

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号  
特表2024-533865  
(P2024-533865A)

(43)公表日 令和6年9月12日(2024.9.12)

| (51)国際特許分類        |                             | F I     |                          | テーマコード (参考) |                    |
|-------------------|-----------------------------|---------|--------------------------|-------------|--------------------|
| C 0 7 D           | 207/08 (2006.01)            | C 0 7 D | 207/08                   | C S P       | 4 C 0 7 6          |
| C 1 2 N           | 15/88 (2006.01)             | C 1 2 N | 15/88                    | Z           | 4 C 0 8 4          |
| C 0 7 D           | 211/22 (2006.01)            | C 0 7 D | 211/22                   |             | 4 C 0 8 5          |
| C 0 7 D           | 211/34 (2006.01)            | C 0 7 D | 211/34                   |             | 4 C 0 8 6          |
| C 0 7 D           | 401/06 (2006.01)            | C 0 7 D | 401/06                   |             | 4 H 0 4 5          |
|                   |                             | 審査請求    | 未請求                      | 予備審査請求      | 未請求 (全366頁) 最終頁に続く |
| (21)出願番号          | 特願2024-540672(P2024-540672) | (71)出願人 | 524097296                |             |                    |
| (86)(22)出願日       | 令和4年9月14日(2022.9.14)        |         | レナゲード セラピューティクス マネー      |             |                    |
| (85)翻訳文提出日        | 令和6年5月10日(2024.5.10)        |         | ジメント インコーポレイテッド          |             |                    |
| (86)国際出願番号        | PCT/US2022/076415           |         | アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2     |             |                    |
| (87)国際公開番号        | WO2023/044333               |         | 1 3 9, ケンブリッジ, メモリアル     |             |                    |
| (87)国際公開日         | 令和5年3月23日(2023.3.23)        |         | ドライブ 6 4 0, スイート 2 3 0 0 |             |                    |
| (31)優先権主張番号       | 63/244,146                  | (74)代理人 | 100078282                |             |                    |
| (32)優先日           | 令和3年9月14日(2021.9.14)        |         | 弁理士 山本 秀策                |             |                    |
| (33)優先権主張国・地域又は機関 | 米国(US)                      | (74)代理人 | 100113413                |             |                    |
| (31)優先権主張番号       | 63/293,286                  |         | 弁理士 森下 夏樹                |             |                    |
| (32)優先日           | 令和3年12月23日(2021.12.23)      | (74)代理人 | 100181674                |             |                    |
| (33)優先権主張国・地域又は機関 | 米国(US)                      |         | 弁理士 飯田 貴敏                |             |                    |
| (31)優先権主張番号       | 63/336,008                  | (74)代理人 | 100181641                |             |                    |
|                   |                             |         | 弁理士 石川 大輔                |             |                    |
|                   |                             | (74)代理人 | 230113332                |             |                    |
|                   |                             | 最終頁に続く  |                          | 最終頁に続く      |                    |

(54)【発明の名称】 環状脂質及びその使用方法

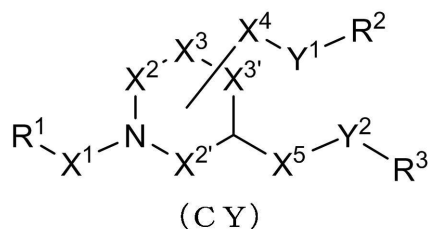
(57)【要約】  
本開示は、感染性物質に対して免疫する際に使用するための核酸配列、ポリペプチドまたはペプチドの送達のための最適化システム及び送達ビヒクルの様々な脂質、組成物、及び／または方法を詳述する。  
【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

式 (C Y) の化合物

## 【化 1】



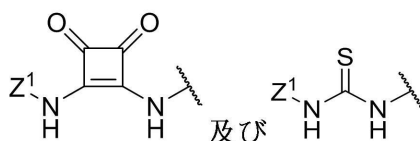
10

またはその薬学的に許容可能な塩

(式中、

 $R^1$  は、 $-OH$ 、 $-OAc$ 、 $R^{1a}$ 、

## 【化 2】

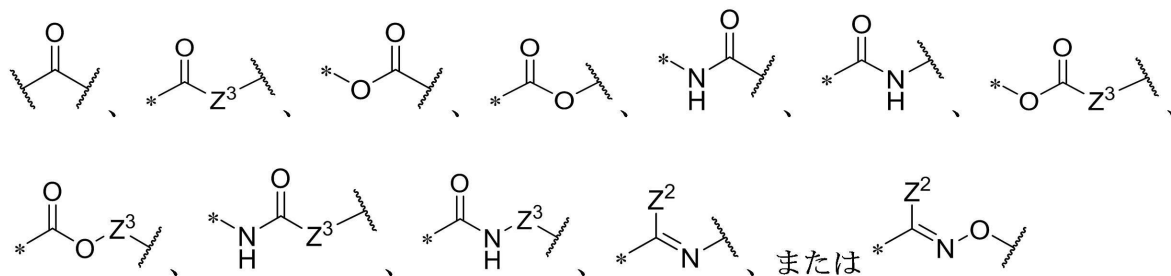


20

からなる群から選択され；

 $Z^1$  は、任意に置換された  $C_1 - C_6$  アルキルであり； $X^1$  は、任意に置換された  $C_2 - C_6$  アルキレニルであり； $X^2$  は、結合、 $-CH_2-$  及び  $-CH_2CH_2-$  からなる群から選択され； $X^{2'}$  は、結合、 $-CH_2-$  及び  $-CH_2CH_2-$  からなる群から選択され； $X^3$  は、結合、 $-CH_2-$  及び  $-CH_2CH_2-$  からなる群から選択され； $X^{3'}$  は、結合、 $-CH_2-$  及び  $-CH_2CH_2-$  からなる群から選択され； $X^4$  及び  $X^5$  は、独立して、任意に置換された  $C_2 - C_{14}$  アルキレニルまたは任意に置換された  $C_2 - C_{14}$  アルケニレニルであり； $Y^1$  及び  $Y^2$  は、独立して、

## 【化 3】



40

からなる群から選択され；

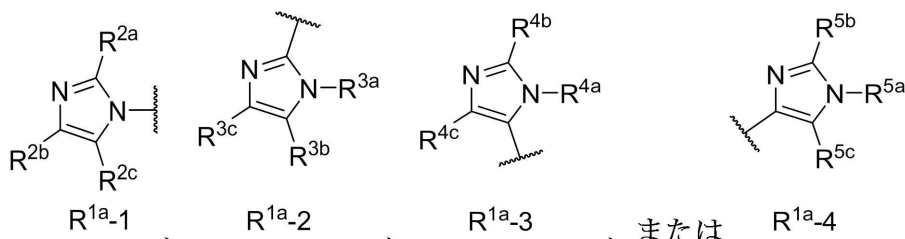
「\*」でマークされた結合は、 $X^4$  または  $X^5$  に結合されており；各  $Z^2$  は、独立して、H または任意に置換された  $C_1 - C_8$  アルキルであり；各  $Z^3$  は、独立して、任意に置換された  $C_1 - C_6$  アルキレニルであり； $R^2$  は、任意に置換された  $C_4 - C_{20}$  アルキル、任意に置換された  $C_2 - C_{14}$  アルケニル、及び  $-(CH_2)_pCH(OR^6)(OR^7)$  からなる群から選択され；

50

$R^3$  は、任意に置換された  $C_4 - C_{20}$  アルキル、任意に置換された  $C_2 - C_{14}$  アルケニル、または  $-(CH_2)_q CH(OR^8)(OR^9)$  からなる群から選択され；

$R^{1a}$  は、

【化 4】



10

であり；

$R^{2a}$ 、 $R^{2b}$ 、及び  $R^{2c}$  は、独立して、水素及び  $C_1 - C_6$  アルキルであり；

$R^{3a}$ 、 $R^{3b}$ 、及び  $R^{3c}$  は、独立して、水素及び  $C_1 - C_6$  アルキルであり；

$R^{4a}$ 、 $R^{4b}$ 、及び  $R^{4c}$  は、独立して、水素及び  $C_1 - C_6$  アルキルであり；

$R^{5a}$ 、 $R^{5b}$ 、及び  $R^{5c}$  は、独立して、水素及び  $C_1 - C_6$  アルキルであり；

$R^6$ 、 $R^7$ 、 $R^8$ 、及び  $R^9$  は、独立して、任意に置換された  $C_1 - C_{14}$  アルキル、任意に置換された  $C_2 - C_{14}$  アルケニル、または  $-(CH_2)_m - A - (CH_2)_n H$  であり；

20

各 A は、独立して、 $C_3 - C_8$  シクロアルキレニルであり；

各 m は、独立して、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、または 12 であり；

各 n は、独立して、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、または 12 であり；

p は、0、1、2、3、4、5、6、及び 7 からなる群から選択され；

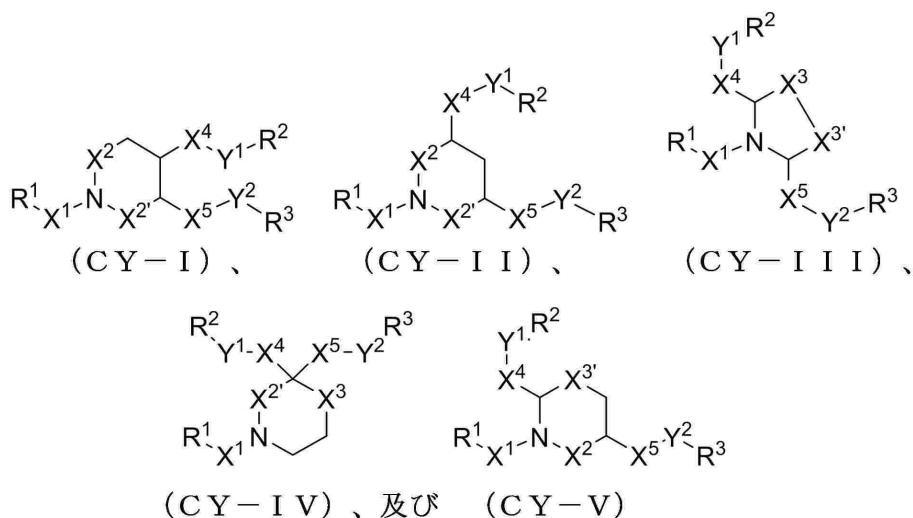
q は、0、1、2、3、4、5、6、及び 7 からなる群から選択される）。

30

【請求項 2】

前記化合物は、式 (CY-I')、(CY-II)、(CY-III)、(CY-IV)、または (CY-V)：

【化 5】



40

のもの、またはその薬学的に許容可能な塩

50

(式中、

$X^2$  及び  $X^3$  は、独立して、結合、 $-CH_2-$ 、または  $-CH_2CH_2-$  であり；

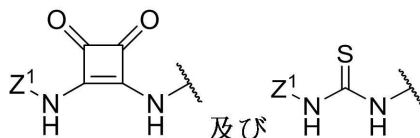
$X^6$  及び  $X^7$  は、独立して、 $-CH_2-$  または  $-CH_2CH_2-$  である)

である、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 3】

$R^1$  は、 $-OH$ 、

【化 6】



10

からなる群から選択される、請求項 1 または 2 に記載の化合物。

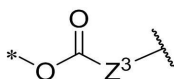
【請求項 4】

$R^1$  は、 $-OH$  である、請求項 1 または 2 に記載の化合物。

【請求項 5】

$Y^1$  及び  $Y^2$  は、独立して、

【化 7】



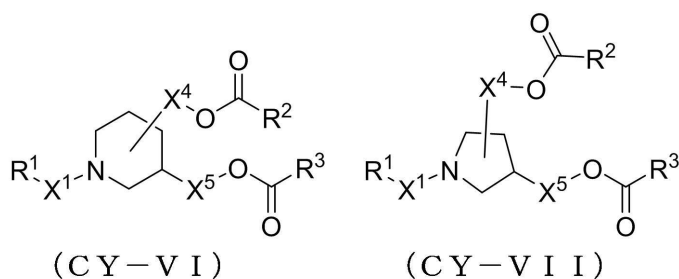
20

である、請求項 1 ～ 4 のいずれかに記載の化合物。

【請求項 6】

前記化合物は、式 (CY-VI) または (CY-VII)：

【化 8】



30

のもの、またはその薬学的に許容可能な塩である、請求項 1 ～ 5 のいずれかに記載の化合物。

40

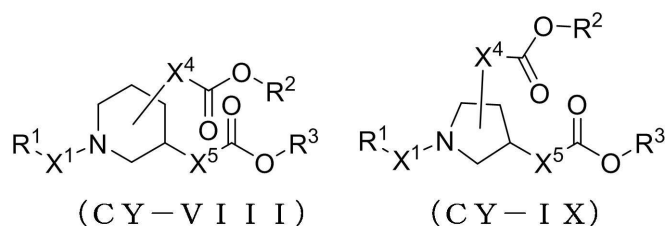
【請求項 7】

前記化合物は、式 (CY-VIII) または (CY-IX)：

50



## 【化 9】



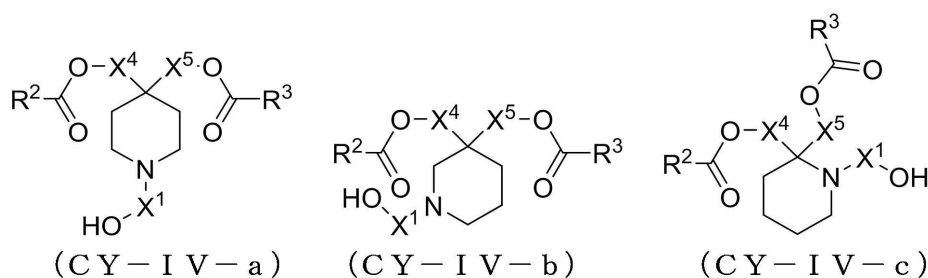
10

のもの、またはその薬学的に許容可能な塩である、請求項 1～5 のいずれかに記載の化合物。

## 【請求項 8】

前記化合物は、式 (CY-IV-a)、(CY-IV-b)、または (CY-IV-c)

## 【化 10】



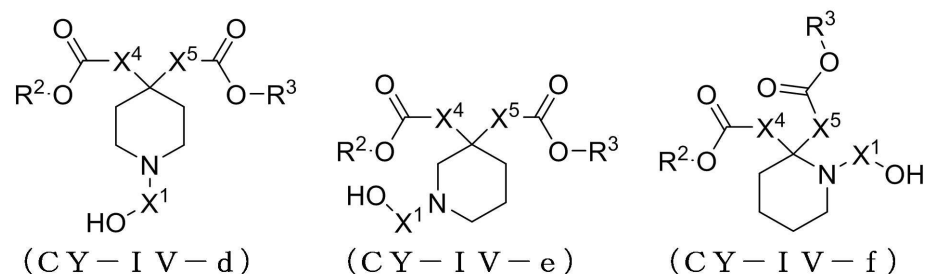
20

のもの、またはその薬学的に許容可能な塩である、請求項 1～5 のいずれかに記載の化合物。

## 【請求項 9】

前記化合物は、式 (CY-IV-d)、(CY-IV-e)、または (CY-IV-f)

## 【化 11】



40

のもの、またはその薬学的に許容可能な塩である、請求項 1～5 のいずれかに記載の化合物。

## 【請求項 10】

X<sup>4</sup> は、任意に置換された C<sub>2</sub> - C<sub>10</sub> アルキレニルであり、X<sup>5</sup> は、任意に置換された C<sub>2</sub> - C<sub>10</sub> アルキレニルである、請求項 1～9 のいずれかに記載の化合物。

## 【請求項 11】

X<sup>4</sup> は、任意に置換された C<sub>2</sub> - C<sub>6</sub> アルキレニルであり、X<sup>5</sup> は、任意に置換された C<sub>2</sub> - C<sub>6</sub> アルキレニルである、請求項 1～9 のいずれかに記載の化合物。

50

## 【請求項 12】

X<sup>4</sup>は、任意に置換されたC<sub>2</sub>アルキレニルであり、X<sup>5</sup>は、任意に置換されたC<sub>2</sub>アルキレニルである、請求項11に記載の化合物。

## 【請求項 13】

X<sup>4</sup>は、任意に置換されたC<sub>2</sub>アルキレニルであり、X<sup>5</sup>は、任意に置換されたC<sub>2</sub>アルキレニルである、請求項11に記載の化合物。

## 【請求項 14】

X<sup>1</sup>は、任意に置換されたC<sub>2</sub> - C<sub>4</sub>アルキレニルである、請求項1～13のいずれかに記載の化合物。

## 【請求項 15】

X<sup>1</sup>は、任意に置換されたC<sub>2</sub>アルキレニルである、請求項1～13のいずれかに記載の化合物。

## 【請求項 16】

R<sup>2</sup>は、-(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>CH(OR<sup>6</sup>)(OR<sup>7</sup>)である、請求項1～15のいずれかに記載の化合物。

## 【請求項 17】

pは、0、1、及び2からなる群から選択される、請求項16に記載の化合物。

## 【請求項 18】

pは、0である、請求項16に記載の化合物。

## 【請求項 19】

R<sup>3</sup>は、-(CH<sub>2</sub>)<sub>q</sub>CH(OR<sup>8</sup>)(OR<sup>9</sup>)である、請求項1～18のいずれかに記載の化合物。

## 【請求項 20】

qは、0、1、及び2からなる群から選択される、請求項19に記載の化合物。

## 【請求項 21】

qは、0である、請求項19に記載の化合物。

## 【請求項 22】

R<sup>2</sup>は、任意に置換されたC<sub>4</sub> - C<sub>20</sub>アルキルである、請求項1～15または19～21のいずれかに記載の化合物。

## 【請求項 23】

R<sup>2</sup>は、任意に置換されたC<sub>10</sub> - C<sub>20</sub>アルキルである、請求項22に記載の化合物。

## 【請求項 24】

R<sup>2</sup>は、任意に置換されたC<sub>10</sub> - C<sub>15</sub>アルキルである、請求項22に記載の化合物。

## 【請求項 25】

R<sup>2</sup>は、任意に置換されたC<sub>15</sub> - C<sub>20</sub>アルキルである、請求項22に記載の化合物。

## 【請求項 26】

R<sup>3</sup>は、任意に置換されたC<sub>4</sub> - C<sub>20</sub>アルキルである、請求項1～18のいずれかに記載の化合物。

## 【請求項 27】

R<sup>3</sup>は、任意に置換されたC<sub>10</sub> - C<sub>20</sub>アルキルである、請求項26に記載の化合物。

## 【請求項 28】

R<sup>3</sup>は、任意に置換されたC<sub>10</sub> - C<sub>15</sub>アルキルである、請求項26に記載の化合物。

## 【請求項 29】

R<sup>3</sup>は、任意に置換されたC<sub>15</sub> - C<sub>20</sub>アルキルである、請求項26に記載の化合物。

## 【請求項 30】

R<sup>6</sup>は、任意に置換されたC<sub>1</sub> - C<sub>14</sub>アルキルであり；

R<sup>7</sup>は、任意に置換されたC<sub>1</sub> - C<sub>14</sub>アルキルであり；

R<sup>8</sup>は、任意に置換されたC<sub>1</sub> - C<sub>14</sub>アルキルであり；

R<sup>9</sup>は、任意に置換されたC<sub>1</sub> - C<sub>14</sub>アルキルである、

請求項1～21のいずれかに記載の化合物。

## 【請求項 3 1】

R<sup>6</sup> は、任意に置換された C<sub>3</sub> - C<sub>10</sub> アルキルであり；

R<sup>7</sup> は、任意に置換された C<sub>3</sub> - C<sub>10</sub> アルキルであり；

R<sup>8</sup> は、任意に置換された C<sub>3</sub> - C<sub>10</sub> アルキルであり；

R<sup>9</sup> は、任意に置換された C<sub>3</sub> - C<sub>10</sub> アルキルである、

請求項 3 0 のいずれかに記載の化合物。

## 【請求項 3 2】

R<sup>6</sup> は、任意に置換された C<sub>6</sub> - C<sub>10</sub> アルキルであり；

R<sup>7</sup> は、任意に置換された C<sub>6</sub> - C<sub>10</sub> アルキルであり；

R<sup>8</sup> は、任意に置換された C<sub>6</sub> - C<sub>10</sub> アルキルであり；

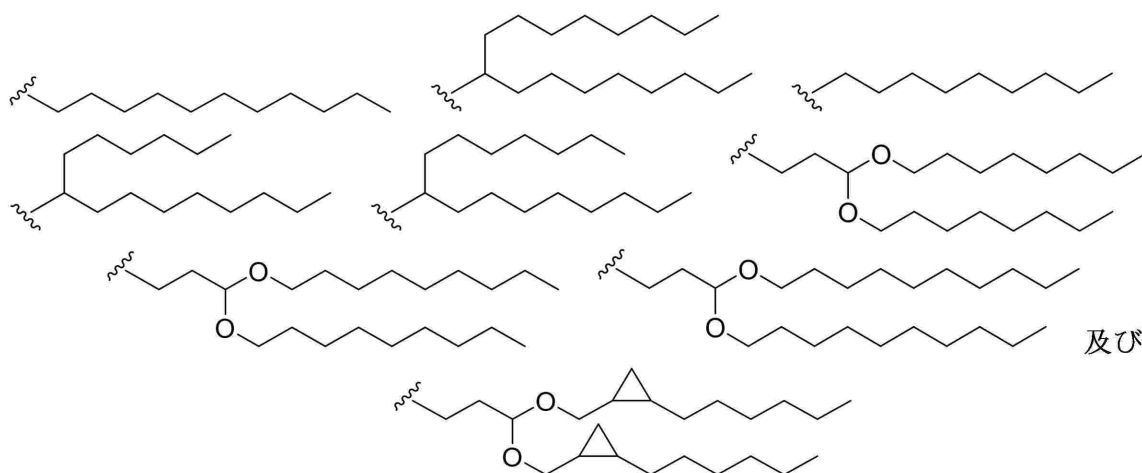
R<sup>9</sup> は、任意に置換された C<sub>6</sub> - C<sub>10</sub> アルキルである、

請求項 3 0 のいずれかに記載の化合物。

## 【請求項 3 3】

R<sup>2</sup> は、

## 【化 1 2】

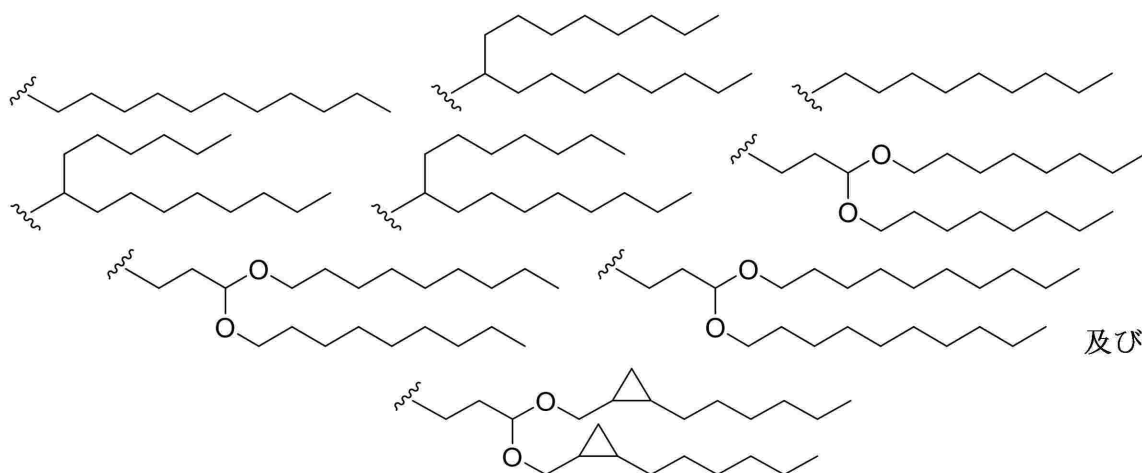


からなる群から選択される、請求項 1 ~ 1 5 のいずれかに記載の化合物。

## 【請求項 3 4】

R<sup>3</sup> は、

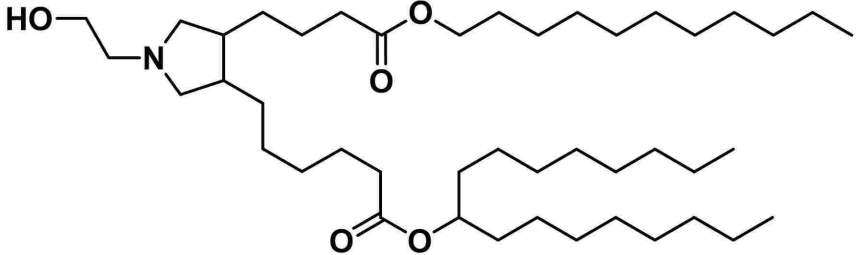
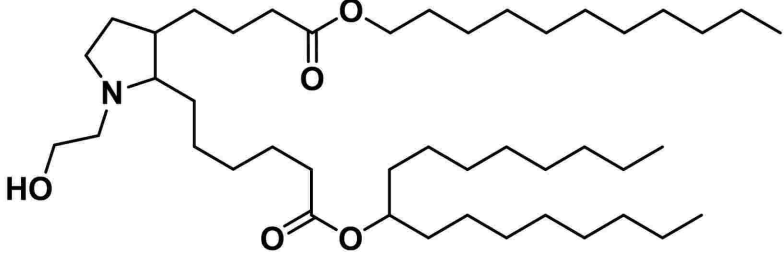
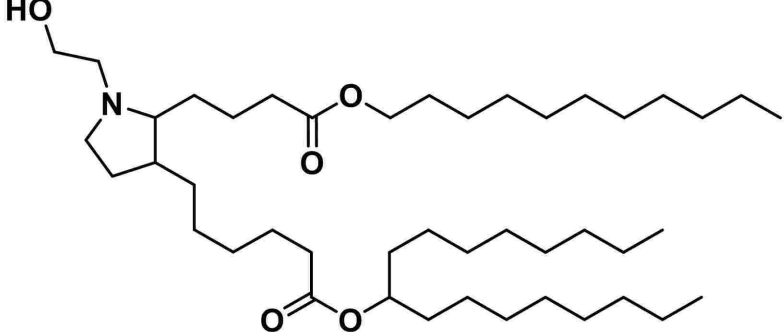
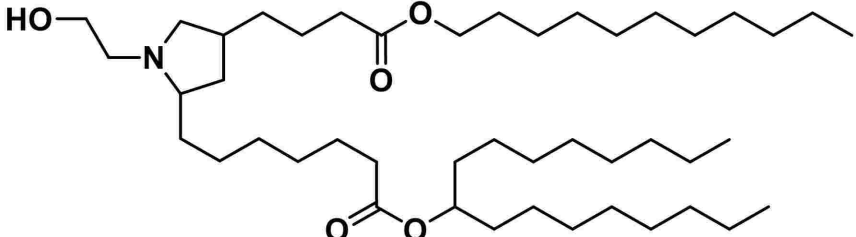
## 【化 1 3】



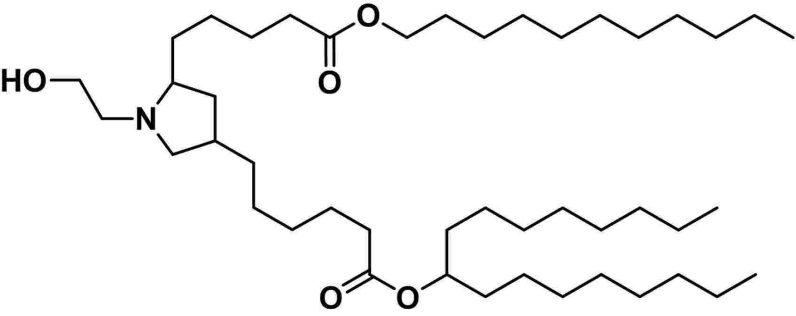
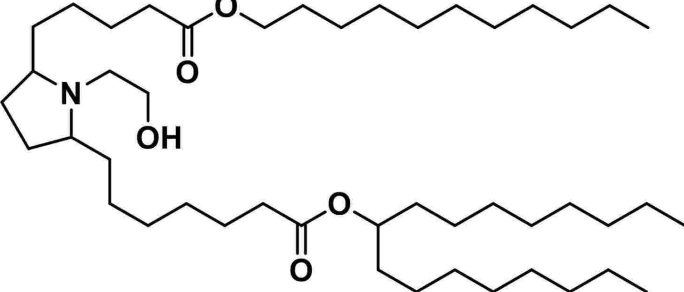
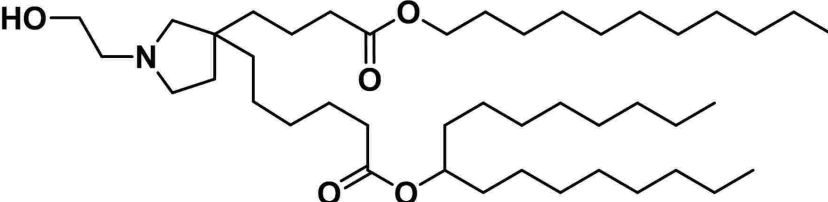
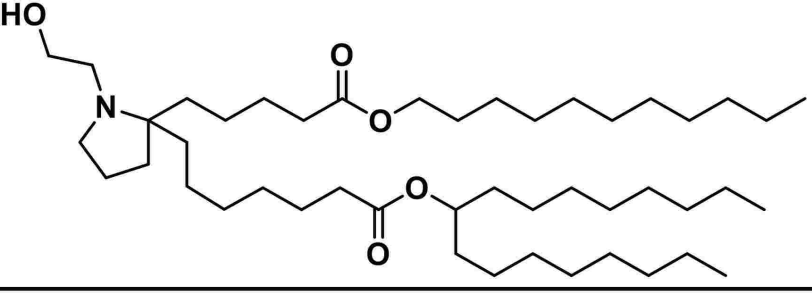
からなる群から選択される、請求項 1 ~ 1 5 または 3 3 のいずれかに記載の化合物。

【請求項 3 5】

【表 6 - 1】

| 構造                                                                                   |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------|----|
|    | 10 |
|    | 20 |
|   | 30 |
|  | 40 |

【表 6 - 2】

|                                                                                      |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------|----|
|    | 10 |
|     | 20 |
|   | 30 |
|  | 40 |

10

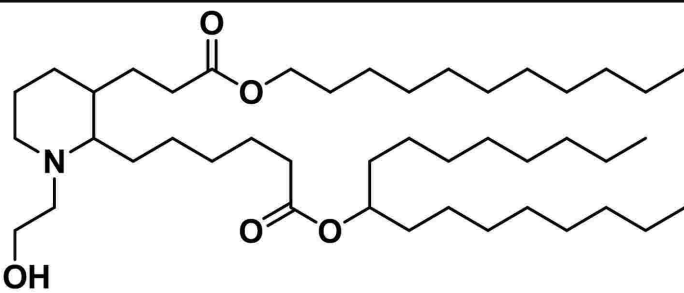
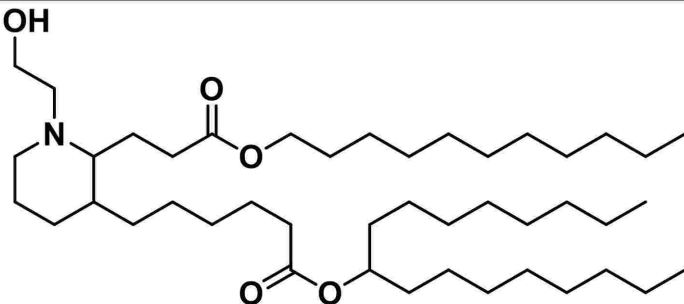
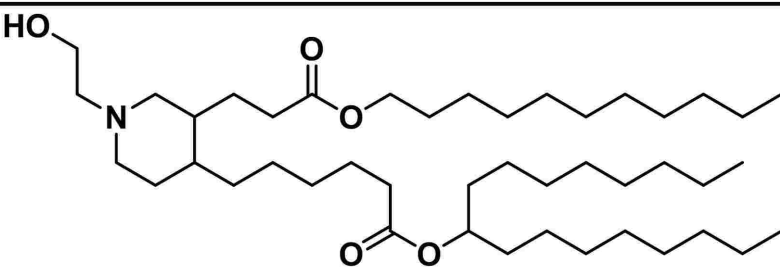
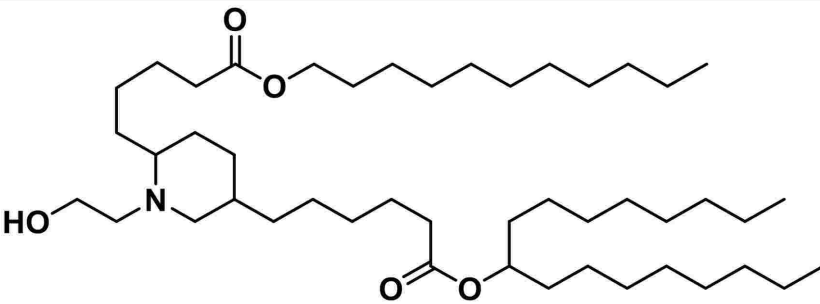
20

30

40

50

【表 6 - 3】

|                                                                                      |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------|----|
|     | 10 |
|     |    |
|   | 20 |
|  | 30 |

10

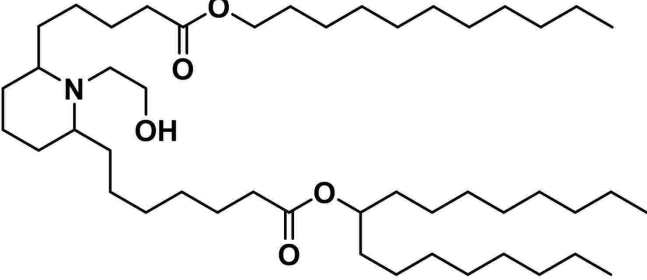
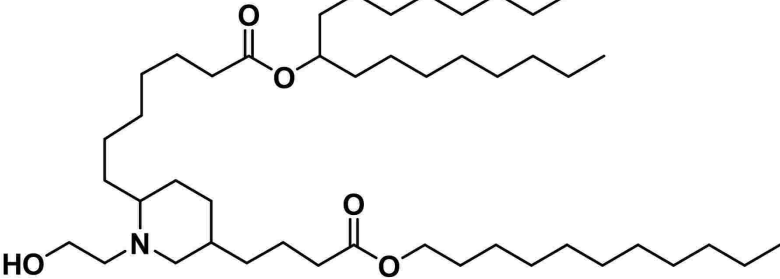
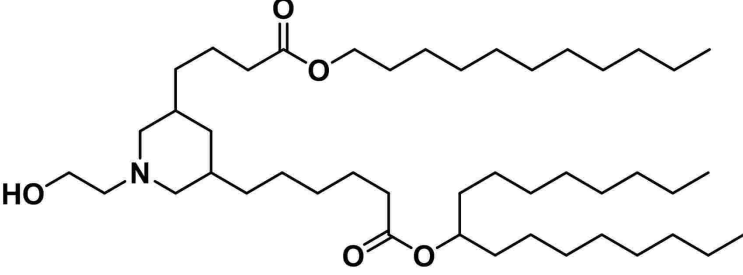
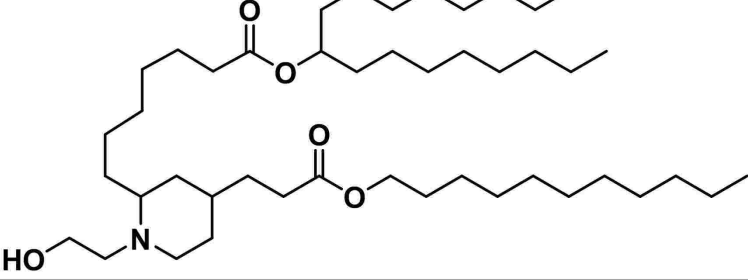
20

30

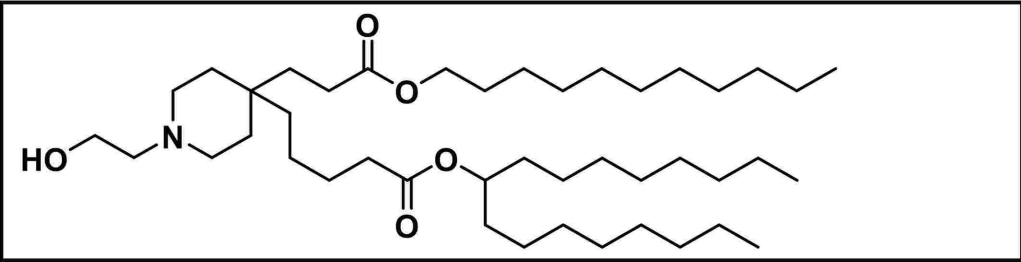
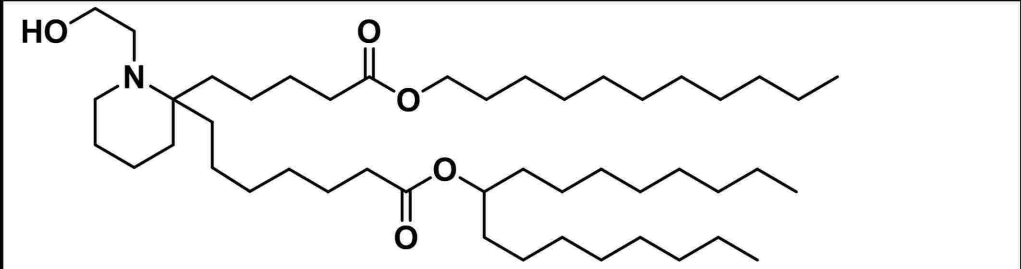
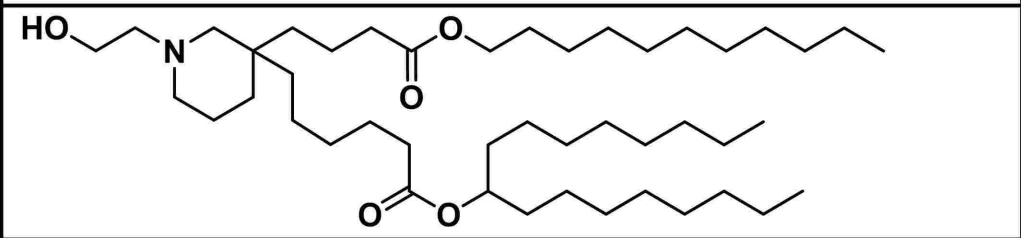
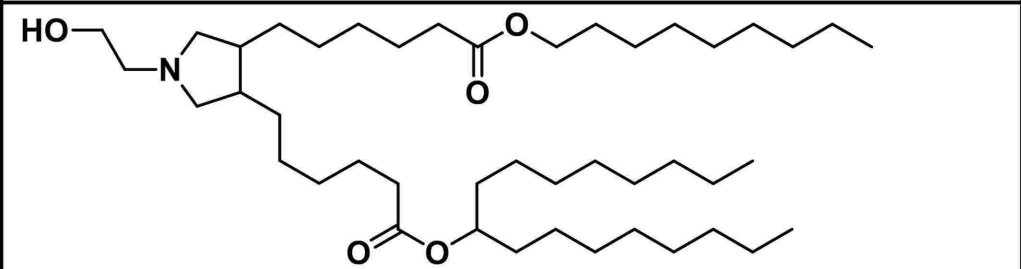
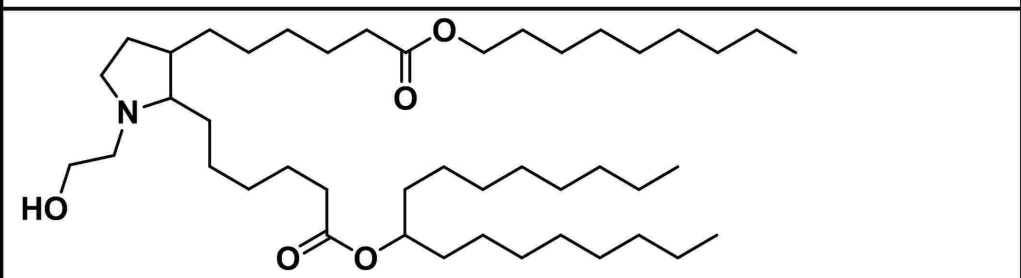
40

50

【表 6 - 4】

|                                                                                      |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------|----|
|     | 10 |
|    | 20 |
|   | 30 |
|  | 40 |

【表 6 - 5】

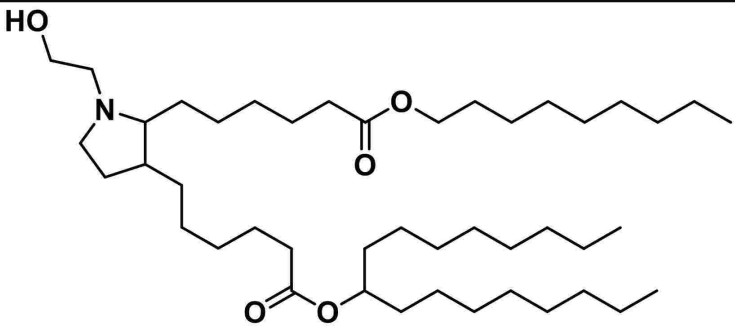
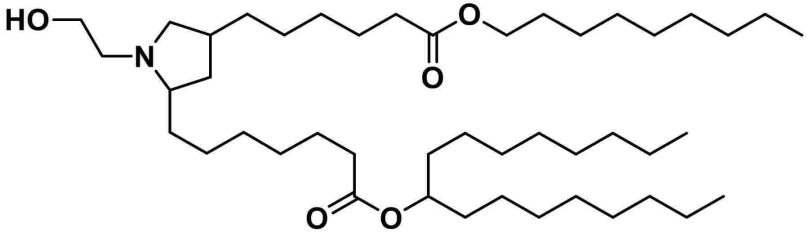
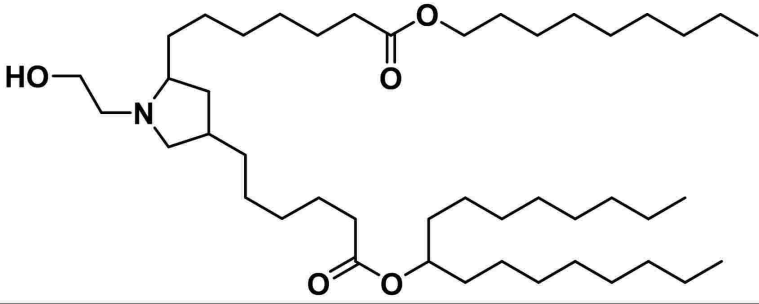
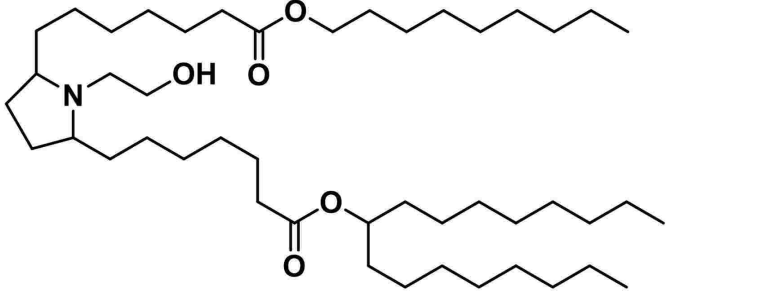
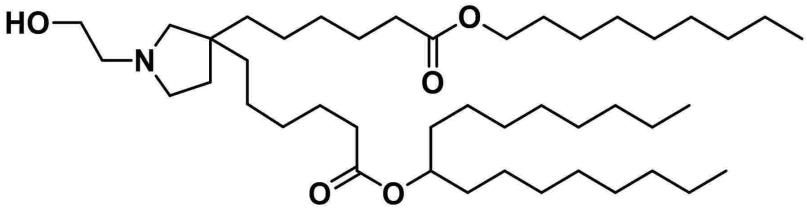
|                                                                                      |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------|----|
|    |    |
|    | 10 |
|   | 20 |
|  | 30 |
|  | 40 |

40

50



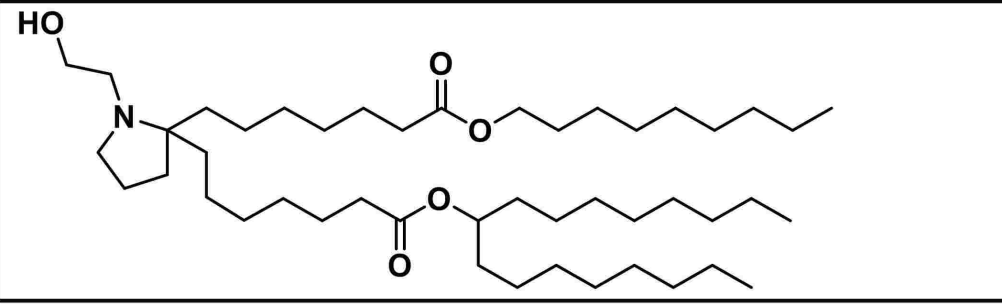
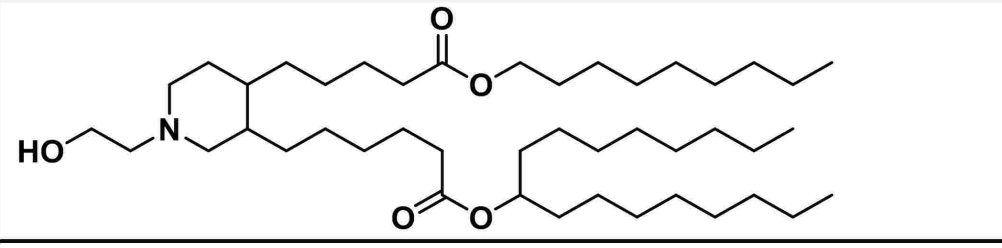
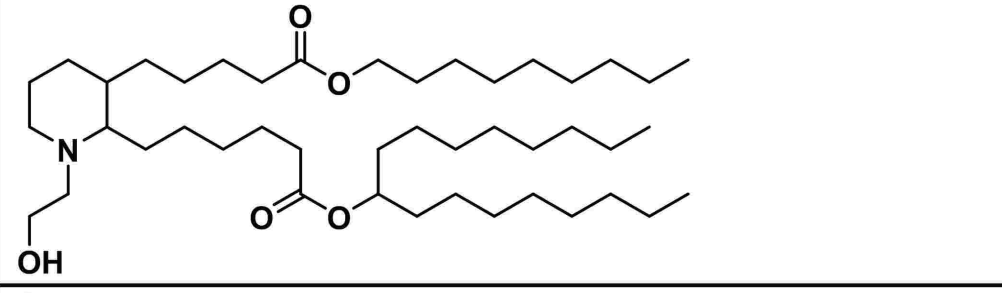
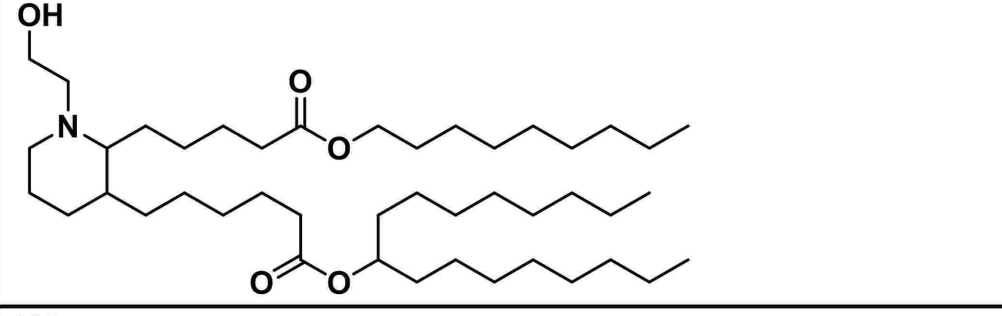
【表 6 - 6】

|                                                                                      |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------|----|
|    | 10 |
|    |    |
|   | 20 |
|  | 30 |
|  | 40 |

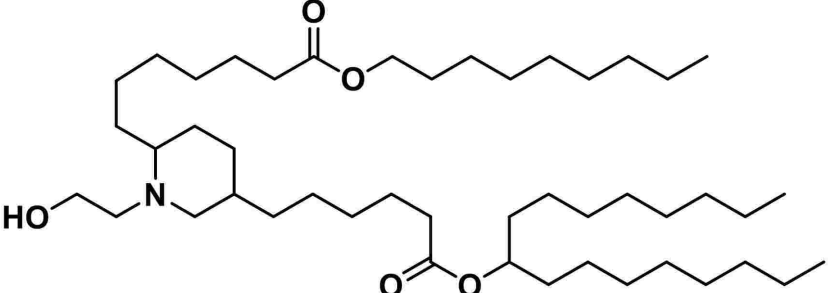
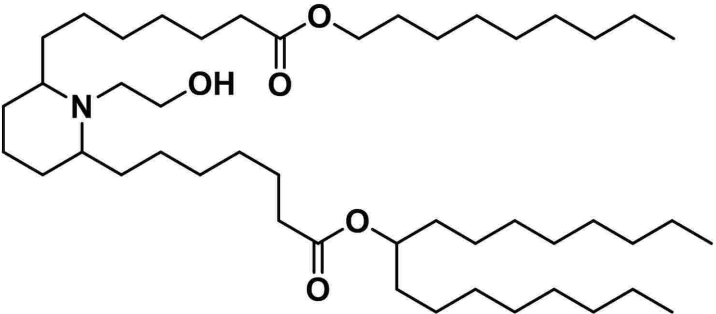
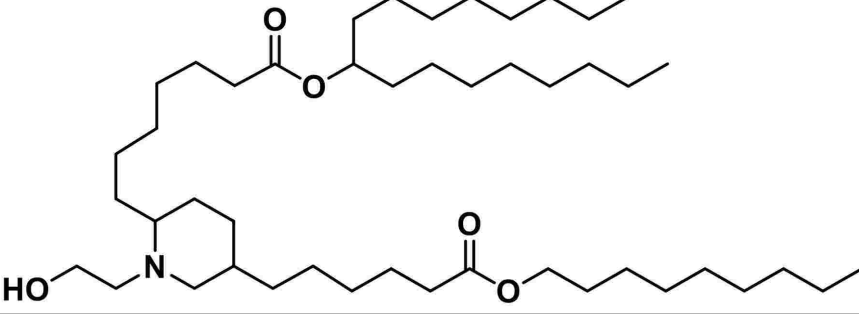
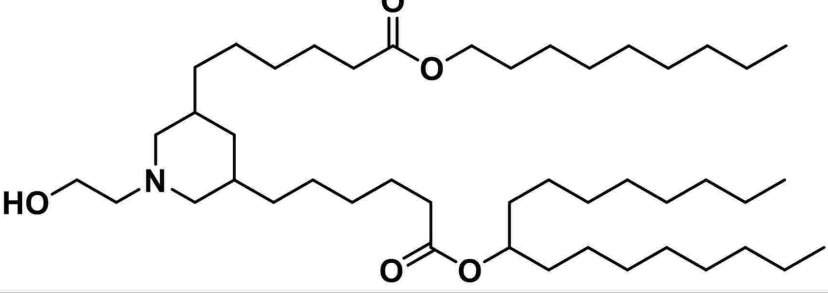
40

50

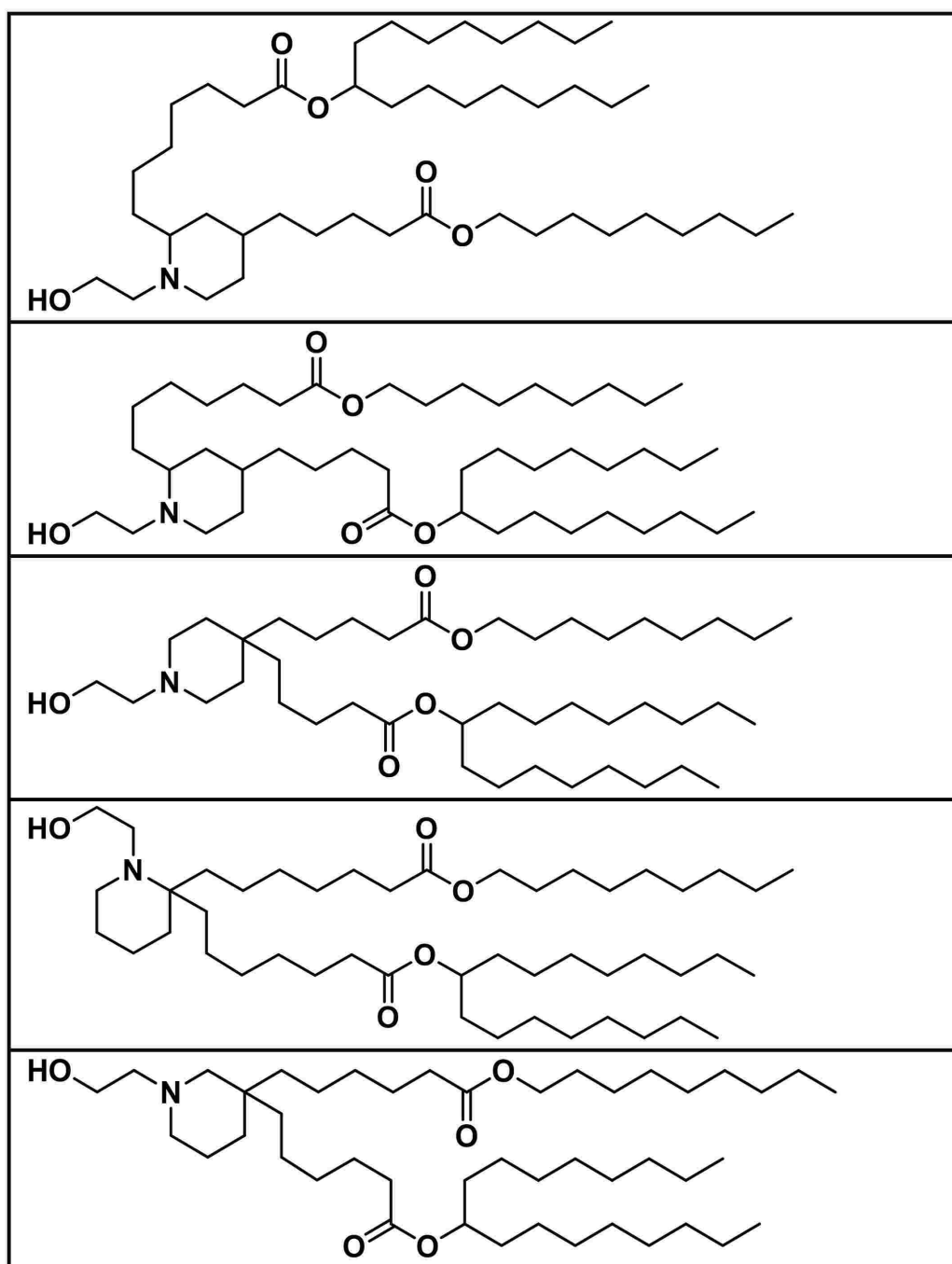
【表 6 - 7】

|                                                                                      |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------|----|
|    | 10 |
|    | 20 |
|   | 30 |
|  | 40 |

【表 6 - 8】

|                                                                                      |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------|----|
|    | 10 |
|     | 20 |
|   | 30 |
|  | 40 |

【表 6 - 9】



10

20

30

40

50

10

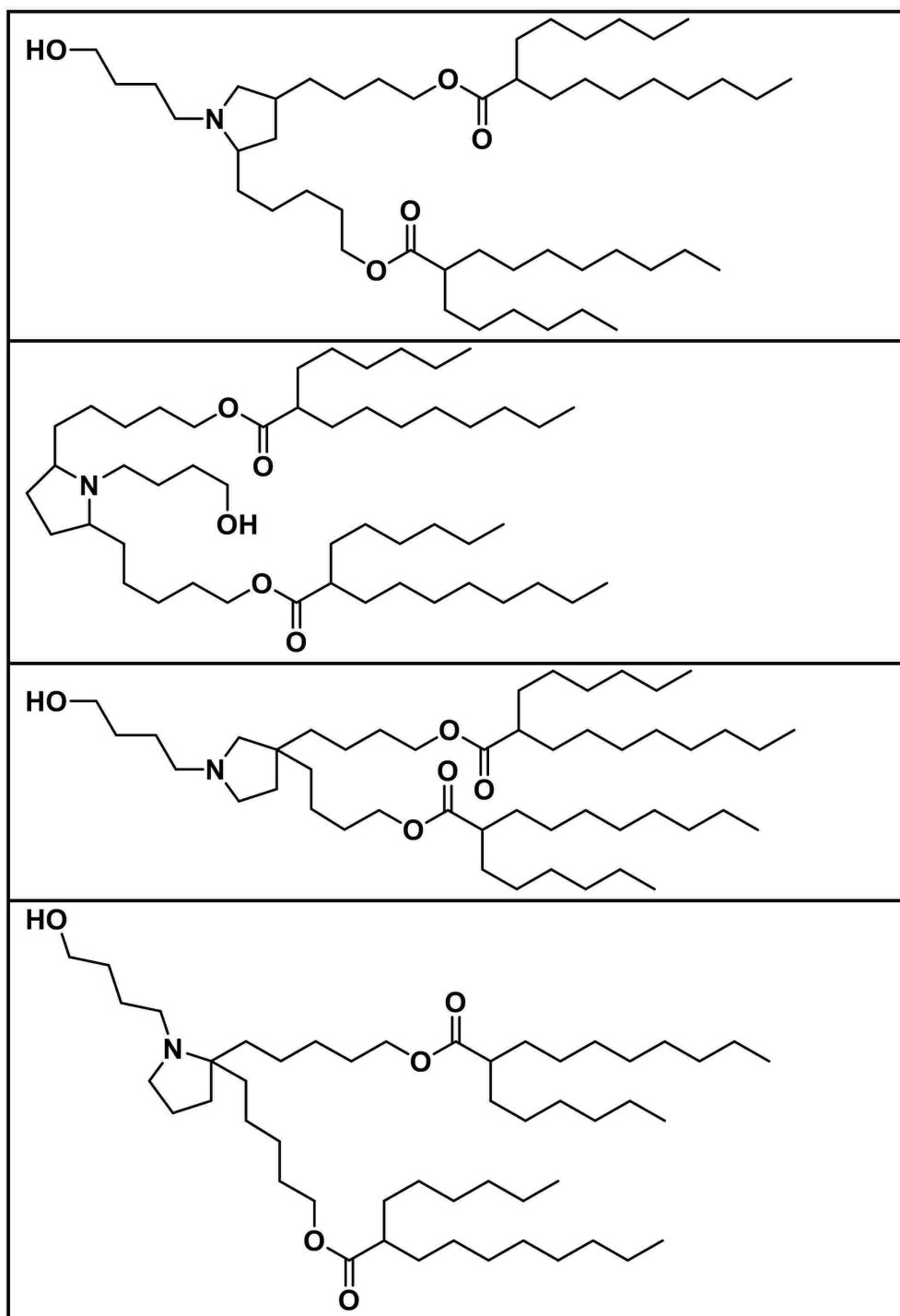


30

40

50

【表 6 - 1 1】



10

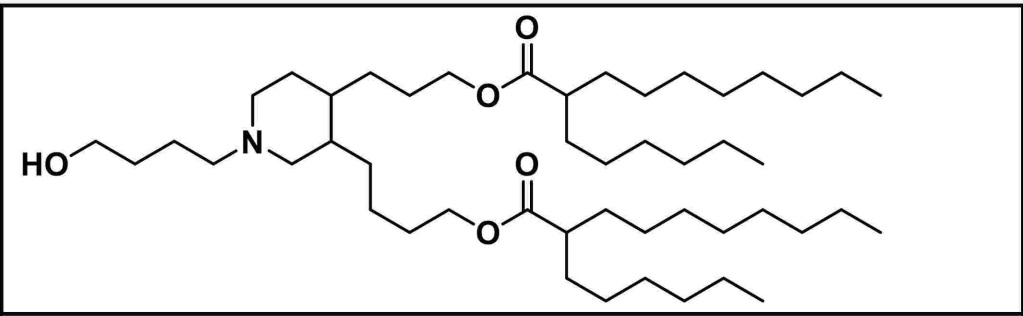
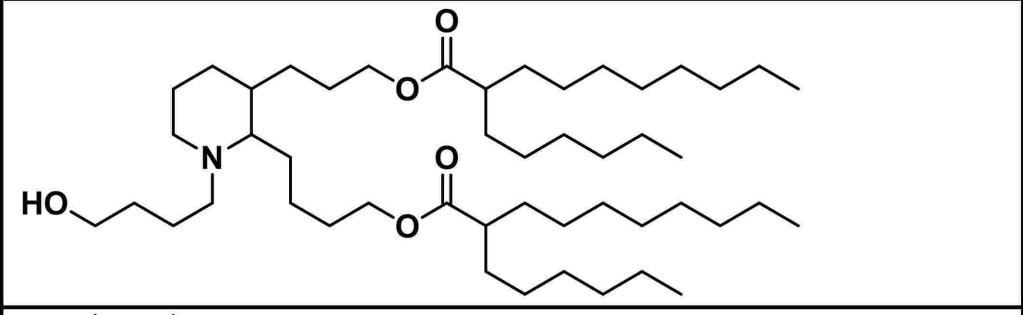
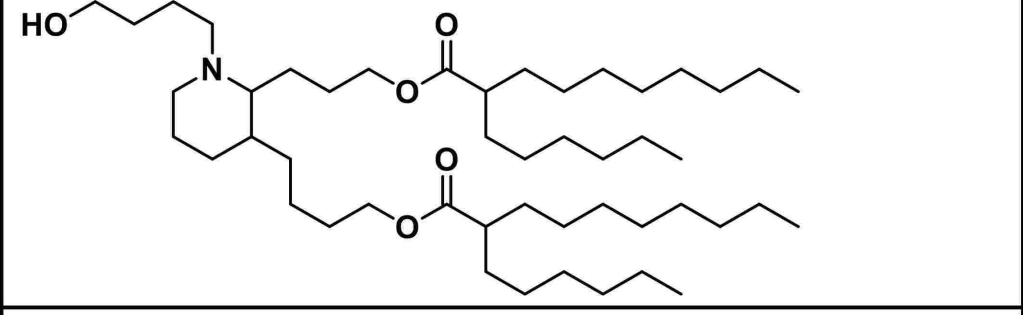
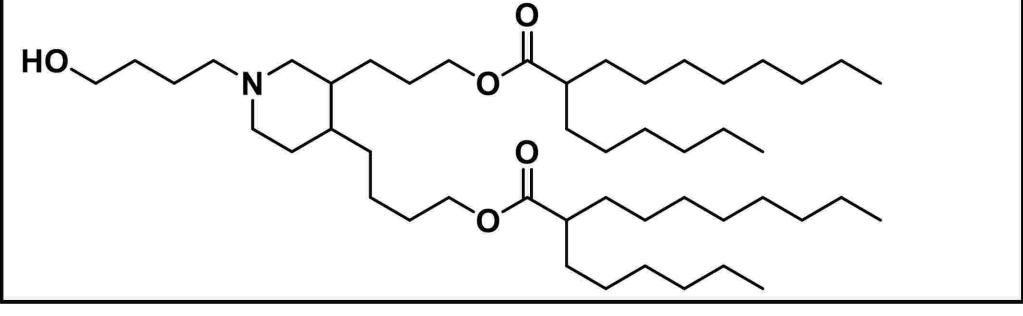
20

30

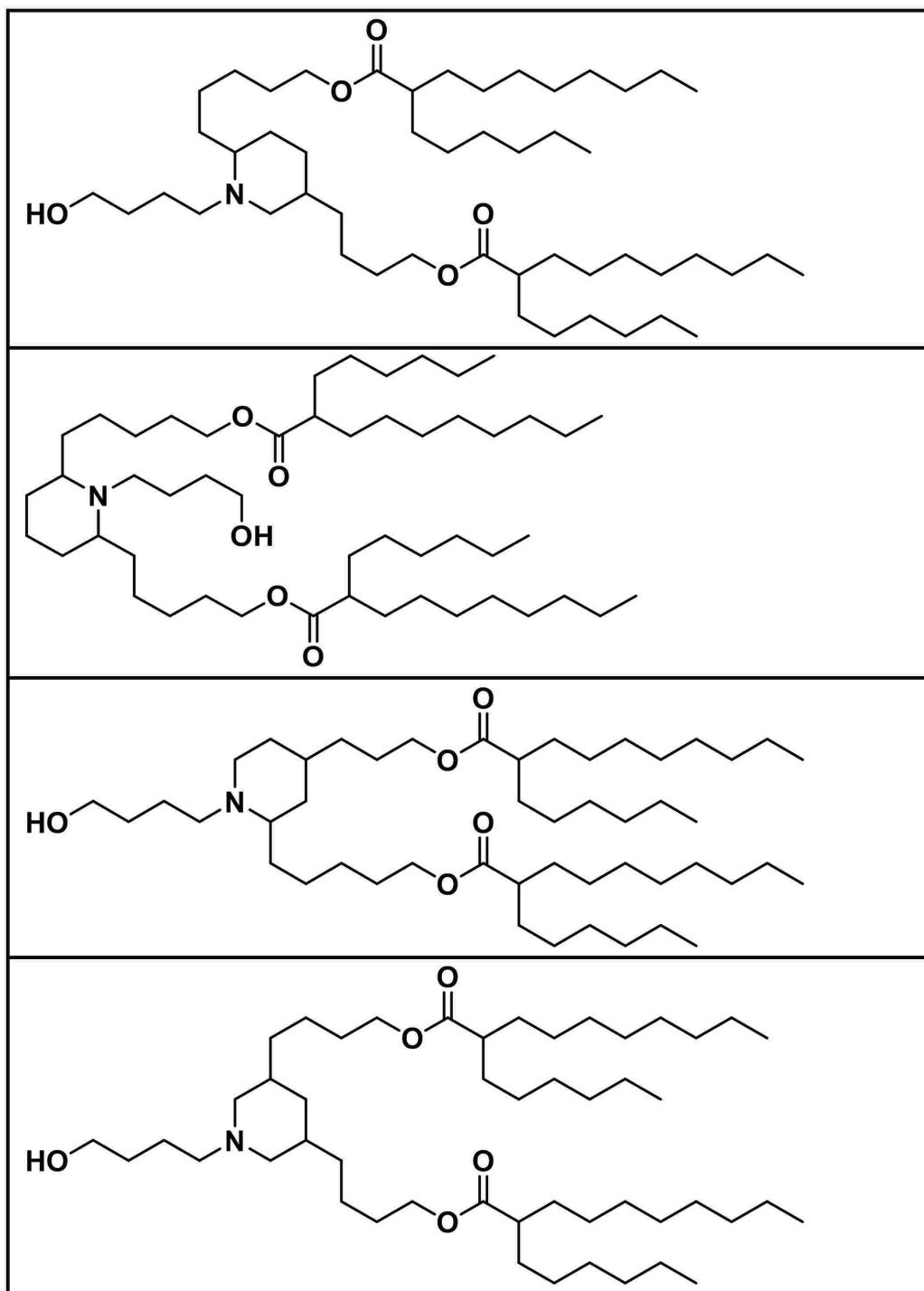
40

50

【表 6 - 1 2】

|                                                                                      |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------|----|
|    | 10 |
|    | 20 |
|   | 30 |
|  | 40 |

【表 6 - 1 3】



10

20

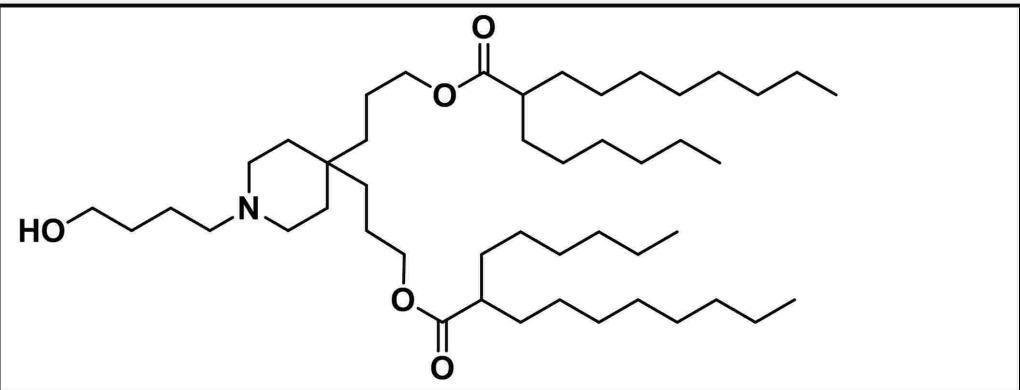
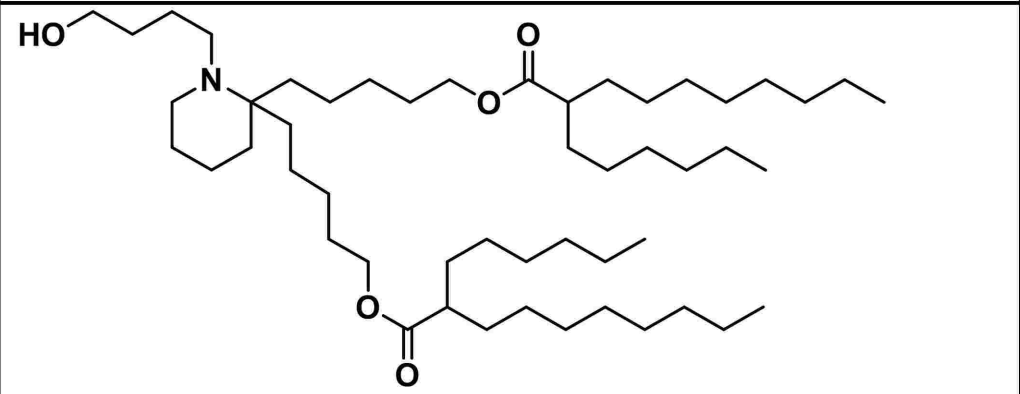
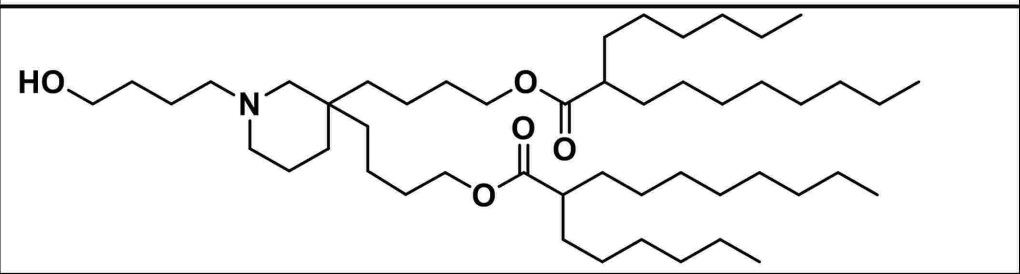
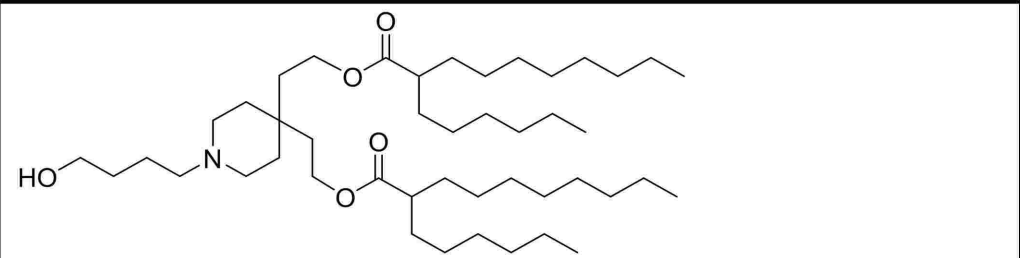
30

40

50

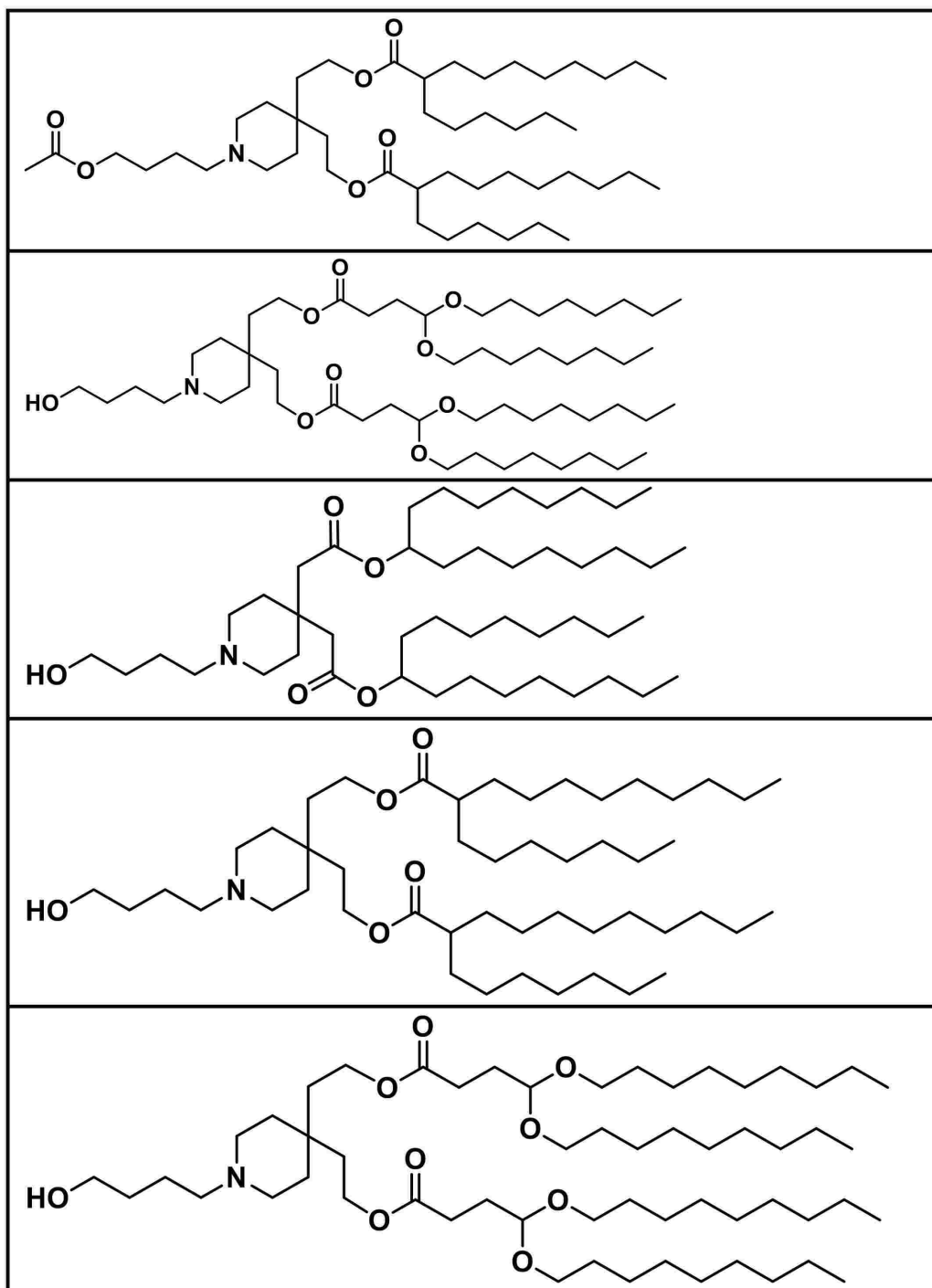


【表 6 - 1 4】

|                                                                                      |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------|----|
|    | 10 |
|   | 20 |
|  | 30 |
|  | 40 |

50

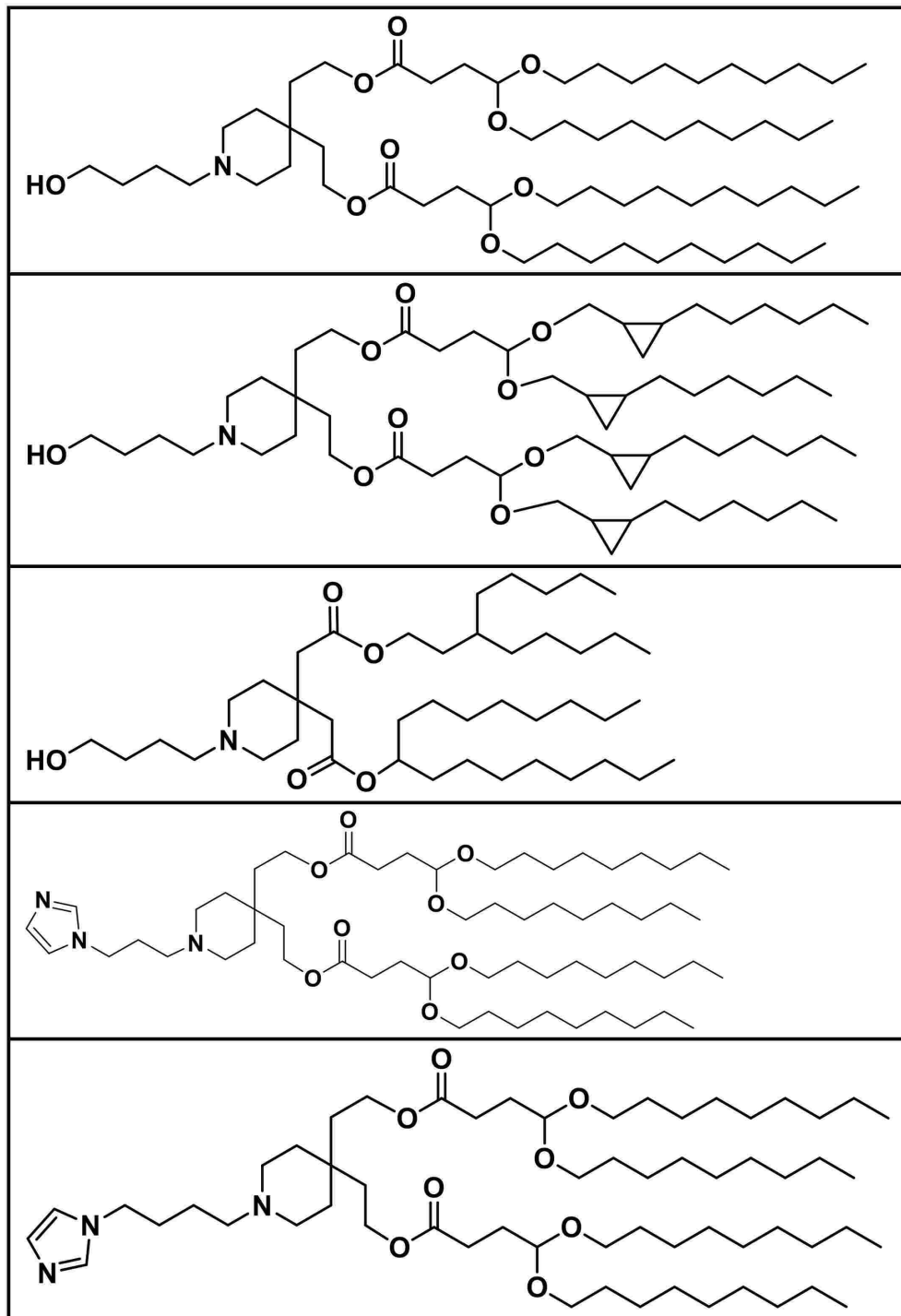
【表 6 - 1 5】



40

50

【表 6 - 1 6】



からなる群から選択される化合物またはその薬学的に許容可能な塩。

【請求項 3 6】

薬学的組成物であって、

a) ポリヌクレオチド、及び

b) 請求項 1 ～ 3 5 のいずれかに記載の化合物を含む送達ビヒクル

を含む、前記薬学的組成物。

【請求項 3 7】

前記ポリヌクレオチドは、DNA である、請求項 3 6 に記載の薬学的組成物。

【請求項 3 8】

前記ポリヌクレオチドは、RNAである、請求項37に記載の薬学的組成物。

【請求項39】

前記RNAは、低分子干渉RNA (siRNA) である、請求項38に記載の薬学的組成物。

【請求項40】

前記siRNAは、細胞における対象となる標的の発現を阻害または抑制する、請求項39に記載の薬学的組成物。

【請求項41】

前記ポリヌクレオチドは、少なくとも1つの修飾を含む、請求項36～39のいずれか1項に記載の薬学的組成物。

【請求項42】

追加のカチオン性脂質をさらに含む、請求項36～41のいずれかに記載の薬学的組成物。

【請求項43】

中性脂質をさらに含む、請求項36～42のいずれかに記載の薬学的組成物。

【請求項44】

アニオン性脂質をさらに含む、請求項36～43のいずれかに記載の薬学的組成物。

【請求項45】

ヘルパー脂質をさらに含む、請求項36～44のいずれかに記載の薬学的組成物。

【請求項46】

ステルス脂質をさらに含む、請求項36～45のいずれかに記載の薬学的組成物。

【請求項47】

前記脂質及び前記ポリヌクレオチドの重量比は、約100：1～約1：1である、請求項36～46のいずれかに記載の薬学的組成物。

【請求項48】

請求項36～47のいずれかに記載の薬学的組成物を含むワクチン製剤。

【請求項49】

請求項36～47のいずれかに記載の薬学的組成物を含むワクチン調製物。

【請求項50】

感染性物質に対して対象を免疫する方法であって、

c) 対象を請求項48に記載のワクチン製剤または請求項49のワクチン調製物と接触させること、及び

d) 免疫反応を誘発させること  
を含む、前記方法。

【請求項51】

対象となる少なくとも1つのタンパク質をコードするポリヌクレオチドを、それを必要とする対象の免疫細胞に送達する方法であって、前記方法は、請求項36～47のいずれか1項に記載の薬学的組成物を前記対象に投与することをむ、前記方法。

