧＣＣＣＴＴＣＡＣＣＣＧＧＧＧＣＣＣＣＴＡＣＣＣＣＡ ＣＣＡＴＧＴＡＣＡＣＣＴＴＣＣＧＧＣＣＣＴＧＧＡＣＣＡＴＣＣＧＧ ＣＡＧＴＡＣＧＣＣＧＧＣＴＴＣＡＧＣＡＣＣＧＴＧＧＡＧＧＡＧＡＧ ＣＡＡＣＡＡＧＴＴＣＴＡＣＡＡＧＧＡＣＡＡＣＡＴＣＡＡＧＧＣＣＧ ＧＣＣＡＧＣＡＧＧＧＣＣＴＧＡＧＣＧＴＧＧＣＣＴＴＣＧＡＣＣＴＧ ＧＣＣＡＣＣＣＡＣＣＧＧＧＧＣＴＡＣＧＡＣＡＧＣＧＡＣＡＡＣＣＣ ＡＣＧＧＧＴＧＣＧＧＧＧＣＧＡＣＧＴＧＧＧＣＡＴＧＧＣＣＧＧＣＧ ＴＧＧＣＣＡＴＣＧＡＣＡＣＣＧＴＧＧＡＧＧＡＣＡＣＣＡＡＧＡＴＣ ＣＴＧＴＴＣＧＡＣＧＧＣＡＴＣＣＣＴＣＴＧＧＡＧＡＡＧＡＴＧＡＧ ＣＧＴＧＡＧＣＡＴＧＡＣＣＡＴＧＡＡＣＧＧＣＧＣＣＧＴＧＡＴＣＣ ＣＣＧＴＧＣＴＧＧＣＣＡＡＣＴＴＣＡＴＣＧＴＧＡＣＣＧＧＣＧＡＧ ＧＡＧＣＡＧＧＧＣＧＴＧＣＣＣＡＡＧＧＡＧＡＡＧＣＴＧＡＣＣＧＧ ＣＡＣＣＡＴＣＣＡＧＡＡＣＧＡＣＡＴＣＣＴＧＡＡＧＧＡＧＴＴＣＡ ＴＧＧＴＧＣＧＧＡＡＣＡＣＣＴＡＣＡＴＣＴＴＣＣＣＴＣＣＣＧＡＧ ＣＣＣＡＧＣＡＴＧＡＡＧＡＴＣＡＴＣＧＣＣＧＡＣＡＴＣＴＴＣＧＡ ＧＴＡＣＡＣＣＧＣＣＡＡＧＣＡＣＡＴＧＣＣＣＡＡＧＴＴＣＡＡＣＡ ＧＣＡＴＣＡＧＣＡＴＣＡＧＣＧＧＣＴＡＣＣＡＣＡＴＧＣＡＧＧＡＧ ＧＣＣＧＧＣＧＣＣＧＡＣＧＣＣＡＴＣＣＴＧＧＡＧＣＴＧＧＣＣＴＡ ＣＡ

【表５５】

	CCCTGGCCGACGGCCTGGAGTACAGCCGGACC GGCCTGCAGGCCGGCCTGACCATCGACGAGTT CGCGCCCCGGCTGAGCTTCTTCTGGGGCATCG GCATGAACTTCTACATGGAGATCGCCAAGATG CGGGCCGGCCGGCGGCTGTGGGCCCACCTGAT CGAGAAGATGTTCCAGCCCAAGAACAGCAAGA GCCTGCTGCTGCGGGCCCACTGCCAGACCAGC GGCTGGAGCCTGACCGAGCAGGACCCCTACAA CAACATCGTGCGGACCGCCATCGAGGCCATGG CCGCCGTGTTCGGCGGCACCCAGAGCCTGCAC ACCAACAGCTTCGACGAGGCCCTGGGCCTGCC CACCGTGAAGAGCGCCCGGATCGCCCGGAACA CCCAGATCATCATCCAGGAGGAGAGCGGCATC CCCAAGGTGGCCGACCCCTGGGGCGGCAGCTA CATGATGGAGTGCCTGACCAACGACGTGTACG ACGCCGCCCTGAAGCTGATCAACGAGATCGAG GAGATGGGCGGCATGGCCAAGGCCGTGGCCGA GGGCATCCCCCAAGCTGCGGATCGAGGAGTGCG CCGCCCGGCGGCAGGCCCGGATCGACAGCGGC AGCGAGGTGATCGTGGGCGTGAACAAGTACCA GCTGGAGAAGGAGGACGCCGTGGAGGTGCTGG CCATCGACAACACCAGCGTGCGGAACCGGCAG ATCGAGAAGCTGAAGAAGATCAAGAGCAGCCG GGACCAGGCCCTGGCCGAGCGGTGCCTGGCCG CCCTGACCGAGTGCGCCGCCAGCGGCGACGGC AACATCCTGGCCCTGGCCGTGGACGCCAGCCG GGCCCGGTGCACCGTGGGCGAGATCACCGACG CCCTGAAGAAGGTGTTCGGCGAGCACAAGGCC AACGACCGGATGGTGAGCGGCGCCTACCGGCA GGAGTTCGGCGAGAGCAAGGAGATCACCAGCG

【表５６】

	CCATCAAGCGGGTGCACAAGTTCATGGAGCGG GAGGGCCGGCGGCCCCGGCTGCTGGTGGCCAA GATGGGCCAGGACGGCCACGACCGGGGCGCCA AGGTGATCGCCACCGGCTTCGCCGACCTGGGC TTCGACGTGGACATCGGCCCACTGTTCCAGAC GCCCCGGGAGGTGGCCCAGCAGGCCGTGGACG CCGACGTGCACGCCGTGGGCGTGAGCACCCTG GCCGCCGGCCACAAGACCCTGGTGCCCGAGCT GATCAAGGAGCTGAACAGCCTGGGCCGGCCCG ACATCCTGGTGATGTGCGGCGGCGTGATCCCG CCCCAGGACTACGAGTTCCTGTTCGAGGTGGG CGTGAGCAACGTGTTCGGCCCCGGCACCCGGA TCCCCAAGGCCGCCGTGCAGGTGCTGGACGAC ATCGAGAAGTGCCTGGAGAAGAAGCAGCAGAG CGTGTGATAATAGTCCATAAAGTAGGAAACAC TACAGCTGGAGCCTCGGTGGCCATGCTTCTTG CCCCTTGGGCCTCCCCCCAGCCCCTCCTCCCC TTCCTGCACCCGTACCCCCCGCATTATTACTC ACGGTACGAGTGGTCTTTGAATAAAGTCTGAG TGGGCGGC

10

20

30

40

50

【表５７】

ｈＭＣＭ　ｍＲＮＡ（配列番号７７０）	ＴＣＡＡＧＣＴＴＴＴＧＧＡＣＣＣＴＣＧＴＡＣＡＧＡＡＧＣＴＡＡＴ ＡＣＧＡＣＴＣＡＣＴＡＴＡＧＧＧＡＡＡＴＡＡＧＡＧＡＧＡＡＡＡＧ ＡＡＧＡＧＴＡＡＧＡＡＧＡＡＡＴＡＴＡＡＧＡＧＣＣＡＣＣＡＴＧＣ ＴＧＣＧＧＧＣＣＡＡＧＡＡＣＣＡＧＣＴＧＴＴＣＣＴＧＣＴＧＡＧＣ ＣＣＣＣＡＣＴＡＣＣＴＧＣＧＧＣＡＧＧＴＧＡＡＧＧＡＧＡＧＣＡＧ ＣＧＧＣＡＧＣＣＧＧＣＴＧＡＴＣＣＡＧＣＡＧＣＧＣＣＴＣＣＴＣＣ ＡＣＣＡＧＣＡＧＣＡＧＣＣＣＣＴＣＣＡＣＣＣＣＧＡＧＴＧＧＧＣＣ ＧＣＣＣＴＣＧＣＣＡＡＧＡＡＧＣＡＧＣＴＣＡＡＧＧＧＣＡＡＧＡＡ ＣＣＣＣＧＡＧＧＡＣＣＴＣＡＴＣＴＧＧＣＡＣＡＣＣＣＣＣＧＡＧＧ ＧＣＡＴＣＴＣＣＡＴＣＡＡＧＣＣＣＣＴＣＴＡＣＴＣＣＡＡＧＣＧＣ ＧＡＣＡＣＣＡＴＧＧＡＣＣＴＣＣＣＣＧＡＧＧＡＧＣＴＣＣＣＣＧＧ ＣＧＴＣＡＡＧＣＣＣＴＴＣＡＣＣＣＧＣＧＧＣＣＣＣＴＡＣＣＣＣＡ ＣＣＡＴＧＴＡＣＡＣＣＴＴＣＣＧＣＣＣＣＴＧＧＡＣＣＡＴＣＣＧＣ ＣＡＧＴＡＣＧＣＣＧＧＣＴＴＣＴＣＣＡＣＣＧＴＣＧＡＧＧＡＧＴＣ ＣＡＡＣＡＡＧＴＴＣＴＡＣＡＡＧＧＡＣＡＡＣＡＴＣＡＡＧＧＣＣＧ ＧＣＣＡＧＣＡＧＧＧＣＣＴＣＴＣＣＧＴＣＧＣＣＴＴＣＧＡＣＣＴＣ ＧＣＣＡＣＣＣＡＣＣＧＣＧＧＣＴＡＣＧＡＣＴＣＣＧＡＣＡＡＣＣＣ ＣＣＧＣＧＴＣＣＧＣＧＧＣＧＡＣＧＴＣＧＧＣＡＴＧＧＣＣＧＧＣＧ ＴＣＧＣＣＡＴＣＧＡＣＡＣＣＧＴＣＧＡＧＧＡＣＡＣＣＡＡＧＡＴＣ ＣＴＣＴＴＣＧＡＣＧＧＣＡＴＣＣＣＣＣＴＣＧＡＧＡＡＧＡＴＧＴＣ ＣＧＴＣＴＣＣＡＴＧＡＣＣＡＴＧＡＡＣＧＧＣＧＣＣＧＴＣＡＴＣＣ ＣＣＧＴＣＣＴＣＧＣＣＡＡＣＴＴＣＡＴＣＧＴＣＡＣＣＧＧＣＧＡＧ ＧＡＧＣＡＧＧＧＣＧＴＣＣＣＣＡＡＧＧＡＧＡＡＧＣＴＣＡＣＣＧＧ ＣＡＣＣＡＴＣＣＡＧＡＡＣＧＡＣＡＴＣＣＴＣＡＡＧＧＡＧＴＴＣＡ ＴＧＧＴＣＣＧＣＡＡＣＡＣＣＴＡＣＡＴＣＴＴＣＣＣＣＣＣＣＧＡＧ ＣＣＣＴＣＣＡＴＧＡ