【請求項52】

前記免疫細胞は、T細胞である、請求項51に記載の方法。

【請求項53】

前記T細胞は、CD8+T細胞である、請求項52に記載の方法。

【請求項54】

前記T細胞は、T制御性細胞である、請求項52に記載の方法。

【請求項55】

前記T細胞は、CD4+T細胞である、請求項52に記載の方法。

【請求項56】

前記免疫細胞は、マクロファージ、樹状細胞、または肝臓免疫細胞である、請求項51に記載の方法。

【請求項57】

10

20

30

40

50

請求項 1～35 のいずれか 1 項に記載の化合物、またはその薬学的に許容可能な塩を含む脂質ナノ粒子 (LNP)。

【請求項 58】

(a) PEG-脂質；

(b) 構造脂質；及び

(c) イオン化可能ではない脂質及び／または双性イオン性脂質

をさらに含む、請求項 57 に記載の LNP。

【請求項 59】

前記イオン化可能な脂質は、イオン化可能なアミノ脂質を含む、請求項 58 に記載の LNP。

10

【請求項 60】

前記 PEG-脂質は、PEG-c-DOMG、PEG-DMG、PEG-DLPE、PEG-DMPE、PEG-DPPC、及び PEG-DSPC からなる群から選択される、請求項 58～59 のいずれか 1 項に記載の LNP。

【請求項 61】

前記構造脂質は、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、ウルソ酸、アルファートコフェロールからなる群から選択される、請求項 58～60 のいずれか 1 項に記載の LNP。

【請求項 62】

前記非イオン化可能な脂質は、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-3-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-ジウンデカノイル-sn-グリセロ-3-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-ジオ-オクタデセニル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (18:0 ジエテル 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)、ナトリウム (S)-2-アンモニオ-3-(((R)-2-(オレオイルオキシ)-3-(ステアロイルオキシ)プロポキシ)オキシドホスホリル)オキシ)プロパノエート (L-α-ホスファチジルセリン；脳 PS)、ジミリストイルホスファチジルコリン (DMPC)、ジミリストイルホスホエタノールアミン (DMPE)、ジミリストイルホスファチジルグリセロール (DMPG)、ジオレオイル-ホスファチジルエタノールアミン 4-(N-マレイミドメチル)-シクロヘキサン-1-カルボキシレート (DOPE-mal)、ジオレオイルホスファチジルグリセロール (DOPG)、1, 2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-(ホスホ-L-セリン) (DOPS)、アセル-融合性リン脂質 (DPHPE)、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン (DPPE)、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール (DPPG)、ジパルミトイルホスファチジルセ

20

30

40

50

リン (DPPS)、ジステアロイルホスファチジルコリン (DSPC)、ジステアロイル  
-ホスファチジル-エタノールアミン (DSPE)、ジステアロイルホスホエタノールア  
ミンイミダゾール (DSPEI)、1, 2-ジウンデカノイル-sn-グリセロ-ホスホ  
コリン (DUPC)、卵黄ホスファチジルコリン (EPC)、1, 2-ジオレオイル-sn  
-グリセロ-3-ホスフェート (18:1 PA; DOPA)、アンモニウムビス ( (S)  
-2-ヒドロキシ-3- (オレオイルオキシ) プロピル) ホスフェート (18:1  
DMP; LBPA)、1, 2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホ- (1'-ミ  
オ-イノシトール) (DOPI; 18:1 PI)、1, 2-ジステアロイル-sn-グ  
リセロ-3-ホスホ-L-セリン (18:0 PS)、1, 2-ジリノレオイル-sn-  
グリセロ-3-ホスホ-L-セリン (18:2 PS)、1-パルミトイル-2-オレオ  
イル-sn-グリセロ-3-ホスホ-L-セリン (16:0-18:1 PS; POPS)  
、1-ステアロイル-2-オレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホ-L-セリン (1  
8:0-18:1 PS)、1-ステアロイル-2-リノレオイル-sn-グリセロ-3  
-ホスホ-L-セリン (18:0-18:2 PS)、1-オレオイル-2-ヒドロキシ  
-sn-グリセロ-3-ホスホ-L-セリン (18:1 Lys o PS)、1-ステア  
ロイル-2-ヒドロキシ-sn-グリセロ-3-ホスホ-L-セリン (18:0 Lys  
o PS)、及びスフィンゴミエリンからなる群から選択されるリン脂質である、請求項  
58~61のいずれか1項に記載のLNP。

【請求項63】

標的化部位をさらに含む、請求項58~62のいずれか1項に記載のLNP。

【請求項64】

前記標的化部位は、抗体またはその断片である、請求項63に記載のLNP。

【請求項65】

活性剤をさらに含む、請求項58~64のいずれか1項に記載のLNP。

【請求項66】

前記活性剤は、核酸である、請求項65に記載のLNP。

【請求項67】

前記核酸は、リボ核酸である、請求項66に記載のLNP。

【請求項68】

前記リボ核酸は、低分子干渉RNA (siRNA)、非対称干渉RNA (aiRNA)  
、マイクロRNA (miRNA)、Dicer-基質RNA (dsRNA)、小ヘアピン  
RNA (shRNA)、メッセンジャーRNA (mRNA)、及び長鎖非コードRNA (lncRNA)  
からなる群から選択される少なくとも1つのリボ核酸である、請求項67  
に記載のLNP。

【請求項69】

前記核酸は、メッセンジャーRNA (mRNA) または環状RNAである、請求項66  
に記載のLNP。

【請求項70】

前記mRNAには、がん抗原をコードするオープンリーディングフレームが含まれる、  
請求項69に記載のLNP。

【請求項71】

前記mRNAには、免疫チェックポイント調節剤をコードするオープンリーディングフ  
レームが含まれる、請求項69に記載のLNP。

【請求項72】

前記mRNAには、ステムループ、鎖終結ヌクレオシド、ポリA配列、ポリアデニル化  
シグナル、及び5'キャップ構造からなる群から選択される少なくとも1つのモチーフが  
含まれる、請求項69~71のいずれか1項に記載のLNP。

【請求項73】

前記核酸は、配列番号1~54から選択されるタンパク質をコードするポリヌクレオチ  
ドである、請求項66に記載のLNP。

10

20

30

40

50

## 【請求項 74】

前記核酸は、ゲノム編集技術に好適である、請求項 66 に記載の LNP。

## 【請求項 75】

前記ゲノム編集技術は、クラスター化規則的間隔ショートパリンドロミックリピート (CRISPR) または転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ (TALEN) である、請求項 74 に記載の LNP。

## 【請求項 76】

前記核酸は、CRISPR RNA (crRNA)、トランス活性化 crRNA (tracrRNA)、単一ガイド RNA (sgRNA)、及び DNA 修復鋳型からなる群から選択されるゲノム編集技術に好適な少なくとも 1 つの核酸である、請求項 66 に記載の LNP。

10

## 【請求項 77】

前記 mRNA は、長さが少なくとも 30 ヌクレオチドである、請求項 69 のいずれか 1 項に記載の LNP。

## 【請求項 78】

前記 mRNA は、長さが少なくとも 300 ヌクレオチドである、請求項 69 のいずれか 1 項に記載の LNP。

## 【請求項 79】

請求項 57～78 のいずれか 1 項に記載の LNP、及び薬学的に許容可能な担体を含む薬学的組成物。

20

## 【請求項 80】

静脈内または筋肉内投与のために製剤化されている、請求項 79 に記載の薬学的組成物。

## 【請求項 81】

静脈内投与のために製剤化されている、請求項 80 に記載の薬学的組成物。

## 【請求項 82】

核酸を細胞に送達するための方法であって、前記細胞を請求項 57～78 のいずれか 1 項に記載の LNP または請求項 79～82 のいずれかに記載の薬学的組成物と接触させることを含む、前記方法。

## 【請求項 83】

機能的タンパク質の欠乏によって特性化される疾患を処置するための方法であって、前記方法は、前記疾患を有する対象に、請求項 82 のいずれか 1 項に記載の LNP を含む LNP 製剤を投与することを含み、前記 mRNA は、前記機能的タンパク質または前記機能的タンパク質と同じ生物学的活性を有するタンパク質をコードする、前記方法。

30

## 【請求項 84】

ポリペプチドの過剰発現によって特性化される疾患を処置するための方法であって、前記疾患を有する対象に、請求項 57～78 のいずれか 1 項に記載の LNP 及び siRNA を含む LNP 製剤を投与することを含み、前記 siRNA は、前記過剰発現したポリペプチドの発現を標的とする、前記方法。

## 【発明の詳細な説明】

40

## 【技術分野】

## 【0001】

## 関連出願の相互参照

本出願は、2021 年 9 月 14 日に出願された米国仮特許出願番号 63/244,146；2021 年 12 月 23 日に出願された 63/293,286；及び 2022 年 4 月 28 日に出願された 63/336,008（これらの各々の内容は、本明細書によってそれらの全体が参照により本明細書に組み込まれる）の利益、及び優先権を主張する。

## 【0002】

本開示は、核酸配列、ポリペプチドまたはペプチドの送達のための最適化システムならびに疾患、障害及び／または病態の処置のためのこれらの最適化システムの使用方法に関

50

する。

【背景技術】

【0003】

タンパク質は治療剤のための標準となっているが、多様な疾患及び治療適応症のための治療的モダリティとしての核酸の使用が過去数年にわたって注目を集めている。様々な企業は、核酸（例えば、*s i R N A*、*m R N A*、環状RNA、DNA、ASO等）がタンパク質ベースの療法と比較してより有効であり得ることを示しているが、治療剤が標的とされる細胞、組織、または器官に局在化されることを確保するために核酸及びタンパク質治療剤の両方のための標的化送達システムが必要とされている。

【0004】

脂質ナノ粒子等の脂質ベースの送達システムを含む現在の送達システムは、送達されるカーゴを保護することに焦点を置いているが、送達システムのために使用される脂質には焦点を置いておらず、しばしば、カーゴまたは送達システムの局所化送達に焦点を置いていない。改善された脂質ベースの送達システムのニーズが当該技術分野において存在する。

【発明の概要】

【0005】

本開示は、送達システムの送達ビヒクルにおいて使用され得る新たな脂質及び例えば、免疫細胞への、核酸及びタンパク質治療剤の局在化送達のための標的化システムをスクリーニングし、開発するための指向性発見プラットフォームを提供する。

【0006】

本開示の態様では、本明細書では、式（CY）、（CY-I）～（CY-IX）のいずれかの1つを有する脂質、もしくはその薬学的に許容可能な塩もしくは溶媒和物、もしくは表（I）における任意の脂質、またはその塩もしくは溶媒和物（以下を参照されたい）（まとめて「本開示の脂質（Lipids of the Disclosure）」と称され、各々は個々に「本開示の脂質（Lipid of the Disclosure）」と称される）が提供される。

【0007】

本開示の態様では、本明細書では、薬学的組成物であって、

【0008】

a）対象となる少なくとも1つのタンパク質をコードするポリヌクレオチド、及び

【0009】

b）少なくとも1つの脂質を含む送達ビヒクル

【0010】

を含み、組成物は、対象における免疫反応を誘発させる、薬学的組成物が提供される。

【0011】

一態様では、ポリヌクレオチドは、DNAである。

【0012】

一態様では、ポリヌクレオチドは、RNAである。

【0013】

一態様では、RNAは、低分子干渉RNA（*s i R N A*）である。

【0014】

一態様では、*s i R N A*は、細胞における対象となる標的の発現を阻害または抑制する。

【0015】

一態様では、阻害または抑制は、約30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%及び100%、または少なくとも20～30%、20～40%、20～50%、20～60%、20～70%、20～80%、20～90%、20～95%、20～100%、30～40%、30～50%、30～60%、30～70%、30～80%、30～90%、30～95%、30～100%、40～50%、40～60

10

20

30

40

50



%、40～70%、40～80%、40～90%、40～95%、40～100%、50～60%、50～70%、50～80%、50～90%、50～95%、50～100%、60～70%、60～80%、60～90%、60～95%、60～100%、70～80%、70～90%、70～95%、70～100%、80～90%、80～95%、80～100%、90～95%、90～100%または95～100%である。

【0016】

一態様では、ポリヌクレオチドは、実質的に環状である。

【0017】

一態様では、ポリヌクレオチドは、ペイロード配列領域に機能可能に連結された内部リボソーム進入部位（IRES）配列を含む。

【0018】

一態様では、IRES配列は、ピコルナウイルス相補的DNA、脳心筋炎ウイルス（EMCV）相補的DNA、ポリオウイルス相補的DNA、または*Drosophila melanogaster*からのアンテナペディア遺伝子に由来する配列を含む。

【0019】

一態様では、ポリヌクレオチドは、終結要素を含み、終結要素は、少なくとも1つの終止コドンを含む。

【0020】

一態様では、ポリヌクレオチドは、制御性要素を含む。

【0021】

一態様では、ポリヌクレオチドは、少なくとも1つのマスキング剤を含む。

【0022】

一態様では、実質的に環状のポリヌクレオチドは、*in vitro*転写を使用して生成される。

【0023】

一態様では、ペイロード配列領域は、非コード核酸配列を含む。

【0024】

一態様では、ペイロード配列領域は、コード核酸配列を含む。

【0025】

一態様では、コード核酸配列は、*Campylobacter jejuni*のための対象となるタンパク質をコードする。一態様では、コード核酸配列は、*Clostridium difficile*のための対象となるタンパク質をコードする。一態様では、コード核酸配列は、*Entamoeba histolytica*のための対象となるタンパク質をコードする。一態様では、コード核酸配列は、エンテロトキシンBのための対象となるタンパク質をコードする。一態様では、コード核酸配列は、ノーウォークウイルスまたはノロウイルスのための対象となるタンパク質をコードする。一態様では、コード核酸配列は、*Helicobacter pylori*のための対象となるタンパク質をコードする。一態様では、コード核酸配列は、ロタウイルスのための対象となるタンパク質をコードする。一態様では、コード核酸配列は、カンジダ酵母のための対象となるタンパク質をコードする。一態様では、コード核酸配列は、コロナウイルスのための対象となるタンパク質をコードする。一態様では、コード核酸配列は、SARS-CoVのための対象となるタンパク質をコードする。一態様では、コード核酸配列は、SARS-CoV-2のための対象となるタンパク質をコードする。一態様では、コード核酸配列は、MER-S-CoVのための対象となるタンパク質をコードする。一態様では、コード核酸配列は、エンテロウイルス71のための対象となるタンパク質をコードする。一態様では、コード核酸配列は、エプスタイン・バーウイルスのための対象となるタンパク質をコードする。一態様では、コード核酸配列は、グラム陰性菌のための対象となるタンパク質をコードする。一態様では、グラム陰性菌は、*Bordetella*である。一態様では、コード核酸配列は、グラム陽性菌のための対象となるタンパク質をコードする。一態様では、グラム陽性菌は、*Clostridium tetani*である。一態様では、グラム陽

10

20

30

40

50

性菌は、*Francisella tularensis*である。一態様では、グラム陽性菌は、*Streptococcus*菌である。一態様では、グラム陽性菌は、*Staphylococcus*菌である。一態様では、コード核酸配列は、肝炎のための対象となるタンパク質をコードする。一態様では、コード核酸配列は、ヒトサイトメガロウイルスのための対象となるタンパク質をコードする。一態様では、コード核酸配列は、ヒト免疫不全ウイルスのための対象となるタンパク質をコードする。一態様では、コード核酸配列は、ヒトパピローマウイルスのための対象となるタンパク質をコードする。一態様では、コード核酸配列は、インフルエンザのための対象となるタンパク質をコードする。一態様では、コード核酸配列は、ジョンカニンガムウイルスのための対象となるタンパク質をコードする。一態様では、コード核酸配列は、*Mycobacterium*のための対象となるタンパク質をコードする。一態様では、コード核酸配列は、ボックスウイルスのための対象となるタンパク質をコードする。一態様では、コード核酸配列は、*Pseudomonas aeruginosa*のための対象となるタンパク質をコードする。一態様では、コード核酸配列は、呼吸器合胞体ウイルスのための対象となるタンパク質をコードする。一態様では、コード核酸配列は、風疹ウイルスのための対象となるタンパク質をコードする。一態様では、コード核酸配列は、水痘帯状疱疹ウイルスのための対象となるタンパク質をコードする。一態様では、コード核酸配列は、チクングンヤウイルスのための対象となるタンパク質をコードする。一態様では、コード核酸配列は、デングウイルスのための対象となるタンパク質をコードする。一態様では、コード核酸配列は、狂犬病ウイルスのための対象となるタンパク質をコードする。一態様では、コード核酸配列は、*Trypanosoma cruzi*及び／またはシャーガス病のための対象となるタンパク質をコードする。一態様では、コード核酸配列は、エボラウイルスのための対象となるタンパク質をコードする。一態様では、コード核酸配列は、*Plasmodium falciparum*のための対象となるタンパク質をコードする。一態様では、コード核酸配列は、マールブルグウイルスのための対象となるタンパク質をコードする。一態様では、コード核酸配列は、日本脳炎ウイルスのための対象となるタンパク質をコードする。一態様では、コード核酸配列は、セントルイス脳炎ウイルスのための対象となるタンパク質をコードする。一態様では、コード核酸配列は、ウエストナイルウイルスのための対象となるタンパク質をコードする。一態様では、コード核酸配列は、黄熱病ウイルスのための対象となるタンパク質をコードする。一態様では、コード核酸配列は、*Bacillus anthracis*のための対象となるタンパク質をコードする。一態様では、コード核酸配列は、ボツリヌス毒素のための対象となるタンパク質をコードする。一態様では、コード核酸配列は、リシンのための対象となるタンパク質をコードする。一態様では、コード核酸配列は、志賀毒素及び／または志賀様毒素のための対象となるタンパク質をコードする。

10

20

30

40

50

#### 【0026】

一態様では、ポリヌクレオチドは、少なくとも1つの修飾を含む。

#### 【0027】

一態様では、塩基の少なくとも20%が修飾されている。一態様では、塩基の少なくとも30%が修飾されている。一態様では、塩基の少なくとも40%が修飾されている。一態様では、塩基の少なくとも50%が修飾されている。一態様では、塩基の少なくとも60%が修飾されている。一態様では、塩基の少なくとも70%が修飾されている。一態様では、塩基の少なくとも80%が修飾されている。一態様では、塩基の少なくとも90%が修飾されている。一態様では、塩基の少なくとも100%が修飾されている。一態様では、特定の塩基は、少なくとも1つの修飾を含む。

#### 【0028】

一態様では、塩基は、アデニンである。一態様では、アデニン塩基の少なくとも20%が修飾されている。一態様では、アデニン塩基の少なくとも30%が修飾されている。一態様では、アデニン塩基の少なくとも40%が修飾されている。一態様では、アデニン塩基の少なくとも50%が修飾されている。一態様では、アデニン塩基の少なくとも60%

が修飾されている。一態様では、アデニン塩基の少なくとも70%が修飾されている。一態様では、アデニン塩基の少なくとも80%が修飾されている。一態様では、アデニン塩基の少なくとも90%が修飾されている。一態様では、アデニン塩基の少なくとも100%が修飾されている。

【0029】

一態様では、塩基は、グアニンである。一態様では、グアニン塩基の少なくとも20%が修飾されている。一態様では、グアニン塩基の少なくとも30%が修飾されている。一態様では、グアニン塩基の少なくとも40%が修飾されている。一態様では、グアニン塩基の少なくとも50%が修飾されている。一態様では、グアニン塩基の少なくとも60%が修飾されている。一態様では、グアニン塩基の少なくとも70%が修飾されている。一態様では、グアニン塩基の少なくとも80%が修飾されている。一態様では、グアニン塩基の少なくとも90%が修飾されている。一態様では、グアニン塩基の少なくとも100%が修飾されている。

10

【0030】

一態様では、塩基は、シトシンである。一態様では、シトシン塩基の少なくとも20%が修飾されている。一態様では、シトシン塩基の少なくとも30%が修飾されている。一態様では、シトシン塩基の少なくとも40%が修飾されている。一態様では、シトシン塩基の少なくとも50%が修飾されている。一態様では、シトシン塩基の少なくとも60%が修飾されている。一態様では、シトシン塩基の少なくとも70%が修飾されている。一態様では、シトシン塩基の少なくとも80%が修飾されている。一態様では、シトシン塩基の少なくとも90%が修飾されている。一態様では、シトシン塩基の少なくとも100%が修飾されている。

20

【0031】

一態様では、塩基は、ウラシルである。一態様では、ウラシル塩基の少なくとも20%が修飾されている。一態様では、ウラシル塩基の少なくとも30%が修飾されている。一態様では、ウラシル塩基の少なくとも40%が修飾されている。一態様では、ウラシル塩基の少なくとも50%が修飾されている。一態様では、ウラシル塩基の少なくとも60%が修飾されている。一態様では、ウラシル塩基の少なくとも70%が修飾されている。一態様では、ウラシル塩基の少なくとも80%が修飾されている。一態様では、ウラシル塩基の少なくとも90%が修飾されている。一態様では、ウラシル塩基の少なくとも100%が修飾されている。

30

【0032】

一態様では、少なくとも1つの修飾は、ピリジン-4-オンリボヌクレオシド、5-アザ-ウリジン、2-チオ-5-アザ-ウリジン、2-チオウリジン、4-チオ-シュードウリジン、2-チオ-シュードウリジン、5-ヒドロキシウリジン、3-メチルウリジン、5-カルボキシメチル-ウリジン、1-カルボキシメチル-シュードウリジン、5-プロピニル-ウリジン、1-プロピニル-シュードウリジン、5-タウリノメチルウリジン、1-タウリノメチル-シュードウリジン、5-タウリノメチル-2-チオ-ウリジン、1-タウリノメチル-4-チオ-ウリジン、5-メチル-ウリジン、1-メチル-シュードウリジン、4-チオ-1-メチル-シュードウリジン、2-チオ-1-メチル-シュードウリジン、1-メチル-1-デアザ-シュードウリジン、2-チオ-1-メチル-1-デアザ-シュードウリジン、ジヒドロウリジン、ジヒドロシュードウリジン、2-チオ-ジヒドロウリジン、2-チオ-ジヒドロシュードウリジン、2-メトキシウリジン、2-メトキシ-4-チオ-ウリジン、4-メトキシ-シュードウリジン、及び4-メトキシ-2-チオ-シュードウリジン、5-アザ-シチジン、シュードイソシチジン、3-メチル-シチジン、N4-アセチルシチジン、5-ホルミルシチジン、N4-メチルシチジン、5-ヒドロキシメチルシチジン、1-メチル-シュードイソシチジン、ピロロ-シチジン、ピロロ-シュードイソシチジン、2-チオ-シチジン、2-チオ-5-メチル-シチジン、4-チオ-シュードイソシチジン、4-チオ-1-メチル-シュードイソシチジン、4-チオ-1-メチル-1-デアザ-シュードイソシチジン、1-メチル-1-デアザ-

40

50

シュードイソシチジン、ゼブラリン、5-アザ-ゼブラリン、5-メチル-ゼブラリン、5-アザ-2-チオ-ゼブラリン、2-チオ-ゼブラリン、2-メトキシ-シチジン、2-メトキシ-5-メチル-シチジン、4-メトキシ-シュードイソシチジン、及び4-メトキシ-1-メチル-シュードイソシチジン、2-アミノプリン、2, 6-ジアミノプリン、7-デアザ-アデニン、7-デアザ-8-アザ-アデニン、7-デアザ-2-アミノプリン、7-デアザ-8-アザ-2-アミノプリン、7-デアザ-2, 6-ジアミノプリン、7-デアザ-8-アザ-2, 6-ジアミノプリン、1-メチルアデノシン、N 6-メチルアデノシン、N 6-イソペンテニルアデノシン、N 6-(cis-ヒドロキシイソペンテニル)アデノシン、2-メチルチオ-N 6-(cis-ヒドロキシイソペンテニル)アデノシン、N 6-グリシニルカルバモイルアデノシン、N 6-トレオニルカルバモイルアデノシン、2-メチルチオ-N 6-トレオニルカルバモイルアデノシン、N 6, N 6-ジメチルアデノシン、7-メチルアデニン、2-メチルチオ-アデニン、及び2-メトキシ-アデニン、イノシン、1-メチル-イノシン、ワイオシン、ワイプトシン、7-デアザ-グアノシン、7-デアザ-8-アザ-グアノシン、6-チオ-グアノシン、6-チオ-7-デアザ-グアノシン、6-チオ-7-デアザ-8-アザ-グアノシン、7-メチル-グアノシン、6-チオ-7-メチル-グアノシン、7-メチルイノシン、6-メトキシ-グアノシン、1-メチルグアノシン、N 2-メチルグアノシン、N 2, N 2-ジメチルグアノシン、8-オキソ-グアノシン、7-メチル-8-オキソ-グアノシン、1-メチル-6-チオ-グアノシン、N 2-メチル-6-チオ-グアノシン、またはN 2, N 2-ジメチル-6-チオ-グアノシンである。

10

20

## 【0033】

一態様では、薬学的組成物は、表(I)における任意の脂質、式(CY-I)の構造を有する任意の脂質、式(CY-II)の構造を有する任意の脂質、式(CY-III)の構造を有する任意の脂質、式(CY-IV)の構造を有する任意の脂質、式(CY-V)の構造を有する任意の脂質、式(CY-VI)の構造を有する任意の脂質、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される少なくとも1つのカチオン性脂質を含む。

## 【0034】

一態様では、カチオン性脂質は、式(CY-I)の構造を有する任意の脂質である。

## 【0035】

一態様では、カチオン性脂質は、化合物CY1、CY2、CY3、CY9、CY10、CY11、CY12、CY22、CY23、CY24、CY30、CY31、CY32、CY33、CY43、CY44、CY45、CY50、CY51、CY52、及びCY53からなる群から選択される。

30

## 【0036】

一態様では、カチオン性脂質は、式(CY-II)の構造を有する任意の脂質である。

## 【0037】

一態様では、カチオン性脂質は、化合物CY4、CY5、CY16、CY17、CY18、CY25、CY26、CY37、CY38、CY39、CY46、CY56、及びCY57からなる群から選択される。

## 【0038】

一態様では、カチオン性脂質は、式(CY-III)の構造を有する任意の脂質である。

40

## 【0039】

一態様では、カチオン性脂質は、化合物CY6、CY14、CY27、CY35、CY47、及びCY55からなる群から選択される。

## 【0040】

一態様では、カチオン性脂質は、式(CY-IV)の構造を有する任意の脂質である。

## 【0041】

一態様では、カチオン性脂質は、化合物CY7、CY8、CY19、CY20、CY21、CY28、CY29、CY40、CY41、CY42、CY48、CY49、CY5

50

8、CY59、及びCY60からなる群から選択される。

【0042】

一態様では、カチオン性脂質は、式(CY-V)の構造を有する任意の脂質である。

【0043】

一態様では、カチオン性脂質は、式(CY-VI)の構造を有する任意の脂質である。

【0044】

一態様では、薬学的組成物は、追加のカチオン性脂質を含む。

【0045】

一態様では、薬学的組成物は、中性脂質を含む。

【0046】

一態様では、薬学的組成物は、アニオン性脂質を含む。

【0047】

一態様では、薬学的組成物は、ヘルパー脂質を含む。

【0048】

一態様では、薬学的組成物は、ステルス脂質を含む。

【0049】

一態様では、脂質及びポリヌクレオチドの重量比は、約100:1～約1:1である。

【0050】

一態様では、薬学的組成物は、それを必要とする対象における免疫細胞にカーゴまたはペイロードを送達する。免疫細胞は、T細胞、例えば、CD8+T細胞、CD4+T細胞、またはT制御性細胞であり得る。免疫細胞はまた、例えば、マクロファージまたは樹状細胞であり得る。

【0051】

一態様では、ワクチン製剤は、薬学的組成物を含む。

【0052】

一態様では、ワクチンは、式(I)～(VI)のいずれかを用いて調製される。

【0053】

一態様では、本明細書では、感染性物質に対して対象を免疫する方法であって、対象をワクチン製剤または調製物と接触させること及び免疫反応を誘発させることを含む、方法が提供される。

【0054】

一態様では、感染性物質は、*Campylobacter jejuni*、*Clostridium difficile*、*Entamoeba histolytica*、エンテロトキシンB、ノーウォークウイルスまたはノロウイルス、*Helicobacter pylori*、ロタウイルス、カンジダ酵母、SARS-CoV、SARS-CoV-2及びMERS-CoVを含むコロナウイルス、エンテロウイルス71、エプスタイン・バーウイルス、*Bordetella*を含むグラム陰性菌、*Clostridium tetani*、*Francisella tularensis*、*Streptococcus* 菌及び *Staphylococcus* 菌を含むグラム陽性菌、及び肝炎、ヒトサイトメガロウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、ヒトパピローマウイルス、インフルエンザ、ジョンカニンガムウイルス、*Mycobacterium*、ポックスウイルス、*Pseudomonas aeruginosa*、呼吸器合胞体ウイルス、風疹ウイルス、水痘帯状疱疹ウイルス、チクングンヤウイルス、デングウイルス、狂犬病ウイルス、*Trypanosoma cruzi* 及び／またはシャーガス病、エボラウイルス、*Plasmodium falciparum*、マールブルグウイルス、日本脳炎ウイルス、セントルイス脳炎ウイルス、ウエストナイルウイルス、黄熱病ウイルス、*Bacillus anthracis*、ボツリヌス毒素、リシン、または志賀毒素及び／または志賀様毒素である。

【0055】

一態様では、接触させることは、経腸（腸内に）、胃腸、硬膜周囲（硬膜内に）、経口

10

20

30

40

50

(口経由で)、経皮、脳内(大脳内に)、脳室内(脳室内に)、皮膚上(皮膚への塗布)、皮内(皮膚自体の中に)、皮下(皮膚の下に)、鼻腔内投与(経鼻で)、静脈内(静脈の中に)、静脈内ボラス、点滴静注、動脈内(動脈の中に)、筋肉内(筋肉の中に)、心臓内(心臓の中に)、骨内注入(骨髄の中に)、髄腔内(脊柱管の中に)、実質内(脳組織の中に)、腹腔内(腹腔の中への注入または注射)、膀胱内注入、硝子体内(経眼で)、海綿体内注入(病的腔の中に)、腔内(陰茎の基部の中に)、腔内投与、子宮内、羊膜外投与、経皮(全身分布用のインタクトな皮膚を介した拡散)、経粘膜(粘膜を介した拡散)、経腔、吹送法(吸引)、舌下、唇下、浣腸、点眼(結膜の上に)、点耳、耳介(耳の中または耳を介して)、頬側(頬に向けて)、結膜、皮膚、歯科的(歯(複数可)に)、電気浸透、子宮頸管内、洞内、気管内、体外、血液透析、浸透、間質内、腹腔内、羊膜内、関節内、胆管内、気管支内、嚢内、軟骨内(軟骨の中に)、尾内(馬尾の中に)、大槽内(小脳延髄大槽の中に)、角膜内(角膜の中に)、歯冠内、冠動脈内(冠動脈の中に)、海綿体内(陰茎の海綿体の拡張可能な空間の中に)、椎間板内(椎間板の中に)、管内(腺管の中に)、十二指腸内(十二指腸の中に)、硬膜内(硬膜の中または下に)、表皮内(表皮に)、食道内(食道に)、胃内(胃の中に)、歯肉内(歯肉の中に)、回腸内(小腸の遠位部分の中に)、病巣内(局在化病巣の中またはそれに直接導入される)、管腔内(管の内腔内)、リンパ内(リンパの中に)、髄内(骨の骨髄腔の中に)、髄膜内(髄膜の中に)、心筋内(心筋の中に)、眼内(眼の中に)、卵巣内(卵巣の中に)、心膜内(心膜の中に)、胸膜内(胸膜の中に)、前立腺内(前立腺の中に)、肺内(肺またはその気管支の中に)、洞内(鼻または眼窩周囲の洞の中に)、髄腔内(脊柱の中に)、関節滑液嚢内(関節の滑液腔の中に)、腱内(腱の中に)、精巣内(精巣の中に)、くも膜下腔内(任意レベルの脳脊髄軸の脳脊髄液の中に)、胸腔内(胸部の中に)、管内(器官の細管の中に)、腫瘍内(腫瘍の中に)、鼓室内(中耳の中に)、血管内(血管(複数可)の中に)、脳室内(脳室の中に)、イオントフォoresis(可溶性塩のイオンを身体組織に移動させる電流による)、灌注(傷口または体腔を浸し、または洗い流すこと)、喉頭(喉頭に直接)、経鼻胃(鼻から胃の中に)、密封包帯技術(局所経路投与後、領域を閉塞する包帯によって覆う)、眼(外眼部へ)、口腔咽頭(口腔及び咽頭に直接)、非経口、経皮、関節周囲、硬膜外、神経周囲、歯周、直腸、呼吸器(局在的または全身的効果のための経口または経鼻吸入によって気道の中に)、眼球後方(脳橋の背後または眼球の背後)、軟部組織、くも膜下、結膜下、粘膜下、局所、経胎盤(胎盤を介してまたは通過して)、経気管(気管の壁を介して)、経鼓膜(鼓室を通過してまたは介して)、尿管(尿管に)、尿道(尿道に)、腔、仙骨麻酔、診断、神経ブロック、胆汁灌流、心臓灌流、フォトフェーシス、または脊髄である。

10

20

30

40

50

【図面の簡単な説明】

【0056】

【図1】本開示の指向性発見プラットフォームの1つの実施形態を図示するダイアグラムである。

【図2】線状または環状であり得る本開示のオリジネーターポリヌクレオチドコンストラクトを図示するダイアグラムである。

【図3A-1】少なくとも1つのバーコード領域(BC)及び／または逆バーコード領域(CB)及びペイロード領域(P)を含み得る本開示の一連のベンチマークポリヌクレオチドコンストラクトを図示するダイアグラムである。

【図3A-2】同上。

【図3B】バーコード領域(BC)または逆バーコード領域(CB)がペイロード領域(P)と重複し得る本開示の一連のベンチマークポリヌクレオチドコンストラクトを図示するダイアグラムである。

【図3C-1】少なくとも1つのタグ及び／または標識を含み得る本開示の一連のベンチマークポリヌクレオチドコンストラクトを図示するダイアグラムである。

【図3C-2】同上。

【図4A-1】少なくとも1つのバーコード領域(BC)及び／または逆バーコード領域

(C B) 及びペイロード領域 (P) を含み得る本開示の一連の環状ベンチマークポリヌクレオチドコンストラクトを図示するダイアグラムである。

【図 4 A - 2】 同上。

【図 4 A - 3】 同上。

【図 4 B】 バーコード領域 (B C) または逆バーコード領域 (C B) がペイロード領域 (P) と重複し得る本開示の一連の環状ベンチマークポリヌクレオチドコンストラクトを図示するダイアグラムである。

【図 4 C - 1】 少なくとも 1 つのタグ及び／または標識を含み得る本開示の一連の環状ベンチマークポリヌクレオチドコンストラクトを図示するダイアグラムである。

【図 4 C - 2】 同上。

【図 5】 本開示の一連の送達ビヒクルを図示するダイアグラムである。

【発明を実施するための形態】

【0057】

#### I. 指向性送達システムの序論

核酸療法は、従来の療法と比較した場合に多用途性、より低い免疫反応及びより高い効力を考慮すると、様々な疾患及び治療的適応症を処置する有力な方法として知られるようになっていく。例えば、核酸療法には、メッセンジャー RNA (mRNA) の翻訳を低減するための低分子干渉 (siRNA)、対象となる標的を生成するための方法としての mRNA、ポリペプチドまたはペプチドの継続的生成を提供し得る、または他の RNA 分子と競合するためのスポンジであり得る環状 RNA (oRNA)、及び対象となる標的の継続的生成を提供するためのウイルスベクターの使用が含まれる。しかしながら、いくつかの核酸は、不安定であり、容易に分解するので、分解を防止するために及び核酸の細胞内送達を補助するために製剤化される必要がある。

【0058】

脂質ナノ粒子及びリポソーム等の脂質ベースの送達ビヒクルを含む現在の送達ビヒクルは、カーゴを保護することに焦点を置いているが、in vivo での特定の領域へのカーゴまたは送達ビヒクルの送達を局在化することに注意を向けていない。

【0059】

本明細書では、特定の標的領域、細胞または組織への局在化送達のための標的化システムを評価するための指向性発見プラットフォームが提供される。図 1 に示されているように、指向性発見プラットフォームは、ライブラリにおける標的化システムの指向性またはシグネチャプロファイルを決定するために脂質ナノ粒子 (LNP) ライブラリ及び／または AAV のライブラリを評価するために使用され得る。ライブラリは、対象 (例えば、非ヒト霊長類、ウサギ、マウス、ラットまたは別の哺乳動物) に投与され、対象の器官及び組織は、スキャン及び／または採取され、分析されて、ライブラリにおける LNP または AAV に含有されるまたは関連付けられた識別子 (例えば、バーコード、標識、シグナル及び／またはタグ) の位置が決定され得る。この分析は、ライブラリにおける各 LNP 及び AAV の指向性シグネチャまたはプロファイルを提供する。

【0060】

#### オリジネーターコンストラクト構造

指向性発見プラットフォームの標的化システムには、カーゴまたはペイロードをコードするまたは含むオリジネーターコンストラクトが含まれ得る。線状または環状であり得るオリジネーターポリヌクレオチドコンストラクト 100 の例が図 2 に提供される。オリジネーターポリヌクレオチドコンストラクト 100 には、対象となるペイロードまたはカーゴであり、またはそれをコードする少なくとも 1 つのペイロード領域 10 が含まれ得る。オリジネーターポリヌクレオチドコンストラクト 100 は、1 または 2 つの隣接領域 20 を含有し得、隣接領域 20 は、ペイロード領域 10 に対して 5' またはペイロード領域 10 に対して 3' に位置し得る。いくつかの例では、オリジネーターポリヌクレオチドコンストラクト 100 は、隣接領域 20 を含有しない。オリジネーターポリヌクレオチドコンストラクト 100 の隣接領域 20 には、少なくとも 1 つの制御性領域 30 が含まれ得る。

オリジネーターポリヌクレオチドコンストラクト100の少なくとも1つの隣接領域20には、少なくとも1つの識別子領域40が含まれ得る。識別子領域40は、バーコード、標識、シグナル及び／またはタグであり得るがこれらに限定されない。また、識別子領域40は、ペイロード領域10内に位置し得、またはペイロード領域10及び少なくとも1つの隣接領域20に位置し得る。

【0061】

いくつかの実施形態では、オリジネーターコンストラクトは、約5～約10,000個の残基を含む。非限定的な例として、オリジネーターコンストラクトの長さは、5～30、5～50、5～100、5～250、5～500、5～1,000、5～1,500、5～3,000、5～5,000、5～7,000、5～10,000、30～50、30～100、30～250、30～500、30～1,000、30～1,500、30～3,000、30～5,000、30～7,000、30～10,000、100～250、100～500、100～1,000、100～1,500、100～3,000、100～5,000、100～7,000、100～10,000、500～1,000、500～1,500、500～2,000、500～3,000、500～5,000、500～7,000、500～10,000、1,000～1,500、1,000～2,000、1,000～3,000、1,000～5,000、1,000～7,000、1,000～10,000、1,500～3,000、1,500～5,000、1,500～7,000、1,500～10,000、2,000～3,000、2,000～5,000、2,000～7,000、2,000～10,000、3,000～5,000、3,000～7,000、3,000～10,000、5,000～7,000、5,000～10,000、及び7,000～10,000であり得る。

10

20

【0062】

いくつかの実施形態では、ペイロード領域の長さは、長さが約5残基を超え、例えば、限定されないが、少なくとも約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、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、3,000、4,000、5,000、6,000、7,000、8,000、9,000、10,000または10,000を超える残基またはそれを超える。

30

【0063】

いくつかの実施形態では、隣接領域は、独立して、長さが0～10,000残基、例えば、限定されないが、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、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、3,000、4,000、5,000、6,000、7,000、8,000、9,000、及び10,000の範囲であり得る。

40

【0064】

いくつかの実施形態では、制御性領域は、独立して、長さが0～3,000残基、例えば、限定されないが、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、40、45、50、55、60、70、80、90、100、120、140、160、180、200、2

50



50、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の範囲であり得る。

#### 【0065】

いくつかの実施形態では、オリジネーターコンストラクトは、オリジネーターコンストラクトの3'末端と5'末端との間の相互作用を補助するための分子を生成するために環状化、またはコンカテマー化され得る。

#### 【0066】

ベンチマークコンストラクト構造

少なくとも1つの識別子（例えば、バーコード、標識、シグナル及び／またはタグ）を含むオリジネーターコンストラクトは、ベンチマークコンストラクトと称される。ベンチマークポリヌクレオチドコンストラクトは、ベンチマークポリヌクレオチドコンストラクトを通して同じまたは異なり得る1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個またはそれを超える識別子を含み得る。

#### 【0067】

いくつかの実施形態では、識別子領域は、独立して、長さが1～3,000残基、例えば、限定されないが、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、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の範囲であり得る。非限定的な例として、識別子領域は、長さが1～5残基、2～5残基、3～5残基、2～7残基、3～7残基、1～10残基、2～10残基、3～10残基、5～10残基、7～10残基、1～15残基、2～15残基、3～15残基、5～15残基、7～15残基、10～15残基、12～15残基、1～20残基、2～20残基、3～20残基、5～20残基、7～20残基、10～20残基、12～20残基、15～20残基、17～20残基、1～25残基、2～25残基、3～25残基、5～25残基、7～25残基、10～25残基、12～25残基、15～25残基、17～25残基、20～25残基、1～30残基、2～30残基、3～30残基、5～30残基、7～30残基、10～30残基、12～30残基、15～30残基、17～30残基、20～30残基、25～30残基、1～35残基、2～35残基、3～35残基、5～35残基、7～35残基、10～35残基、12～35残基、15～35残基、17～35残基、20～35残基、25～35残基、30～35残基、1～35残基、2～35残基、3～35残基、5～35残基、7～35残基、10～35残基、12～35残基、15～35残基、17～35残基、20～35残基、25～35残基、30～35残基、1～40残基、2～40残基、3～40残基、5～40残基、7～40残基、10～40残基、12～40残基、15～40残基、17～40残基、20～40残基、25～40残基、30～40残基、35～40残基、1～45残基、2～45残基、3～45残基、5～45残基、7～45残基、10～45残基、12～45残基、15～45残基、17～45残基、20～45残基、25～45残基、30～45残基、35～45残基、40～45残基、1～50残基、2～50残基、3～50残基、5～50残基、7～50残基、10～50残基、12～50残基、15～50残基、17～50残基、20～50残基、25～50残基、30～50残基、35～50残基、40～50残基、または45～50残基であり得る。

#### 【0068】

線状または環状であり得る少なくとも1つの識別子を有するベンチマークポリヌクレオチドコンストラクトの非限定的な例は、図3A、図3B及び図3Cに提供される。少なくとも1つの識別子を有する環状ベンチマークポリヌクレオチドコンストラクトの非限定的

10

20

30

40

50

な例は、図 4 A、図 4 B 及び図 4 C に提供される。図 3 A、図 3 B、図 4 A 及び図 4 B において、ベンチマークポリヌクレオチドコンストラクトには、ペイロード領域（図において「P」と称される）及び少なくとも 1 つの識別子領域（図において「BC」と称される）及び／または逆識別子領域（図において「CB」と称される）が含まれる。図 3 C 及び図 4 C において、ベンチマークポリヌクレオチドコンストラクトには、ベンチマークポリヌクレオチドコンストラクトに関連付けられたペイロード領域（図において「P」と称される）及び少なくとも 1 つの識別子部位が含まれる。

【0069】

いくつかの実施形態では、ベンチマークコンストラクトにおける識別子領域は、ペイロード領域と重複する。本明細書で使用される場合、「重複する」は、識別子領域の少なくとも 1 つのヌクレオチドがペイロード領域内に伸長することを意味する。いくつかの態様では、識別子領域は、ペイロード領域と 1 ヌクレオチド、2 ヌクレオチド、3 ヌクレオチド、4 ヌクレオチド、5 ヌクレオチド、6 ヌクレオチド、7 ヌクレオチド、8 ヌクレオチド、9 ヌクレオチド、10 ヌクレオチド、11 ヌクレオチド、12 ヌクレオチド、13 ヌクレオチド、14 ヌクレオチド、15 ヌクレオチド、16 ヌクレオチド、17 ヌクレオチド、18 ヌクレオチド、19 ヌクレオチド、20 ヌクレオチド、21 ヌクレオチド、22 ヌクレオチド、23 ヌクレオチド、24 ヌクレオチド、25 ヌクレオチド、26 ヌクレオチド、27 ヌクレオチド、28 ヌクレオチド、29 ヌクレオチド、30 ヌクレオチド、31 ヌクレオチド、32 ヌクレオチド、33 ヌクレオチド、34 ヌクレオチド、35 ヌクレオチド、36 ヌクレオチド、37 ヌクレオチド、38 ヌクレオチド、39 ヌクレオチド、40 ヌクレオチド、41 ヌクレオチド、42 ヌクレオチド、43 ヌクレオチド、44 ヌクレオチド、45 ヌクレオチド、46 ヌクレオチド、47 ヌクレオチド、48 ヌクレオチド、49 ヌクレオチド、50 ヌクレオチドまたは 50 ヌクレオチド超重複する。いくつかの態様では、識別子領域は、ペイロード領域と 1～5 ヌクレオチド、2～5 ヌクレオチド、3～5 ヌクレオチド、2～7 ヌクレオチド、3～7 ヌクレオチド、1～10 ヌクレオチド、2～10 ヌクレオチド、3～10 ヌクレオチド、5～10 ヌクレオチド、7～10 ヌクレオチド、1～15 ヌクレオチド、2～15 ヌクレオチド、3～15 ヌクレオチド、5～15 ヌクレオチド、7～15 ヌクレオチド、10～15 ヌクレオチド、12～15 ヌクレオチド、1～20 ヌクレオチド、2～20 ヌクレオチド、3～20 ヌクレオチド、5～20 ヌクレオチド、7～20 ヌクレオチド、10～20 ヌクレオチド、12～20 ヌクレオチド、15～20 ヌクレオチド、17～20 ヌクレオチド、1～25 ヌクレオチド、2～25 ヌクレオチド、3～25 ヌクレオチド、5～25 ヌクレオチド、7～25 ヌクレオチド、10～25 ヌクレオチド、12～25 ヌクレオチド、15～25 ヌクレオチド、17～25 ヌクレオチド、20～25 ヌクレオチド、1～30 ヌクレオチド、2～30 ヌクレオチド、3～30 ヌクレオチド、5～30 ヌクレオチド、7～30 ヌクレオチド、10～30 ヌクレオチド、12～30 ヌクレオチド、15～30 ヌクレオチド、17～30 ヌクレオチド、20～30 ヌクレオチド、25～30 ヌクレオチド、1～35 ヌクレオチド、2～35 ヌクレオチド、3～35 ヌクレオチド、5～35 ヌクレオチド、7～35 ヌクレオチド、10～35 ヌクレオチド、12～35 ヌクレオチド、15～35 ヌクレオチド、17～35 ヌクレオチド、20～35 ヌクレオチド、25～35 ヌクレオチド、30～35 ヌクレオチド、1～40 ヌクレオチド、2～40 ヌクレオチド、3～40 ヌクレオチド、5～40 ヌクレオチド、7～40 ヌクレオチド、10～40 ヌクレオチド、12～40 ヌクレオチド、15～40 ヌクレオチド、17～40 ヌクレオチド、20～40 ヌクレオチド、25～40 ヌクレオチド、30～40 ヌクレオチド、35～40 ヌクレオチド、1～45 ヌクレオチド、2～45 ヌクレオチド、3～45 ヌクレオチド、5～45 ヌクレオチド、7～45 ヌクレオチド、10～45 ヌクレオチド、12～45 ヌクレオチド、15～45 ヌクレオチド、17～45 ヌクレオチド、

10

20

30

40

50

20～45ヌクレオチド、25～45ヌクレオチド、30～45ヌクレオチド、35～45ヌクレオチド、40～45ヌクレオチド、1～50ヌクレオチド、2～50ヌクレオチド、3～50ヌクレオチド、5～50ヌクレオチド、7～50ヌクレオチド、10～50ヌクレオチド、12～50ヌクレオチド、15～50ヌクレオチド、17～50ヌクレオチド、20～50ヌクレオチド、25～50ヌクレオチド、30～50ヌクレオチド、35～50ヌクレオチド、40～50ヌクレオチド、または45～50ヌクレオチド重複する。

【0070】

いくつかの実施形態では、ベンチマークポリヌクレオチドコンストラクトは、ペイロード領域及び識別子領域を含む。識別子領域は、ペイロード領域に対して5'、ペイロード領域に対して3'に位置し得、または識別子領域は、ペイロード領域の5'末端または3'末端と重複し得る。

10

【0071】

いくつかの実施形態では、ベンチマークポリヌクレオチドコンストラクトは、ペイロード領域及び2つの識別子領域を含む。各識別子領域は、独立して、ペイロード領域に対して5'、ペイロード領域に対して3'に位置し得、または識別子領域は、ペイロード領域の5'末端または3'末端と重複し得る。

【0072】

非限定的な例として、第1の識別子領域は、ペイロード領域に対して5'に位置し、第2の識別子領域は、ペイロード領域に対して3'に位置する。非限定的な例として、第1及び第2の識別子領域は、ペイロード領域に対して5'に位置する。非限定的な例として、第1及び第2の識別子領域は、ペイロード領域に対して3'に位置する。

20

【0073】

非限定的な例として、第1の識別子領域は、逆にされており、ペイロード領域に対して5'に位置し、第2の識別子領域は、ペイロード領域に対して3'に位置する。非限定的な例として、第1の識別子領域は、逆にされており、ペイロード領域に対して5'に位置し、第2の識別子領域は、逆にされており、ペイロード領域に対して3'に位置する。非限定的な例として、第1の識別子領域は、ペイロード領域に対して5'に位置し、第2の識別子領域は、逆にされており、ペイロード領域に対して3'に位置する。非限定的な例として、第1及び第2の識別子領域はいずれとも、逆であり、ペイロード領域に対して5'に位置する。非限定的な例として、第1及び第2の識別子領域は、ペイロード領域に対して5'に位置し、第1の識別子領域は、逆にされている。非限定的な例として、第1及び第2の識別子領域は、ペイロード領域に対して5'に位置し、第2の識別子領域は、逆にされている。非限定的な例として、第1及び第2の識別子領域はいずれとも、逆であり、ペイロード領域に対して3'に位置する。非限定的な例として、第1及び第2の識別子領域は、ペイロード領域に対して3'に位置し、第1の識別子領域は、逆にされている。非限定的な例として、第1及び第2の識別子領域は、ペイロード領域に対して3'に位置し、第2の識別子領域は、逆にされている。

30

【0074】

非限定的な例として、第1の識別子領域は、ペイロード領域に対して5'に位置し、ペイロード領域と重複し、第2の識別子領域は、ペイロード領域に対して3'に位置する。非限定的な例として、第1の識別子領域は、ペイロード領域に対して5'に位置し、第2の識別子領域は、ペイロード領域に対して3'に位置し、ペイロード領域と重複する。

40

【0075】

非限定的な例として、第1及び第2の識別子領域は、ペイロード領域に対して5'に位置し、第2の識別子領域は、ペイロード領域と重複する。非限定的な例として、第1及び第2の識別子領域は、ペイロード領域に対して3'に位置し、第1の識別子領域は、ペイロード領域と重複する。

【0076】

非限定的な例として、第1の識別子領域は、逆にされており、ペイロード領域に対して

50

5'に位置し、ペイロード領域と重複し、第2の識別子領域は、ペイロード領域に対して3'に位置する。非限定的な例として、第1の識別子領域は、逆にされており、ペイロード領域に対して5'に位置し、第2の識別子領域は、ペイロード領域に対して3'に位置し、ペイロード領域と重複する。非限定的な例として、第1の識別子領域は、逆にされており、ペイロード領域に対して5'に位置し、第2の識別子領域は、ペイロード領域に対して3'に位置し、第1及び第2の識別子領域の両方は、ペイロード領域と重複する。

【0077】

非限定的な例として、第1の識別子領域は、逆にされており、ペイロード領域に対して5'に位置し、ペイロード領域と重複し、第2の識別子領域は、逆にされており、ペイロード領域に対して3'に位置する。非限定的な例として、第1の識別子領域は、逆にされており、ペイロード領域に対して5'に位置し、第2の識別子領域は、逆にされており、ペイロード領域に対して3'に位置し、ペイロード領域と重複する。非限定的な例として、第1の識別子領域は、逆にされており、ペイロード領域に対して5'に位置し、第2の識別子領域は、逆にされており、ペイロード領域に対して3'に位置し、第1及び第2の識別子領域の両方は、ペイロード領域と重複する。

10

【0078】

非限定的な例として、第1の識別子領域は、ペイロード領域に対して5'に位置し、ペイロード領域と重複し、第2の識別子領域は、逆にされており、ペイロード領域に対して3'に位置する。非限定的な例として、第1の識別子領域は、ペイロード領域に対して5'に位置し、第2の識別子領域は、逆にされており、ペイロード領域に対して3'に位置し、ペイロード領域と重複する。非限定的な例として、第1の識別子領域は、ペイロード領域に対して5'に位置し、第2の識別子領域は、逆にされており、ペイロード領域に対して3'に位置し、第1及び第2の識別子領域の両方は、ペイロード領域と重複する。

20

【0079】

非限定的な例として、第1及び第2の識別子領域は、いずれとも逆であり、ペイロード領域に対して5'に位置し、第2の識別子領域は、ペイロード領域と重複する。非限定的な例として、第1及び第2の識別子領域は、ペイロード領域に対して5'に位置し、第1の識別子領域は、逆にされており、第2の識別子領域は、ペイロード領域と重複する。非限定的な例として、第1及び第2の識別子領域は、ペイロード領域に対して5'に位置し、第2の識別子領域は、逆にされており、ペイロード領域と重複する。非限定的な例として、第1及び第2の識別子領域は、いずれとも逆であり、ペイロード領域に対して3'に位置し、第1の識別子領域は、ペイロード領域と重複する。非限定的な例として、第1及び第2の識別子領域は、ペイロード領域に対して3'に位置し、第1の識別子領域は、逆にされており、ペイロード領域と重複する。非限定的な例として、第1及び第2の識別子領域は、ペイロード領域に対して3'に位置し、第2の識別子領域は、逆にされており、第1のペイロード領域は、ペイロード領域と重複する。

30

【0080】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つの識別子部位が、ベンチマークポリヌクレオチドコンストラクトに関連付けられ得る。ベンチマークポリヌクレオチドコンストラクトは、ベンチマークポリヌクレオチドコンストラクトに関連付けられた同じ部位または異なる部位であり得るベンチマークポリヌクレオチドコンストラクトに関連付けられた1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個またはそれを超える識別子部位を有し得る。各識別子部位は、独立して、ペイロード領域に対して5'の隣接領域上に、ペイロード領域に対して3'の隣接領域上に位置し得、または識別子部位の位置は、ペイロード領域の5'末端または3'末端及び隣接領域に及び得る。いくつかの態様では、識別子部位の位置には、ペイロード領域の1つ以上のヌクレオチド、例えば、限定されないが、1ヌクレオチド、2ヌクレオチド、3ヌクレオチド、4ヌクレオチド、5ヌクレオチド、6ヌクレオチド、7ヌクレオチド、8ヌクレオチド、9ヌクレオチド、10ヌクレオチド、11ヌクレオチド、12ヌクレオチド、13ヌクレオチド、14ヌクレオチド、15ヌクレオチド、16ヌクレオチド、17ヌクレオチド、18ヌクレオチド、19ヌクレオチド、20

40

50

ヌクレオチド、21ヌクレオチド、22ヌクレオチド、23ヌクレオチド、24ヌクレオチド、25ヌクレオチド、26ヌクレオチド、27ヌクレオチド、28ヌクレオチド、29ヌクレオチド、30ヌクレオチド、31ヌクレオチド、32ヌクレオチド、33ヌクレオチド、34ヌクレオチド、35ヌクレオチド、36ヌクレオチド、37ヌクレオチド、38ヌクレオチド、39ヌクレオチド、40ヌクレオチド41ヌクレオチド、42ヌクレオチド、43ヌクレオチド、44ヌクレオチド、45ヌクレオチド、46ヌクレオチド、47ヌクレオチド、48ヌクレオチド、49ヌクレオチド、50ヌクレオチドまたは50ヌクレオチド超が含まれ得る。いくつかの態様では、識別子部位の位置には、ペイロード領域の1つ以上のヌクレオチド、例えば、限定されないが、1〜5ヌクレオチド、2〜5ヌクレオチド、3〜5ヌクレオチド、2〜7ヌクレオチド、3〜7ヌクレオチド、1〜10ヌクレオチド、2〜10ヌクレオチド、3〜10ヌクレオチド、5〜10ヌクレオチド、7〜10ヌクレオチド、1〜15ヌクレオチド、2〜15ヌクレオチド、3〜15ヌクレオチド、5〜15ヌクレオチド、7〜15ヌクレオチド、10〜15ヌクレオチド、12〜15ヌクレオチド、1〜20ヌクレオチド、2〜20ヌクレオチド、3〜20ヌクレオチド、5〜20ヌクレオチド、7〜20ヌクレオチド、10〜20ヌクレオチド、12〜20ヌクレオチド、15〜20ヌクレオチド、17〜20ヌクレオチド、1〜25ヌクレオチド、2〜25ヌクレオチド、3〜25ヌクレオチド、5〜25ヌクレオチド、7〜25ヌクレオチド、10〜25ヌクレオチド、12〜25ヌクレオチド、15〜25ヌクレオチド、17〜25ヌクレオチド、20〜25ヌクレオチド、1〜30ヌクレオチド、2〜30ヌクレオチド、3〜30ヌクレオチド、5〜30ヌクレオチド、7〜30ヌクレオチド、10〜30ヌクレオチド、12〜30ヌクレオチド、15〜30ヌクレオチド、17〜30ヌクレオチド、20〜30ヌクレオチド、25〜30ヌクレオチド、1〜35ヌクレオチド、2〜35ヌクレオチド、3〜35ヌクレオチド、5〜35ヌクレオチド、7〜35ヌクレオチド、10〜35ヌクレオチド、12〜35ヌクレオチド、15〜35ヌクレオチド、17〜35ヌクレオチド、20〜35ヌクレオチド、25〜35ヌクレオチド、30〜35ヌクレオチド、1〜35ヌクレオチド、2〜35ヌクレオチド、3〜35ヌクレオチド、5〜35ヌクレオチド、7〜35ヌクレオチド、10〜35ヌクレオチド、12〜35ヌクレオチド、15〜35ヌクレオチド、17〜35ヌクレオチド、20〜35ヌクレオチド、25〜35ヌクレオチド、30〜35ヌクレオチド、1〜40ヌクレオチド、2〜40ヌクレオチド、3〜40ヌクレオチド、5〜40ヌクレオチド、7〜40ヌクレオチド、10〜40ヌクレオチド、12〜40ヌクレオチド、15〜40ヌクレオチド、17〜40ヌクレオチド、20〜40ヌクレオチド、25〜40ヌクレオチド、30〜40ヌクレオチド、35〜40ヌクレオチド、1〜45ヌクレオチド、2〜45ヌクレオチド、3〜45ヌクレオチド、5〜45ヌクレオチド、7〜45ヌクレオチド、10〜45ヌクレオチド、12〜45ヌクレオチド、15〜45ヌクレオチド、17〜45ヌクレオチド、20〜45ヌクレオチド、25〜45ヌクレオチド、30〜45ヌクレオチド、35〜45ヌクレオチド、40〜45ヌクレオチド、1〜50ヌクレオチド、2〜50ヌクレオチド、3〜50ヌクレオチド、5〜50ヌクレオチド、7〜50ヌクレオチド、10〜50ヌクレオチド、12〜50ヌクレオチド、15〜50ヌクレオチド、17〜50ヌクレオチド、20〜50ヌクレオチド、25〜50ヌクレオチド、30〜50ヌクレオチド、35〜50ヌクレオチド、40〜50ヌクレオチド、または45〜50ヌクレオチドが含まれ得る。

#### 【0081】

いくつかの実施形態では、1つの識別子部位が、ベンチマークポリヌクレオチドコンストラクトに関連付けられ得る。非限定的な例として、識別子部位は、ベンチマークポリヌクレオチドコンストラクトの5'末端上のベンチマークポリヌクレオチドコンストラクトに関連付けられ得る。非限定的な例として、識別子部位は、5'隣接領域上のベンチマークポリヌクレオチドコンストラクトに関連付けられ得る。非限定的な例として、識別子部位は、3'隣接領域上のベンチマークポリヌクレオチドコンストラクトに関連付けられ得る。非限定的な例として、識別子部位は、ベンチマークポリヌクレオチドコンストラクト

10

20

30

40

50

の 3' 末端上のベンチマークポリヌクレオチドコンストラクトに関連付けられ得る。非限定的な例として、識別子部位は、ペイロード領域上のベンチマークポリヌクレオチドコンストラクトに関連付けられ得る。非限定的な例として、ベンチマークポリヌクレオチドコンストラクトは、識別子部位を含み、識別子部位の位置は、ペイロード領域の 5' 末端及び 5' 隣接領域に及ぶ。非限定的な例として、ベンチマークポリヌクレオチドコンストラクトは、識別子部位を含み、識別子部位の位置は、ペイロード領域の 3' 末端及び 3' 隣接領域に及ぶ。

【0082】

いくつかの実施形態では、2つの識別子部位が、ベンチマークポリヌクレオチドコンストラクトに関連付けられる。非限定的な例として、第1の識別子部位及び第2の識別子部位は、5' 隣接領域上に位置する。非限定的な例として、第1の識別子部位及び第2の識別子部位は、ペイロード領域上に位置する。非限定的な例として、第1の識別子部位及び第2の識別子部位は、3' 隣接領域上に位置する。非限定的な例として、第1の識別子部位及び第2の識別子部位は、ベンチマークポリヌクレオチドコンストラクトの 5' 末端上に位置する。非限定的な例として、第1の識別子部位及び第2の識別子部位は、ベンチマークポリヌクレオチドコンストラクトの 3' 末端上に位置する。

10

【0083】

非限定的な例として、第1の識別子部位は、ベンチマークポリヌクレオチドコンストラクトの 5' 末端上に位置し、第2の識別子部位は、5' 隣接領域上に位置する。非限定的な例として、第1の識別子部位は、ベンチマークポリヌクレオチドコンストラクトの 5' 末端上に位置し、第2の識別子部位は、ペイロード領域上に位置する。非限定的な例として、第1の識別子部位は、ベンチマークポリヌクレオチドコンストラクトの 5' 末端上に位置し、第2の識別子部位は、3' 隣接領域上に位置する。非限定的な例として、第1の識別子部位は、ベンチマークポリヌクレオチドコンストラクトの 5' 末端上に位置し、第2の識別子部位の位置は、5' 隣接領域及びペイロード領域に及ぶ。非限定的な例として、第1の識別子部位は、ベンチマークポリヌクレオチドコンストラクトの 5' 末端上に位置し、第2の識別子部位の位置は、3' 隣接領域及びペイロード領域に及ぶ。非限定的な例として、第1の識別子部位は、ベンチマークポリヌクレオチドコンストラクトの 5' 末端上に位置し、第2の識別子部位は、ベンチマークポリヌクレオチドコンストラクトの 3' 末端上に位置する。

20

30

【0084】

非限定的な例として、第1の識別子部位は、5' 隣接領域上に位置し、第2の識別子部位は、ペイロード領域上に位置する。非限定的な例として、第1の識別子部位は、5' 隣接領域上に位置し、第2の識別子部位は、3' 隣接領域上に位置する。非限定的な例として、第1の識別子部位は、5' 隣接領域上に位置し、第2の識別子部位の位置は、5' 隣接領域及びペイロード領域に及ぶ。非限定的な例として、第1の識別子部位は、5' 隣接領域上に位置し、第2の識別子部位の位置は、3' 隣接領域及びペイロード領域に及ぶ。非限定的な例として、第1の識別子部位は、5' 隣接領域上に位置し、第2の識別子部位は、ベンチマークポリヌクレオチドコンストラクトの 5' 末端上に位置する。非限定的な例として、第1の識別子部位は、5' 隣接領域上に位置し、第2の識別子部位は、ベンチマークポリヌクレオチドコンストラクトの 3' 末端上に位置する。

40

【0085】

非限定的な例として、第1の識別子部位の位置は、5' 隣接領域及びペイロード領域に及び、第2の識別子部位は、ベンチマークポリヌクレオチドコンストラクトの 5' 末端上に位置する。非限定的な例として、第1の識別子部位の位置は、5' 隣接領域及びペイロード領域に及び、第2の識別子部位は、5' 隣接領域上に位置する。非限定的な例として、第1の識別子部位の位置は、5' 隣接領域及びペイロード領域に及び、第2の識別子部位は、ペイロード領域上に位置する。非限定的な例として、第1の識別子部位の位置は、5' 隣接領域及びペイロード領域に及び、第2の識別子部位の位置は、3' 隣接領域及びペイロード領域に及ぶ。非限定的な例として、第1の識別子部位の位置は、5' 隣接領域及

50

10

20

30

40

50

50

50

50

50

50

非限定的な例として、第 1 の識別子部位は、ベンチマークポリヌクレオチドコンストラクトの 3' 末端上に位置し、第 2 の識別子部位は、ベンチマークポリヌクレオチドコンス

トラクトの 5' 末端上に位置する。非限定的な例として、第 1 の識別子部位は、ベンチマークポリヌクレオチドコンストラクトの 3' 末端上に位置し、第 2 の識別子部位は、5' 隣接領域上に位置する。非限定的な例として、第 1 の識別子部位は、ベンチマークポリヌクレオチドコンストラクトの 5' 末端上に位置し、第 2 の識別子部位の位置は、5' 隣接領域及びペイロード領域に及ぶ。非限定的な例として、第 1 の識別子部位は、ベンチマークポリヌクレオチドコンストラクトの 3' 末端上に位置し、第 2 の識別子部位は、ペイロード領域上に位置する。非限定的な例として、第 1 の識別子部位は、ベンチマークポリヌクレオチドコンストラクトの 5' 末端上に位置し、第 2 の識別子部位の位置は、3' 隣接領域及びペイロード領域に及ぶ。非限定的な例として、第 1 の識別子部位は、ベンチマークポリヌクレオチドコンストラクトの 3' 末端上に位置し、第 2 の識別子部位は、3' 隣接領域上に位置する。 10

【0091】

いくつかの実施形態では、3つの識別子部位が、ベンチマークポリヌクレオチドコンストラクトに関連付けられる。

【0092】

いくつかの実施形態では、4つの識別子部位が、ベンチマークポリヌクレオチドコンストラクトに関連付けられる。

【0093】

いくつかの実施形態では、5つの識別子部位が、ベンチマークポリヌクレオチドコンストラクトに関連付けられる。 20

【0094】

いくつかの実施形態では、6つの識別子部位が、ベンチマークポリヌクレオチドコンストラクトに関連付けられる。

【0095】

いくつかの実施形態では、7つの識別子部位が、ベンチマークポリヌクレオチドコンストラクトに関連付けられる。

【0096】

いくつかの実施形態では、8つの識別子部位が、ベンチマークポリヌクレオチドコンストラクトに関連付けられる。

【0097】

いくつかの実施形態では、9つの識別子部位が、ベンチマークポリヌクレオチドコンストラクトに関連付けられる。 30

【0098】

いくつかの実施形態では、10個の識別子部位が、ベンチマークポリヌクレオチドコンストラクトに関連付けられる。

【0099】

II. カーゴ及びペイロード

本開示のオリジネーターコンストラクト及びベンチマークコンストラクトは、カーゴまたはペイロードを含み、それをコードし、またはそれにコンジュゲートされ得る。本明細書で使用される場合、用語「カーゴ」または「ペイロード」は、細胞または組織へのまたはその中への送達のための送達ビヒクルに包含された1つ以上の分子または構造を指し得る。カーゴの非限定的な例には、核酸、ポリペプチド、ペプチド、タンパク質、リボソーム、標識、タグ、小さな化学的分子、大きな生物学的分子、及びそれらの任意の組み合わせまたはその断片が含まれ得る。オリジネーターコンストラクト及びベンチマークコンストラクトにおいて、カーゴまたはペイロードを含むまたはコードするコンストラクトの領域は、「カーゴ領域」または「ペイロード領域」と称される。 40

【0100】

いくつかの実施形態では、カーゴまたはペイロードは、生物学的に活性な分子、例えば、限定されないが、治療タンパク質であり、またはそれをコードする。本明細書で使用される場合、用語「生物学的に活性」は、生物学的システム、特に生物において活性を有す 50



る任意の薬剤の特徴を指す。例えば、生物に投与された場合、その生物に対する生物学的効果を有する薬剤は、生物学的に活性と考えられる。いくつかの実施形態では、カーゴまたはペイロードは、1つ以上の予防的または治療的に活性なタンパク質、ポリペプチド、または他の因子であり、またはそれをコードする。非限定的な例として、カーゴまたはペイロードは、がんにおいて、限定されないが、T R A I Lまたは腫瘍壊死因子 (T N F) 等の腫瘍殺傷活性を向上させる薬剤であり、またはそれをコードし得る。別の非限定的な例として、カーゴまたはペイロードは、筋ジストロフィー (例えば、カーゴまたはペイロードは、ジストロフィンであり、またはそれをコードする)、心臓血管疾患 (例えば、カーゴまたはペイロードは、S E R C A 2 a、G A T A 4、T b x 5、M e f 2 C、H a n d 2、M y o c d 等であり、またはそれをコードする)、神経変性疾患 (例えば、カーゴまたはペイロードは、N G F、B D N F、G D N F、N T - 3 等であり、またはそれをコードする)、慢性疼痛 (例えば、カーゴまたはペイロードは、G l y R a l であり、またはそれをコードする)、エンケファリン、またはグルタミン酸デカルボキシラーゼ (例えば、カーゴまたはペイロードは、G A D 6 5、G A D 6 7、または別のアイソフォームであり、またはそれをコードする)、肺疾患 (例えば、カーゴまたはペイロードは、C F T R であり、またはそれをコードする)、血友病 (例えば、カーゴまたはペイロードは、第 V I I I 因子または第 I X 因子であり、またはそれをコードする)、新生物形成 (例えば、カーゴまたはペイロードは、P T E N、A T M、A T R、E G F R、E R B B 2、E R B B 3、E R B B 4、N o t c h 1、N o t c h 2、N o t c h 3、N o t c h 4、A K T、A K T 2、A K T 3、H I F、H I F l a、H I F 3 a、M e t、H R G、B c l 2、P P A R アルファ、P P A R ガンマ、W T 1 (ウィルムス腫瘍)、F G F 受容体ファミリーメンバー (5つのメンバー: 1、2、3、4、5)、C D K N 2 a、A P C、R B (網膜芽細胞腫)、M E N 1、V H L、B R C A 1、B R C A 2、A R (アンドロゲン受容体)、T S G 1 0 1、I G F、I G F 受容体、I g f 1 (4つのバリエーション)、I g f 2 (3つのバリエーション)、I g f 1 受容体、I g f 2 受容体、B a x、B c l 2、カスパーゼファミリー (9つのメンバー: 1、2、3、4、6、7、8、9、12)、K r a s、A p e であり、またはそれをコードする)、加齢黄斑変性症 (例えば、カーゴまたはペイロードは、A b e r、C c l 2、C c 2、c p (セルロプラスミン)、T i m p 3、カテプシン D、V l d l r であり、またはそれをコードする)、統合失調症 (例えば、ニューレグリン (N r g l)、E r b 4 (ニューレグリンのための受容体)、コンプレキシン (C p l x l)、T p h l トリプトファンヒドロキシラーゼ、T p h 2 トリプトファンヒドロキシラーゼ 2、ニューレキシン 1、G S K 3、G S K 3 a、G S K 3 b、5 - H I T (S l c 6 a 4)、C O M T、D R D (D r d l a)、S L C 6 A 3、D A O A、D T N B P I、D a o (D a o l)、トリヌクレオチド反復障害 (例えば、H T T (ハンチントン D x)、S B M A / S M A X I / A R (ケネディ D x)、F X N / X 2 5 (フリードライヒ運動失調症)、A T X 3 (マシャド・ジョセフ D x)、A T X N I 及び A T X N 2 (脊髄小脳運動失調)、D M P K (筋強直性ジストロフィー)、アトロフィン-1 及び A t n l (D R P L A D x)、C B P (C r e b - B P - 全体的不安定性)、V L D L R (アルツハイマー)、A t x n 7、A t x n 1 0)、脆弱 X 症候群 (例えば、カーゴまたはペイロードは、F M R 2、F X R I、F X R 2、m G L U R 5 であり、またはそれをコードする)、セクレターゼ関連障害 (例えば、カーゴまたはペイロードは、A P H - 1 (アルファ及びベータ)、プレセニリン (P s e n l)、ニカストリン (N c s t n)、P E N - 2 であり、またはそれをコードする)、A L S (例えば、カーゴまたはペイロードは、S O D 1、A L S 2、S T E X、F U S、T A R D B P、V E G F (V E G F - a、V E G F - b、V E G F - c) であり、またはそれをコードする)、自閉症 (例えば、カーゴまたはペイロードは、M e c p 2、B Z R A P 1、M D G A 2、S e m a 5 A、ニューレキシン 1 であり、またはそれをコードする)、アルツハイマー病 (例えば、カーゴまたはペイロードは、E l、チップ、U C H、U B B、タウ、L R P、P I C A L M、C l u s t e r i n、P S 1、S O R L 1、C R 1、V l d l r、U b a l、U b a 3、C H I P 2 8 (A q p l、アクアポリン 1)、U c h l l、U c h l 3、A P P であり

10

20

30

40

50

、またはそれをコードする)、炎症(例えば、カーゴまたはペイロードは、IL-10、IL-1(IL-1a、IL-1b)、IL-13、IL-17(IL-17a(CTLA8)、IL-17b、IL-17c、IL-17d、IL-171)、11-23、Cx3cr1、ptpn22、TNFa、IBDについてのNOD2/CARD15、IL-6、IL-12(IL-12a、IL-12b)、CTLA4、Cx3cl1であり、またはそれをコードする)、パーキンソン病(例えば、x-シヌクレイン、DJ-1、LRRK2、パーキン、PINK1)、血液及び凝固障害、例えば、貧血、ベアリンパ球症候群、出血障害、血球貪食性リンパ組織球症障害、血友病A、血友病B、出血性障害、白血球欠損症及び障害、鎌状赤血球貧血、及びサラセミア(例えば、カーゴまたはペイロードは、CRAN1、CDA1、RPS19、DBA、PKLR、PK1、NT5C3、UMPH1、PSNI、RHAG、RH50A、NRAMP2、SPTB、ALAS2、ANH1、ASB、ABCB7、ABC7、ASAT、TAPBP、TPSN、TAP2、ABCB3、PSF2、RING11、MHC2TA、C2TA、RFX5、RFXAP、RFX5、TBXA2R、P2RX1、P2X1、HF1、CFH、HUS、MCFD2、FANCA、FAC A、FA1、FA、FA A、FAAP95、FAAP90、FLJ34064、FANCB、FANCC、FACC、BRCA2、FANCD1、FANCD2、FANCD、FACD、FAD、FANCE、FACE、FANCF、XRCC9、FANCG、BR1PI、BACH1、FANCI、PHF9、FANCL、FANCM、KIAA1596、PRF1、HPLH2、UNC13D、MUNC13-4、HPLH3、HLH3、FHL3、F8、FSC、PI、ATT、F5、ITGB2、CD18、LCAMB、LAD、EIF2B1、EIF2BA、EIF2B2、EIF2B3、EIF2B5、LVWM、CACH、CLE、EIF2B4、HBB、HBA2、HBB、HBD、LCRB、HBA1であり、またはそれをコードする)、B細胞非ホジキンリンパ腫または白血病(例えば、カーゴまたはペイロードは、BCL7A、BCL7、ALI、TCL5、SCL、TAL2、FLT3、NBS1、NBS、ZNFN1AI、1KI、LYF1、HOXD4、HOX4B、BCR、CML、PHL、ALL、ARNT、KRAS2、RASK2、GMPS、AFIO、ARHGEF12、LARG、KIAA0382、CALM、CLTH、CEBPA、CEBP、CHIC2、BTL、FLT3、KIT、PBT、LPP、NPMI、NUP214、D9S46E、CAN、CAIN、RUNXI、CBFA2、AML1、WHSC1LI、NSD3、FLT3、AF1Q、NPMI、NUMA1、ZNF145、PLZF、PML、MYL、STAT5B、AF1Q、CALM、CLTH、ARL11、ARLTS1、P2RX7、P2X7、BCR、CML、PHL、ALL、GRAF、NF1、VRNF、WSS、NFNS、PTPNI1、PTP2C、SHP2、NS1、BCL2、CCND1、PRAD1、BCL1、TCRA、GATA1、GF1、ERYF1、NFE1、ABLI、NQO1、DIA4、NMOR1、NUP214、D9S46E、CAN、CAINであり、またはそれをコードする)、炎症及び免疫関連疾患及び障害(例えば、カーゴまたはペイロードは、KIR3DL1、NKAT3、NKB1、AMB11、K1R3DS1、IFNG、CXCL12、TNFRSF6、APT1、FAS、CD95、ALPS1A、IL2RG、SCIDX1、SCIDX、IMD4、CCL5、SCYA5、D17S136E、TCP228、IL10、CSIF、CMKBR2、CCR2、CMKBR5、CCCKR5(CCR5)、CD3E、CD3G、AICDA、AID、HIGM2、TNFRSF5、CD40、UNG、DGU、HIGM4、TNFSFS、CD40LG、HIGM1、IGM、FOXP3、IPEX、AID、XPID、PIDX、TNFRSF14B、TACIであり、またはそれをコードする)、炎症(例えば、カーゴまたはペイロードは、IL-10、IL-1(IL-1A、IL-1B)、IL-13、IL-17(IL-17a(CTLA8)、IL-17b、IL-17c、IL-17d、IL-171)、11-23、Cx3cr1、ptpn22、TNFa、IBDについてのNOD2/CARD15、IL-6、IL-12(IL-12a、IL-12b)、CTLA4、Cx3cII)、JAK3、JAKL、DCLREIC、ARTEMIS、SCIDA、R

10

20

30

40

50

AG1、RAG2、ADA、PTPRC、CD45、LCA、IL7R、CD3D、T3D、IL2RG、SCIDX1、SCIDX、IMD4であり、またはそれをコードする)、代謝、肝臓、腎臓及びタンパク質疾患及び障害(例えば、カーゴまたはペイロードは、TTR、PALB、APOA1、APP、AAA、CVAP、ADI、GSN、FGA、LYZ、TTR、PALB、KRT18、KRT8、CIRH1A、NAIC、TEX292、KIAA1988、CFTR、ABCC7、CF、MRP7、SLC2A2、GLUT2、G6PC、G6PT、G6PT1、GAA、LAMP2、LAMPB、AGL、GDE、GBE1、GYS2、PYGL、PFKM、TCF1、HNF1A、MODY3、SCOD1、SCOL、CTNNB1、PDGFR1、PDGRL、PRLTS、AX1NI、AXIN、CTNNB1、TP53、P53、LFS1、IGF2R、MPRI、MET、CASP8、MCH5、UMOD、HNFJ、FJHN、MCKD2、ADMCKD2、PAH、PKU1、QDPR、DHPR、PTS、FCYT、PKHD1、ARPKD、PKD1、PKD2、PKD4、PKDTS、PRKCSH、G19P1、PCLD、SEC63であり、またはそれをコードする)、筋肉／骨格疾患及び障害(例えば、カーゴまたはペイロードは、DMD、BMD、MYF6、LMNA、LMN1、EMD2、FPLD、CMDIA、HGPS、LGMDIB、LMNA、LMNI、EMD2、FPLD、CMDIA、FSHMD1A、FSHD1A、FKRP、MDC1C、LGMD2I、LAMA2、LAMM、LARGE、KIAA0609、MDC1D、FCMD、TTID、MYOT、CAPN3、CANP3、DYSF、LGMD2B、SGCG、LGMD2C、DMDA1、SCG3、SGCA、ADL、DAG2、LGMD2D、DMDA2、SGCB、LGMD2E、SGCD、SGD、LGMD2F、CMD1L、TCAP、LGMD2G、CMD1N、TRIM32、HT2A、LGMD2H、FKRP、MDC1C、LGMD21、TTN、CMD1G、TMD、LGMD2J、POMT1、CAV3、LGMD1C、SEPN1、SELN、RSMD1、PLEC1、PLTN、EBS1、LRP5、BMNDL、LRP7、LR3、OPPG、VBCH2、CL

CN7、CLC7、OPTA2、OSTMI、GL、TCIRG1、TIRC7、OC116、PTB1、VAPB、VAPC、ALS8、SMN1、SMA1、SMA2、SMA3、SMA4、BSC12、SPG17、GARS、SMAD1、CMT2D、HEXB、IGHMBP2、SMUBP2、CATF1、SMARD1であり、またはそれをコードする)、神経及びニューロン疾患及び障害(例えば、カーゴまたはペイロードは、SOD1、ALS2、STEX、FUS、TARDBP、VEGF(VEGF-a、VEGF-b、VEGF-c)、APP、AAA、CVAP、ADI、APOE、AD2、PSEN2、AD4、STM2、APBB2、FE65LI、NOS3、PLAU、URK、ACE、DCPI、ACEI、MPO、PAC1PI、PAXIPIL、PTIP、A2M、BLMH、BMH、PSEN1、AD3、Mecp2、BZRAP1、MDGA2、Sema5A、ニューレキシン1、GLO1、MECP2、RTT、PPMX、MRX16、MRX79、NLGN3、NLGN4、KIAA1260、AUTSX2、FMR2、FXR1、FXR2、mGLUR5、HD、IT15、PRNP、PRIP、JPH3、JP3、HDL2、TBP、SCA17、NR4A2、NURR1、NOT、TINUR、SNCAIP、TBP、SCA17、SNCA、NACP、PARK1、PARK4、DJI、PARK7、LRRK2、PARK8、PINK1、PARK6、UCHL1、PARK5、SNCA、NACP、PARKL、PARK4、PRKN、PARK2、PDJ、DBH、NDUFV2、MECP2、RTT、PPMX、MRX16、MRX79、CDKL5、STK9、MECP2、RTT、PPMX、MRX16、MRX79、x-シヌクレイン、DJ-1、ニューレグリン-1(Nrg1)、Erb4(ニューレグリンについての受容体)、コンプレキシン-1(Cplx1)、Tph1トリプトファンヒドロキシラーゼ、Tph2、トリプトファンヒドロキシラーゼ2、ニューレキシン1、GSK3、GSK3a、GSK3b、5-HTT(Slc6a4)、CONT、DRD(Drdla)、SLC6A、DAOA、DTNBP1、Dao(Daol)、APH-

10

20

30

40

50

l (アルファ及びベータ)、プレセニリン (Psen1)、ニカストリン、(Ncstn)、PEN-2、Nos1、Parp1、Nat1、Nat2、HTT、SBMA/SMAX1/AR、FXN/X25、ATX3、TXN、ATXN2、DMPK、アトロフィニン-1、Atn1、CBP、VLDLR、Atxn7、及びAtxn10)、及び眼疾患及び障害 (例えば、Aber、Ccl2、Cc2、cp (セルロプラスミン)、Timp3、カテプシン-D、Vldlr、Ccr2、CRYAA、CRYA1、CRYBB2、CRYB2、PITX3、BFSP2、CP49、CP47、CRYAA、CRYAI、PAX6、AN2、MGDA、CRYBA1、CRYB1、CRYGC、CRYG3、CCL、LIM2、MP19、CRYGD、CRYG4、BFSP2、CP49、CP47、HSF4、CTM、HSF4、CTM、MIP、AQPO、CRYAB、CRYA2、CTPP2、CRYBB1、CRYGD、CRYG4、CRYBB2、CRYB2、CRYGC、CRYG3、CCL、CRYAA、CRYAI、GJA8、CX50、CAE1、GJA3、CX46、CZP3、CAE3、CCM1、CAM、KRIT1、APOA1、TGFB1、CSD2、CDGG1、CSD、BIGH3、CDG2、TACSTD2、TROP2、M1SI、VSX1、RINX、PPCD、PPD、KTCN、COL8A2、FECD、PPCD2、PIP5K3、CFD、KERA、CNA2、MYOC、TIGR、GLCIA、JOAG、GPOA、OPTN、GLC1E、FIP2、HYPL、NRP、CYP1BI、GLC3A、OPA1、NTG、NPG、CYP1BI、GLC3A、CRB1、RP12、CRX、CORD2、CRD、RPGRIPI、LCA6、CORD9、RPE65、RP20、AIPL1、LCA4、GUCY2D、GUC2D、LCA1、CORD6、RDH12、LCA3、ELOVL4、ADMD、STGD2、STGD3、RDS、RP7、PRPH2、PRPH、AVMD、AOFMD、及びVMD2であり、またはそれをコードする)等の病態の処置に好適な薬剤であり、またはそれをコードし得る。

10

20

30

#### 【0101】

いくつかの実施形態では、カーゴまたはペイロードは、細胞の分化に影響を及ぼし得る因子であり、またはそれをコードする。非限定的な例として、Oct4、Klf4、Sox2、c-Myc、L-Myc、ドミナントネガティブp53、Nanog、Glisl、Lin28、TFIID、mir-302/367、または他のmiRNAのうちの1つ以上の発現は、細胞が誘導多能性幹 (iPS) 細胞となることを引き起こし得る。

#### 【0102】

いくつかの実施形態では、カーゴまたはペイロードは、細胞を分化転換するための因子であり、またはそれをコードする。因子の非限定的な例には、心筋細胞のためのGATA4、Tbx5、Mef2C、Myocd、Hand2、SRF、Mespl、SMARCD3；神経細胞のためのAsci1、Nurr1、Lmx1A、Bm2、Myt1l、NeuroD1、FoxA2；及び肝臓細胞のためのHnf4a、Foxa1、Foxa2またはFoxa3のうちの1つ以上が含まれる。

#### 【0103】

ポリペプチド、タンパク質及びペプチド

本開示のオリジネーターコンストラクト及びベンチマークコンストラクトは、ポリペプチド、タンパク質またはペプチドであるカーゴまたはペイロードを含み、それをコードし、またはそれにコンジュゲートされ得る。本明細書で使用される場合、用語「ポリペプチド」は通常、ペプチド結合によって連結されたアミノ酸のポリマーを指し、「タンパク質及び「ペプチド」を包含する。本開示のためのポリペプチドには、当該技術分野で知られているすべてのポリペプチド、タンパク質及び／またはペプチドが含まれる。ポリペプチドの非限定的なカテゴリーには、抗原、抗体、抗体断片、サイトカイン、ペプチド、ホルモン、酵素、酸化剤、抗酸化剤、合成ポリペプチド、及びキメラポリペプチドが含まれる。

40

#### 【0104】

本明細書で使用される場合、用語「ペプチド」は通常、約50アミノ酸以下のより短い

50

ポリペプチドを指す。2つのアミノ酸のみを有するペプチドは、「ジペプチド」と称され得る。3つのアミノ酸のみを有するペプチドは、「トリペプチド」と称され得る。ポリペプチドは通常、約4〜約50アミノ酸を有するポリペプチドを指す。ペプチドは、当業者に知られている任意の方法を介して得られ得る。いくつかの実施形態では、ペプチドは、培養下で発現させられ得る。いくつかの実施形態では、ペプチドは、化学的合成（例えば、固相ペプチド合成）を介して得られ得る。

#### 【0105】

いくつかの実施形態では、本開示のオリジネーターコンストラクト及びベンチマークコンストラクトは、加水分解するとアミノ酸及び場合により小さな炭水化物化合物を生成する単純なタンパク質であるカーゴまたはペイロードを含み、それをコードし、またはそれにコンジュゲートされ得る。単純なタンパク質の非限定的な例には、アルブミン、アルブミノイド、グロブリン、グルテリン、ヒストン及びプロタミンが含まれる。

10

#### 【0106】

いくつかの実施形態では、本開示のオリジネーターコンストラクト及びベンチマークコンストラクトは、非タンパク質に関連付けられた単純なタンパク質であり得るコンジュゲート化タンパク質であるカーゴまたはペイロードを含み、それをコードし、またはそれにコンジュゲートされ得る。コンジュゲート化タンパク質の非限定的な例には、糖タンパク質、ヘモグロビン、レシトタンパク質（lecithoprotein）、核タンパク質、及びリンタンパク質が含まれる。

#### 【0107】

いくつかの実施形態では、本開示のオリジネーターコンストラクト及びベンチマークコンストラクトは、化学的または物理的手段によって単純なまたはコンジュゲート化タンパク質から誘導されたタンパク質である誘導タンパク質であるカーゴまたはペイロードを含み、それをコードし、またはそれにコンジュゲートされ得る。誘導されたタンパク質の非限定的な例には、変性タンパク質及びペプチドが含まれる。

20

#### 【0108】

いくつかの実施形態では、ポリペプチド、タンパク質またはペプチドは、未修飾であり得る。

#### 【0109】

いくつかの実施形態では、ポリペプチド、タンパク質またはペプチドは、修飾され得る。修飾のタイプには、リン酸化、グリコシル化、アセチル化、ユビキチン化／スモ化、メチル化、パルミトイル化、キノン、アミド化、ミリストイル化、ピロリドンカルボン酸、ヒドロキシル化、ホスホパンテテイン、プレニル化、GPIアンカリング、酸化、ADP-リボシル化、硫酸化、S-ニトロシル化、シトルリン化、ニトロ化、ガンマーカルボキシグルタミン酸、ホルミル化、ヒプシン、トパキノン（TPQ）、臭素化、リジントパキノン（LTQ）、トリプトファントリプトフィルキノン（TTQ）、ヨード化、及びシステイントリプトフィルキノン（CTQ）が含まれるがこれらに限定されない。いくつかの態様では、ポリペプチド、タンパク質またはペプチドは、その構造、細胞内局在化、及び／または機能に影響を及ぼし得る転写後修飾によって修飾され得る。

30

#### 【0110】

いくつかの実施形態では、ポリペプチド、タンパク質またはペプチドは、リン酸化を使用して修飾され得る。セリン、トレオニン、またはチロシン残基のリン酸化、またはホスフェート基の付加は、タンパク質修飾の最も一般的な形態の1つである。タンパク質リン酸化は、細胞内シグナル伝達カスケードにおいてシグナルを微調整する際に重要な役割を果たす。

40

#### 【0111】

いくつかの実施形態では、ポリペプチド、タンパク質またはペプチドは、標的タンパク質へのユビキチンの共有結合であるユビキチン化を使用して修飾され得る。ユビキチン化媒介タンパク質ターナーオーバーは、細胞周期を誘導する際に及びタンパク質分解非依存性細胞内シグナル伝達経路において役割を果たすことが示されている。

50

## 【0112】

いくつかの実施形態では、ポリペプチド、タンパク質またはペプチドは、遺伝子発現を制御する際に役割を果たし得るアセチル化及びメチル化を使用して修飾され得る。非限定的な例として、アセチル化及びメチル化は、遺伝子サイレンシングの媒介に影響を有する可能性があるクロマチンドメイン（例えば、ユークロマチン及びヘテロクロマチン）の形成を媒介する可能性がある。

## 【0113】

いくつかの実施形態では、ポリペプチド、タンパク質またはペプチドは、グリコシル化を使用して修飾され得る。グリコシル化は、多数のグリカン基の1つの結合であり、すべてのタンパク質の約半分において生じ、かつ胚発生、細胞分裂、及びタンパク質構造の制御を含むがこれらに限定されない生物学的プロセスにおいて役割を果たす修飾である。タンパク質グリコシル化の2つの主要なタイプは、N-グリコシル化及びO-グリコシル化である。N-グリコシル化の場合、グリカンは、アスパラギンに結合され、O-グリコシル化の場合、グリカンは、セリンまたはトレオニンに結合される。

## 【0114】

いくつかの実施形態では、ポリペプチド、タンパク質またはペプチドは、スモ化を使用して修飾され得る。スモ化は、タンパク質へのSUMO（小ユビキチン様修飾因子）の付加であり、ユビキチン化と同様の翻訳後修飾である。

## 【0115】

## 抗体

本明細書で使用される場合、用語「抗体」は、最も広い意味で称され、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多重特異的抗体（例えば、少なくとも2つのインタクト抗体から形成された二重特異的抗体）、及び所望の生物学的活性を示す（例えば、「機能的である」）限り抗体断片（例えば、ダイアボディ）を含むがこれらに限定されない様々な実施形態を具体的に包含する。抗体は、既知のまたは親抗体配列に由来する少なくとも1つのアミノ酸領域及び非抗体配列に由来する少なくとも1つのアミノ酸領域を含む単量体または多量体ポリペプチドである主にアミノ酸をベースとする分子である。抗体は、1つ以上の修飾（糖部位、蛍光部位、化学的タグ等の付加を含むがこれらに限定されない）を含み得る。本明細書における目的のため、「抗体」は、重及び軽可変ドメインならびにFc領域を含み得る。

## 【0116】

カーゴまたはペイロードは、1つ以上の機能的抗体を形成するポリペプチドを含み得、またはコードし得る。

## 【0117】

いくつかの実施形態では、カーゴまたはペイロードは、当該技術分野で知られている抗体及び／または治療、診断、または研究目的であり得る市販されている抗体を含むがこれらに限定されない任意の抗体として形成または機能するポリペプチドを含み得、またはコードし得る。また、カーゴまたはペイロードは、そのような抗体の断片または抗体、例えば、限定されないが、可変ドメインまたは相補性決定領域（CDR）を含み得、またはコードし得る。

## 【0118】

本明細書で使用される場合、用語「ネイティブ抗体」は通常、2つの同一の軽（L）鎖及び2つの同一の重（H）鎖から構成される約150,000ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質を指す。抗体重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子は知られており、それぞれを構成するセグメントは、よく特性化されており、記載されている（Matsuda, F. et al., 1998. The Journal of Experimental Medicine. 188 (11); 2151-62及びLi, A. et al., 2004. Blood. 103 (12): 4602-9（これらの各々の内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる）。各軽鎖は、1つの共有ジスルフィド結合によって重鎖に連結されている一方で、ジスルフィド連結の数は、異なる免疫グロブリンアイソ

10

20

30

40

50

タイプの重鎖間で様々である。各重鎖及び軽鎖はまた、規則的に間隔を空けて鎖内ジスルフィド架橋を有する。各重鎖は、一端に可変ドメイン（ $V_H$ ）と、それに続くいくつかの定常ドメインを有する。各軽鎖は、一端に可変ドメイン（ $V_L$ ）を有し、その他端に定常ドメインを有する；軽鎖の定常ドメインは、重鎖の第1の定常ドメインと整列し、軽鎖の可変ドメインは、重鎖の可変ドメインと整列している。本明細書で使用される場合、用語「軽鎖」は、定常ドメインのアミノ酸配列に基づいてカップ及びラムダと呼ばれる2つの明確に区別されるタイプのうちの1つに割り当てられた任意の脊椎動物種からの抗体の成分を指す。それらの重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に応じて、抗体は、異なるクラスに割り当てられ得る。5つの主要なクラスのインタクト抗体：IgA、IgD、IgE、IgG、及びIgMが存在し、これらのいくつかは、サブクラス（アイソタイプ）、例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、及びIgA2にさらに分けられ得る。

10

#### 【0119】

本明細書で使用される場合、用語「可変ドメイン」は、抗体間で配列が広く異なり、かつその特定の抗原に対する各特定の抗体の結合及び特異性において使用される抗体重鎖及び軽鎖の両方に見られる特定の抗体ドメインを指す。可変ドメインは、超可変領域を含む。本明細書で使用される場合、用語「超可変領域」は、抗原結合を担うアミノ酸残基を含む可変ドメイン内の領域を指す。超可変領域内に存在するアミノ酸は、抗体の抗原結合部位の一部となる相補性決定領域（CDR）の構造を決定する。本明細書で使用される場合、用語「CDR」は、その標的抗原またはエピトープに相補的な構造を含む抗体の領域を指す。抗原と相互作用しない可変ドメインの他の部分は、フレームワーク（FW）領域と称される。抗原結合部位（抗原結合部位またはパラトープとしても知られている）は、特定の抗原と相互作用するために必要なアミノ酸残基を含む。抗原結合部位を構成する正確な残基は、典型的には、結合した抗原との共結晶学によって明らかになるが、計算的評価もまた、他の抗体との比較に基づいて使用され得る（Strohl, W. R. Therapeutic Antibody Engineering. Woodhead Publishing, Philadelphia PA. 2012. Ch. 3, p. 47-54（その内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる））。CDRを構成する残基を決定することには、Kabata [Wu, T. T. et al., 1970, JEM, 132 (2) : 211-50及びJohnson, G. et al., 2000, Nucleic Acids Res. 28 (1) : 214-8（これらの各々の内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる）]、Chothia [Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196, 901 (1987), Chothia et al., Nature 342, 877 (1989)及びAll-Lazikani, B. et al., 1997, J. Mol. Biol. 273 (4) : 927-48（これらの各々の内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる）]、Lefranc (Lefranc, M. P. et al., 2005, Immunome Res. 1 : 3)及びHonegger (Honegger, A. and Pluckthun, A. 2001. J. Mol. Biol. 309 (3) : 657-70（その内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる））によって教示されるものを含むがこれらに限定されない付番スキームの使用が含まれ得る。

20

30

40

#### 【0120】

$V_H$ 及び $V_L$ ドメインはそれぞれ、3つのCDRを有する。 $V_L$ のCDRは、可変ドメインポリペプチドに沿ってN末端からC末端へ移動した場合に存在する順序で、本明細書でCDR-L1、CDR-L2及びCDR-L3と称される。 $V_H$ のCDRは、可変ドメインポリペプチドに沿ってN末端からC末端へ移動した場合に存在する順序で、本明細書でCDR-H1、CDR-H2、及びCDR-H3と称される。CDRの各々は、抗原結合ドメインにおける多様な三次元構造をもたらす抗体間の配列及び長さが非常に可変であり得るアミノ酸配列を含むCDR-H3を除いて、好ましい標準的構造を有する。いくつかの場合では、CDR-H3は、抗体多様性を評価するために関連する抗体のパネル間で

50

分析され得る。

【0121】

CDR配列を決定する様々な方法は、当該技術分野で知られており、既知の抗体配列に適用され得る。「Kababに従って付番される」、「Kabab付番」、「Kabab定義」、及び「Kabab表示」とも称されるKababによって記載されるシステムは、抗体の任意の可変ドメインに適用可能な明白な残基付番システムを提供し、各鎖の3つのCDRを定義する正確な残基境界を提供する。(Kabab et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987) and (1991) (その内容は、それらの全体が参照により組み込まれる)。Kabab CDRは、軽鎖可変ドメインにおけるおよそ残基24~34 (CDR1)、50~56 (CDR2) 及び89~97 (CDR3)、ならびに重鎖可変ドメインにおける31~35 (CDR1)、50~65 (CDR2) 及び95~102 (CDR3)を含む。Chothia及び同僚は、Kabab CDR内の所定の副次的部分が、アミノ酸配列のレベルで優れた多様性を有するにもかかわらず、ほぼ同一のペプチド骨格構造を採用することを発見した。(Chothia et al. (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917; 及びChothia et al. (1989) Nature 342:877-883 (これらの内容の各々は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる))。これらのCDRは、「Chothia CDR」、「Chothia付番」、または「Chothiaに従って付番される」と称され得、軽鎖可変ドメインにおけるおよそ残基24~34 (CDR1)、50~56 (CDR2) 及び89~97 (CDR3)、ならびに重鎖可変ドメインにおける26~32 (CDR1)、52~56 (CDR2) 及び95~102 (CDR3)を含む。Mol. Biol. 196:901-917 (1987)。「MacCallumに従って付番される」、または「MacCallum付番」とも称されるMacCallumによってされる記載されるシステムは、軽鎖可変ドメインにおけるおよそ残基30~36 (CDR1)、46~55 (CDR2) 及び89~96 (CDR3)、ならびに重鎖可変ドメインにおける30~35 (CDR1)、47~58 (CDR2) 及び93~101 (CDR3)を含む。(MacCallum et al. (1996) J. Mol. Biol. 262(5):732-745) (その内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる)。「AbMに従って付番する」、または「AbM付番」とも称されるAbMによってされる記載されるシステムは、軽鎖可変ドメインにおけるおよそ残基24~34 (CDR1)、50~56 (CDR2) 及び89~97 (CDR3)、ならびに重鎖可変ドメインにおける26~35 (CDR1)、50~58 (CDR2) 及び95~102 (CDR3)を含む。可変領域のIMGT (INTERNATIONAL IMMUNOGENETICS INFORMATION SYSTEM) 付番も使用され得、これは、IMGTの方法に従う免疫グロブリン可変重鎖または軽鎖における残基の付番である(Lefranc, M.-P., "The IMGT unique numbering for immunoglobulins, T cell Receptors and Ig-like domains", The Immunologist, 7, 132-136 (1999) (その全体が参照により本明細書に参照により組み込まれる)。本明細書で使用される場合、「IMGT配列付番」または「IMTGに従って付番される」は、IMGTに従う可変領域をコードする配列の付番を指す。重鎖可変ドメインの場合、IMGTに従って付番される場合、超可変領域は、CDR1についてアミノ酸位置27~38、CDR2についてアミノ酸位置56~65、及びCDR3についてアミノ酸位置105~117の範囲である。軽鎖可変ドメインの場合、IMGTに従って付番される場合、超可変領域は、CDR1についてアミノ酸位置27~38、CDR2についてアミノ酸位置56~65、及びCDR3についてアミノ酸位置105~117の範囲である。

【0122】

いくつかの実施形態では、カーゴまたはペイロードは、当該技術分野で知られている方



法、例えば、限定されないが、免疫及びディスプレイ技術（例えば、ファージディスプレイ、酵母ディスプレイ、及びリボソームディスプレイ）、ハイブリドーマ技術、ハイブリドーマまたは他の源から選択される重鎖及び軽鎖可変領域 cDNA 配列を使用して生成された抗体を含み得、またはコードし得る。

#### 【0123】

いくつかの実施形態では、カーゴまたはペイロードは、任意の天然に存在するまたは合成の抗原を使用して樹立された抗体を含み得、またはコードし得る。本明細書で使用される場合、「抗原」は、生物において免疫反応を誘導するまたは呼び起こす実体である。免疫反応は、外来実体の存在に対する生物の細胞、組織及び／または器官の反応によって特性化される。そのような免疫反応は、典型的には、外来実体、例えば、抗原または抗原の一部分に対する1つ以上の抗体の生物による生成をもたらす。本明細書で使用される場合、「抗原」はまた、ディスプレイライブラリにおける特定の抗体または結合剤に対する結合パートナーを指す。

10

#### 【0124】

本明細書で使用される場合、用語「モノクローナル抗体」は、実質的に均一の細胞（またはクローン）の集団から得られた抗体を指す。すなわち、集団を構成する個々の抗体は、モノクローナル抗体の生成中に生じ得る可能性のあるバリエーション（そのようなバリエーションは通常、少量で存在する）を除き、同一であり及び／または同じエピトープに結合する。異なる決定基（エピトープ）に対して仕向けられた異なる抗体を典型的に含むポリクローナル抗体調製物とは対照的に、各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基に対して仕向けられる。

20

#### 【0125】

修飾語「モノクローナル」は、実質的に均一の抗体集団から得られる抗体の特性を示し、任意の特定の方法による抗体の生成を必要とするものと解釈されるべきではない。本明細書におけるモノクローナル抗体には、重鎖及び／または軽鎖の一部分が、特定の種に由来する、または特定の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体における対応する配列と同一または相同である一方で、鎖（複数可）の残部が、別の種に由来する、または別の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体における対応する配列と同一または相同である「キメラ」抗体（免疫グロブリン）、及びそのような抗体の断片が含まれる。

#### 【0126】

本明細書で使用される場合、用語「ヒト化抗体」は、1つ以上の非ヒト（例えば、ネズミ）抗体源（複数可）からの最小部分を含み、残部が1つ以上のヒト免疫グロブリン源に由来するキメラ抗体を指す。ほとんど場合、ヒト化抗体は、レシピエントの抗体からの超可変領域からの残基が、所望の特異性、親和性、及び／または能力を有する非ヒト種（ドナー抗体）、例えば、マウス、ラット、ウサギまたは非ヒト霊長類の抗体からの超可変領域からの残基によって置き換えられたヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）である。

30

#### 【0127】

いくつかの実施形態では、カーゴまたはペイロードは、抗体模倣体を含み得、またはコードし得る。本明細書で使用される場合、用語「抗体模倣体」は、抗体の機能または効果を模倣し、かつそれらの分子標的に特異的かつ高親和性で結合する任意の分子を指す。いくつかの実施形態では、抗体模倣体は、タンパク質骨格としてフィブロネクチンIII型ドメイン（Fn3）を組み込むように設計されたモノボディであり得る。いくつかの実施形態では、抗体模倣体は、アフィボディ分子、アフィリン、アフィチン、アンチカリン、アビマー、センチリン、DARPIN（商標）、フィノマー、クーニツドメイン、及びドメインペプチドを含むがこれらに限定されない当該技術分野で知られているものであり得る。他の実施形態では、抗体模倣体には、1つ以上の非ペプチド領域が含まれ得る。

40

#### 【0128】

##### 抗体断片及びバリエーション

いくつかの実施形態では、カーゴまたはペイロードは、全長抗体からの抗原結合領域を含む抗体断片を含み得、またはコードし得る。抗体断片の非限定的な例には、Fab、F

50

a b'、F (a b')<sub>2</sub>、及び F v 断片、ダイアボディ、線状抗体、一本鎖抗体分子、及び抗体断片から形成された多重特異的抗体が含まれる。抗体のパパイン消化は、「F a b」断片と呼ばれる2つの同一の抗原結合断片を生成し、各々が単一の抗原結合部位を有する。また、残基「F c」断片も生成され、その名称は、容易に結晶化するその能力を反映する。ペプシン処置は、2つの抗原結合部位を有し、依然として抗原を架橋させることが可能な F (a b')<sub>2</sub> 断片を生成する。本開示の化合物及び／または組成物は、これらの断片のうちの1つ以上を含み得る。

#### 【0129】

いくつかの実施形態では、F c 領域は、修飾された F c 領域であり得、F c 領域は、野生型 F c 領域のための対応する配列と比較した場合、単一のアミノ酸置換を有し得、単一のアミノ酸置換は、野生型 F c 領域のものに対して好ましい特性を有する F c 領域を生成する。単一のアミノ酸置換によって改変され得る F c 特性の非限定的な例には、pH 条件に対する結合特性または反応が含まれる。

#### 【0130】

本明細書で使用される場合、用語「F v」は、完全な抗原結合部位を形成するために必要とされる抗体上の最小断片を含む抗体断片を指す。これらの領域は、緊密な非共有結合性の会合での1つの重鎖及び1つの軽鎖可変ドメインの二量体からなる。F v 断片は、タンパク質分解切断によって生成され得るが、概ね不安定である。組換え方法は、典型的には、一本鎖 F v (s c F v) を形成するために軽鎖可変ドメインと重鎖可変ドメインとの間のフレキシブルリンカーの挿入を介して、または重鎖可変ドメインと軽鎖可変ドメインとの間のジスルフィド架橋の導入を介して、安定な F v 断片を生成するために当該技術分野で知られている。

#### 【0131】

本明細書で使用される場合、用語「一本鎖 F v」または「s c F v」は、V<sub>H</sub> 及び V<sub>L</sub> 抗体ドメインの融合タンパク質であって、これらのドメインが、フレキシブルペプチドリンカーによって単一のポリペプチド鎖へと互いに連結されているものを指す。いくつかの実施形態では、F v ポリペプチドリンカーは、s c F v が抗原結合のための所望の構造を形成することを可能にする。いくつかの実施形態では、s c F v は、ファージディスプレイ、酵母ディスプレイまたは他のディスプレイ方法と併せて利用され、その場合、それらは、表面メンバー（例えば、ファージコートタンパク質）と関連して発現され、所与の抗原に対する高親和性ペプチドの同定において使用され得る。

#### 【0132】

本明細書で使用される場合、用語「抗体バリエント」は、構造及び／または機能がネイティブまたは開始抗体と似ている（ネイティブ又開始抗体に対して）修飾された抗体または生体分子（例えば、抗体模倣体）を指す。抗体バリエントは、ネイティブ抗体と比較した場合、それらのアミノ酸配列、組成、または構造が改変され得る。抗体バリエントには、改変されたアイソタイプ（例えば、I g A、I g D、I g E、I g G<sub>1</sub>、I g G<sub>2</sub>、I g G<sub>3</sub>、I g G<sub>4</sub>、または I g M）を有する抗体、ヒト化バリエント、最適化されたバリエント、多重特異的抗体バリエント（例えば、二重特異的バリエント）、及び抗体断片が含まれ得るがこれらに限定されない。

#### 【0133】

##### 多重特異的抗体

いくつかの実施形態では、カーゴまたはペイロードは、複数のエピトープを結合させる抗体であり得、またはそれをコードし得る。本明細書で使用される場合、用語「マルチボディ」または「多重特異的抗体」は、2つ以上の可変領域が、異なるエピトープに結合する抗体を指す。エピトープは、同じまたは異なる標的上にあり得る。所定の実施形態では、多重特異的抗体は、同じまたは異なる抗原上の2つの異なるエピトープを認識する「二重特異的抗体」である。

#### 【0134】

いくつかの実施形態では、多重特異的抗体は、B I O A T L A（登録商標）によって使

10

20

30

40

50

用される及び国際特許公開WO201109726（その内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載される方法によって調製され得る。まず、相同の天然に存在する抗体のライブラリが、当該技術分野で知られている任意の方法（すなわち、哺乳動物細胞表面ディスプレイ）によって生成され、次いで2つ以上の標的抗原に特異的に結合する多重特異的抗体について、FACS Ariaまたは別のスクリーニング方法によってスクリーニングされる。いくつかの実施形態では、同定された多重特異的抗体は、修飾された多重特異的抗体のセットを生成するために、当該技術分野で知られている任意の方法によってさらに進化させられる。これらの修飾された多重特異的抗体は、標的抗原への結合についてスクリーニングされる。いくつかの実施形態では、多重特異的抗体は、最適化されたまたは所望の特徴について進化した修飾された多重特異的抗体をスクリーニングすることによってさらに最適化され得る。

10

#### 【0135】

いくつかの実施形態では、多重特異的抗体は、BIOATLA（登録商標）によって使用され、米国公開番号US20150252119（その内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載される方法によって調製され得る。1つのアプローチでは、2つの親抗体の可変ドメインであって、親抗体がモノクローナル抗体であるものは、単一の軽鎖が、2つの異なる親抗体の重鎖を機能的に補完することを可能とする手法で当該技術分野で知られている任意の方法を使用して進化させられる。別のアプローチは、第2の標的抗原を認識するために単一の親抗体の重鎖を進化させることを必要とする。第3のアプローチは、第2の標的抗原を認識するように親抗体の軽鎖を進化させることを伴う。ポリペプチド進化のための方法は、国際公開WO2012009026（その内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載されており、それには、非限定的な例として、包括的位置進化（CPE）、コンビナトリアルタンパク質合成（CPS）、包括的位置挿入（CPI）、包括的位置欠失（CPD）、またはそれらの任意の組み合わせが含まれる。米国公開番号US20150252119に記載の多重特異的抗体のFc領域は、ノブ・イン・ホールアプローチ、またはFcドメインがヘテロ二量体を形成することを可能とする任意の他の方法を使用して生成され得る。得られる多重特異的抗体は、改善された特徴または特性、例えば、標的抗原に対する結合親和性のためにさらに進化させられ得る。

20

#### 【0136】

##### 二重特異的抗体

いくつかの実施形態では、カーゴまたはペイロードは、二重特異的抗体であり得、またはそれをコードし得る。本明細書で使用される場合、用語「二重特異的抗体」は、2つの異なる抗原に結合することが可能な抗体を指す。そのような抗体は、典型的には、少なくとも2つの異なる抗体からの領域を含む。そのような抗体は、典型的には、少なくとも2つの異なる抗体からの抗原結合領域を含む。例えば、二重特異的モノクローナル抗体（BsMAb、BsAb）は、2つの異なるモノクローナル抗体の断片から構成される人工タンパク質であり、よって、BsAbは、2つの異なるタイプの抗原にする結合することが可能となる。

30

#### 【0137】

いくつかの場合では、カーゴまたはペイロードは、2つの異なる抗tau抗体からの抗原結合領域を含む二重特異的抗体であり得、またはそれをコードし得る。例えば、そのような二重特異的抗体は、2つの異なる抗体からの結合領域を含み得る。

40

#### 【0138】

二重特異的抗体フレームワークには、Riethmuller, G., 2012. Cancer Immunity. 12:12-18; Marvin, J. S. et al., 2005. Acta Pharmacologica Sinica. 26(6):649-58; 及び Schaefer, W. et al., 2011. PNAS. 108(27):11187-92（これらの各々の内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているもののいずれかが含まれ得る。

50

## 【0139】

「3官能性二重特異的」抗体と呼ばれるB s M A bの新たな世代が開発されている。これらは、2つの重鎖及び2つの軽鎖からなり、各々が2つの異なる抗体に由来し、2つのF a b領域（腕部）は、2つの抗原に対して仕向けられ、F c領域（足部）は、2つの重鎖を含み、3つ目の結合部位を形成する。

## 【0140】

二重特異的抗体の可変ドメインの頂部を形成する2つのパラトープのうち、一方は標的抗原に対して仕向けられ得、他方はTーリンパ球抗原様C D 3に対して仕向けられ得る。3官能性抗体の場合、F c領域は、マクロファージ、ナチュラルキラー（NK）細胞または樹状細胞のようなF c受容体を発現する細胞に追加的に結合し得る。要するに、標的とされる細胞は、免疫系の1つまたは2つの細胞に接続され、それはその後それを破壊する。

10

## 【0141】

二重特異的抗体の他のタイプは、サイトカイン遊離によって引き起こされる所定の問題、例えば、短い半減期、免疫原性及び副作用を克服するように設計されている。それらには、F a b領域のみからなる化学的に連結されたF a b、ならびに様々なタイプの二価及び三価一本鎖可変断片（s c F v）が含まれる（2つの抗体の可変ドメインを模倣する融合タンパク質）。これらのより新しい形式の最も開発が進んでいるものは、二重特異的T細胞エンゲージャー（B i T E）及びF c定常領域の代わりにF c a b抗原結合断片を含むように操作されたm A b 2の抗体である。

20

## 【0142】

分子遺伝学を使用して、2つのs c F vは、「タンデムs c F v」（t a s c F v）と呼ばれる、リンカードメインによって分離された単一のポリペプチドへとタンデムで操作され得る。T a s c F vは、不十分な可溶性であり、細菌において生成される場合にリフォールディングを必要とすることが判明しており、またはそれらは、リフォールディング要件を回避するが不十分な収率をもたらし得る哺乳動物細胞培養システムにおいて製造され得る。2つの異なるs c F vのための遺伝子でのt a s c F vの構築は、「二重特異的一本鎖可変断片」（ビスーs c F v）を生成する。商業会社によって2つのみのt a s c F vが臨床的に開発されている；その両方は、がん適応症のためのM i c r o m e tによる進行中の初期段階の開発下にある二重特異的薬剤であり、「二重特異的T細胞エンゲージャー（B i T E）」として記載されている。ブリナツモマブは、第2相にある、B細胞非ホジキンリンパ腫に対するT細胞反応を促進する抗C D 1 9／抗C D 3二重特異的t a s c F vである。M T 1 1 0は、第1相にある、固形腫瘍に対するT細胞反応を促進する抗E P－C A M／抗C D 3二重特異的t a s c F vである。二重特異的四価「T a n d A b」もまた、A f f i m e dによって研究されている。

30

## 【0143】

いくつかの実施形態では、カーゴまたはペイロードは、単一の抗原結合ドメインを含む抗体であり得、またはそれをコードし得る。これらの分子は極端に小さく、分子量は、フルサイズのm A bで観察されるもののおよそ10分の1である。さらなる抗体には、軽鎖を欠く、ラクダ及びリャマに見られる重鎖抗体の抗原結合可変重鎖領域（V H H）に由来する「ナノボディ」が含まれ得る。

40

## 【0144】

M e m o r i a l S l o a n－K e t t e r i n g C a n c e r C e n t e rのP C T公開W O 2 0 1 4 1 4 4 5 7 3（その内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）では、二量体化の能力を有しない多重特異的結合剤よりも改善された特性を有する二量体多重特異的結合剤（例えば、抗体成分を含む融合タンパク質）を作製するための多量体化技術が開示及び請求されている。

## 【0145】

いくつかの場合では、カーゴまたはペイロードは、四価二重特異的抗体（P C T公開W O 2 0 1 4 1 4 4 3 5 7（その内容は、その全体が本明細書に組み込まれる）で開示及び

50

請求される T e t B i A b) であり得、またはそれをコードし得る。T e t B i A b は、抗体の C 末端に結合された第 2 の抗原特異性を有する F a b 断片の第 2 の対を特徴とし、よって、2 つの抗原特異性の各々について二価である分子を提供する。四価抗体は、その同源の共発現した F a b 重鎖と会合する F a b 軽鎖に抗体重鎖を共有結合的に連結させることによって、遺伝子操作方法によって生成される。

#### 【0146】

いくつかの態様では、カーゴまたはペイロードは、米国特許番号 5, 091, 513 (その内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる) に記載されるような生合成抗体であり得、またはそれをコードし得る。そのような抗体には、生合成抗体結合部位 (B A B S) として挙動する領域を構成するアミノ酸の 1 つ以上の配列が含まれ得る。部位は、1) 非共有結合的に関連付けられたまたはジスルフィド結合した合成 V<sub>H</sub> 及び V<sub>L</sub> 二量体、2) V<sub>H</sub> - V<sub>L</sub> または V<sub>L</sub> - V<sub>H</sub> 一本鎖であって、V<sub>H</sub> 及び V<sub>L</sub> がポリペプチドリinker によって結合されているもの、または 3) 個々の V<sub>H</sub> または V<sub>L</sub> ドメインを含む。結合ドメインは、連結された C D R 及び F R 領域を含み、これらは別々の免疫グロブリンに由来し得る。生合成抗体にはまた、例えば、酵素、毒素、結合部位、または固定化媒体もしくは放射性原子への結合の部位として機能する他のポリペプチド配列が含まれ得る。生合成抗体を生成するための、抗体の i n v i v o 生成によって誘発され得る任意の特異性を有する B A B S を設計するための、及びそれらのアナログを生成するための方法が開示される。

#### 【0147】

いくつかの実施形態では、カーゴまたはペイロードは、米国特許番号 8, 399, 625 で教示されている抗体アクセプターフレームワークを有する抗体であり得、またはそれをコードし得る。そのような抗体アクセプターフレームワークは、対象となる抗体からの特に良好に適した受け入れ C D R であり得る。いくつかの場合では、当該技術分野で知られているまたは本明細書に提示される方法に従って開発された抗 t a u 抗体からの C D R が使用され得る。

#### 【0148】

##### 小型化抗体

いくつかの実施形態では、カーゴまたはペイロードは、「小型化」抗体であり得、またはそれをコードし得る。m A b の小型化の最良の例には、T r u b i o n P h a r m a c e u t i c a l s 製の小型モジュール免疫薬 (S M I P) がある。一価または二価であり得るこれらの分子は、1 つの V<sub>L</sub>、1 つの V<sub>H</sub> 抗原結合ドメイン、及び 1 つまたは 2 つの定常「エフェクター」ドメインを含有し、すべてがリンカードメインによって接続されている組換え一本鎖分子である。おそらく、そのような分子は、定常ドメインによって付与される免疫エフェクター機能を維持しながら、断片によって求められる増加した組織または腫瘍浸透性の利点を提供する可能性がある。少なくとも 3 つの「小型化」S M I P が臨床開発に入っている。W y e t h と協働で開発された抗 C D 20 S M I P である T R U - 015 は、最も進行している計画であり、関節リウマチ (R A) について第 2 相まで進行している。全身性エリテマトーデス (S L E) 及び B 細胞リンパ腫におけるより早期の試みは、最終的に中止された。T r u b i o n a n d F a c e t B i o t e c h n o l o g y は、第 2 相に達したプロジェクトである、C L L 及び他のリンパ新生物の処置のための抗 C D 37 S M I P である T R U - 016 の開発において協業している。W y e t h は、R A、S L E、及び場合により多発性硬化症を含む自己免疫疾患の処置のための抗 C D 20 S M I P S B I - 087 をライセンスしたが、これらのプロジェクトは、臨床試験の最も早期の段階に留まっている。

#### 【0149】

##### ダイアボディ

いくつかの実施形態では、カーゴまたはペイロードは、ダイアボディであり得、またはそれをコードし得る。本明細書で使用される場合、用語「ダイアボディ」は、2 つの抗原結合部位を有する小さな抗体断片を指す。ダイアボディは、同じポリペプチド鎖において

軽鎖可変ドメインV<sub>L</sub>に接続された重鎖可変ドメインV<sub>H</sub>を含む。同じ鎖上の2つのドメイン間の対合を可能にするには過度に短いリンカーを使用することにより、ドメインは、別の鎖の相補的ドメインと対合し、2つの抗原結合部位を生成することを強えられる。

#### 【0150】

ダイアボディは、機能的二重特異的一本鎖抗体(b s c A b)である。これらの二価抗原結合分子は、s c F vの非共有結合性二量体から構成され、組換え方法を使用して哺乳動物細胞において生成され得る(例えば、Mack et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 92:7021-7025, 1995を参照されたい)。数種のダイアボディが臨床開発に入っている。抗CEAキメラ抗体c T 8 4 . 6 6のヨウ素-123標識ダイアボディバージョンは、Beckman Research Institute of the City of Hope (Clinicaltrials.gov NCT00647153)によって資金援助された研究において大腸癌の術前イムノシンチグラフィ検出について評価されている。

#### 【0151】

##### ユニボディ

いくつかの実施形態では、カーゴまたはペイロードは、ヒンジ領域がI g G 4分子から除去された「ユニボディ」であり得、またはそれをコードし得る。I g G 4分子は不安定であり、軽-重鎖ヘテロ二量体を互いに交換し得るが、ヒンジ領域の欠失は、重鎖-重鎖の対合を完全に防止し、高い特異性の一価軽/重ヘテロ二量体を残し、その一方でi n v i v oでの安定性及び半減期を確保するためのF c領域を保持する。I g G 4は、F c Rと不十分に相互作用し、一価ユニボディは、細胞内シグナル伝達複合体形成を促進することができないので、この構成は、免疫活性化または発がん成長のリスクを最小化し得る。しかしながら、これらの論点は、臨床よりも実験室的証拠によって概ね支持されている。他の抗体は、縮小された100 k D aの抗体である「小型化」抗体であり得る。

#### 【0152】

##### イントラボディ

いくつかの実施形態では、カーゴまたはペイロードは、イントラボディであり得、またはそれをコードし得る。用語「イントラボディ」は、それが生成される細胞から分泌されないが、代わりに1つ以上の細胞内タンパク質を標的とする抗体の形態を指す。イントラボディは、細胞内トラフィッキング、転写、翻訳、代謝プロセス、増殖シグナル伝達及び細胞分裂を含むがこれらに限定されない多数の細胞プロセスに影響を及ぼすために使用され得る。いくつかの実施形態では、本開示の方法には、イントラボディベースの療法が含まれ得る。いくつかのそのような実施形態では、本明細書に開示される可変ドメイン配列及び/またはC D R配列は、イントラボディベースの療法のための1つ以上のコンストラクトに組み込まれ得る。例えば、イントラボディは、1つ以上の糖化細胞内タンパク質を標的とし得、または1つ以上の糖化細胞内タンパク質と代替的タンパク質との間の相互作用を調節し得る。

#### 【0153】

20年超前、細胞内標的に対する細胞内抗体が最初に記載された(Biocca, Neuberger and Cattaneo EMBO J. 9:101-108, 1990(その内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる))。哺乳動物細胞の異なる区画におけるイントラボディの細胞内発現は、内因性分子の機能のブロックまたは調節を可能とする(Biocca, et al., EMBO J. 9:101-108, 1990; Colby et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101:17616-21, 2004(その内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる))。イントラボディは、タンパク質フォールディング、タンパク質-タンパク質、タンパク質-DNA、タンパク質-RNA相互作用及びタンパク質修飾を改変し得る。それらは、表現型ノックアウトを誘導し、標的抗原への直接的結合によって、その細胞内トラフィッキングを迂回させることによってまたは結合パートナーとのその会合を阻害することによって、中和剤として作用し得る。それらは主に、研究ツ-

ルとして用いられており、ヒト疾患、例えば、ウイルス性病状、がん及びミスフォールディング疾患の処置のための治療分子として台頭している。組換え抗体の急成長しているバイオ市場は、療法におけるそれらの使用のために、より低い免疫原性と共に、向上した結合特異性、安定性、及び溶解性を有するイントラボディを提供する。

#### 【0154】

いくつかの実施形態では、イントラボディは、干渉RNA (iRNA) を上回る利点を有する；例えば、iRNAは、複数の非特異的効果を発揮することが示されている一方で、イントラボディは、標的抗原に対する高い特異性及び親和性を有することが示されている。さらに、タンパク質として、イントラボディは、iRNAよりもはるかに長い活性半減期を保有する。よって、細胞内標的分子の活性半減期が長い場合、iRNAを介した遺伝子サイレンシングは、効果を生み出すのが遅い場合がある一方で、イントラボディ発現の効果は、ほとんど瞬間的であり得る。最後に、特定の標的分子の所定の結合相互作用をブロックする一方で他のものを取っておくようにイントラボディを設計することが可能である。

#### 【0155】

イントラボディは、しばしば、組換え核酸分子から発現され、かつ細胞内に保持される（例えば、細胞質、小胞体、またはペリプラズムに保持される）ように操作された一本鎖可変断片 (scFv) である。イントラボディは、例えば、イントラボディが結合するタンパク質の機能を取り除くために、使用され得る。イントラボディの発現はまた、イントラボディを含む核酸発現ベクターにおける誘導性プロモーターの使用を介して制御される。イントラボディは、当該技術分野で知られている方法、例えば、Marasco et al., 1993 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:7889-7893; Chen et al., 1994, Hum. Gene Ther. 5:595-601; Chen et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:5932-5936; Maciejewski et al., 1995, Nature Med., 1:667-673; Marasco, 1995, Immunotech, 1:1-19; Mhashilkar, et al., 1995, EMBO J. 14:1542-51; Chen et al., 1996, Hum. Gene Therap., 7:1515-1525; Marasco, Gene Ther. 4:11-15, 1997; Rondon and Marasco, 1997, Annu. Rev. Microbiol. 51:257-283; Cohen, et al., 1998, Oncogene 17:2445-56; Proba et al., 1998, J. Mol. Biol. 275:245-253; Cohen et al., 1998, Oncogene 17:2445-2456; Hassanzadeh, et al., 1998, FEBS Lett. 437:81-6; Richards et al., 1998, Gene Ther. 5:635-44; Ohage and Steipe, 1999, J. Mol. Biol. 291:1119-1128; Ohage et al., 1999, J. Mol. Biol. 291:1129-1134; Wirtz and Steipe, 1999, Protein Sci. 8:2245-2250; Zhu et al., 1999, J. Immunol. Methods 231:207-222; Arafat et al., 2000, Cancer Gene Ther. 7:1250-6; der Maur et al., 2002, J. Biol. Chem. 277:45075-85; Mhashilkar et al., 2002, Gene Ther. 9:307-19; 及びWheeler et al., 2003, FASEB J. 17:1733-5ならびにこれらで引用されている参考文献) において開示され、レビューされているものを使用して本開示のウイルスゲノムにおいて使用するために生成され得る。特に、CCR5イントラボディは、Steinberger et al., 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:805-810) によって生成されている。一般にMarasco, WA, 1998, "Intrabodies: Basic Research and Cli

10

20

30

40

50

nical Gene Therapy Applications” Springer : New Yorkを参照されたい；また、scFvのレビューについては、Pluckthun in “The Pharmacology of Monoclonal Antibodies,” 1994, vol. 113, Rosenberg and Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp. 269-315を参照されたい（これらの各々の内容は、それらの全体が参照によりそれぞれ組み込まれる）。

#### 【0156】

ドナー抗体からの配列は、イントラボディを樹立するために使用され得る。イントラボディは、しばしば、細胞内で単一のドメイン断片、例えば、単離されたV<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>ドメインとしてまたは一本鎖可変断片（scFv）抗体として組換え的に発現される。例えば、イントラボディは、しばしば、フレキシブルリンカーポリペプチドによって接続された重鎖及び軽鎖の可変ドメインを含む一本鎖抗体を形成するために単一のポリペプチドとして発現される。イントラボディは、典型的には、ジスルフィド結合を欠き、それらの特異的結合活性を介して標的遺伝子の発現または活性を調節することが可能である。一本鎖抗体はまた、軽鎖定常領域に接続された一本鎖可変領域断片として発現され得る。

#### 【0157】

当該技術分野で知られているように、イントラボディは、標的タンパク質が位置する細胞内区画において高濃度での発現を可能とするために、そのNまたはC末端で細胞内トラフィッキングシグナルをコードするように組換えポリヌクレオチドベクター内に操作され得る。例えば、小胞体（ER）に標的化されたイントラボディは、リーダーペプチド及び、任意に、C末端ER保持シグナルを組み込むように操作される。核において活性を発揮することが意図されたイントラボディは、核局在化シグナルを含むように操作される。細胞膜のサイトゾル側にイントラボディを繋ぐために脂質部位がイントラボディに接続される。イントラボディはまた、サイトゾルにおいて機能を発揮するように標的化され得る。例えば、サイトゾルイントラボディは、サイトゾル内の因子を隔離するために使用され、それによりそれらがそれらの天然細胞目的地に輸送されることを防止する。

#### 【0158】

イントラボディ発現には所定の技術的課題が存在する。特に、細胞内での新しく合成されたイントラボディのタンパク質構造的フォールディング及び構造的安定性は、細胞内環境の還元条件によって影響を受ける。

#### 【0159】

本開示のイントラボディは、病理学的アイソフォームを含むタンパク質の異なる構造を特異的に認識するそれらの事実上無限の能力の使用のため、及びそれらが凝集の潜在的部位（細胞内及び細胞外部位の両方）に標的とされ得るため、タウオパチー、プリオン病、アルツハイマー病、パーキンソン病、及びハンチントン病を含むミスフォールディング疾患の処置のための有望な治療剤であり得る。これらの分子は、それらの凝集を防止することによってアミロイド生成性タンパク質に対する中和剤として、及び／またはその潜在的凝集部位からタンパク質を経路変更することによって細胞内トラフィックの分子シャンターとして作用し得る。

#### 【0160】

##### マキシボディ

いくつかの実施形態では、カーゴまたはペイロードは、IgGのマキシボディ（Fc（CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>ドメインのアミノ末端に融合された二価scFv）であり得、またはそれをコードし得る。

#### 【0161】

##### キメラ抗原受容体（CAR）

いくつかの実施形態では、カーゴまたはペイロードは、免疫細胞（例えば、T細胞及びNK細胞）に形質導入された場合、CARの細胞外標的部位によって認識される分子を発現する標的（例えば、腫瘍細胞）に対して免疫細胞を再誘導し得るキメラ抗原受容体（C

10

20

30

40

50



A R)であり得、またはそれをコードし得る。

【0162】

本明細書で使用される場合、用語「キメラ抗原受容体 (CAR)」は、T細胞の表面上のTCRを模倣する合成受容体を指す。通常、CARは、細胞外標的化ドメイン、膜貫通ドメイン／領域及び細胞内シグナル伝達／活性化ドメインから構成される。標準的なCAR受容体では、成分：細胞外標的化ドメイン、膜貫通ドメイン及び細胞内シグナル伝達／活性化ドメインは、単一の融合タンパク質として線状に構築されている。細胞外領域は、特定の腫瘍抗原または他の腫瘍細胞－表面分子を認識する標的化ドメイン／部位（例えば、scFv）を含む。細胞内領域は、TCR複合体のシグナル伝達ドメイン（例えば、CD3ζのシグナル領域）、及び／または1つ以上の共刺激シグナル伝達ドメイン、例えば、CD28、4-1BB (CD137) 及びOX-40 (CD134) からのものを含有し得る。例えば、「第1世代CAR」のみがCD3ζシグナル伝達ドメインを有する一方で、T細胞の持続性及び増殖を高める努力の中で、共刺激細胞内ドメインが加えられ、CD3ζシグナルドメインに加えて1つの共刺激シグナル伝達ドメインを有する第2世代CAR、及びCD3ζシグナルドメインに加えて2つ以上の共刺激シグナル伝達ドメインを有する第3世代CARが出現した。CARは、T細胞によって発現する場合、CARの細胞外標的化部位によって決定される抗原特異性を有するT細胞をもたらす。いくつかの態様では、1つ以上の要素、例えば、ホーミング及び自殺遺伝子が、より有能でより安全なCAR構造を開発するために加えられる可能性がある（いわゆる第4世代CAR）。

【0163】

いくつかの実施形態では、細胞外標的化ドメインは、ヒンジ（スペースドメインまたはスペーサーとも称される）及び膜貫通領域を介して細胞内シグナル伝達ドメインに接続される。ヒンジは、細胞外標的化ドメインを、細胞膜を横断し、かつ細胞内シグナル伝達ドメインに接続する膜貫通ドメインに接続させる。標的化部位が結合する標的タンパク質のサイズ、ならびに標的化ドメイン自体のサイズ及び親和性により、CAR形質導入細胞のがん細胞に対する効力を最適化するためにヒンジを変化させる必要があり得る。標的細胞への標的化部位の認識及び結合により、細胞内シグナル伝達ドメインは、CAR T細胞に活性化シグナルをもたらす、これは、1つ以上の細胞内共刺激ドメインからの「第2のシグナル」によってさらに増幅される。CAR T細胞は、活性化されると、標的細胞を破壊し得る。

【0164】

いくつかの実施形態では、CARは、2つの部分に分割され得、各部分は、二量化ドメインに連結されており、これにより二量化を誘発するインプットがインタクトな機能性受容体の構築を促進する。Wu及びLimは、細胞外CD19結合ドメイン及び細胞内シグナル伝達要素が分離されており、ラパマイシンアナログAP21967の存在下でヘテロ二量化するFKBPドメイン及びFRB\* (FKBP-ラパマイシン結合のT2089L変異体) ドメインに連結されている分割CARを報告した。分割受容体は、AP21967の存在下で特定の抗原結合と一緒に構築され、T細胞を活性化する (Wu et al., Science, 2015, 625 (6258) : aab4077 (その内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる))。

【0165】

いくつかの実施形態では、CARは、CD19 CARコンストラクトへのTet-On誘導性システムの組み込みを有する誘導性CARとして設計され得る。CD19 CARは、ドキシサイクリン (Dox) の存在下でのみ活性化される。Sakemuraは、Doxの存在下のTet-CD19CAR T細胞が、従来のCD19CAR T細胞と比較して、CD19+細胞株に対して同等の細胞傷害性があり、CD19刺激時に同等のサイトカイン生成及び増殖を有することを報告した (Sakemura et al., Cancer Immuno. Res., 2016, Jun 21, Epub (その内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる))。二重システムは、形質導入されたT細胞におけるCAR発現のオン及びオフに対してより高い柔軟性を提供する。

## 【0166】

いくつかの実施形態では、カーゴまたはペイロードは、第1世代CAR、または第2世代CAR、または第3世代CAR、または第4世代CARであり得、またはそれをコードし得る。いくつかの実施形態では、カーゴまたはペイロードは、細胞外ドメイン、ヒンジ及び膜貫通ドメイン及び細胞内シグナル伝達領域から構成される完全CARコンストラクトであり得、またはそれをコードし得る。他の実施形態では、カーゴまたはペイロードは、細胞外標的化部位、ヒンジ領域、膜貫通ドメイン、細胞内シグナル伝達ドメイン、1つ以上の共刺激ドメイン、ならびにリーダー配列、ホーミング要素及び安全性スイッチまたはそのような成分の組み合わせを含むがこれらに限定されないCAR構造及び機能性を改善する他の追加の要素を含む完全CARコンストラクトの成分であり得、またはそれをコードし得る。

10

## 【0167】

いくつかの実施形態では、カーゴまたはペイロードは、調整可能なCARであり得、またはそれをコードし得る。可逆的オン・オフスイッチメカニズムは、過剰なCAR-T細胞増殖によって引き起こされる急性毒性の管理を可能とする。リガンドで付与されるCARの制御は、抗原喪失によって誘導される腫瘍エスケープの相殺において有効であり得、慢性的抗原曝露による緊張性シグナル伝達によって引き起こされる機能消耗を回避し、*in vivo*でCAR発現細胞の持続性を向上させる。調整可能なCARは、腫瘍溶解症候群によって引き起こされる組織毒性に対してオンターゲットを制限するためにCAR発現を下方制御するために利用され得る。抗腫瘍効力の後にCARの発現を下方制御することは、(1) 正常な組織において抗原発現によって引き起こされるオンターゲット腫瘍外毒性；(2) *in vivo*での抗原非依存的活性化を防止し得る。

20

## 【0168】

## 細胞外標的化ドメイン／部位

いくつかの実施形態では、CARの細胞外標的化部位は、所与の標的分子、例えば、腫瘍細胞上のネオアンチゲンを高い特異性及び親和性で認識し、それに結合する任意の薬剤であり得る。標的化部位は、腫瘍細胞上の標的分子に特異的に結合する抗体及びそのバリエーション、または腫瘍細胞上の標的分子に結合するその能力に基づいてランダム配列プールから選択されたペプチドアダプター、または腫瘍細胞上の標的分子に結合し得るバリエーションもしくはその断片、またはナイティブT細胞受容体(TCR)からの抗原認識ドメイン(例えば、HIV感染細胞を認識するCD4細胞外ドメイン)、または外来認識成分、例えば、サイトカイン受容体を保有する標的細胞の認識をもたらす連結サイトカイン、または受容体の天然リガンドであり得る。

30

## 【0169】

いくつかの実施形態では、CARの標的化ドメインは、Ig NAR、Fab断片、Fab'断片、F(ab)'<sub>2</sub>断片、F(ab)'<sub>3</sub>断片、Fv、一本鎖可変断片(scFv)、bis-scFv、(scFv)<sub>2</sub>、ミニボディ、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、ジスルフィド安定化Fvタンパク質(dsFv)、ユニボディ、ナノボディ、または標的分子、例えば、腫瘍特異的抗原(TSA)を特異的に認識する抗体に由来する抗原結合領域であり得る。1つの実施形態では、標的化部位は、scFv抗体である。scFvドメインは、CAR-T細胞の表面上に発現し、その後、がん細胞上の標的タンパク質に結合した場合、CAR-T細胞をがん細胞の近くに維持し、T細胞の活性化を誘発することができる。scFvは、慣用の組換えDNAテクノロジー技術を使用して生成され得、本開示において論述される。

40

## 【0170】

いくつかの実施形態では、CARコンストラクトの標的化部位は、対象となる標的分子に特異的に結合するペプチドアダプター等のアダプターであり得る。ペプチドアダプターは、対象となる標的分子に結合するその能力に基づいてランダム配列プールから選択され得る。

## 【0171】

50

いくつかの実施形態では、CARコンストラクトの標的化部位は、標的分子の天然リガンド、または標的分子を結合させることが可能なそのバリエーション及び／または断片であり得る。いくつかの態様では、CARの標的化部位は、標的分子の受容体、例えば、CD70受容体としての全長ヒトCD27であり得、CD70陽性悪性腫瘍のための免疫治療剤としてCD27キメラ受容体を形成するCD3ζのシグナル伝達ドメインにインフレーションで融合され得る。

【0172】

いくつかの実施形態では、CARの標的化部位は、腫瘍特異的抗原（TSA）、例えば、腫瘍細胞上で限定して発現するがんネオアンチゲンを認識し得る。

【0173】

非限定的な例として、本開示のCARは、5T4、707-AP、A33、AFP（α-フェトプロテイン）、AKAP-4（Aキナーゼアンカータンパク質4）、ALK、α5β1-インテグリン、アンドロゲン受容体、アネキシンII、アルファ-アクチニン-4、ART-4、B1、B7H3、B7H4、BAGE（B黒色腫抗原）、BCMA、BCR-ABL融合タンパク質、ベーターカテニン、BKT-抗原、BTAA、CA-I（炭酸脱水酵素I）、CA50（がん抗原50）、CA125、CA15-3、CA195、CA242、カルレチニン、CAIX（炭酸脱水酵素）、CAMEL（黒色腫上の細胞傷害性T-リンパ球認識抗原）、CAM43、CAP-1、カスパーゼ-8/m、CD4、CD5、CD7、CD19、CD20、CD22、CD23、CD25、CD27/m、CD28、CD30、CD33、CD34、CD36、CD38、CD40/CD154、CD41、CD44v6、CD44v7/8、CD45、CD49f、CD56、CD68/KP1、CD74、CD79a/CD79b、CD103、CD123、CD133、CD138、CD171、cdc27/m、CDK4（サイクリン依存性キナーゼ4）、CDKN2A、CDS、CEA（がん胎児性抗原）、CEACAM5、CEACAM6、クロモグラニン、c-Met、c-Myc、coa-1、CSAp、CT7、CT10、シクロフィリンB、サイクリンB1、細胞質チロシンキナーゼ、サイトケラチン、DAM-10、DAM-6、dek-can融合タンパク質、デスミン、DEPDC1（DEPドメイン含有1）、E2A-PRL、EBNA、EGF-R（上皮成長因子受容体）、EGP-1（上皮糖タンパク質-1）（TROP-2）、EGP-2、EGP-40、EGFR（上皮成長因子受容体）、EGFRvIII、EF-2、ELF2M、EMMPRIN、EpCAM（上皮細胞接着分子）、EphA2、エプスタイン・バーウイルス抗原、Erb（ErbB1；ErbB3；ErbB4）、ETA（上皮腫瘍抗原）、ETV6-AML1融合タンパク質、FAP（線維芽細胞活性化タンパク質）、FBP（葉酸結合タンパク質）、FGF-5、葉酸受容体、FOS関連抗原1、フコシルGM1、G250、GAGE（GAGE-1；GAGE-2）、ガレクチン、GD2（ガングリオシド）、GD3、GFAP（グリア線維性酸性タンパク質）、GM2（がん胎児性抗原-免疫原性-1；OFA-I-1）、GnT-V、Gp100、H4-RET、HAGE（ヘリカーゼ抗原）、HER-2/neu、HIF（低酸素症誘導因子）、HIF-1、HIF-2、HLA-A2、HLA-A\*0201-R170I、HLA-ALL、HMWMAA、Hom/Mel-40、HSP70-2M（熱ショックタンパク質70）、HST-2、HTgp-175、hTERT（またはhTRT）、ヒトパピローマウイルス-E6/ヒトパピローマウイルス-E7及びE6、iCE（免疫捕捉EIA）、IGF-1R、IGH-IGK、IL-2R、IL-5、ILK（インテグリン-連結キナーゼ）、IMP3（インスリン様成長因子II mRNA結合タンパク質3）、IRF4（インターフェロン制御性因子4）、KDR（キナーゼ挿入ドメイン受容体）、KIAA0205、KRAB-ジンクフィンガータンパク質（KID）-3；KID31、KSA（17-1A）、K-ras、LAGE、LCK、LDLR/FUT（LDLR-フコシルトランスフェラーゼAS融合タンパク質）、LeY（ルイスY）、MAD-CT-1、MAGE（チロシナーゼ、黒色腫関連抗原）（MAGE-1；MAGE-3）、メラノ-A腫瘍抗原（MART）、MART-2/Ski、MC1R（メラノコルチン1受容体）、MDM2

10

20

30

40

50

、メソテリン、MPHOSPH1、MSA（筋肉特異的アクチン）、mTOR（ラパマイシンの哺乳動物標的）、MUC-1、MUC-2、MUM-1（黒色腫関連抗原（変異型）1）、MUM-2、MUM-3、ミオシン／m、MYL-RAR、NA88-A、N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ、neo-PAP、NF-KB（核因子-カッパB）、ニューロフィラメント、NSE（ニューロン特異的エノラーゼ）、ノッチ受容体、NuMa、N-Ras、NY-BR-1、NY-CO-1、NY-ESO-1、オンコスタチンM、OS-9、OY-TES1、p53変異体、p190マイナーbcr-abl、pl5（58）、pl85erbB2、pl80erbB-3、PAGE（前立腺関連遺伝子）、PAP（前立腺酸ホスファターゼ）、PAX3、PAX5、PDGFR（血小板由来成長因子受容体）、ペペリジン及びピロリジン利用に関与するシトクロムP450（PIPA）、Pml-RARアルファ融合タンパク質、PR-3（プロテイナーゼ3）、PSA（前立腺特異的抗原）、PSM、PSMA（前立腺幹細胞抗原）、PRAME（黒色腫の優先的に発現する抗原）、PTPRK、RAGE（腎臓腫瘍抗原）、Raf（A-Raf、B-Raf及びC-Raf）、Ras、受容体チロシンキナーゼ、RCAS1、RGSS、ROR1（受容体チロシンキナーゼ様オーファン受容体1）、RU1、RU2、SAGE、SART-1、SART-3、SCP-1、SDCCAG16、SP-17（精液タンパク質17）、srcファミリー、SSX（滑膜肉腫Xブレークポイント）-1、SSX-2（HOM-MEL-40）、SSX-3、SSX-4、SSX-5、STAT-3、STAT-5、STAT-6、STEAD、STn、スルビピン、syk-ZAP70、TA-90（Mac-2結合タンパク質／シクロフィリンC関連タンパク質）、TAAL6、TACSTD1（腫瘍関連カルシウムシグナル伝達物質1）、TACSTD2、TAG-72-4、TAGE、TARP（T細胞受容体ガンマ交互リーディングフレームタンパク質）、TEL／AML1融合タンパク質、TEM1、TEM8（エンドシアリンまたはCD248）、TGFβ、TIE2、TLP、TMPRSS2 ETS融合遺伝子、TNF-受容体（TNF-α受容体、TNF-β受容体；またはTNF-γ受容体）、トランスフェリン受容体、TPS、TRP-1（チロシン関連タンパク質1）、TRP-2、TRP-2／INT2、TSP-180、VEGF受容体、WNT、WT-1（ウィルムス腫瘍抗原）及びXAGEから選択される腫瘍特異的抗原に結合することが可能な細胞外標的化ドメインを含み得る。

10

20

30

40

50

【0174】

いくつかの実施形態では、カーゴまたはペイロードは、標識された抗原に結合することが可能な標的化部位を有する普遍的免疫受容体を含むCARであり得、またはそれをコードし得る。

【0175】

いくつかの実施形態では、カーゴまたはペイロードは、病原体抗原に結合することが可能な標的化部位を含むCARであり得、またはそれをコードし得る。

【0176】

いくつかの実施形態では、カーゴまたはペイロードは、非タンパク質分子、例えば、腫瘍関連糖脂質及び炭水化物に結合することが可能な標的化部位を含むCARであり得、またはそれをコードし得る。

【0177】

いくつかの実施形態では、カーゴまたはペイロードは、腫瘍関連マクロファージ（TAM）、未熟単球、未熟樹状細胞、免疫抑制性CD4+CD25+制御性T細胞（Treg）及びMDSCを含む様々な腫瘍間質細胞において発現するタンパク質を含む腫瘍微小環境内の成分に結合することが可能な標的化部位を含むCARであり得、またはそれをコードし得る。

【0178】

いくつかの実施形態では、カーゴまたはペイロードは、細胞表面接着分子に結合することが可能な標的化部位、自己免疫疾患において現われる炎症性細胞の表面分子、または自己免疫を引き起こすTCRを含むCARであり得、またはそれをコードし得る。非限定的

な例として、本開示の標的化部位は、腫瘍特異的抗原（TSA）を認識するs c F v抗体、例えば、ヒトメソテリンを特異的に認識し、それに結合する抗体SS、SS1及びHN1のs c F v、GD2の抗体のs c F v、CD19抗原結合ドメイン、NKG2Dリガンド結合ドメイン、ヒト抗メソテリンs c F v、抗CS1結合剤、抗BCMA結合ドメイン、抗CD19 s c F v抗体、GFRアルファ4抗原結合断片、抗CLL-1（C型レクチン様分子1）結合ドメイン、CD33結合ドメイン、GPC3（グリピカン-3）結合ドメイン、GFRアルファ4（グリコシル-ホスファチジルイノシトール（GPI）連結GDNFファミリーα-受容体4細胞-表面受容体）結合ドメイン、CD123結合ドメイン、抗ROR1抗体またはその断片、GPC-3に特異的なs c F v、CSPG4に対するs c F v、及び葉酸受容体アルファに対するs c F vであり得る。

10

【0179】

細胞内シグナル伝達ドメイン

CAR融合ポリペプチドの細胞内ドメインは、その標的分子に結合した後に、シグナルを免疫エフェクター細胞に伝達し、細胞溶解活性（例えば、サイトカイン分泌）またはヘルパー活性を含む免疫エフェクター細胞の正常なエフェクター機能のうちの少なくとも1つを活性化する。そのため、細胞内ドメインは、T細胞受容体（TCR）の「細胞内シグナル伝達ドメイン」を含む。

【0180】

いくつかの態様では、細胞内シグナル伝達ドメイン全体が用いられ得る。他の態様では、エフェクター機能シグナルを伝達する限り、細胞内シグナル伝達ドメインの切断部分がインタクト鎖の代わりに使用され得る。

20

【0181】

いくつかの実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインは、免疫受容体チロシンベース活性化モチーフ（ITAM）として知られているシグナル伝達モチーフを含有し得る。ITAM含有細胞質シグナル伝達配列の例には、TCR CD3ゼータ、FcRガンマ、FcRベータ、CD3ガンマ、CD3デルタ、CD3イプシロン、CD5、CD22、CD79a、CD79b、及びCD66dに由来するものが含まれる。一例では、細胞内シグナル伝達ドメインは、CD3ゼータ（CD3ζ）シグナル伝達ドメインである。

【0182】

いくつかの実施形態では、細胞内領域は、追加のシグナルを免疫エフェクター細胞に提供する1つ以上の共刺激シグナル伝達ドメインをさらに含む。これらの共刺激シグナル伝達ドメインは、シグナル伝達ドメインと組み合わせて、CAR操作免疫細胞（例えば、CAR T細胞）の増殖、活性化、記憶、持続性、及び腫瘍根絶効率をさらに改善し得る。いくつかの場合では、共刺激シグナル伝達領域は、1つ以上の細胞内シグナル伝達及び／または共刺激分子の1、2、3、または4つの細胞質ドメインを含有する。共刺激シグナル伝達ドメインは、CD2、CD7、CD27、CD28、4-1BB（CD137）、OX40（CD134）、CD30、CD40、ICOS（CD278）、GITR（グルココルチコイド誘導腫瘍壊死因子受容体）、LFA-1（リンパ球機能関連抗原-1）、LIGHT、NKG2C、B7-H3を含むがこれらに限定されない共刺激分子の細胞内／細胞質ドメインであり得る。一例では、共刺激シグナル伝達ドメインは、CD28の細胞質ドメインに由来する。別の例では、共刺激シグナル伝達ドメインは、4-1BB（CD137）の細胞質ドメインに由来する。別の例では、共刺激シグナル伝達ドメインは、米国特許番号9,175,308（その内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に教示されるGITRの細胞内ドメインであり得る。

30

40

【0183】

いくつかの実施形態では、細胞内領域は、MHCクラスI分子、TNF受容体タンパク質、免疫グロブリン様タンパク質、サイトカイン受容体、インテグリン、シグナル伝達リンパ球性活性化タンパク質（SLAM）、例えば、CD48、CD229、2B4、CD84、NTB-A、CRACC、BLAME、CD2F-10、SLAMF6、SLAMF7、活性化NK細胞受容体、BTLA、TOLLリガンド受容体、OX40、CD2、

50

CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CDS、ICAM-1、LFA-1 (CD11a/CD18)、4-1BB (CD137)、B7-H3、CDS、ICAM-1、ICOS (CD278)、GITR、BAFFR、LIGHT、HVEM (LIGHTR)、SLAMF7、NKp80 (KLRF1)、NKp44、NKp30、NKp46、CD19、CD4、CD8アルファ、CD8ベータ、IL2Rベータ、IL2Rガンマ、IL7Rアルファ、IL-15Ra、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、NKG2D、NKG2C、NKD2C SLP76、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1 (CD226)、SLAMF4 (CD244、2B4)、CD84、CD96 (Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9 (CD229)、CD160 (BY55)、PSGL1、CD100 (SEMA4D)、CD69、SLAMF6 (NTB-A、Ly108)、SLAM (SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME (SLAMF8)、SELPLG (CD162)、LTBR、LAT、CD270 (HVEM)、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、CD19a、CD83と特異的に結合するリガンド、DAP10、TRIM、ZAP70、キラー免疫グロブリン受容体 (KIR)、例えば、KIR2DL1、KIR2DL2/L3、KIR2DL4、KIR2DL5A、KIR2DL5B、KIR2DS1、KIR2DS2、KIR2DS3、KIR2DS4、KIR2DS5、KIR3DL1/S1、KIR3DL2、KIR3DL3、及びKIR2DP1；レクチン関連NK細胞受容体、例えば、Ly49、Ly49A、及びLy49Cからなる群から選択されるタンパク質からの機能的シグナル伝達ドメインを含み得る。

10

20

30

40

50

#### 【0184】

いくつかの実施形態では、本開示の細胞内シグナル伝達ドメインは、JAK-STATに由来するシグナル伝達ドメインを含有し得る。他の実施形態では、本開示の細胞内シグナル伝達ドメインは、DAP-12 (死関連タンパク質12) に由来するシグナル伝達ドメインを含有し得る (Topfer et al., Immunol., 2015, 194:3201-3212; 及びWang et al., Cancer Immunol., 2015, 3:815-826)。DAP-12は、NK細胞において肝要なシグナル伝達受容体である。DAP-12によって媒介される活性化シグナルは、所定の腫瘍細胞及びウイルス感染細胞に対してNK細胞細胞傷害性反応を誘発させる際に重要な役割を果たす。DAP12の細胞質ドメインは、免疫受容体チロシンベース活性化モチーフ (ITAM) を含有する。したがって、DAP12由来シグナル伝達ドメインを含有するCARは、NK細胞の養子移入のために使用され得る。

#### 【0185】

##### 膜貫通ドメイン

いくつかの実施形態では、CARは、膜貫通ドメインを含み得る。本明細書で使用される場合、用語「膜貫通ドメイン (TM)」は、細胞膜に及ぶ長さが約15残基のアミノ酸配列を広く指す。膜貫通ドメインは、少なくとも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、または45アミノ酸残基を含み得、細胞膜に及ぶ。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、天然または合成源のいずれかに由来し得る。CARの膜貫通ドメインは、任意の天然膜結合または膜貫通タンパク質に由来し得る。例えば、膜貫通領域は、T細胞受容体、CD3イプシロン、CD4、CD5、CD8、CD8α、CD9、CD16、CD22、CD33、CD28、CD37、CD45、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD152、またはCD154のアルファ、ベータまたはゼータ鎖に由来し得る (すなわち、その少なくとも膜貫通領域 (複数可) を含み得る)。

#### 【0186】

代替的には、本開示の膜貫通ドメインは、合成であり得る。いくつかの態様では、合成配列は、主に疎水性残基、例えば、ロイシン及びバリンを含み得る。

【0187】

いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、CD8 $\alpha$ 膜貫通ドメイン、CD4膜貫通ドメイン、CD28膜貫通ドメイン、CTLA-4膜貫通ドメイン、PD-1膜貫通ドメイン、及びヒトIgG4 Fc領域からなる群から選択され得る。

【0188】

いくつかの実施形態では、CARは、任意のヒンジ領域（スペーサーとも呼ばれる）を含み得る。ヒンジ配列は、標的結合ドメインをエフェクター細胞表面から離れるように移動させて適切な細胞／細胞接触、標的結合及びエフェクター細胞活性化を可能とする細胞外標的化ドメインの柔軟性を容易化する短いアミノ酸の配列である。ヒンジ配列は、標的化部位と膜貫通ドメインとの間に位置し得る。ヒンジ配列は、任意の好適な分子に由来するまたはそれから得られた任意の好適な配列であり得る。ヒンジ配列は、免疫グロブリン（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4）ヒンジ領域、すなわち、免疫グロブリンのCH1及びCH2ドメインの間に入る配列、例えば、IgG4 Fcヒンジ、野生型配列または誘導体であり得るCD8 $\alpha$  CD4、CD28及びCD7等の1型膜タンパク質の細胞外領域のすべてまたは一部に由来し得る。いくつかのヒンジ領域には、免疫グロブリンCH3ドメインまたはCH3ドメイン及びCH2ドメインの両方が含まれる。所定の実施形態では、ヒンジ領域は、未修飾ヒンジに存在するものとは異なるアミノ酸残基で置換された1つ以上のアミノ酸残基、例えば、1、2、3、4または5つの残基を含むIgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4から修飾され得る。

【0189】

いくつかの実施形態では、CARは、CARのドメインのいずれかの間に1つ以上のリンカーを含み得る。リンカーは、1～30アミノ酸長であり得る。この点に関して、リンカーは、長さが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または30アミノ酸であり得る。他の実施形態では、リンカーは、フレキシブルであり得る。

【0190】

いくつかの実施形態では、標的化部位、膜貫通ドメイン及び細胞内シグナル伝達ドメインを含む成分は、単一の融合ポリペプチドにおいて構築され得る。融合ポリペプチドは、本開示のエフェクターモジュールのペイロードであり得る。

【0191】

いくつかの実施形態では、カーゴまたはペイロードは、種々のB細胞悪性腫瘍を標的とするCD19特異的CARならびに肉腫、膠芽腫及び進行型Her2陽性肺悪性腫瘍を標的とするHER2特異的CARであり得、またはそれをコードし得る。タンデムCAR（TanCAR）

【0192】

いくつかの実施形態では、CARは、2、3、4、またはそれを超える腫瘍特異的抗原を標的とすることができるタンデムキメラ抗原受容体（TanCAR）であり得る。いくつかの態様では、CARは、腫瘍細胞上の2つの異なるTSAを認識する2つの標的化ドメインを含む二重特異的TanCARである。二重特異的TanCARは、第1の腫瘍抗原に特異的な標的化ドメイン（例えば、抗原認識ドメイン）及び第2の腫瘍抗原に特異的な標的ドメイン（例えば、抗原認識ドメイン）を含む細胞外領域を含むものとしてさらに定義され得る。他の態様では、CARは、タンデム配置で構成された3つ以上の標的化ドメインを含む多重特異的TanCARである。TanCARにおける標的化ドメイン間のスペースは、長さが約5～約30アミノ酸、例えば、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29及び30アミノ酸であり得る。

【0193】

### 分割 C A R

いくつかの実施形態では、標的化部位、膜貫通ドメイン及び細胞内シグナル伝達ドメインを含む C A R 成分は、インタクトな機能性受容体の構築を促進する複数のインプットに依存するように 2 つ以上の部分に分割され得る。非限定的な例として、分割 C A R は、小分子依存的様式で構築する 2 つの部分からなる；受容体の一方の部分は、細胞外抗原結合ドメイン（例えば、s c F v）を特徴とし、他方の部分は、細胞内シグナル伝達ドメイン、例えば、C D 3 ζ 細胞内ドメインを有する。

#### 【0194】

他の態様では、C A R システムの分割部分は、シグナルを増加させるためにさらに修飾され得る。非限定的な例として、細胞質断片の第 2 の部分は、膜貫通ドメイン（例えば、C D 8 α 膜貫通ドメイン）をコンストラクトに組み込むことによって細胞膜に固定され得る。追加の細胞外ドメイン、例えば、ホモ二量化を媒介する細胞外ドメインがまた、C A R システムの第 2 の部分に付加され得る。これらの修飾は、受容体アウトプット活性、すなわち、T 細胞活性化を増加させ得る。

#### 【0195】

いくつかの実施形態では、分割 C A R システムの 2 つの部分は、ヘテロ二量化小分子の結合により条件付きで相互作用するヘテロ二量化ドメインを含有する。このように、受容体成分は、小分子の存在下で構築されて、インタクトシステムを形成し、これは次いで、抗原係合によって活性化され得る。任意の既知のヘテロ二量化成分が分割 C A R システムに組み込まれ得る。ジベレリン誘導二量体化システム（G I D 1 - G A I）、トリメトプリム - S L F 誘導 e c D H F R 及び F K B P 二量体化ならびに P P 2 C 及び P Y L ドメインの A B A（アブシジン酸）誘導二量体化を含むがこれらに限定されない他の小分子依存性ヘテロ二量体化ドメインも使用され得る。分割 C A R システムの誘導性構築（例えば、リガンド依存性二量化）及び分解（例えば、不安定化ドメイン誘導 C A R 分解）を使用する二重制御は、C A R 修飾 T 細胞の活性をコントロールするためにより高い柔軟性を提供し得る。