【表５８】

	AGATCATCGCCGACATCTTCGAGTACACCGCC AAGCACATGCCCAAGTTCAACTCCATCTCCAT CTCCGGCTACCACATGCAGGAGGCCGGCGCCG ACGCCATCCTCGAGCTCGCCTACACCCTCGCC GACGGCCTCGAGTACTCCCGCACCGGCCTCCA GGCCGGCCTCACCATCGACGAGTTCGCCCCCC GCCTCTCCTTCTTCTGGGGCATCGGCATGAAC TTCTACATGGAGATCGCCAAGATGCGCGCCGG CCGCCGCCTCTGGGCCCACCTCATCGAGAAGA TGTTCCAGCCCAAGAACTCCAAGTCCCTCCTC CTCCGCGCCCACTGCCAGACCTCCGGCTGGTC CCTCACCGAGCAGGACCCCTACAACAACATCG TCCGCACCGCCATCGAGGCCATGGCCGCCGTC TTCGGCGGCACCCAGTCCCTCCACACCAACTC CTTCGACGAGGCCCTCGGCCTCCCCACCGTCA AGTCCGCCCGCATCGCCCGCAACACCCAGATC ATCATCCAGGAGGAGTCCGGCATCCCCAAGGT CGCCGACCCCCTGGGGCGGCTCCTACATGATGG AGTGCCTCACCAACGACGTCTACGACGCCGCC CTCAAGCTCATCAACGAGATCGAGGAGATGGG CGGCATGGCCAAGGCCGTCGCCGAGGGCATCC CCAAGCTCCGCATCGAGGAGTGCGCCGCCCGC CGCCAGGCCCCGCATCGACTCCGGCTCCGAGGT CATCGTCGGCGTCAACAAGTACCAGCTCGAGA AGGAGGACGCCGTCGAGGTCCTCGCCATCGAC AACACCTCCGTCCGCAACCGCCAGATCGAGAA GCTCAAGAAGATCAAGTCCTCCCGCGACCAGG CCCTCGCCGAGCGCTGCCTCGCCGCCCTCACC GAGTGCGCCGCCTCCGGCGACGGCAACATCCT CG

【表５９】

	CCCTCGCCGTCGACGCCTCCCGCGCCCGCTGC ACCGTCGGCGAGATCACCGACGCCCTCAAGAA GGTCTTCGGCGAGCACAAGGCCAACGACCGCA TGGTCTCCGGCGCCTACCGCCAGGAGTTCGGC GAGTCCAAGGAGATCACCTCCGCCATCAAGCG CGTCCACAAGTTCATGGAGCGCGAGGGCCGCC GCCCCCGCCTCCTCGTCGCCAAGATGGGCCAG GACGGCCACGACCGCGGCGCCAAGGTCATCGC CACCGGCTTCGCCGACCTCGGCTTCGACGTCG ACATCGGCCCCCTCTTCCAGACCCCCCGCGAG GTCGCCCAGCAGGCCGTCGACGCCGACGTCCA CGCCGTCGGCGTCTCCACCCTCGCCGCCGGCC ACAAGACCCTCGTCCCCGAGCTCATCAAGGAG CTCAACTCCCTCGGCCGCCCCGACATCCTCGT CATGTGCGGCGGCGTCATCCCCCCCCCAGGACT ACGAGTTCCTCTTCGAGGTCGGCGTCTCCAAC GTCTTCGGCCCCGGCACCCGCATCCCCAAGGC CGCCGTCCAGGTCCTCGACGACATCGAGAAGT GCCTCGAGAAGAAGCAGCAGTCCGTCTGATAA TAGGCTGGAGCCTCGGTGGCCATGCTTCTTGC CCCTTGGGCCTCCCCCCCAGCCCCTCCTCCCCT TCCTGCACCCGTACCCCCCCGCATTATTACTCA CGGTACGAGTGGTCTTTGAATAAAGTCTGAGT GGGCGGC

10

20

30

40

50

【表６０】

ｈＭＣＭ　ＯＲＦ（配列番号７７５）	ＡＴＧＴＴＡＡＧＡＧＣＴＡＡＧＡＡＴＣＡＧＣＴＴＴＴＴＴＴＡＣＴ ＴＴＣＡＣＣＴＣＡＴＴＡＣＣＴＧＡＧＧＣＡＧＧＴＡＡＡＡＧＡＡＴ ＣＡＴＣＡＧＧＣＴＣＣＡＧＧＣＴＣＡＴＡＣＡＧＣＡＡＣＧＡＣＴＴ ＣＴＡＣＡＣＣＡＧＣＡＡＣＡＧＣＣＣＣＴＴＣＡＣＣＣＡＧＡＡＴＧ ＧＧＣＴＧＣＣＣＴＧＧＣＴＡＡＡＡＡＧＣＡＧＣＴＧＡＡＡＧＧＣＡ ＡＡＡＡＣＣＣＡＧＡＡＧＡＣＣＴＡＡＴＡＴＧＧＣＡＣＡＣＣＣＣＧ ＧＡＡＧＧＧＡＴＣＴＣＴＡＴＡＡＡＡＣＣＣＴＴＧＴＡＴＴＣＣＡＡ ＧＡＧＡＧＡＴＡＣＴＡＴＧＧＡＣＴＴＡＣＣＴＧＡＡＧＡＡＣＴＴＣ ＣＡＧＧＡＧＴＧＡＡＧＣＣＡＴＴＣＡＣＡＣＧＴＧＧＡＣＣＡＴＡＴ ＣＣＴＡＣＣＡＴＧＴＡＴＡＣＣＴＴＴＡＧＧＣＣＣＴＧＧＡＣＣＡＴ ＣＣＧＣＣＡＧＴＡＴＧＣＴＧＧＴＴＴＴＡＧＴＡＣＴＧＴＧＧＡＡＧ ＡＡＡＧＣＡＡＴＡＡＧＴＴＣＴＡＴＡＡＧＧＡＣＡＡＣＡＴＴＡＡＧ ＧＣＴＧＧＴＣＡＧＣＡＧＧＧＡＴＴＡＴＣＡＧＴＴＧＣＣＴＴＴＧＡ ＴＣＴＧＧＣＧＡＣＡＣＡＴＣＧＴＧＧＣＴＡＴＧＡＴＴＣＡＧＡＣＡ ＡＣＣＣＴＣＧＡＧＴＴＣＧＴＧＧＴＧＡＴＧＴＴＧＧＡＡＴＧＧＣＴ ＧＧＡＧＴＴＧＣＴＡＴＴＧＡＣＡＣＴＧＴＧＧＡＡＧＡＴＡＣＣＡＡ ＡＡＴＴＣＴＴＴＴＴＴＧＡＴＧＧＡＡＴＴＣＣＴＴＴＡＧＡＡＡＡＡＡ ＴＧＴＣＡＧＴＴＴＣＣＡＴＧＡＣＴＡＴＧＡＡＴＧＧＡＧＣＡＧＴＴ ＡＴＴＣＣＡＧＴＴＣＴＴＧＣＡＡＡＴＴＴＴＡＴＡＧＴＡＡＣＴＧＧ ＡＧＡＡＧＡＡＣＡＡＧＧＴＧＴＡＣＣＴＡＡＡＧＡＧＡＡＡＣＴＴＡ ＣＴＧＧＴＡＣＣＡＴＣＣＡＡＡＡＴＧＡＴＡＴＡＣＴＡＡＡＧＧＡＡ ＴＴＴＡＴＧＧＴＴＣＧＡＡＡＴＡＣＡＴＡＣＡＴＴＴＴＴＣＣＴＣＣ ＡＧＡＡＣＣＡＴＣＣＡＴＧＡＡＡＡＴＴＡＴＴＧＣＴＧＡＣＡＴＡＴ ＴＴＧＡＡＴＡＴＡＣＡＧＣＡＡＡＧＣＡＣＡＴＧＣＣＡＡＡＡＴＴＴ ＡＡＴＴＣＡＡＴＴＴＣＡＡＴＴＡＧＴＧＧＡＴＡＣＣＡＴＡＴＧＣＡ ＧＧＡＡＧＣＡＧＧＧＧＣＴＧＡＴＧＣＣＡＴＴＣＴＧＧＡＧＣＴＧＧ ＣＣＴＡＴＡＣＴＴＴＡＧＣＡＧＡＴＧＧＡＴＴＧＧＡＧＴＡＣＴＣＴ ＡＧＧＡＣＴＧＧＡＣＴＣＣＡＧＧＣＴＧＧＣＣＴＧＡＣＡＡＴＴＧＡ ＴＧＡＡ

【表６１】

	TTTGCACCAAGGTTGTCTTTCTTCTGGGGAAT TGGAATGAATTTCTATATGGAAATAGCAAAGA TGAGAGCTGGTAGAAGACTCTGGGCTCACTTA ATAGAGAAAATGTTTCAGCCTAAAAACTCAAA ATCTCTTCTTCTAAGAGCACACTGTCAGACAT CTGGATGGTCACTTACTGAGCAGGATCCCTAC AATAATATTGTCCGTACTGCAATAGAAGCAAT GGCAGCAGTATTTGGAGGGACTCAGTCTTTGC ACACAAATTCTTTTGATGAAGCTTTGGGTTTG CCAACTGTGAAAAGTGCTCGAATTGCCAGGAA CACACAAATCATCATTCAAGAAGAATCTGGGA TTCCCAAAGTGGCTGATCCTTGGGGAGGTTCT TACATGATGGAATGTCTCACAAATGATGTTTA TGATGCTGCTTTAAAGCTCATTAATGAAATTG AAGAAATGGGTGGAATGGCCAAAGCTGTAGCT GAGGGAATACCTAAACTTCGAATTGAAGAATG TGCTGCCCGAAGACAAGCTAGAATAGATTCTG GTTCTGAAGTAATTGTTGGAGTAAATAAGTAC CAGTTGGAAAAAGAAGACGCTGTA