#### 【0196】

### 切り替え可能な C A R

いくつかの実施形態では、C A R は、刺激物（例えば、小分子）に対して一時的にスイッチオンされ得るコントロール可能な C A R である切り替え可能な C A R であり得る。この C A R 設計において、システムは、C A R における細胞膜ドメインから s c F v ドメインを分離するヒンジドメインに直接的に組み込まれる。そのようなシステムは、T C R のネイティブ構造の複雑性を模倣する、受容体複合体の異なる鎖内での活性化及び共刺激等の C A R の異なる重要な機能を分割し、または組み合わせることが可能である。この組み込みシステムは、刺激物の非存在／存在によってコントロールされるオン／オフ状態間で s c F v 及び抗原の相互作用を切り替え得る。

#### 【0197】

### 可逆的 C A R

いくつかの実施形態では、C A R は、可逆的 C A R システムであり得る。この C A R 構造では、L I D ドメイン（リガンド誘導分解）が C A R システムに組み込まれる。その C A R は、L I D ドメインのリガンドを添加することによって一時的に下方制御され得る。

#### 【0198】

### 阻害性 C A R（i C A R）

いくつかの実施形態では、C A R は、阻害性 C A R であり得る。阻害性 C A R（i C A R）は、腫瘍特異性を向上させ、正常な組織毒性を制限するためにネガティブシグナルが使用される二重特異的 C A R 設計を指す。この設計は、活性化受容体の同時係合を伴う場合であっても T 細胞反応性を制限するために阻害性シグナルドメインと組み合わせられた表面抗原認識ドメインを有する第 2 の C A R を組み込む。この抗原認識ドメインは、T 細胞が第 1 の標的タンパク質の存在下で活性化され得るが、i C A R に結合する第 2 のタンパク質が存在する場合、T 細胞活性化が阻害されるように、正常組織特異的抗原に対して仕

10

20

30

40

50



向けられる。

#### 【0199】

非限定的な例として、CTLA4及びPD1阻害性ドメインに基づく前立腺特異的膜抗原(PMSA)に対するiCARは、T細胞活性化によって誘導されるサイトカイン分泌、細胞傷害性及び増殖を選択的に制限する能力を実証した。

#### 【0200】

##### キメラスイッチ受容体

いくつかの実施形態では、カーゴまたはペイロードは、負のシグナルを正のシグナルにスイッチし得るキメラスイッチ受容体であり得、またはそれをコードし得る。本明細書で使用される場合、用語「キメラスイッチ受容体」は、第1の細胞外ドメイン及び第2の膜貫通及び細胞内ドメインを含む融合タンパク質であって、第1のドメインには、負のシグナル領域が含まれ、第2のドメインには、正の細胞内シグナル伝達領域が含まれるものを指す。いくつかの態様では、融合タンパク質は、共刺激受容体の膜貫通及び細胞質ドメインに融合されたT細胞上の阻害性受容体の細胞外ドメインを含有するキメラスイッチ受容体である。このキメラスイッチ受容体は、T細胞阻害性シグナルをT細胞刺激性シグナルに変換し得る。

#### 【0201】

非限定的な例として、キメラスイッチ受容体は、CD28の膜貫通及び細胞質ドメインに融合されたPD-1の細胞外ドメインを含み得る。いくつかの態様では、他の阻害性受容体、例えば、CTLA-4、LAG-3、TIM-3、KIR及びBTLAの細胞外ドメインがまた、共刺激受容体、例えば、CD28、4-1BB、CD27、OX40、CD40、GTIR及びICOSに由来する膜貫通及び細胞質ドメインに融合され得る。

#### 【0202】

いくつかの実施形態では、キメラスイッチ受容体には、刺激性サイトカイン受容体、例えば、IL-2R(IL-2R $\alpha$ 、IL-2R $\beta$ 及びIL-2R $\gamma$ )及びIL-7R $\alpha$ の細胞内シグナル伝達ドメインに融合された阻害性サイトカイン受容体(例えば、IL-13受容体 $\alpha$ (IL-13R $\alpha$ 1)、IL-10R、及びIL-4R $\alpha$ )の細胞外サイトカイン結合ドメインを含む組換え受容体が含まれ得る。そのようなキメラサイトカイン受容体の1つの例は、IL-7R $\alpha$ の細胞内シグナル伝達ドメインに連結されたIL-4R $\alpha$ のサイトカイン結合細胞外ドメインを含有する組換え受容体である。

#### 【0203】

いくつかの実施形態では、キメラスイッチ受容体は、キメラTGF $\beta$ 受容体であり得る。キメラTGF $\beta$ 受容体は、TGF $\beta$ 受容体、例えば、TGF $\beta$ 受容体1、TGF $\beta$ 受容体2、TGF $\beta$ 受容体3、または任意の他のTGF $\beta$ 受容体またはそのバリエーションに由来する細胞外ドメイン；及び非TGF $\beta$ 受容体細胞内ドメインを含み得る。非TGF $\beta$ 受容体細胞内ドメインは、TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、TLR10、CD28、4-1BB(CD137)、OX40(CD134)、CD3ゼータ、CD40、CD27、またはそれらの組み合わせに由来する細胞内ドメインまたはその断片であり得る。

#### 【0204】

##### 活性化条件付きCAR

いくつかの実施形態では、カーゴまたはペイロードは、活性化免疫細胞でのみ発現する活性化条件付きキメラ抗原受容体であり得、またはそれをコードし得る。CARの発現は、配列、例えば、CARの転写及び／または発現をそのコントロール下で誘導する1つ以上の核酸配列を指す活性化条件付きコントロール領域と連携され得る。そのような活性化条件付きコントロール領域は、免疫エフェクター細胞の活性化中に上方制御される遺伝子のプロモーター、例えば、IL2プロモーターまたはNFAT結合部位であり得る。

#### 【0205】

##### 特異的プロテオグリカンマーカを有する腫瘍細胞へのCAR標的化

いくつかの実施形態では、カーゴまたはペイロードは、特定のタイプのがん細胞を標的

10

20

30

40

50

とするCARであり得、またはそれをコードし得る。ヒトがん細胞及び転移は、独自の及びそうでなければ異常なプロテオグリカン、例えば、多糖鎖（例えば、コンドロイチン硫酸（CS）、デルマタン硫酸（DSまたはCSB）、ヘパラン硫酸（HS）及びヘパリン）を発現し得る。したがって、CARは、がん関連プロテオグリカンを認識する結合部位と融合され得る。一例では、CARは、プロテオグリカンに結合したコンドロイチン硫酸A（CSA）の特定のタイプに高い親和性で結合するVAR2CSAポリペプチドと融合され得る（VAR2-CAR）。CARの細胞外ScFv部分は、少なくとも最小のCSA結合ドメインを含むVAR2CSAバリエーションで置換され得、コンドロイチン硫酸A（CSA）修飾に特異的なCARを生成する。代替的には、CARは、spy-CARを生成するために分割タンパク質結合システムに融合され得、CARのscFv部分は、SpyTag及びSpy-catcher等の分割タンパク質結合システムの一部で置換され、がん認識分子（例えば、scFv及びまたはVAR2-CSA）は、分割タンパク質結合システムを介してCARに結合される。

10

20

30

40

50

#### 【0206】

##### 核酸

本開示のオリジネーターコンストラクト及びベンチマークコンストラクトは、核酸であるペイロード領域（カーゴ領域とも称され得る）を含み得る。用語「核酸」には、その最も広い意味で、ポリヌクレオチドと称され得るヌクレオチドのポリマーを含む任意の化合物及び／または物質が含まれる。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）、ロック核酸（LNA）またはそれらのハイブリッドが含まれるがこれらに限定されない。

#### 【0207】

いくつかの実施形態では、ペイロード領域は、複数のカーゴまたはペイロードをコードする核酸配列を含む。

#### 【0208】

いくつかの実施形態では、ペイロード領域は、コード核酸配列であり、またはそれをコードし得る。

#### 【0209】

いくつかの実施形態では、ペイロード領域は、非コード核酸配列であり、またはそれをコードし得る。

#### 【0210】

いくつかの実施形態では、ペイロード領域は、コード核酸配列及び非コード核酸配列の両方であり、またはそれをコードし得る。

#### 【0211】

##### DNA

デオキシリボ核酸（DNA）は、すべての生物のための遺伝子情報を保有し、二重ヘリックスとして知られている形状を形成するために互いの周りを巻きつく2つの鎖からなる分子である。各鎖は、交互の糖（デオキシリボース）及びホスフェート基から構成される骨格を有する。4つの塩基：アデニン（A）、シトシン（C）、グアニン（G）、及びチミン（T）のうちの1つが各糖に結合されている。2つの鎖は、アデニンとチミンとの間またはシトシンとグアニンとの間の結合によって一緒に保持される。骨格に沿った塩基の配列は、タンパク質及びRNA分子を構築するための指示書として機能する。

#### 【0212】

いくつかの実施形態では、ペイロード領域は、コードDNAであり、またはそれをコードし得る。

#### 【0213】

いくつかの実施形態では、ペイロード領域は、非コードDNAであり、またはそれをコードし得る。

#### 【0214】

いくつかの実施形態では、ペイロード領域は、コードDNA及び非コードRNAの両方であり、またはそれをコードし得る。

【0215】

いくつかの実施形態では、DNAは、修飾され得る。修飾のタイプには、メチル化、アセチル化、リン酸化、ユビキチン化、及びスモ化が含まれるがこれらに限定されない。

【0216】

ベクター

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のオリジネーターコンストラクト及び／またはベンチマークコンストラクトは、ベクター、例えば、プラスミドまたはウイルスベクターであり、またはそれによってコードされ得る。いくつかの実施形態では、オリジネーターコンストラクト及び／またはベンチマークコンストラクトは、ウイルスベクターであり、またはそれによってコードされる。ウイルスベクターは、ヘルペスウイルス（HSV）ベクター、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクター、レンチウイルスベクター等であり得るがこれらに限定されない。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは、AAVベクターである。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは、レンチウイルスベクターである。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは、レトロウイルスベクターである。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは、アデノウイルスベクターである。

【0217】

アデノ随伴ウイルス性（AAV）ベクター

Parvoviridae科のウイルスは、一本鎖DNAゲノムによって特性化される小さな非エンベロープ型20面体カプシドウイルスである。Parvoviridae科ウイルスは、2つのサブファミリー：脊椎動物に感染するParvovirinae、及び無脊椎動物に感染するDensovirinaeからなる。標準的な分子生物学技術を使用して容易に操作されるその比較的単純な構造により、このウイルス科は、生物学的ツールとして有用である。ウイルスのゲノムは、標的細胞、組織、器官、または生物に送達され得る所望のペイロードがロードされ、またはそれを発現または送達するように操作された、機能的組換えウイルス、またはウイルス粒子の構築のための最小の成分を含有するように修飾され得る。

【0218】

Parvoviridae科は、ヒト、霊長類、ウシ、イヌ、ウマ、及びヒツジ種を含むがこれらに限定されない脊椎動物宿主における複製が可能なアデノ随伴ウイルス（AAV）を含むディペンドウイルス属を含む。

【0219】

AAVベクターゲノムは、長さがおよそ5,000ヌクレオチド（nt）の線状一本鎖DNA（ssDNA）分子である。AAVベクターゲノムは、ペイロード領域及び少なくとも1つの末端逆位反復（ITR）またはITR領域を含み得る。ITRは通常、非構造タンパク質（Rep遺伝子によってコードされる）及び構造タンパク質（カプシド遺伝子またはCap遺伝子によってコードされる）のためのコードヌクレオチド配列に隣接する。理論に縛られることを望むものではないが、AAVベクターゲノムは、典型的には、2つのITR配列を含む。AAVベクターゲノムは、エネルギー的に安定な二本鎖領域を形成するssDNAの5'及び3'末端の自己相補的末端145ヌクレオチドによって定義される特徴的なT形状ヘアピン構造を含む。二本鎖ヘアピン構造は、宿主ウイルス複製細胞の内因性DNAポリメラーゼ複合体のためのプライマーとして機能することによってDNA複製のための起点として作用することを含むがこれらに限定されない複数の機能を含む。

【0220】

コードされる異種ペイロードに加えて、AAVベクターゲノムは、全体的または部分的に、任意の天然に存在する及び／または組換えAAV血清型ヌクレオチド配列またはバリエーションを含む。AAVバリエーションは、通常、物理的及び機能的同等物であり、同様の

10

20

30

40

50

メカニズムによって複製し、同様のメカニズムによって構築するコンストラクトを生成するために、核酸（ゲノムまたはカプシド）及びアミノ酸レベル（カプシド）で有意な相同性の配列を有し得る。Chiorini et al., J. Vir. 71: 6823-33 (1997); Srivastava et al., J. Vir. 45: 555-64 (1983); Chiorini et al., J. Vir. 73: 1309-1319 (1999); Rutledge et al., J. Vir. 72: 309-319 (1998); 及び Wu et al., J. Vir. 74: 8635-47 (2000)（これらの各々の内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる）。

#### 【0221】

いくつかの実施形態では、AAVベクターゲノムは、その中にコードされるコード配列の複製、転写、及び翻訳を提供する少なくとも1つのコントロール要素を含む。適切な宿主細胞においてコード配列が複製、転写、及び／または翻訳されることが可能である限り、コントロール要素のすべてが常に存在することが必要であるわけではない。発現コントロール要素の非限定的な例には、転写開始及び／または終結のための配列、プロモーター及び／またはエンハンサー配列、効率的なRNAプロセッシングシグナル、例えば、スプライシング及びポリアデニル化シグナル、細胞質mRNAを安定化する配列、翻訳効力を向上させる配列（例えば、Kozakコンセンサス配列）、タンパク質安定性を向上させる配列、及び／またはタンパク質プロセッシング及び／または分泌を向上させる配列が含まれる。

#### 【0222】

本開示のAAVベクターゲノムは、組換え的に生成され得、アデノ随伴ウイルス（AAV）親または参照配列に基づき得る。本明細書で使用される場合、「ベクターゲノム」は、本明細書に記載の核酸等の異種分子を輸送し、形質導入し、またはそうでなければその担体として作用する任意の分子または部位である。

#### 【0223】

一本鎖AAVベクターゲノム（例えば、ssAAV）に加えて、本開示はまた、自己相補的AAV（scAAV）ベクターゲノムを提供する。scAAVベクターゲノムは、二本鎖DNAを形成するために一緒にアニーリングするDNA鎖を含有する。第2の鎖合成をスキップすることにより、scAAVは、細胞における急速発現が可能となる。

#### 【0224】

いくつかの実施形態では、AAVベクターゲノムは、scAAVである。

#### 【0225】

いくつかの実施形態では、AAVベクターゲノムは、ssAAVである。

#### 【0226】

いくつかの実施形態では、AAVベクターゲノムは、AAV粒子の一部であり得、カプシドの血清型は、AAV1、AAV2、AAV2G9、AAV3、AAV3a、AAV3b、AAV3-3、AAV4、AAV4-4、AAV5、AAV6、AAV6.1、AAV6.2、AAV6.1.2、AAV7、AAV7.2、AAV8、AAV9、AAV9.11、AAV9.13、AAV9.16、AAV9.24、AAV9.45、AAV9.47、AAV9.61、AAV9.68、AAV9.84、AAV9.9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV16.3、AAV24.1、AAV27.3、AAV42.12、AAV42-1b、AAV42-2、AAV42-3a、AAV42-3b、AAV42-4、AAV42-5a、AAV42-5b、AAV42-6b、AAV42-8、AAV42-10、AAV42-11、AAV42-12、AAV42-13、AAV42-15、AAV42-a a、AAV43-1、AAV43-12、AAV43-20、AAV43-21、AAV43-23、AAV43-25、AAV43-5、AAV44.1、AAV44.2、AAV44.5、AAV223.1、AAV223.2、AAV223.4、AAV223.5、AAV223.6、AAV223.7、AAV1-7/rh.48、AAV1-8/rh.49、AAV2-15/rh.62、AAV2-3/rh.61、AAV2-4/rh.50、AAV2-5/rh.51、AAV3

. 1 / hu. 6、AAV3. 1 / hu. 9、AAV3-9 / rh. 52、AAV3-11 / rh. 53、AAV4-8 / r11. 64、AAV4-9 / rh. 54、AAV4-19 / rh. 55、AAV5-3 / rh. 57、AAV5-22 / rh. 58、AAV7. 3 / hu. 7、AAV16. 8 / hu. 10、AAV16. 12 / hu. 11、AAV29. 3 / bb. 1、AAV29. 5 / bb. 2、AAV106. 1 / hu. 37、AAV114. 3 / hu. 40、AAV127. 2 / hu. 41、AAV127. 5 / hu. 42、AAV128. 3 / hu. 44、AAV130. 4 / hu. 48、AAV145. 1 / hu. 53、AAV145. 5 / hu. 54、AAV145. 6 / hu. 55、AAV161. 10 / hu. 60、AAV161. 6 / hu. 61、AAV33. 12 / hu. 17、AAV33. 4 / hu. 15、AAV33. 8 / hu. 16、AAV52 / hu. 19、AAV52. 1 / hu. 20、AAV58. 2 / hu. 25、AAVA3. 3、AAVA3. 4、AAVA3. 5、AAVA3. 7、AAVC1、AAVC2、AAVC5、AAV-DJ、AAV-DJ8、AAVF3、AAVF5、AAVH2、AAVrh. 72、AAVhu. 8、AAVrh. 68、AAVrh. 70、AAVpi. 1、AAVpi. 3、AAVpi. 2、AAVrh. 60、AAVrh. 44、AAVrh. 65、AAVrh. 55、AAVrh. 47、AAVrh. 69、AAVrh. 45、AAVrh. 59、AAVhu. 12、AAVH6、AAVLK03、AAVH-1 / hu. 1、AAVH-5 / hu. 3、AAVLG-10 / rh. 40、AAVLG-4 / rh. 38、AAVLG-9 / hu. 39、AAVN721-8 / rh. 43、AAVCh. 5、AAVCh. 5R1、AAVcy. 2、AAVcy. 3、AAVcy. 4、AAVcy. 5、AAVCy. 5R1、AAVCy. 5R2、AAVCy. 5R3、AAVCy. 5R4、AAVcy. 6、AAVhu. 1、AAVhu. 2、AAVhu. 3、AAVhu. 4、AAVhu. 5、AAVhu. 6、AAVhu. 7、AAVhu. 9、AAVhu. 10、AAVhu. 11、AAVhu. 13、AAVhu. 15、AAVhu. 16、AAVhu. 17、AAVhu. 18、AAVhu. 20、AAVhu. 21、AAVhu. 22、AAVhu. 23. 2、AAVhu. 24、AAVhu. 25、AAVhu. 27、AAVhu. 28、AAVhu. 29、AAVhu. 29R、AAVhu. 31、AAVhu. 32、AAVhu. 34、AAVhu. 35、AAVhu. 37、AAVhu. 39、AAVhu. 40、AAVhu. 41、AAVhu. 42、AAVhu. 43、AAVhu. 44、AAVhu. 44R1、AAVhu. 44R2、AAVhu. 44R3、AAVhu. 45、AAVhu. 46、AAVhu. 47、AAVhu. 48、AAVhu. 48R1、AAVhu. 48R2、AAVhu. 48R3、AAVhu. 49、AAVhu. 51、AAVhu. 52、AAVhu. 54、AAVhu. 55、AAVhu. 56、AAVhu. 57、AAVhu. 58、AAVhu. 60、AAVhu. 61、AAVhu. 63、AAVhu. 64、AAVhu. 66、AAVhu. 67、AAVhu. 14 / 9、AAVhu. t 19、AAVrh. 2、AAVrh. 2R、AAVrh. 8、AAVrh. 8R、AAVrh. 10、AAVrh. 12、AAVrh. 13、AAVrh. 13R、AAVrh. 14、AAVrh. 17、AAVrh. 18、AAVrh. 19、AAVrh. 20、AAVrh. 21、AAVrh. 22、AAVrh. 23、AAVrh. 24、AAVrh. 25、AAVrh. 31、AAVrh. 32、AAVrh. 33、AAVrh. 34、AAVrh. 35、AAVrh. 36、AAVrh. 37、AAVrh. 37R2、AAVrh. 38、AAVrh. 39、AAVrh. 40、AAVrh. 46、AAVrh. 48、AAVrh. 48. 1、AAVrh. 48. 1. 2、AAVrh. 48. 2、AAVrh. 49、AAVrh. 51、AAVrh. 52、AAVrh. 53、AAVrh. 54、AAVrh. 56、AAVrh. 57、AAVrh. 58、AAVrh. 61、AAVrh. 64、AAVrh. 64R1、AAVrh. 64R2、AAVrh. 67、AAVrh. 73、AAVrh. 74、AAVrh8R、AAVrh8R A586R変異体、AAVrh8R R533A変異体、AAAV、BAAV、ヤギAAV、ウシAAV、AAVhE1. 1、AAVhEr1. 5、AAVhEr1. 14、AAVhEr1. 8、AAVhEr1. 16、AAVhEr1. 18、AA

VhEr1. 35、AAVhEr1. 7、AAVhEr1. 36、AAVhEr2. 29  
 、AAVhEr2. 4、AAVhEr2. 16、AAVhEr2. 30、AAVhEr2  
 . 31、AAVhEr2. 36、AAVhEr1. 23、AAVhEr3. 1、AAV2  
 . 5T、AAV-PAEC、AAV-LK01、AAV-LK02、AAV-LK03、  
 AAV-LK04、AAV-LK05、AAV-LK06、AAV-LK07、AAV-  
 LK08、AAV-LK09、AAV-LK10、AAV-LK11、AAV-LK12  
 、AAV-LK13、AAV-LK14、AAV-LK15、AAV-LK16、AAV  
 -LK17、AAV-LK18、AAV-LK19、AAV-PAEC2、AAV-PA  
 EC4、AAV-PAEC6、AAV-PAEC7、AAV-PAEC8、AAV-PA  
 EC11、AAV-PAEC12、AAV-2-pre-miRNA-101、AAV-  
 8h、AAV-8b、AAV-h、AAV-b、AAV SM 10-2、AAV Sh  
 uffle 100-1、AAV Shuffle 100-3、AAV Shuffl  
 e 100-7、AAV Shuffle 10-2、AAV Shuffle 10-  
 6、AAV Shuffle 10-8、AAV Shuffle 100-2、AAV  
 SM 10-1、AAV SM 10-8、AAV SM 100-3、AAV SM 1  
 00-10、BNP61 AAV、BNP62 AAV、BNP63 AAV、AAVr  
 h. 50、AAVrh. 43、AAVrh. 62、AAVrh. 48、AAVhu. 19  
 、AAVhu. 11、AAVhu. 53、AAV4-8/rh. 64、AAV LG-9/  
 hu. 39、AAV54. 5/hu. 23、AAV54. 2/hu. 22、AAV54.  
 7/hu. 24、AAV54. 1/hu. 21、AAV54. 4R/hu. 27、AAV  
 46. 2/hu. 28、AAV46. 6/hu. 29、AAV128. 1/hu. 43、  
 真正タイプAAV (ttAAV)、UPENN AAV 10、日本型AAV10血清型  
 、AAV CBr-7. 1、AAV CBr-7. 10、AAV CBr-7. 2、AA  
 V CBr-7. 3、AAV CBr-7. 4、AAV CBr-7. 5、AAV CB  
 r-7. 7、AAV CBr-7. 8、AAV CBr-B7. 3、AAV CBr-B  
 7. 4、AAV CBr-E1、AAV CBr-E2、AAV CBr-E3、AAV  
 CBr-E4、AAV CBr-E5、AAV CBr-e5、AAV CBr-E6、  
 AAV CBr-E7、AAV CBr-E8、AAV CHt-1、AAV CHt-  
 2、AAV CHt-3、AAV CHt-6. 1、AAV CHt-6. 10、AAV  
 CHt-6. 5、AAV CHt-6. 6、AAV CHt-6. 7、AAV CHt-  
 6. 8、AAV CHt-P1、AAV CHt-P2、AAV CHt-P5、AAV  
 CHt-P6、AAV CHt-P8、AAV CHt-P9、AAV CKd-1、A  
 AV CKd-10、AAV CKd-2、AAV CKd-3、AAV CKd-4、  
 AAV CKd-6、AAV CKd-7、AAV CKd-8、AAV CKd-B1  
 、AAV CKd-B2、AAV CKd-B3、AAV CKd-B4、AAV CK  
 d-B5、AAV CKd-B6、AAV CKd-B7、AAV CKd-B8、AA  
 V CKd-H1、AAV CKd-H2、AAV CKd-H3、AAV CKd-H  
 4、AAV CKd-H5、AAV CKd-H6、AAV CKd-N3、AAV C  
 Kd-N4、AAV CKd-N9、AAV CLg-F1、AAV CLg-F2、A  
 AV CLg-F3、AAV CLg-F4、AAV CLg-F5、AAV CLg-  
 F6、AAV CLg-F7、AAV CLg-F8、AAV CLv-1、AAV C  
 Lv1-1、AAV CLv1-10、AAV CLv1-2、AAV CLv-12、  
 AAV CLv1-3、AAV CLv-13、AAV CLv1-4、AAV CLv  
 1-7、AAV CLv1-8、AAV CLv1-9、AAV CLv-2、AAV  
 CLv-3、AAV CLv-4、AAV CLv-6、AAV CLv-8、AAV  
 CLv-D1、AAV CLv-D2、AAV CLv-D3、AAV CLv-D4、  
 AAV CLv-D5、AAV CLv-D6、AAV CLv-D7、AAV CLv  
 -D8、AAV CLv-E1、AAV CLv-K1、AAV CLv-K3、AAV  
 CLv-K6、AAV CLv-L4、AAV CLv-L5、AAV CLv-L6、  
 AAV CLv-M1、AAV CLv-M11、AAV CLv-M2、AAV CL

10

20

30

40

50

v-M5、AAV CLv-M6、AAV CLv-M7、AAV CLv-M8、AAV CLv-M9、AAV CLv-R1、AAV CLv-R2、AAV CLv-R3、AAV CLv-R4、AAV CLv-R5、AAV CLv-R6、AAV CLv-R7、AAV CLv-R8、AAV CLv-R9、AAV CSp-1、AAV CSp-10、AAV CSp-11、AAV CSp-2、AAV CSp-3、AAV CSp-4、AAV CSp-6、AAV CSp-7、AAV CSp-8、AAV CSp-8.10、AAV CSp-8.2、AAV CSp-8.4、AAV CSp-8.5、AAV CSp-8.6、AAV CSp-8.7、AAV CSp-8.8、AAV CSp-8.9、AAV CSp-9、AAV.hu.48R3、AAV.VR-355、AAV3B、AAV4、AAV5、AAVF1/HSC1、AAVF11/HSC11、AAVF12/HSC12、AAVF13/HSC13、AAVF14/HSC14、AAVF15/HSC15、AAVF16/HSC16、AAVF17/HSC17、AAVF2/HSC2、AAVF3/HSC3、AAVF4/HSC4、AAVF5/HSC5、AAVF6/HSC6、AAVF7/HSC7、AAVF8/HSC8、AAVF9/HSC9、PHP.B、PHP.A、G2B-26、G2B-13、TH1.1-32、及び／またはTH1.1-35ならびにそれらのバリエーションであり得るがこれらに限定されない。

#### 【0227】

末端逆位反復 (ITR)

#### 【0228】

いくつかの実施形態では、AAVベクターゲノムは、少なくとも1つのITR領域及びペイロード領域を含み得る。いくつかの実施形態では、ベクターゲノムは、2つのITRを有する。これらの2つのITRは、5'及び3'末端でペイロード領域に隣接する。ITRは、複製のための認識部位を含む複製起点として機能する。ITRは、相補的であり、かつ対称的に配置され得る配列領域を含む。本開示のベクターゲノムに組み込まれたITRは、天然に存在するポリヌクレオチド配列または組換え的に誘導されたポリヌクレオチド配列を含み得る。

#### 【0229】

ITRは、カプシドまたはその誘導体と同じ血清型に由来し得る。ITRは、カプシドとは異なる血清型のものであり得る。いくつかの実施形態では、AAV粒子は、複数のITRを有する。非限定的な例では、AAV粒子は、2つのITRを含むベクターゲノムを有する。いくつかの実施形態では、ITRは、互いに同じ血清型のものであり得る。別の実施形態では、ITRは、異なる血清型のものである。非限定的な例は、カプシドと同じ血清型を有するITRを含まず、またはその一方または両方を含む。いくつかの実施形態では、AAV粒子のベクターゲノムのITRの両方は、AAV2 ITRである。

#### 【0230】

独立して、各ITRは、長さが約100～約150ヌクレオチドであり得る。ITRは、長さが約100～105ヌクレオチド、長さが106～110ヌクレオチド、長さが111～115ヌクレオチド、長さが116～120ヌクレオチド、長さが121～125ヌクレオチド、長さが126～130ヌクレオチド、長さが131～135ヌクレオチド、長さが136～140ヌクレオチド、長さが141～145ヌクレオチドまたは長さが146～150ヌクレオチドであり得る。いくつかの実施形態では、ITRは、長さが140～142ヌクレオチドである。ITRの長さの非限定的な例は、長さが102、140、141、142、145ヌクレオチド、及びそれと少なくとも95%の同一性を有するものである。

#### 【0231】

プロモーター

いくつかの実施形態では、ベクターゲノムのペイロード領域は、導入遺伝子標的特異性及び発現を向上させるための少なくとも1つの要素を含む (例えば、Powell et al. Viral Expression Cassette Elements to

10

20

30

40

50

Enhance Transgene Target Specificity and Expression in Gene Therapy, 2015 (その内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる)を参照されたい)。導入遺伝子標的特異性及び発現を向上させるための要素の非限定的な例には、プロモーター、内因性miRNA、転写後制御性要素(PRE)、ポリアデニル化(ポリA)シグナル配列及び上流エンハンサー(USE)、CMVエンハンサー及びイントロンが含まれる。

【0232】

いくつかの実施形態では、プロモーターは、AAV粒子のベクターゲノムのペイロード領域においてコードされるポリペプチド(複数可)の発現を誘導する場合、効率的である。

10

【0233】

いくつかの実施形態では、プロモーターは、標的とされる細胞において発現を誘導する場合、効率的であるとみなされる。

【0234】

いくつかの実施形態では、プロモーターは、標的とされる組織において所定期間、ペイロードの発現を誘導する。プロモーターによって誘導される発現は、1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、8時間、9時間、10時間、11時間、12時間、13時間、14時間、15時間、16時間、17時間、18時間、19時間、20時間、21時間、22時間、23時間、1日、2日、3日、4日、5日、6日、1週、8日、9日、10日、11日、12日、13日、2週、15日、16日、17日、18日、19日、20日、3週、22日、23日、24日、25日、26日、27日、28日、29日、30日、31日、1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月、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、13ヶ月、14ヶ月、15ヶ月、16ヶ月、17ヶ月、18ヶ月、19ヶ月、20ヶ月、21ヶ月、22ヶ月、23ヶ月、2年、3年、4年、5年、6年、7年、8年、9年、10年または10年を超える期間であり得る。発現は、1～5時間、1～12時間、1～2日、1～5日、1～2週、1～3週、1～4週、1～2ヶ月、1～4ヶ月、1～6ヶ月、2～6ヶ月、3～6ヶ月、3～9ヶ月、4～8ヶ月、6～12ヶ月、1～2年、1～5年、2～5年、3～6年、3～8年、4～8年、または5～10年間であり得る。

20

【0235】

いくつかの実施形態では、プロモーターは、ペイロードの発現を少なくとも1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月、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、6年、7年、8年、9年、10年、11年、12年、13年、14年、15年、16年、17年、18年、19年、20年、21年、22年、23年、24年、25年、26年、27年、28年、29年、30年、31年、32年、33年、34年、35年、36年、37年、38年、39年、40年、41年、42年、43年、44年、45年、46年、47年、48年、49年、50年、55年、60年、65年間、または65年を超えて誘導する。

30

【0236】

プロモーターは、天然に存在し、または天然に存在しない場合がある。プロモーターの非限定的な例には、ウイルスプロモーター、植物プロモーター及び哺乳動物プロモーターが含まれる。いくつかの実施形態では、プロモーターは、ヒトプロモーターであり得る。いくつかの実施形態では、プロモーターは、切断型であり得る。

40

【0237】

ほとんどの組織において発現を誘導または促進するプロモーターには、ヒト伸長因子1 $\alpha$ -サブユニット(EF1 $\alpha$ )、サイトメガロウイルス(CMV)最初期エンハンサー及び/またはプロモーター、ニワトリ $\beta$ -アクトニン(CBA)及びその誘導體CAG、 $\beta$ グルクロニダーゼ(GUSB)、またはユビキチンC(UBC)が含まれるがこれらに限定されない。限定されないが、筋肉特異的プロモーター、B細胞プロモーター、単球プロモーター、白血球プロモーター、マクロファージプロモーター、膵腺房細胞プロモーター、

50



内皮細胞プロモーター、肺組織プロモーター、星状細胞プロモーター、または発現をニューロン、星状細胞、またはオリゴデンドロサイトに限定するために使用され得る神経系プロモーター等の組織特異的発現要素が、発現を所定の細胞タイプに限定するために使用され得る。

#### 【0238】

筋肉特異的プロモーターの非限定的な例には、哺乳動物筋肉クレアチンキナーゼ（MCK）プロモーター、哺乳動物デスミン（DES）プロモーター、哺乳動物トロポニンI（TNNI2）プロモーター、及び哺乳動物骨格アルファアクチン（ASKA）プロモーター（例えば、米国特許公開US20110212529（その内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる）を参照されたい）が含まれる。

10

#### 【0239】

ニューロンのための組織特異的発現要素の非限定的な例には、ニューロン特異的エノラーゼ（NSE）、血小板由来成長因子（PDGF）、血小板由来成長因子B鎖（PDGF-β）、シナプシン（Syn）、メチル-CpG結合タンパク質2（MeCP2）、Ca<sup>2+</sup>/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼII（CaMKII）、代謝型グルタミン酸受容体2（mGluR2）、ニューロフィラメント軽（NFL）または重（NFH）、β-グロビンミニ遺伝子nβ2、プレプロエンケファリン（PPE）、エンケファリン（Enk）及び興奮性アミノ酸トランスポーター2（EAAT2）プロモーターが含まれる。星状細胞のための組織特異的発現要素の非限定的な例には、グリア線維性酸性タンパク質（GFAP）及びEAAT2プロモーターが含まれる。オリゴデンドロサイトのための組織特異的発現要素の非限定的な例には、ミエリン塩基性タンパク質（MBP）プロモーターが含まれる。

20

#### 【0240】

いくつかの実施形態では、プロモーターは、1 kb未満であり得る。プロモーターは、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、または800を超えるヌクレオチドの長さを有し得る。プロモーターは、200～300、200～400、200～500、200～600、200～700、200～800、300～400、300～500、300～600、300～700、300～800、400～500、400～600、400～700、400～800、500～600、500～700、500～800、600～700、600～800、または700～800の長さを有し得る。

30

#### 【0241】

いくつかの実施形態では、プロモーターは、同じまたは異なる開始または親プロモーターの2つ以上の成分の組み合わせ、例えば、限定されないが、CMV及びCBAであり得る。各成分は、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、381、382、383、384、385、386、387、388、389、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、または800を超える長さを有し得る。各成分は、200～300、200～400、200～500、200～600、200～700、200～800、300～400、300～500、300～600、300～700、300～800、400～500、400～600、400～700、400～800、500～600、500～700、500～800、600～700、600～800、700～800、または800～900の長さを有し得る。

40

50

0～700、500～800、600～700、600～800、または700～800の長さを有し得る。いくつかの実施形態では、プロモーターは、382ヌクレオチドCMV-エンハンサー配列及び260ヌクレオチドCBA-プロモーター配列の組み合わせである。

【0242】

いくつかの実施形態では、ベクターゲノムは、ユビキタスプロモーターを含む。ユビキタスプロモーターの非限定的な例には、CMV、CBA（誘導体CAG、CBh等を含む）、EF-1 $\alpha$ 、PGK、UBC、GUSB（hGBp）、及びUCOE（HNRPAB1-CBX3のプロモーター）が含まれる。

【0243】

いくつかの実施形態では、プロモーターは、細胞特異的ではない。

【0244】

いくつかの実施形態では、ベクターゲノムは、操作されたプロモーターを含む。

【0245】

いくつかの実施形態では、ベクターゲノムは、天然に発現するタンパク質からのプロモーターを含む。

【0246】

非翻訳領域（UTR）

定義により、遺伝子の野生型非翻訳領域（UTR）は、転写されるが翻訳されない。通常、5'UTRは、転写開始部位で開始し、開始コドンで終了し、3'UTRは、終止コードの直後に開始し、転写のための終結シグナルまで続く。

【0247】

特定の標的器官の豊富に発現した遺伝子に典型的に見られる特徴は、安定性及びタンパク質生成を向上させるためにUTR内に操作され得る。非限定的な例として、肝臓において通常発現するmRNA（例えば、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、アルファフェトプロテイン、エリスロポエチン、または第V因子）からの5'UTRは、肝細胞株または肝臓における発現を向上させるために本開示のAAV粒子のベクターゲノムにおいて使用され得る。

【0248】

理論に縛られることを望むものではないが、野生型5'非翻訳領域（UTR）には、翻訳開始において役割を果たす特徴が含まれる。リボソームが多くの遺伝子の翻訳を開始させるプロセスに関与することが一般的に知られているKozak配列が通常、5'UTRに含まれる。Kozak配列は、コンセンサスCCR（A/G）CCAUGG（式中、Rは、開始コドン（ATG）（別の「G」が続く）の3塩基上流のプリン（アデニンまたはグアニン）である）を有する。

【0249】

いくつかの実施形態では、ベクターゲノムにおける5'UTRには、Kozak配列が含まれる。

【0250】

いくつかの実施形態では、ベクターゲノムにおける5'UTRには、Kozak配列が含まれない。

【0251】

理論に縛られることを望むものではないが、野生型3'UTRは、それに埋め込まれたアデノシン及びウリジンの伸長部を有することが知られている。これらのAUリッチングネチャは、高いターンオーバー率を有する遺伝子において特に広く見られる。それらの配列特徴及び機能的特性に基づいて、AUリッチ要素（ARE）は、3つのクラスに分けられ得る（Chen et al., 1995（その内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる））：クラスIのARE、例えば、限定されないが、c-Myc及びMyoDは、Uリッチ領域内でAUUAモチーフのいくつかの分散したコピーを含有する。クラスIIのARE、例えば、限定されないが、GM-CSF及びTNF- $\alpha$ は、2つ

10

20

30

40

50

以上の重複するUUAUUUA (U/A) (U/A) 九量体を保有する。クラスIIIのARE、例えば、限定されないが、c-Jun及びミオゲニンは、あまりよく定義されていない。これらのUリッチ領域は、AUUAモチーフを含有しない。AREに結合するほとんどのタンパク質は、メッセンジャーを不安定化することが知られている一方で、ELAVファミリーのメンバー、中でも特にHuRは、mRNAの安定性を増加させることが文書化されている。HuRは、3つすべてのクラスのAREに結合する。核酸分子の3' UTR内にHuR特異的結合部位を操作することは、HuR結合をもたらし、よって、*in vivo*でメッセージの安定化をもたらす。

#### 【0252】

3' UTR AUリッチ要素 (ARE) の導入、除去または修飾は、ポリヌクレオチドの安定性を調節するために使用され得る。特定のポリヌクレオチド、例えば、ベクターゲノムのペイロード領域を操作する場合、ポリヌクレオチドをより不安定にし、それにより翻訳を縮小し、得られるタンパク質の生成を減少させるためにAREの1つ以上のコピーが導入され得る。同様に、AREは、同定され、細胞内安定性を増加させ、よって、得られるタンパク質の翻訳及び生成を増加させるために除去または変異させられ得る。

#### 【0253】

いくつかの実施形態では、ベクターゲノムの3' UTRには、ポリ-Aテールの鋳型付加のためのオリゴ (dT) 配列が含まれ得る。

#### 【0254】

いくつかの実施形態では、ベクターゲノムには、少なくとも1つのmiRNAシード、結合部位または完全配列が含まれ得る。マイクロRNA (またはmiRNAまたはmiR) は、核酸標的の部位に結合し、核酸分子安定性を低減することによってまたは翻訳を阻害することによってのいずれかで遺伝子発現を下方制御する19~25ヌクレオチドの非コードRNAである。マイクロRNA配列は、「シード」領域、すなわち、成熟マイクロRNAの位置2~8の領域における配列を含み、この配列は、核酸のmiRNA標的配列と完全なワトソン・クリック相補性を有する。

#### 【0255】

いくつかの実施形態では、ベクターゲノムは、少なくとも1つのmiRNA結合部位、配列、またはシード領域を含む、改変するまたは除去するように操作され得る。

#### 【0256】

当該技術分野で知られている任意の遺伝子からの任意のUTRは、AAV粒子のベクターゲノムに組み込まれ得る。これらのUTR、またはその一部分は、それらが選択された遺伝子と同じ配向で配置され得、またはそれらは、配向または位置が改変され得る。いくつかの実施形態では、AAV粒子のベクターゲノムにおいて使用されるUTRは、逆にされ、短くされ、長くされ、当該技術分野で知られている1つ以上の他の5' UTRまたは3' UTRを用いて作製され得る。本明細書で使用される場合、用語「改変」は、UTRに関する場合、参照配列に対して何らかの方法で変更されていることを意味する。例えば、3' または5' UTRは、上に教示されるように配向または位置の変化によって野生型またはネイティブUTRと比べて改変され得、または追加の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または転移によって改変され得る。

#### 【0257】

いくつかの実施形態では、AAV粒子のベクターゲノムは、野生型UTRのバリエーションではない少なくとも1つの人工UTRを含む。

#### 【0258】

いくつかの実施形態では、AAV粒子のベクターゲノムは、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産物のファミリーから選択されているUTRを含む。

#### 【0259】

##### ポリアデニル化配列

いくつかの実施形態では、ベクターゲノムは、ペイロードコード配列の3' 末端と、3' 50

10

20

30

40

50

ITRの5'末端との間に少なくとも1つのポリアデニル化配列を含む。

【0260】

いくつかの実施形態では、ポリアデニル化（ポリ-A）配列は、長さが非存在から約500ヌクレオチドまでの範囲であり得る。ポリアデニル化配列は、長さが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、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、239、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、301、302、303、304、305、306、307、308、309、310、311、312、313、314、315、316、317、318、319、320、321、322、323、324、325、326、327、328、329、330、331、332、333、334、335、336、337、338、339、340、341、342、343、344、345、346、347、348、349、350、351、352、353、354、355、356、357、358、359、360、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、383、384、385、386、387、388、389、390、391、392、393、394、395、396、397、398、399、400、401、402、403、404、405、406、407、408、409、410、411、412、413、414、415、416、417、418、419、420、421、422、423、424、425、426、427、428、429、430、431、432、433、434、435、436、437、438、439、440、441、442、443、444、445、446、447、448、449、450、451、452、453、454、455、456、457、458、459、460、461、462、463、464、465、466、467、468、469、470、471、472、473、474、475、476、477、478、479、480、481、482、483、484、485、486、487、488、489

10

20

30

40

50

、490、491、492、493、494、495、496、497、498、499、及び500ヌクレオチドであり得るがこれらに限定されない。

【0261】

いくつかの実施形態では、ポリアデニル化配列は、長さが50～100ヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、ポリアデニル化配列は、長さが50～150ヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、ポリアデニル化配列は、長さが50～160ヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、ポリアデニル化配列は、長さが50～200ヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、ポリアデニル化配列は、長さが60～100ヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、ポリアデニル化配列は、長さが60～150ヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、ポリアデニル化配列は、長さが60～160ヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、ポリアデニル化配列は、長さが60～200ヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、ポリアデニル化配列は、長さが70～100ヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、ポリアデニル化配列は、長さが70～150ヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、ポリアデニル化配列は、長さが70～160ヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、ポリアデニル化配列は、長さが70～200ヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、ポリアデニル化配列は、長さが80～100ヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、ポリアデニル化配列は、長さが80～150ヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、ポリアデニル化配列は、長さが80～160ヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、ポリアデニル化配列は、長さが80～200ヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、ポリアデニル化配列は、長さが90～100ヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、ポリアデニル化配列は、長さが90～150ヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、ポリアデニル化配列は、長さが90～160ヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、ポリアデニル化配列は、長さが90～200ヌクレオチドである。

10

20

【0262】

リンカー

ベクターゲノムは、コードまたは非コード領域を分離するように1つ以上のスペーサーまたはリンカー領域で操作され得る。

【0263】

いくつかの実施形態では、ベクターゲノムのペイロード領域は、1つ以上のリンカー配列を任意にコードし得る。いくつかの場合では、リンカーは、ペイロード領域によってコードされるポリペプチド（すなわち、発現中の軽及び重抗体鎖）を接続するために使用され得るペプチドリリンカーであり得る。いくつかのペプチドリリンカーは、重鎖及び軽鎖ドメインを分離するために発現後に切断され、成熟抗体または抗体断片の構築を可能とし得る。リンカー切断は、酵素性であり得る。いくつかの場合では、リンカーは、細胞内または細胞外切断を容易化するための酵素切断部位を含む。いくつかのペイロード領域は、mRNA転写産物からのリンカー配列の翻訳中にポリペプチド合成を遮断するリンカーをコードする。そのようなリンカーは、単一の転写産物からの別々のタンパク質ドメインの翻訳を容易化し得る。いくつかの場合では、2つ以上のリンカーは、ベクターゲノムのペイロード領域によってコードされる。

30

40

【0264】

内部リボソーム進入部位（IRES）は、mRNA配列の中央部における翻訳の開始を可能とするヌクレオチド配列（>500ヌクレオチド）である（Kim, J. H. et al., 2011. PLoS One 6 (4): e18556（その内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）。IRES配列の使用は、IRESの前及び後の遺伝子の共発現を確保するが、IRESの後の配列は、IRES配列に先行する配列よりも低いレベルで転写及び翻訳され得る。

【0265】

2Aペプチドは、ウイルス、例えば、足口病ウイルス（F2A）、ブタテシオウイルス

50

ー1 (P2A)、Those as a signal ウイルス (T2A)、またはウマ鼻炎Aウイルス (E2A) に由来する小さな「自己切断性」ペプチド (18~22アミノ酸) である。2Aの指定は特に、2AペプチドのC末端におけるグリシループロリン結合でリボソームスキップをもたらすピコルナウイルスポリタンパク質の領域を指す (Kim, J. H. et al., 2011. PLoS One 6 (4): e18556 (その内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる))。このスキップは、2Aペプチドとそのすぐ下流のペプチドとの間の切断をもたらす。IRESリンカーとは対照的に、2Aペプチドは、2Aペプチドに隣接するタンパク質の化学量論的発現を生成し、それらのより短い長さは、ウイルス性発現ベクターを生成する際に有利であり得る。

#### 【0266】

いくつかのペイロード領域は、フーリン切断部位を含むリンカーをコードする。フーリンは、塩基性アミノ酸標的配列 (Arg-X-(Arg/Lys)-Arg) のすぐ下流のタンパク質を切断するカルシウム依存性セリンエンドプロテアーゼである (Thomas, G., 2002. Nature Reviews Molecular Cell Biology 3 (10): 753-66 (その内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる))。フーリンは、トランスゴルジネットワークにおいて濃縮されており、そこでそれは、細胞前駆体タンパク質のプロセッシングに関与する。フーリンはまた、多数の病原体を活性化する際に役割を果たす。この活性は、本開示のポリペプチドの発現のために利用され得る。

#### 【0267】

いくつかの実施形態では、ペイロード領域は、カテプシン、マトリックスメタロプロテイナーゼまたはレグマイン切断部位を含む1つ以上のリンカーをコードし得る。そのようなリンカーは、例えば、Cizeau及びMacdonaldによって国際公開番号WO 2008052322 (その内容は、それらの全体が本明細書に組み込まれる) に記載されている。カテプシンは、特定のタンパク質を切断するための独自のメカニズムを有するプロテアーゼのファミリーである。カテプシンBは、システインプロテアーゼであり、カテプシンDは、アスパルチルプロテアーゼである。マトリックスメタロプロテイナーゼは、カルシウム依存性及び亜鉛含有エンドペプチダーゼのファミリーである。レグマインは、タンパク質及び小分子基質の (-Asn-Xaa-) 結合の加水分解を触媒する酵素である。

#### 【0268】

いくつかの実施形態では、ペイロード領域は、切断されないリンカーをコードし得る。そのようなリンカーには、単一アミノ酸配列、例えば、グリシンリッチ配列が含まれ得る。いくつかの場合では、リンカーは、グリシン及びセリン残基を含むフレキシブルペプチドリンカーを含み得る。リンカーは、異なる長さのフレキシブルペプチドリンカー、例えば、n x G4S (式中、n=1~10である) を含み得、コードされるリンカーの長さは、5~50アミノ酸で変わる。非限定的な例では、リンカーは、5 x G4Sであり得る。これらのフレキシブルリンカーは、抗体セグメント間にフレキシブルリンカーを提供しながら、二次タンパク質構造に影響を及ぼさない傾向となるように小さく、側鎖を有しない (George, R. A., et al., 2002. Protein Engineering 15 (11): 871-9; Huston, J. S. et al., 1988. PNAS 85: 5879-83; 及びShan, D. et al., 1999. Journal of Immunology. 162 (11): 6589-95 (これらの各々の内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる))。さらに、セリン残基の極性は、溶解性を改善し、凝集問題を防止する。

#### 【0269】

いくつかの実施形態では、本開示のペイロード領域は、小さな非分岐状セリンリッチペプチドリンカー、例えば、Huston et al. によって米国特許番号US 5525491 (その内容は、それらの全体が本明細書に組み込まれる) において記載されているものをコードし得る。セリンリッチリンカーによって連結された本開示のペイロード領

10

20

30

40

50

域によってコードされるポリペプチドは、増加した溶解性を有する。

【0270】

いくつかの実施形態では、本開示のペイロード領域は、人工リンカー、例えば、Whitlow及びFilpulaによって米国特許番号US5856456に、及びLadner et al.によって米国特許番号US4946778（これらの各々の内容は、それらの全体が本明細書に組み込まれる）に記載されているものをコードし得る。

【0271】

イントロン

いくつかの実施形態では、ペイロード領域は、発現を向上させるための少なくとも1つの要素、例えば、1つ以上のイントロンまたはその部分を含む。イントロンの非限定的な例には、MVM（67～97bp）、F.IX切断型イントロン1（300bp）、β-グロビンSD/免疫グロブリン重鎖スプライスアクセプター（250bp）、アデノウイルススプライスドナー/イムノグロビンスプライスアクセプター（500bp）、SV40後期スプライスドナー/スプライスアクセプター（19S/16S）（180bp）及びハイブリッドアデノウイルススプライスドナー/IgGスプライスアクセプター（230bp）が含まれる。

【0272】

いくつかの実施形態では、イントロンまたはイントロン部分は、長さが100～500ヌクレオチドであり得る。イントロンは、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490または500の長さを有し得る。イントロンは、80～100、80～120、80～140、80～160、80～180、80～200、80～250、80～300、80～350、80～400、80～450、80～500、200～300、200～400、200～500、300～400、300～500、または400～500の長さを有し得る。

【0273】

レンチウイルスベクター

レンチウイルスベクターは、レトロウイルスの1種であり、それらのウイルスシェルが標的細胞の核のインタクト膜を通過し得るので、分裂及び非分裂細胞の両方に感染し得る。レンチウイルスベクターは、安定な遺伝子操作が救い難いほど無効であると長い間思われていた組織において導入遺伝子を送達する能力を有する。レンチベクターはまた、多様な遺伝性及び後天的障害の遺伝子的処置のための新たな視点を切り開き、それらの臨床的使用のための現実的提案が差し迫っているようである。

【0274】

RNA

リボ核酸（RNA）は、窒素塩基及びホスフェート基に結合したリボース糖であるヌクレオチドから構成される分子である。窒素塩基には、アデニン（A）、グアニン（G）、ウラシル（U）、及びシトシン（C）が含まれる。通常、RNAは大抵、一本鎖形態で存在するが、所定の状況では二本鎖で存在し得る。RNAの長さ、形態及び構造は、RNAの目的に応じて多様である。例えば、RNAの長さは、短い配列（例えば、siRNA）から長い配列（例えば、lncRNA）まで様々であり得、線状（例えば、mRNA）または環状（例えば、oRNA）であり得、コード（例えば、mRNA）または非コード（例えば、lncRNA）配列のいずれかであり得る。

【0275】

いくつかの実施形態では、ペイロード領域は、コードRNAであり、またはそれをコードし得る。

【0276】

いくつかの実施形態では、ペイロード領域は、非コードRNAであり、またはそれをコードし得る。

【0277】

いくつかの実施形態では、ペイロード領域は、コードRNA及び非コードRNAの両方であり、またはそれをコードし得る。

【0278】

いくつかの実施形態では、ペイロード領域は、複数のカーゴまたはペイロードをコードする核酸配列を含む。

【0279】

いくつかの実施形態では、ペイロード領域は、遺伝子の発現を向上させるための核酸配列を含む。非限定的な例として、核酸配列は、メッセンジャーRNA (mRNA) である。別の非限定的な例として、核酸配列は、環状RNA (oRNA) である。

10

【0280】

いくつかの実施形態では、ペイロード領域は、遺伝子の発現を低減または阻害するための核酸配列を含む。非限定的な例として、核酸配列は、低分子干渉RNA (siRNA) またはマイクロRNA (miRNA) である。

【0281】

メッセンジャーRNA (mRNA)

いくつかの実施形態では、オリジネーターコンストラクト及び／またはベンチマークコンストラクトは、mRNAであり得る。本明細書で使用される場合、用語「メッセンジャーRNA」(mRNA) は、対象となる標的をコードし、in vitro、in vivo、in situまたはex vivoで翻訳されて、対象となるコードされる標的を生成することが可能な任意のポリヌクレオチドを指す。

20

【0282】

通常、mRNA分子は、少なくともコード領域、5'非翻訳領域(UTR)、3'UTR、5'キャップ及びポリ-Aテールを含む。いくつかの態様では、1つ以上の構造的及び／または化学的修飾または改変が、mRNAが導入される細胞の自然免疫反応を低減し得るRNAに含まれ得る。本明細書で使用される場合、「構造的」特徴または修飾は、2つ以上の連結されたヌクレオチドが、ヌクレオチド自体への有意な化学的修飾に伴わずに、核酸において挿入、欠失、複製、反転、またはランダム化されたものである。構造的修飾を達成するためには化学的結合が必ず切断され、再形成されるので、構造的修飾は、化学的特質のものであり、よって、化学的修飾である。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ことになる。例えば、ポリヌクレオチド「ATCG」は、「AT-5meC-G」に化学的に修飾され得る。

30

【0283】

通常、オリジネーターコンストラクト及び／またはベンチマークコンストラクトの領域の最短の長さは、ジペプチド、トリペプチド、テトラペプチド、ペンタペプチド、ヘキサペプチド、ヘプタペプチド、オクタペプチド、ノナペプチド、またはデカペプチドをコードするために十分である核酸配列の長さであり得る。別の実施形態では、長さは、2~30アミノ酸、例えば、5~30、10~30、2~25、5~25、10~25、または10~20アミノ酸のペプチドをコードするために十分であり得る。長さは、少なくとも11、12、13、14、15、17、20、25または30アミノ酸のペプチド、または40アミノ酸以下、例えば、35、30、25、20、17、15、14、13、12、11または10アミノ酸以下であるペプチドをコードするために十分であり得る。

40

【0284】

通常、対象となる標的をコードするmRNAの領域の長さは、長さが約30ヌクレオチドを超える(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

50



、1,900、2,000、2,500、及び3,000、4,000、5,000、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ヌクレオチドまたは最大で100,000ヌクレオチドを含み、またはそれを超える)。

#### 【0285】

いくつかの実施形態では、mRNAには、約30～約100,000ヌクレオチド(例えば、30～50、30～100、30～250、30～500、30～1,000、30～1,500、30～3,000、30～5,000、30～7,000、30～10,000、30～25,000、30～50,000、30～70,000、100～250、100～500、100～1,000、100～1,500、100～3,000、100～5,000、100～7,000、100～10,000、100～25,000、100～50,000、100～70,000、100～100,000、500～1,000、500～1,500、500～2,000、500～3,000、500～5,000、500～7,000、500～10,000、500～25,000、500～50,000、500～70,000、500～100,000、1,000～1,500、1,000～2,000、1,000～3,000、1,000～5,000、1,000～7,000、1,000～10,000、1,000～25,000、1,000～50,000、1,000～70,000、1,000～100,000、1,500～3,000、1,500～5,000、1,500～7,000、1,500～10,000、1,500～25,000、1,500～50,000、1,500～70,000、1,500～100,000、2,000～3,000、2,000～5,000、2,000～7,000、2,000～10,000、2,000～25,000、2,000～50,000、2,000～70,000、及び2,000～100,000)が含まれる。

#### 【0286】

いくつかの実施形態では、対象となる標的をコードする領域またはその領域に隣接する領域は、独立して、長さが15～1,000ヌクレオチドの範囲であり得る(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、及び900ヌクレオチドを超え、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、及び1,000ヌクレオチド)。

#### 【0287】

いくつかの実施形態では、mRNAは、長さが非存在～500ヌクレオチドの範囲であり得るテール配列(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)を含む。テール領域がポリAテールである場合、長さは、ポリA結合タンパク質結合の単位で、またはその機能に応じて決定され得る。この実施形態では、ポリAテールは、ポリA結合タンパク質の少なくとも4モノマーを結合させるのに十分に長い。ポリA結合タンパク質モノマーは、およそ38ヌクレオチドの伸長部に結合する。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。

#### 【0288】

いくつかの実施形態では、mRNA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むキャップ配列を含む。キャップ配列は、長さが1～10、例えば、2～9、3～8、4～7、1～5、5～10、または少なくとも2、または10以下のヌクレオチドであり得る。いくつかの実施形態では、キャップ配列は、非存在である。

#### 【0289】

いくつかの実施形態では、mRNAは、開始コドンを含む領域を含む。開始コドンを含む領域は、長さが3～40、例えば、5～30、10～20、15、または少なくとも4、または30以下のヌクレオチドの範囲であり得る。

【0290】

いくつかの実施形態では、mRNAは、終止コドンを含む領域を含む。終止コドンを含む領域は、長さが3～40、例えば、5～30、10～20、15、または少なくとも4、または30以下のヌクレオチドの範囲であり得る。

【0291】

いくつかの実施形態では、mRNAは、制限配列を含む領域を含む。制限配列を含む領域は、長さが3～40、例えば、5～30、10～20、15、または少なくとも4、または30以下のヌクレオチドの範囲であり得る。

【0292】

非翻訳領域 (UTR)

いくつかの実施形態では、mRNAは、対象となる標的をコードする領域に隣接する少なくとも1つの非翻訳領域 (UTR) を含む。UTRは、転写されるが翻訳されない。

【0293】

5' UTRは、転写開始部位で開始し、開始コドンまで続くが、開始コドンを含まず；一方で、3' UTRは、終止コドンの直後で開始し、転写終結シグナルまで続く。理論に縛られることを望むものではないが、UTRは、核酸の翻訳及び安定性の観点から制御の役割を有し得る。

【0294】

天然5' UTRには通常、リボソームが多く遺伝子の翻訳を開始させるプロセスに関与することが一般的に知られているKozak配列を含む傾向があるので、翻訳開始において役割を有する特徴が含まれる。Kozak配列は、コンセンサスCCR (A/G) CCAUGG (式中、Rは、開始コドン (AUG) (別の「G」が続く) の3塩基上流のプリン (アデニンまたはグアニン) である) を有する。5' UTRはまた、伸長因子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。

【0295】

3' UTRは、それらに埋め込まれたアデノシン及びウリジンの伸長部を有することが知られている。これらのAUリッチシグネチャは、高いターンオーバー率を有する遺伝子において特に広く見られる。それらの配列特徴及び機能的特性に基づいて、AUリッチ要素 (ARE) は、3つのクラスに分けられ得る (Chen et al., 1995)：クラスIのAREは、Uリッチ領域内でAUUAモチーフのいくつかの分散したコピーを含有する。C-Myc及びMyoDは、クラスIのAREを含有する。クラスIIのAREは、2つ以上の重複するUUAUUA (U/A) (U/A) 九量体を保有する。このタイプのAREを含有する分子には、GM-CSF及びTNF- $\alpha$ が含まれる。クラスIIIのAREは、あまり定義されていない。これらのUリッチ領域は、AUUAモチーフを含有しない。c-Jun及びミオゲニン、このクラスの2つのよく研究された例である。AREに結合するほとんどのタンパク質は、メッセンジャーを不安定化することが知られている一方で、ELAVファミリーのメンバー、中でも特にHuRは、mRNAの安定性を増加させることが文書化されている。HuRは、3つすべてのクラスのAREに結合する。核酸分子の3' UTR内にHuR特異的結合部位を操作することは、HuR結合をもたらす、よって、in vivoでメッセージの安定化をもたらす。3' UTR AUリッチ要素 (ARE) の導入、除去または修飾は、mRNAの安定性を調節するために使用され得る。例えば、AREの1つ以上のコピーは、mRNAの安定性がより低いものとし、それにより翻訳を削減し、得られるタンパク質の生成を減少させるために導入され得る。代替的には、AREは、細胞内安定性を増加させ、よって、得られるタンパク質の翻訳及び生成を増加させるために同定され、除去または変異させられ得る。

【0296】

いくつかの実施形態では、標的器官の遺伝子においてしばしば発現する特徴の導入によ

10

20

30

40

50

り、mRNAの安定性及びタンパク質生成は、特定の器官及び／または組織において向上し得る。非限定的な例として、特徴は、UTRであり得る。別の例として、特徴は、イントロンまたはイントロン配列の一部であり得る。

【0297】

#### 5'キャッピング

mRNAの5'キャップ構造は、核外搬出に関与し、mRNA安定性を増加させ、mRNAキャップ結合タンパク質(CBP)を結合させ、これは、細胞におけるmRNA安定性及び成熟環状mRNA種を形成するためのCBPとポリ(A)結合タンパク質との会合を介する翻訳能力を担う。キャップはさらに、mRNAスプライシング中に5'近傍イントロン除去の除去を補助する。

【0298】

内因性mRNA分子は、5'末端でキャップされ得、末端グアノシンキャップ残基と、mRNA分子の5'末端の転写されたセンスヌクレオチドとの間に5'-ppp-5'-トリホスフェート結合を生成する。この5'-グアニレートキャップは次いで、N7-メチルグアニレート残基を生成するようにメチル化され得る。mRNAの5'末端の末端及び／または非末端の転写されたヌクレオチドのリボース糖はまた、任意に2'-O-メチル化され得る。グアニレートキャップ構造の加水分解及び切断を介する5'-脱キャッピングは、分解のために核酸分子、例えば、mRNA分子を標的とし得る。

【0299】

mRNAに対する修飾は、脱キャッピングを防止し、よって、mRNA半減期を増加させる加水分解可能ではないキャップ構造を生成し得る。キャップ構造の加水分解は、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が使用され得る。例えば、New England Biolabs (Ipswich, MA)からのVaccinia Capping Enzymeは、5'-ppp-5'キャップにおいてホスホロチオエート結合を生成するために製造業者の指示書に従ってα-チオグアノシンヌクレオチドと共に使用され得る。

【0300】

α-メチル-ホスホネート及びセレノ-ホスフェートヌクレオチド等の追加の修飾グアノシンヌクレオチドが使用され得る。

【0301】

追加の修飾には、糖環の2'-ヒドロキシル基上のmRNAの5'末端及び／または5'非末端ヌクレオチドのリボース糖の2'-O-メチル化(上述されている)が含まれるがこれらに限定されない。複数の異なる5'-キャップ構造は、mRNA分子等の核酸分子の5'-キャップを生成するために使用され得る。

【0302】

本明細書で合成キャップアナログ、化学的キャップ、化学的キャップアナログ、または構造的もしくは機能的キャップアナログとも称されるキャップアナログは、キャップ機能を保持しながらそれらの化学的構造において天然(すなわち、内因性、野生型または生理的)5'-キャップとは異なる。キャップアナログは、化学的(すなわち、非酵素的)または酵素的に合成され、及び／または核酸分子に連結され得る。

【0303】

例えば、アンチリバースキャップアナログ(ARCA)キャップは、5'-5'-トリホスフェート基によって連結された2つのグアニンを含有し、一方のグアニンは、N7メチル基ならびに3'-O-メチル基(すなわち、N7, 3'-O-ジメチルグアノシン-5'-トリホスフェート-5'-グアニン(mG-3'mppp-G(3'-O-Me-m7G(5')ppp(5')G)と同等に指定され得る)を含有する。他方の未修飾のグアニンの3'-O原子は、キャップされた核酸分子(例えば、mRNA)の5'末端ヌクレオチドに連結される。N7-及び3'-O-メチル化グアニンは、キャップされた核酸分子(例えば、mRNA)の末端部位を提供する。

【0304】

10

20

30

40

50

別の例示的なキャップはmCAPであり、これはARCAに類似しているが、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、7mGm-ppp-G）。

#### 【0305】

キャップアナログにより、*in vitro*転写反応において核酸分子の付随キャッピングが可能となるが、転写産物の最大で20%は、キャップされないままであり得る。このこと、ならびに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'-キャップ構造からのキャップアナログの構造的差異は、低減された翻訳能力及び低減された細胞安定性をもたらし得る。

#### 【0306】

mRNAはまた、より確実な5'-キャップ構造を生成するために、酵素を使用して、転写後にキャップされ得る。本明細書で使用される場合、語句「より確実な」は、構造的または機能的のいずれかで、内因性または野生型の特徴を厳密に反映または模倣する特徴を指す。すなわち、「より確実な」特徴は、先行技術の合成特徴またはアナログ等と比較して、または1つ以上の点で対応する内因性、野生型、天然または生理的特徴よりも性能が優れている内因性、野生型、天然または生理的細胞機能及び／または構造をより良好に代表する。より確実な5'-キャップ構造の非限定的な例は、とりわけ、当該技術分野で知られている合成5'-キャップ構造（または野生型、天然または生理的5'-キャップ構造）と比較した場合、キャップ結合タンパク質の向上した結合、増加した半減期、5'-エンドヌクレアーゼに対する低減した感受性及び／または低減した5'-脱キャッピングを有するものである。例えば、組換えワクシニアウイルスキャッピング酵素及び組換え2'-O-メチルトランスフェラーゼ酵素は、mRNA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の標準的な5'-5'-トリホスフェート結合を生成し得、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、当該技術分野で知られている他の5'-キャップアナログ構造と比較した場合、より高い翻訳能力及び細胞安定性ならびに細胞性炎症誘発性サイトカインの低減された活性化をもたらす。キャップ構造には、7mG(5\*)ppp(5\*)N, pN2p(キャップ0)、7mG(5\*)ppp(5\*)NlmpNp(キャップ1)、及び7mG(5\*)-ppp(5')NlmpN2mp(キャップ2)が含まれるがこれらに限定されない。

#### 【0307】

いくつかの実施形態では、5'-末端キャップには、内因性キャップまたはキャップアナログが含まれ得る。

#### 【0308】

いくつかの実施形態では、5'-末端キャップは、グアニンアナログを含み得る。有用なグアニンアナログには、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。

#### 【0309】

##### IRES配列

いくつかの実施形態では、mRNAは、内部リボソーム進入部位(IRES)を含有し得る。特徴的ピコルナウイルスRNAとして最初に同定されたIRESは、5'-キャップ構造の非存在下でタンパク質合成を開始させる際に重要な役割を果たす。IRESは、唯一のリボソーム結合部位として作用し得、またはmRNAの複数のリボソーム結合部位の1つとして機能し得る。複数の機能的リボソーム結合部位を含有するmRNAは、リボソームによって独立して翻訳されるいくつかのペプチドまたはポリペプチドをコードし得る。使用され得るIRES配列の非限定的な例には、限定されないが、ピコルナウイルス（例えば、FMDV）、ペストウイルス（CFPV）、ポリオウイルス（PV）、脳心筋炎ウイルス（ECMV）、足口病ウイルス（FMDV）、C型肝炎ウイルス（HCV）、古典的ブタ熱ウイルス（CSFV）、ネズミ白血病ウイルス（MLV）、シミアン免疫不全

10

20

30

40

50

ウイルス（S I V）またはコオロギ麻痺ウイルス（C r P V）からのものが含まれる。

【0310】

ポリ-Aテール

R N A プロセシング中に、アデニンヌクレオチドの長鎖（ポリ-Aテール）が、安定性を増加させるためにポリヌクレオチド、例えば、m R N A 分子に付加され得る。転写の直後に、転写産物の3'末端が切断されて3'ヒドロキシルを遊離させ得る。次いでポリ-Aポリメラーゼは、アデニンヌクレオチドの鎖をR Aに付加する。ポリアデニル化と呼ばれるそのプロセスは、所定長さのポリ-Aテールを付加する。

【0311】

いくつかの実施形態では、ポリ-Aテールの長さは、長さが30ヌクレオチドを超える。別の実施形態では、ポリ-Aテールは、長さが35ヌクレオチドを超える（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ヌクレオチドまたはそれを超える）。いくつかの実施形態では、m R N A には、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、2,000~2,500、及び2,500~3,000）のポリ-Aテールが含まれる。

10

20

【0312】

いくつかの実施形態では、ポリ-Aテールは、m R N A 全体の長さに対して設計される。この設計は、対象となる標的をコードする領域の長さ、特定の特徴または領域（例えば、隣接領域領域）の長さに基づき、またはm R N A から発現する最終生成物の長さに基づき得る。

30

【0313】

この文脈において、ポリ-Aテールは、m R N A またはその特徴よりも長さが10、20、30、40、50、60、70、80、90、または100%長い場合がある。ポリ-Aテールはまた、それが属するm R N A の画分として設計され得る。この文脈において、ポリ-Aテールは、コンストラクトの総長さの10、20、30、40、50、60、70、80、または90%以上またはコンストラクトの総長さからポリ-Aテールを除いたものであり得る。さらに、ポリ-A結合タンパク質のためのm R N A の操作された結合部位及びコンジュゲーションは、発現を向上させ得る。

40

【0314】

また、複数の異なるm R N A は、ポリ-Aテールの3'末端で修飾ヌクレオチドを使用して3'末端を介してP A B P（ポリ-A結合タンパク質）に互いに連結され得る。トランスフェクション実験は、関連する細胞株において行われ得、タンパク質生成は、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日目後にE L I S A によってアッセイされ得る。

【0315】

いくつかの実施形態では、m R N A は、ポリA-Gカルテット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る4つのグアニンヌクレオチドの環状水素結合アレイである。この実施形態では、G-カ

50

ルテットは、ポリ-A テールの末端に組み込まれる。

【0316】

終止コドン

いくつかの実施形態では、mRNA には、1つの終止コドンが含まれ得る。いくつかの実施形態では、mRNA には、2つの終止コドンが含まれ得る。いくつかの実施形態では、mRNA には、3つの終止コドンが含まれ得る。いくつかの実施形態では、mRNA には、少なくとも1つの終止コドンが含まれ得る。いくつかの実施形態では、mRNA には、少なくとも2つの終止コドンが含まれ得る。いくつかの実施形態では、mRNA には、少なくとも3つの終止コドンが含まれ得る。非限定的な例として、終止コドンは、TGA、TAA 及び TAG から選択され得る。

10

【0317】

いくつかの実施形態では、mRNA には、終止コドン TGA 及び 1つの追加の終止コドンが含まれる。さらなる実施形態では、追加終止コドンは、TAA であり得る。

【0318】

環状RNA (oRNA)

いくつかの実施形態では、オリジネーターコンストラクト及び／またはベンチマークコンストラクトは、環状RNA (oRNA) である。本明細書で使用される場合、用語「oRNA」または「環状RNA」は、互換的に使用され、共有結合または非共有結合を介して環状構造を形成するRNAを指し得る。

【0319】

いくつかの実施形態では、oRNA は、哺乳動物（例えば、ヒト、非ヒト霊長類、ウサギ、ラット、及びマウス）において非免疫原性であり得る。

20

【0320】

いくつかの実施形態では、oRNA は、水産養殖動物（例えば、魚、カニ、エビ、カキ等）、哺乳動物細胞、ペットまたは動物園動物（例えば、ネコ、イヌ、トカゲ、鳥類、ライオン、トラ及びクマ等）からの細胞、牧場または労働動物（例えば、ウマ、ウシ、ブタ、ニワトリ等）からの細胞、ヒト細胞、培養細胞、初代細胞または細胞株、幹細胞、前駆細胞、分化細胞、胚細胞、がん細胞（例えば、腫瘍形成性、転移）、非腫瘍形成性細胞（例えば、正常細胞）、胎児細胞、胚細胞、成人細胞、分裂細胞、非分裂細胞、またはそれらの任意の組み合わせ細胞において複製することが可能であり得、または複製する。

30

【0321】

いくつかの実施形態では、oRNA は、少なくとも線状対応物のものの半減期を有する。いくつかの実施形態では、oRNA は、線状対応物のものよりも増加した半減期を有する。いくつかの実施形態では、半減期は、約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、またはそれを超えて増加する。いくつかの実施形態では、oRNA は、少なくとも約1時間～約30日、または少なくとも約2時間、6時間、12時間、18時間、24時間（1日）、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、11日、12日、13日、14日、15日、16日、17日、18日、19日、20日、21日、22日、23日、24日、25日、26日、27日、28日、29日、30日、60日、またはそれより長くまたはその間の任意の時間、細胞における半減期または持続性を有する。いくつかの実施形態では、oRNA は、約10分～約7日以下、または約1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、8時間、9時間、10時間、11時間、12時間、13時間、14時間、15時間、16時間、17時間、18時間、19時間、20時間、21時間、22時間、24時間（1日）、36時間（1.5日）、48時間（2日）、60時間（2.5日）、72時間（3日）、4日、5日、6日、または7日以下、細胞における半減期または持続性を有する。

40

【0322】

いくつかの実施形態では、oRNA は、細胞における半減期または持続性を有するが、細胞は分裂性である。いくつかの実施形態では、oRNA は、分裂後の細胞における半減期または持続性を有する。所定の実施形態では、oRNA は、約10分～約30日超、ま

50

たは少なくとも約10分、15分、30分、45分、1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、8時間、9時間、10時間、11時間、12時間、13時間、14時間、15時間、16時間、17時間、18時間、24時間（1日）、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、11日、12日、13日、14日、15日、16日、17日、18日、19日、20日、21日、22日、23日、24日、25日、26日、27日、28日、29日、30日、60日、またはより長くまたはその間の任意の時間、分裂細胞における半減期または持続性を有する。

【0323】

いくつかの実施形態では、oRNAは、細胞機能を、例えば、一時的または長期に調節する。所定の実施形態では、細胞機能は、少なくとも約1時間～約30日、または少なくとも約2時間、6時間、12時間、18時間、24時間（1日）、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、11日、12日、13日、14日、15日、16日、17日、18日、19日、20日、21日、22日、23日、24日、25日、26日、27日、28日、29日、30日、60日、またはより長く持続する調節等、安定的に改変される。所定の実施形態では、細胞機能は、例えば、約30分～約7日、または約30分、45分、1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、8時間、9時間、10時間、11時間、12時間、13時間、14時間、15時間、16時間、17時間、18時間、19時間、20時間、21時間、22時間、23時間、24時間（1日）、36時間（1.5日）、48時間（2日）、60時間（2.5日）、72時間（3日）、4日、5日、6日、または7日以下の間持続する調節等、一時的に改変される。

【0324】

いくつかの実施形態では、oRNAは、少なくとも約20ヌクレオチド、少なくとも約30ヌクレオチド、少なくとも約40ヌクレオチド、少なくとも約50ヌクレオチド、少なくとも約75ヌクレオチド、少なくとも約100ヌクレオチド、少なくとも約200ヌクレオチド、少なくとも約300ヌクレオチド、少なくとも約400ヌクレオチド、少なくとも約500ヌクレオチド、少なくとも約1,000ヌクレオチド、少なくとも約2,000ヌクレオチド、少なくとも約5,000ヌクレオチド、少なくとも約6,000ヌクレオチド、少なくとも約7,000ヌクレオチド、少なくとも約8,000ヌクレオチド、少なくとも約9,000ヌクレオチド、少なくとも約10,000ヌクレオチド、少なくとも約12,000ヌクレオチド、少なくとも約14,000ヌクレオチド、少なくとも約15,000ヌクレオチド、少なくとも約16,000ヌクレオチド、少なくとも約17,000ヌクレオチド、少なくとも約18,000ヌクレオチド、少なくとも約19,000ヌクレオチド、または少なくとも約20,000ヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、oRNAは、リボソームへの結合部位を提供するために十分なサイズのものであり得る。

【0325】

いくつかの実施形態では、oRNAの最大サイズは、RNAをパッケージングし、標的に送達する能力によって制限され得る。いくつかの実施形態では、oRNAのサイズは、ポリペプチドをコードするために十分な長さであり、よって、少なくとも20,000ヌクレオチド、少なくとも15,000ヌクレオチド、少なくとも10,000ヌクレオチド、少なくとも7,500ヌクレオチド、または少なくとも5,000ヌクレオチド、少なくとも4,000ヌクレオチド、少なくとも3,000ヌクレオチド、少なくとも2,000ヌクレオチド、少なくとも1,000ヌクレオチド、少なくとも500ヌクレオチド、少なくとも400ヌクレオチド、少なくとも300ヌクレオチド、少なくとも200ヌクレオチド、少なくとも100ヌクレオチドの長さが有用であり得る。

【0326】

いくつかの実施形態では、oRNAは、本明細書の他の箇所に記載の1つ以上の要素を含む。いくつかの実施形態では、要素は、スパーサー配列またはリンカーによって互いに分離され得る。いくつかの実施形態では、要素は、互いに1ヌクレオチド、2ヌクレオチド、約5ヌクレオチド、約10ヌクレオチド、約15ヌクレオチド、約20ヌクレオチド

、約30ヌクレオチド、約40ヌクレオチド、約50ヌクレオチド、約60ヌクレオチド、約80ヌクレオチド、約100ヌクレオチド、約150ヌクレオチド、約200ヌクレオチド、約250ヌクレオチド、約300ヌクレオチド、約400ヌクレオチド、約500ヌクレオチド、約600ヌクレオチド、約700ヌクレオチド、約800ヌクレオチド、約900ヌクレオチド、約1000ヌクレオチド、最大で約1kb、少なくとも約1000ヌクレオチド分離され得る。

【0327】

いくつかの実施形態では、1つ以上の要素は、互いに連続しており、例えば、スペース要素を欠く。

【0328】

いくつかの実施形態では、1つ以上の要素は、構造的にフレキシブルである。いくつかの実施形態では、構造的柔軟性は、二次構造を実質的に含まない配列による。

【0329】

いくつかの実施形態では、oRNAは、リボソーム、翻訳、またはローリングサークル翻訳のための結合部位を提供する二次または三次構造を含む。

【0330】

いくつかの実施形態では、oRNAは、特定の配列特徴を含む。例えば、oRNAは、特定のヌクレオチド組成物を含み得る。いくつかのそのような実施形態では、oRNAには、1つ以上のプリンリッチ領域（アデニンまたはグアノシン）が含まれ得る。いくつかのそのような実施形態では、oRNAには、1つ以上のプリンリッチ領域（アデニンまたはグアノシン）が含まれ得る。いくつかの実施形態では、oRNAには、1つ以上のAUリッチ領域または要素（ARE）が含まれ得る。いくつかの実施形態では、oRNAには、1つ以上のアデニンリッチ領域が含まれ得る。

【0331】

いくつかの実施形態では、oRNAは、本明細書の他の箇所に記載の1つ以上の修飾を含む。

【0332】

いくつかの実施形態では、oRNAは、1つ以上の発現配列を含み、in vivoで対象の細胞において永続的発現のために構成される。いくつかの実施形態では、oRNAは、より遅い時点での細胞における1つ以上の発現配列の発現が、より早い時点と同等またはそれよりも早くなるように構成される。そのような実施形態では、1つ以上の発現配列の発現は、比較的安定なレベルで維持され得、または経時的に増加し得る。発現配列の発現は、長期間比較的安定であり得る。例えば、いくつかの場合では、細胞における1つ以上の発現配列の発現は、少なくとも7、8、9、10、12、14、16、18、20、22、23日またはそれを超える日数の期間にわたって、50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、または5%減少しない。いくつかの場合では、いくつかの場合では、細胞における1つ以上の発現配列の発現は、少なくとも7、8、9、10、12、14、16、18、20、22、23日以上の間、50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、または5%を超えて変化しないレベルで維持される。

【0333】

制御性要素

いくつかの実施形態では、oRNAは、制御性要素を含む。本明細書で使用される場合、「制御性要素」は、発現配列の発現を修飾する配列である。制御性要素には、ペイロードまたはカーゴ領域に隣接して位置する配列が含まれ得る。制御性要素は、機能可能にペイロードまたはカーゴ領域に機能可能に連結され得る。

【0334】

いくつかの実施形態では、制御性要素は、制御性要素が存在しない場合に発現する量と比較した場合、発現するペイロードまたはカーゴの量を増加させ得る。非限定的な例として、1つの制御性要素は、タンデムで結合した複数のペイロードまたはカーゴ配列につい

10

20

30

40

50



て発現するペイロードまたはカーゴの量を増加させ得る。

【0335】

いくつかの実施形態では、制御性要素は、ペイロードまたはカーゴの翻訳を選択的に開始または活性化するための配列を含み得る。

【0336】

いくつかの実施形態では、制御性要素は、oRNAまたはペイロードまたはカーゴの分解を開始させるための配列を含み得る。分解を開始させるための配列の非限定的な例には、リボスイッチアプタザイム及びmiRNA結合部位が含まれるがこれらに限定されない。

【0337】

いくつかの実施形態では、制御性要素は、oRNAにおけるペイロードまたはカーゴの翻訳を調節し得る。調節は、ペイロードまたはカーゴにおいて増加（エンハンサー）または減少（サプレッサー）を生成し得る。制御性要素は、ペイロードまたはカーゴに隣接して（例えば、ペイロードまたはカーゴの一方の側または両方の側に）位置し得る。

【0338】

いくつかの実施形態では、翻訳開始配列は、制御性要素として機能する。いくつかの実施形態では、翻訳開始配列は、AUG／ATGコドンを含む。いくつかの実施形態では、翻訳開始配列は、任意の真核生物開始コドン、例えば、限定されないが、AUG／ATG、CUG／CTG、GUG／GTG、UUG／TTG、ACG、AUC／ATC、AUU、AAG、AUA／ATA、またはAGGを含む。いくつかの実施形態では、翻訳開始配列は、Kozak配列を含む。いくつかの実施形態では、翻訳は、選択的条件、例えば、ストレス誘導条件下で、代替的翻訳開始配列、例えば、AUG／ATGコドン以外の翻訳開始配列で開始する。非限定的な例として、環状ポリリボヌクレオチドの翻訳は、代替的翻訳開始配列、例えば、ACGで開始し得る。別の非限定的な例として、環状ポリリボヌクレオチド翻訳は、代替的翻訳開始配列、CUG／CTGで開始し得る。別の非限定的な例として、翻訳は、代替的翻訳開始配列、GUG／GTGで開始し得る。さらに別の非限定的な例として、翻訳は、繰り返しRNA、例えば、CGG、GGGGCC、CAG、CTGの短い伸長部を含む代替的翻訳開始配列等のリピート関連非AUG（RAN）配列で開始し得る。

【0339】

マスキング剤

翻訳を開始させるコドンに隣接するヌクレオチドのいずれかをマスキングすることは、oRNAの翻訳開始の位置、翻訳効率、長さ及び／または構造を改変するために使用され得る。いくつかの実施形態では、マスキングされた開始コドンまたは代替的開始コドンで翻訳開始の可能性を低減するためにコドンをマスキングするためにまたは隠すために、開始コドンまたは代替的開始コドンの近くでマスキング剤が使用され得る。マスキング剤の非限定的な例には、アンチセンスロック核酸（LNA）オリゴヌクレオチド及びエクソジャンクション複合体（EJC）が含まれる。いくつかの実施形態では、マスキング剤は、翻訳が代替的開始コドンで開始する可能性を増加させるためにoRNAの開始コドンをマスキングするために使用され得る。

【0340】

翻訳開始配列

いくつかの実施形態では、oRNAは、ポリペプチドまたはペプチドをコードし、翻訳開始配列を含み得る。翻訳開始配列は、開始コドン、非コード開始コドン、Kozak配列またはシャイン・ダルガノ配列を含み得るがこれらに限定されない。翻訳開始配列は、ペイロードまたはカーゴに隣接して（例えば、ペイロードまたはカーゴの一方の側または両方の側に）位置し得る。

【0341】

いくつかの実施形態では、翻訳開始配列は、構造的柔軟性をoRNAに提供する。いくつかの実施形態では、翻訳開始配列は、oRNAの実質的に一本鎖の領域内にある。

10

20

30

40

50

## 【0342】

oRNAには、1つを超える開始コドン、例えば、限定されないが、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または15個を超える開始コドンが含まれ得る。翻訳は、第1の開始コドンで開始し得、または第1の開始コドンの下流で開始し得る。

## 【0343】

いくつかの実施形態では、oRNAは、第1の開始コドン、例えば、AUGではないコドンで開始し得る。環状ポリリボヌクレオチドの翻訳は、代替的翻訳開始配列、例えば、限定されないが、ACG、AGG、AAG、CUG／CTG、GUG／GTG、AUA／ATA、AUU／ATT、UUG／TTGで開始し得る。いくつかの実施形態では、翻訳は、選択的条件、例えば、ストレス誘導条件下で、代替的翻訳開始配列で開始し得る。非限定的な例として、oRNAの翻訳は、代替的翻訳開始配列、例えば、ACGで開始し得る。別の非限定的な例として、oRNA翻訳は、代替的翻訳開始配列、CUG／CTGで開始し得る。さらに別の非限定的な例として、oRNA翻訳は、代替的翻訳開始配列、GTG／GUGで開始し得る。さらに別の非限定的な例として、oRNAは、繰り返しRNA、例えば、CGG、GGGGCC、CAG、CTGの短い伸長部を含む代替的翻訳開始配列等のリピート関連非AUG（RAN）配列で翻訳を開始し得る。

## 【0344】

## IRES 配列

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のoRNAは、真核生物リボソームに係合することが可能な内部リボソーム進入部位（IRES）要素を含む。いくつかの実施形態では、IRES要素は、少なくとも約5ヌクレオチド、少なくとも約8ヌクレオチド、少なくとも約9ヌクレオチド、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40ヌクレオチド、少なくとも約50ヌクレオチド、少なくとも約100ヌクレオチド、少なくとも約200ヌクレオチド、少なくとも約250ヌクレオチド、少なくとも約350ヌクレオチド、または少なくとも約500ヌクレオチドである。1つの実施形態では、IRES要素は、生物、ウイルス、哺乳動物、及びショウジョウバエを含むがこれらに限定されないDNAに由来する。そのようなウイルスDNAは、ピコルナウイルス相補的DNA（cDNA）、脳筋炎ウイルス（EMCV）cDNA及びポリオウイルスcDNAに由来し得るがこれらに限定されない。1つの実施形態では、IRES要素の由来となったショウジョウバエDNAには、Drosophila melanogasterからのアンテナペディア遺伝子が含まれるがこれらに限定されない。

## 【0345】

いくつかの実施形態では、IRES要素は、ウイルスに少なくとも部分的に由来し、例えば、それは、ウイルスIRES要素、例えば、ABPV\_\_IGRpred、AEV、ALPV\_\_IGRpred、BQCV\_\_IGRpred、BVDV1\_\_1-385、BVDV1\_\_29-391、CrPV\_\_5NCR、CrPV\_\_IGR、crTMV\_\_IREScp、crTMV\_\_IRESmp75、crTMV\_\_IRESmp228、crTMV\_\_IREScp、crTMV\_\_IREScp、CSFV、CVB3、DCV\_\_IGR、EMCV-R、EoPV\_\_5NTR、ERAV\_\_245-961、ERBV\_\_162-920、EV71\_\_1-748、FeLV-Notch2、FMDV\_\_type\_\_C、GBV-A、GBV-B、GBV-C、gypsy\_\_env、gypsyD5、gypsyD2、HAV\_\_HM175、HCV\_\_type\_\_1a、HiPV\_\_IGRpred、HIV-1、HoCV1\_\_IGRpred、HRV-2、IAPV\_\_IGRpred、idefix、KBV\_\_IGRpred、LINE-1\_\_ORF1\_\_-101\_\_~\_\_-1、LINE-1\_\_ORF1-302\_\_~\_\_-202、LINE-1\_\_ORF2-138\_\_~\_\_-86、LINE-1\_\_ORF1\_\_-44\_\_~\_\_-1、PSIV\_\_IGR、PV\_\_type1\_\_Mah

oney、PV\_\_type3\_\_Leon、REV-A、RhPV\_\_5NCR、RhPV\_\_IGR、SINV1\_\_IGRpred、SV40\_\_661-830、TMEV、TMV\_\_UI\_\_IRESmp228、TRV\_\_5NTR、TrV\_\_IGR、またはTSV\_\_IGRに由来し得る。いくつかの実施形態では、IRES要素は、細胞IRES、例えば、AML1/RUNX1、Antp-D、Antp-DE、Antp-CDE、Apaf-1、Apaf-1、AQP4、AT1R\_\_var1、AT1R\_\_var2、AT1R\_\_var3、AT1R\_\_var4、BAG1\_\_p36デルタ236 nt、BAG1\_\_p36、BCL2、BiP\_\_-222\_\_-3、c-IAP1\_\_285-1399、c-IAP1\_\_1313-1462、c-jun、c-myc、Cat-1224、CCND1、DAPS、eIF4G、eIF4GI-ext、eIF4GII、eIF4GII-long、ELG1、ELH、FGF1A、FMR1、Gtx-133-141、Gtx-1-166、Gtx-1-120、Gtx-1-196、hairless、HAP4、HIF1a、hSNM1、Hsp101、hsp70、hsp70、Hsp90、IGF2\_\_leader2、Kv1.4\_\_1.2、L-myc、Lamb1\_\_-335\_\_-1、LEF1、MNT\_\_75-267、MNT\_\_36-160、MTG8a、MYB、MYT2\_\_997-1152、n-MYC、NDST1、NDST2、NDST3、NDST4L、NDST4S、NRF\_\_-653\_\_-17、NtHSF1、ODC1、p27kip1、03\_\_128-269、PDGF2/c-sis、Pim-1、PITSLRE\_\_p58、Rbm3、reaper、Scamper、TFIID、TIF4631、Ubx\_\_1-966、Ubx\_\_373-961、UNR、Ure2、UtrA、VEGF-A-133-1、XIAP\_\_5-464、XIAP\_\_305-466、またはYAP1に少なくとも部分的に由来する。

10

20

30

40

50

#### 【0346】

##### 終結要素

いくつかの実施形態では、oRNAには、1つ以上のカーゴまたはペイロード配列（発現配列とも称される）が含まれ、各カーゴまたはペイロード配列は、終結要素を有するまたは有しない場合がある。

#### 【0347】

いくつかの実施形態では、oRNAは、1つ以上のカーゴまたはペイロード配列を含み、配列は、oRNAが連続的に翻訳されるように終結要素を欠く。終結要素の排除により、リボソームが失速または脱落しないので、コードされるペプチドまたはポリペプチドのローリングサークル翻訳または連続的発現がもたらされ得る。そのような実施形態では、ローリングサークル翻訳は、各カーゴまたはペイロード配列を介して連続的発現を発現する。

#### 【0348】

いくつかの実施形態では、oRNAにおける1つ以上のカーゴまたはペイロード配列は、終結要素を含む。

#### 【0349】

いくつかの実施形態では、oRNAにおけるカーゴまたはペイロード配列のすべてが、終結要素を含むわけではない。そのような例では、カーゴまたはペイロードは、リボソームが終結要素に遭遇し、翻訳を終結させる場合、リボソームから離れ得る。いくつかの実施形態では、翻訳は終結されるが、リボソームの少なくとも1つの領域は、oRNAと接触したままである。

#### 【0350】

##### ローリングサークル翻訳

いくつかの実施形態では、oRNAの翻訳が開始されると、oRNAに結合したリボソームは、oRNAの翻訳の少なくとも1つのラウンドを終了させる前にoRNAから離れない。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるoRNAは、ローリングサークル翻訳に適する。いくつかの実施形態では、ローリングサークル翻訳中に、oRNAの翻訳が開始されると、oRNAに結合したリボソームは、oRNAの翻訳の少なくとも2ラウ

ンド、少なくとも3ラウンド、少なくとも4ラウンド、少なくとも5ラウンド、少なくとも6ラウンド、少なくとも7ラウンド、少なくとも8ラウンド、少なくとも9ラウンド、少なくとも10ラウンド、少なくとも11ラウンド、少なくとも12ラウンド、少なくとも13ラウンド、少なくとも14ラウンド、少なくとも15ラウンド、少なくとも20ラウンド、少なくとも30ラウンド、少なくとも40ラウンド、少なくとも50ラウンド、少なくとも60ラウンド、少なくとも70ラウンド、少なくとも80ラウンド、少なくとも90ラウンド、少なくとも100ラウンド、少なくとも150ラウンド、少なくとも200ラウンド、少なくとも250ラウンド、少なくとも500ラウンド、少なくとも1000ラウンド、少なくとも1500ラウンド、少なくとも2000ラウンド、少なくとも5000ラウンド、少なくとも10000ラウンド、少なくとも10の5乗ラウンド、または少なくとも10の6乗ラウンドを終了させる前にoRNAから離れない。

10

#### 【0351】

いくつかの実施形態では、oRNAのローリングサークル翻訳は、oRNAの翻訳の複数のラウンドから翻訳されるポリペプチドの生成をもたらす。いくつかの実施形態では、oRNAは、スタグガー要素を含み、oRNAのローリングサークル翻訳は、oRNAの1ラウンドの翻訳または1ラウンド未満の翻訳から生成されるポリペプチド生成物の生成をもたらす。

#### 【0352】

##### 環状化

1つの実施形態では、線状RNAは、環状化、またはコンカテマー化され得る。いくつかの実施形態では、線状RNAは、製剤化及び／または送達の前に*in vitro*で環状化され得る。いくつかの実施形態では、線状RNAは、細胞内で環状化され得る。

20

#### 【0353】

いくつかの実施形態では、環状化またはコンカテマー化のメカニズムは、少なくとも3つの異なる経路：1) 化学的、2) 酵素的、及び3) リボザイム触媒化を介して生じ得る。新しく形成された5' - / 3' - 結合は、分子内または分子間であり得る。

#### 【0354】

第1の経路では、核酸の5'末端及び3'末端は、互いに近づいた場合、分子の5'末端と3'末端との間に新たな共有結合を形成する化学的反応性基を含有する。5'末端は、NHS-エステル反応性基を含有し得、3'末端は、3'-アミノ末端化ヌクレオチドを含有し得、これにより有機溶媒中で合成mRNA分子の3'末端上の3'-アミノ末端化ヌクレオチドは、5'-NHS-エステル部位上で求核攻撃を受け、新たな5' / 3'-アミド結合を形成することになる。

30

#### 【0355】

第2の経路では、T4 RNAリガーゼは、5'-リン酸化核酸分子を核酸の3'-ヒドロキシル基に酵素的に連結させ、新たなホスホロジエステル結合を形成するために使用され得る。例となる反応では、核酸分子の<sup>g</sup>は、1~10単位のT4 RNAリガーゼ(New England Biolabs, Ipswich, MA)と製造業者のプロトコルに従って37℃で1時間インキュベートされる。ライゲーション反応は、酵素的ライゲーション反応を補助するために並列で5'及び3'領域の両方と塩基対合することが可能な分割オリゴヌクレオチドの存在下で生じ得る。

40

#### 【0356】

第3の経路では、*in vitro*転写中に、得られる核酸分子が、核酸分子の5'末端を核酸分子の3'末端にライゲーションすることが可能な活性リボザイム配列を含有し得るように、cDNA鋳型の5'または3'末端のいずれかは、リガーゼリボザイム配列をコードする。リガーゼリボザイムは、グループIイントロン、グループIIイントロン、肝炎デルタウイルス、ヘアピンリボザイムに由来し得、またはSELEX(指数関数的濃縮によるリガンドの系統的進化)によって選択され得る。リボザイムリガーゼ反応は、0~37℃の温度で1~24時間行われ得る。

#### 【0357】

50

いくつかの実施形態では、 $\circ$ RNAは、線状RNAの環状化を介して作製される。

【0358】

細胞外環状化

いくつかの実施形態では、線状RNAは、 $\circ$ RNAを形成するために化学的方法を使用して環状化、またはコンカテマー化される。いくつかの化学的方法では、核酸（例えば、線状RNA）の5'末端及び3'末端には、互いに近づいた場合、分子の5'末端と3'末端との間に新たな共有結合を形成し得る化学的反応性基が含まれる。5'末端は、NHSEステル反応性基を含有し得、3'末端は、3'-アミノ末端化ヌクレオチドを含有し得、これにより有機溶媒中で線状RNAの3'末端上の3'-アミノ末端化ヌクレオチドは、5'-NHSEステル部位上で求核攻撃を受け、新たな5'／3'-アミド結合を形成することになる。

【0359】

1つの実施形態では、DNAまたはRNAリガーゼは、新たなホスホロジエステル結合を形成する核酸（例えば、線状核酸）の3'-ヒドロキシル基に5'-リン酸化核酸分子（例えば、線状RNA）を酵素的に連結させるために使用され得る。例示的な反応では、線状RNAは、製造業者のプロトコルに従って1～10単位のT4 RNAリガーゼと37℃で1時間インキュベートされる。ライゲーション反応は、酵素的ライゲーション反応を補助するために並列で5'及び3'領域の両方と塩基対合することが可能な線状核酸の存在下で生じ得る。1つの実施形態では、ライゲーションは、スプリントライゲーションであり、その場合、一本鎖RNAのような一本鎖ポリヌクレオチド（スプリント）が、線状RNAの両方の末端とハイブリダイズすることで2つの末端が一本鎖スプリントとのハイブリダイゼーションにより並置され得るように設計され得る。よって、スプリントリガーゼは、線状RNAの並列の2つの末端のライゲーションを触媒し得、 $\circ$ RNAを生成する。

【0360】

1つの実施形態では、DNAまたはRNAリガーゼは、 $\circ$ RNAの合成において使用され得る。非限定的な例として、リガーゼは、circリガーゼまたは環状リガーゼであり得る。

【0361】

1つの実施形態では、線状RNAの5'または3'末端のいずれかは、in vitro転写中に、得られる線状RNAが、線状RNAの5'末端を線状RNAの3'末端にライゲーションすることが可能な活性リボザイム配列を含むようにリガーゼリボザイム配列をコードし得る。リガーゼリボザイムは、グループEイントロン、肝炎デルタウイルス、ヘアピンリボザイムに由来し得、またはSELEX（指数関数的濃縮によるリガンドの系統的進化）によって選択され得る。

【0362】

1つの実施形態では、線状RNAは、少なくとも1つの非核酸部位を使用することによって環状化またはコンカテマー化され得る。1つの態様では、少なくとも1つの非核酸部位は、線状RNAを環状化または連結するために、線状RNAの5'末端の近く及び／または3'末端の近くの領域または特徴と反応し得る。別の態様では、少なくとも1つの非核酸部位は、線状RNAの5'末端及び／または3'末端にまたはその近くに配置または連結され得る。企図される非核酸部位は、同種または異種であり得る。非限定的な例として、非核酸部位は、結合、例えば、疎水性連結、イオン性連結、生分解性連結及び／または切断可能な連結であり得る。別の非限定的な例として、非核酸部位は、ライゲーション部位である。さらに別の非限定的な例として、非核酸部位は、オリゴヌクレオチドまたはペプチド部位、例えば、本明細書に記載されるアプタマーまたは非核酸リンカーであり得る。

【0363】

1つの実施形態では、線状RNAは、線状RNAの5'及び3'末端で、その近くでまたはそれに連結された原子、分子表面間の引力を引き起こす非核酸部位により環状化またはコンカテマー化され得る。非限定的な例として、1つ以上の線状RNAは、分子間力また

は分子内力によって環状化またはコンカテマー化され得る。分子間力の非限定的な例には、双極子-双極子力、双極子-誘導双極子力、誘導双極子-誘導双極子力、ファンデルワールス力、及びロンドン分散力が含まれる。分子内力の非限定的な例には、共有結合、金属結合、イオン結合、共鳴結合、アグノスティック結合、双極性結合、コンジュゲーション、ハイパコンジュゲーション及び反結合が含まれる。

#### 【0364】

1つの実施形態では、線状RNAは、5'末端の近く及び3'末端の近くにリボザイムRNA配列を含み得る。リボザイムRNA配列は、配列がリボザイムの残部に曝露された場合、ペプチドに共有結合的に連結し得る。1つの態様では、5'末端及び3'末端の近くでリボザイムRNA配列に共有結合的に連結されたペプチドは、互いに会合して、線状RNAが環状化またはコンカテマー化することを引き起こし得る。別の態様では、5'末端及び3'末端の近くでリボザイムRNA配列に共有結合的に連結されたペプチドは、当該技術分野で知られている様々な方法、例えば、限定されないが、タンパク質ライゲーションを使用するライゲーションに供された後に、線状RNAが環状化またはコンカテマー化することを引き起こし得る。

#### 【0365】

いくつかの実施形態では、線状RNAには、例えば、5'トリホスフェートをRNA 5'ピロホスホヒドロラーゼ (RppH) またはATPジホスホヒドロラーゼ (アピラーゼ) と接触させることによって、5'モノホスフェートに変換された核酸の5'トリホスフェートが含まれ得る。代替的には、線状RNAの5'トリホスフェートを5'モノホスフェートに変換することは、(a) 線状RNAの5'ヌクレオチドをホスファターゼ (例えば、南極ホスファターゼ、エビアルカリホスファターゼ、または子牛腸ホスファターゼ) と接触させて3つすべてのホスフェートを除去すること；及び(b) 工程(a)後の5'ヌクレオチドを、単一のホスフェートを付加するキナーゼ (例えば、ポリヌクレオチドキナーゼ) と接触させることを含む2工程反応において生じ得る。

#### 【0366】

いくつかの実施形態では、RNAは、WO2017222911及びWO2016197121 (これらの各々の内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる) に記載の方法を使用して環状化され得る。

#### 【0367】

いくつかの実施形態では、RNAは、例えば、非哺乳動物外因性イントロンのバックスプライシングまたは線状RNAの5'及び3'末端のスプリントライゲーションライゲーションによって環状化され得る。1つの実施形態では、環状RNAは、環状とすべき標的RNAをコードする組換え核酸から生成される。非限定的な例として、方法は、a) 環状とされる標的RNAをコードする組換え核酸を生成することであって、組換え核酸は、5'から3'の順序で、i) 3'スプライス部位を含む外因性イントロンの3'部分、ii) 標的RNAをコードする核酸配列、及びiii) 5'スプライス部位を含む外因性イントロンの5'部分を含む、生成すること；b) 転写を実施することであって、これによりRNAが組換え核酸から生成される、実施すること；及びc) RNAのスプライシングを実施することであって、これによりRNAが環状化してoRNAを生成する、実施することを含む。

#### 【0368】

理論に縛られることを望むものではないが、外因性イントロンを用いて生成された環状RNAは、「非自己」として免疫系によって認識され、自然免疫反応を誘発させる。一方、内因性イントロンを用いて生成された環状RNAは、「自己」として免疫系によって認識され、外来RNAを含むエクソンを保有する場合であっても、通常は自然免疫反応を引き起こさない。

#### 【0369】

したがって、環状RNAは、所望により免疫学的自己/非自己の区別をコントロールするために、内因性または外因性イントロンのいずれかを用いて生成され得る。多様な生物

10

20

30

40

50

及びウイルスからの多数のイントロン配列が知られており、それには、タンパク質、リボソームRNA (rRNA)、またはトランスファーRNA (tRNA) をコードする遺伝子に由来する配列が含まれる。

#### 【0370】

環状RNAは、多数の方法で線状RNAから生成され得る。いくつかの実施形態では、環状RNAは、上流3'スプライス部位(スプライスアクセプター)への下流5'スプライス部位(スプライスドナー)のバックスプライシングによって線状RNAから生成される。環状RNAは、任意の非哺乳動物スプライシング方法によってこの手法で生成され得る。例えば、自己スプライシンググループIイントロン、自己スプライシンググループIIイントロン、スプライセオソームイントロン、及びtRNAイントロンを含む様々なタイプのイントロンを含有する線状RNAが環状化され得る。特に、グループI及びグループIIイントロンは、それらの自己触媒的リボザイム活性により自己スプライシングを受けるそれらの能力により、*in vitro*及び*in vivo*で環状RNAの生成のために容易に使用され得るという利点を有する。

10

#### 【0371】

いくつかの実施形態では、環状RNAは、RNAの5'及び3'末端の化学的または酵素的ライゲーションによって線状RNAから*in vitro*で生成され得る。化学的ライゲーションは、例えば、ホスホジエステル結合形成を可能とするためにヌクレオチドホスホモノエステル基の活性化のためのシアノゲンプロミド(BrCN)またはエチル-3-(3'-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDC)を使用して実施され得る。例えば、Sokolova (1988) F E B S L e t t 232:153-155; Dolinnaya et al. (1991) N u c l e i c A c i d s R e s . , 19:3067-3072; Fedorova (1996) N u c l e o s i d e s N u c l e o t i d e s N u c l e i c A c i d s 15:1137-1147 (参照により本明細書に組み込まれる)を参照されたい。代替的には、酵素的ライゲーションは、RNAを環状化するために使用され得る。使用され得る例示的なリガーゼには、T4 DNAリガーゼ(T4 Dnl)、T4 RNAリガーゼ1(T4 Rnl 1)、及びT4 RNAリガーゼ2(T4 Rnl 2)が含まれる。

20

#### 【0372】

いくつかの実施形態では、線状RNAの2つの末端とハイブリダイズするオリゴヌクレオチドスプリントを使用するスプリントライゲーションは、線状RNAの末端と一緒にライゲーションさせるために使用され得る。DNAまたはRNAのいずれかであり得るスプリントのハイブリダイゼーションは、ライゲーションのためにRNA末端の5'-ホスフェート及び3'-OHを配向させる。その後のライゲーションは、上述したように、化学的または酵素的技術のいずれかを使用して実施され得る。酵素的ライゲーションは、例えば、T4 DNAリガーゼ(DNAスプリントが必要とされる)、T4 RNAリガーゼ1(RNAスプリントが必要とされる)またはT4 RNAリガーゼ2(DNAまたはRNAスプリント)を用いて実施され得る。例えば、BrCNまたはEDCとの化学的ライゲーションは、いくつかの場合では、ハイブリダイズしたスプリント-RNA複合体の構造が酵素活性と干渉する場合、酵素的ライゲーションよりも効率的である。

30

40

#### 【0373】

いくつかの実施形態では、oRNAは、ポリペプチドをコードするRNA配列に機能可能に連結された内部リボソーム進入部位(IRES)をさらに含み得る。IRESの包含は、環状RNAからの1つ以上のオープンリーディングフレームの翻訳を可能とする。IRES要素は、真核生物リボソーム翻訳開始複合体を引き寄せ、翻訳開始を促進する。例えば、Kaufman et al. , N u c . A c i d s R e s . (1991) 19:4485-4490; Gurtu et al. , B i o c h e m . B i o p h y s . R e s . C o m m . (1996) 229:295-298; Rees et al. , B i o T e c h n i q u e s (1996) 20:102-110; Kobayashi et al. , B i o T e c h n i q u e s (1996) 21:399-402; 及びM

50

osser et al., BioTechniques 1997 22 150-161)を参照されたい。

【0374】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される環状化方法の環状化効率は、少なくとも約10%、少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、または100%である。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される環状化方法の環状化効率は、少なくとも約40%である。

【0375】

スプライシング要素

いくつかの実施形態では、oRNAには、少なくとも1つのスプライシング要素が含まれる。スプライシング要素は、oRNAのスプライシングを媒介し得る完全なスプライシング要素であり得、またはスプライシング要素は、完了したスプライシング事象からの残留スプライシング要素であり得る。例えば、いくつかの場合では、線状RNAのスプライシング要素は、線状RNAの環状化をもたらすスプライシング事象を媒介し得、それにより得られるoRNAは、そのようなスプライシング媒介環状化事象からの残留スプライシング要素を含む。いくつかの場合では、残留スプライシング要素は、任意のスプライシングを媒介することができない。他の場合では、残留スプライシング要素は、所定の状況下でスプライシングを依然として媒介し得る。いくつかの実施形態では、スプライシング要素は、少なくとも1つの発現配列に隣接する。いくつかの実施形態では、oRNAには、各発現配列に隣接するスプライシング要素が含まれる。いくつかの実施形態では、スプライシング要素は、各発現配列の一方または両方の側にあり、発現生成物、例えば、ペプチド（複数可）及びまたはポリペプチド（複数可）の分離をもたらす。

【0376】

いくつかの実施形態では、oRNAには、複製された場合、スプライシングされた末端と一緒に接続される内部スプライシング要素が含まれる。いくつかの例は、スプライス部位配列及び短い逆リピート（30~40nt）、例えば、AluSq2、AluJr、及びAluSz、隣接イントロンにおける逆配列、隣接イントロンにおけるAlu要素、ならびに隣接エクソンを有するバックスプライス部位の200bp前（上流）または後（下流）の配列等のバックスプライス事象の近くの（sup table 4濃縮モチーフ）シース配列要素に見られるモチーフを有する小型イントロン（<100nt）が含まれ得る。いくつかの実施形態では、oRNAには、内部スプライシング要素として本明細書の他の箇所に記載の少なくとも1つの繰り返しヌクレオチド配列が含まれる。そのような実施形態では、繰り返しヌクレオチド配列には、イントロンのAluファミリーからの繰り返し配列が含まれ得る。例えば、米国特許番号11,058,706を参照されたい。

【0377】

いくつかの実施形態では、oRNAには、oRNAの頭尾ジャンクションに隣接する標準的スプライス部位が含まれ得る。

【0378】

いくつかの実施形態では、oRNAには、2つの3ヌクレオチドバルジが隣接する4塩基対ステムを含むバルジーヘリックス-バルジモチーフが含まれ得る。バルジ領域における部位で切断が生じ、末端5'-ヒドロキシル基及び2'、3'-環状ホスフェートを有する特徴的断片を生成する。環状化は、3'、5'-ホスホジエステル架橋を形成する同じ分子の2'、3'-環状ホスフェートへの5'-OH基の求核攻撃によって進行する。

【0379】

いくつかの実施形態では、oRNAには、自己ライゲーションを媒介する配列が含まれ得る。自己ライゲーションを媒介し得る配列の非限定的な例には、自己環状化イントロン、例えば、5'及び3'スライスジャンクション、または自己環状化触媒イントロン、例えば、グループI、グループIIまたはグループIIIイントロンが含まれる。グループI

10

20

30

40

50



のイントロン自己スプライシング配列の非限定的な例には、T4バクテリオファージ遺伝子tdに由来する自己スプライシング順列変化イントロン-エクソン配列、及びテトラヒメナの介在配列(IVS) rRNAが含まれ得る。

#### 【0380】

##### 他の環状化方法

いくつかの実施形態では、線状RNAには、個々のイントロン内または隣接イントロンにわたって繰り返しまたは非繰り返し核酸配列のいずれかを含む相補的配列が含まれ得る。いくつかの実施形態では、oRNAには、繰り返し核酸配列が含まれる。いくつかの実施形態では、繰り返しヌクレオチド配列には、ポリCAまたはポリUG配列が含まれる。いくつかの実施形態では、oRNAには、oRNAの別のセグメントにおける相補的繰り返し核酸配列にハイブリダイズする少なくとも1つの繰り返し核酸配列が含まれ、ハイブリダイズされたセグメントは、内部二重鎖を形成する。いくつかの実施形態では、単一のoRNAを生成するようにハイブリダイズする2つの別々のoRNAからの繰り返し核酸配列及び相補的繰り返し核酸配列、ハイブリダイズされたセグメントは、内部二重鎖を形成する。いくつかの実施形態では、相補的配列は、線状RNAの5'及び3'末端で見られる。いくつかの実施形態では、相補的配列には、約3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、またはそれを超える対合ヌクレオチドが含まれる。

#### 【0381】

いくつかの実施形態では、環状化の化学的方法が、oRNAを生成するために使用され得る。そのような方法には、クリックケミストリー（例えば、アルキン及びアジドベースの方法、またはクリック可能な塩基）、オレフィンメタセシス、ホスホルアミデートライゲーション、ヘミアミナール-イミン架橋、塩基修飾、及びそれらの任意の組み合わせが含まれ得るがこれらに限定されない。

#### 【0382】

いくつかの実施形態では、環状化の酵素的な方法が、oRNAを生成するために使用され得る。いくつかの実施形態では、ライゲーション酵素、例えば、DNAまたはRNAリガーゼが、oRNAもしくは相補体の鋳型、oRNAの相補鎖、またはoRNAを生成するために使用され得る。

#### 【0383】

##### 低分子干渉RNA (siRNA)

いくつかの実施形態では、ペイロード領域は、遺伝子の発現を低減または阻害するために使用され得るRNA干渉(RNAi)配列であり、またはそれをコードし得る。RNAi（転写後遺伝子サイレンシング(PTGS)、キューエリング、または共抑制としても知られている）は、RNA分子が、配列特異的様式で、典型的には特定のmRNA分子の破壊を引き起こすことによって、遺伝子発現を低減または阻害する転写後遺伝子サイレンシングプロセスである。RNAiの活性成分は、典型的には、15〜30ヌクレオチド（例えば、19〜25、19〜24または19〜21ヌクレオチド）及び2ヌクレオチドの3'オーバーハングを含有し、かつ標的遺伝子の核酸配列とマッチする低分子干渉RNA (siRNA)と呼ばれる短い／小さな二本鎖RNA(dsRNA)である。これらの短いRNA種は、より大きなdsRNAのDicer媒介切断によってin vivoで天然に生成され得、それらは、哺乳動物細胞において機能的である。

#### 【0384】

マイクロRNA(miRNA)と称される天然に発現する小さなRNA分子は、mRNAの発現を制御することによって遺伝子サイレンシングを誘発させる。miRNA含有RNA誘導サイレンシング複合体(RISC)は、シード領域と呼ばれるmiRNAの5'領域におけるヌクレオチド2〜7との完全な配列相補性、及びその3'領域と他の塩基対を呈するmRNAを標的とする。遺伝子発現のmiRNA媒介下方制御は、標的mRNA

Aの切断、標的mRNAの翻訳阻害、またはmRNA減衰阻害によって引き起こされ得る。miRNA標的化配列は通常、標的mRNAの3'-UTRに位置する。単一のmiRNAは、様々な遺伝子からの100種を超える転写産物を標的とし得、1つのmRNAは、異なるmiRNAによって標的とされ得る。

#### 【0385】

特定のmRNAを標的とするsiRNA二本鎖またはdsRNAが設計され、in vitroで合成され、RNAiプロセスを活性化するために細胞に導入され得る。21ヌクレオチドsiRNA二本鎖（低分子干渉RNAと称される）は、哺乳動物細胞において免疫反応を誘導することなく強力かつ特異的な遺伝子ノックダウンを達成することが可能であったことが先に示されている。今では、siRNAによる転写後遺伝子サイレンシングは、哺乳動物細胞における遺伝子分析のための強力なツールとして早くも台頭しており、新規治療剤を生成する潜在性を有する。

#### 【0386】

in vitroで合成されたsiRNA配列は、RNAiを活性化するために細胞に導入され得る。外因性siRNA二本鎖は、細胞に導入された場合、内因性dsRNAと同様に、siRNA二本鎖の2つの鎖のうち的一方（すなわち、アンチセンス鎖）と相補的なRNA配列と相互作用する多単位複合体であるRNA誘導サイレンシング複合体（RISC）を形成するように構築され得る。プロセス中に、siRNAのセンス鎖（またはパッセンジャー鎖）は、複合体から失われるのに対し、siRNAのアンチセンス鎖（またはガイド鎖）は、その相補的RNAとマッチされる。特に、siRNAを含有するRISC複合体の標的は、完全な配列相補性を提示するmRNAである。次いで、siRNA媒介遺伝子サイレンシングが、標的を切断、放出及び分解することによって生じる。

#### 【0387】

標的mRNAと相同なセンス鎖及び標的mRNAと相補的なアンチセンス鎖を含むsiRNA二本鎖は、一本鎖（ss）-siRNA（例えば、アンチセンス鎖RNAまたはアンチセンスオリゴヌクレオチド）の使用と比較して、標的RNA破壊のための効率の観点からはるかに多くの利点を提供する。多くの場合、対応する二本鎖の有効な遺伝子サイレンシング効力を達成するために、より高いss-siRNAの濃度を必要とする。

#### 【0388】

##### siRNA二本鎖の設計及び配列

siRNAを設計するためのいくつかのガイドラインが当該技術分野において提案されている。これらのガイドラインは通常、サイレンシングされる遺伝子における領域を標的とする19ヌクレオチドの二本鎖領域、対称的な2~3ヌクレオチドの3'オーバーハング、5'-ホスフェート及び3'-ヒドロキシル基を生成することを推奨している。siRNA配列の好ましさを支配し得る他の規則には、(i) アンチセンス鎖の5'末端におけるA/U；(ii) センス鎖の5'末端におけるG/C；(iii) アンチセンス鎖の5'末端の1/3における少なくとも5つのA/U残基；及び(iv) 長さが9ヌクレオチドよりも多い任意のGC伸長部の非存在が含まれるがこれらに限定されない。そのような考慮事項に従って、標的遺伝子の特定の配列と共に、哺乳動物標的遺伝子発現を抑制するために必須の非常に有効なsiRNAコンストラクトが容易に設計され得る。

#### 【0389】

いくつかの実施形態では、特定の遺伝子を標的とするsiRNAコンストラクト（例えば、siRNA二本鎖またはコードされたdsRNA）が設計される。そのようなsiRNAコンストラクトは、遺伝子発現及びタンパク質生成を特異的に抑制し得る。いくつかの態様では、siRNAコンストラクトは、細胞における遺伝子バリエーション、すなわち、患者において同定された、または様々な疾患及び／または障害の原因である変異した転写産物を選択的に「ノックアウト」するために設計及び使用される。いくつかの態様では、siRNAコンストラクトは、細胞における遺伝子のバリエーションを選択的に「ノックダウン」するために設計及び使用される。他の態様では、siRNAコンストラクトは、遺伝子の野生型及び変異バージョンの両方を阻害または抑制することができる。

## 【0390】

いくつかの実施形態では、s i R N A 配列は、センス鎖及び相補的アンチセンス鎖を含み、両方の鎖は、互いにハイブリダイズされて二本鎖構造を形成する。アンチセンス鎖は、標的特異的R N A iを誘導するためにm R N A 配列に対して十分な相補性を有し、すなわち、s i R N A 配列は、R N A i機構またはプロセスによって標的m R N Aの破壊を誘発させるために十分な配列を有する。

## 【0391】

いくつかの実施形態では、s i R N A 配列は、センス鎖及び相補的アンチセンス鎖を含み、両方の鎖が二本鎖構造を形成するために互いにハイブリダイズされ、m R N A に対するハイブリダイゼーションの開始部位は、m R N A 配列上のヌクレオチド100～10,000の間である。非限定的な例として、開始部位は、m R N A 配列上のヌクレオチド100～150、150～200、200～250、250～300、300～350、350～400、400～450、450～500、500～550、550～600、600～650、650～700、700～750、750～800、800～850、850～900、900～950、950～1000、1000～1050、1050～1100、1100～1150、1150～1200、1200～1250、1250～1300、1300～1350、1350～1400、1400～1450、1450～1500、1500～1550、1550～1600、1600～1650、1650～1700、1700～1750、1750～1800、1800～1850、1850～1900、1900～1950、1950～2000、2000～2050、2050～2100、2100～2150、2150～2200、2200～2250、2250～2300、2300～2350、2350～2400、2400～2450、2450～2500、2500～2550、2550～2600、2600～2650、2650～2700、2700～2750、2750～2800、2800～2850、2850～2900、2900～2950、2950～3000、3000～3050、3050～3100、3100～3150、3150～3200、3200～3250、3250～3300、3300～3350、3350～3400、3400～3450、3450～3500、3500～3550、3550～3600、3600～3650、3650～3700、3700～3750、3750～3800、3800～3850、3850～3900、3900～3950、3950～4000、4000～4050、4050～4100、4100～4150、4150～4200、4200～4250、4250～4300、4300～4350、4350～4400、4400～4450、4450～4500、4500～4550、4550～4600、4600～4650、4650～4700、4700～4750、4750～4800、4800～4850、4850～4900、4900～4950、4950～5000、5000～5050、5050～5100、5100～5150、5150～5200、5200～5250、5250～5300、5300～5350、5350～5400、5400～5450、5450～5500、5500～5550、5550～5600、5600～5650、5650～5700、5700～5750、5750～5800、5800～5850、5850～5900、5900～5950、5950～6000、6000～6050、6050～6100、6100～6150、6150～6200、6200～6250、6250～6300、6300～6350、6350～6400、6400～6450、6450～6500、6500～6550、6550～6600、6600～6650、6650～6700、6700～6750、6750～6800、6800～6850、6850～6900、6900～6950、6950～7000、7000～7050、7050～7100、7100～7150、7150～7200、7200～7250、7250～7300、7300～7350、7350～7400、7400～7450、7450～7500、7500～7550、7550～7600、7600～7650、7650～7700、7700～7750、7750～7800、7800～7850、7850～7900、7900～7950、7950～8000、8000～8050、8050～8100、

10

20

30

40

50

00、8100～8150、8150～8200、8200～8250、8250～8300、8300～8350、8350～8400、8400～8450、8450～8500、8500～8550、8550～8600、8600～8650、8650～8700、8700～8750、8750～8800、8800～8850、8850～8900、8900～8950、8950～9000、9000～9050、9050～9100、9100～9150、9150～9200、9200～9250、9250～9300、9300～9350、9350～9400、9400～9450、9450～9500、9500～9550、9550～9600、9600～9650、9650～9700、9700～9750、9750～9800、9800～9850、9850～9900、9900～9950、9950～10000であり得る。

10

#### 【0392】

いくつかの実施形態では、アンチセンス鎖及び標的mRNA配列は、100%相補的である。アンチセンス鎖は、mRNA配列の標的の任意の部分に相補的であり得る。

#### 【0393】

他の実施形態では、アンチセンス鎖及び標的mRNA配列は、少なくとも1つのミスマッチを含む。非限定的な例として、アンチセンス鎖及び標的mRNA配列は、少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%または少なくとも20～30%、20～40%、20～50%、20～60%、20～70%、20～80%、20～90%、20～95%、20～99%、30～40%、30～50%、30～60%、30～70%、30～80%、30～90%、30～95%、30～99%、40～50%、40～60%、40～70%、40～80%、40～90%、40～95%、40～99%、50～60%、50～70%、50～80%、50～90%、50～95%、50～99%、60～70%、60～80%、60～90%、60～95%、60～99%、70～80%、70～90%、70～95%、70～99%、80～90%、80～95%、80～99%、90～95%、90～99%または95～99%を有する。

20

#### 【0394】

いくつかの実施形態では、siRNA配列は、約10～50またはそれを超えるヌクレオチドの長さを有し、すなわち、各鎖は、10～50ヌクレオチド（またはヌクレオチドアナログ）を含む。好ましくは、siRNA配列は、各鎖において約15～30、例えば、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、または30ヌクレオチドの長さを有し、鎖の一方は、標的領域と十分に相補的である。いくつかの実施形態では、siRNA配列は、約19～25、19～24または19～21ヌクレオチドの長さを有する。

30

#### 【0395】

いくつかの実施形態では、siRNA配列は、約19ヌクレオチド～約25ヌクレオチド、及び3'末端で2つのオーバーハングヌクレオチドを含む合成RNA二本鎖であり得る。いくつかの態様では、siRNAコンストラクトは、未修飾RNA分子であり得る。他の態様では、siRNAコンストラクトは、少なくとも1つの修飾ヌクレオチド、例えば、塩基、糖または骨格修飾を含有し得る。

40

#### 【0396】

いくつかの実施形態では、siRNA配列は、細胞への送達のためのプラスミドベクター、ウイルスベクターまたは他の核酸発現ベクターにおいてコードされ得る。DNA発現プラスミドは、細胞においてsiRNA二本鎖またはdsRNAを安定的に発現させ、標的遺伝子発現の長期阻害を達成するために使用され得る。1つの態様では、siRNA二本鎖のセンス及びアンチセンス鎖は、典型的には、ショートヘアピンRNA（shRNA）と称されるステムループ構造の発現をもたらす短いスパーサー配列によって連結される。ヘアピンは、Dicerによって認識及び切断され、よって、成熟siRNAコンストラクトを生成する。

50

## 【0397】

いくつかの実施形態では、*siRNA*二本鎖のセンス及びアンチセンス鎖は、短いスーパーセー配列によって連結され得、これは追加の隣接配列に任意に連結され得、一次マイクロRNA (*pri-miRNA*) と称される隣接アーム-ステム-ループ構造の発現をもたらす。*pri-miRNA*は、*Drosha*及び*Dicer*によって認識及び切断され得、よって、成熟*siRNA*コンストラクトを生成する。

## 【0398】

いくつかの実施形態では、*siRNA*二本鎖またはコードされる*dsRNA*は、標的*mRNA*を抑制（または分解）する。したがって、*siRNA*二本鎖またはコードされる*dsRNA*は、細胞における遺伝子発現を実質的に阻害するために使用され得る。いくつかの態様では、遺伝子発現の阻害は、少なくとも約20%、好ましくは少なくとも約30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%及び100%、または少なくとも20~30%、20~40%、20~50%、20~60%、20~70%、20~80%、20~90%、20~95%、20~100%、30~40%、30~50%、30~60%、30~70%、30~80%、30~90%、30~95%、30~100%、40~50%、40~60%、40~70%、40~80%、40~90%、40~95%、40~100%、50~60%、50~70%、50~80%、50~90%、50~95%、50~100%、60~70%、60~80%、60~90%、60~95%、60~100%、70~80%、70~90%、70~95%、70~100%、80~90%、80~95%、80~100%、90~95%、90~100%または95~100%の阻害を指す。したがって、標的とされる遺伝子のタンパク質生成物は、少なくとも約20%、好ましくは少なくとも約30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%及び100%、または少なくとも20~30%、20~40%、20~50%、20~60%、20~70%、20~80%、20~90%、20~95%、20~100%、30~40%、30~50%、30~60%、30~70%、30~80%、30~90%、30~95%、30~100%、40~50%、40~60%、40~70%、40~80%、40~90%、40~95%、40~100%、50~60%、50~70%、50~80%、50~90%、50~95%、50~100%、60~70%、60~80%、60~90%、60~95%、60~100%、70~80%、70~90%、70~95%、70~100%、80~90%、80~95%、80~100%、90~95%、90~100%または95~100%阻害され得る。

## 【0399】

いくつかの実施形態では、*siRNA*コンストラクトは、ガイド鎖に位置する標的のための*miRNA*シードマッチを含む。別の実施形態では、*siRNA*コンストラクトは、パッセンジャー鎖に位置する標的のための*miRNA*シードマッチを含む。さらに別の実施形態では、遺伝子を標的とする*siRNA*二本鎖またはコードされる*dsRNA*は、ガイドまたはパッセンジャー鎖に位置する標的のためのシードマッチを含まない。

## 【0400】

いくつかの実施形態では、遺伝子を標的とする*siRNA*二本鎖またはコードされる*dsRNA*は、ガイド鎖のための有意な全長オフターゲットをほとんど有しない場合がある。別の実施形態では、遺伝子を標的とする*siRNA*二本鎖またはコードされる*dsRNA*は、パッセンジャー鎖のための有意な全長オフターゲット効果をほとんど有しない場合がある。遺伝子を標的とする*siRNA*二本鎖またはコードされる*dsRNA*は、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%未満、1~5%、2~6%、3~7%、4~8%、5~9%、5~10%、6~10%、5~15%、5~20%、5~25%、5~30%、10~20%、10~30%、10~40%、10~50%、15~30%、15~40%、15~45%、20~40%、20~50%、25~50%、30~40%、30~50%、35~50%、40~50%、45~

50%のパスセンジャー鎖のための全長オフターゲット効果を有し得る。さらに別の実施形態では、遺伝子を標的とする*s i R N A*二本鎖またはコードされる*d s R N A*は、ガイド鎖またはパスセンジャー鎖のための有意な全長オフターゲットをほとんど有しない場合がある。遺伝子を標的とする*s i R N A*二本鎖またはコードされる*d s R N A*は、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%未満、1~5%、2~6%、3~7%、4~8%、5~9%、5~10%、6~10%、5~15%、5~20%、5~25%、5~30%、10~20%、10~30%、10~40%、10~50%、15~30%、15~40%、15~45%、20~40%、20~50%、25~50%、30~40%、30~50%、35~50%、40~50%、45~50%のガイドまたはパスセンジャー鎖のための全長オフターゲット効果を有し得る。

10

#### 【0401】

いくつかの実施形態では、遺伝子を標的とする*s i R N A*二本鎖またはコードされる*d s R N A*は、*i n v i t r o*で高い活性を有し得る。別の実施形態では、*s i R N A*コンストラクトは、*i n v i t r o*で低い活性を有し得る。さらに別の実施形態では、遺伝子を標的とする*s i R N A*二本鎖または*d s R N A*は、*i n v i t r o*で高いガイド鎖活性及び低いパスセンジャー鎖活性を有し得る。

#### 【0402】

いくつかの実施形態では、*s i R N A*コンストラクトは、*i n v i t r o*で高いガイド鎖活性及び低いパスセンジャー鎖活性を有する。ガイド鎖による標的ノックダウン(KD)は、少なくとも40%、50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、99.5%または100%であり得る。ガイド鎖による標的ノックダウンは、40~50%、45~50%、50~55%、50~60%、60~65%、60~70%、60~75%、60~80%、60~85%、60~90%、60~95%、60~99%、60~99.5%、60~100%、65~70%、65~75%、65~80%、65~85%、65~90%、65~95%、65~99%、65~99.5%、65~100%、70~75%、70~80%、70~85%、70~90%、70~95%、70~99%、70~99.5%、70~100%、75~80%、75~85%、75~90%、75~95%、75~99%、75~99.5%、75~100%、80~85%、80~90%、80~95%、80~99%、80~99.5%、80~100%、85~90%、85~95%、85~99%、85~99.5%、85~100%、90~95%、90~99%、90~99.5%、90~100%、95~99%、95~99.5%、95~100%、99~99.5%、99~100%または99.5~100%であり得る。非限定的な例として、ガイド鎖による標的ノックダウン(KD)は、70%を超える。非限定的な例として、ガイド鎖による標的ノックダウン(KD)は、60%を超える。

20

30

#### 【0403】

いくつかの実施形態では、発現するガイド対パスセンジャー(G:P)(アンチセンス対センスとも称される)鎖比は、*i n v i t r o*または*i n v i v o*で1:10、1:9、1:8、1:7、1:6、1:5、1:4、1:3、1:2、1;1、2:10、2:9、2:8、2:7、2:6、2:5、2:4、2:3、2:2、2:1、3:10、3:9、3:8、3:7、3:6、3:5、3:4、3:3、3:2、3:1、4:10、4:9、4:8、4:7、4:6、4:5、4:4、4:3、4:2、4:1、5:10、5:9、5:8、5:7、5:6、5:5、5:4、5:3、5:2、5:1、6:10、6:9、6:8、6:7、6:6、6:5、6:4、6:3、6:2、6:1、7:10、7:9、7:8、7:7、7:6、7:5、7:4、7:3、7:2、7:1、8:10、8:9、8:8、8:7、8:6、8:5、8:4、8:3、8:2、8:1、9:10、9:9、9:8、9:7、9:6、9:5、9:4、9:3、9:2、9:1、10:10、10:9、10:8、10:7、10:6、10:5、10:4、10:3、10:2、10:1、1:99、5:95、10:90、15:85、20:8

40

50

0、25：75、30：70、35：65、40：60、45：55、50：50、55：45、60：40、65：35、70：30、75：25、80：20、85：15、90：10、95：5、または99：1であり得る。ガイド対パッセンジャー比は、primaryマイクロRNAの細胞内プロセシングの後のガイド鎖対パッセンジャー鎖の比を指す。例えば、80：20のガイド対パッセンジャー比は、前駆体からプロセシングされた2個のパッセンジャー鎖毎に8個のガイド鎖を有するであろう。非限定的な例として、ガイド対パッセンジャー鎖比は、*in vitro*で8：2である。非限定的な例として、ガイド対パッセンジャー鎖比は、*in vivo*で8：2である。非限定的な例として、ガイド対パッセンジャー鎖比は、*in vitro*で9：1である。非限定的な例として、ガイド対パッセンジャー鎖比は、*in vivo*で9：1である。

10

#### 【0404】

いくつかの実施形態では、発現するガイド対パッセンジャー（G：P）（アンチセンス対センスとも称される）鎖比は、1を超える。いくつかの実施形態では、発現するガイド対パッセンジャー（G：P）（アンチセンス対センスとも称される）鎖比は、2を超える。いくつかの実施形態では、発現するガイド対パッセンジャー（G：P）（アンチセンス対センスとも称される）鎖比は、5を超える。いくつかの実施形態では、発現するガイド対パッセンジャー（G：P）（アンチセンス対センスとも称される）鎖比は、10を超える。いくつかの実施形態では、発現するガイド対パッセンジャー（G：P）（アンチセンス対センスとも称される）鎖比は、20を超える。いくつかの実施形態では、発現するガイド対パッセンジャー（G：P）（アンチセンス対センスとも称される）鎖比は、50を超える。いくつかの実施形態では、発現するガイド対パッセンジャー（G：P）（アンチセンス対センスとも称される）鎖比は、少なくとも3：1である。いくつかの実施形態では、発現するガイド対パッセンジャー（G：P）（アンチセンス対センスとも称される）鎖比は、少なくとも5：1である。いくつかの実施形態では、発現するガイド対パッセンジャー（G：P）（アンチセンス対センスとも称される）鎖比は、少なくとも10：1である。いくつかの実施形態では、発現するガイド対パッセンジャー（G：P）（アンチセンス対センスとも称される）鎖比は、少なくとも20：1である。いくつかの実施形態では、発現するガイド対パッセンジャー（G：P）（アンチセンス対センスとも称される）鎖比は、少なくとも50：1である。

20

#### 【0405】

いくつかの実施形態では、発現するパッセンジャー対ガイド（P：G）（センス対アンチセンスとも称される）鎖比は、*in vitro*または*in vivo*で1：10、1：9、1：8、1：7、1：6、1：5、1：4、1：3、1：2、1；1、2：10、2：9、2：8、2：7、2：6、2：5、2：4、2：3、2：2、2：1、3：10、3：9、3：8、3：7、3：6、3：5、3：4、3：3、3：2、3：1、4：10、4：9、4：8、4：7、4：6、4：5、4：4、4：3、4：2、4：1、5：10、5：9、5：8、5：7、5：6、5：5、5：4、5：3、5：2、5：1、6：10、6：9、6：8、6：7、6：6、6：5、6：4、6：3、6：2、6：1、7：10、7：9、7：8、7：7、7：6、7：5、7：4、7：3、7：2、7：1、8：10、8：9、8：8、8：7、8：6、8：5、8：4、8：3、8：2、8：1、9：10、9：9、9：8、9：7、9：6、9：5、9：4、9：3、9：2、9：1、10：10、10：9、10：8、10：7、10：6、10：5、10：4、10：3、10：2、10：1、1：99、5：95、10：90、15：85、20：80、25：75、30：70、35：65、40：60、45：55、50：50、55：45、60：40、65：35、70：30、75：25、80：20、85：15、90：10、95：5、または99：1である。ガイドに対するパッセンジャーの比は、ガイド鎖の切除後のガイド鎖に対するパッセンジャー鎖の比を指す。例えば、80：20のパッセンジャー対ガイド比は、前駆体からプロセシングされた2個のガイド鎖毎に8個のパッセンジャー鎖を有するであろう。非限定的な例として、パッセンジャー対ガイド鎖比は、*in vitro*で80：20である。非限定的な例として、パッセンジャー対ガ

30

40

50

イド鎖比は、*in vivo*で80：20である。非限定的な例として、パッセンジャー対ガイド鎖比は、*in vitro*で8：2である。非限定的な例として、パッセンジャー対ガイド鎖比は、*in vivo*で8：2である。非限定的な例として、パッセンジャー対ガイド鎖比は、*in vitro*で9：1である。非限定的な例として、パッセンジャー対ガイド鎖比は、*in vivo*で9：1である。

#### 【0406】

いくつかの実施形態では、発現するパッセンジャー対ガイド（P：G）（センス対アンチセンスとも称される）鎖比は、1を超える。いくつかの実施形態では、発現するパッセンジャー対ガイド（P：G）（センス対アンチセンスとも称される）鎖比は、2を超える。いくつかの実施形態では、発現するパッセンジャー対ガイド（P：G）（センス対アンチセンスとも称される）鎖比は、5を超える。いくつかの実施形態では、発現するパッセンジャー対ガイド（P：G）（センス対アンチセンスとも称される）鎖比は、10を超える。いくつかの実施形態では、発現するパッセンジャー対ガイド（P：G）（センス対アンチセンスとも称される）鎖比は、20を超える。いくつかの実施形態では、発現するパッセンジャー対ガイド（P：G）（センス対アンチセンスとも称される）鎖比は、50を超える。いくつかの実施形態では、発現するパッセンジャー対ガイド（P：G）（センス対アンチセンスとも称される）鎖比は、少なくとも3：1である。いくつかの実施形態では、発現するパッセンジャー対ガイド（P：G）（センス対アンチセンスとも称される）鎖比は、少なくとも5：1である。いくつかの実施形態では、発現するパッセンジャー対ガイド（P：G）（センス対アンチセンスとも称される）鎖比は、少なくとも10：1である。いくつかの実施形態では、発現するパッセンジャー対ガイド（P：G）（センス対アンチセンスとも称される）鎖比は、少なくとも20：1である。いくつかの実施形態では、発現するパッセンジャー対ガイド（P：G）（センス対アンチセンスとも称される）鎖比は、少なくとも50：1である。

#### 【0407】

いくつかの実施形態では、パッセンジャーガイド鎖二本鎖は、*pri*ーまたは*pre*ーマイクロRNAが、当該技術分野で知られている及び本明細書に記載されている方法によって、プロセシングが測定された場合に2倍を超えるガイド対パッセンジャー鎖比を実証する場合、有効であると考えられる。非限定的な例として、*pri*ーまたは*pre*ーマイクロRNAは、プロセシングが測定される場合、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、11倍、12倍、13倍、14倍、15倍超、または2～5倍、2～10倍、2～15倍、3～5倍、3～10倍、3～15倍、4～5倍、4～10倍、4～15倍、5～10倍、5～15倍、6～10倍、6～15倍、7～10倍、7～15倍、8～10倍、8～15倍、9～10倍、9～15倍、10～15倍、11～15倍、12～15倍、13～15倍、または14～15倍のガイド対パッセンジャー鎖比を実証する。

#### 【0408】

いくつかの実施形態では、dsRNAをコードするベクターゲノムは、コンストラクトの全長の少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%または99%を超える配列を含む。非限定的な例として、ベクターゲノムは、コンストラクトの全長配列の少なくとも80%である配列を含む。

#### 【0409】

いくつかの実施形態では、siRNAコンストラクトは、配列上の少なくとも1つのエクソンを標的とすることによって野生型または変異体遺伝子をサイレンシングするために使用され得る。

#### 【0410】

##### siRNA修飾

いくつかの実施形態では、siRNAコンストラクトは、前駆体またはDNAとして送達されない場合、限定されないが、*in vivo*でsiRNAの安定性を増加させること等、RNA分子のいくつかの特徴を調節するために化学的に修飾され得る。化学的に修



飾された s i R N A コンストラクトは、ヒト治療用途において使用され得、s i R N A コンストラクトの R N A i 活性を損なうことなく改善される。非限定的な例として、センス鎖及びアンチセンス鎖の両方の 3' 及び 5' 末端の両方で修飾された s i R N A コンストラクトを含む。

【0411】

いくつかの実施形態では、修飾されたヌクレオチドは、センス鎖のみにあり得る。

【0412】

いくつかの実施形態では、修飾されたヌクレオチドは、アンチセンス鎖のみにあり得る。

【0413】

いくつかの実施形態では、修飾されたヌクレオチドは、センス鎖及びアンチセンス鎖の両方にあり得る。

【0414】

いくつかの実施形態では、化学的に修飾されたヌクレオチドは、アンチセンス鎖が標的 m R N A 配列と対合する能力に影響を及ぼさない。

【0415】

マイクロ R N A ( m i R ) 骨格

いくつかの実施形態では、s i R N A コンストラクトは、マイクロ R N A ( m i R ) 骨格コンストラクトも含むポリヌクレオチド配列においてコードされ得る。本明細書で 사용되는場合、「マイクロ R N A ( m i R ) 骨格コンストラクト」は、後続分子を設計または作製する配列または構造的基礎を形成するフレームワークまたは開始分子である。

【0416】

いくつかの実施形態では、m i R 骨格コンストラクトは、少なくとも 1 つの 5' 隣接領域を含む。非限定的な例として、5' 隣接領域は、任意の長さのものであり得、かつ全体的または部分的に野生型マイクロ R N A 配列に由来し得、または完全に人工配列であり得る 5' 隣接配列を含み得る。

【0417】

いくつかの実施形態では、m i R 骨格コンストラクトは、少なくとも 1 つの 3' 隣接領域を含む。非限定的な例として、3' 隣接領域は、任意の長さのものであり得、かつ全体的または部分的に野生型マイクロ R N A 配列に由来し得、または完全に人工配列であり得る 3' 隣接配列を含み得る。

【0418】

いくつかの実施形態では、m i R 骨格コンストラクトは、少なくとも 1 つのループモチーフ領域を含む。非限定的な例として、ループモチーフ領域は、任意の長さのものであり得る配列を含み得る。

【0419】

いくつかの実施形態では、m i R 骨格コンストラクトは、5' 隣接領域、ループモチーフ領域及び／または 3' 隣接領域を含む。

【0420】

いくつかの実施形態では、少なくとも 1 つのペイロード（例えば、s i R N A、m i R N A または本明細書に記載の他の R N A i）は、少なくとも 1 つの m i R 骨格コンストラクトも含み得るポリヌクレオチドによってコードされ得る。m i R 骨格コンストラクトは、任意の長さのものであり得、かつ全体的または部分的に野生型マイクロ R N A 配列に由来し得、または完全に人工であり得る 5' 隣接配列を含み得る。3' 隣接配列は、サイズ及び起源が 5' 隣接配列及び／または 3' 隣接配列を反映し得る。隣接配列のいずれかは、非存在であり得る。3' 隣接配列は、1 つ以上の C N N C モチーフ（「N」は、任意のヌクレオチドを表す）を任意に含有し得る。

【0421】

いくつかの実施形態では、m i R 骨格コンストラクトを含むまたはコードするポリヌクレオチドのステムループ構造の 5' アームは、センス配列をコードする配列を含む。

10

20

30

40

50

## 【0422】

いくつかの実施形態では、miR骨格コンストラクトを含むまたはコードするポリヌクレオチドのステムループの3'アームは、アンチセンス配列をコードする配列を含む。アンチセンス配列は、いくつかの例では、最も5'末端で「G」ヌクレオチドを含む。

## 【0423】

いくつかの実施形態では、センス配列は、3'アーム上に存在し得るのに対し、アンチセンス配列は、miR骨格コンストラクトを含む、またはコードするポリヌクレオチドのステムループ構造のステムの5'アーム上に存在する。

## 【0424】

いくつかの実施形態では、センス及びアンチセンス配列は、それらの長さの実質的部分にわたって完全に相補的であり得る。他の実施形態では、センス配列及びアンチセンス配列は、独立して、鎖の長さの少なくとも50、60、70、80、85、90、95、または99%にわたって少なくとも70、80、90、95または99%相補的であり得る。

10

## 【0425】

センス配列の同一性もアンチセンス配列の相同性も標的配列と100%相補的である必要はない。

## 【0426】

いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドのステムループ構造のセンス及びアンチセンス配列を分離することは、ループ配列（ループモチーフ、リンカーまたはリンカーモチーフとしても知られている）である。ループ配列は、4~30ヌクレオチド、4~20ヌクレオチド、4~15ヌクレオチド、5~15ヌクレオチド、6~12ヌクレオチド、6ヌクレオチド、7ヌクレオチド、8ヌクレオチド、9ヌクレオチド、10ヌクレオチド、11ヌクレオチド、12ヌクレオチド、13ヌクレオチド、14ヌクレオチド、及び/または15ヌクレオチドの任意の長さのものであり得る。

20

## 【0427】

いくつかの実施形態では、ループ配列は、少なくとも1つのUGUGモチーフをコードする核酸配列を含む。いくつかの実施形態では、UGUGモチーフをコードする核酸配列は、ループ配列の5'末端に位置する。

## 【0428】

いくつかの実施形態では、1つ以上のモジュール（例えば、5'隣接領域、ループモチーフ領域、3'隣接領域、センス配列、アンチセンス配列）を互いに分離するためにスペーサー領域がポリヌクレオチドに存在し得る。1つ以上のそのようなスペーサー領域が存在し得る。

30

## 【0429】

いくつかの実施形態では、8~20、すなわち、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20ヌクレオチドのスペーサー領域が、センス配列と隣接領域配列との間に存在し得る。

## 【0430】

いくつかの実施形態では、スペーサー領域の長さは、13ヌクレオチドであり、センス配列の5'末端と隣接配列の3'末端との間に位置する。いくつかの実施形態では、スペーサーは、配列のおよそ1つのらせん形を形成するために十分な長さである。

40

## 【0431】

いくつかの実施形態では、8~20、すなわち、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20ヌクレオチドのスペーサー領域が、アンチセンス配列と隣接配列との間に存在し得る。

## 【0432】

いくつかの実施形態では、スペーサー配列は、10~13、すなわち、10、11、12または13ヌクレオチドであり、アンチセンス配列の3'末端と隣接配列の5'末端と間に位置する。いくつかの実施形態では、スペーサーは、配列のおよそ1つのらせん形を形

50

成するために十分な長さである。

【0433】

いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、5'から3'方向で、5'隣接配列、5'アーム、ループモチーフ、3'アーム及び3'隣接配列を含む。非限定的な例として、5'アームは、センス配列を含み得、3'アームは、アンチセンス配列を含む。別の非限定的な例では、5'アームは、アンチセンス配列を含み、3'アームは、センス配列を含む。

【0434】

いくつかの実施形態では、5'アーム、ペイロード（例えば、センス及び／またはアンチセンス配列）、ループモチーフ及び／または3'アーム配列は、改変され得る（例えば、1つ以上のヌクレオチドを置換する、ヌクレオチドを付加する及び／またはヌクレオチドを欠失させる）。改変は、コンストラクトの機能の有益な変化を引き起こし得る（例えば、標的配列のノックダウンを増加させる、コンストラクトの分解を低減する、オフターゲット効果を低減する、ペイロードの効率を増加させる、及びペイロードの分解を低減する）。

【0435】

いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドのmiR骨格コンストラクトは、ガイド鎖の切除率がパッセンジャー鎖の切除率よりも高くなるように整列させられる。ガイドまたはパッセンジャー鎖の切除率は、独立して、1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%または99%を超え得る。非限定的な例として、ガイド鎖の切除率は、少なくとも80%である。別の非限定的な例として、ガイド鎖の切除率は、少なくとも90%である。

【0436】

いくつかの実施形態では、ガイド鎖の切除率は、パッセンジャー鎖の切除率よりも高い。1つの態様では、ガイド鎖の切除率は、パッセンジャー鎖よりも少なくとも1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%または99%を超えて高い場合がある。

【0437】

いくつかの実施形態では、ガイド鎖の切除の効率%は、少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%または99%を超える。非限定的な例として、ガイド鎖の切除の効率は、80%よりも高い。

【0438】

いくつかの実施形態では、ガイド鎖の切除の効率は、miR骨格コンストラクトからのパッセンジャー鎖の切除よりも高い。ガイド鎖の切除は、miR骨格コンストラクトからのパッセンジャー鎖の切除よりも2、3、4、5、6、7、8、9、10倍または10倍を超えて効率的であり得る。

【0439】

いくつかの実施形態では、miR骨格コンストラクトは、二重機能標的化ポリヌクレオチドを含む。本明細書で使用される場合、「二重機能標的化」ポリヌクレオチドは、ガイド及びパッセンジャー鎖の両方が同じ標的をノックダウンし、またはガイド及びパッセンジャー鎖が異なる標的をノックダウンするポリヌクレオチドである。

【0440】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のポリヌクレオチドのmiR骨格コンストラクトは、5'隣接領域、ループモチーフ領域及び3'隣接領域を含み得る。

【0441】

いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、以下の特性：ループバリエーション、シードミスマッチ／バルジ／揺らぎバリエーション、ステムミスマッチ、ループバリエーション及びベース対ミスマッチバリエーション、シードミスマッチ及びベース対ミスマッチバリエーション、ステムミスマッチ及びベース対ミスマッチバリエーション、シード揺らぎ及

10

20

30

40

50

びベールシステム揺らぎバリエーション、またはステム配列バリエーションのうちの少なくとも1つを使用して設計される。

【0442】

いくつかの実施形態では、miRNA骨格コンストラクトは、天然pri-miRNA骨格であり得る。

【0443】

いくつかの実施形態では、miRNA骨格コンストラクトの選択は、pri-miRNAにおけるポリヌクレオチドを比較する方法によって決定される。

【0444】

いくつかの実施形態では、miRNA骨格コンストラクトの選択は、天然pri-miRNA A及び合成pri-miRNAにおけるポリヌクレオチドを比較する方法によって決定される。

【0445】

トランスファーRNA (tRNA)

トランスファーRNA (tRNA) は、mRNAをタンパク質に翻訳するRNA分子である。tRNAには、3'アクセプター部位、5'末端ホスフェート、Dアーム、Tアーム、及びアンチコドンアームを含むクローバー型構造が含まれる。tRNAの主要な目的は、タンパク質を合成するために遊離tRNA上に適切なアミノ酸をロードする酵素であるアミノアシル-tRNA合成酵素の助けを借りてリボソーム複合体にその3'アクセプター部位上のアミノ酸を運搬することである。アミノ酸がtRNAに結合すると、tRNAは、アミノアシル-tRNAとみなされる。tRNA上のアミノ酸のタイプは、mRNAコドンに依存性である。tRNAのアンチコドンアームは、mRNAコドンと相補的であり、どのアミノ酸を運搬するかを指示するアンチコドンの部位である。tRNAはまた、シトクロムcスカベンジャーとして作用することによってアポトーシスの制御において役割を有することが知られている。

【0446】

いくつかの実施形態では、オリジネーターコンストラクト及び／またはベンチマークコンストラクトは、tRNAを含み、またはそれをコードする。

【0447】

リボソームRNA (rRNA)

リボソームRNA (rRNA) は、リボソームを形成するRNAである。リボソームは、タンパク質合成に必須であり、大及び小リボソームサブユニットを含有する。原核生物において、小30S及び大50Sリボソームサブユニットは、70Sリボソームを構成する。真核生物において、40S及び60Sサブユニットは、80Sリボソームを形成する。アミノアシル-tRNAを結合させ、アミノ酸と一緒に連結してポリペプチドを生成するために、リボソームは、3つの部位：出口部位 (E)、ペプチジル部位 (P)、及びアクセプター部位 (A) を含有する。

【0448】

いくつかの実施形態では、オリジネーターコンストラクト及び／またはベンチマークコンストラクトは、rRNAを含み、またはそれをコードする。

【0449】

マイクロRNA (miRNA)

マイクロRNA (またはmiRNA) は、核酸分子の3'UTRに結合し、核酸分子安定性を低減することによってまたは翻訳を阻害することによってのいずれかで遺伝子発現を下方制御する19~25ヌクレオチド長の非コードRNAである。オリジネーターコンストラクト及び／またはベンチマークコンストラクトは、1つ以上のマイクロRNA標的配列、マイクロRNA配列、またはマイクロRNAシードを含み得る。

【0450】

マイクロRNA配列は、「シード」領域、すなわち、成熟マイクロRNAの位置2~8の領域における配列を含み、この配列は、miRNA標的配列と完全なワトソン・クリッ

10

20

30

40

50

ク相補性を有する。マイクロRNAシードは、成熟マイクロRNAの位置2～8または2～7を含み得る。いくつかの実施形態では、マイクロRNAシードは、7ヌクレオチド（例えば、成熟マイクロRNAのヌクレオチド2～8）を含み得、対応するmiRNA標的におけるシード相補的部位は、マイクロRNA位置1に対向するアデニン（A）と隣接している。いくつかの実施形態では、マイクロRNAシードは、6ヌクレオチド（例えば、成熟マイクロRNAのヌクレオチド2～7）を含み得、対応するmiRNA標的におけるシード相補的部位は、マイクロRNA位置1に対向するアデニン（A）に隣接している。マイクロRNAシードの塩基は、標的配列と完全な相補性を有する。マイクロRNA標的配列をmRNAの3'UTRに操作することによって、対象となるマイクロRNAが利用可能であることを条件として、分解または低減された翻訳のために分子を標的化し得る。このプロセスは、核酸分子送達によりオフターゲット効果の危険を低減するであろう。

10

#### 【0451】

本明細書で使用される場合、用語「マイクロRNA部位」は、マイクロRNA標的部位もしくはマイクロRNA認識部位、またはマイクロRNAが結合または会合する任意のヌクレオチド配列を指す。「結合」は、従来のワトソン・クリックハイブリダイゼーション規則に従い得、またはマイクロRNAとマイクロRNA部位におけるまたはそれに隣接する標的配列との任意の安定な会合を反映し得ることが理解されるべきである。

#### 【0452】

マイクロRNA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非限定的な例には、肝臓（miR-122）、筋肉（miR-133、miR-206、miR-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）が含まれるがこれらに限定されない。マイクロRNAはまた、複雑な生物学的プロセス、例えば、血管新生を制御し得る（miR-132）。

20

#### 【0453】

例えば、核酸分子がmRNAであり、肝臓に送達されることは意図されていないが、そこに行き着く場合、そのときは肝臓において豊富なマイクロRNAであるmiR-122は、miR-122の1つのまたは複数の標的部位がmRNAの3'UTR内に操作される場合、対象となる遺伝子の発現を阻害し得る。異なるマイクロRNAのための1つまたは複数の結合部位の導入は、mRNAの寿命、安定性、及びタンパク質翻訳をさらに減少させるために操作され得る。

30

#### 【0454】

逆に、マイクロRNA結合部位は、特定の組織においてタンパク質発現を増加させるためにそれらが天然に存在する配列から操作排除（すなわち、除去）され得る。例えば、miR-122結合部位は、肝臓におけるタンパク質発現を改善するために除去され得る。複数の組織における発現の制御は、1つのまたはいくつかのマイクロRNA結合部位の導入または除去を介して達成され得る。

40

#### 【0455】

##### 長鎖非コードRNA（lncRNA）

長鎖非コードRNA（lncRNA）は、タンパク質をコードしないが、広範囲の生物学的プロセスに影響を及ぼす制御性RNA分子である。lncRNA指定は通常、約200ヌクレオチドよりも長い非コード転写産物に制限され得る。長さの指定は、lncRNAを、低分子干渉RNA（siRNA）及びマイクロRNA（miRNA）等の小さな制御性RNAと区別する。脊椎動物では、lncRNA種数は、タンパク質コード種数を大幅に超えると考えられる。また、lncRNAは、無脊椎動物と比較して脊椎動物において観察される生物学的複雑性を誘導すると考えられている。この複雑性の証拠は、脊椎動物生物の多くの細胞区画、例えば、適応免疫系のTリンパ球区画で見られる。lnc

50

R N A の発現及び機能の差は、ヒト疾患に対する主要な寄与因子であり得る。

【0456】

いくつかの実施形態では、オリジネーターコンストラクト及び／またはベンチマークコンストラクトは、l n c R N A を含む。

【0457】

R N A 修飾

いくつかの態様では、オリジネーターコンストラクトまたはベンチマークコンストラクトは、1つ以上の修飾されたヌクレオチド、例えば、限定されないが、糖修飾されたヌクレオチド、核酸塩基修飾及び／または骨格修飾を含有し得る。いくつかの態様では、オリジネーターコンストラクトまたはベンチマークコンストラクトは、組み合わされた修飾、例えば、組み合わされた核酸塩基及び骨格修飾を含有し得る。

10

【0458】

いくつかの実施形態では、修飾されたヌクレオチドは、糖修飾されたヌクレオチドであり得る。糖修飾されたヌクレオチドには、2'-フルオロ、2'-アミノ及び2'-チオ修飾されたりボヌクレオチド、例えば、2'-フルオロ修飾されたりボヌクレオチドが含まれるがこれらに限定されない。修飾されたヌクレオチドは、糖部位、及びリボシルではない糖またはそのアナログを有するヌクレオチドで修飾され得る。例えば、糖部位は、マンノース、アラビノース、グルコピラノース、ガラクトピラノース、4'-チオリボース、及び他の糖、複素環、または炭素環であり得、またはそれらに基づき得る。

【0459】

いくつかの実施形態では、修飾されたヌクレオチドは、核酸塩基修飾ヌクレオチドであり得る。

20

【0460】

いくつかの実施形態では、修飾されたヌクレオチドは、骨格修飾ヌクレオチドであり得る。いくつかの実施形態では、オリジネーターコンストラクトまたはベンチマークコンストラクトは、骨格上に他の修飾をさらに含み得る。正常な「骨格」は、本明細書で 사용되는場合、DNA または RNA 分子における繰り返しの交互の糖-ホスフェート配列を指す。デオキシリボース／リボース糖は、「ホスホジエステル」結合／リンカー（PO 結合）としても知られているエステル結合において3'-ヒドロキシル基及び5'-ヒドロキシル基の両方でホスフェート基に接続される。PO 骨格は、「ホスホロチオエート骨格（PS 結合）」として修飾され得る。いくつかの場合では、天然ホスホジエステル結合は、アミド結合によって置き換えられ得るが、2つの糖単位の間の4つの原子は維持される。そのようなアミド修飾は、オリゴヌクレオチドの固相合成を容易化し、s i R N A 相補体と形成された二本鎖の熱力学的安定性を増加させ得る。

30

【0461】

修飾された塩基は、1つ以上の原子または基の置き換えまたは付加によって修飾されたヌクレオチド塩基、例えば、限定されないが、アデニン、グアニン、シトシン、チミン、ウラシル、キサンチン、イノシン、及びキューオシンを指す。核酸塩基部位上の修飾のいくつかの例には、アルキル化、ハロゲン化、チオール化、アミノ化、アミド化、またはアセチル化塩基が個々にまたは組み合わせて含まれるがこれらに限定されない。より具体的な例には、例えば、5-プロピニルウリジン、5-プロピニルシチジン、6-メチルアデニン、6-メチルグアニン、N, N, -ジメチルアデニン、2-プロピルアデニン、2-プロピルグアニン、2-アミノアデニン、1-メチルイノシン、3-メチルウリジン、5-メチルシチジン、5-メチルウリジン及び5位で修飾を有する他のヌクレオチド、5-(2-アミノ)プロピルウリジン、5-ハロシチジン、5-ハロウリジン、4-アセチルシチジン、1-メチルアデノシン、2-メチルアデノシン、3-メチルシチジン、6-メチルウリジン、2-メチルグアノシン、7-メチルグアノシン、2, 2-ジメチルグアノシン、5-メチルアミノエチルウリジン、5-メチルオキシウリジン、デアザヌクレオチド、例えば、7-デアザアデノシン、6-アゾウリジン、6-アゾシチジン、6-アゾチミジン、5-メチル-2-チオウリジン、他のチオ塩基、例えば、2-チオウリジン及

40

50

び 4-チオウリジン及び 2-チオシチジン、ジヒドロウリジン、シュードウリジン、キューオシン、アルカエオシン、ナフチル及び置換ナフチル基、任意の O-及び N-アルキル化プリン及びピリミジン、例えば、N6-メチルアデノシン、5-メチルカルボニルメチルウリジン、ウリジン 5-オキシ酢酸、ピリジン-4-オン、ピリジン-2-オン、フェニル及び修飾されたフェニル基、例えば、アミノフェノールまたは 2, 4, 6-トリメトキシベンゼン、G-クランブヌクレオチドとして作用する修飾されたシトシン、8 置換アデニン及びグアニン、5 置換ウラシル及びチミン、アザピリミジン、カルボキシヒドロキシャルキルヌクレオチド、カルボキシアルキルアミノアルキルヌクレオチド、及びアルキルカルボニルアルキル化ヌクレオチドが含まれる。

#### 【0462】

オリジネーターコンストラクト及び／またはベンチマークコンストラクトには、参照配列、特に、親 RNA に対して 1 つ以上の置換、挿入及び／または付加、欠失、及び共有結合性修飾が含まれ得、本開示の範囲に含まれる。