10

20

30

40

50

【表６２】

	GAAGTTCTGGCAATTGATAATACTTCAGTGCG AAACAGGCAGATTGAAAAACTTAAGAAGATCA AATCCAGCAGGGATCAAGCTTTGGCTGAACGT TGCCTTGCTGCACTAACCGAATGTGCTGCTAG CGGAGATGGAAATATCCTGGCTCTTGCAGTGG ATGCATCTCGGGCAAGATGTACAGTGGGAGAA ATCACAGATGCCCTGAAAAAGGTATTTGGTGA ACATAAAGCGAATGATCGAATGGTGAGTGGAG CATATCGCCAGGAATTTGGAGAAAGTAAAGAG ATAACATCTGCTATCAAGAGGGTTCATAAATT CATGGAACGTGAAGGTCGCAGACCTCGTCTTC TTGTAGCAAAAATGGGACAAGATGGCCATGAC AGAGGAGCAAAAGTTATTGCTACAGGATTTGC TGATCTTGGTTTTGATGTGGACATAGGCCCTC TTTTCCAGACTCCTCGTGAAGTGGCCCAGCAG GCTGTGGATGCGGATGTGCATGCTGTGGGCGT AAGCACCCTCGCTGCTGGTCATAAAACCCTAG TTCCTGAACTCATCAAAGAACTTAACTCCCTT GGACGGCCAGATATTCTTGTCATGTGTGGAGG GGTGATACCACCTCAGGATTATGAATTTCTGT TTGAAGTTGGTGTTTCCAATGTATTTGGTCCT GGGACTCGAATTCCAAAGGCTGCCGTTCAGGT GCTTGATGATATTGAGAAGTGTTTGGAAAAGA AGCAGCAATCTGTA

10

20

30

40

50

【表６３】

ｈＭＣＭ　ＯＲＦ（配列番号７７６）	ＡＴＧＣＴＧＡＧＧＧＣＣＡＡＧＡＡＣＣＡＧＣＴＧＴＴＴＣＴＣＣＴ ＧＴＣＧＣＣＣＣＡＣＴＡＣＣＴＧＡＧＧＣＡＧＧＴＧＡＡＧＧＡＧＴ ＣＣＴＣＣＧＧＣＡＧＣＡＧＧＣＴＣＡＴＴＣＡＧＣＡＧＡＧＧＣＴＧ ＴＴＧＣＡＣＣＡＧＣＡＧＣＡＧＣＣＣＣＴＧＣＡＣＣＣＡＧＡＧＴＧ ＧＧＣＣＧＣＣＣＴＣＧＣＣＡＡＧＡＡＧＣＡＧＣＴＧＡＡＧＧＧＧＡ ＡＧＡＡＣＣＣＣＧＡＧＧＡＣＣＴＧＡＴＣＴＧＧＣＡＴＡＣＧＣＣＣ ＧＡＧＧＧＴＡＴＣＴＣＣＡＴＡＡＡＡＣＣＣＣＴＣＴＡＣＡＧＴＡＡ ＧＡＧＧＧＡＣＡＣＣＡＴＧＧＡＣＣＴＧＣＣＣＧＡＧＧＡＡＣＴＧＣ ＣＣＧＧＣＧＴＧＡＡＧＣＣＧＴＴＣＡＣＧＣＧＧＧＧＣＣＣＡＴＡＣ ＣＣＣＡＣＣＡＴＧＴＡＣＡＣＣＴＴＣＣＧＧＣＣＧＴＧＧＡＣＣＡＴ ＣＡＧＧＣＡＡＴＡＣＧＣＣＧＧＣＴＴＣＡＧＣＡＣＣＧＴＧＧＡＧＧ ＡＧＡＧＣＡＡＣＡＡＧＴＴＣＴＡＣＡＡＡＧＡＣＡＡＣＡＴＣＡＡＡ ＧＣＣＧＧＴＣＡＧＣＡＡＧＧＧＣＴＧＡＧＣＧＴＡＧＣＣＴＴＣＧＡ ＣＣＴＧＧＣＣＡＣＣＣＡＣＡＧＧＧＧＣＴＡＣＧＡＣＴＣＣＧＡＣＡ ＡＣＣＣＣＡＧＧＧＴＧＣＧＣＧＧＣＧＡＣＧＴＧＧＧＣＡＴＧＧＣＣ ＧＧＣＧＴＧＧＣＣＡＴＣＧＡＣＡＣＣＧＴＧＧＡＡＧＡＣＡＣＣＡＡ ＧＡＴＣＣＴＣＴＴＣＧＡＣＧＧＣＡＴＣＣＣＣＣＴＧＧＡＡＡＡＧＡ ＴＧＴＣＣＧＴＧＴＣＣＡＴＧＡＣＣＡＴＧＡＡＣＧＧＧＧＣＣＧＴＴ ＡＴＡＣＣＧＧＴＧＣＴＧＧＣＣＡＡＣＴＴＣＡＴＡＧＴＣＡＣＣＧＧ ＣＧＡＧＧＡＧＣＡＧＧＧＧＧＴＣＣＣＧＡＡＧＧＡＧＡＡＧＴＴＡＡ ＣＣＧＧＣＡＣＧＡＴＴＣＡＧＡＡＣＧＡＣＡＴＣＣＴＧＡＡＡＧＡＧ ＴＴＣＡＴＧＧＴＧＡＧＧＡＡＣＡＣＣＴＡＴＡＴＣＴＴＣＣＣＣＣＣ ＣＧＡＧＣＣＣＴＣＣＡＴＧＡＡＡＡＴＣＡＴＣＧＣＣＧＡＣＡＴＣＴ ＴＣＧＡＧＴＡＣＡＣＣＧＣＧＡＡＧＣＡＣＡＴＧＣＣＣＡＡＧＴＴＣ ＡＡＣＴＣＣＡＴＣＡＧＣＡＴＣＴＣＣＧＧＡＴＡＴＣＡＣＡＴＧＣＡ ＧＧＡＡＧＣＣＧＧＣＧＣＣＧＡＣＧＣＣＡＴＣＣＴＧＧＡＧＣＴＧＧ ＣＣＴＡＣＡＣＣＣＴＧＧＣＧＧＡＣＧＧＡＣＴＧＧＡＧＴＡＣＡＧＣ ＣＧＣＡＣＧＧＧＣＣＴＧＣＡＧＧＣＧＧＧＣＣＴＧＡＣＣＡＴＡＧＡ ＣＧＡＡＴＴＴＧＣＣＣＣＧＣＧＧＣＴＧＡＧＣＴＴＴＴＴＣＴＧＧＧ ＧＧＡＴＣＧＧＣＡＴＧＡＡＴＴＴＣＴＡＣＡＴＧＧＡＧＡＴＣＧＣＣ

10

20

30

40

50

【表６４】

	AAGATGCGGGCCGGCAGACGGCTGTGGGCCCA TCTGATCGAAAAAATGTTCCAGCCCAAAAACA GCAAGTCCCTGCTGCTGCGGGCCCACTGCCAG ACCAGCGGCTGGAGCCTGACCGAGCAGGACCC GTACAATAACATCGTGAGGACCGCCATCGAGG CCATGGCCGCCGTGTTCGGCGGGACGCAAAGC CTGCACACGAACTCCTTCGACGAGGCGCTCGG CCTGCCCACCGTGAAGTCCGCTAGGATCGCCA GGAACACACAGATCATCATCCAGGAGGAGAGC GGCATCCCCAAGGTGGCCGACCCCTGGGGCGG CTCCTACATGATGGAGTGCCTGACGAACGACG TGTACGACGCCGCCCTGAAGCTGATCAACGAG ATCGAGGAGATGGGCGGCATGGCCAAGGCCGT CGCCGAGGGCATCCCCAAGCTGCGCATCGAGG AGTGCGCCGCCAGGCGCCAAGCCCGGATCGAT AGCGGCAGCGAGGTGATCGTGGGGGTGAACAA GTACCAGCTGGAGAAGGAGGACGCGGTCGAGG TCCTGGCCATAGACAACACGAGCGTGCGGAAC AGGCAGATCGAGAAGCTCAAGAAAATCAAGAG CAGCCGGGACCAGGCCCTGGCCGAAAGGTGCC TCGCCGCCCTCACGGAATGCGCCGCCAGCGGC GACGGCAATATCCTGGCCCTGGCGGTCGATGC CAGCCGCGCTCGGTGCACCGTGGGGGAGATCA CCGATGCCCTCAAGAAAGTGTTCGGGGAGCAC AAGGCCAACGACAGGATGGTGTCCGGCGCCTA CAGGCAGGAGTTCGGCGAAAGCAAGGAAATCA CGAGCGCCATCAAGCGGGTCCATAAGTTCATG GAGAGGGAGGGCCGGAGGCCCAGGCTGCTCGT GGCCAAAATGGGCCAGGACGGCCATGACAGGG GC

【表６５】

	GCCAAGGTGATCGCCACCGGGTTCGCCGACCT CGGCTTCGACGTGGACATCGGGCCGCTGTTCC AGACGCCGCGGGAGGTCGCCCAGCAAGCGGTG GACGCCGACGTGCACGCCGTCGGGGGTGAGCAC CCTCGCCGCTGGGCATAAGACCCTGGTGCCCG AGCTGATCAAAGAGCTCAACAGCCTCGGCAGG CCCGACATTCTCGTTATGTGCGGCGGCGTCAT CCCGCCCCAGGACTACGAGTTCCTGTTTGAGG TCGGCGTCTCCAACGTGTTCGGCCCAGGCACC AGGATCCCCAAGGCCGCCGTGCAGGTGTTGGA CGATATCGAGAAATGCCTCGAGAAAAAGCAGC AGAGCGTC