#### 【0463】

いくつかの実施形態では、オリジネーターコンストラクト及び／またはベンチマークコンストラクトには、1 つ以上の転写後修飾（例えば、キャッピング、切断、ポリアデニル化、スプライシング、ポリ-A 配列、メチル化、アシル化、リン酸化、リジン及びアルギニン残基のメチル化、アセチル化、ならびにチオール基及びチロシン残基のニトロシル化等）が含まれる。1 つ以上の転写後修飾は、RNA において同定されている数百の異なるヌクレオシド修飾のいずれか等の任意の転写後修飾であり得る (Rozenski, J, Crain, P, and McCloskey, J. (1999). The RNA Modification Database: 1999 update. Nucl Acids Res 27: 196-197)。いくつかの実施形態では、第 1 の単離された核酸は、メッセンジャー RNA (mRNA) を含む。いくつかの実施形態では、オリジネーターコンストラクト及び／またはベンチマークコンストラクトは、ピリジン-4-オリボヌクレオシド、5-アザウリジン、2-チオ-5-アザウリジン、2-チオウリジン、4-チオシュードウリジン、2-チオシュードウリジン、5-ヒドロキシウリジン、3-メチルウリジン、5-カルボキシメチルウリジン、1-カルボキシメチルシュードウリジン、5-プロピニルウリジン、1-プロピニルシュードウリジン、5-タウリノメチルウリジン、1-タウリノメチルシュードウリジン、5-タウリノメチル-2-チオウリジン、1-タウリノメチル-4-チオウリジン、5-メチルウリジン、1-メチルシュードウリジン、4-チオ-1-メチルシュードウリジン、2-チオ-1-メチルシュードウリジン、1-メチル-1-デアザシュードウリジン、2-チオ-1-メチル-1-デアザシュードウリジン、ジヒドロウリジン、ジヒドロシュードウリジン、2-チオジヒドロウリジン、2-チオジヒドロシュードウリジン、2-メトキシウリジン、2-メトキシ-4-チオウリジン、4-メトキシシュードウリジン、及び 4-メトキシ-2-チオシュードウリジンからなる群から選択される少なくとも 1 つのヌクレオシドを含む。いくつかの実施形態では、mRNA は、5-アザシチジン、シュードイソシチジン、3-メチルシチジン、N4-アセチルシチジン、5-ホルミルシチジン、N4-メチルシチジン、5-ヒドロキシメチルシチジン、1-メチルシュードイソシチジン、ピロロシチジン、ピロロシュードイソシチジン、2-チオシチジン、2-チオ-5-メチルシチジン、4-チオシュードイソシチジン、4-チオ-1-メチルシュードイソシチジン、4-チオ-1-メチル-1-デアザシュードイソシチジン、1-メチル-1-デアザシュードイソシチジン、ゼブラリン、5-アザゼブラリン、5-メチルゼブラリン、5-アザ-2-チオゼブラリン、2-チオゼブラリン、2-メトキシシチジン、2-メトキシ-5-メチルシチジン、4-メトキシシュードイソシチジン、及び 4-メトキシ-1-メチルシュードイソシチジンからなる群から選択される少なくとも 1 つのヌクレオシドを含む。いくつかの実施形態では、mRNA は、2-アミノプリン、2, 6-ジアミノプリン、7-デアザアデニン、7-デアザ-8-アザアデニン、7-デアザ-2-アミノプリン、7-デアザ-8-アザ

10

20

30

40

50

ー2-アミノプリン、7-デアザー2，6-ジアミノプリン、7-デアザー8-アザー2，6-ジアミノプリン、1-メチルアデノシン、N6-メチルアデノシン、N6-イソペンテニルアデノシン、N6-(cis-ヒドロキシイソペンテニル)アデノシン、2-メチルチオーN6-(cis-ヒドロキシイソペンテニル)アデノシン、N6-グリシニルカルバモイルアデノシン、N6-トレオニルカルバモイルアデノシン、2-メチルチオーN6-トレオニルカルバモイルアデノシン、N6，N6-ジメチルアデノシン、7-メチルアデニン、2-メチルチオーアデニン、及び2-メトキシアデニンからなる群から選択される少なくとも1つのヌクレオシドを含む。いくつかの実施形態では、mRNAは、イノシン、1-メチルイノシン、ワイオシン、ワイプトシン、7-デアザーグアノシン、7-デアザー8-アザーグアノシン、6-チオーグアノシン、6-チオー7-デアザーグアノシン、6-チオー7-デアザー8-アザーグアノシン、7-メチルグアノシン、6-チオー7-メチルグアノシン、7-メチルイノシン、6-メトキシグアノシン、1-メチルグアノシン、N2-メチルグアノシン、N2，N2-ジメチルグアノシン、8-オキソグアノシン、7-メチル-8-オキソグアノシン、1-メチル-6-チオーグアノシン、N2-メチル-6-チオーグアノシン、及びN2，N2-ジメチル-6-チオーグアノシンからなる群から選択される少なくとも1つのヌクレオシドを含む。

10

#### 【0464】

オリジネーターコンストラクト及び／またはベンチマークコンストラクトには、例えば、糖、核酸塩基、またはヌクレオシド間連結（例えば、連結しているホスフェート／ホスホジエステル結合／ホスホジエステル骨格）に対する任意の有用な修飾が含まれ得る。ピリミジン核酸塩基の1つ以上の原子は、任意に置換されたアミノ、任意に置換されたチオール、任意に置換されたアルキル（例えば、メチルまたはエチル）、またはハロ（例えば、クロロまたはフルオロ）で置き換えられ、または置換され得る。所定の実施形態では、修飾（例えば、1つ以上の修飾）は、糖及びヌクレオシド間結合の各々に存在する。修飾は、リボ核酸（RNA）からデオキシリボ核酸（DNA）、トレオース核酸（TNA）、グリコール核酸（GNA）、ペプチド核酸（PNA）、ロック核酸（LNA）またはそれらのハイブリッド）への修飾であり得る。追加の修飾は、本明細書に記載されている。

20

#### 【0465】

いくつかの実施形態では、オリジネーターコンストラクト及び／またはベンチマークコンストラクトには、翻訳効率を増加させるために少なくとも1つのN（6）メチルアデノシン（m6A）修飾が含まれる。いくつかの実施形態では、N（6）メチルアデノシン（m6A）修飾は、オリジネーターコンストラクト及び／またはベンチマークコンストラクトの免疫原性を低減し得る。

30

#### 【0466】

いくつかの実施形態では、修飾には、化学的または細胞性誘導修飾が含まれ得る。例えば、細胞内RNA修飾のいくつかの非限定的な例は、Nat. Reviews Mol. Cell Biol.，2017，18：202-210からの“RNA modifications and structures cooperate to guide RNA-protein interactions”においてLewis及びPanによって記載されている。

40

#### 【0467】

いくつかの実施形態では、RNAに対する化学的修飾は、免疫回避を向上させ得る。RNAは、当該技術分野においてよく確立されている方法、例えば、“Current protocols in nucleic acid chemistry,” Beaucage, S. L. et al. (Eds.), John Wiley & Sons, Inc., New York, N. Y., USA（本明細書によって参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているものによって合成及び／または修飾され得る。修飾には、例えば、末端修飾、例えば、5'末端修飾（リン酸化（一、二及び三）、コンジュゲーション、逆結合等）、3'末端修飾（コンジュゲーション、DNAヌクレオチド、逆連結等）、塩基修飾（例えば、安定化塩基、不安定化塩基、またはパートナーの伸長レパー

50



トリーと塩基対合する塩基での置き換え)、塩基の除去(塩基脱落ヌクレオチド)、またはコンジュゲート化塩基が含まれる。修飾されたりボヌクレオチド塩基にはまた、5-メチルシチジン及びシュードウリジンが含まれ得る。いくつかの実施形態では、塩基修飾は、RNAのいくつかの機能的効果を指定するために発現、免疫反応、安定性、細胞内局在化を調節し得る。いくつかの実施形態では、修飾には、双直交ヌクレオチド、例えば、非天然塩基が含まれる。例えば、Kimoto et al., Chem Commun (Camb), 2017, 53:12309, DOI:10.1039/c7cc06661a (参照により本明細書に組み込まれるである)を参照されたい。

#### 【0468】

いくつかの実施形態では、1つ以上のRNAの糖修飾(例えば、2'位または4'位)または糖の置き換えは、骨格修飾と同様に、ホスホジエステル結合の修飾または置き換えが含まれ得る。修飾の具体的な例には、ホスホジエステル結合の修飾または置き換えを含む、ヌクレオシド間修飾等の修飾された骨格または非天然ヌクレオシド間連結が含まれる。修飾された骨格を有するRNAには、とりわけ、骨格においてリン原子を有しないものが含まれる。本出願の目的のため、及び時に当該技術分野で言及されるように、それらのヌクレオシド間骨格においてリン原子を有しない修飾されたRNAもまた、オリゴヌクレオシドとみなされ得る。特定の実施形態では、RNAには、そのヌクレオシド間骨格においてリン原子を有するリボヌクレオチドが含まれるであろう。

#### 【0469】

修飾されたRNA骨格には、例えば、ホスホロチオエート、キラルホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホトリエステル、アミノアルキルホスホトリエステル、メチル及び他のアルキルホスホネート、例えば、3'-アルキレンホスホネート及びキラルホスホネート、ホスフィネート、ホスホルアミデート、例えば、3'-アミノホスホルアミデート及びアミノアルキルホスホルアミデート、チオノホスホルアミデート、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、及び通常の3'-5'結合を有するボラノホスフェート、これらの2-5'結合アナログ、ならびに逆転した極性を有するもの(ヌクレオシド単位の隣接対が、3'-5'から5'-3'または2'-5'から5'-2'に連結されている)が含まれ得る。様々な塩、混合塩及び遊離酸形態も含まれる。いくつかの実施形態では、RNAは、負または正に荷電している場合がある。

#### 【0470】

修飾されたヌクレオチドは、ヌクレオシド間結合(例えば、ホスフェート骨格)上で修飾され得る。本明細書では、ポリヌクレオチド骨格の文脈において、語句「ホスフェート」及び「ホスホジエステル」は、互換的に使用される。骨格ホスフェート基は、酸素原子の1つ以上を異なる置換基に置き換えることによって修飾され得る。さらに、修飾されたヌクレオシド及びヌクレオチドには、未修飾ホスフェート部位の、本明細書に記載される別のヌクレオシド間結合での大規模置き換えが含まれ得る。修飾されたホスフェート基の例には、ホスホロチオエート、ホスホロセレネート、ボラノホスフェート、ボラノホスフェートエステル、水素ホスホネート、ホスホルアミデート、ホスホロジアミデート、アルキルまたはアリールホスホネート、及びホスホトリエステルが含まれるがこれらに限定されない。ホスホロジチオエートは、両方の非連結酸素が硫黄によって置き換えられている。ホスフェートリンカーはまた、窒素(架橋ホスホルアミデート)、硫黄(架橋ホスホロチオエート)、及び炭素(架橋メチレン-ホスホネート)での連結酸素の置き換えによって修飾され得る。

#### 【0471】

a-チオ置換ホスフェート部位は、非天然ホスホロチオエート骨格結合を介してRNA及びDNAポリマーに安定性を付与するために提供される。ホスホロチオエートDNA及びRNAは、細胞環境において増加したヌクレアーゼ耐性及びその後のより長い半減期を有する。RNAに連結されたホスホロチオエートは、細胞自然免疫分子のより弱い結合/活性化を介して自然免疫反応を低減することが予期される。

#### 【0472】

特定の実施形態では、修飾されたヌクレオシドには、アルファーチオ-ヌクレオシド（例えば、5'-O-（1-チオホスフェート）-アデノシン、5'-O-（1-チオホスフェート）-シチジン（α-チオ-シチジン）、5'-O-（1-チオホスフェート）-グアノシン、5'-O-（1-チオホスフェート）-ウリジン、または5'-O-（1-チオホスフェート）-シュードウリジン）が含まれる。

【0473】

リン原子を含有しないヌクレオシド間結合を含む、本開示に従って用いられ得る他のヌクレオシド間連結は、本明細書に記載されている。

【0474】

いくつかの実施形態では、RNAには、1つ以上の細胞傷害性ヌクレオシドが含まれ得る。例えば、細胞傷害性ヌクレオシドは、2官能性修飾等、RNAに組み込まれ得る。細胞傷害性ヌクレオシドには、アデノシンアラビノシド、5-アザシチジン、4'-チオアラシチジン、シクロペンテニルシトシン、クラドリビン、クロファラビン、シタラビン、シトシンアラビノシド、1-（2-C-シアノ-2-デオキシ-ベーター-D-アラビノ-ペントフラノシル）-シトシン、デシタビン、5-フルオロウラシル、フルダラビン、フロクスウリジン、ゲムシタビン、テガフル及びウラシルの組み合わせ、テガフル（（RS）-5-フルオロ-1-（テトラヒドロフラン-2-イル）ピリミジン-2，4（1H，3H）-ジオン）、トロキサシタビン、テザシタビン、2'-デオキシ-2'-メチリデンシチジン（DMDC）、及び6-メルカプトプリンが含まれ得るがこれらに限定されない。追加の例には、フルダラビンホスフェート、N4-ベヘノイル-1-ベーター-D-アラビノフラノシルシトシン、N4-オクタデシル-1-ベーター-D-アラビノフラノシルシトシン、N4-パルミトイル-1-（2-C-シアノ-2-デオキシ-ベーター-D-アラビノ-ペントフラノシル）シトシン、及びP-4055（シタラビン5'-エライジン酸エステル）が含まれる。

【0475】

いくつかの実施形態では、RNA配列は、天然ヌクレオシド（例えば、アデノシン、グアノシン、シチジン、ウリジン）、ヌクレオシドアナログ（例えば、2-アミノアデノシン、2-チオチミジン、イノシン、ピロロ-ピリミジン、3-メチルアデノシン、5-メチルシチジン、C-5プロピニル-シチジン、C-5プロピニル-ウリジン、2-アミノアデノシン、C5-プロモウリジン、C5-フルオロウリジン、C5-ヨードウリジン、C5-プロピニル-ウリジン、C5-プロピニル-シチジン、C5-メチルシチジン、2-アミノアデノシン、7-デアザアデノシン、7-デアザグアノシン、8-オキソアデノシン、8-オキソグアノシン、O（6）-メチルグアニン、及び2-チオシチジン）、化学的に修飾された塩基、生物学的に修飾された塩基（例えば、メチル化塩基）、インターカレート塩基、修飾された糖（例えば、2'-フルオロリボース、リボース、2'-デオキシリボース、アラビノース、及びヘキソース）、及び／または修飾されたホスフェート基（例えば、ホスホロチオエート及び5'-N-ホスホロアミダイト結合）を含み（include）、または含む（comprise）。1つの実施形態では、RNA配列は、組み込まれたシュードウリジン（y）を含み（include）、または含む（comprise）。別の実施形態では、RNA配列は、5-メチルシトシン（m5C）を含み（include）、または含む（comprise）。

【0476】

RNAは、分子の長さ全体に沿って均一に修飾されている場合があり、されていない場合がある。例えば、ヌクレオチドの1つ以上またはすべてのタイプ（例えば、天然に存在するヌクレオチド、プリンまたはピリミジン、またはA、G、U、C、I、pUの任意の1つ以上またはすべて）は、RNAにおいて、またはその所与の既定の配列領域において均一に修飾されている場合があり、されていない場合がある。いくつかの実施形態では、RNAには、シュードウリジンが含まれる。いくつかの実施形態では、RNAには、イノシンが含まれ、これは、ウイルスRNAに対して内因性としてRNAを特性化する免疫系を補助し得る。イノシンの組み込みはまた、改善されたRNA安定性／低減された分解を

10

20

30

40

50

媒介し得る。

【0477】

いくつかの実施形態では、RNAにおける（またはその所与の配列領域における）すべてのヌクレオチドが修飾されている。いくつかの実施形態では、修飾には、発現を増加させ得るm6A、免疫反応を減弱させ得るイノシン、RNA安定性、または翻訳リードスルー（スタグガー要素）を増加させ得るシュドウリジン、安定性を増加させ得るm5C、及び細胞内転座（例えば、核局在化）を補助する2,2,7-トリメチルグアノシンが含まれ得る。

【0478】

異なる糖修飾、ヌクレオチド修飾、及び／またはヌクレオチド間結合（例えば、骨格構造）は、RNAにおける様々な位置で存在し得る。当業者は、RNAの機能が実質的に減少しないようにヌクレオチドアナログまたは他の修飾（複数可）が、RNAの任意の位置（複数可）に位置し得ることを理解するであろう。修飾はまた、非コード領域修飾であり得る。RNAには、約1%～約100%の修飾ヌクレオチド（ヌクレオチド含有量全体に関する、またはヌクレオチドの1つ以上のタイプ、すなわち、A、G、UまたはCのうちの任意の1つ以上に関する）または任意の介在割合（例えば、1%～20%、1%～25%、1%～50%、1%～60%、1%～70%、1%～80%、1%～90%、1%～95%、10%～20%、10%～25%、10%～50%、10%～60%、10%～70%、10%～80%、10%～90%、10%～95%、10%～100%、20%～25%、20%～50%、20%～60%、20%～70%、20%～80%、20%～90%、20%～95%、20%～100%、50%～60%、50%～70%、50%～80%、50%～90%、50%～95%、50%～100%、70%～80%、70%～90%、70%～95%、70%～100%、80%～90%、80%～95%、80%～100%、90%～95%、90%～100%、及び95%～100%）が含まれ得る。

【0479】

コドン最適化

オリジネーターコンストラクト及び／またはベンチマークコンストラクトのヌクレオチド配列は、コドン最適化され得る。コドン最適化方法は、当該技術分野で知られており、いくつかの目標の1つ以上を達成する試みにおいて有用であり得る。これらの目標には、標的生物と宿主生物におけるコドン頻度を一致させて適切なフォールディングを確保し、GC含有量にバイアスをかけてmRNA安定性を増加させ、または二次構造を低減し、遺伝子構築または発現を損い得るタンデムリピートコドンまたは塩基ランを最小化し、転写及び翻訳コントロール領域をカスタマイズし、タンパク質トラフィッキング配列を挿入または除去し、コードされた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／付加し、タンパク質ドメインを付加、除去またはシャッフルし、制限酵素部位を挿入または欠失させ、リボソーム結合部位及びmRNA分解部位を修飾し、翻訳速度を調整してタンパク質の様々なドメインが適切にフォールディングすること、またはmRNA内の問題のある二次構造を低減または排除することを可能とすることが含まれる。コドン最適化ツール、アルゴリズム及びサービスは、当該技術分野で知られており、非限定的な例には、GeneArt（Life Technologies）、DNA2.0（Meno Park CA）及び／または私有の方法からのサービスが含まれる。いくつかの実施形態では、ORF配列は、最適化アルゴリズムを使用して最適化される。

【0480】

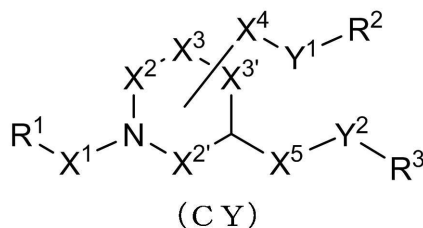
III. 脂質

本開示は、低い毒性、関連する組織における低い持続した脂質レベルと共に、様々な組織への局所的送達のための高い有効性を実証するイオン化可能な脂質を提供する。イオン化可能な脂質は、カチオン性脂質であり得る。

【0481】

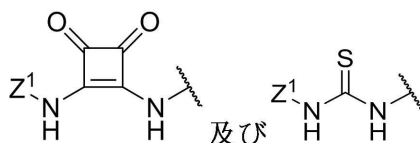
式（CY）

本開示は、式 (C Y) の化合物  
【化 1】



10

またはその薬学的に許容可能な塩  
(式中、  
R<sup>1</sup> は、-OH、-OAc、R<sup>1a</sup>、  
【化 2】



20

からなる群から選択され；

Z<sup>1</sup> は、任意に置換された C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub> アルキルであり；

X<sup>1</sup> は、任意に置換された C<sub>2</sub> - C<sub>6</sub> アルキレニルであり；

X<sup>2</sup> は、結合、-CH<sub>2</sub>- 及び -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>- からなる群から選択され；

X<sup>2'</sup> は、結合、-CH<sub>2</sub>- 及び -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>- からなる群から選択され；

X<sup>3</sup> は、結合、-CH<sub>2</sub>- 及び -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>- からなる群から選択され；

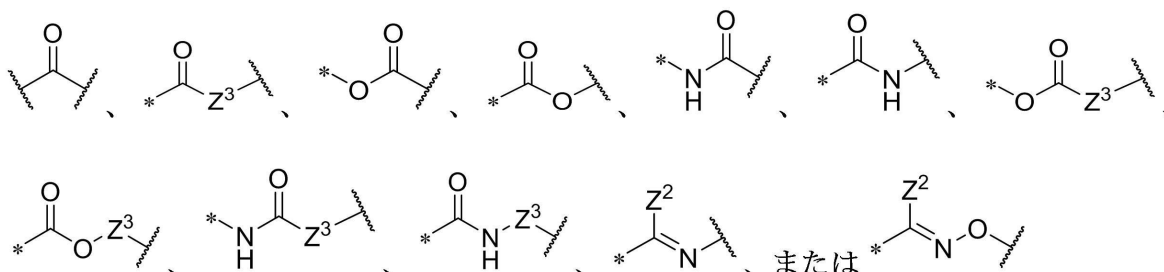
X<sup>3'</sup> は、結合、-CH<sub>2</sub>- 及び -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>- からなる群から選択され；

X<sup>4</sup> 及び X<sup>5</sup> は、独立して、任意に置換された C<sub>2</sub> - C<sub>14</sub> アルキレニルまたは任意に置換された C<sub>2</sub> - C<sub>14</sub> アルケニレニルであり；

Y<sup>1</sup> 及び Y<sup>2</sup> は、独立して、

30

【化 3】



40

からなる群から選択され；

「\*」でマークされた結合は、X<sup>4</sup> または X<sup>5</sup> に結合されており；

各 Z<sup>2</sup> は、独立して、H または任意に置換された C<sub>1</sub> - C<sub>8</sub> アルキルであり；

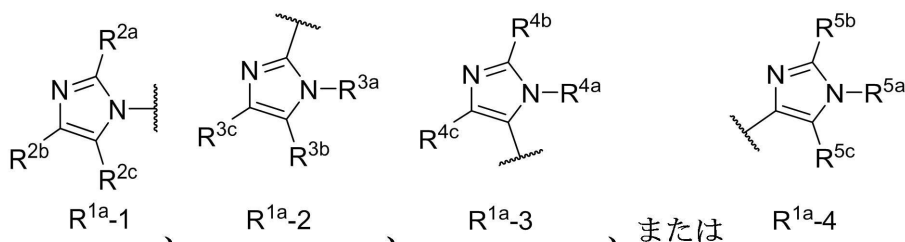
各 Z<sup>3</sup> は、独立して、任意に置換された C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub> アルキレニルであり；

R<sup>2</sup> は、任意に置換された C<sub>4</sub> - C<sub>20</sub> アルキル、任意に置換された C<sub>2</sub> - C<sub>14</sub> アルケニル、及び -(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>CH(OR<sup>6</sup>)(OR<sup>7</sup>) からなる群から選択され；

R<sup>3</sup> は、任意に置換された C<sub>4</sub> - C<sub>20</sub> アルキル、任意に置換された C<sub>2</sub> - C<sub>14</sub> アルケニル、または -(CH<sub>2</sub>)<sub>q</sub>CH(OR<sup>8</sup>)(OR<sup>9</sup>) からなる群から選択され；

50

R<sup>1a</sup> は、  
【化 4】



10

であり；

R<sup>2a</sup>、R<sup>2b</sup>、及び R<sup>2c</sup> は、独立して、水素及び C<sub>1</sub>－C<sub>6</sub> アルキルであり；

R<sup>3a</sup>、R<sup>3b</sup>、及び R<sup>3c</sup> は、独立して、水素及び C<sub>1</sub>－C<sub>6</sub> アルキルであり；

R<sup>4a</sup>、R<sup>4b</sup>、及び R<sup>4c</sup> は、独立して、水素及び C<sub>1</sub>－C<sub>6</sub> アルキルであり；

R<sup>5a</sup>、R<sup>5b</sup>、及び R<sup>5c</sup> は、独立して、水素及び C<sub>1</sub>－C<sub>6</sub> アルキルであり；

R<sup>6</sup>、R<sup>7</sup>、R<sup>8</sup>、及び R<sup>9</sup> は、独立して、任意に置換された C<sub>1</sub>－C<sub>14</sub> アルキル、任意に置換された C<sub>2</sub>－C<sub>14</sub> アルケニル、または－(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>－A－(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> H であり；

20

各 A は、独立して、C<sub>3</sub>－C<sub>8</sub> シクロアルキレニルであり；

各 m は、独立して、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、または 12 であり；

各 n は、独立して、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、または 12 であり；

p は、0、1、2、3、4、5、6、及び 7 からなる群から選択され；

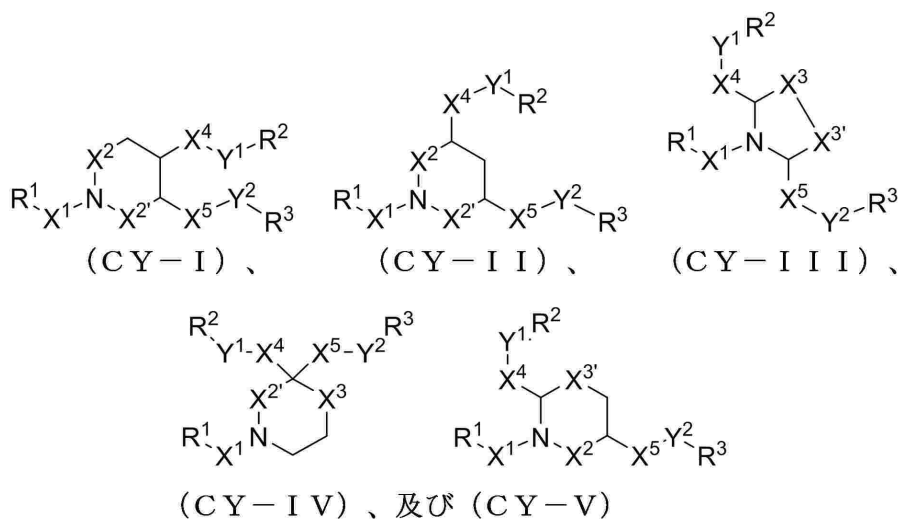
q は、0、1、2、3、4、5、6、及び 7 からなる群から選択される）を提供する。

【0482】

いくつかの実施形態では、本開示には、式 (CY-I)、(CY-II)、(CY-III)、(CY-IV)、または (CY-V) の化合物：

30

【化 5】



40

またはその薬学的に許容可能な塩

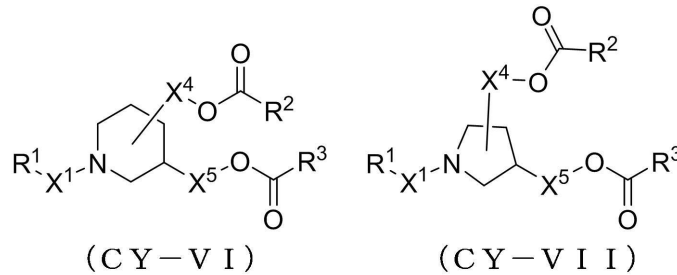
(式中、X<sup>1</sup>、X<sup>2</sup>、X<sup>2'</sup>、X<sup>3</sup>、X<sup>3'</sup>、X<sup>4</sup>、X<sup>5</sup>、Y<sup>1</sup>、Y<sup>2</sup>、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、及び R<sup>3</sup> は、本明細書で定義されている) が含まれる。

50

【 0 4 8 3 】

いくつかの実施形態では、本開示には、式（CY-VI）または（CY-VII）の化合物：

【化6】



10

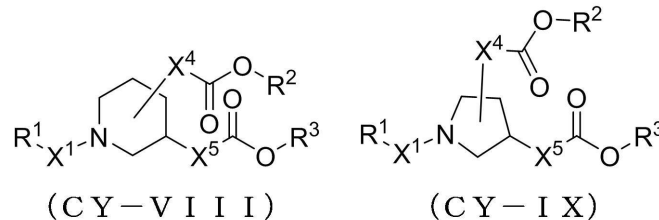
またはその薬学的に許容可能な塩

（式中、 $X^1$ 、 $X^4$ 、 $X^5$ 、 $R^1$ 、 $R^2$ 、及び $R^3$ は、本明細書で定義されている）が含まれる。

【 0 4 8 4 】

いくつかの実施形態では、本開示には、式（CY-VIII）または（CY-IX）の化合物：

【化7】



20

30

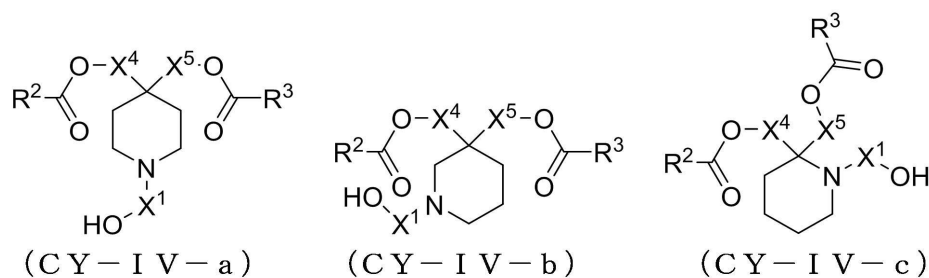
またはその薬学的に許容可能な塩

（式中、 $X^1$ 、 $X^4$ 、 $X^5$ 、 $R^1$ 、 $R^2$ 、及び $R^3$ は、本明細書で定義されている）が含まれる。

【 0 4 8 5 】

いくつかの実施形態では、本開示には、式（CY-IV-a）、（CY-IV-b）、または（CY-IV-c）の化合物

【化8】



40

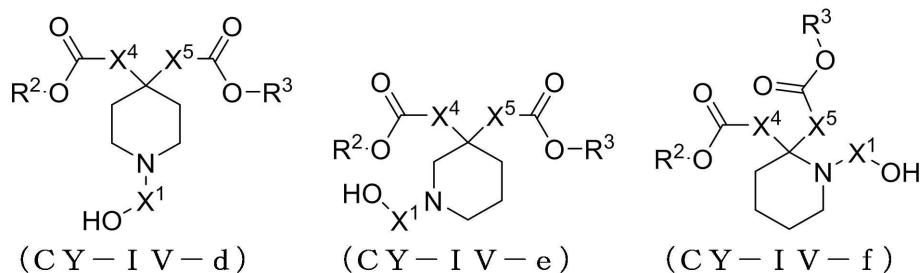
またはその薬学的に許容可能な塩

（式中、 $X^1$ 、 $X^4$ 、 $X^5$ 、 $R^2$ 、及び $R^3$ は、本明細書で定義されている）が含まれる。

【 0 4 8 6 】

50

いくつかの実施形態では、本開示には、式 (CY-IV-d)、(CY-IV-e)、または (CY-IV-f) の化合物  
【化 9】



10

またはその薬学的に許容可能な塩

(式中、 $X^1$ 、 $X^4$ 、 $X^5$ 、 $R^2$ 、及び  $R^3$  は、本明細書で定義されている) が含まれる。

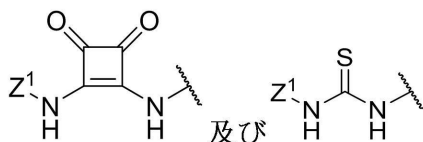
【0487】

$R^1$

いくつかの実施形態では、 $R^1$  は、 $-OH$ 、 $-OAc$ 、 $R^{1a}$ 、

【化 10】

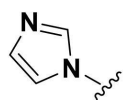
20



からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、 $R^1$  は、 $-OH$  または  $-OAc$  である。いくつかの実施形態では、 $R^1$  は、 $OH$  である。いくつかの実施形態では、 $R^1$  は、 $-OAc$  である。いくつかの実施形態では、 $R^1$  は、 $R^{1a}$  である。いくつかの実施形態では、 $R^1$  は、イミダゾリルである。いくつかの実施形態では、 $R^1$  は、

【化 11】

30



である。

【0488】

$R^2$

いくつかの実施形態では、 $R^2$  は、任意に置換された  $C_4-C_{20}$  アルキル、任意に置換された  $C_2-C_{14}$  アルケニル、及び  $-(CH_2)_pCH(OR^6)(OR^7)$  からなる群から選択される。

40

【0489】

いくつかの実施形態では、 $R^2$  は、任意に置換された  $C_4-C_{20}$  アルキルである。いくつかの実施形態では、 $R^2$  は、任意に置換された  $C_8-C_{17}$  アルキルである。いくつかの実施形態では、 $R^2$  は、任意に置換された  $C_9-C_{16}$  アルキルである。いくつかの実施形態では、 $R^2$  は、任意に置換された  $C_8-C_{10}$  アルキルである。いくつかの実施形態では、 $R^2$  は、任意に置換された  $C_{11}-C_{13}$  アルキルである。いくつかの実施形態では、 $R^2$  は、任意に置換された  $C_{14}-C_{16}$  アルキルである。いくつかの実施形態では、 $R^2$  は、任意に置換された  $C_9$  アルキルである。いくつかの実施形態では、 $R^2$  は、任意に置換された  $C_{10}$  アルキルである。いくつかの実施形態では、 $R^2$  は、任意に置

50

換された  $C_{11}$  アルキルである。いくつかの実施形態では、 $R^2$  は、任意に置換された  $C_{12}$  アルキルである。いくつかの実施形態では、 $R^2$  は、任意に置換された  $C_{13}$  アルキルである。いくつかの実施形態では、 $R^2$  は、任意に置換された  $C_{14}$  アルキルである。いくつかの実施形態では、 $R^2$  は、任意に置換された  $C_{15}$  アルキルである。いくつかの実施形態では、 $R^2$  は、任意に置換された  $C_{16}$  アルキルである。

【0490】

いくつかの実施形態では、 $R^2$  は、任意に置換された  $C_2 - C_{14}$  アルケニルである。いくつかの実施形態では、 $R^2$  は、任意に置換された  $C_5 - C_{14}$  アルケニルである。いくつかの実施形態では、 $R^2$  は、任意に置換された  $C_7 - C_{14}$  アルケニルである。いくつかの実施形態では、 $R^2$  は、任意に置換された  $C_9 - C_{14}$  アルケニルである。いくつかの実施形態では、 $R^2$  は、任意に置換された  $C_{10} - C_{14}$  アルケニルである。いくつかの実施形態では、 $R^2$  は、任意に置換された  $C_{12} - C_{14}$  アルケニルである。

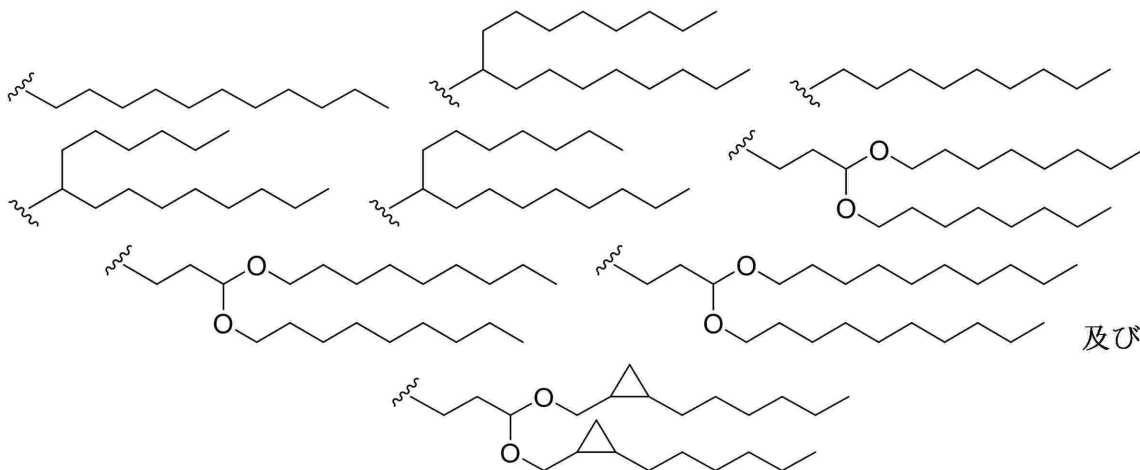
【0491】

いくつかの実施形態では、 $R^2$  は、 $-(CH_2)_p CH(OR^6)(OR^7)$  である。いくつかの実施形態では、 $R^2$  は、 $-CH(OR^6)(OR^7)$  である。いくつかの実施形態では、 $R^2$  は、 $-CH_2 CH(OR^6)(OR^7)$  である。いくつかの実施形態では、 $R^2$  は、 $-(CH_2)_2 CH(OR^6)(OR^7)$  である。いくつかの実施形態では、 $R^2$  は、 $-(CH_2)_3 CH(OR^6)(OR^7)$  である。いくつかの実施形態では、 $R^2$  は、 $-(CH_2)_4 CH(OR^6)(OR^7)$  である。

【0492】

いくつかの実施形態では、 $R^2$  は、

【化12】



からなる群から選択される。

【0493】

$R^3$

いくつかの実施形態では、 $R^3$  は、任意に置換された  $C_4 - C_{20}$  アルキル、任意に置換された  $C_2 - C_{14}$  アルケニル、及び  $-(CH_2)_q CH(OR^6)(OR^7)$  からなる群から選択される。

【0494】

いくつかの実施形態では、 $R^3$  は、任意に置換された  $C_4 - C_{20}$  アルキルである。いくつかの実施形態では、 $R^3$  は、任意に置換された  $C_8 - C_{17}$  アルキルである。いくつかの実施形態では、 $R^3$  は、任意に置換された  $C_9 - C_{16}$  アルキルである。いくつかの実施形態では、 $R^3$  は、任意に置換された  $C_8 - C_{10}$  アルキルである。いくつかの実施形態では、 $R^3$  は、任意に置換された  $C_{11} - C_{13}$  アルキルである。いくつかの実施形態では、 $R^3$  は、任意に置換された  $C_{14} - C_{16}$  アルキルである。いくつかの実施形態



では、 $R^3$ は、任意に置換された $C_9$ アルキルである。いくつかの実施形態では、 $R^3$ は、任意に置換された $C_{10}$ アルキルである。いくつかの実施形態では、 $R^3$ は、任意に置換された $C_{11}$ アルキルである。いくつかの実施形態では、 $R^3$ は、任意に置換された $C_{12}$ アルキルである。いくつかの実施形態では、 $R^3$ は、任意に置換された $C_{13}$ アルキルである。いくつかの実施形態では、 $R^3$ は、任意に置換された $C_{14}$ アルキルである。いくつかの実施形態では、 $R^3$ は、任意に置換された $C_{15}$ アルキルである。いくつかの実施形態では、 $R^3$ は、任意に置換された $C_{16}$ アルキルである。

【0495】

いくつかの実施形態では、 $R^3$ は、任意に置換された $C_2 - C_{14}$ アルケニルである。いくつかの実施形態では、 $R^3$ は、任意に置換された $C_5 - C_{14}$ アルケニルである。いくつかの実施形態では、 $R^3$ は、任意に置換された $C_7 - C_{14}$ アルケニルである。いくつかの実施形態では、 $R^3$ は、任意に置換された $C_9 - C_{14}$ アルケニルである。いくつかの実施形態では、 $R^3$ は、任意に置換された $C_{10} - C_{14}$ アルケニルである。いくつかの実施形態では、 $R^3$ は、任意に置換された $C_{12} - C_{14}$ アルケニルである。

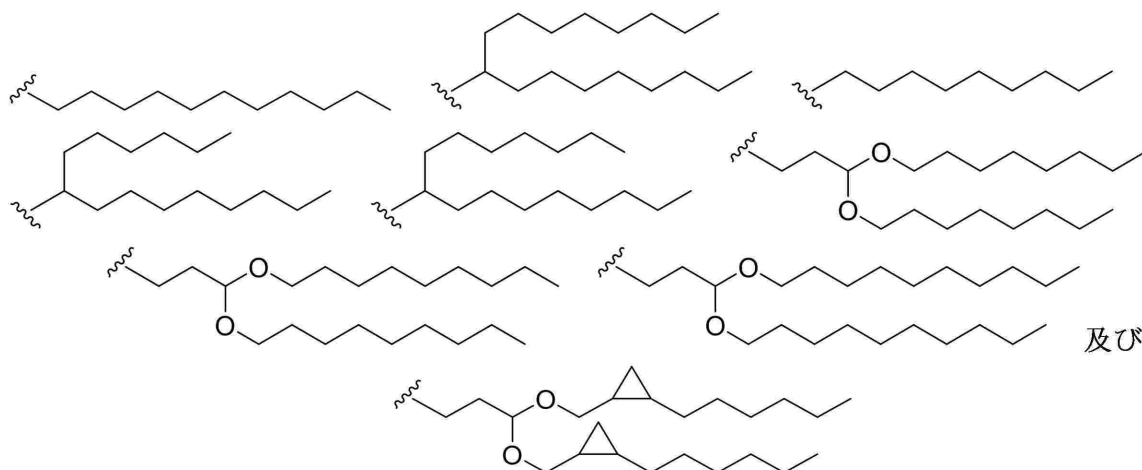
【0496】

いくつかの実施形態では、 $R^3$ は、 $-(CH_2)_qCH(OR^8)(OR^9)$ である。いくつかの実施形態では、 $R^3$ は、 $-CH(OR^8)(OR^9)$ である。いくつかの実施形態では、 $R^3$ は、 $-CH_2CH(OR^8)(OR^9)$ である。いくつかの実施形態では、 $R^3$ は、 $-(CH_2)_2CH(OR^8)(OR^9)$ である。いくつかの実施形態では、 $R^3$ は、 $-(CH_2)_3CH(OR^8)(OR^9)$ である。いくつかの実施形態では、 $R^3$ は、 $-(CH_2)_4CH(OR^8)(OR^9)$ である。

【0497】

いくつかの実施形態では、 $R^3$ は、

【化13】



及び

からなる群から選択される。

【0498】

$R^6$ 、 $R^7$ 、 $R^8$ 、 $R^9$

いくつかの実施形態では、 $R^6$ 、 $R^7$ 、 $R^8$ 、及び $R^9$ は、独立して、任意に置換された $C_1 - C_{14}$ アルキル、任意に置換された $C_2 - C_{14}$ アルケニル、または $-(CH_2)_m-A-(CH_2)_nH$ である。いくつかの実施形態では、 $R^6$ 、 $R^7$ 、 $R^8$ 、及び $R^9$ は、独立して、任意に置換された $C_1 - C_{14}$ アルキルである。いくつかの実施形態では、 $R^6$ 、 $R^7$ 、 $R^8$ 、及び $R^9$ は、独立して、任意に置換された $C_2 - C_{14}$ アルケニルである。いくつかの実施形態では、 $R^6$ 、 $R^7$ 、 $R^8$ 、及び $R^9$ は、独立して、 $-(CH_2)_m-A-(CH_2)_nH$ である。

【0499】

10

20

30

40

50

**【 0 5 0 4 】**

いくつかの実施形態では、各  $n$  は、独立して、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、または12である。いくつかの実施形態では、各  $n$  は、0である。いくつかの実施形態では、各  $n$  は、1である。いくつかの実施形態では、各  $n$  は、2である。いくつかの実施形態では、各  $n$  は、3である。いくつかの実施形態では、各  $n$  は、4である。いくつかの実施形態では、各  $n$  は、5である。いくつかの実施形態では、各  $n$  は、6である。いくつかの実施形態では、各  $n$  は、7である。いくつかの実施形態では、各  $n$  は、8である。いくつかの実施形態では、各  $n$  は、9である。いくつかの実施形態では、各  $n$  は、10である。いくつかの実施形態では、各  $n$  は、11である。いくつかの実施形態では、各  $n$  は、12である。

【0505】

10

いくつかの実施形態では、各  $A$  は、独立して、 $C_3-C_8$  シクロアルキレニルである。いくつかの実施形態では、各  $A$  は、シクロプロピレニルである。

【0506】

$X^1$

いくつかの実施形態では、 $X^1$  は、任意に置換された  $C_2-C_6$  アルキレニルである。いくつかの実施形態では、 $X^1$  は、任意に置換された  $C_2-C_5$  アルキレニルである。いくつかの実施形態では、 $X^1$  は、任意に置換された  $C_2-C_4$  アルキレニルである。いくつかの実施形態では、 $X^1$  は、任意に置換された  $C_2-C_3$  アルキレニルである。いくつかの実施形態では、 $X^1$  は、任意に置換された  $C_2$  アルキレニルである。いくつかの実施形態では、 $X^1$  は、任意に置換された  $C_3$  アルキレニルである。いくつかの実施形態では、 $X^1$  は、任意に置換された  $C_4$  アルキレニルである。いくつかの実施形態では、 $X^1$  は、任意に置換された  $C_5$  アルキレニルである。いくつかの実施形態では、 $X^1$  は、任意に置換された  $C_6$  アルキレニルである。いくつかの実施形態では、 $X^1$  は、任意に置換された  $-(CH_2)_2-$  である。いくつかの実施形態では、 $X^1$  は、任意に置換された  $-(CH_2)_3-$  である。いくつかの実施形態では、 $X^1$  は、任意に置換された  $-(CH_2)_4-$  である。いくつかの実施形態では、 $X^1$  は、任意に置換された  $-(CH_2)_5-$  である。いくつかの実施形態では、 $X^1$  は、任意に置換された  $-(CH_2)_6-$  である。

20

【0507】

$X^2$

いくつかの実施形態では、 $X^2$  は、結合、 $-CH_2-$  及び  $-CH_2CH_2-$  からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、 $X^2$  は、結合である。いくつかの実施形態では、 $X^2$  は、 $-CH_2-$  である。いくつかの実施形態では、 $X^2$  は、 $-CH_2CH_2-$  である。

30

【0508】

$X^{2'}$

いくつかの実施形態では、 $X^{2'}$  は、結合、 $-CH_2-$  及び  $-CH_2CH_2-$  からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、 $X^{2'}$  は、結合である。いくつかの実施形態では、 $X^{2'}$  は、 $-CH_2-$  である。いくつかの実施形態では、 $X^{2'}$  は、 $-CH_2CH_2-$  である。

40

【0509】

$X^3$

いくつかの実施形態では、 $X^3$  は、結合、 $-CH_2-$  及び  $-CH_2CH_2-$  からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、 $X^3$  は、結合である。いくつかの実施形態では、 $X^3$  は、 $-CH_2-$  である。いくつかの実施形態では、 $X^3$  は、 $-CH_2CH_2-$  である。

【0510】

$X^{3'}$

いくつかの実施形態では、 $X^{3'}$  は、結合、 $-CH_2-$  及び  $-CH_2CH_2-$  からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、 $X^{3'}$  は、結合である。いくつかの実施形態では、 $X^{3'}$  は、 $-CH_2-$  である。いくつかの実施形態では、 $X^{3'}$  は、 $-CH_2CH_2-$

50

ーである。

【0511】

$X^4$

いくつかの実施形態では、 $X^4$ は、任意に置換された $C_2-C_{14}$ アルキレニル及び任意に置換された $C_2-C_{14}$ アルケニレニルからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、 $X^4$ は、任意に置換された $C_2-C_{14}$ アルキレニルである。いくつかの実施形態では、 $X^4$ は、任意に置換された $C_2-C_{10}$ アルキレニルである。いくつかの実施形態では、 $X^4$ は、任意に置換された $C_2-C_8$ アルキレニルである。いくつかの実施形態では、 $X^4$ は、任意に置換された $C_2-C_6$ アルキレニルである。いくつかの実施形態では、 $X^4$ は、任意に置換された $C_3-C_6$ アルキレニルである。いくつかの実施形態では、 $X^4$ は、任意に置換された $C_3$ アルキレニルである。いくつかの実施形態では、 $X^4$ は、任意に置換された $C_4$ アルキレニルである。いくつかの実施形態では、 $X^4$ は、任意に置換された $C_5$ アルキレニルである。いくつかの実施形態では、 $X^4$ は、任意に置換された $C_6$ アルキレニルである。いくつかの実施形態では、 $X^4$ は、任意に置換された $-(CH_2)_2-$ である。いくつかの実施形態では、 $X^4$ は、任意に置換された $-(CH_2)_3-$ である。いくつかの実施形態では、 $X^4$ は、任意に置換された $-(CH_2)_4-$ である。いくつかの実施形態では、 $X^4$ は、任意に置換された $-(CH_2)_5-$ である。いくつかの実施形態では、 $X^4$ は、任意に置換された $-(CH_2)_6-$ である。

10

【0512】

$X^5$

いくつかの実施形態では、 $X^5$ は、任意に置換された $C_2-C_{14}$ アルキレニル及び任意に置換された $C_2-C_{14}$ アルケニレニルからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、 $X^5$ は、任意に置換された $C_2-C_{14}$ アルキレニルである。いくつかの実施形態では、 $X^5$ は、任意に置換された $C_2-C_{10}$ アルキレニルである。いくつかの実施形態では、 $X^5$ は、任意に置換された $C_2-C_8$ アルキレニルである。いくつかの実施形態では、 $X^5$ は、任意に置換された $C_2-C_6$ アルキレニルである。いくつかの実施形態では、 $X^5$ は、任意に置換された $C_3-C_6$ アルキレニルである。いくつかの実施形態では、 $X^5$ は、任意に置換された $C_3$ アルキレニルである。いくつかの実施形態では、 $X^5$ は、任意に置換された $C_4$ アルキレニルである。いくつかの実施形態では、 $X^5$ は、任意に置換された $C_5$ アルキレニルである。いくつかの実施形態では、 $X^5$ は、任意に置換された $C_6$ アルキレニルである。いくつかの実施形態では、 $X^5$ は、任意に置換された $-(CH_2)_2-$ である。いくつかの実施形態では、 $X^5$ は、任意に置換された $-(CH_2)_3-$ である。いくつかの実施形態では、 $X^5$ は、任意に置換された $-(CH_2)_4-$ である。いくつかの実施形態では、 $X^5$ は、任意に置換された $-(CH_2)_5-$ である。いくつかの実施形態では、 $X^5$ は、任意に置換された $-(CH_2)_6-$ である。

20

30

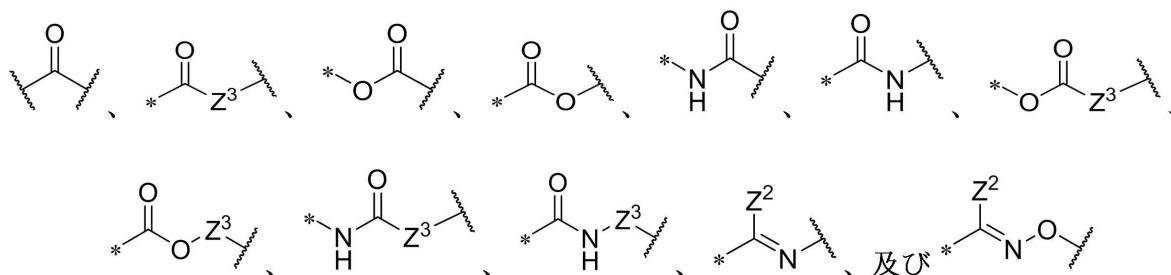
【0513】

$Y^1$

いくつかの実施形態では、 $Y^1$ は、

【化14】

40



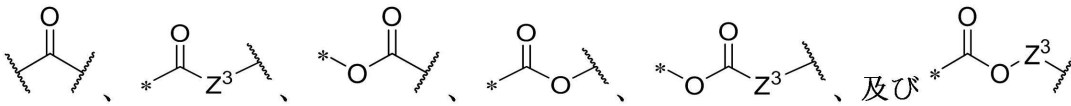
からなる群から選択される。

50

【0514】

いくつかの実施形態では、 $Y^1$  は、

【化15】



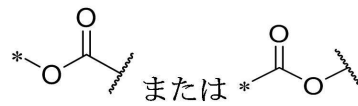
からなる群から選択される。

【0515】

10

いくつかの実施形態では、 $Y^1$  は、

【化16】



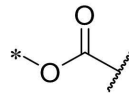
である。

【0516】

20

いくつかの実施形態では、 $Y^1$  は、

【化17】



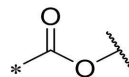
である。

【0517】

いくつかの実施形態では、 $Y^1$  は、

【化18】

30



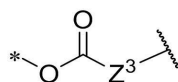
である。

【0518】

いくつかの実施形態では、 $Y^1$  は、

【化19】

40



である。

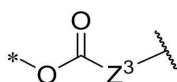
【0519】

 $Y^2$ いくつかの実施形態では、 $Y^2$  は、

50



【化 2 5】



である。

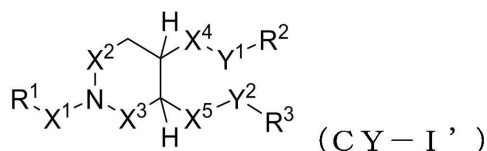
【0 5 2 5】

式 (CY-I')

いくつかの実施形態では、本開示の脂質は、式 (CY-I') の構造：

10

【化 2 6】

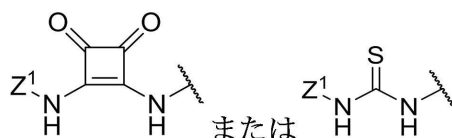


またはその薬学的に許容可能な塩（式中、

R<sup>1</sup> は、-OH、R<sup>1a</sup>、

20

【化 2 7】



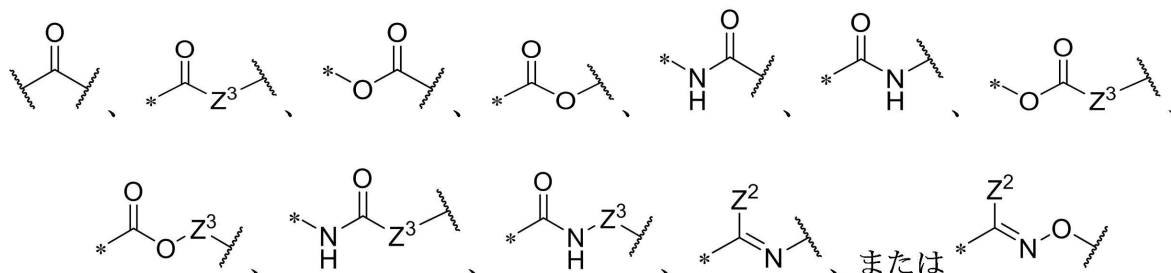
であり；

Z<sup>1</sup> は、任意に置換された C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> アルキルであり；X<sup>1</sup> は、任意に置換された C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> アルキレニルであり；X<sup>2</sup> 及び X<sup>3</sup> は、独立して、結合、-CH<sub>2</sub>-、または -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-であり；

30

X<sup>4</sup> 及び X<sup>5</sup> は、独立して、任意に置換された C<sub>2</sub>-C<sub>14</sub> アルキレニルまたは任意に置換された C<sub>2</sub>-C<sub>14</sub> アルケニレニルであり；Y<sup>1</sup> 及び Y<sup>2</sup> は、独立して、

【化 2 8】



40

であり；

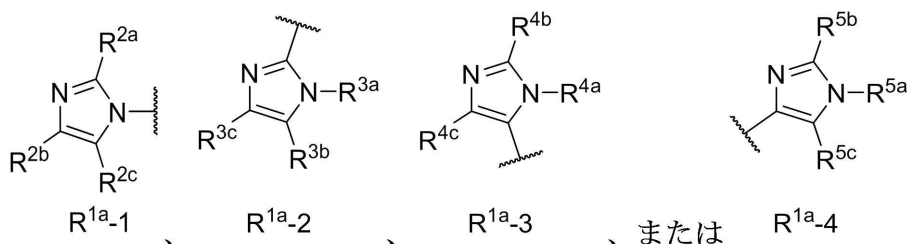
「\*」でマークされた結合は、X<sup>4</sup> または X<sup>5</sup> に結合されており；各 Z<sup>2</sup> は、独立して、H または任意に置換された C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> アルキルであり；各 Z<sup>3</sup> は、独立して、任意に置換された C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> アルキレニルであり；R<sup>2</sup> は、任意に置換された C<sub>4</sub>-C<sub>20</sub> アルキル、任意に置換された C<sub>2</sub>-C<sub>14</sub> アルケニル、または -CH(OR<sup>6</sup>)(OR<sup>7</sup>) であり；

50

$R^3$  は、任意に置換された  $C_4 - C_{20}$  アルキル、任意に置換された  $C_2 - C_{14}$  アルケニル、または  $-CH(OR^8)(OR^9)$  であり；

$R^{1a}$  は、

【化 29】



10

であり；

$R^{2a}$ 、 $R^{2b}$ 、及び  $R^{2c}$  は、独立して、水素及び  $C_1 - C_6$  アルキルであり；

$R^{3a}$ 、 $R^{3b}$ 、及び  $R^{3c}$  は、独立して、水素及び  $C_1 - C_6$  アルキルであり；

$R^{4a}$ 、 $R^{4b}$ 、及び  $R^{4c}$  は、独立して、水素及び  $C_1 - C_6$  アルキルであり；

$R^{5a}$ 、 $R^{5b}$ 、及び  $R^{5c}$  は、独立して、水素及び  $C_1 - C_6$  アルキルであり；

$R^6$ 、 $R^7$ 、 $R^8$ 、及び  $R^9$  は、独立して、任意に置換された  $C_1 - C_{14}$  アルキル、任意に置換された  $C_2 - C_{14}$  アルケニル、または  $-(CH_2)_m-A-(CH_2)_nH$  であり；

20

A は、 $C_3 - C_8$  シクロアルキレニルであり；

各  $m$  は、独立して、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、または 12 であり；

各  $n$  は、独立して、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、または 12 である）を有する。

【0526】

いくつかの実施形態では、本開示の脂質は、式 (CY-I') の構造 (式中、

$R^1$  は、 $-OH$ 、 $R^{1a}$ 、

30

【化 30】



であり、

$Z^1$  は、任意に置換された  $C_1 - C_6$  アルキルであり；

$X^1$  は、任意に置換された  $C_2 - C_6$  アルキレニルであり；

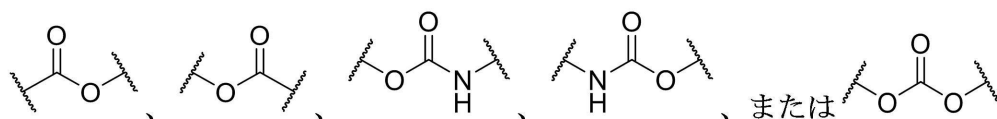
40

$X^2$  及び  $X^3$  は、独立して、結合、 $-CH_2-$ 、または  $-CH_2CH_2-$  であり；

$X^4$  及び  $X^5$  は、独立して、任意に置換された  $C_2 - C_{14}$  アルキレニルであり；

$Y^1$  及び  $Y^2$  は、独立して、

【化 31】



50

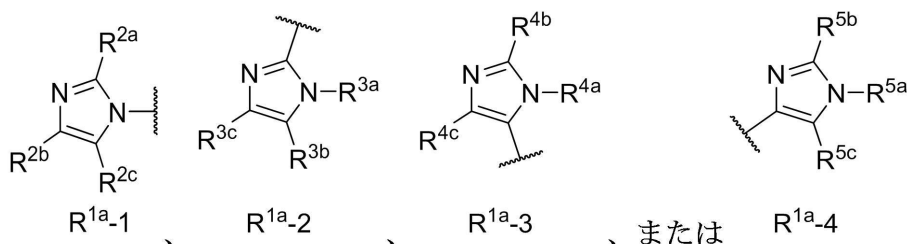


であり；

$R^2$  及び  $R^3$  は、独立して、任意に置換された  $C_4 - C_{20}$  アルキルであり；

$R^{1a}$  は、

【化 3 2】



10

であり；

$R^{2a}$ 、 $R^{2b}$ 、及び  $R^{2c}$  は、独立して、水素及び  $C_1 - C_6$  アルキルであり；

$R^{3a}$ 、 $R^{3b}$ 、及び  $R^{3c}$  は、独立して、水素及び  $C_1 - C_6$  アルキルであり；

$R^{4a}$ 、 $R^{4b}$ 、及び  $R^{4c}$  は、独立して、水素及び  $C_1 - C_6$  アルキルであり；

$R^{5a}$ 、 $R^{5b}$ 、及び  $R^{5c}$  は、独立して、水素及び  $C_1 - C_6$  アルキルである）を有する。

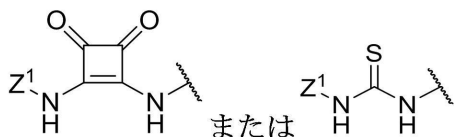
20

【0 5 2 7】

いくつかの実施形態では、本開示の脂質は、式（CY-III'）の構造（式中、

$R^1$  は、 $-OH$ 、 $R^{1a}$ 、

【化 3 3】



30

であり、

$Z^1$  は、任意に置換された  $C_1 - C_6$  アルキルであり；

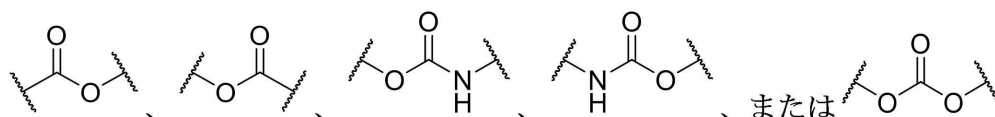
$X^1$  は、任意に置換された  $C_2 - C_6$  アルキレニルであり；

$X^2$  及び  $X^3$  は、独立して、結合、 $-CH_2-$ 、または  $-CH_2CH_2-$  であり；

$X^4$  及び  $X^5$  は、独立して、任意に置換された  $C_2 - C_{14}$  アルキレニルであり；

$Y^1$  及び  $Y^2$  は、独立して、

【化 3 4】



40

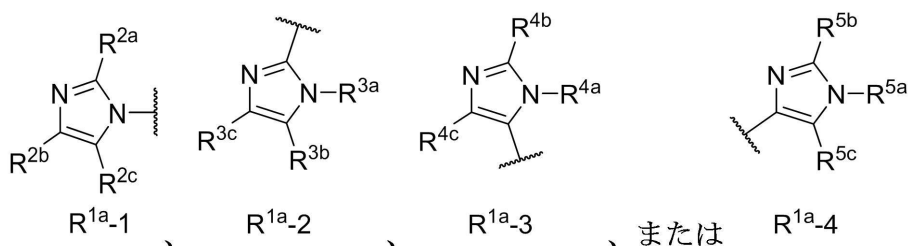
であり；

$R^2$  及び  $R^3$  は、独立して、任意に置換された  $C_4 - C_{20}$  アルキルであり；

$R^{1a}$  は、

50

## 【化 3 5】



10

であり；

R<sup>2a</sup>、R<sup>2b</sup>、及びR<sup>2c</sup>は、独立して、水素及びC<sub>1</sub>－C<sub>6</sub>アルキルであり；

R<sup>3a</sup>、R<sup>3b</sup>、及びR<sup>3c</sup>は、独立して、水素及びC<sub>1</sub>－C<sub>6</sub>アルキルであり；

R<sup>4a</sup>、R<sup>4b</sup>、及びR<sup>4c</sup>は、独立して、水素及びC<sub>1</sub>－C<sub>6</sub>アルキルであり；

R<sup>5a</sup>、R<sup>5b</sup>、及びR<sup>5c</sup>は、独立して、水素及びC<sub>1</sub>－C<sub>6</sub>アルキルである）を有する。

## 【0528】

いくつかの実施形態では、本開示の脂質は、式（CY－I'）の構造（式中、R<sup>1</sup>は、－OH、

20

## 【化 3 6】



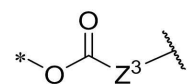
である）を有する。

## 【0529】

いくつかの実施形態では、本開示の脂質は、式（CY－I'）の構造（式中、Y<sup>1</sup>及びY<sup>2</sup>は、独立して、

30

## 【化 3 7】



である）を有する。

## 【0530】

いくつかの実施形態では、本開示の脂質は、式（CY－I'）の構造（式中、R<sup>2</sup>は、－CH（OR<sup>6</sup>）（OR<sup>7</sup>）である）を有する。

40

## 【0531】

いくつかの実施形態では、本開示の脂質は、式（CY－I'）の構造（式中、R<sup>3</sup>は、－CH（OR<sup>8</sup>）（OR<sup>9</sup>）である）を有する。

## 【0532】

式（CY－I'）の構造を有する脂質の非限定的な例には、化合物CY1、CY2、CY3、CY9、CY10、CY11、CY12、CY22、CY23、CY24、CY30、CY31、CY32、CY33、CY43、CY44、CY45、CY50、CY51、CY52、及びCY53が含まれる。

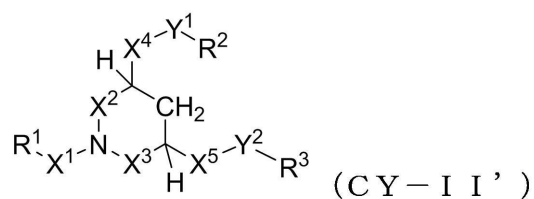
## 【0533】

50

式 (CY-III')

いくつかの実施形態では、本開示の脂質は、式 (CY-III') の構造：

【化38】



10

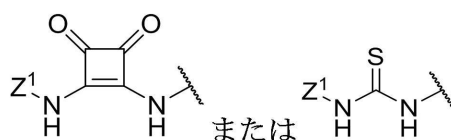
またはその薬学的に許容可能な塩（式中、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $X^1$ 、 $X^2$ 、 $X^3$ 、 $X^4$ 、 $X^5$ 、 $Y^1$ 、及び $Y^2$ は、式 (CY-I') に関連して定義されるとおりである）を有する。

【0534】

いくつかの実施形態では、本開示の脂質は、式 (CY-III') の構造（式中、

$R^1$  は、 $-OH$ 、 $R^{1a}$ 、

【化39】



20

であり、

$Z^1$  は、任意に置換された  $C_1 - C_6$  アルキルであり；

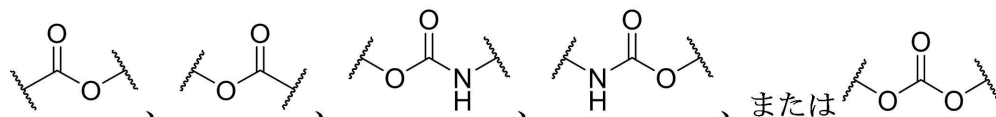
$X^1$  は、任意に置換された  $C_2 - C_6$  アルキレニルであり；

$X^2$  及び  $X^3$  は、独立して、結合、 $-CH_2-$ 、または  $-CH_2CH_2-$  であり；

$X^4$  及び  $X^5$  は、独立して、任意に置換された  $C_2 - C_{14}$  アルキレニルであり；

$Y^1$  及び  $Y^2$  は、独立して、

【化40】



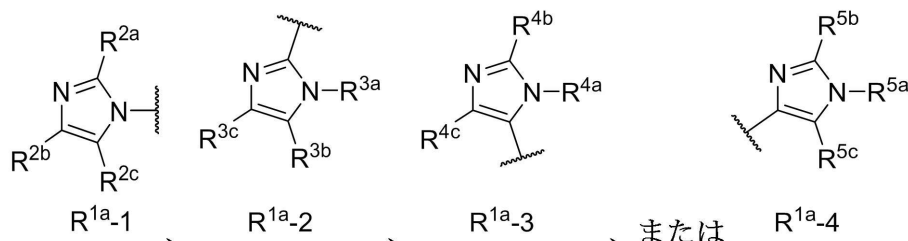
30

であり；

$R^2$  及び  $R^3$  は、独立して、任意に置換された  $C_4 - C_{20}$  アルキルであり；

$R^{1a}$  は、

【化41】



40

50



またはその薬学的に許容可能な塩（式中、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $X^1$ 、 $X^2$ 、 $X^3$ 、 $X^4$ 、 $X^5$ 、 $Y^1$ 、及び $Y^2$ は、式（CY-I'）に関連して定義されるとおりである）を有する。

【0541】

いくつかの実施形態では、本開示の脂質は、式（CY-II I'）の構造（式中、 $R^1$ は、 $-OH$ 、 $R^{1a}$ 、

【化45】



10

であり、

$Z^1$ は、任意に置換された $C_1 - C_6$ アルキルであり；

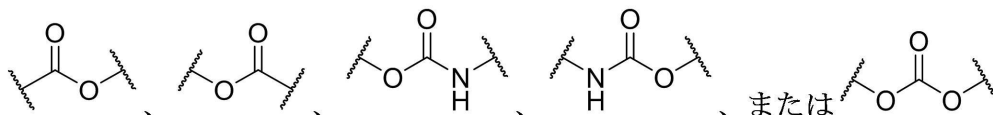
$X^1$ は、任意に置換された $C_2 - C_6$ アルキレニルであり；

$X^2$ 及び $X^3$ は、独立して、結合、 $-CH_2-$ 、または $-CH_2CH_2-$ であり；

$X^4$ 及び $X^5$ は、独立して、任意に置換された $C_2 - C_{14}$ アルキレニルであり；

$Y^1$ 及び $Y^2$ は、独立して、

【化46】



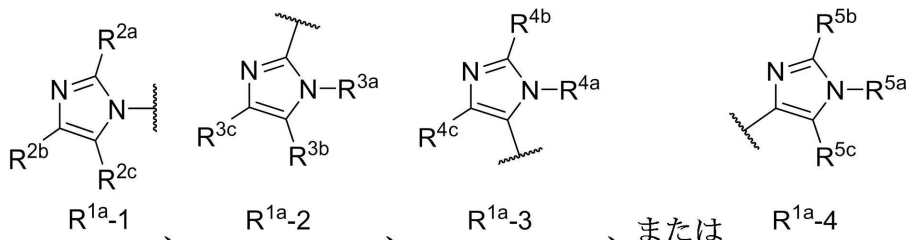
20

であり；

$R^2$ 及び $R^3$ は、独立して、任意に置換された $C_4 - C_{20}$ アルキルであり；

$R^{1a}$ は、

【化47】



30

であり；

$R^{2a}$ 、 $R^{2b}$ 、及び $R^{2c}$ は、独立して、水素及び $C_1 - C_6$ アルキルであり；

$R^{3a}$ 、 $R^{3b}$ 、及び $R^{3c}$ は、独立して、水素及び $C_1 - C_6$ アルキルであり；

$R^{4a}$ 、 $R^{4b}$ 、及び $R^{4c}$ は、独立して、水素及び $C_1 - C_6$ アルキルであり；

$R^{5a}$ 、 $R^{5b}$ 、及び $R^{5c}$ は、独立して、水素及び $C_1 - C_6$ アルキルである）を有する。

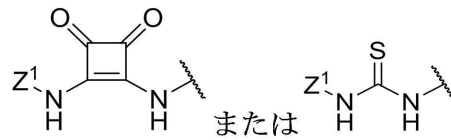
【0542】

いくつかの実施形態では、本開示の脂質は、式（CY-II I'）の構造（式中、 $R^1$ は、 $-OH$ 、

40

50

【化 4 8】



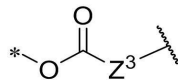
である)を有する。

【0543】

いくつかの実施形態では、本開示の脂質は、式 (CY-III') の構造 (式中、Y<sup>1</sup> 及び Y<sup>2</sup> は、独立して、

10

【化 4 9】



である)を有する。

【0544】

いくつかの実施形態では、本開示の脂質は、式 (CY-III') の構造 (式中、R<sup>2</sup> は、-CH(OR<sup>6</sup>)(OR<sup>7</sup>)である)を有する。

20

【0545】

いくつかの実施形態では、本開示の脂質は、式 (CY-III') の構造 (式中、R<sup>3</sup> は、-CH(OR<sup>8</sup>)(OR<sup>9</sup>)である)を有する。

【0546】

式 (CY-III') の構造を有する脂質の非限定的な例には、化合物 CY 6、CY 14、CY 27、CY 35、CY 47、及び CY 55 が含まれる。

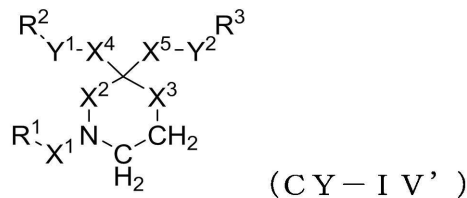
【0547】

式 (CY-IV)

いくつかの実施形態では、本開示の脂質は、式 (CY-IV') の構造：

30

【化 5 0】



40

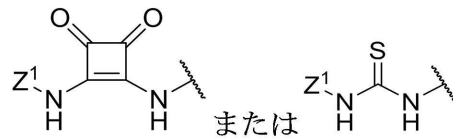
またはその薬学的に許容可能な塩 (式中、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、X<sup>1</sup>、X<sup>2</sup>、X<sup>3</sup>、X<sup>4</sup>、X<sup>5</sup>、Y<sup>1</sup>、及び Y<sup>2</sup> は、式 (CY-I') に関連して定義されるとおりである)を有する。

【0548】

いくつかの実施形態では、本開示の脂質は、式 (CY-IV') の構造 (式中、R<sup>1</sup> は、-OH、R<sup>1a</sup>、

50

【化 5 1】

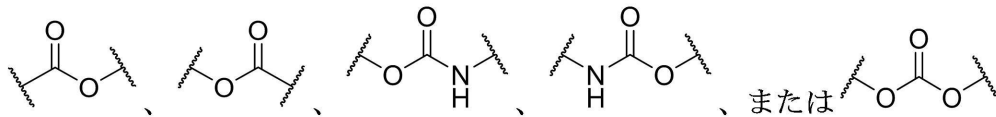


であり、

 $Z^1$  は、任意に置換された  $C_1 - C_6$  アルキルであり； $X^1$  は、任意に置換された  $C_2 - C_6$  アルキレニルであり； $X^2$  及び  $X^3$  は、独立して、結合、 $-CH_2-$ 、または  $-CH_2CH_2-$  であり； $X^4$  及び  $X^5$  は、独立して、任意に置換された  $C_2 - C_{14}$  アルキレニルであり； $Y^1$  及び  $Y^2$  は、独立して、

10

【化 5 2】

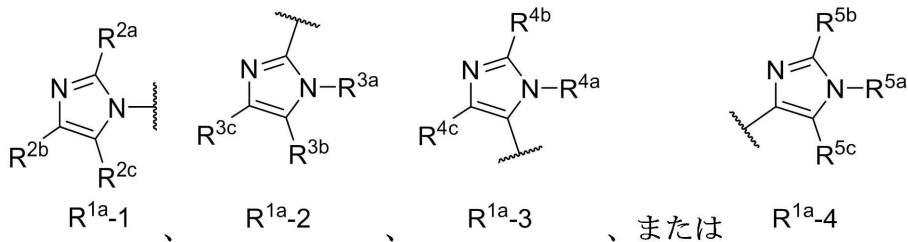


20

であり；

 $R^2$  及び  $R^3$  は、独立して、任意に置換された  $C_4 - C_{20}$  アルキルであり； $R^{1a}$  は、

【化 5 3】



30

であり；

 $R^{2a}$ 、 $R^{2b}$ 、及び  $R^{2c}$  は、独立して、水素及び  $C_1 - C_6$  アルキルであり； $R^{3a}$ 、 $R^{3b}$ 、及び  $R^{3c}$  は、独立して、水素及び  $C_1 - C_6$  アルキルであり； $R^{4a}$ 、 $R^{4b}$ 、及び  $R^{4c}$  は、独立して、水素及び  $C_1 - C_6$  アルキルであり； $R^{5a}$ 、 $R^{5b}$ 、及び  $R^{5c}$  は、独立して、水素及び  $C_1 - C_6$  アルキルである）を有す

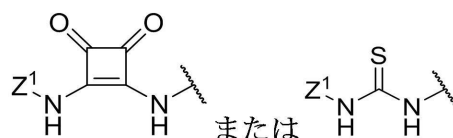
る。

40

【0549】

いくつかの実施形態では、本開示の脂質は、式（CY-IV'）の構造（式中、 $R^1$  は、 $-OH$ 、

【化 5 4】



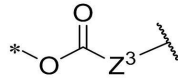
50

である)を有する。

【0550】

いくつかの実施形態では、本開示の脂質は、式(CY-IV')の構造(式中、Y<sup>1</sup>及びY<sup>2</sup>は、独立して、

【化55】



10

である)を有する。

【0551】

いくつかの実施形態では、本開示の脂質は、式(CY-IV')の構造(式中、R<sup>2</sup>は、-CH(OR<sup>6</sup>)(OR<sup>7</sup>)である)を有する。

【0552】

いくつかの実施形態では、本開示の脂質は、式(CY-IV')の構造(式中、R<sup>3</sup>は、-CH(OR<sup>8</sup>)(OR<sup>9</sup>)である)を有する。

【0553】

式(CY-IV')の構造を有する脂質の非限定的な例には、化合物CY7、CY8、CY19、CY20、CY21、CY28、CY29、CY40、CY41、CY42、CY48、CY49、CY58、CY59、及びCY60が含まれる。

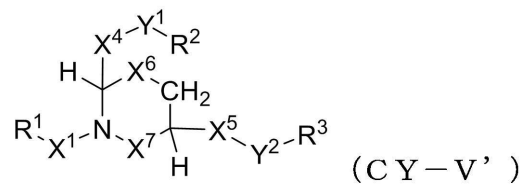
20

【0554】

式(CY-V')

いくつかの実施形態では、本開示の脂質は、式(CY-V')の構造：

【化56】



30

またはその薬学的に許容可能な塩(式中、

X<sup>6</sup>及びX<sup>7</sup>は、独立して、-CH<sub>2</sub>-または-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-であり；

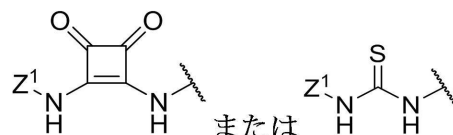
R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、X<sup>1</sup>、X<sup>4</sup>、X<sup>5</sup>、Y<sup>1</sup>、及びY<sup>2</sup>は、式(CY-I')に関連して定義されるとおりである)を有する。

【0555】

いくつかの実施形態では、本開示の脂質は、式(CY-V')の構造(式中、

R<sup>1</sup>は、-OH、R<sup>1a</sup>、

【化57】



であり、

Z<sup>1</sup>は、任意に置換されたC<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>アルキルであり；

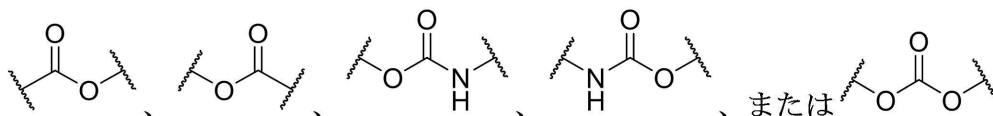
X<sup>1</sup>は、任意に置換されたC<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>アルキレニルであり；

50



$X^2$  及び  $X^3$  は、独立して、結合、 $-CH_2-$ 、または  $-CH_2CH_2-$  であり；  
 $X^4$  及び  $X^5$  は、独立して、任意に置換された  $C_2-C_{14}$  アルキレニルであり；  
 $Y^1$  及び  $Y^2$  は、独立して、

【化 5 8】



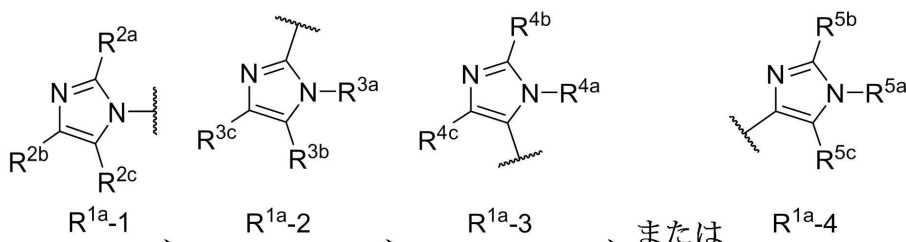
10

であり；

$R^2$  及び  $R^3$  は、独立して、任意に置換された  $C_4-C_{20}$  アルキルであり；

$R^{1a}$  は、

【化 5 9】



20

であり；

$R^{2a}$ 、 $R^{2b}$ 、及び  $R^{2c}$  は、独立して、水素及び  $C_1-C_6$  アルキルであり；

$R^{3a}$ 、 $R^{3b}$ 、及び  $R^{3c}$  は、独立して、水素及び  $C_1-C_6$  アルキルであり；

$R^{4a}$ 、 $R^{4b}$ 、及び  $R^{4c}$  は、独立して、水素及び  $C_1-C_6$  アルキルであり；

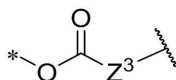
$R^{5a}$ 、 $R^{5b}$ 、及び  $R^{5c}$  は、独立して、水素及び  $C_1-C_6$  アルキルである）を有する。