【表６６】

ｈＭＣＭ　ＯＲＦ（配列番号７７７）	ＡＴＧＣＴＧＣＧＧＧＣＣＡＡＧＡＡＣＣＡＧＣＴＧＴＴＣＣＴＧＣＴ ＧＡＧＣＣＣＣＣＡＣＴＡＣＣＴＧＣＧＧＣＡＧＧＴＧＡＡＧＧＡＧＡ ＧＣＡＧＣＧＧＣＡＧＣＣＧＧＣＴＧＡＴＣＣＡＧＣＡＧＣＧＣＣＴＣ ＣＴＣＣＡＣＣＡＧＣＡＧＣＡＧＣＣＣＣＴＣＣＡＣＣＣＣＧＡＧＴＧ ＧＧＣＣＧＣＣＣＴＣＧＣＣＡＡＧＡＡＧＣＡＧＣＴＣＡＡＧＧＧＣＡ ＡＧＡＡＣＣＣＣＧＡＧＧＡＣＣＴＣＡＴＣＴＧＧＣＡＣＡＣＣＣＣＣ ＧＡＧＧＧＣＡＴＣＴＣＣＡＴＣＡＡＧＣＣＣＣＴＣＴＡＣＴＣＣＡＡ ＧＣＧＣＧＡＣＡＣＣＡＴＧＧＡＣＣＴＣＣＣＣＧＡＧＧＡＧＣＴＣＣ ＣＣＧＧＣＧＴＣＡＡＧＣＣＣＴＴＣＡＣＣＣＧＣＧＧＣＣＣＣＴＡＣ ＣＣＣＡＣＣＡＴＧＴＡＣＡＣＣＴＴＣＣＧＣＣＣＣＣＴＧＧＡＣＣＡＴ ＣＣＧＣＣＡＧＴＡＣＧＣＣＧＧＣＴＴＣＴＣＣＡＣＣＧＴＣＧＡＧＧ ＡＧＴＣＣＡＡＣＡＡＧＴＴＣＴＡＣＡＡＧＧＡＣＡＡＣＡＴＣＡＡＧ ＧＣＣＧＧＣＣＡＧＣＡＧＧＧＣＣＴＣＴＣＣＧＴＣＧＣＣＴＴＣＧＡ ＣＣＴＣＧＣＣＡＣＣＣＡＣＣＧＣＧＧＣＴＡＣＧＡＣＴＣＣＧＡＣＡ ＡＣＣＣＣＣＧＣＧＴＣＣＧＣＧＧＣＧＡＣＧＴＣＧＧＣＡＴＧＧＣＣ ＧＧＣＧＴＣＧＣＣＡＴＣＧＡＣＡＣＣＧＴＣＧＡＧＧＡＣＡＣＣＡＡ ＧＡＴＣＣＴＣＴＴＣＧＡＣＧＧＣＡＴＣＣＣＣＣＴＣＧＡＧＡＡＧＡ ＴＧＴＣＣＧＴＣＴＣＣＡＴＧＡＣＣＡＴＧＡＡＣＧＧＣＧＣＣＧＴＣ ＡＴＣＣＣＣＧＴＣＣＴＣＧＣＣＡＡＣＴＴＣＡＴＣＧＴＣＡＣＣＧＧ ＣＧＡＧＧＡＧＣＡＧＧＧＣＧＴＣＣＣＣＡＡＧＧＡＧＡＡＧＣＴＣＡ ＣＣＧＧＣＡＣＣＡＴＣＣＡＧＡＡＣＧＡＣＡＴＣＣＴＣＡＡＧＧＡＧ ＴＴＣＡＴＧＧＴＣＣＧＣＡＡＣＡＣＣＴＡＣＡＴＣＴＴＣＣＣＣＣＣ ＣＧＡＧＣＣＣＴＣＣＡＴＧＡＡＧＡＴＣＡＴＣＧＣＣＧＡＣＡＴＣＴ ＴＣＧＡＧＴＡＣＡＣＣＧＣＣＡＡＧＣＡＣＡＴＧＣＣＣＡＡＧＴＴＣ ＡＡＣＴＣＣＡＴＣＴＣＣＡＴＣＴＣＣＧＧＣＴＡＣＣＡＣＡＴＧＣＡ ＧＧＡＧＧＣＣＧＧＣＧＣＣＧＡＣＧＣＣＡＴＣＣＴＣＧＡＧＣＴＣＧ ＣＣＴＡＣＡＣＣＣＴＣＧＣＣＧＡＣＧＧＣＣＴＣＧＡＧＴＡＣＴＣＣ ＣＧＣＡＣＣＧＧＣＣＴＣＣＡＧＧＣＣＧＧＣＣＴＣＡＣＣＡＴＣＧＡ ＣＧＡＧ

【表６７】

	TTCGCCCCCCGCCTCTCCTTCTTCTGGGGCAT CGGCATGAACTTCTACATGGAGATCGCCAAGA TGCGCGCCGGCCGCCGCCTCTGGGCCCACCTC ATCGAGAAGATGTTCCAGCCCAAGAACTCCAA GTCCCTCCTCCTCCGCGCCCACTGCCAGACCT CCGGCTGGTCCCTCACCGAGCAGGACCCCTAC AACAACATCGTCCGCACCGCCATCGAGGCCAT GGCCGCCGTCTTCGGCGGCACCCAGTCCCTCC ACACCAACTCCTTCGACGAGGCCCTCGGCCTC CCCACCGTCAAGTCCGCCCGCATCGCCCGCAA CACCCAGATCATCATCCAGGAGGAGTCCGGCA TCCCCAAGGTCGCCGACCCCTGGGGCGGCTCC TACATGATGGAGTGCCTCACCAACGACGTCTA CGACGCCGCCCTCAAGCTCATCAACGAGATCG AGGAGATGGGCGGCATGGCCAAGGCCGTCGCC GAGGGCATCCCCAAGCTCCGCATCGAGGAGTG CGCCGCCCGCCGCCAGGCCCGCATCGACTCCG GCTCCGAGGTCATCGTCGGCGTCAACAAGTAC CAGCTCGAGAAGGAGGACGCCGTCGAGGTCCT CGCCATCGACAACACCTCCGTCCGCAACCGCC AGATCGAGAAGCTCAAGAAGATCAAGTCCTCC CGCGACCAGGCCCTCGCCGAGCGCTGCCTCGC CGCCCTCACCGAGTGCGCCGCCTCCGGCGACG GCAACATCCTCGCCCTCGCCGTCGACGCCTCC CGCGCCCGCTGCACCGTCGGCGAGATCACCGA CGCCCTCAAGAAGGTCTTCGGCGAGCACAAGG CCAACGACCGCATGGTCTCCGGCGCCTACCGC CAGGAGTTCGGCGAGTCCAAGGAGATCACCTC CGCCATCAAGCGCGTCCACAAGTTCATGGAGC GCGAGGGCCGCCGCCCCCGCCTCCTCGTCGCC

【表６８】

	AAGATGGGCCAGGACGGCCACGACCGCGGCGC CAAGGTCATCGCCACCGGCTTCGCCGACCTCG GCTTCGACGTCGACATCGGCCCCCTCTTCCAG ACCCCCCGCGAGGTCGCCCAGCAGGCCGTCGA CGCCGACGTCCACGCCGTCGGCGTCTCCACCC TCGCCGCCGGCCACAAGACCCTCGTCCCCGAG CTCATCAAGGAGCTCAACTCCCTCGGCCGCCC CGACATCCTCGTCATGTGCGGCGGCGTCATCC CCCCCCAGGACTACGAGTTCCTCTTCGAGGTC GGCGTCTCCAACGTCTTCGGCCCCGGCACCCG CATCCCCAAGGCCGCCGTCCAGGTCCTCGACG ACATCGAGAAGTGCCTCGAGAAGAAGCAGCAG TCCGTC

【表６９】

ｈＭＣＭ　ＯＲＦ（配列番号７７８）	ＡＴＧＣＴＧＣＧＧＧＣＣＡＡＧＡＡＣＣＡＧＣＴＧＴＴＣＣＴＧＣＴ ＧＡＧＣＣＣＣＣＡＣＴＡＣＣＴＧＣＧＧＣＡＧＧＴＧＡＡＧＧＡＧＡ ＧＣＡＧＣＧＧＣＡＧＣＣＧＧＣＴＧＡＴＣＣＡＧＣＡＧＣＧＣＣＴＣ ＣＴＣＣＡＣＣＡＧＣＡＧＣＡＧＣＣＣＣＴＣＣＡＣＣＣＣＧＡＧＴＧ ＧＧＣＣＧＣＣＣＴＣＧＣＣＡＡＧＡＡＧＣＡＧＣＴＣＡＡＧＧＧＣＡ ＡＧＡＡＣＣＣＣＧＡＧＧＡＣＣＴＣＡＴＣＴＧＧＣＡＣＡＣＣＣＣＣ ＧＡＧＧＧＣＡＴＣＴＣＣＡＴＣＡＡＧＣＣＣＣＴＣＴＡＣＴＣＣＡＡ ＧＣＧＣＧＡＣＡＣＣＡＴＧＧＡＣＣＴＣＣＣＣＧＡＧＧＡＧＣＴＣＣ ＣＣＧＧＣＧＴＣＡＡＧＣＣＣＴＴＣＡＣＣＣＧＣＧＧＣＣＣＣＴＡＣ ＣＣＣＡＣＣＡＴＧＴＡＣＡＣＣＴＴＣＣＧＣＣＣＣＴＧＧＡＣＣＡＴ ＣＣＧＣＣＡＧＴＡＣＧＣＣＧＧＣＴＴＣＴＣＣＡＣＣＧＴＣＧＡＧＧ ＡＧＴＣＣＡＡＣＡＡＧＴＴＣＴＡＣＡＡＧＧＡＣＡＡＣＡＴＣＡＡＧ ＧＣＣＧＧＣＣＡＧＣＡＧＧＧＣＣＴＣＴＣＣＧＴＣＧＣＣＴＴＣＧＡ ＣＣＴＣＧＣＣＡＣＣＣＡＣＣＧＣＧＧＣＴＡＣＧＡＣＴＣＣＧＡＣＡ ＡＣＣＣＣＣＧＣＧＴＣＣＧＣＧＧＣＧＡＣＧＴＣＧＧＣＡＴＧＧＣＣ ＧＧＣＧＴＣＧＣＣＡＴＣＧＡＣＡＣＣＧＴＣＧＡＧＧＡＣＡＣＣＡＡ ＧＡＴＣＣＴＣＴＴＣＧＡＣＧＧＣＡＴＣＣＣＣＣＴＣＧＡＧＡＡＧＡ ＴＧＴＣＣＧＴＣＴＣＣＡＴＧＡＣＣＡＴＧＡＡＣＧＧＣＧＣＣＧＴＣ ＡＴＣＣＣＣＧＴＣＣＴＣＧＣＣＡＡＣＴＴＣＡＴＣＧＴＣＡＣＣＧＧ ＣＧＡＧＧＡＧＣＡＧＧＧＣＧＴＣＣＣＣＡＡＧＧＡＧＡＡＧＣＴＣＡ ＣＣＧＧＣＡＣＣＡＴＣＣＡＧＡＡＣＧＡＣＡＴＣＣＴＣＡＡＧＧＡＧ ＴＴＣＡＴＧＧＴＣＣＧＣＡＡＣＡＣＣＴＡＣＡＴＣＴＴＣＣＣＣＣＣ ＣＧＡＧＣＣＣＴＣＣＡＴＧＡＡＧＡＴＣＡＴＣＧＣＣＧＡＣＡＴＣＴ ＴＣＧＡＧＴＡＣＡＣＣＧＣＣＡＡＧＣＡＣＡＴＧＣＣＣＡＡＧＴＴＣ ＡＡＣＴＣＣＡＴＣＴＣＣＡＴＣＴＣＣＧＧＣＴＡＣＣＡＣＡＴＧＣＡ ＧＧＡＧＧＣＣＧＧＣＧＣＣＧＡＣＧＣＣＡＴＣＣＴＣＧＡＧＣＴＣＧ ＣＣＴＡＣＡＣＣＣＴＣＧＣＣＧＡＣＧＧＣＣＴＣＧＡＧＴＡＣＴＣＣ ＣＧＣＡＣＣＧＧＣＣＴＣＣＡＧＧＣＣＧＧＣＣＴＣＡＣＣＡＴＣＧＡ ＣＧＡＧ

【表７０】

	TTCGCCCCCCGCCTCTCCTTCTTCTGGGGCAT CGGCATGAACTTCTACATGGAGATCGCCAAGA TGCGCGCCGGCCGCCGCCTCTGGGCCCACCTC ATCGAGAAGATGTTCCAGCCCAAGAACTCCAA GTCCCTCCTCCTCCGCGCCCACTGCCAGACCT CCGGCTGGTCCCTCACCGAGCAGGACCCCTAC AACAACATCGTCCGCACCGCCATCGAGGCCAT GGCCGCCGTCTTCGGCGGCACCCAGTCCCTCC ACACCAACTCCTTCGACGAGGCCCTCGGCCTC CCCACCGTCAAGTCCGCCCGCATCGCCCGCAA CACCCAGATCATCATCCAGGAGGAGTCCGGCA TCCCCAAGGTCGCCGACCCCTGGGGCGGCTCC TACATGATGGAGTGCCTCACCAACGACGTCTA CGACGCCGCCCTCAAGCTCATCAACGAGATCG AGGAGATGGGCGGCATGGCCAAGGCCGTCGCC GAGGGCATCCCCAAGCTCCGCATCGAGGAGTG CGCCGCCCGCCGCCAGGCCCGCATCGACTCCG GCTCCGAGGTCATCGTCGGCGTCAACAAGTAC CAGCTCGAGAAGGAGGACGCCGTCGAGGTCCT CGCCATCGACAACACCTCCGTCCGCAACCGCC AGATCGAGAAGCTCAAGAAGATCAAGTCCTCC CGCGACCAGGCCCTCGCCGAGCGCTGCCTCGC CGCCCTCACCGAGTGCGCCGCCTCCGGCGACG GCAACATCCTCGCCCTCGCCGTCGACGCCTCC CGCGCCCGCTGCACCGTCGGCGAGATCACCGA CGCCCTCAAGAAGGTCTTCGGCGAGCACAAGG CCAACGAC

10

20

30

40

50

【表７１】

	CGCATGGTCTCCGGCGCCTACCGCCAGGAGTT CGGCGAGTCCAAGGAGATCACCTCCGCCATCA AGCGCGTCCACAAGTTCATGGAGCGCGAGGGC CGCCGCCCCCCGCCTCCTCGTCGCCAAGATGGG CCAGGACGGCCACGACCGCGGCGCCAAGGTCA TCGCCACCGGCTTCGCCGACCTCGGCTTCGAC GTCGACATCGGCCCCCTCTTCCAGACCCCCCG CGAGGTCGCCCAGCAGGCCGTCGACGCCGACG TCCACGCCGTCGGCGTCTCCACCCTCGCCGCC GGCCACAAGACCCTCGTCCCCGAGCTCATCAA GGAGCTCAACTCCCTCGGCCGCCCCGACATCC TCGTCATGTGCGGCGGCGTCATCCCCCCCCAG GACTACGAGTTCCTCTTCGAGGTCGGCGTCTC CAACGTCTTCGGCCCCGGCACCCGCATCCCCA AGGCCGCCGTCCAGGTCCTCGACGACATCGAG AAGTGCCTCGAGAAGAAGCAGCAGTCCGTC

【１３４６】

他の実施形態

使用してきた表現は、限定ではなく記述の表現であり、本開示の真の範囲及び趣旨を逸脱することなく、その広い態様において、添付する特許請求の範囲の範囲内で変更が可能であることを理解されたい。

【１３４７】

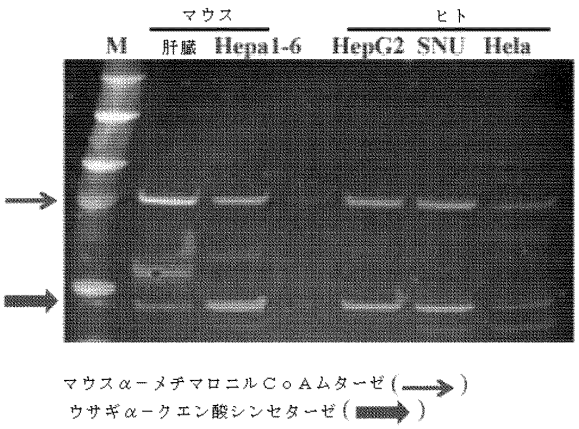
本開示は、いくつかの記載の実施形態に関して、ある程度の長さで、ある程度の具体性をもって記述されているが、そのような任意の具体的事項もしくは実施形態または任意の特定の実施形態に限定されることを意図するものではなく、先行技術を考慮した上で、添付する特許請求の範囲の可能な限り最も広範な解釈を提供し、その結果、本開示の意図される範囲を事実上包含するように、添付する特許請求の範囲に関して解釈されるものである。

【１３４８】

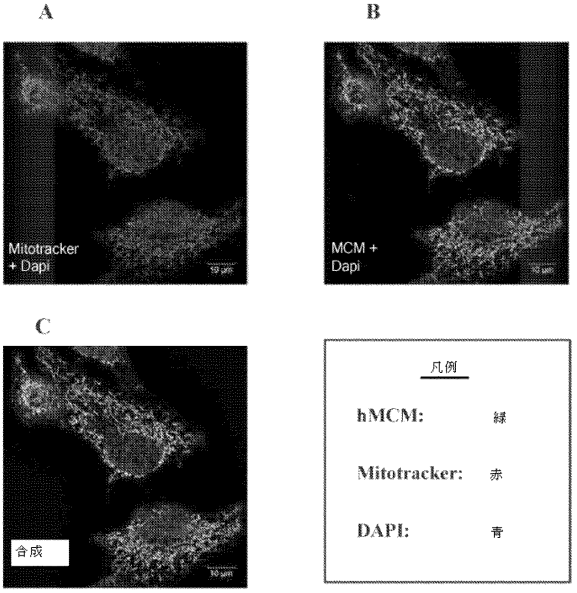
本明細書で言及される全ての公開物、特許出願、特許及び他の参考文献は、その全体を参照により援用する。矛盾が生じる場合には、定義を含め、本明細書が優先される。加えて、セクションの見出し、材料、方法及び実施例は、例示に過ぎず、限定することを意図するものではない。