30

【0 5 5 6】

いくつかの実施形態では、本開示の脂質は、式（CY-V'）の構造（式中、 $Y^1$  及び  $Y^2$  は、独立して、

【化 6 0】



である）を有する。

40

【0 5 5 7】

いくつかの実施形態では、本開示の脂質は、式（CY-V'）の構造（式中、 $R^2$  は、 $-CH(OR^6)(OR^7)$  である）を有する。

【0 5 5 8】

いくつかの実施形態では、本開示の脂質は、式（CY-V'）の構造（式中、 $R^2$  は、 $-CH(OR^8)(OR^9)$  である）を有する。

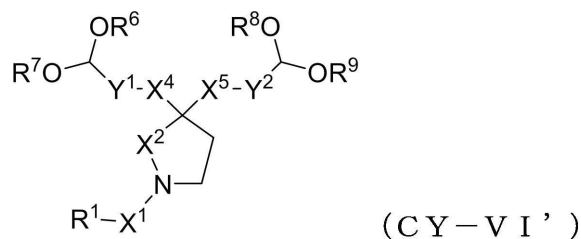
【0 5 5 9】

式（CY-V'）の構造を有する脂質の非限定的な例には、化合物 CY 1 3、CY 1 5、CY 3 4、CY 3 6、及び CY 5 4 が含まれる。

【0 5 6 0】

50

いくつかの実施形態では、本開示の脂質は、式 (CY-VI') の構造：  
【化61】



10

またはその薬学的に許容可能な塩（式中、R<sup>1</sup>、R<sup>6</sup>、R<sup>7</sup>、R<sup>8</sup>、R<sup>9</sup>、X<sup>1</sup>、X<sup>2</sup>、X<sup>3</sup>、X<sup>4</sup>、X<sup>5</sup>、Y<sup>1</sup>、及びY<sup>2</sup>は、式 (CY-I') に関連して定義されるとおりである）を有する。

【0561】

いくつかの実施形態では、本開示の脂質は、式 (CY-VI') の構造、またはその薬学的に許容可能な塩（式中、R<sup>1</sup>は、-OHである）を有する。

【0562】

いくつかの実施形態では、本開示の脂質は、式 (CY-VI') の構造、またはその薬学的に許容可能な塩（式中、X<sup>1</sup>は、C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>アルキレニルである）を有する。

20

【0563】

いくつかの実施形態では、本開示の脂質は、式 (CY-VI') の構造、またはその薬学的に許容可能な塩（式中、X<sup>2</sup>は、-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-である）を有する。

【0564】

いくつかの実施形態では、本開示の脂質は、式 (CY-VI') の構造、またはその薬学的に許容可能な塩（式中、X<sup>4</sup>は、C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>アルキレニルである）を有する。

【0565】

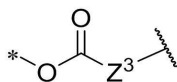
いくつかの実施形態では、本開示の脂質は、式 (CY-VI') の構造、またはその薬学的に許容可能な塩（式中、X<sup>5</sup>は、C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>アルキレニルである）を有する。

30

【0566】

いくつかの実施形態では、本開示の脂質は、式 (CY-VI') の構造、またはその薬学的に許容可能な塩（式中、Y<sup>1</sup>は、

【化62】



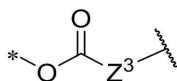
である）を有する。

40

【0567】

いくつかの実施形態では、本開示の脂質は、式 (CY-VI') の構造、またはその薬学的に許容可能な塩（式中、Y<sup>2</sup>は、

【化63】



である）を有する。

50

## 【0568】

いくつかの実施形態では、本開示の脂質は、式（CY-VI'）の構造、またはその薬学的に許容可能な塩（式中、各Z<sup>3</sup>は、独立して、任意に置換されたC<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>アルケニルである）を有する。

## 【0569】

いくつかの実施形態では、本開示の脂質は、式（CY-VI'）の構造、またはその薬学的に許容可能な塩（式中、各Z<sup>3</sup>は、-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-である）を有する。

## 【0570】

いくつかの実施形態では、本開示の脂質は、式（CY-VI'）の構造、またはその薬学的に許容可能な塩（式中、R<sup>6</sup>は、C<sub>5</sub>-C<sub>14</sub>アルキルである）を有する。

10

## 【0571】

いくつかの実施形態では、本開示の脂質は、式（CY-VI'）の構造、またはその薬学的に許容可能な塩（式中、R<sup>7</sup>は、C<sub>5</sub>-C<sub>14</sub>アルキルである）を有する。

## 【0572】

いくつかの実施形態では、本開示の脂質は、式（CY-VI'）の構造、またはその薬学的に許容可能な塩（式中、R<sup>6</sup>は、C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>アルケニルである）を有する。

## 【0573】

いくつかの実施形態では、本開示の脂質は、式（CY-VI'）の構造、またはその薬学的に許容可能な塩（式中、R<sup>7</sup>は、C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>アルケニルである）を有する。

## 【0574】

いくつかの実施形態では、本開示の脂質は、式（CY-VI'）の構造、またはその薬学的に許容可能な塩（式中、R<sup>8</sup>は、C<sub>5</sub>-C<sub>16</sub>アルキルである）を有する。

20

## 【0575】

いくつかの実施形態では、本開示の脂質は、式（CY-VI'）の構造、またはその薬学的に許容可能な塩（式中、R<sup>9</sup>は、C<sub>5</sub>-C<sub>14</sub>アルキルである）を有する。

## 【0576】

いくつかの実施形態では、本開示の脂質は、式（CY-VI'）の構造、またはその薬学的に許容可能な塩（式中、R<sup>8</sup>は、C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>アルケニルである）を有する。

## 【0577】

いくつかの実施形態では、本開示の脂質は、式（CY-VI'）の構造、またはその薬学的に許容可能な塩（式中、R<sup>9</sup>は、C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>アルケニルである）を有する。

30

## 【0578】

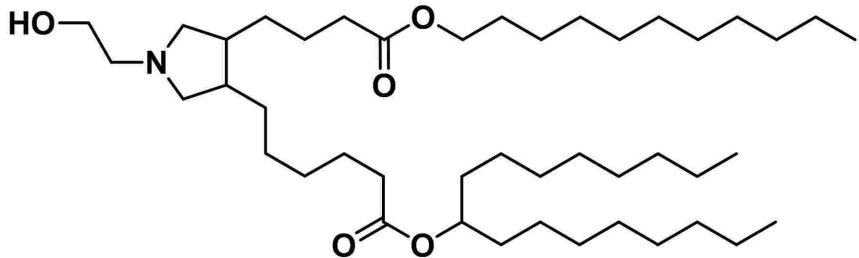
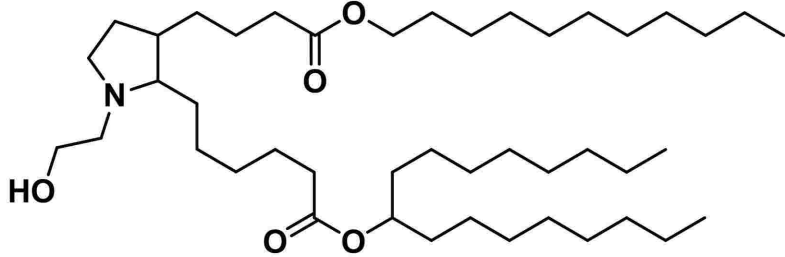
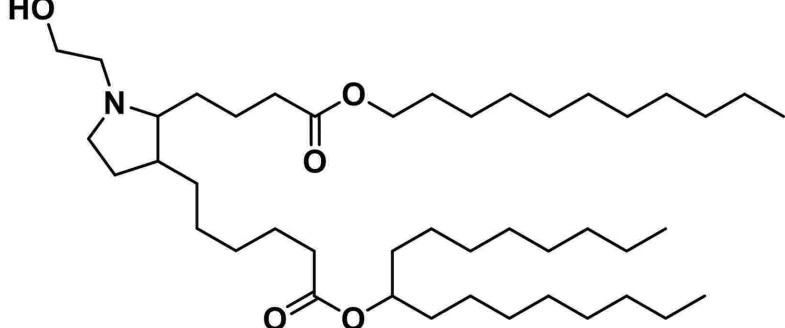
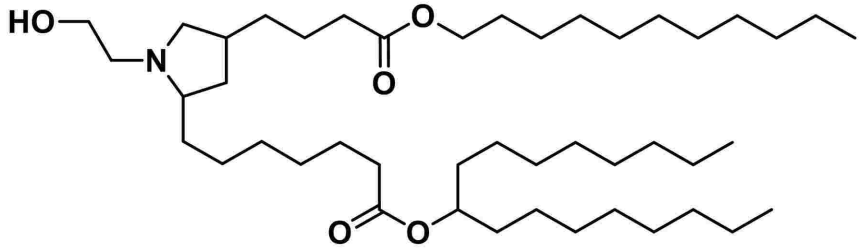
いくつかの実施形態では、本開示の脂質は、複素環式コア（式中、ヘテロ原子は、窒素である）を含む。いくつかの実施形態では、複素環式コアは、ピロリジンまたはその誘導体を含む。いくつかの実施形態では、複素環式コアは、ピペリジンまたはその誘導体を含む。いくつかの実施形態では、本開示の脂質は、以下の表（I）における任意の脂質またはその薬学的に許容可能な塩から選択される：

40

50

【表 1 - 1】

表（I）．環状コアを有するイオン化可能な脂質の非限定的な例

| 構造                                                                                   | 化合物番号 |
|--------------------------------------------------------------------------------------|-------|
|    | CY1   |
|     | CY2   |
|    | CY3   |
|  | CY4   |

10

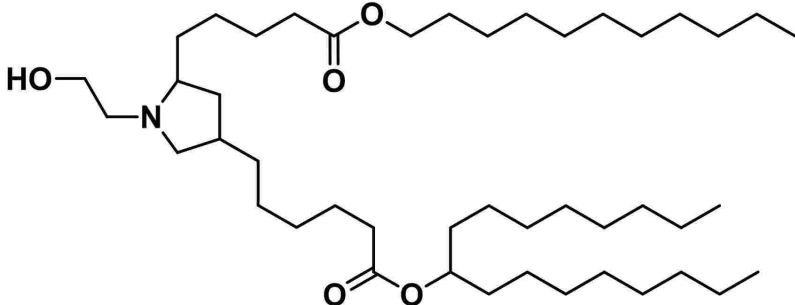
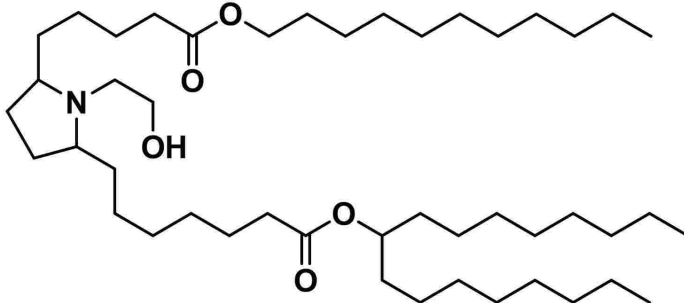
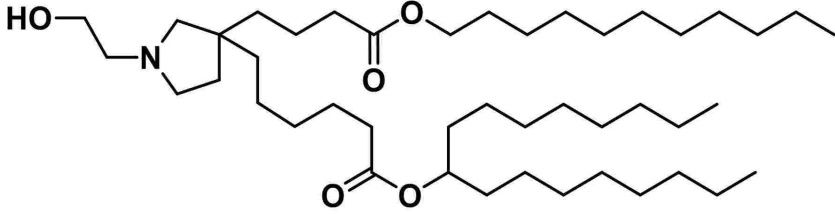
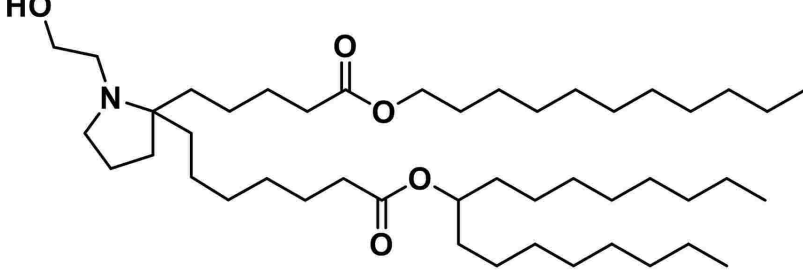
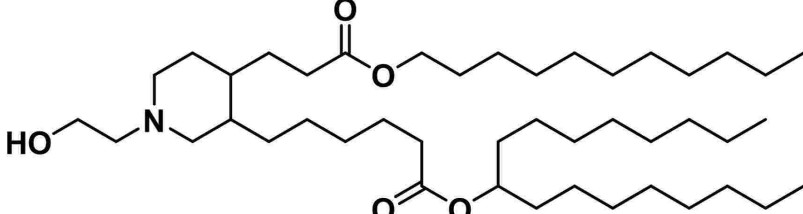
20

30

40

50

【表 1 - 2】

|                                                                                     |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-----|
|    | CY5 |
|    | CY6 |
|  | CY7 |
|  | CY8 |
|  | CY9 |

10

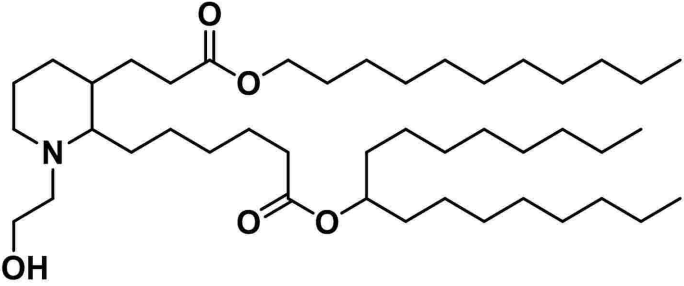
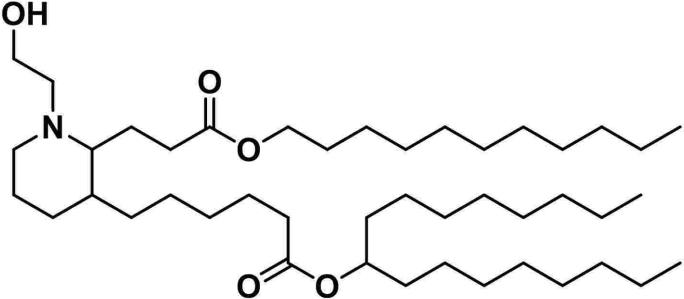
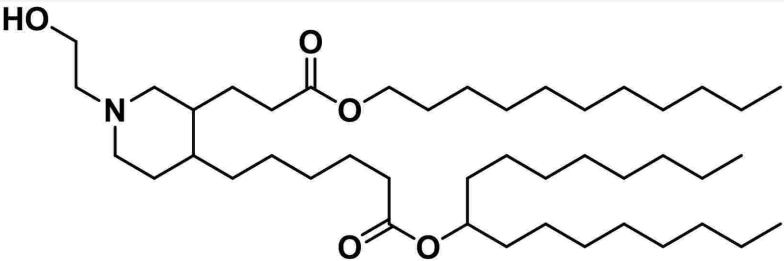
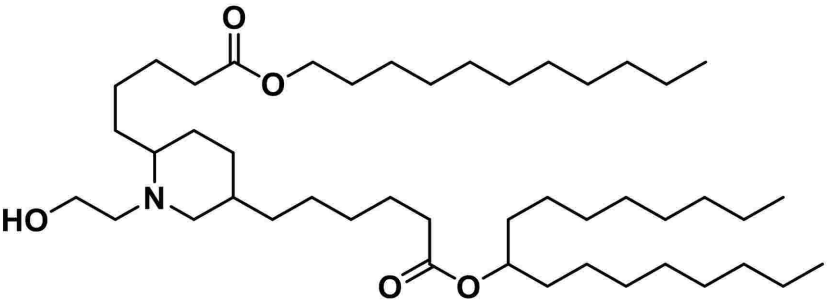
20

30

40

50

【表 1 - 3】

|                                                                                      |      |
|--------------------------------------------------------------------------------------|------|
|     | CY10 |
|     | CY11 |
|    | CY12 |
|  | CY13 |

10

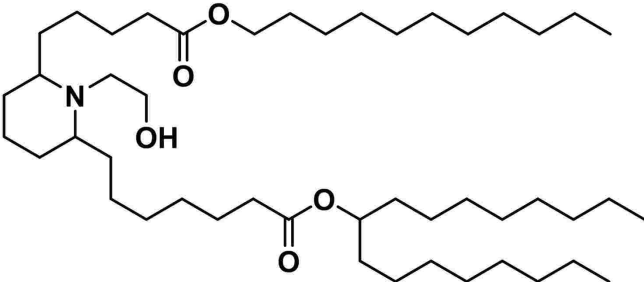
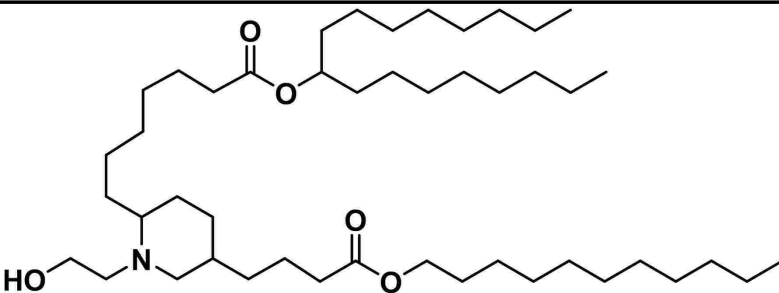
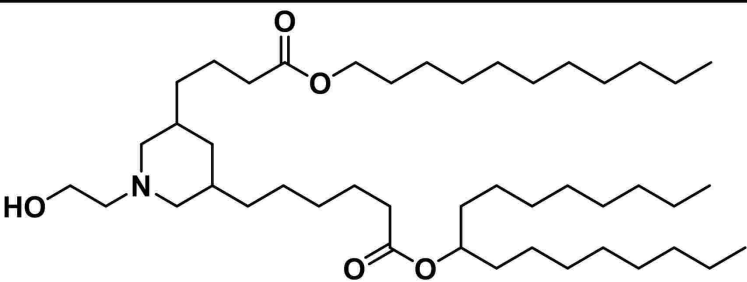
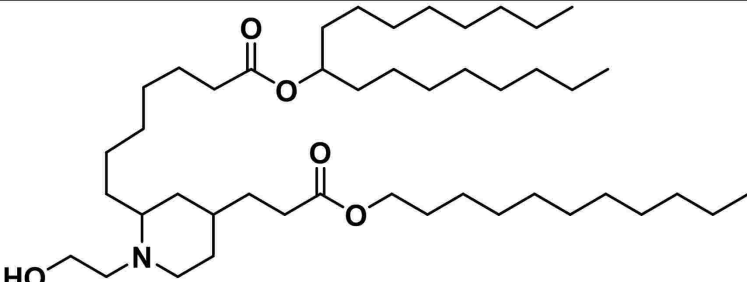
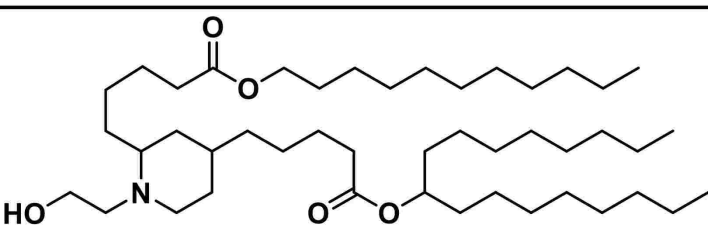
20

30

40

50

【表 1 - 4】

|                                                                                     |      |
|-------------------------------------------------------------------------------------|------|
|    | CY14 |
|    | CY15 |
|   | CY16 |
|  | CY17 |
|  | CY18 |

10

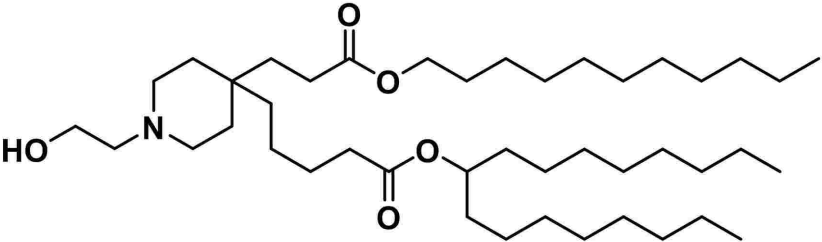
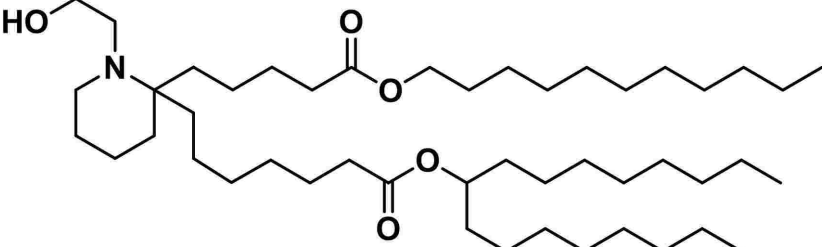
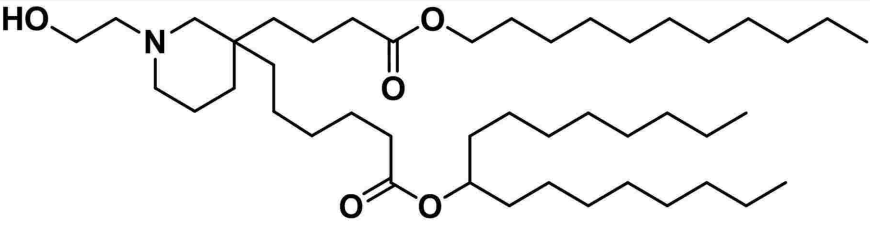
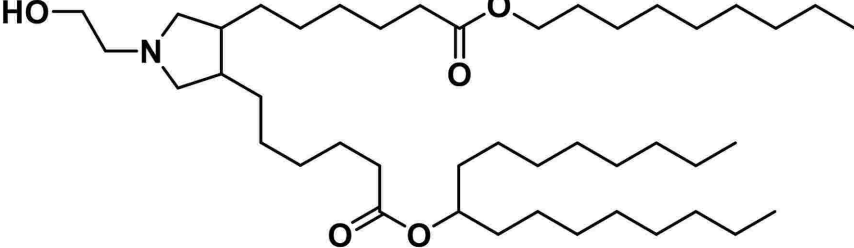
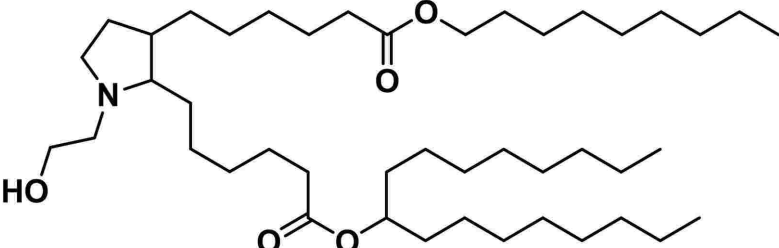
20

30

40

50

【表 1 - 5】

|                                                                                      |      |
|--------------------------------------------------------------------------------------|------|
|    | CY19 |
|    | CY20 |
|   | CY21 |
|  | CY22 |
|   | CY23 |

10

20

30

40

50



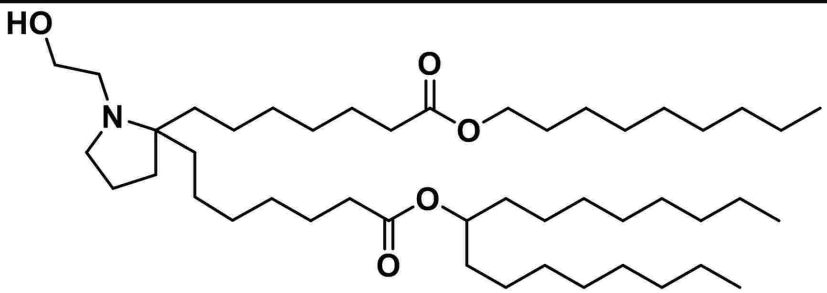
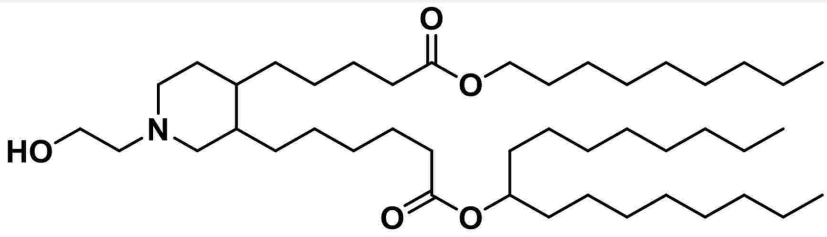
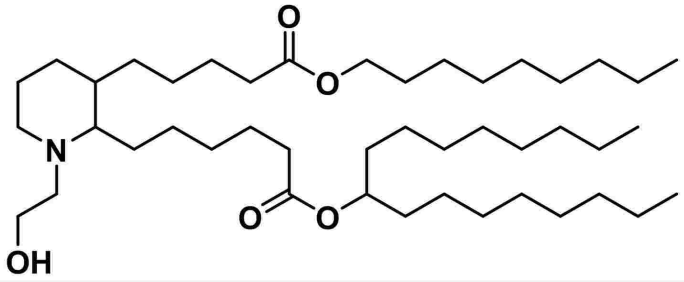
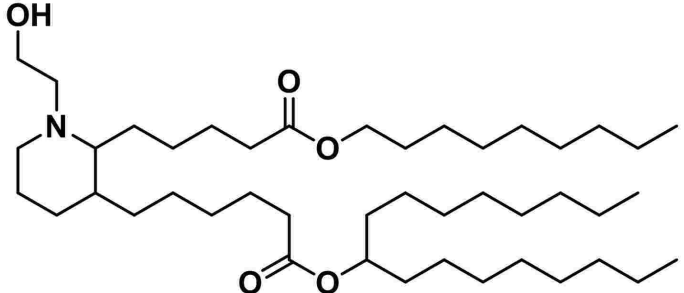
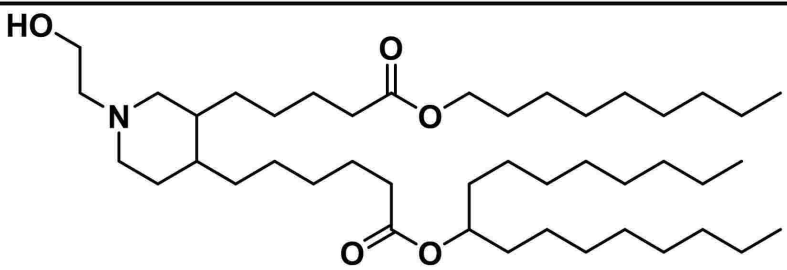
10

20

30

40

【表 1 - 7】

|                                                                                     |      |
|-------------------------------------------------------------------------------------|------|
|   | CY29 |
|   | CY30 |
|   | CY31 |
|  | CY32 |
|  | CY33 |

10

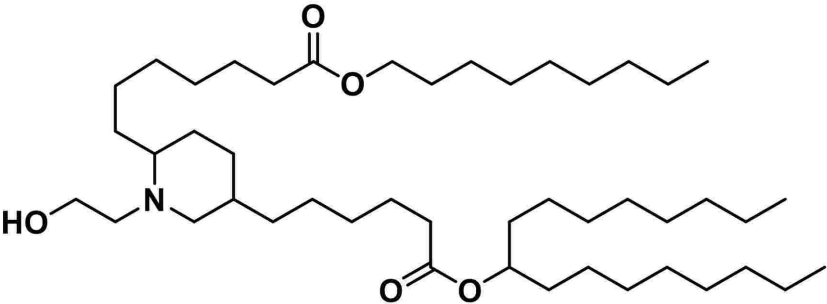
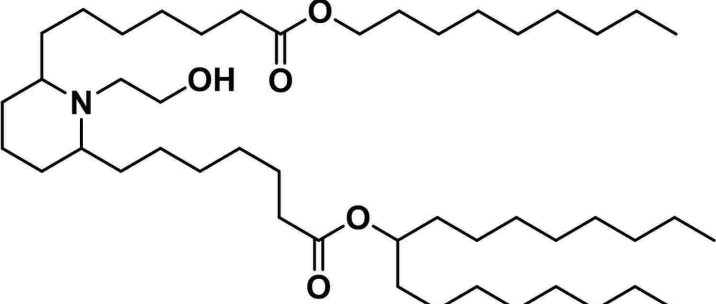
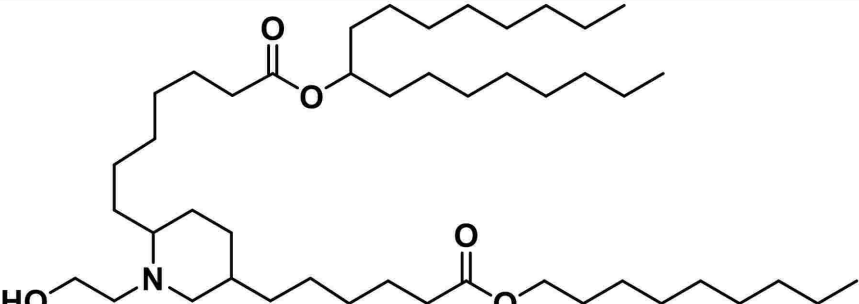
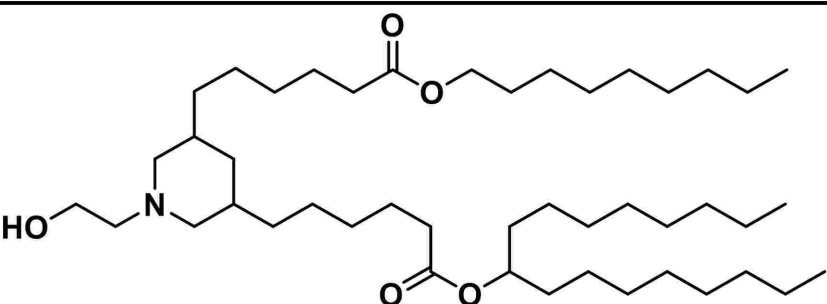
20

30

40

50

【表 1 - 8】

|                                                                                      |      |
|--------------------------------------------------------------------------------------|------|
|    | CY34 |
|     | CY35 |
|   | CY36 |
|  | CY37 |

10

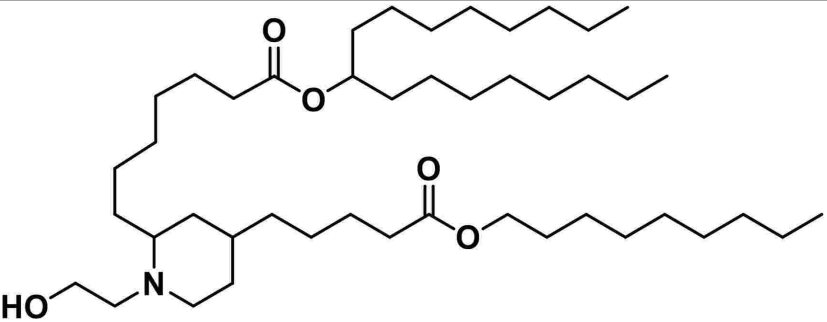
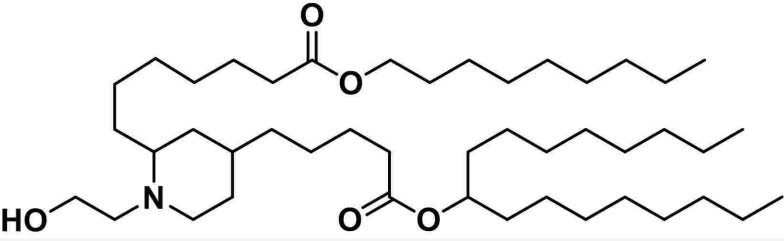
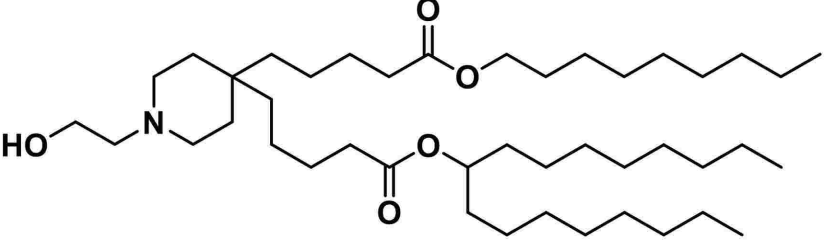
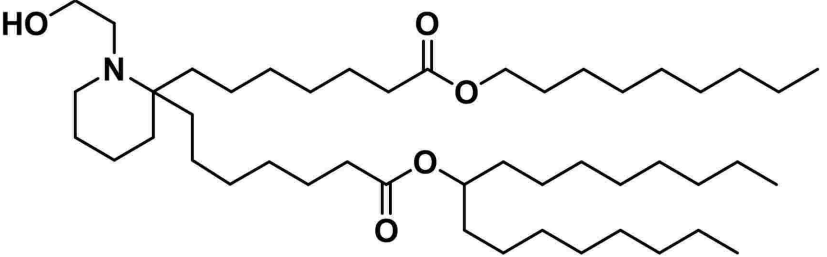
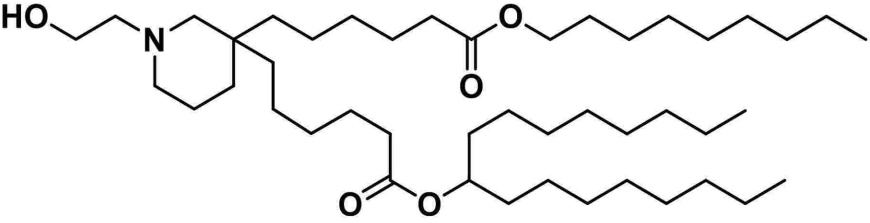
20

30

40

50

【表 1 - 9】

|                                                                                      |      |
|--------------------------------------------------------------------------------------|------|
|    | CY38 |
|     | CY39 |
|   | CY40 |
|  | CY41 |
|  | CY42 |

10

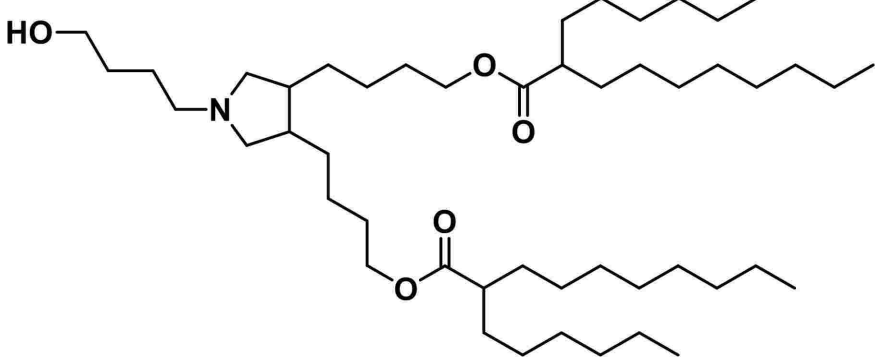
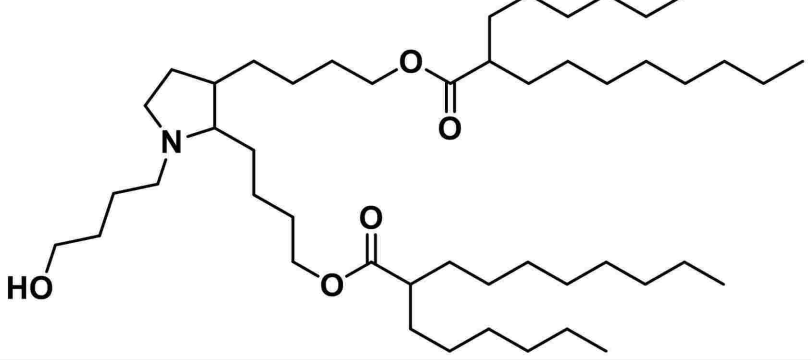
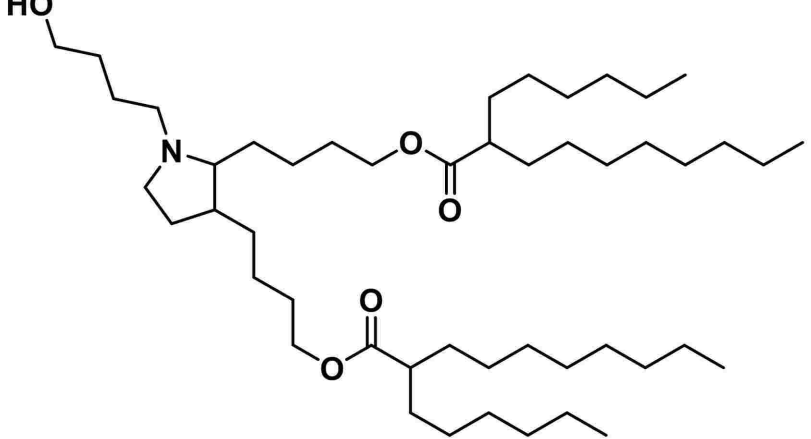
20

30

40

50

【表 1 - 1 0】

|                                                                                     |      |
|-------------------------------------------------------------------------------------|------|
|   | CY43 |
|    | CY44 |
|  | CY45 |

10

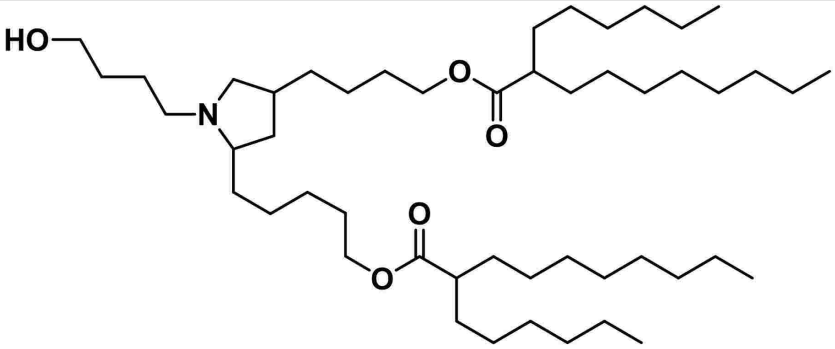
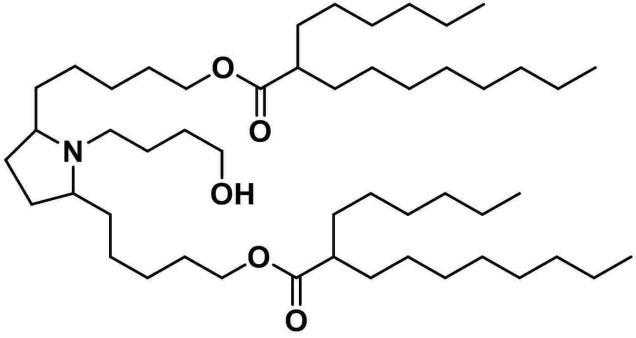
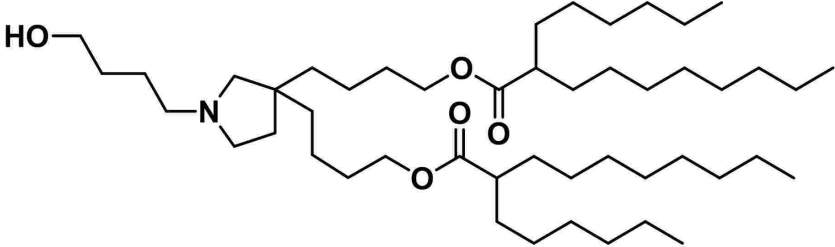
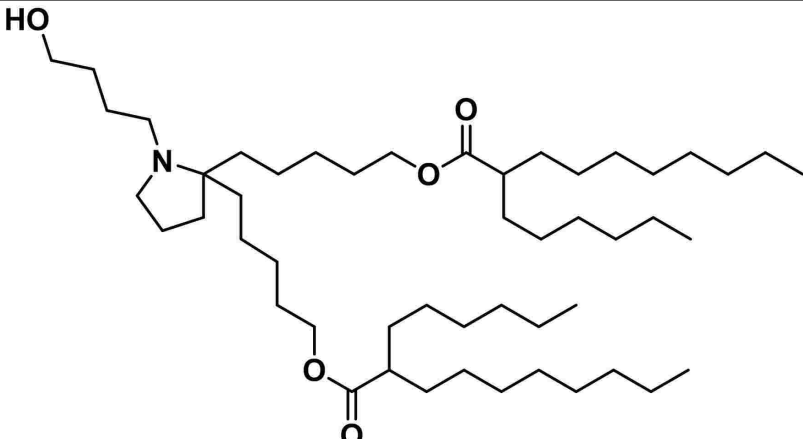
20

30

40

50

【表 1 - 1 1】

|                                                                                     |      |
|-------------------------------------------------------------------------------------|------|
|   | CY46 |
|    | CY47 |
|  | CY48 |
|  | CY49 |

10

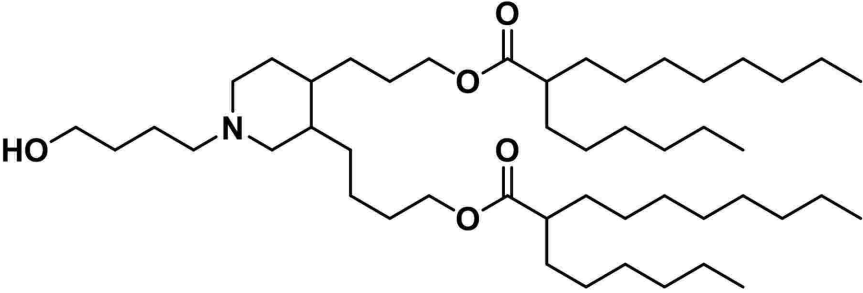
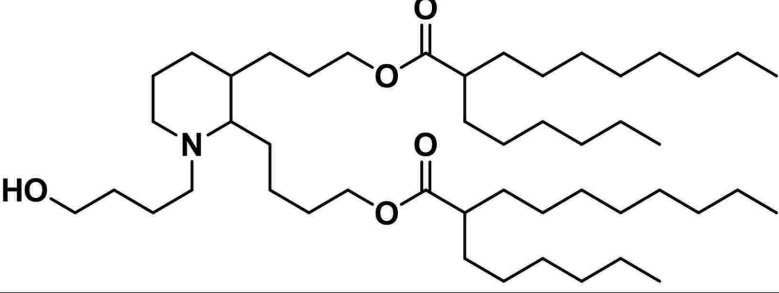
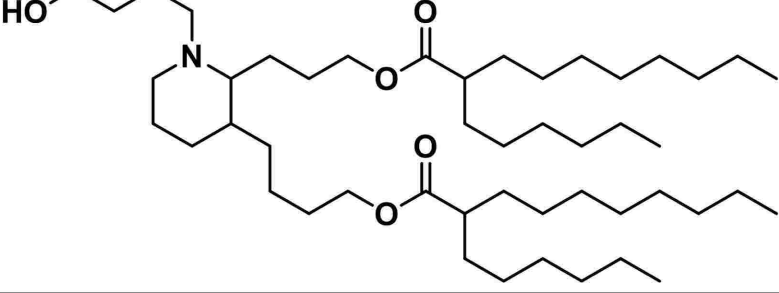
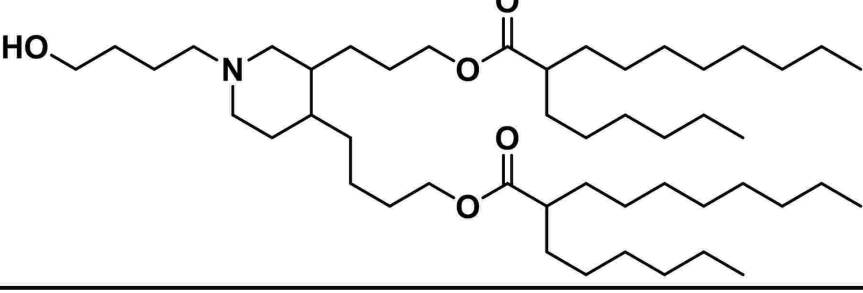
20

30

40

50

【表 1 - 1 2】

|                                                                                      |      |
|--------------------------------------------------------------------------------------|------|
|    | CY50 |
|     | CY51 |
|    | CY52 |
|  | CY53 |

10

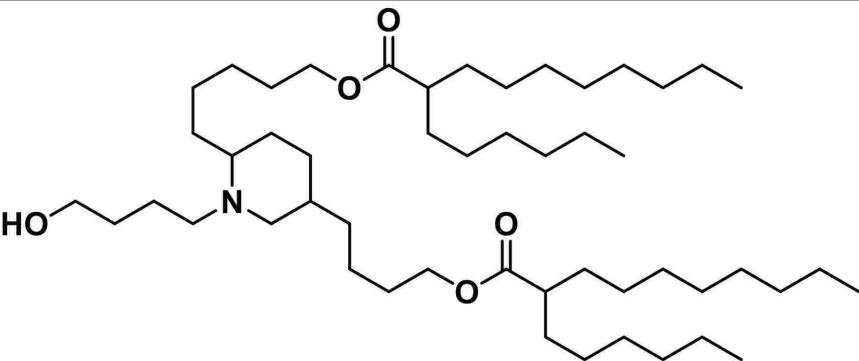
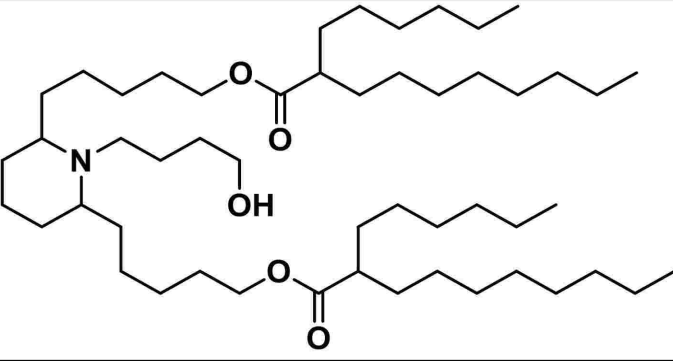
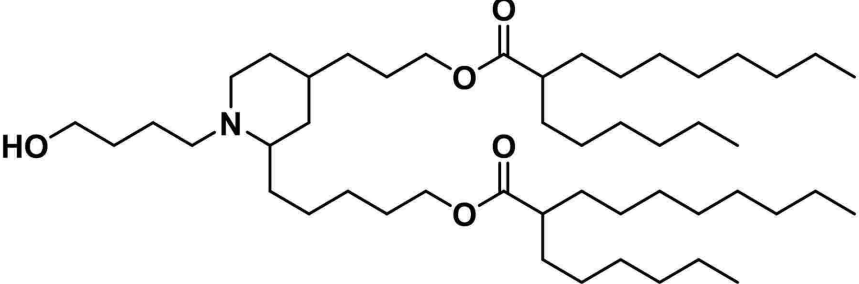
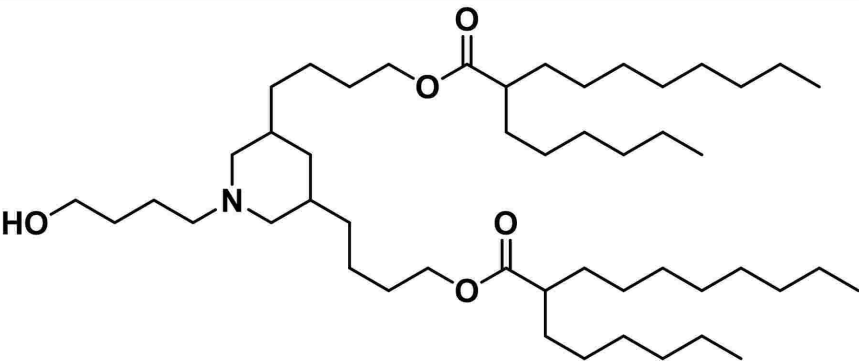
20

30

40

50

【表 1 - 1 3】

|                                                                                      |      |
|--------------------------------------------------------------------------------------|------|
|    | CY54 |
|     | CY55 |
|   | CY56 |
|  | CY57 |

10

20

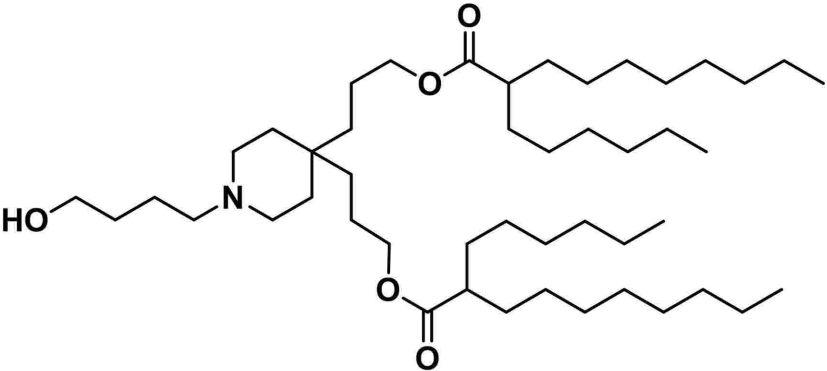
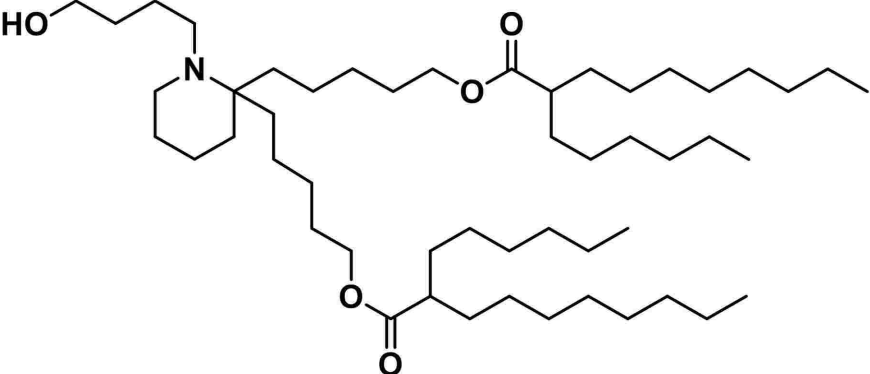
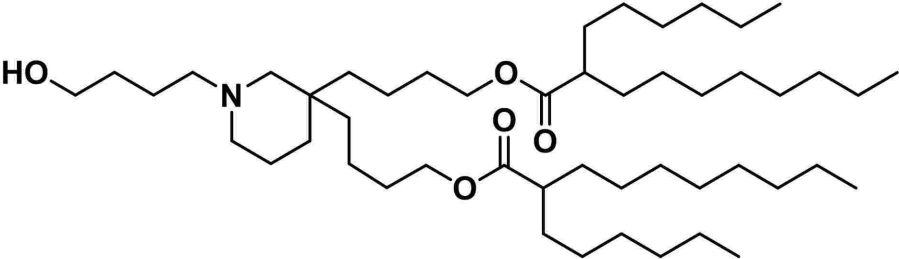
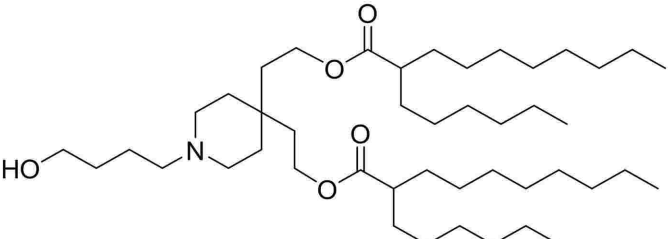
30

40

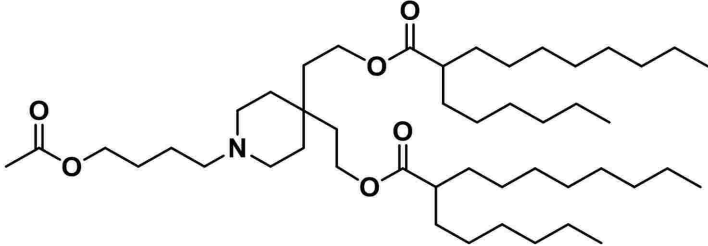
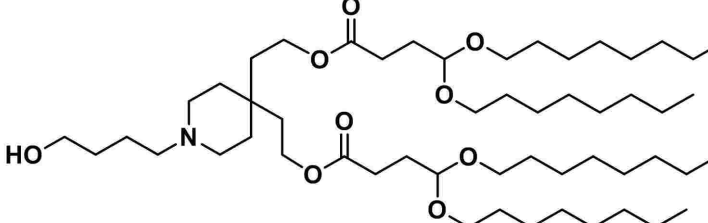
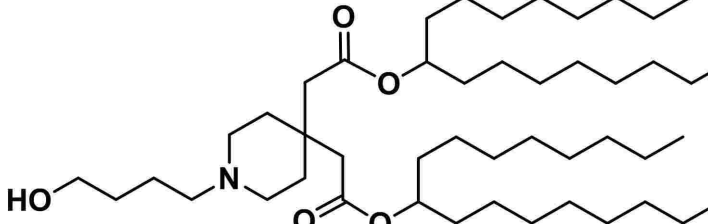
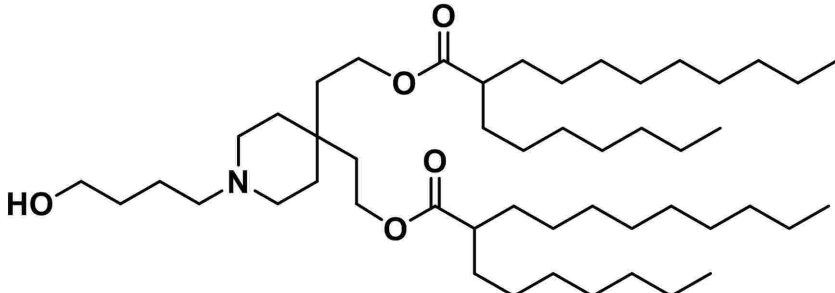
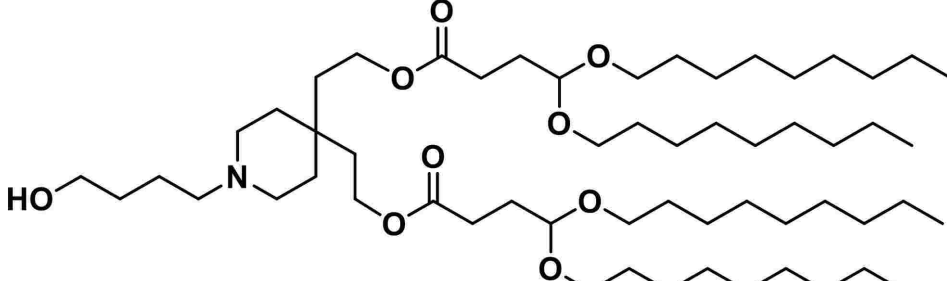
50



【表 1 - 1 4】

|                                                                                      |      |
|--------------------------------------------------------------------------------------|------|
|    | CY58 |
|   | CY59 |
|  | CY60 |
|   | CY61 |

【表 1 - 1 5】

|                                                                                      |      |
|--------------------------------------------------------------------------------------|------|
|     | CY62 |
|     | CY63 |
|     | CY64 |
|  | CY65 |
|  | CY66 |

10

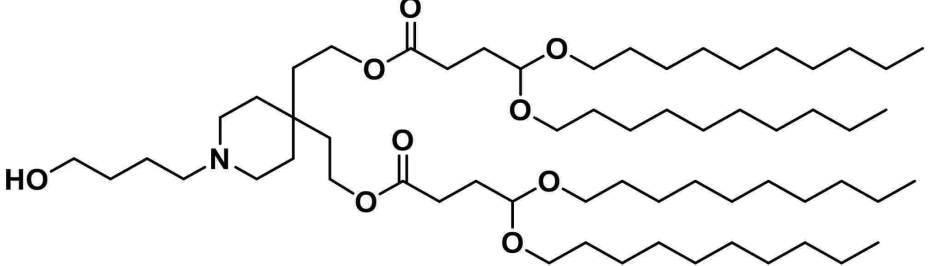
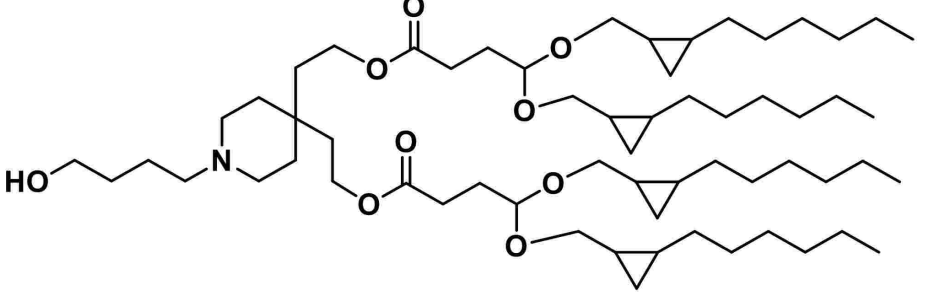
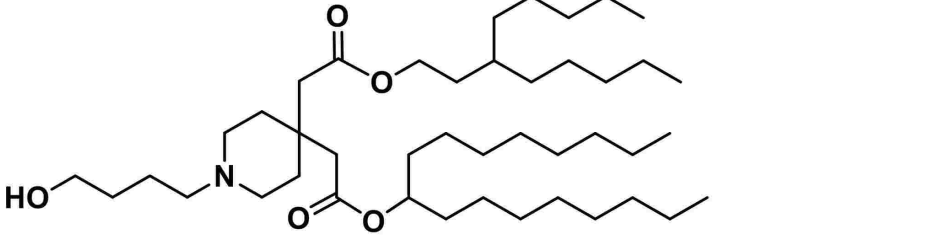
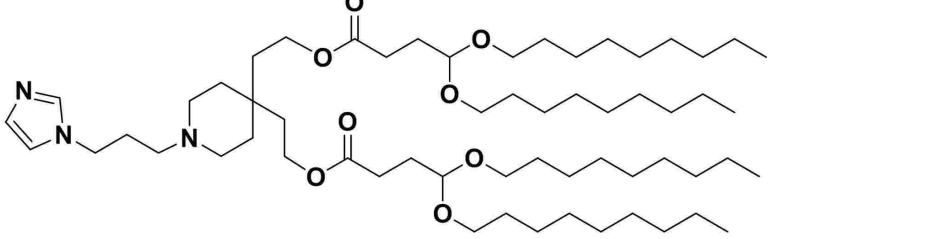
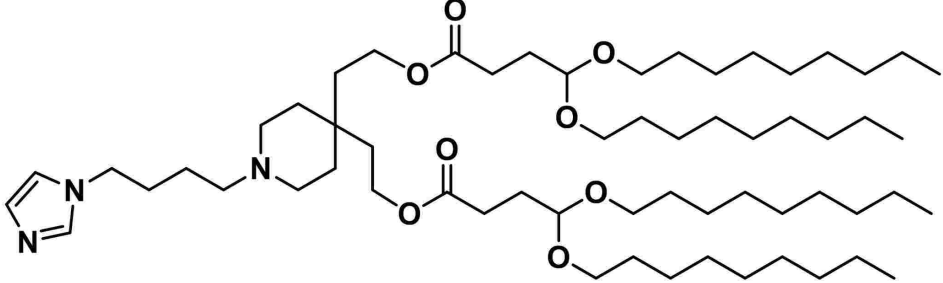
20

30

40

50

【表 1 - 1 6】

|                                                                                      |      |
|--------------------------------------------------------------------------------------|------|
|    | CY67 |
|    | CY68 |
|   | CY69 |
|  | CY70 |
|  | CY71 |

【0579】

## I V . 送達ビヒクル及びトラッキングシステム

本明細書に記載のオリジネーターコンストラクト及びベンチマークコンストラクトは、送達ビヒクル中で製剤化され得る。送達ビヒクルの非限定的な例には、脂質ナノ粒子、非脂質ナノ粒子、エクソソーム、リポソーム、ミセル、ウイルス粒子、及びポリマー送達技術が含まれる。

【0580】

いくつかの実施形態では、送達ビヒクルは、表（I）における少なくとも1つの脂質を含む。

## 【0581】

いくつかの実施形態では、送達ビヒクルは、表（I）における少なくとも2つの脂質を含む。

## 【0582】

いくつかの実施形態では、送達ビヒクルは、表（I）における少なくとも3つの脂質を含む。

## 【0583】

いくつかの実施形態では、送達ビヒクルは、表（I）における少なくとも4つの脂質を含む。

## 【0584】

送達ビヒクルにおける表（I）における脂質（複数可）の総重量パーセンテージは、約10%～約95%、例えば、約10%～約20%、約21%～約30%、約31%～約40%、約41%～約50%、約51%～約60%、約61%～約70%、約71%～約80%、約81%～約90%、または約91%～約95%である。

## 【0585】

送達ビヒクルにおける表（I）における脂質（複数可）の総モルパーセンテージは、約10%～約95%、例えば、約10%～約20%、約21%～約30%、約31%～約40%、約41%～約50%、約51%～約60%、約61%～約70%、約71%～約80%、約81%～約90%、または約91%～約95%である。

## 【0586】

いくつかの実施形態では、送達ビヒクルにおける少なくとも1つの脂質は、式（CY-I）、（CY-II）、（CY-III）、または（CY-IV）の構造を有する。

## 【0587】

いくつかの実施形態では、送達ビヒクルにおける少なくとも2つの脂質は、式（CY-I）、（CY-II）、（CY-III）、または（CY-IV）の構造を有する。

## 【0588】

いくつかの実施形態では、送達ビヒクルにおける少なくとも3つの脂質は、式（CY-I）、（CY-II）、（CY-III）、または（CY-IV）の構造を有する。

## 【0589】

いくつかの実施形態では、送達ビヒクルにおける少なくとも4つの脂質は、式（CY-I）、（CY-II）、（CY-III）、または（CY-IV）の構造を有する。

## 【0590】

送達ビヒクルにおける式（CY-I）、（CY-II）、（CY-III）、または（CY-IV）の構造を有する脂質（複数可）の総重量パーセンテージは、10%～95%、例えば、約10%～約20%、約21%～約30%、約31%～約40%、約41%～約50%、約51%～約60%、約61%～約70%、約71%～約80%、約81%～約90%、または約91%～約95%である。

## 【0591】

送達ビヒクルにおける式（CY-I）、（CY-II）、（CY-III）、または（CY-IV）の構造を有する脂質（複数可）の総モルパーセンテージは、10%～95%、例えば、約10%～約20%、約21%～約30%、約31%～約40%、約41%～約50%、約51%～約60%、約61%～約70%、約71%～約80%、約81%～約90%、または約91%～約95%である。

## 【0592】

いくつかの実施形態では、送達ビヒクルは、少なくとも1つの追加の脂質をさらに含む。非限定的な例には、追加のカチオン性脂質、中性脂質、アニオン性脂質、ヘルパー脂質、ステルス脂質、またはポリエチレングリコール（PEG）脂質が含まれる。

## 【0593】

「ヘルパー脂質」は、トランスフェクション、例えば、ペイロード及びカーゴを含む送達ビヒクルのトランスフェクションを向上させる脂質である。ヘルパー脂質がトランスフ

10

20

30

40

50

エクシオンを向上させるメカニズムには、粒子安定性を向上させること及び／または膜融合性を向上させることが含まれ得る。ヘルパー脂質には、ステロイド及びアルキルレゾルシノールが含まれる。本開示において使用するために好適なヘルパー脂質には、コレステロール、5-ヘプタデシルレゾルシノール、及びコレステロールヘミスクシネートが含まれるがこれらに限定されない。

【0594】

「ステルス脂質」は、送達ビヒクルが *in vivo* で（例えば、血液に）存在し得る時間の長さを延長させる脂質である。本開示の脂質組成物において使用するために好適なステルス脂質には、脂質部位に連結された親水性頭部基を有するステルス脂質が含まれるがこれらに限定されない。

【0595】

本開示の送達ビヒクルにおいて使用するために好適なカチオン性脂質の非限定的な例には、N，N-ジオレイル-N，N-ジメチルアンモニウムクロリド（DODAC）、N，N-ジステアイル-N，N-ジメチルアンモニウムブロミド（DDAB）、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（DOTAP）、1，2-ジオレオイル-3-ジメチルアンモニウム-プロパン（DODAP）、N-（1-（2，3-ジオレイルオキシ）プロピル）-N，N，N-トリメチルアンモニウムクロリド（DOTMA）、1，2-ジオレオイルカルバミル-3-ジメチルアンモニウム-プロパン（DOCDAP）、1，2-ジリネオイル-3-ジメチルアンモニウム-プロパン（DLINDAP）、ジラウリル（C12：0）トリメチルアンモニウムブロパン（DLTAP）、ジオクタデシルアミドグリシルスペルミン（DOGS）、DC-Choi、ジオレオイルオキシ-N-〔2-スベ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）、1，2-ジミリスチルオキシプロピル-3-ジメチル-ヒドロキシエチルアンモニウムブロミド（DMRIE）、3-ジメチルアミノ-2-（コレスト-5-エン-3-ベーターオキシブタン-4-オキシ）-1-（cis，cis-9，12-オクタデカジエノキシ）プロパン（CLINDMA）、N，N-ジメチル-2，3-ジオレイルオキシ）プロピルアミン（DODMA）、2-〔5'-（コレスト-5-エン-3〔ベータ〕-オキシ）-3'-オキサベントキシ）-3-ジメチル-1-（cis，cis-9'，12'-オクタデカジエノキシ）プロパン（CpLINDMA）及びN，N-ジメチル-3，4-ジオレイルオキシベンジルアミン（DMOBA）、ならびに1，2-N，N'-ジオレイルカルバミル-3-ジメチルアミノプロパン（DOcarbDAP）が含まれるがこれらに限定されない。

【0596】

本開示の送達ビヒクルにおいて使用するために好適な中性脂質の非限定的な例には、多様な中性、非荷電または双性イオン性脂質が含まれる。本開示において使用するために好適な中性リン脂質の例には、5-ヘプタデシルベンゼン-1，3-ジオール（レゾルシノール）、ジパルミトイルホスファチジルコリン（DPPC）、ジステアロイルホスファチジルコリン（DSPC）、ホスホコリン（DOPC）、ジミリストイルホスファチジルコリン（DMPC）、ホスファチジルコリン（PLPC）、1，2-ジステアロイル-s n-グリセロ-3-ホスホコリン（DAPC）、ホスファチジルエタノールアミン（PE）、卵黄ホスファチジルコリン（EPC）、ジラウリロイルホスファチジルコリン（DLPC）、ジミリストイルホスファチジルコリン（DMPC）、1-ミリストイル-2-パルミトイルホスファチジルコリン（MPPC）、1-パルミトイル-2-ミリストイルホスファチジルコリン（PMP C）、1-パルミトイル-2-ステアロイルホスファチジルコリン（PSPC）、1，2-ジアラキドイル-s n-グリセロ-3-ホスホコリン（DBPC）、1-ステアロイル-2-パルミトイルホスファチジルコリン（SPPC）、1，2-ジェイコセノイル-s n-グリセロ-3-ホスホコリン（DEPC）、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン（POPC）、リソホスファチジルコリン、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン（DOPE）、ジリノレオイルホスファチジルコリン

ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン (D S P E)、ジミリストイルホスファチジルエタノールアミン (D M P E)、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン (D P P E)、パルミトイルオレオイルホスファチジルエタノールアミン (P O P E)、リソホスファチジルエタノールアミン及びそれらの組み合わせが含まれるがこれらに限定されない。

【0597】

本開示の送達ビヒクルにおいて使用するために好適なアニオン性脂質の非限定的な例には、ホスファチジルグリセロール、カルジオリピン、ジアシルホスファチジルセリン、ジアシルホスファチジン酸、N-ドデカノイルホスファチジルエタノールアミン、N-スクシニルホスファチジルエタノールアミン、N-グルタリルホスファチジルエタノールアミン、コレステロールヘミスクシネート (C H E M S)、及びリシルホスファチジルグリセロールが含まれるがこれらに限定されない。

10

【0598】

いくつかの実施形態では、送達ビヒクル (脂質のすべてを含む) 及びペイロードの重量比は、約 100 : 1 ~ 約 1 : 1、例えば、約 100 : 1 ~ 約 90 : 1、約 89 : 1 ~ 約 80 : 1、約 79 : 1 ~ 約 70 : 1、約 69 : 1 ~ 約 60 : 1、約 59 : 1 ~ 約 50 : 1、約 49 : 1 ~ 約 40 : 1、約 39 : 1 ~ 約 30 : 1、約 29 : 1 ~ 約 20 : 1、約 19 : 1 ~ 約 10 : 1、及び約 9 : 1 ~ 約 1 : 1 である。

【0599】

いくつかの実施形態では、送達ビヒクルは、少なくとも 1 つのカーゴまたはペイロードを有するオリジネーターコンストラクトまたはベンチマークコンストラクトを含む。カーゴまたはペイロードは、本明細書に記載の任意の DNA、RNA またはポリペプチドであり得る。

20

【0600】

いくつかの実施形態では、送達ビヒクルは、コード RNA である少なくとも 1 つのカーゴまたはペイロードを有するオリジネーターコンストラクトまたはベンチマークコンストラクトを含む。

【0601】

いくつかの実施形態では、送達ビヒクルは、非コード RNA である少なくとも 1 つのカーゴまたはペイロードを有するオリジネーターコンストラクトまたはベンチマークコンストラクトを含む。

30

【0602】

いくつかの実施形態では、送達ビヒクルは、oRNA である少なくとも 1 つのカーゴまたはペイロードを有するオリジネーターコンストラクトまたはベンチマークコンストラクトを含む。

【0603】

いくつかの実施形態では、送達ビヒクルは、mRNA である少なくとも 1 つのカーゴまたはペイロードを有するオリジネーターコンストラクトまたはベンチマークコンストラクトを含む。

【0604】

いくつかの実施形態では、少なくとも 1 つの RNA 化合物は、機能的 RNA を含み、RNA は、細胞、組織、器官及び／または生物における少なくとも 1 つの変化をもたらす。前記状態の変化には、ポリペプチドの発現レベルを改変すること、核酸の翻訳レベルを改変すること、核酸の発現レベルを改変すること、細胞、組織、器官及び／または生物に存在するポリペプチドの量を改変すること、細胞、組織、器官及び／または生物の遺伝子配列を変化させること、核酸を標的ゲノムに加えること、標的ゲノムから核酸を引き抜くこと、細胞、組織、器官及び／または生物における生理的活性を改変することまたはそれらの任意の組み合わせが含まれ得るがこれらに限定されない。

40

【0605】

いくつかの実施形態では、送達ビヒクルは、DNA である少なくとも 1 つのカーゴまた

50

はペイロードを有するオリジネーターコンストラクトまたはベンチマークコンストラクトを含む。

【0606】

いくつかの実施形態では、送達ビヒクルは、DNAである2つのカーゴまたはペイロードを有するオリジネーターコンストラクトまたはベンチマークコンストラクトを含む。DNAは、同じDNAまたは異なるDNAであり得る。非限定的な例として、DNAは、同じである。非限定的な例として、DNAは、異なる。非限定的な例として、DNAは、異なるが、同じペイロードまたはカーゴをコードする。非限定的な例として、DNAは、機能的ポリペプチド（例えば、抗体）を生成するために当該技術分野で知られている天然システムまたは合成方法を使用して一緒となり得るより大きなペイロードまたはカーゴの異なるピース（例えば、抗体の重鎖または軽鎖）である。

10

【0607】

いくつかの実施形態では、送達ビヒクルは、DNAである3つのカーゴまたはペイロードを有するオリジネーターコンストラクトまたはベンチマークコンストラクトを含む。DNAは、同じDNAまたは異なるDNAであり得る。非限定的な例として、DNAは、同じである。非限定的な例として、DNAは、異なる。非限定的な例として、2つのDNAは、同じであり、1つは、異なる。非限定的な例として、第1のDNAは、第2及び第3のDNAとは異なる。非限定的な例として、第1のDNA、第2のDNA及び第3のDNAはすべて、異なる。非限定的な例として、第1のDNAは、第2及び第3のDNAとは異なるが、それらはすべて、同じペイロードまたはカーゴをコードする。非限定的な例として、第1のDNAは、第2及び第3のDNAとは異なるが、第2及び第3のDNAは、同じペイロードまたはカーゴをコードする。

20

【0608】

いくつかの実施形態では、送達ビヒクルは、ポリペプチドである少なくとも1つのカーゴまたはペイロードを有するオリジネーターコンストラクトまたはベンチマークコンストラクトを含む。

【0609】

いくつかの実施形態では、送達ビヒクルは、ポリペプチドである2つのカーゴまたはペイロードを有するオリジネーターコンストラクトまたはベンチマークコンストラクトを含む。ポリペプチドは、同じポリペプチドまたは異なるポリペプチドであり得る。非限定的な例として、ポリペプチドは、同じである。非限定的な例として、ポリペプチドは、異なる。非限定的な例として、ポリペプチドは、機能的ポリペプチド（例えば、抗体）を生成するために当該技術分野で知られている天然システムまたは合成方法を使用して一緒となり得るより大きなペイロードまたはカーゴの異なるピース（例えば、抗体の重鎖または軽鎖）である。

30

【0610】

いくつかの実施形態では、送達ビヒクルは、ポリペプチドである3つのカーゴまたはペイロードを有するオリジネーターコンストラクトまたはベンチマークコンストラクトを含む。ポリペプチドは、同じポリペプチドまたは異なるポリペプチドであり得る。非限定的な例として、ポリペプチドは、同じである。非限定的な例として、ポリペプチドは、異なる。非限定的な例として、2つのポリペプチドは、同じであり、1つは、異なる。非限定的な例として、第1のポリペプチドは、第2及び第3のポリペプチドとは異なる。非限定的な例として、第1のポリペプチド、第2のポリペプチド及び第3のポリペプチドはすべて、異なる。非限定的な例として、第1のポリペプチドは、第2及び第3のポリペプチドとは異なるが、それらはすべて、同じペイロードまたはカーゴをコードする。非限定的な例として、第1のポリペプチドは、第2及び第3のポリペプチドとは異なるが、第2及び第3のポリペプチドは、同じペイロードまたはカーゴをコードする。

40

【0611】

いくつかの実施形態では、送達ビヒクルは、ペプチドである少なくとも1つのカーゴまたはペイロードを有するオリジネーターコンストラクトまたはベンチマークコンストラク

50

トを含む。

【0612】

いくつかの実施形態では、送達ビヒクルは、ペプチドである2つのカーゴまたはペイロードを有するオリジネーターコンストラクトまたはベンチマークコンストラクトを含む。ペプチドは、同じペプチドまたは異なるペプチドであり得る。非限定的な例として、ペプチドは、同じである。非限定的な例として、ペプチドは、異なる。非限定的な例として、ペプチドは、機能的ポリペプチド（例えば、抗体）を生成するために当該技術分野で知られている天然システムまたは合成方法を使用して一緒となり得るより大きなペイロードまたはカーゴの異なるピース（例えば、抗体の重鎖または軽鎖）である。

【0613】

いくつかの実施形態では、送達ビヒクルは、ペプチドである3つのカーゴまたはペイロードを有するオリジネーターコンストラクトまたはベンチマークコンストラクトを含む。ペプチドは、同じペプチドまたは異なるペプチドであり得る。非限定的な例として、ペプチドは、同じである。非限定的な例として、ペプチドは、異なる。非限定的な例として、2つのペプチドは、同じであり、1つは、異なる。非限定的な例として、第1のペプチドは、第2及び第3のペプチドとは異なる。非限定的な例として、第1のペプチド、第2のペプチド及び第3のペプチドはすべて、異なる。非限定的な例として、第1のペプチドは、第2及び第3のペプチドとは異なるが、それらはすべて、同じペイロードまたはカーゴをコードする。非限定的な例として、第1のペプチドは、第2及び第3のペプチドとは異なるが、第2及び第3のペプチドは、同じペイロードまたはカーゴをコードする。

【0614】

いくつかの実施形態では、送達ビヒクルは、RNAである少なくとも1つのカーゴまたはペイロードを有するオリジネーターコンストラクトまたはベンチマークコンストラクトを含む。

【0615】

いくつかの実施形態では、送達ビヒクルは、RNAである2つのカーゴまたはペイロードを有するオリジネーターコンストラクトまたはベンチマークコンストラクトを含む。RNAは、同じRNAまたは異なるRNAであり得る。非限定的な例として、RNAは、同じである。非限定的な例として、RNAは、異なる。非限定的な例として、RNAは、異なるが、同じペイロードまたはカーゴをコードする。非限定的な例として、RNAは、機能的ポリペプチド（例えば、抗体）を生成するために当該技術分野で知られている天然システムまたは合成方法を使用して一緒となり得るより大きなペイロードまたはカーゴの異なるピース（例えば、抗体の重鎖または軽鎖）である。

【0616】

いくつかの実施形態では、送達ビヒクルは、RNAである3つのカーゴまたはペイロードを有するオリジネーターコンストラクトまたはベンチマークコンストラクトを含む。RNAは、同じRNAまたは異なるRNAであり得る。非限定的な例として、RNAは、同じである。非限定的な例として、RNAは、異なる。非限定的な例として、2つのRNAは、同じであり、1つは、異なる。非限定的な例として、第1のRNAは、第2及び第3のRNAとは異なる。非限定的な例として、第1のRNA、第2のRNA及び第3のRNAはすべて、異なる。非限定的な例として、第1のRNAは、第2及び第3のRNAとは異なるが、それらはすべて、同じペイロードまたはカーゴをコードする。非限定的な例として、第1のRNAは、第2及び第3のRNAとは異なるが、第2及び第3のRNAは、同じペイロードまたはカーゴをコードする。

【0617】

いくつかの実施形態では、送達ビヒクルは、1つがRNAであり、1つがDNAである2つのカーゴまたはペイロードを有するオリジネーターコンストラクトまたはベンチマークコンストラクトを含む。RNA及びDNAは、同じペプチドまたはポリペプチドをコードし得、または異なるペプチドまたはポリペプチドをコードし得る。非限定的な例として、RNA及びDNAは、同じペプチドまたはポリペプチドをコードし得る。非限定的な例



として、RNA及びDNAは、異なるペプチドまたはポリペプチドをコードし得る。非限定的な例として、RNA及びDNAは、機能的ポリペプチド（例えば、抗体）を生成するために当該技術分野で知られている天然システムまたは合成方法を使用して一緒となり得るより大きなペイロードまたはカーゴの異なるピース（例えば、抗体の重鎖または軽鎖）である。

#### 【0618】

いくつかの実施形態では、送達ビヒクルは、1つがRNAであり、1つがペプチドである2つのカーゴまたはペイロードを有するオリジネーターコンストラクトまたはベンチマークコンストラクトを含む。RNAは、ペプチドカーゴ／ペイロードと同じペプチドをコードし得、RNAは、異なるペプチドをコードし得る。非限定的な例として、RNAは、同じペプチドをコードする。非限定的な例として、RNAは、異なるペプチドをコードする。非限定的な例として、RNA及びペプチドは、機能的ポリペプチド（例えば、抗体）を生成するために当該技術分野で知られている天然システムまたは合成方法を使用して一緒となり得るより大きなペイロードまたはカーゴの異なるピース（例えば、抗体の重鎖または軽鎖）である。

10

#### 【0619】

いくつかの実施形態では、送達ビヒクルは、1つがRNAであり、1つがポリペプチドである2つのカーゴまたはペイロードを有するオリジネーターコンストラクトまたはベンチマークコンストラクトを含む。RNAは、ポリペプチドカーゴ／ペイロードとして同じポリペプチドをコードし得、RNAは、異なるポリペプチドをコードし得る。非限定的な例として、RNAは、同じポリペプチドをコードする。非限定的な例として、RNAは、異なるポリペプチドをコードする。非限定的な例として、RNA及びポリペプチドは、機能的ポリペプチド（例えば、抗体）を生成するために当該技術分野で知られている天然システムまたは合成方法を使用して一緒となり得るより大きなペイロードまたはカーゴの異なるピース（例えば、抗体の重鎖または軽鎖）である。

20

#### 【0620】

いくつかの実施形態では、送達ビヒクルは、1つがDNAであり、1つがペプチドである2つのカーゴまたはペイロードを有するオリジネーターコンストラクトまたはベンチマークコンストラクトを含む。DNAは、ペプチドカーゴ／ペイロードと同じペプチドをコードし得、DNAは、異なるペプチドをコードし得る。非限定的な例として、DNAは、同じペプチドをコードする。非限定的な例として、DNAは、異なるペプチドをコードする。非限定的な例として、DNA及びペプチドは、機能的ポリペプチド（例えば、抗体）を生成するために当該技術分野で知られている天然システムまたは合成方法を使用して一緒となり得るより大きなペイロードまたはカーゴの異なるピース（例えば、抗体の重鎖または軽鎖）である。