【図面】

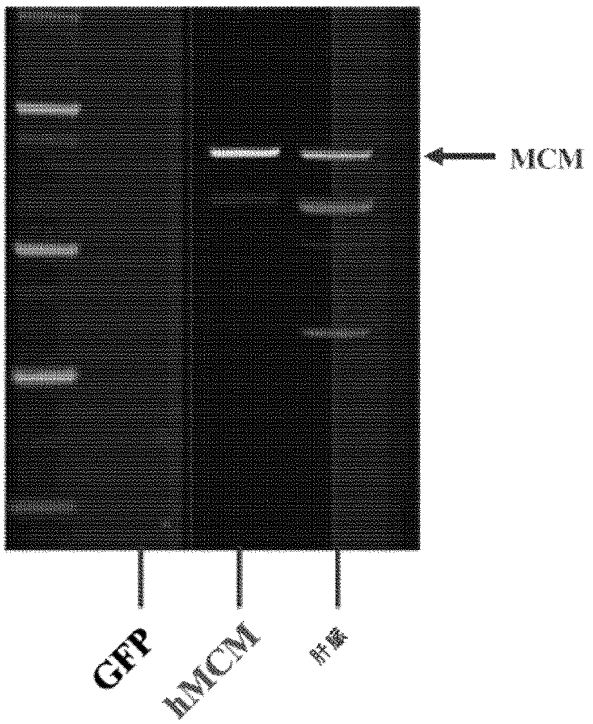
【図１】


マウス
ヒト
M
肝臓
Hepa1-6
HepG2
SNU
Hela
マウスα－メチマロニルＣｏＡムターゼ（⟶）
ウサギα－クエン酸シンセターゼ（⟶）

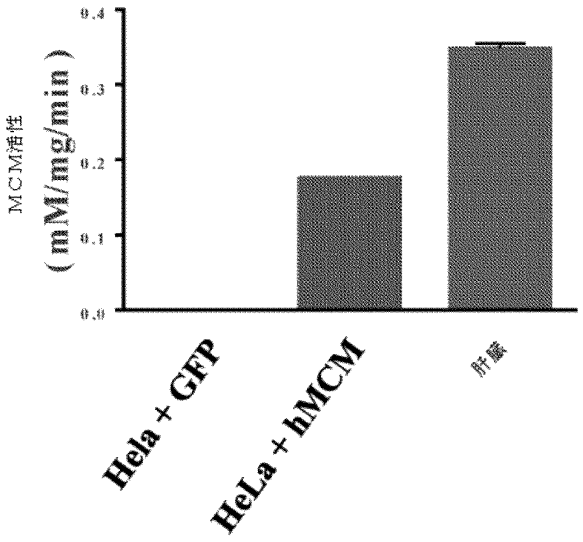
【図２】


A
B
C
Mitotracker
+ Dapi
MCM +
Dapi
合成
凡例
hMCM: 緑
Mitotracker: 赤
DAPI: 青

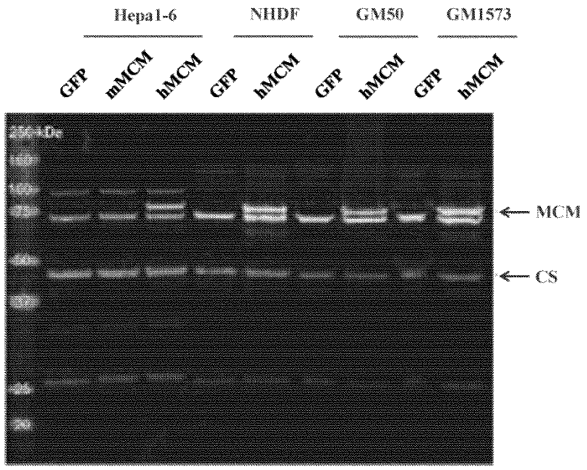
【図３】


MCM
GFP
hMCM
肝臓

【図４】

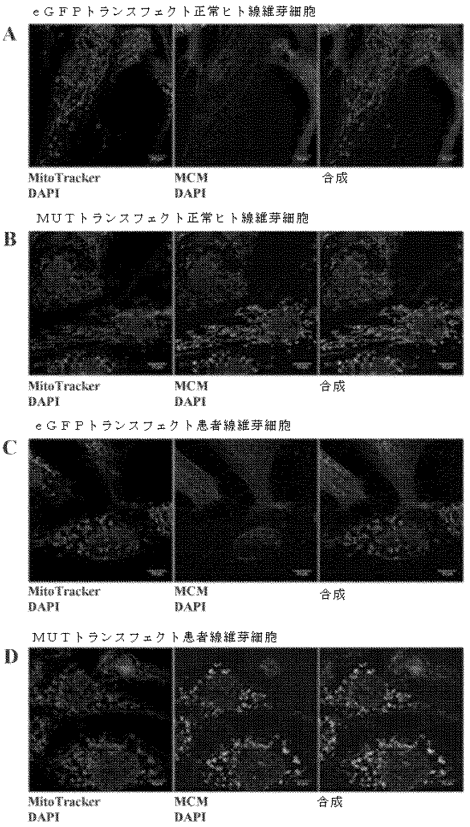

MCM活性
（mM/mg/min）
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
Hela + GFP
HeLa + hMCM
肝臓

【図５】

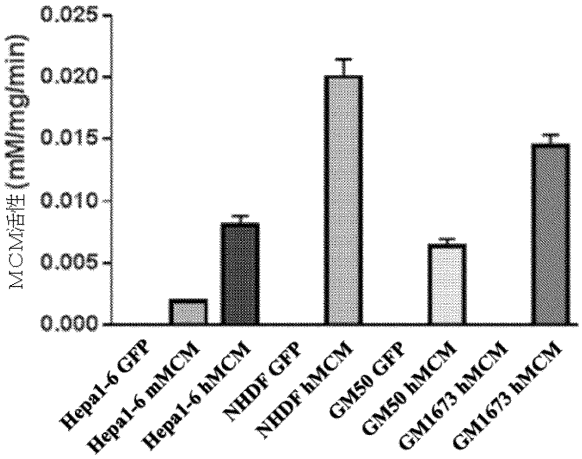


MCM: マウスα－メチマロニルＣｏＡムターゼ (TA505873_2C8)
CS: ウサギα－クエン酸シンセターゼ

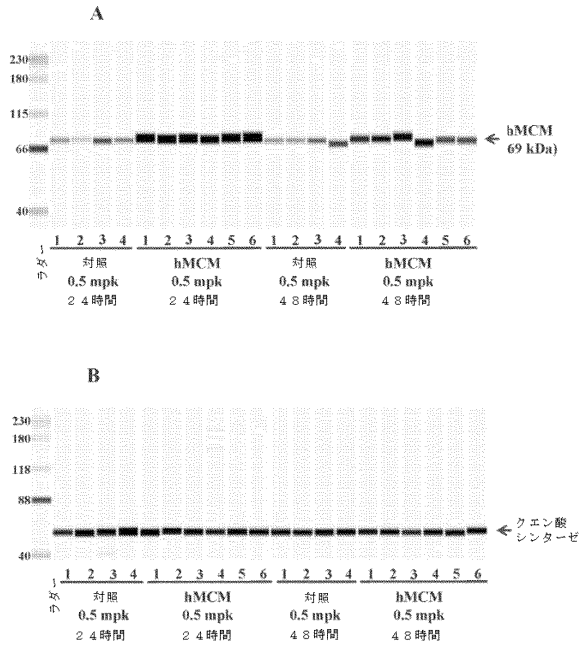
【図６】



【図７】



【図８】



【図９】

配列番号７３２

【図１０】

配列番号７３３

【図１１】

配列番号７３４

【図１２】

配列番号１５１

【図１３】

ATGCTGAGAGCCAAAAATCAGCTCTTCCTACTGAGCCCTCATTACCTGAGGCAGGTGAA
GGAGAGCTCAGGGAGCCGGCTCATCCAGCAGAGACTGCTCCATCAGCAGCAGCCGCTGC
ACCCGGAGTGGGCCGCCCTGGCCAAGAAACAACTGAAGGGCAAGAACCCAGAGGACCTT
ATTTGGCACACCCCAGAGGGCATTAGCATCAAGCCTCTCTATAGCAAGAGAGACACCAT
GGACCTCCCCGAGGAGCTGCCCGGCGTGAAGCCTTTCACCCGTGGCCCCTACCCAACCA
TGTACACATTCAGGCCCTGGACTATCCGGCAGTACGCGGGCTTCTCTACCGTGGAGGAG
TCCAACAAGTTCTACAAGGACAATATTAAAGCTGGCCAGCAGGGACTGAGCGTGGCCTT
CGATTTGGCCACCCACAGAGGATACGACAGCGACAACCCCAGGGTGAGGGGCGACGTTG
GAATGGCCGGCGTGGCCATTGATACTGTCGAGGACACCAAGATCCTGTTCGATGGGATA
CCCCTCGAAAAAATGTCTGTGTCCATGACAATGAATGGGGCCGTGATCCCAGTGTTGGC
CAATTTTATCGTGACAGGAGAGGAGCAGGGCGTGCCCAAGGAGAAGCTGACCGGCACCA
TCCAGAACGACATCTTGAAAGAATTCATGGTTAGAAATACCTACATCTTTCCTCCCGAA
CCCAGCATGAAGATCATCGCCGATATCTTCGAGTATACCGCCAAACACATGCCCAAATT
CAACTCCATTAGCATATCCGGATACCATATGCAGGAGGCTGGCGCCGACGCCATCCTGG
AGCTGGCGTACACCCTGGCCGATGGCCTGGAATATTCTAGGACCGGCCTGCAGGCTGGA
CTCACAATCGATGAGTTCGCCCCCCGCCTGAGCTTCTTCTGGGGCATCGGCATGAACTT
CTACATGGAGATCGCTAAGATGAGAGCGGGACGCCGCCTGTGGGCTCACCTGATCGAAA
AAATGTTCCAACCTAAGAATAGCAAGTCTCTGCTCCTGCGGGCACACTGTCAAACCTCC
GGCTGGTCCCTTACAGAACAGGACCCGTACAACAACATCGTGAGAACCGCCATCGAAGC
CATGGCGGCCGTGTTCGGGGGCACCCAGTCACTCCACACCAATAGCTTCGACGAGGCCC
TGGGCTTGCCTACTGTCAAGTCTGCCAGGATCGCCAGGAACACTCAGATTATCATCCAG
GAGGAGAGCGGCATTCCTAAGGTAGCTGACCCCTGGGGGGGAAGCTACATGATGGAATG
CCTCACCAACGACGTGTACGATGCCGCCCTGAAGCTGATTAATGAGATCGAGGAAATGG
GGGGCATGGCCAAGGCTGTAGCCGAGGGAATCCCCAAGCTGAGAATCGAGGAGTGCGCC
GCCAGGCGGCAGGCCCGCATCGATAGTGGCAGCGAGGTGATCGTGGGCGTTAACAAGTA
CCAGCTCGAGAAGGAAGACGCCGTAGAGGTGTTGGCAATCGACAATACCTCCGTGAGAA
ATAGGCAGATCGAGAAGCTAAAGAAGATAAAGAGCAGCCGGGACCAGGCTCTGGCAGAA
CGGTGCCTGGCCGCCCTCACTGAATGCGCCGCTTCTGGCGATGGCAACATTCTGGCCCT
TGCCGTCGATGCCAGCCGGGCCCGATGCACTGTGGGAGAGATCACAGACGCTCTGAAGA
AGGTGTTCGGCGAGCATAAAGCAAACGATAGAATGGTGTCCGGCGCCTACAGGCAGGAG
TTTGGCGAGAGCAAGGAGATCACATCTGCTATTAAGAGAGTGCATAAGTTCATGGAGAG
AGAGGGACGGCGGCCTAGACTGCTGGTAGCAAAGATGGGCCAGGACGGCCACGATCGGG
GAGCAAAGGTCATTGCTACCGGGTTCGCCGACCTGGGCTTCGACGTGGACATTGGCCCC
CTCTTCCAGACCCCCCGCGAAGTTGCTCAGCAGGCTGTGGATGCTGACGTGCACGCTGT
GGGCGTCAGCACACTGGCCGCTGGACATAAGACCCTGGTTCCCGAGCTGATCAAGGAGC
TGAATAGCCTGGGTCGGCCAGACATCCTCGTGATGTGCGGGGGTGTGATCCCCCCTCAG
GATTACGAGTTCCTGTTCGAGGTTGGAGTCTCTAATGTGTTCGGCCCCGGAACAAGAAT
CCCGAAGGCCGCTGTGCAAGTCCTGGACGACATCGAAAAGTGCCTCGAGAAGAAGCAGC
AGTCTGTG

配列番号１５２

【図１４】

ATGCTGAGGGCCAAGAACCAGCTGTTCCTCCTGTCTCCTCACTACCTGAGACAGGTGAA
GGAGTCCAGCGGTAGCAGACTGATCCAGCAGAGGCTGCTTCACCAGCAGCAGCCCCTCC
ATCCGGAGTGGGCTGCACTGGCAAAAAAGCAGCTTAAGGGAAAAAACCCCGAGGACCTG
ATTTGGCACACCCCAGAGGGAATTAGCATTAAACCCCTCTACAGCAAACGGGACACGAT
GGACCTGCCCGAGGAACTGCCCGGCGTGAAGCCCTTCACACGGGGCCCATACCCCACAA
TGTATACATTCCGTCCTTGGACCATTCGCCAATACGCCGGGTTCAGCACGGTGGAGGAA
TCCAACAAGTTCTACAAGGACAACATCAAGGCCGGCCAGCAAGGCCTCAGCGTCGCCTT
TGACTTGGCCACCCACAGAGGCTACGACTCCGACAACCCCAGAGTGAGAGGCGACGTGG
GTATGGCCGGCGTGGCCATCGACACTGTTGAGGACACCAAAATCCTATTTGACGGCATA
CCCCTGGAAAAGATGTCCGTGAGCATGACAATGAATGGCGCTGTGATCCCCGTGCTCGC
TAACTTCATCGTGACCGGCGAGGAGCAGGGTGTCCCTAAGGAGAAACTTACCGGCACAA
TCCAGAACGACATTCTCAAGGAGTTTATGGTGCGCAACACCTACATTTTCCCCCAGAG
CCTAGCATGAAGATCATTGCCGACATCTTCGAGTACACCGCCAAGCATATGCCAAAGTT
TAACTCCATTTCAATCTCTGGCTACCATATGCAGGAAGCTGGCGCTGACGCCATCTTAG
AGCTGGCCTACACCTTGGCCGACGGCCTCGAATACAGCAGGACCGGCCTTCAGGCCGGT
CTGACCATTGACGAATTTGCACCCAGACTGAGCTTCTTCTGGGGCATCGGCATGAACTT
CTATATGGAGATCGCTAAAATGAGAGCCGGCCGGAGACTGTGGGCTCACCTGATCGAGA
AAATGTTTCAACCCAAGAACTCCAAAAAGCCTTCTGCTCAGGGCCCATTGTCAAACCTCT
GGATGGAGCCTGACTGAGCAGGACCCGTATAACAACATCGTCAGGACCGCCATCGAGGC
CATGGCTGCCGTGTTTGGCGGAACCCAGTCCTTACACACAAATAGCTTTGACGAAGCCC
TGGGGCTGCCAACCGTGAAAAGCGCCAGAATCGCCCCGGAATACTCAGATAATCATCCAG
GAGGAGTCCGGGATCCCCAAGGTTGCCGACCCCTGGGGGGGAAGTTACATGATGGAGTG
CTTGACCAACGATGTGTACGATGCTGCTCTGAAGCTGATTAACGAGATTGAGGAGATGG
GAGGCATGGCTAAGGCTGTCGCGGAGGGCATCCCTAAGCTGAGAATCGAGGAGTGCGCC
GCCCGCCGGCAGGCCAGGATTGACAGCGGATCTGAGGTGATCGTGGGGGTGAACAAGTA
CCAGCTGGAGAAGGAGGACGCCGTTGAGGTTCTGGCTATCGACAACACCAGCGTCAGAA
ACAGGCAGATCGAGAAGCTGAAGAAAATCAAAAGCAGCAGAGACCAGGCCCTGGCAGAA
AGATGCCTGGCTGCCCTGACCGAGTGCGCTGCTAGCGGAGACGGGAACATCCTGGCTCT
GGCCGTCGACGCTTCCAGAGCCAGGTGTACCGTCGGCGAGATCACCGACGCCCTGAAGA
AAGTGTTCGGCGAGCACAAGGCCAACGACCGCATGGTGTCCGGCGCCTACAGGCAGGAG
TTCGGCGAGTCCAAGGAGATTACCTCCGCCATCAAACGGGTGCACAAATTCATGGAGAG
AGAGGGCAGACGGCCACGCTTGCTCGTGGCCAAGATGGGGCAGGACGGCCACGATAGGG
GCGCTAAGGTTATCGCTACAGGCTTTGCTGATCTGGGCTTCGACGTGGACATCGGCCCC
CTGTTTCAGACCCCTAGAGAGGTAGCTCAGCAGGCCGTCGACGCCGACGTGCACGCCGT
GGGCGTCAGCACACTGGCAGCCGGACACAAGACCCTCGTGCCCGAGCTTATCAAGGAAC
TGAACTCCTTGGGGCGGCCCGACATCCTCGTCATGTGCGGCGGAGTGATTCCCCCCCAG
GACTATGAGTTCCTGTTCGAGGTCGGCGTAAGCAACGTCTTTGGCCCCGGAACTCGGAT
CCCCAAGGCCGCAGTACAGGTGCTGGACGACATCGAAAAGTGCCTGGAGAAGAAGCAAC
AGTCTGTG

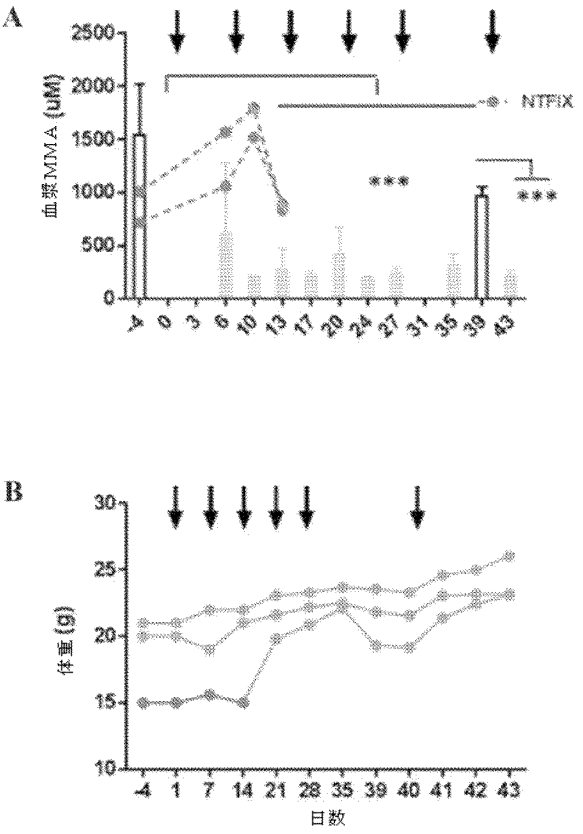
配列番号１５３

【図１５】

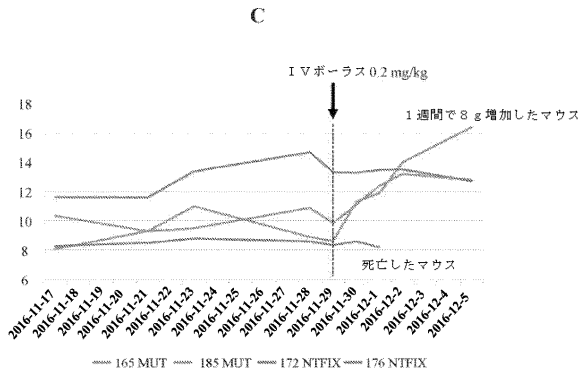
ATGCTGCGCGCTAAAAACCAACTATTCCTGCTGTCCCCCCATTACCTGAGACAGGTGAA
GGAGAGCTCCGGAAGCAGGCTGATCCAACAGAGACTTCTGCACCAGCAGCAGCCCCTGC
ATCCCGAGTGGGCCGCTCTGGCTAAGAAACAACTGAAGGGAAAGAACCCCGAGGACCTG
ATCTGGCACACCCCAGAGGGCATATCCATCAAGCCCCTGTATTCTAAGAGGGACACTAT
GGACCTGCCCGAGGAGCTCCCCGGCGTCAAGCCTTTCACACGCGGACCTTACCCCACAA
TGTACACATTCCGACCATGGACCATTAGGCAGTACGCAGGATTCAGCACCGTTGAGGAG
TCCAATAAATTCTATAAGGACAATATTAAGGCCGGACAACAGGGCCTGAGTGTGGCATT
CGACCTGGCCACACACAGAGGTTACGACTCCGATAATCCTAGGGTGAGAGGCGACGTGG
GCATGGCTGGAGTGGCCATCGATACCGTCGAGGACACAAAGATCCTGTTCGACGGCATC
CCCTTGGAGAAAATGTCCGTGAGCATGACCATGAACGGCGCCGTGATTCCCGTGCTGGC
CAACTTTATTGTAACCGGCGAGGAGCAGGGCGTCCCCAAGGAGAAGCTGACCGGCACCA
TCCAGAACGATATCCTCAAGGAGTTCATGGTACGGAATACCTACATTTTTCCCCCCGAA
CCCTCCATGAAGATCATCGCCGACATCTTCGAGTACACCGCCAAGCACATGCCCAAGTT
CAACTCCATCAGTATTAGCGGCTATCACATGCAGGAGGCCGGCGCCGACGCCATCCTGG
AACTGGCCTACACACTGGCCGACGGTCTGGAGTACAGCAGAACCGGCCTGCAAGCAGGC
CTGACCATCGACGAGTTCGCCCCTCGACTGAGCTTCTTCTGGGGCATTGGCATGAACTT
TTACATGGAGATCGCCAAAATGCGCGCTGGCAGGCGACTCTGGGCCCACCTGATAGAAA
AAATGTTCCAGCCCAAGAACTCCAAGTCCCTGCTCCTCAGGGCCCACTGTCAGACTAGC
GGCTGGAGCCTCACCGAGCAGGACCCATATAATAACATTGTAAGAACAGCCATCGAGGC
CATGGCCGCAGTGTTCGGAGGGACCCAGAGCCTGCATACCAACAGCTTCGATGAGGCCC
TGGGACTGCCCACTGTAAAGTCCGCTAGAATAGCCCGGAACACCCAGATCATTATCCAG
GAAGAGTCCGGGATCCCCAAGGTGGCCGACCCATGGGGCGGCAGCTACATGATGGAGTG
TCTCACCAACGACGTTTACGATGCTGCCCTGAAGCTTATCAACGAAATCGAGGAGATGG
GCGGCATGGCCAAAGCCGTCGCCGAGGGGATTCCAAAGCTCCGGATCGAGGAGTGCGCC
GCCAGAAGGCAGGCCAGAATCGACTCTGGAAGCGAGGTGATTGTGGGTGTGAATAAGTA
TCAGCTTGAGAAGGAAGACGCTGTAGAGGTGCTGGCTATAGATAACACCAGCGTCAGGA
ACAGGCAGATTGAAAAGCTGAAGAAGATCAAGTCGAGCAGAGATCAGGCGCTGGCCGAG
AGATGCCTGGCCGCCCTGACTGAGTGCGCCGCCTCTGGCGATGGCAACATCCTCGCACT
GGCCGTGGACGCTAGCCGGGCCCGGTGTACCGTGGGCGAGATAACCGATGCCCTGAAGA
AGGTGTTCGGAGAGCACAAGGCCAACGACAGAATGGTGTCTGGCGCATATAGACAGGAG
TTCGGCGAGAGCAAGGAGATTACGAGCGCCATCAAGAGAGTGCACAAGTTCATGGAGAG
GGAGGGCAGGAGACCACGGCTGCTGGTTGCCAAGATGGGCCAAGACGGTCACGACAGAG
GGGCTAAAGTGATTGCCACCGGCTTCGCCGACCTGGGCTTCGACGTGGACATCGGTCCA
CTGTTCCAGACCCCTAGGGAGGTGGCGCAGCAGGCCGTGGACGCCGACGTGCACGCCGT
CGGCGTGAGCACACTGGCTGCCGGCCACAAGACACTAGTTCCTGAGCTGATCAAGGAAC
TCAACAGCCTGGGCCGGCCTGATATACTGGTGATGTGCGGGGGGGTGATCCCCCCTCAG
GATTACGAGTTTCTGTTTGAGGTGGGCGTGTCCAACGTCTTCGGCCCCGGGACCAGAAT
CCCAAAGGCCGCAGTGCAGGTATTAGACGACATTGAGAAGTGCCTGGAGAAGAAACAGC
AGTCCGTT

配列番号１５４

【図１６－１】

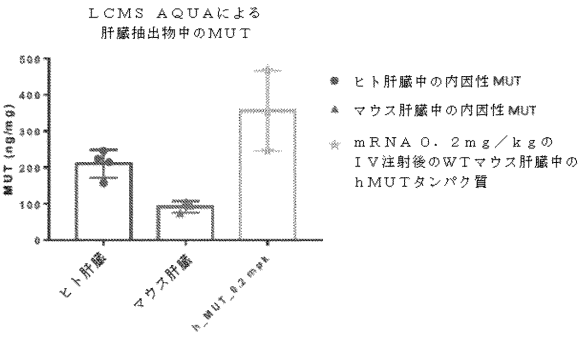


【図１６－２】

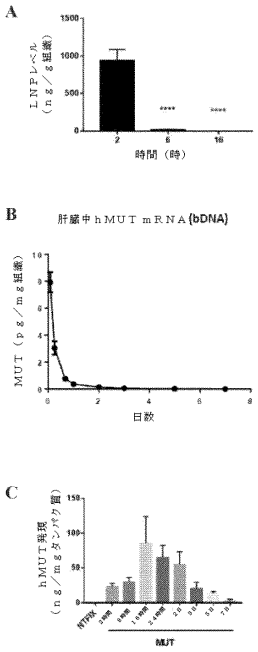


研究設計：ＭＣＫマウスへの週１回のＩＶ注射（ｈＭＵＴまたはＮＴＦＩＸ　ｍＲＮＡ）

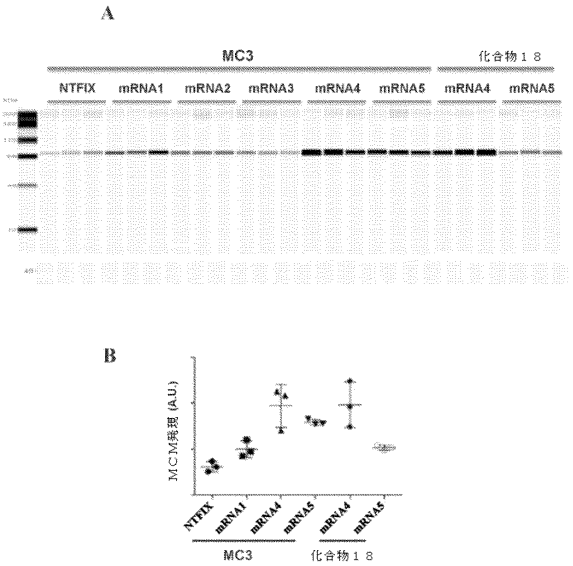
【図１７】



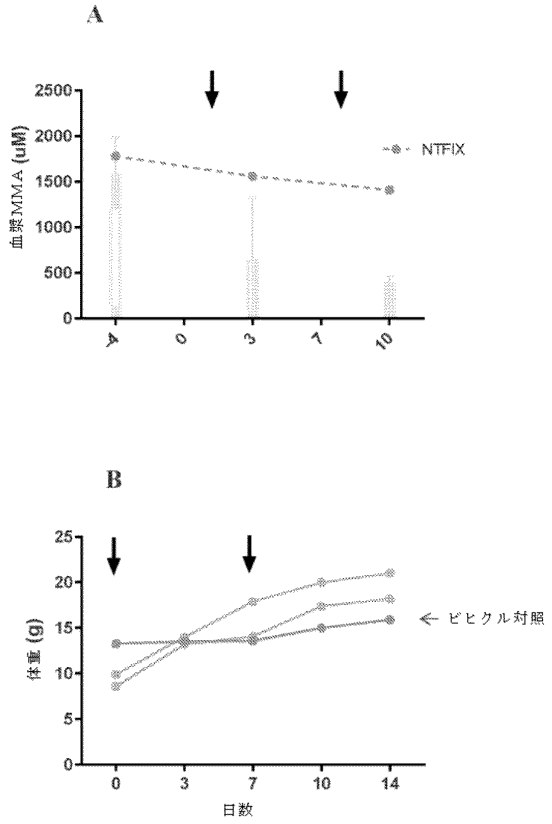
【図１８】



【図１９】



【図２０】



【配列表】

0007065036000001.app

フロントページの続き

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号 62/273,112
(32)優先日 平成27年12月30日(2015.12.30)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号 62/273,108
(32)優先日 平成27年12月30日(2015.12.30)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号 62/274,727
(32)優先日 平成28年1月4日(2016.1.4)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号 62/274,722
(32)優先日 平成28年1月4日(2016.1.4)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号 62/274,733
(32)優先日 平成28年1月4日(2016.1.4)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号 62/274,726
(32)優先日 平成28年1月4日(2016.1.4)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号 62/338,478
(32)優先日 平成28年5月18日(2016.5.18)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号 62/338,456
(32)優先日 平成28年5月18日(2016.5.18)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号 62/409,343
(32)優先日 平成28年10月17日(2016.10.17)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

ッツ州ケンブリッジ、テクノロジー・スクエア２００番、モダーナティエックス・インコーポレイテッド内
(72)発明者 ウラディミール・プレスニャク
アメリカ合衆国０２１４１マサチューセッツ州ケンブリッジ、ウェブスター・アベニュー１２３番、ナンバー３

審査官 柴原 直司

(56)参考文献
特表２０１５－５１８７０５（ＪＰ，Ａ）
国際公開第２０１３／０８６３７３（WO，Ａ１）
国際公開第２０１４／０８９２１２（WO，Ａ１）
米国特許出願公開第２０１４／０２００２６１（ＵＳ，Ａ１）
Mol. Genet. Metab., (2003), 80, [4], p.463-468

(58)調査した分野 (Int.Cl.，ＤＢ名)
Ａ６１Ｋ ３８／００－３８／５８
Ａ６１Ｋ ４８／００
Ａ６１Ｋ ４７／００－４７／６９
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）