30

#### 【0621】

いくつかの実施形態では、送達ビヒクルは、1つがDNAであり、1つがポリペプチドである2つのカーゴまたはペイロードを有するオリジネーターコンストラクトまたはベンチマークコンストラクトを含む。DNAは、ポリペプチドカーゴ／ペイロードとして同じポリペプチドをコードし得、DNAは、異なるポリペプチドをコードし得る。非限定的な例として、DNAは、同じポリペプチドをコードする。非限定的な例として、DNAは、異なるポリペプチドをコードする。非限定的な例として、DNA及びポリペプチドは、機能的ポリペプチド（例えば、抗体）を生成するために当該技術分野で知られている天然システムまたは合成方法を使用して一緒となり得るより大きなペイロードまたはカーゴの異なるピース（例えば、抗体の重鎖または軽鎖）である。

40

#### 【0622】

送達ビヒクル

ナノ粒子

いくつかの実施形態では、送達ビヒクルは、ナノ粒子である。用語「ナノ粒子」は、本明細書で使用される場合、サイズが10～1000nmの範囲の任意の粒子を指す。ナノ

50

粒子は、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、205、210、215、220、225、230、235、240、245、250、255、260、265、270、275、280、285、290、295、300、305、310、315、320、325、330、335、340、345、350、355、360、365、370、375、380、385、390、395、400、405、410、415、420、425、430、435、440、445、450、455、460、465、470、475、480、485、490、495、500、505、510、515、520、525、530、535、540、545、550、555、560、565、570、575、580、585、590、595、600、605、610、615、620、625、630、635、640、645、650、655、660、665、670、675、680、685、690、695、700、705、710、715、720、725、730、735、740、745、750、755、760、765、770、775、780、785、790、795、800、805、810、815、820、825、830、835、840、845、850、855、860、865、870、875、880、885、890、895、900、905、910、915、920、925、930、935、940、945、950、955、960、965、970、975、980、985、990、995、または1000nmであり得る。

10

20

#### 【0623】

##### 脂質ナノ粒子

いくつかの実施形態では、ナノ粒子は、脂質ナノ粒子（LNP）であり得る。通常、LNPは、非LNP環境に露出した親水性外部表面を有する外部脂質層、水性（ベシクル様）または非水性（ミセル様）であり得る内部空間、及び少なくとも1つの疎水性膜間空間を保有する小さな固体または半固体粒子として特性化され得る。LNP膜は、層状または非層状であり得、1、2、3、4、5個またはそれを超える層を含み得る。いくつかの実施形態では、LNPは、それらの内部空間内に、膜間空間内に、それらの外部表面上に、またはそれらの任意の組み合わせにカーゴまたはペイロードを含み得る。

#### 【0624】

本明細書において有用なLNPは、当該技術分野で知られており、通常は、コレステロール（安定性を補助し、膜融合を促進する）、リン脂質（構造をLNP二重層に提供し、また、エンドソーム脱出を補助し得る）、ポリエチレングリコール（PEG）誘導体（LNP凝集を低減し、免疫細胞によって非特異的エンドサイトーシスからのLNPを「遮断」する）、及びイオン化可能な脂質（負に荷電したRNAを複合体化し、エンドソーム脱出を向上させる）を含み、これらがLNP形成組成物を形成する。

30

#### 【0625】

LNPの成分は、所望の標的、カーゴ、サイズ等に基づいて選択され得る。非限定的な例として、先行研究は、低分子量ポリアミン及び脂質から作製されたポリマー性ナノ粒子が、高い効率で核酸を内皮細胞に送達し得ることを示している。（Dahlman, et al., *In vivo endothelial siRNA delivery using polymeric nanoparticles with low molecular weight*, *Nat Nanotechnol.* 2014 Aug; 9(8): 648-655（その内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる））。

40

#### 【0626】

いくつかの実施形態では、本開示のオリジネーターコンストラクト及びベンチマークコンストラクトは、脂質ナノ粒子（LNP）に組み込まれ得る。いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子は、少なくとも1つのカチオン性脂質、少なくとも1つの非カチオン性脂質、少なくとも1つのステロール、少なくとも1つの粒子活性修飾剤、またはそれらの任意

50

の組み合わせを含み得る。いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子は、少なくとも1つのカチオン性脂質、少なくとも1つの非カチオン性脂質、少なくとも1つのステロール、及び少なくとも1つの粒子活性修飾剤を含み得る。いくつかの実施形態では、LNPは、少なくとも1つのカチオン性脂質、少なくとも1つの非カチオン性脂質、及び少なくとも1つのステロールを含み得る。いくつかの実施形態では、LNPは、少なくとも1つのカチオン性脂質、少なくとも1つの非カチオン性脂質、及び少なくとも1つの粒子活性修飾剤を含み得る。いくつかの実施形態では、LNPは、少なくとも1つの非カチオン性脂質、少なくとも1つのステロール、及び少なくとも1つの粒子活性修飾剤を含み得る。いくつかの実施形態では、LNPは、少なくとも1つのカチオン性脂質及び少なくとも1つの非カチオン性脂質を含み得る。いくつかの実施形態では、LNPは、少なくとも1つのカチオン性脂質及び少なくとも1つのステロールを含み得る。いくつかの実施形態では、LNPは、少なくとも1つのカチオン性脂質及び少なくとも1つの粒子活性修飾剤を含み得る。いくつかの実施形態では、LNPは、少なくとも1つの非カチオン性脂質及び少なくとも1つのステロールを含み得る。いくつかの実施形態では、LNPは、少なくとも1つの非カチオン性脂質及び少なくとも1つの粒子活性修飾剤を含み得る。いくつかの実施形態では、LNPは、少なくとも1つのステロール及び少なくとも1つの粒子活性修飾剤を含み得る。いくつかの実施形態では、LNPは、少なくとも1つのカチオン性脂質を含み得る。いくつかの実施形態では、LNPは、少なくとも1つの非カチオン性脂質を含み得る。いくつかの実施形態では、LNPは、ステロールを含み得る。いくつかの実施形態では、LNPは、粒子活性修飾剤を含み得る。

10

20

#### 【0627】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つのカチオン性脂質は、少なくとも1つのイオン化可能なカチオン性脂質、少なくとも1つのアミノ脂質、少なくとも1つの飽和カチオン性脂質、少なくとも1つの不飽和カチオン性脂質、少なくとも1つの双性イオン性脂質、少なくとも1つの多価カチオン性脂質、またはそれらの任意の組み合わせのいずれかを含み得る。いくつかの実施形態では、LNPは、少なくとも1つのカチオン性脂質を本質的に欠き得る。いくつかの実施形態では、LNPは、少なくとも1つのカチオン性脂質の量含有しない場合がある。

#### 【0628】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つのカチオン性脂質は、限定されないが、1, 3-ビス-(1, 2-ビス-テトラデシルオキシ-プロピル-3-ジメチルエトキシアンモニウムブロミド)-プロパン-2-オール((R)-PLC-2)、2-(ジノニルアミノ)エタン-1-オール(17-10)、2-(ジドデシルアミノ)エタン-1-オール(17-11)、3-(ジドデシルアミノ)プロパン-1-オール(17-12)、4-(ジドデシルアミノ)ブタン-1-オール(17-13)、2-(ヘキシル((9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエン-1-イル)アミノ)エタン-1-オール(17-2)、2-(ノニル((9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエン-1-イル)アミノ)エタン-1-オール(17-3)、2-(ドデシル((9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエン-1-イル)アミノ)エタン-1-オール(17-4)、2-(((9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエン-1-イル)(テトラデシル)アミノ)エタン-1-オール(17-5)、2-(((9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエン-1-イル)(オクタデシル)アミノ)エタン-1-オール(17-6)、2-(ジテトラデシルアミノ)エタン-1-オール(17-7)、2-(ジ((Z)-オクタデス-9-エン-1-イル)アミノ)エタン-1-オール(17-8)、(9Z, 12Z)-N-(2-メトキシエチル)-N-((9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエン-1-イル)オクタデカ-9, 12-ジエン-1-アミン(17-9)、N-ノニル-N-(2-(ピペラジン-1-イル)エチル)ノナン-1-アミン(19-1)、N-ドデシル-N-(2-(ピペラジン-1-イル)エチル)ドデカン-1-アミン(19-2)、(9Z, 12Z)-N-((9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエン-1-イル)-N-(2-(ピペラジン-1-イル)エチル)オクタデカ-9, 12-ジ

30

40

50

エン-1-アミン(19-3)、N-ドデシル-N-(2-(4-メチルピペラジン-1-  
 -イル)エチル)ドデカン-1-アミン中間体1:2-(ジドデシルアミノ)エタン-1-  
 -オール(19-4)、N-ドデシル-N-(2-(4-(4-メトキシベンジル)ピペ  
 ラジン-1-イル)エチル)ドデカン-1-アミン(19-5)、(9Z,12Z)-N-  
 -(2-(4-ドデシルピペラジン-1-イル)エチル)-N-(9Z,12Z)-オ  
 クタデカ-9,12-ジエン-1-イル)オクタデカ-9,12-ジエン-1-アミン(19-6)、  
 (3-(6Z,9Z,28Z,31Z)-ヘプタトリアコンタ-6,9,28,31-テトラエン-19-イル  
 オキシ)-N,N-ジメチルプロパン-1-アミン(1-BL1)、N-(2-(ジドデシルアミノ)エチル)-  
 N-ドデシルグリシン(20-1)、ジノニル8,8'-((2-(ドデシル(2-ヒドロキシエチル)アミノ)エチル)アザネ  
 ジル)ジオクタノエート(20-10)、3-(2-(ジテトラデシルアミノ)エチル)(ドデシル)アミノ  
 プロパン-1-オール(20-11)、2-(2-(ジテトラデシルアミノ)エチル)(テトラデシル)アミノ  
 エタン-1-オール(20-12)、2-(2-(ジ(9Z,12Z)-オクタデカ-9,12-ジエン-1-イル)アミノ)エチル  
 (ドデシル)アミノエタン-1-オール(20-13)、2-(2-(ジ(9Z,12Z)-オクタデカ-9,12-ジエン-1-イル)ア  
 ミノ)エチル((9Z,12Z)-オクタデカ-9,12-ジエン-1-イル)アミノエタン-1-オール(20-14)、2-(2-(ジドデ  
 シルアミノ)エチル)(ヘキシル)アミノエタン-1-オール(20-15)、2-(2-(ジノニルアミノ)エチル)(ノニル)ア  
 ミノエタン-1-オール(20-16)、2-(2-(ジドデシルアミノ)エチル)(ノニル)アミノエタン-1-オール(20-17)、  
 2-(2-(ジノニルアミノ)エチル)(ドデシル)アミノエタン-1-オール(20-18)、2-(2-(ジドデシルアミノ)エチル)ア  
 ミノエタン-1-オール(20-19)、ペンチル6-(ドデシル(2-(ドデシル(2-ヒドロキシエチル)アミノ)エチル)ア  
 ミノ)ヘキサノエート(20-2)、2-(2-(ジドデシルアミノ)エチル)(ドデシル)アミノエタン-1-オール(20-20)、  
 3-(2-(ジドデシルアミノ)エチル)(ドデシル)アミノプロパン-1-オール(20-21)、4-(2-(ジドデシルアミノ)エチル)  
 (ドデシル)アミノブタン-1-オール(20-22)、(Z)-2-(2-(ジドデシルアミノ)エチル)(ドデス-6-エン-1-イル)ア  
 ミノエタン-1-オール(20-23)、2-(2-(ジドデシルアミノ)エチル)(テトラデシル)アミノエタン-1-オール(20-24)、  
 2-(2-(ジドデシルアミノ)エチル)((9Z,12Z)-オクタデカ-9,12-ジエン-1-イル)アミノエタン-1-オール(20-25)、  
 ペンチル6-(2-(ジドデシルアミノ)エチル)(2-ヒドロキシエチル)アミノヘキサノエート(20-3)、ジペンチル  
 6,6'-((2-(ドデシル(2-ヒドロキシエチル)アミノ)エチル)アザネジル)ジヘキサノエート(20-4)、ジヘプチル  
 6,6'-((2-(6-(ヘプチルオキシ)-6-オキソヘキシル)(2-ヒドロキシエチル)アミノ)エチル)アザネジル)ジ  
 ヘキサノエート(20-5)、ペンチル6-(2-(ジノニルアミノ)エチル)(2-ヒドロキシエチル)アミノヘキサノエート  
 (20-6)、ヘプチル6-(ドデシル(2-(ドデシル(2-ヒドロキシエチル)アミノ)エチル)アミノ)ヘキサノエート  
 (20-7)、ノニル8-(2-(ジドデシルアミノ)エチル)(2-ヒドロキシエチル)アミノオクタノエート(20-8)、ヘ  
 プタデカン-9-イル8-(2-(ジドデシルアミノ)エチル)(2-ヒドロキシエチル)アミノオクタノエート(20-9)、1-  
 (2,2-ジ(9Z,12Z)-オクタデカ-9,12-ジエン-1-イル)シクロブ  
 ロピル)-N,N-ジメチルメタンアミン(21-1)、3,3-ジ(9Z,12Z)-オクタデカ-9,12-ジエン-1-イル)シクロ  
 ブチル4-(ジメチルアミノ)ブタノエート(21-2)、3,3-ジ(9Z,12Z)-オクタデカ-9,12-ジエン-1-イル)シクロ  
 ペンチル3-(ジメチルアミノ)プロパノエート(21-3)、3,3-ジ(9Z,12Z)-オクタデカ-9,12-ジエン-1-イル)シクロ  
 ペンチル4-(ジメチルアミノ)ブタノエート(21-4)、1-(2,3-ジ(8Z,11Z

10

20

30

40

50

) - ヘブタデカ - 8, 11 - ジエン - 1 - イル) シクロプロピル) - N, N - ジメチルメ  
 タンアミン (21 - 6)、不明 (75 - 016B)、ポリ {4 - ( (2 - (ジメチルアミ  
 ノ) エチル) チオ) テトラヒドロ - 2H - ピラン - 2 - オン} - r - ポリ {4 - (オク  
 ルチオ) テトラヒドロ - 2H - ピラン - 2 - オン} (A7)、(3aR5s, 6aS) -  
 N, N - ジメチル - 2, 2 - ジ ( (9Z, 12Z) - オクタデカ - 9, 12 - ジエニル)  
 テトラヒドロ - 3aH - シクロペンタ d1, 3 ジオキソール - 5 - アミン (ALN100  
 )、(3aR, 5s, 6aS) - N, N - ジメチル - 2, 2 - ジ ( (9Z, 12Z) - オ  
 クタデカ - 9, 12 - ジエニル) テトラヒドロ - 3aH シクロペンタ [d] [l, 3] ジ  
 オキソール - 5 - アミン (ALN1001)、( (3aR, 5s, 6aS) - N, N - ジ  
 メチル - 2, 2 - ジ ( (9Z, 12Z) - オクタデカ - 9, 12 - ジエニル) テトラヒド  
 ロ - 3aH - シクロペンタ [d] [1, 3] ジオキソール - 5 - アミン) (ALNY -  
 100)、ジミリストイルトリメチルアンモニウムプロパン (アミノ脂質6)、ベンザミ  
 πジπ - ジアルキル - カルボン酸 (BADACA)、N, N - ジヒドロキシエチルメチル  
 - N - 2 - (コレステリルオキシカルボニルアミノ) エチルアンモニウムプロミド (BH  
 EM - Chol)、N, N - ビス - (2 - ヒドロキシエチル) - N - メチル - N - (2 -  
 コレステリルオキシカルボニルアミノ - エチル) アンモニウムプロミド (BHEM - Ch  
 ol1)、2 - {4 - [ (3β) - コレスト - 5 - エン - 3 - イルオキシ] ブトキシ} -  
 iV? N - ジメチル - 3 - [ (9Z, 12Z) - オクタデカ - 9! 12 - ジエン - l - イ  
 ルオキシ] プロパン - 1 - アミン (ブチル - CLiNDMA)、(2JR) - 2 - {4 -  
 [ (3β) - コレスト - 5 - エン - 3 - イルオキシ] ブトキシ} - Ar ^ ジメチル - 3 -  
 [ (9Z, 12Z) - オクタデカ - 9! 12 - ジエン - l - イルオキシ] j プロパン - 1 -  
 アミン (ブチル - CLiNDMA (2R))、(25) - 2 - {4 - [ (3β) - コレス  
 ト - 5 - エン - 3 - イルオキシ] ブトキシ} - iVy / V - ジメチル - 3 - [ (9Z, 1  
 2Z) - オクタデカ - 9, 12 - ジエン - l - イルオキシ] プロパン - 1 - アミン (ブチ  
 ル - CLiNDMA (2S))、1, 1' - (2 - (4 - (2 - ( (2 - (ビス (2 - ヒ  
 ドロキシドデシル) アミノ) エチル) (2 - ヒドロキシドデシル) アミノ) エチル) ピペ  
 ラジン - l - イル) エチルアザネジイル) ジドデカン - 2 - オール (C12 - 200)、  
 1, 1' - ( (2 - (4 - (2 - ( (2 - (ビス (2 - ヒドロキシドデシル) アミノ) エ  
 チル) (2 - ヒドロキシドデシル) アミノ) エチル) ピペラジン - 1 - イル) エチル) ア  
 ザネジイル) ビス (ドデカン - 2 - オール) (C12 - 200)、コレステリル - スクシニ  
 ルシラン (C2)、(9Z, 9'Z, 12Z, 12'Z) - 2 - ( (4 - ( ( (3 - (ジメ  
 チルアミノ) プロボキシ) カルボニル) オキシ) ヘキサデカノイル) オキシ) プロパン -  
 1, 3 - ジイルビス (オクタデカ - 9, 12 - ジエノエート) (カチオン性脂質A2)、  
 9Z, 12Z) - 3 - ( (4, 4 - ビス (オクチルオキシ) ブタノイル) オキシ) - 2 -  
 ( ( ( (3 - (ジエチルアミノ) プロボキシ) カルボニル) オキシ) メチル) プロピルオ  
 クタデカ - 9, 12 - ジエノエート (カチオン性脂質A3)、l - (3 - コレステリル)  
 - オキシカルボニル - アミノメチルイミダゾール (CHIM)、[ (2 - モルホリン - 4  
 - イル - エチルカルバモイル) メチル] - カルバミン酸コレステリルエステル (Chol  
 - C3N - Mo2)、[ (2 - モルホリン - 4 - イル - エチルカルバモイル) - エチル]  
 - カルバミン酸コレステリルエステル Chol - DM C3N - Mo2 [l - メチル - 2 -  
 (2 - モルホリン - 4 - イル - エチルカルバモイル) - プロピル] - カルバミン酸コレス  
 テリルエステル (Chol - C4N - Mo2)、l, 17 - ビス (2 - オクチルシクロプ  
 ロピル) ヘブタデカン - 9 - イル 4 - (ジメチルアミノ) ブタノエート (CL)、ヘブタ  
 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 (CL01)、コレステリル 3 - (ジメチルアミノ) プロパノエート (C  
 L06)、コレステリル 2 - (ジメチルアミノ) アセテート (CL08)、N, N - ジメ  
 チル - 2, 3 - ビス ( ( (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 (CL - 1)、N - メチル - 2 - ( ( (9Z, 12Z) -  
 オクタデカ - 9, 12 - ジエン - 1 - イル) オキシ) - N - (2 - ( ( (9Z, 12Z  
 ) - オクタデカ - 9, 12 - ジエン - 1 - イル) オキシ) エチル) エタン - 1 - アミン (

10

20

30

40

50

CL-11)、(3R, 4R)-3, 4-ビス((Z)-ヘキサデス-9-エン-1-  
 イル)オキシ)-1-メチルピロリジン(化合物CL-12)(CL-12)、2-(ジ  
 メチルアミノ)-N-((6Z, 9Z, 28Z, 31Z)-ヘプタトリコンター6, 9,  
 28, 31-テトラエン-19-イル)アセトアミド(CL-13)、3-(ジメチルア  
 ミノ)プロパン-1, 2-ジイル(9Z, 9'Z, 12Z, 12'Z)-ビス(オクタデカ  
 -9, 12-ジエノエート)(CL-14)、(9Z, 12Z)-ジ((9Z, 12Z)  
 -オクタデカ-9, 12-ジエン-1-イル)アミン(CL-15)、7-ヒドロキシ  
 7-(4-((1-メチルピペリジン-4-カルボニル)オキシ)ブチル)トリデカン-  
 1, 13-ジイルジドデカノエート(CL15B6)、7-ヒドロキシ7-(4-((1-  
 メチルピペリジン-4-カルボニル)オキシ)ブチル)トリデカン-1, 13-ジイル  
 ジテトラデカノエート(CL15C6)、7-ヒドロキシ7-(4-((1-メチルピペ  
 リジン-4-カルボニル)オキシ)ブチル)トリデカン-1, 13-ジイルジパルミテ  
 ト(CL15D6)、7-ヒドロキシ7-(4-((1-メチルピペリジン-4-カルボ  
 ニル)オキシ)ブチル)トリデカン-1, 13-ジイルジオレエート(CL15H6)、  
 ビス(2-((9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエン-1-イル)オキシ)  
 エチル)アミン(CL-16)、(9Z, 12Z)-N-メチル-N-(2-((9Z  
 , 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエン-1-イル)オキシ)エチル)オクタデカ-  
 9, 12-ジエン-1-アミン(CL-17)、(9Z, 12Z)-N-(3-((9Z  
 , 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエン-1-イル)オキシ)プロピル)オクタデ  
 カ-9, 12-ジエン-1-アミン(CL-18)、(1-メチルピペリジン-3-イル  
 )メチルジ((11Z, 14Z)-イコサ-11, 14-ジエン-1-イル)カルバメ  
 ト(CL-19)、N-メチル-N, N-ビス(2-((Z)-ヘキサデス-9-エニル  
 オキシ)エチル)アミン(CL-2)、(13Z, 16Z)-N, N-ジメチル-4-  
 ((9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエン-1-イル)ドコサ-3, 13, 16  
 -トリエン-1-アミン(CL-20)、(S)-2-アミノ-3-ヒドロキシ-N, N  
 -ビス(2-((Z)-オクタデカ-9-エン-1-イル)オキシ)エチル)プロパン  
 アミド(CL-21)、C2:N, N-ジヘキサデシル-N'-((3-トリエトキシシリ  
 ルプロピル)スクシンアミド(CL3)、trans-1-メチル-3, 4-ビス((  
 (Z)-オクタデス-9-エン-1-イル)オキシ)メチル)ピロリジン(CL-3)、  
 trans-1-メチルピロリジン-3, 4-ジイル)ビス(メチレン)(9Z, 9'Z  
 , 12Z, 12'Z)-ビス(オクタデカ-9, 12-ジエノエート)(CL-4)、7  
 -(4-(ジイソプロピルアミノ)ブチル)-7-ヒドロキシトリデカン-1, 13-ジ  
 イルジテトラデカノエート(CL4C6)、7-(4-(ジイソプロピルアミノ)ブチル  
 )-7-ヒドロキシトリデカン-1, 13-ジイルジパルミテート(CL4D6)、11  
 -(4-(ジイソプロピルアミノ)ブチル)-11-ヒドロキシヘニコサン-1, 21-  
 ジイルジオレエート(CL4H10)、7-(4-(ジイソプロピルアミノ)ブチル)-  
 7-ヒドロキシトリデカン-1, 13-ジイルジオレエート(CL4H6)、9-(4-  
 (ジイソプロピルアミノ)ブチル)-7-ヒドロキシヘプタデカン-1, 17-ジイルジ  
 オレエート(CL4H8)、(6Z, 9Z, 28Z, 31Z)-ヘプタトリアコンター6  
 , 9, 28, 31-テトラエン-19-イル4-(ジメチルアミノ)ブタノエート(CL  
 -5)、2-(ジメチルアミノ)-N-(2-((Z)-オクタデカ-9-エン-1-  
 イル)オキシ)エチル)-N-((9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエン-1  
 -イル)アセトアミド(CL-53)、3-((2-((Z)-オクタデカ-9-エン  
 -1-イル)オキシ)エチル)((9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエン-1  
 -イル)アミノ)プロパン-1-ALL(CL-54)、1-メチル-3, 3-ビス((  
 ((9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエン-1-イル)オキシ)メチル)アゼ  
 チジン(CL-55)、1-メチル-3, 3-ビス(2-((9Z, 12Z)-オクタ  
 デカ-9, 12-ジエン-1-イル)オキシ)エチル)アゼチジン(CL-56)、1-  
 メチル-3, 3-ビス(2-((9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエン-1  
 -イル)オキシ)プロピル)アゼチジン(CL-57)、2-(3, 3-ジ((9Z, 1

10

20

30

40

50

2 Z) - オクタデカ-9, 12-ジエン-1-イル) アゼチジン-1-イル) エタン-1-オール (CL-58)、2- (3, 3-ジ ( (9 Z, 12 Z) - オクタデカ-9, 12-ジエン-1-イル) アゼチジン-1-イル) プロパン-1-オール (CL-59)、3- (ジ ( (9 Z, 12 Z) - オクタデカ-9, 12-ジエン-1-イル) アミノ) プロパン-1-オール (CL-6)、3- (ジメチルアミノ) プロピル 3, 3-ジ ( (9 Z, 12 Z) - オクタデカ-9, 12-ジエン-1-イル) アゼチジン-1-カルボキシレート (CL-60)、2- (ジ ( (Z) - オクタデカ-9-エン-1-イル) アミノ) エタン-1-オール (CL-61)、3- (ジ ( (Z) - オクタデカ-9-エン-1-イル) アミノ) プロパン-1-オール (CL-62)、(11 Z, 14 Z) - 2- ( (ジメチルアミノ) メチル) - 2- ( (9 Z, 12 Z) - オクタデカ-9, 12-ジエン-1-イル) イコ  
 10  
 サ-11, 14-ジエン-1-オール (CL-63)、(11 Z, 14 Z) - 2- (ジメチルアミノ) - 2- ( (9 Z, 12 Z) - オクタデカ-9, 12-ジエン-1-イル) イコ  
 コサ-11, 14-ジエン-1-オール (CL-64)、3- (ジメチルアミノ) - 2, 2-ビス ( ( (9 Z, 12 Z) - 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 (CL-65)、(9 Z, 12 Z) - N- (2- ( (Z) - オクタデカ-9-エン-1-イル) オキシ) エチル) オクタデカ-9, 12-ジエン-1-アミン (CL-7)、1-メチル-3, 3-ジ ( (9 Z, 12 Z) - オクタデカ-9, 12-ジエン-1-イル) アゼチジン (CL-8)、N, 2-ジメチル-1, 3-ビス ( ( (9 Z, 12 Z) - オクタデカ-9, 12-ジエン-1-イル) オキシ) プロパン-2-アミン (CL-9)、3-ジメチルアミノ-2- (コレスト-5-エン-3 B-オ  
 20  
 キシブタン-4-オキシ) - 1- (cis, cis-9, 12-オクタデカジエノキシ) プロパン (CL in DMA)、2- [5' - (コレスト-5-エン-3-オキシ) - 3' - オキサペントキシ) - 3-ジメチル-1- (cis, cis-9', 12' - オクタデカジエノキシ) プロパン (Cp L in DMA)、セチルトリメチルアンモニウムブロミド (CT AB)、 $\text{L}^{\wedge}$ -ジアラキドニルオキシ- $\text{T V}$ -ジメチ- $\text{P}$ -プロピル-S-アミン (DA r a DMA)、0, 0'-ジテトラデカノイル-N- ( $\alpha$ -トリメチルアンモニオアセチル) ジエタノールアミンクロリド (DC-6-14)、3  $\beta$ - [N- (N', N'-ジメチルアミノエタン) カルバモイル] コレステロール (DC-Chol)、ジメチルジオクタデシルアンモニウム (DDA)、ジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミド (DDA  
 30  
 )、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)、 $\text{l}$ , 2-ジドコサヘキサニルオキシ- (7 V, N-ジメチル) -プロピル-3-アミン (D Doc DMA)、N- (2- (ジメチルアミノ) エチル) -4, 5-ビス (ドデシルチオ) ペンタンアミド (DE DPA)、3-ジメチルアミノ-2- (コレスト-5-エン-3  $\beta$ -オキシペント-3-オキサ-an-5-オキシ) - 1- (cis, cis-9, 12-オクタデカジエノキシ) プロパン (DE G-CL in DMA)、1, 6-ジレオイルトリエチレンテトラミド (ジオ-TETA)、N $\text{l}$ , N19-ビス ( (S, 23 E, 25 E, 27 E, 29 E) - 16- ( (2 E, 4 E, 6 E, 8 E) - 3, 7-ジメチル-9- (2, 6, 6-トリメチルシクロヘクス- $\text{l}$ -エン- $\text{l}$ -イル) ノナ-2, 4, 6, 8-テトラエナミド) - 24, 28-ジメチル-15, 22-ジオキソ-30- (2, 6, 6-トリメチルシクロヘクス- $\text{l}$ -エン- $\text{l}$ -イル) - 4, 7, 10-トリオキサ-14,  
 40  
 21-ジアザトリアコンタ-23, 25, 27, 29-テトラエン- $\text{l}$ -イル) - 4, 7, 10, 13, 16-ペンタオキサノナデカン-1, 19-ジアミド (di VA-PEG-di VA)、Di L in-N-メチルピペラジン (DL-033)、Di L in-N, N-ジメチルグリシン (DL-036)、ジオレイル-N, N-ジメチルグリシン (DL-048)、3- ( (1, 3-ビス ( ( (9 Z, 12 Z) - オクタデカ-9, 12-ジエノイル) オキシ) プロパン-2-イル) アミノ) プロパン酸 (DLAPA)、1, 2-ジリノレニルオキシ-3-ジメチルアミノプロパン (DL en DMA)、1-リノレオイル-2-リノレイルオキシ-3-ジメチルアミノプロパン (DL in-2-DMA P)、3- (N, N-ジリノレイルアミノ) - 1, 2-プロパンジオール (DL in AP)、1, 2-N, N'-ジリノレイルカルバミル-3-ジメチルアミノプロパン (DL in car  
 50

bDAP)、1,2-ジリノレオイルカルバミル-3-ジメチルアミノプロパン(DLinCDAP)、1,2-ジリノレイルカルバモイルオキシ-3-ジメチルアミノプロパン(DLin-C-DAP)、1,2-ジリノレイオキシ-3-(ジメチルアミノ)アセトキシプロパン(DLin-DAC)、1,2-ジリノレオイル-3-ジメチルアミノプロパン(DLinDAP)、1,2-ジリノレイルオキシ-N,N-ジメチルアミノプロパン(DLinDMA)、1,2-ジリノレイルオキシ-3-ジメチルアミノプロパン(DLinDMA1)、1,2-ジリノレイルオキシ-3-(2-N,N-ジメチルアミノ)エトキシプロパン(DLin-EG-DMA)、ジリノレオイル-4-アミノ酪酸(DLinFAB)、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-K-C2-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)、1,2-ジリノレイオキシ-3-モルホリノプロパン(DLin-MA)、(6Z,9Z,28Z,31Z)-ヘプタトリアコント-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)、1,2-ジリノレイルオキシ-3-(N-メチルピペラジノ)プロパン(DLinMPZ)、1,2-ジリノレイルオキシ-3-(N-メチルピペラジノ)プロパン(DLin-MPZ)、ジリノレイルオキシ3-ピペリジノプロピルアミン(DLinPip)、1,2-ジリノレイルオキシ3-(3'-ヒドロキシピペリジノ)-プロピルアミン(DLinPip-3OH)、1,2-ジリノレイルオキシ3-(4'-ヒドロキシピペリジノ)-プロピルアミン(DLinPip-4OH)、1,2-ジリノレイルオキシ-3-ヒドロキシプロパン(DLinPO)、1,2-ジリノレイルチオ-3-ジメチルアミノプロパン(DLin-S-DMA)、1,2-ジリノレオイル-3-トリメチルアミノプロパン(DLinTAP)、1,2-ジリノレオイル-3-トリメチルアミノプロパンクロリド塩(DLin-TAP.Cl)、1,2-ジリノレイルオキシ-3-トリメチルアミノプロパンクロリド塩(DLin-TMA.Cl)、3-((1,3-ビス((9Z,12Z,15Z)-オクタデカ-9,12,15-トリエノイル)オキシ)プロパン-2-イル)アミノ)プロパン酸(DLLAPA)、1,2-ジリノレイルオキシ3-(N,N-ジメチル-プロピルアミン(DLmDEA)、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(DLPE)、1,2-ジラウロイル-sn-グリセロ-3-グリセロール(DLPG)、N,N-ジメチル-3,4-ジオレイルオキシベンジルアミン(DMOBA)、ジミリスチルホスファチジルセリン(DMPS)、N-[1-(2,3-ジミリスチルオキシ)プロピル]-N,N-ジメチル-N-(2-ヒドロキシエチル)アンモニウムブロミド(DMRIE)、1,2-ジミリスチルオキシプロピル-3-ジメチル-ヒドロキシエチルアンモニウムブロミド(DMRIE1)、1,2-ジミリスチル-3-トリメチルアンモニウムプロパン(DMTAP)、3-(N,N-ジオレイルアミノ)-1,2-プロパンジオ(DOAP)、3-((1,3-ビス(オレオイルオキシ)プロパン-2-イル)アミノ)プロパン酸(DOAPA)、1,2-N,N'-ジオレイルカルバミル-3-ジメチルアミノプロパン(DOcarbDAP)、1,2-ジオレオイルカルバミル-3-ジメチルアンモニウム-プロパン(DOCDAP)、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-ジオレオイル-3-ジメチルアンモニウム-プロパン(DODAP)、N,N-ジヒドロキシエチルN,N-ジオクタデシルアンモニウムクロリド(DODEAC)、N,N-ジメチル-2,3-ジオレイルオキシプロピルアミン(DODMA)、ジオレオイル-4-アミノ酪酸(DOFAB)、ジオクタデシルアミドグリシルスペルミン(DOGS)、1,2-ジオレオイル-3-メチル-(メトキシカルボニル-エチル)アンモニウム-プロパン(DOMCAP)、1,2-ジオレオイル-3-N-ピロリジン-プロパン(DOP5P)、1,2-ジオレオイル-3-N-ピリジニウム-プロパン、ブロミド塩(DOP6P)、1,2-ジオレオイル-3-ジメチル-ヒドロキシエチルアンモニウムブロミド(DORI)、1,2-ジオレイルオキシプロピル-3-ジメチル-ヒドロキ



シエチルアンモニウムブロミド (D O R I E)、1, 2-ジオレイルオキシプロピル-3-ジメチル-ヒドロキシブチルアンモニウムブロミド (D O R I E-H B)、1, 2-ジオレイルオキシプロピル-3-ジメチル-ヒドロキシブチルアンモニウムブロミド (D O R I E-H P)、1, 2-ジオレイルオキシプロピル-3-ジメチル-ヒドロキシペンチルアンモニウムブロミド (D O R I E-H p e)、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 (D O S P A)、1, 3-ジオレイルオキシ-2-(6-カルボキシ-スペルミル)-プロピルアミド (D O S P E R)、N-(1-(2, 3-ジオレイルオキシ)プロピル)-N, N-トリメチルアンモニウムクロリド (D O T A P)、1, 2-ジオレイル-3-トリメチルアンモニウム-プロパン (D O T A P 1) 10  
 、N-[5'-(2', 3'-ジオレイル)ウリジン]-N', N', N'-トリメチルアンモニウムトシレート (D O T A U)、1-[2-(9(Z)-オクタデセノイルオキシ)エチル]-2-(8(Z)-ヘプタデセニル-3-(2-ヒドロキシエチル)イミダゾリニウムクロリド (D O T I M)、N-(1-(2, 3-ジオレイルオキシ)プロピル)-N, N-トリメチルアンモニウムクロリド (D O T M A)、ジオレイルホスファチジルウリジンホスファチジルコリン (D O U P C)、1, 2-ジフブタニルオキシ-W. N-ジメチル)-ブチル-4-アメ (D P a n-C 2-D M A)、1, 2-ジフィタニルオキシ-3-(i V, 7 V-ジメチル)-プロピルアミン (D P a n D M A)、2, 3-ビス(ドデシルチオ)プロピル(2-(ジメチルアミノ)エチル)カルバメート (D P D E C) 20  
 、ジバルミトイル-4-アミノ酪酸 (D P F A B)、1, 2-ジバルミチルオキシプロピル-3-ジメチル-ヒドロキシエチルアンモニウムブロミド (D P R I E)、1, 2-ジバルミトイル-3-トリメチルアンモニウムプロパン (D P T A P)、1-[2-(ヘキサデカノイルオキシ)エチル]-2-ペンタデシル-3-(2-ヒドロキシエチル)イミダゾリニウムクロリド (D P T I M)、3-((1, 3-ビス(ステアロイルオキシ)プロパン-2-イル)アミノ)プロパン酸 (D S A P A)、ジステアリルジメチルアンモニウム (D S D M A)、1, 2-ジステアルルオキシ-N, N-ジメチルアミノプロパン (D S D M A 1)、1, 2-ジステリルオキシプロピル-3-ジメチル-ヒドロキシエチルアンモニウムブロミド (D S R I E)、1, 2-ジステロイル-3-トリメチルアンモニウムプロパン (D S T A P)、ジテトラデシルトリメチルアンモニウム (D T D T M A) 30  
 、1, 2-ジオレイル-s n-グリセロ-3-エチルホスホコリン (E D O P C)、N<sub>2</sub>-[N<sub>2</sub>, N<sub>5</sub>-ビス(3-アミノプロピル)-L-オルミチル]-N, N-ジオクタデシル-L-グルタミンテトラヒドロトリフルオロアセテート (G C 3 3)、コレスト-5-エン-3-オール(3 P)-, 3-[(3-アミノプロピル)[4-[(3-アミノプロピル)アミノ]ブチル]カルバメート (G L 6 7)、グリセリルモノ-オレエート (G M O)、グアニジノ-ジアルキル-カルボン酸 (G U A D A C A)、2-(ビス(2-(テトラデカノイルオキシ)エチル)アミノ)-N-(2-ヒドロキシエチル)-N, N-ジメチル-2-オキソエタン-アミニウムブロミド (H E D C)、2, 2'-(tert-ブトキシカルボニルアザネジール)ビス(エタン-2, 1-ジイル)ジテトラデカノエート (H E D C-B O C-T N)、1-(2-((3 S, 10 R, 13 R)-10, 13-ジメチル-17-((R)-6-メチルヘプタン-2-イル)-2, 3, 4 40  
 , 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17-テトラデカヒドロ-1 H-シクロペンタ[a]フェナントレン-3-イルジスルファニル)エチル)グアニジン (H G T 4 0 0 2)、(15 Z, 18 Z)-N, N-ジメチル-6-(9 Z, 12 Z)-オクタデカ-9, 12-ジエン-1-イル)テトラコサ-15, 18-ジエン-1-アミン (H G T 5 0 0 0)、(15 Z, 18 Z)-N, N-ジメチル-6-((9 Z, 12 Z)-オクタデカ-9, 12-ジエン-1-イル)テトラコサ-4, 15, 18-トリエン-1-アミン (H G T 5 0 0 1)、ヒスタミニル-コレステロールヘミスクシナト (H i s C h o l)、ヒスタジニルコレステロールヘミスクシネート (H i s t-C h o l)、Hydro Soy PC (H S P C)、イミダゾールコレステロールエステル (I C E) 50  
 、3-(ジドデシルアミノ)-N<sub>1</sub>, N<sub>1</sub>, 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)、N, N-ジ-n-アルクトラデシル、N-メチル-N-(2-グアニジニル)クチルアンモニウム (脂質1)、N, N-ジ-n-オクタデシル、N-メチル-N-(2-グアニジニル)クチルアンモニウムクロリド (脂質2)、3-((4, 4-ビス(オクチルオキシ)ブタノイル)オキシ)-2-(((3-(ジエチルアミノ)プロポキシ)カルボニル)オキシ)メチル)プロピル(9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエノエート (脂質A)、(9Z, 12Z)-3-((4, 4-ビス(オクチルオキシ)ブタノイル)オキシ)-2-(((3-(ジエチルアミノ)プロポキシ)カルボニル)オキシ)メチル)プロピルオクタデカ-9, 12-ジエノエート (脂質A1)、2, 2-ジリノレイル-4-ジメチルアミノエチル-[1, 3]-ジオキサラン (脂質A2)、((5-(ジメチルアミノ)メチル)-1, 3-フェニレン)ビス(オキシ))ビス(オクタン-8, 1-ジイル)ビス(デカノエート) (脂質B)、2-((4-((3-(ジメチルアミノ)プロポキシ)カルボニル)オキシ)ヘキサデカノイル)オキシ)プロパン-1, 3-ジイル9Z, 9'Z, 12Z, 12'Z)-ビス(オクタデカ-9, 12-ジエノエート) (脂質C)、3-(((3-(ジメチルアミノ)プロポキシ)カルボニル)オキシ)-13-(オクタノイルオキシ)トリデシル3-オクチルウンデカノエート (脂質D)、(6Z, 16Z)-12-((Z)-デス-4-エン-1-イル)ドコサ-6, 16-ジエン-11-イル5-(ジメチルアミノ)ペンタノエート (脂質I)、ジオクタデシル-(2-ヒドロキシ1-3-プロピルアミノ)アミノポリリジン (脂質T)、(3-((6Z, 9Z, 28Z, 31Z)-ヘプタトリアコンタ-6, 9, 28, 31-テトラエン-19-イルオキシ)-N, N-ジメチルプロパン-1-アミン (MC3エーテル)、米国仮出願番号61/384, 050に記載 (MC3チオエステル)、(4-((6Z, 9Z, 28Z, 31Z)-ヘプタトリアコンタ-6, 9, 28, 31-テトラエン-19-イルオキシ)-N, N-ジメチルブタン-1-アミン (MC4エーテル)、3-((2-((9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエノイル)オキシ)エチル)アミノ)プロパン酸 (MLAPA)、3-((2-((9Z, 12Z, 15Z)-オクタデカ-9, 12, 15-トリエノイル)オキシ)エスプンアミノ)プロパン酸 (MLLAPA)、モノミコリルグリセロール (MMG)、3-((2-(オレオイルオキシ)エチル)アミノ)プロパン酸 (MOAPA)、4-(2-アミノエチル)-モルホリノ-コレステロールヘミスクシナト (MoChol)、1, 2-ジオレオイル-3-N-モルホリン-プロパン (MoDO)、メチルピリジイル-ジアルキル-カルボン酸 (MPDACA)、モノパルミトイルホスファチジルコリン (MPPC)、3-((2-(ステアロイルオキシ)エチル)アミノ)プロパン酸 (MSAPA)、N1-[2-((1S)-1-[(3-アミノプロピル)アミノ]-4-[ジ(3-アミノ-プロピル)アミノ]ブチルカルボキサミド)エチル]-3, 4-ジ[オレイルオキシ]-ベンズアミド (MVL5)、2-({8-[(3β)-コレスト-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)-コレスト-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))、ホスファチジルコリン (PC)、1, 3-ビス-(1, 2-ビス-テトラデシルオキシ-プロピル-3-ジメチルエトキシアンモニウムブロミド)-プロパン-2-オール (PCL-2)、パルミトイ-オイ-エ-オイル-ノル-アルギニン (PONA)、ステアリルアミン (STA)、2-(((tert-ブチルジメチルシリル)オキシ)メチル)-2-(ヒドロキシメチル)プロパン-1, 3-ジオール (合成例1(A))、3-(((tert-ブチル(ジメチル)シリル)オキシ)-2, 2-ビス(((9Z)-テトラデス-9-エノイルオキシ)メチル)プロピル(9Z)-テトラデス-9-エノエート) (合成例1(B))、3-ヒドロキシ-2, 2-ビス(((

10

20

30

40

50

9 Z) - テトラデス - 9 - エノイルオキシ) メチル) プロピル (9 Z) - テトラデス - 9  
 - エノエート) (合成例 1 (C))、3 - ( (4 - (ジメチルアミノ) ブタノイル) オキ  
 シ) - 2, 2 - ビス ( ( (9 Z) - テトラデス - 9 - エノイルオキシ) メチル) プロピル  
 (9 Z) - テトラデス - 9 - エノエート) (合成例 1 (D))、3 - (5 - (ビス (2 -  
 ヒドロキシドデシル) アミノ) ペンタン - 2 - イル) - 6 - (5 - ( (2 - ヒドロキシド  
 デシル) (2 - ヒドロキシウンデシル) アミノ) ペンタン - 2 - イル) - 1, 4 - ジオキ  
 サン - 2, 5  
 - ジオン) (標的 24)、トレハロース 6', 6' - ジベヘネート (TDB)、1, 1' - (10  
 2 - (4 - (2 - ( (2 - (ビス (2 ヒドロキシドデシル) アミノ) エチル) (2 - ヒド  
 ロキシドデシル) アミノ) エチル) ピペラジン - 1 - イル) エチルアザネジイル) ジドデ  
 カン - 2 - オール (Tech G1)、3 - ( (1, 3 - ビス ( ( (9 Z, 12 Z) - オ  
 クタデカ - 9, 12 - ジエノイル) オキシ) - 2 - ( ( ( (9 Z, 12 Z) - オクタデカ  
 - 9, 12 - ジエノイル) オキシ) メチル) プロパン - 2 - イル) アミノ) プロパン酸 (T  
 LAPA)、(1 - (2, 3 - リノレイルオキシプロポキシ) - 2 - (リノレイルオキシ  
 シ) - (7 V, 11 - ジメチル) - プロピル - 3 - アミン) (TLindMA)、3 - (1  
 (1, 3 - ビス ( ( (9 Z, 12 Z, 15 Z) - オクタデカ - 9, 12, 15 - トリエノ  
 イル) オキシ) - 2 - ( ( ( (9 Z, 12 Z, 15 E) - オクタデカ - 9, 12, 15 -  
 トリエノイル) オキシ) メチル) プロパン - 2 - イル) アミノ) プロパン酸 (TLAP  
 A)、N - (α - トリメチルアンモニオアセチル) - ジドデシル - D - グルタメートクロ  
 リド (TMAG)、3 - ( (1, 3 - ビス ( ( (Z) - オクタデス - 9 - エノイル) オキシ  
 シ) - 2 - ( ( ( (Z) - オクタデス - 9 - エノイル) オキシ) メチル) プロパン - 2 -  
 イル) アミノ) プロパン酸 (TOAPA)、3 - ( (1, 3 - ビス (ステアロイルオキシ  
 シ) - 2 - ( (ステアロイルオキシ) メチル) プロパン - 2 - イル) アミノ) プロパン酸 (T  
 SAPA)、1, N19 - ビス ( (16 E, 18 E, 20 E, 22 E) - 17, 21 -  
 ジメチル - 15 - オキソ - 23 - (2, 6, 6 - トリメチルシクロヘキス - 1 - エン - 1  
 - イル) - 4, 7, 10 - トリオキサ - 14 - アザトリコサ - 16, 18, 20, 22 -  
 テトラエン - 1 - イル) - 4, 7, 10, 13, 16 - ペンタオキサノナデカン - 1, 1  
 9 - ジアミド (VA-PEG-VA)、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 (XTC)、非特許文献 11 に開示 (YSK05)、1,  
 2 - ジ - γ - リノレニルオキシ - N, N - ジメチルアミノプロパン (γ-DLenDMA 30  
 )、α - D - トコフェロールヘミスクシノイル、(9 Z, 9, Z, 12 Z, 12, Z) -  
 2 - ( (2 - ( ( (3 - (ジメチルアミノ) プロポキシ) カルボニル) オキシ) テトラデ  
 カノイル) オキシ) プロパン - 1, 3 - ジイルビス (オクタデカ - 9, 12 - ジエノエ  
 ート)、2 - ( ( (13 Z, 16 Z) - 4 - ( ( (3 - (ジエチルアミノ) プロポキシ) カ  
 ルボニル) オキシ) ドコサ - 13, 16 - ジエノイル) オキシ) プロパン - 1, 3 - ジ  
 イルジオクタノエート、2 - ( ( (13 Z, 16 Z) - 4 - ( ( (3 - (ジメチルアミノ)  
 プロポキシ) カルボニル) オキシ) ドコサ - 13, 16 - ジエノイル) オキシ) プロパ  
 ン - 1, 3 - ジイルジオクタノエート、2 - ( (4 - ( ( (3 - (エチル (メチル) アミノ  
 ) プロポキシ) カルボニル) オキシ) ヘキサデカノイル) オキシ) プロパン - 1, 3 -  
 ジイルジオクタノエート、2 - ( (4 - ( ( (3 - (エチル (メチル) アミノ) プロポキシ 40  
 ) カルボニル) オキシ) ヘキサデカノイル) オキシ) プロパン - 1, 3 - ジイルビス (デ  
 カノエート)、2 - ( (4 - ( ( (3 - (ジエチルアミノ) プロポキシ) カルボニル) オ  
 キシ) ヘキサデカノイル) オキシ) プロパン - 1, 3 - ジイルビス (デカノエート)、2  
 - (10 - ドデシル - 3 - エチル - 8, 14 - ジオキソ - 7, 9, 13 - トリオキサ - 3  
 - アザイコサン - 20 - イル) プロパン - 1, 3 - ジイルジオクタノエート、2 - ( ( (4  
 - (ジメチルアミノ) ブタノイル) オキシ) メチル) - 2 - ( (オクタノイルオキシ)  
 メチル) プロパン - 1, 3 - ジイル (9 Z, 9', Z) ビス - テトラデス - 9 - エノエート  
 、(9 Z, 9', Z, 12 Z, 12', Z) - 2 - ( ( (1 - (シクロプロピルメチル) ピペリ  
 ジン - 4 - カルボニル) オキシ) メチル) プロパン - 1, 3 - ジイルビス (オクタデカ  
 9, 12 - ジエノエート)、( (2 - ( ( (1 - イソプロピルピペリジン - 4 - カルボニ

ル) オキシ) メチル) - 1, 4-フェニレン) ビス (オキシ) ) ビス (オクタノ- 8, 1-ジイル) ビス (デカノエート)、2- ( (4- ( ( (3- (エチル (メチル) アミノ) プロポキシ) カルボニル) オキシ) ヘキサデカノイル) オキシ) プロパン- 1, 3-ジイルジドデカノエート、2- ( (4- ( ( (3- (ジエチルアミノ) プロポキシ) カルボニル) オキシ) ヘキサデカノイル) オキシ) プロパン- 1, 3-ジイルジドデカノエート、2- ( (4- ( ( (3- (エチル (メチル) アミノ) プロポキシ) カルボニル) オキシ) ヘキサデカノイル) オキシ) プロパン- 1, 3-ジイルジテトラデカノエート、2- ( (4- ( ( (3- (ジメチルアミノ) プロポキシ) カルボニル) オキシ) ヘキサデカノイル) オキシ) プロパン- 1, 3-ジイルジテトラデカノエート、2- ( (4- ( ( (3- (ジエチルアミノ) プロポキシ) カルボニル) オキシ) ヘキサデカノイル) オキシ) プロパン- 1, 3-ジイルジテトラデカノエート、(Z) - 2- ( (4- ( ( (3- (ジメチルアミノ) プロポキシ) カルボニル) オキシ) ヘキサデカノイル) オキシ) プロパン- 1, 3-ジイルジオレエート、(9Z, 9, Z, 12Z, 12, Z, 15Z, 15, Z) - 2- ( (4- ( ( (3- (ジメチルアミノ) プロポキシ) カルボニル) オキシ) ヘキサデカノイル) オキシ) プロパン- 1, 3-ジイルビス (オクタデカ- 9, 12, 15-トリエノエート)、(9Z, 9, Z, 12Z, 12, Z) - 2- ( (4- ( ( (3- (ジエチルアミノ) プロポキシ) カルボニル) オキシ) ヘキサデカノイル) オキシ) プロパン- 1, 3-ジイルビス (オクタデカ- 9, 12-ジエノエート)、(9Z, 9, Z, 12Z, 12, Z) - 2- ( (4- ( ( (3- (ジメチルアミノ) プロポキシ) カルボニル) オキシ) ヘキサデカノイル) オキシ) プロパン- 1, 3-ジイルビス (オクタデカ- 9, 12-ジエノエート)、N, N, N-トリメチル- 5-オキソ- 5- (3- ( (3-ペンチルオクタノイル) オキシ) - 2, 2-ビス ( ( (3-ペンチルオクタノイル) オキシ) メチル) プロポキシ) ペンタノ- 1-アミニウムヨウ化物 3- ( (5- (ジメチルアミノ) ペンタノイル) オキシ) - 2, 2-ビス ( ( (3-ペンチルオクタノイル) オキシ) メチル) プロピル 3-ペンチルオクタノエート、3-ジメチルアミノプロピルカーボネート (9Z, 12Z) - オクタコサ- 19, 22-ジエン- 11-イル、2- ( ( (N, N-ジメチル-  $\beta$ -アラニル) オキシ] メチル} - 2- [(オクタノイルオキシ) メチル) プロパン- 1, 3-ジイル (9Z, 9'Z) ビス-テトラデス- 9-エノエート、O' I, O1- (2- (7-ドデシル- 14-メチル- 3, 9-ジオキソ- 2, 4, 8, 10-テトラオキサ- 14-アザペンタデシル) プロパン- 1, 3-ジイル) 8-ジメチルジオクタンジオエート、8-ジメチル O' I, O1- (2- ( ( (1-メチルピロリジン- 3-カルボニル) オキシ) メチル) プロパン- 1, 3-ジイル) ジオクタンジオエート、1- (3- ( (6, 6-ビス ( (2-プロピルペンチル) オキシ) ヘキサノイル) オキシ) - 2- ( ( (1, 4-ジメチルピペリジン- 4-カルボニル) オキシ) メチル) プロピル) 8-メチルオクタンジオエート、(9Z, 12Z) - 5- ( ( (3- (ジメチルアミノ) プロポキシ) カルボニル) オキシ) - 7-オクチルペンタデシルオクタデカ- 9, 12-ジエノエート、5- ( ( (3- (ジメチルアミノ) プロポキシ) カルボニル) オキシ) - 7-オクチルペンタデシルオクタノエート、1- (3- ( (6, 6-ビス ( (2-プロピルペンチル) オキシ) ヘキサノイル) オキシ) - 2- ( ( (1, 4-ジメチルピペリジン- 4-カルボニル) オキシ) メチル) プロピル) 10-オクチルデカンジオエート、3- ( ( (3- (ジメチルアミノ) プロポキシ) カルボニル) オキシ) - 5-オクチルトリデシルデカノエート、1- (16- ( ( (4, 4-ビス (オクチルオキシ) ブタノイル) オキシ) メチル) - 9-ドデシル- 2-メチル- 7, 13-ジオキソ- 6, 8, 12, 14-テトラオキサ- 2-アザヘプタデカン- 17-イル) 8-メチルオクタンジオエート、3- ( (5- (ジメチルアミノ) ペンタノイル) オキシ) - 2, 2-ビス ( ( (9Z) -テトラデス- 9-エノイルオキシ) メチル) プロピル (9Z, 12Z) - オクタデス- 9, 12-ジエノエート、3- ( (5- (ジメチルアミノ) ペンタノイル) オキシ) - 2, 2-ビス ( ( (3-ペンチルオクタノイル) オキシ) メチル) プロピル 3-ペンチルオクタノエート、(9Z, 9'Z,

1 2 Z, 1 2' Z) - 2 - ( ( ( 3 - (ジエチルアミノ) プロパノイル) オキシ) メチル  
 ) プロパン-1, 3-ジイルビス (オクタデカ-9, 12-ジエノエート)、 ( ( 2 - ( ( ( 4 - (ジメチルアミノ) ブタノイル) オキシ) メチル) - 1, 4-フェニレン) ビス  
 (オキシ) ) ビス (オクタン-8, 1-ジイル) ビス (デカノエート)、 1 - ( 3 - ( ( 4, 4-ビス (オクチルオキシ) ブタノイル) オキシ) - 2 - ( ( ( 1-メチルピロリジ  
 ン-3-カルボニル) オキシ) メチル) プロピル) 8-メチルオクタンジオエート、 3 -  
 ( ( 4, 4-ビス (オクチルオキシ) ブタノイル) オキシ) - 2 - ( ( パルミトイルオキシ  
 ) メチル) プロピル 1-メチルピロリジン-3-カルボキシレート、 3 - ( ( 4, 4-  
 ビス (オクチルオキシ) ブタノイル) オキシ) - 2 - ( ( テトラデカノイルオキシ) メチ  
 ル) プロピル 1-メチルピロリジン-3-カルボキシレート、 3 - ( ( ( 3 - (ジメチル  
 アミノ) プロポキシ) カルボニル) オキシ) - 1 3 - (オクタノイルオキシ) トリデシル  
 9-ペンチルトトラデカノエート、 3 - ( ( 4, 4-ビス (オクチルオキシ) ブタノイル  
 ) オキシ) - 2 - ( ( ドデカノイルオキシ) メチル) プロピル 1-メチルピロリジン-3  
 -カルボキシレート、 3 - ( ( ( 3 - (ジメチルアミノ) プロポキシ) カルボニル) オキシ  
 ) - 1 3 - ヒドロキシトリデシル 9-ペンチルトトラデカノエート、 3 - ( ( ( 3 - (ジ  
 メチルアミノ) プロポキシ) カルボニル) オキシ) - 1 3 - (オクタノイルオキシ) ト  
 リデシル 7-ヘキシルトリデカノエート、 2 - ( 5 - ( 3 - ( ( 1-メチルピロリジン-  
 3-カルボニル) オキシ) - 2 - ( ( テトラデカノイルオキシ) メチル) プロポキシ) -  
 5-オキソペンチル) プロパン-1, 3-ジイルジオクタノエート、 3 - ( ( ( 3 - (ジ  
 メチルアミノ) プロポキシ) カルボニル) オキシ) - 1 3 - (オクタノイルオキシ) トリ  
 デシル 5-ヘプチルドデカノエート、 2 - ( 5 - ( 3 - ( ( 1-メチルピロリジン-3-  
 カルボニル) オキシ) - 2 - ( ( パルミトイルオキシ) メチル) プロポキシ) - 5-オキ  
 ソペンチル) プロパン-1, 3-ジイルジオクタノエート、 3 - ( ( ( 3 - (ジメチルア  
 ミノ) プロポキシ) カルボニル) オキシ) - 1 3 - ヒドロキシトリデシル 5-ヘプチルド  
 デカノエート、 2 - ( ( ( 1-メチルピロリジン-3-カルボニル) オキシ) メチル) プ  
 ロパン-1, 3-ジイルビス (6, 6-ビス (オクチルオキシ) ヘキサノエート)、 ( 9  
 Z, 1 2 Z) - 3 - ( ( ( 3 - ジメチルアミノ) プロポキシ) カルボニル) オキシ) - 1  
 3 - (オクタノイルオキシ) トリデシルオクタデカ-9, 12-ジエノエート、 3 - ( ( 5  
 - (ジメチルアミノ) ペンタノイル) オキシ) - 2, 2-ビス ( ( ( 9 Z) - テトラデ  
 ス-9-エノイルオキシ) メチル) プロピル ( 9 Z) - オクタデス-9-エノエート、 2  
 - ( 10-ドデシル-3-エチル-8, 14-ジオキソ-7, 9, 13-トリオキサ-3  
 -アザノナデカン-19-イル) プロパン-1, 3-ジイルジオクタノエート、 ( ( 2 -  
 ( ( ( 1-メチルペリジン-4-カルボニル) オキシ) メチル) - 1, 4-フェニレン  
 ) ビス (オキシ) ) ビス (オクタン-8, 1-ジイル) ビス (デカノエート)、 2 - ( ( ( 3  
 - (ジメチルアミノ) プロパノイル) オキシ) メチル) プロパン-1, 3-ジ  
 イルビス (4, 4-ビス (オクチルオキシ) ブタノエート)、 ( 9 Z, 1 2 Z) - 2 - ( ( ( 1  
 1 Z, 1 4 Z) - 2 - ( ( 3 - (ジメチルアミノ) プロパノイル) オキシ) イコサ-  
 11, 14-ジエン-1-イル) オキシ) エチルオクタデカ-9, 12-ジエノエート、  
 2 - ( ( ( 1, 3-ジメチルピロリジン-3-カルボニル) オキシ) メチル) プロパン-  
 1, 3-ジイルビス (4, 4-ビス (オクチルオキシ) ブタノエート)、 ( 1 3 Z, 1 6  
 Z) - 4 - ( ( ( 3 - (ジメチルアミノ) プロポキシ) カルボニル) オキシ) ドコサ-1  
 3, 16-ジエン-1-イルヘプタデカン-9-イルスクシネート、 2, 2-ビス (ヘプ  
 チルオキシ) エチル 3 - ( ( 3-エチル-10 - ( ( 9 Z, 1 2 Z) - オクタデカ-9,  
 12-ジエン-1-イル) - 8, 15-ジオキソ-7, 9, 14-トリオキサ-3-アザ  
 ヘプタデカン-17-イル) ジスルファニル) プロパノエート、 2 - ( ( ( 1-メチルピ  
 ロリジン-3-カルボニル) オキシ) メチル) プロパン-1, 3-ジイルビス (4, 4-  
 ビス (オクチルオキシ) ブタ、 1 - ( 3 - ( ( 1, 3-ジメチルピロリジン-3-カルボ  
 ニル) オキシ) - 2 - ( ( ( 9 Z, 1 2 Z) - オクタデカ-9, 12-ジエノイルオキシ  
 ) メチル) プロピル) 10-オクチルデカンジオエート、 ( 1 3 Z, 1 6 Z) - 4 - ( ( ( 3  
 - (ジエチルアミノ) プロポキシ) カルボニル) オキシ) ドコサ-1 3, 16-ジエ

10

20

30

40

50

ン-1-イル2, 2-ビス(ヘブチルオキシ)アセテート、(13Z, 16Z)-4-(  
 ((2-(ジメチルアミノ)エトキシ)カルボニル)オキシ)ドコサ-13, 16-ジエ  
 ン-1-イル2, 2-ビス(ヘブチルオキシ)アセテート、酢酸(20, 23R)-2-  
 メチル-9-[ (9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエン-1-イル]-7-オ  
 キソ-6, 8, 11-トリオキサ-2-アザノナコサ-20-エン-23-イル3-(ジ  
 メチルアミノ)プロピルカーボネート(11Z, 14Z)-1-{ [(9Z, 12R)-  
 12-ヒドロキシオクタデス-9-エン-1-イル]、(12Z, 15Z)-1-((  
 (9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエン-1-イルオキシ)カルボニル)オキ  
 シ)ヘニコサ-12, 15-ジエン-3-イル3-(ジメチルアミノ)プロパノエート、  
 (9Z, 12Z)-3-((4, 4-ビス(オクチルオキシ)ブタノイル)オキシ)-2  
 -(((3-(ジメチルアミノ)プロピル)カルバモイル)オキシ)メチル)プロピル  
 オクタデカ-9, 12-ジエノエート、(12Z, 15Z)-3-((4-(ジメチルア  
 ミノ)ブタノイル)オキシ)ヘニコサ-12, 15-ジエン-1-イル9-ペンチルテト  
 ラデカノエート、(9Z, 12Z)-3-((4, 4-ビス(オクチルオキシ)ブタノイ  
 ル)オキシ)-2-(((1, 2, 2, 6, 6-ペンタメチルピペリジン-4-イル  
 )オキシ)カルボニル)オキシ)メチル)プロピルオクタデカ-9, 12-ジエノエート  
 、(12Z, 15Z)-3-((4-(ジメチルアミノ)ブタノイル)オキシ)ヘニコサ  
 -12, 15-ジエン-1-イル7-ヘキシルトリデカノエート、(9Z, 12Z)-3  
 -((4, 4-ビス(オクチルオキシ)ブタノイル)オキシ)-2-(((1-メチ  
 ルピペリジン-4-イル)メトキシ)カルボニル)オキシ)メチル)プロピルオクタデカ  
 -9, 12-ジエノエート、(12Z, 15Z)-3-((4-(ジメチルアミノ)ブタ  
 ノイル)オキシ)ヘニコサ-12, 15-ジエン-1-イル5-ヘブチルドデカノエート  
 、(9Z, 12Z)-3-((4, 4-ビス(オクチルオキシ)ブタノイル)オキシ)-  
 2-(((1-エチルピペリジン-4-イル)オキシ)カルボニル)オキシ)メチル  
 )プロピルオクタデカ-9, 12-ジエノエート、(12Z, 15Z)-3-((4-(  
 ジメチルアミノ)ブタノイル)オキシ)ヘニコサ-12, 15-ジエン-1-イル3-オ  
 クチルウンデカノエート、ギ酸塩、3-((5-(ジメチルアミノ)ペンタノイル)オキ  
 シ)-2, 2-ビス(((9Z)-テトラデス-9-エノイルオキシ)メチル)プロピル  
 (9Z)-ヘキサデス-9-エノエート、(9Z, 12Z)-3-((4, 4-ビス(オ  
 クチルオキシ)ブタノイル)オキシ)-2-(((1-メチルアゼチジン-3-イル  
 )オキシ)カルボニル)オキシ)メチル)プロピルオクタデカ-9, 12-ジエノエート  
 、(9Z, 12Z)-((12Z, 15Z)-3-((3-(ジメチルアミノ)プロパノイ  
 ル)オキシ)ヘニコサ-12, 15-ジエン-1-イルオクタデカ-9, 12-ジエノエ  
 ート、2-(((3-(ジエチルアミノ)プロボキシ)カルボニル)オキシ)テトラデシ  
 ル4, 4-ビス((2-エチルヘキシル)オキシ)ブタノエート、(9Z, 12Z)-3  
 -((4, 4-ビス(オクチルオキシ)ブタノイル)オキシ)-2-(((1-メチ  
 ルピペリジン-4-イル)オキシ)カルボニル)オキシ)メチル)プロピルオクタデカ  
 -9, 12-ジエノエート、(9Z, 12Z)-3-((4, 4-ビス(オクチルオキシ)  
 ブタノイル)オキシ)-2-(((1-メチルピロリジン-3-イル)オキシ)カル  
 ボニル)オキシ)メチル)プロピルオクタデカ-9, 12-ジエノエート、(9Z, 12  
 Z)-3-(((2-(ジメチルアミノ)エトキシ)カルボニル)オキシ)ペンタデシル  
 オクタデカ-9, 12-ジエノエート、(9Z, 12Z)-3-((4, 4-ビス(オク  
 チルオキシ)ブタノイル)オキシ)-2-(((3-(4-メチルピペラジン-1-イ  
 ル)プロボキシ)カルボニル)オキシ)メチル)プロピルオクタデカ-9, 12-ジエノ  
 エート、3-(ジメチルアミノ)プロピルトリアコンタン-11-イルカルボネートトリ  
 アコンタン-11-オール、(9Z, 12Z)-3-((4, 4-ビス(オクチルオキシ)  
 )ブタノイル)オキシ)-2-(((3-(ピロリジン-1-イル)プロボキシ)カル  
 ボニル)オキシ)メチル)プロピルオクタデカ-9, 12-ジエノエート、(9Z, 12  
 Z)-3-(((3-(エチル(メチル)アミノ)プロボキシ)カルボニル)オキシ)ペ  
 ンタデシルオクタデカ-9, 12-ジエノエート、3-((4, 4-ビス(オクチルオキ

10

20

30

40

50

シ) ブタノイル) オキシ) - 2 - ( ( ( 9 Z, 1 2 Z) - オクタデカ- 9, 1 2 - ジエノ  
 イルオキシ) メチル) プロピル 4 - ( ( ジエチルアミノ) メチル) ベンゾエート、 ( 9 Z  
 , 1 2 Z) - 3 - ( ( ( 3 - ( ジエチルアミノ) プロポキシ) カルボニル) オキシ) ペン  
 タデシルオクタデカ- 9, 1 2 - ジエノエート、 3 - ( ( 4, 4 - ビス ( オクチルオキシ  
 ) ブタノイル) オキシ) - 2 - ( ( ( 9 Z, 1 2 Z) - オクタデカ- 9, 1 2 - ジエノイ  
 ルオキシ) メチル) プロピル 3 - ( ( ジメチルアミノ) メチル) ベンゾエート、 ( 9 Z,  
 1 2 Z) - 3 - ( ( ( 3 - ( ジメチルアミノ) プロポキシ) カルボニル) オキシ) ペンタ  
 デシルオクタデカ- 9, 1 2 - ジエノエート、 3 - ( ( 4, 4 - ビス ( オクチルオキシ)  
 ブタノイル) オキシ) - 2 - ( ( ( 9 Z, 1 2 Z) - オクタデカ- 9, 1 2 - ジエノイル  
 オキシ) メチル) プロピル 1 - メチルピペリジン- 3 - カルボキシレート、 3 - ( ( 4,  
 4 - ビス ( オクチルオキシ) ブタノイル) オキシ) - 2 - ( ( ( 9 Z, 1 2 Z) - オクタ  
 デカ- 9, 1 2 - ジエノイルオキシ) メチル) プロピル 1 - メチルピペリジン- 4 - カル  
 ボキシレート、 3 - ( ( 4, 4 - ビス ( オクチルオキシ) ブタノイル) オキシ) - 2 - ( ( ( 9 Z,  
 1 2 Z) - オクタデカ- 9, 1 2 - ジエノイルオキシ) メチル) プロピル 1,  
 4 - ジメチルピペリジン- 4 - カルボキシレート、 3 - ( ( 4 - ( ジメチルアミノ) ブタ  
 ノイル) オキシ) - 2, 2 - ビス ( ( ( 9 Z) - テトラデス- 9 - エノイルオキシ) メチ  
 ル) プロピル ( 9 Z) - ヘキサデス- 9 - エノエート、 2 - ( 1 0 - ドデシル- 3 - エチ  
 ル- 8, 1 4 - ジオキソ- 7, 9, 1 3 - トリオキサ- 3 - アザヘキサデカン- 1 6 - イ  
 ル) プロパン- 1, 3 - ジイルジオクタノエート、 ( 9 Z, 9 ' Z, 1 2 Z, 1 2 ' Z) -  
 2 - ( ( ( 4 - ( ピペリジン- 1 - イル) ブタノイル) オキシ) メチル) プロパン- 1,  
 3 - ジイルビス ( オクタデカ- 9, 1 2 - ジエノエート)、 3 - ( ( 4, 4 - ビス ( オク  
 チルオキシ) ブタノイル) オキシ) - 2 - ( ( ( 9 Z, 1 2 Z) - オクタデカ- 9, 1 2  
 - ジエノイルオキシ) メチル) プロピル 4 - メチルモルホリン- 2 - カルボキシレート、  
 ( 2 R) - 3 - ( ( 4, 4 - ビス ( オクチルオキシ) ブタノイル) オキシ) - 2 - ( ( ( 9 Z,  
 1 2 Z) - オクタデカ- 9, 1 2 - ジエノイルオキシ) メチル) プロピル 1 - メチ  
 ルピロリジン- 2 - カルボキシレート、 ( 2 S) - 3 - ( ( 4, 4 - ビス ( オクチルオキ  
 シ) ブタノイル) オキシ) - 2 - ( ( ( 9 Z, 1 2 Z) - オクタデカ- 9, 1 2 - ジエノ  
 イルオキシ) メチル) プロピル 1 - メチルピロリジン- 2 - カルボキシレート、 ( 9 Z,  
 9 ' Z, 1 2 Z, 1 2 ' Z) - 2 - ( ( ( ( 3 - ( ジエチルアミノ) プロポキシ) カルボニ  
 ル) オキシ) メチル) - 2 - ( ( ( 9 Z, 1 2 Z) - オクタデカ- 9, 1 2 - ジエノイル  
 オキシ) メチル) プロパン- 1, 3 - ジイルビス ( オクタデカ- 9, 1 2 - ジエノエート  
 )、 ( 9 Z, 1 2 Z) - 3 - ( ( 4, 4 - ビス ( オクチルオキシ) ブタノイル) オキシ)  
 - 2 - ( ( ( ( 1 - エチルピペリジン- 3 - イル) メトキシ) カルボニル) オキシ) メ  
 チル) プロピルオクタデカ- 9, 1 2 - ジエノエート、 3 - ( ( 4, 4 - ビス ( オクチル  
 オキシ) ブタノイル) オキシ) - 2 - ( ( ( 9 Z, 1 2 Z) - オクタデカ- 9, 1 2 - ジ  
 エノイルオキシ) メチル) プロピル 1 - ( シクロプロピルメチル) ピペリジン- 4 - カル  
 ボキシレート、 3 - ( ( 4, 4 - ビス ( オクチルオキシ) ブタノイル) オキシ) - 2 - ( ( ( 9 Z,  
 1 2 Z) - オクタデカ- 9, 1 2 - ジエノイルオキシ) メチル) プロピル 1 -  
 イソプロピルピペリジン- 4 - カルボキシレート、 ( 9 Z, 1 2 Z) - 3 - ( ( 4, 4 -  
 ビス ( オクチルオキシ) ブタノイル) オキシ) - 2 - ( ( ( 3 - ( ジメチルアミノ) プロ  
 パノイル) オキシ) メチル) プロピルオクタデカ- 9, 1 2 - ジエノエート、 4 - ( ジメ  
 チルアミノ) ブチルカルボネート ( 6 Z, 9 Z, 2 6 Z, 2 9 Z) - ペンタトリアコンタ  
 - 6, 9, 2 6, 2 9 - テトラエン- 1 8 - イル、 3 - ( ( 6 - ( ジメチルアミノ) ヘキ  
 サノイル) オキシ) - 2, 2 - ビス ( ( ( 9 Z) - テトラデス- 9 - エノイルオキシ) メ  
 チル) プロピル ( 9 Z) - テトラデス- 9 - エノエート、 2, 5 - ビス ( ( 9 Z, 1 2 Z)  
 ) - オクタデカ- 9, 1 2 - ジエニルオキシ) ベンジル 3 - ( ジメチルアミノ) プロピル  
 カーボネート、 ( 9 Z, 9 ' Z, 1 2 Z, 1 2 ' Z) - 2 - ( ( ( 4 - ( ピロリジン- 1 -  
 イル) ブタノイル) オキシ) メチル) プロパン- 1, 3 - ジイルビス ( オクタデカ- 9,  
 1 2 - ジエノエート)、 3 - ( ( ( 3 - ( ジメチルアミノ) プロポキシ) カルボニル) オ  
 キシ) ペンタデシル 5 - ヘプチルドデカノエート、酢酸 ( 7 R, 9 Z) - 1 8 - ( { [ 3

10

20

30

40

50

- (ジメチルアミノ) プロピルオキシ] カルボニル} オキシ) オクタコサ-9-エン-7-  
 -イル、3-((3-(ジメチルアミノ) プロポキシ) カルボニル) オキシ) ペンタデ  
 シル9-ペンチルトトラデカノエート、(9Z, 12Z)-3-((6, 6-ビス(オク  
 チルオキシ) ヘキサノイル) オキシ)-2-(((3-(ジエチルアミノ) プロポキシ  
 ) カルボニル) オキシ) メチル) プロピルオクタデカ-9, 12-ジエノエート、3-  
 ((3-(ジメチルアミノ) プロポキシ) カルボニル) オキシ) ペンタデシル7-ヘキシ  
 ルトリデス-6-エノエート、(9Z, 12Z)-3-(2, 2-ビス(ヘプチルオキシ  
 ) アセトキシ)-2-(((2-(ジメチルアミノ) エトキシ) カルボニル) オキシ)  
 メチル) プロピルオクタデカ-9, 12-ジエノエート、3-(((3-(ジメチルアミ  
 ノ) プロポキシ) カルボニル) オキシ) ペンタデシル3-オクチルウンデス-2-エノエ  
 ート、(9Z, 12Z)-3-(((3-(ジエチルアミノ) プロポキシ) カルボニル)  
 オキシ)-2-(((5-ヘプチルドデカノイル) オキシ) メチル) プロピルオクタデカ  
 -9, 12-ジエノエート、3-(((3-ジメチルアミノ) プロポキシ) カルボニ  
 ル) オキシ) ペンタデシル3オクチルウンデカノエート、(9Z, 12Z)-3-(((3-  
 (ジエチルアミノ) プロポキシ) カルボニル) オキシ)-2-(((9-ペンチルト  
 トラデカノイル) オキシ) メチル) プロピルオクタデカ-9, 12-ジエノエート、二酢  
 酸(7R, 9Z, 26Z, 29R)-18-({[3-(ジメチルアミノ) プロポキシ]  
 カルボニル} オキシ) ペンタトリアコンタ-9, 26-ジエン-7, 29-ジイル、3-  
 (((3-(ジメチルアミノ) プロポキシ) カルボニル) オキシ) ペンタデシル8, 8-  
 ビス((2-プロピルベンチル) オキシ) オクタノエート、(9Z, 12Z)-3-(((3-  
 (ジエチルアミノ) プロポキシ) カルボニル) オキシ)-2-(((7-ヘキシルト  
 リデカノイル) オキシ) メチル) プロピルオクタデカ-9, 12-ジエノエート、3-  
 (((3-(エチル(メチル) アミノ) プロポキシ) カルボニル) オキシ) ペンタデシル  
 8, 8-ビス((2-プロピルベンチル) オキシ) オクタノエート、(9Z, 12Z)-3-  
 (((3-(ジエチルアミノ) プロポキシ) カルボニル) オキシ)-2-(((3-  
 オクチルウンデカノイル) オキシ) メチル) プロピルオクタデカ-9, 12-ジエノエ  
 ート、3-(((3-(ジエチルアミノ) プロポキシ) カルボニル) オキシ) ペンタデシル  
 8, 8-ビス((2-プロピルベンチル) オキシ) オクタノエート、3-(((3-(ジ  
 エチルアミノ) プロポキシ) カルボニル) オキシ) ペンタデシル8, 8-ジブトキシオク  
 タノエート、3-(((5-(ジメチルアミノ) ペンタノイル) オキシ)-2, 2-ビス(  
 (9Z)-テトラデス-9-エノイルオキシ) メチル) プロピル(9Z)-テトラデス  
 -9-エノエート、3-(ジメチルアミノ) プロピルカーボネート(6Z, 9Z, 26Z  
 , 29Z)-ペンタトリアコントル-6, 9, 26, 29-テトラエン-18-イル、  
 2, 5-ビス((9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエン-1-イルオキシ) ベ  
 ンジル3-(ジメチルアミノ) プロパノエート、(9Z, 9'Z, 12Z, 12'Z)-2-  
 (((3-(4-メチルピペラジン-1-イル) プロパノイル) オキシ) メチル) プロ  
 パン-1, 3-ジイルビス(オクタデカ-9, 12-ジエノエート)、3-(((3-(  
 ジエチルアミノ) プロポキシ) カルボニル) オキシ) ペンタデシル8, 8-ビス(オク  
 チルオキシ) オクタノエート、3-(ジメチルアミノ) プロピルオクタコサン-11-イル  
 カルボネート、2, 4-ビス((9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエニルオキシ)  
 ベンジル4-(ジメチルアミノ) ブタノエート、(9Z, 12Z)-3-(((3-  
 (ジエチルアミノ) プロポキシ) カルボニル) オキシ)-2-(((2-ヘプチルウンデ  
 カノイル) オキシ) メチル) プロピルオクタデカ-9, 12-ジエノエート、3-(((3-  
 (ジエチルアミノ) プロポキシ) カルボニル) オキシ) ペンタデシル6, 6-ビス(  
 (2-エチルヘキシル) オキシ) ヘキサノエート、2-(((3-(ジメチルアミノ)  
 プロポキシ) カルボニル) オキシ) メチル) プロパン-1, 3-ジイルビス(2-ヘプ  
 チルウンデカノエート)、3-(((3-(ジエチルアミノ) プロポキシ) カルボニル) オ  
 キシ) ペンタデシル6, 6-ビス(ヘキシルオキシ) ヘキサノエート、4-メチル-2,  
 5-ビス((9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエン-1-イルオキシ) ベンジ  
 ル4-(ジメチルアミノ) ブタノエート、3-(((3-(ジエチルアミノ) プロポキシ

10

20

30

40

50



) カルボニル) オキシ) ペンタデシル 6, 6-ビス (オクチルオキシ) ヘキサノエート、  
 4- (ジメチルアミノ) ブチル 4-メチル-2, 5-ビス ( (9Z, 12Z) -オクタデ  
 カ-9, 12-ジエニルオキシ) ベンジルカルボネート、3- ( ( (3- (ジメチルアミ  
 ノ) プロポキシ) カルボニル) オキシ) ペンタデシル 4, 4-ビス ( (2-プロピルペン  
 チル) オキシ) ブタノエート、2- (12-ドデシル-3-エチル-8, 14-ジオキソ  
 -7, 9, 13-トリオキサ-3-アザオクタデカン-18-イル) プロパン-1, 3-  
 ジイルジオクタノエート、2- (5-オキソ-5- ( (3- ( ( (3- (ピペリジン-1  
 -イル) プロポキシ) カルボニル) オキシ) ペンタデシル) オキシ) ペンチル) プロパン  
 -1, 3-ジイルジオクタノエート、3- (ジメチルアミノ) プロピル 4-メチル-2,  
 5-ビス ( (9Z, 12Z) -オクタデカ-9, 12-ジエン-1-イルオキシ) ベンジ  
 ルカルボネート、3- ( ( (3- (エチル (メチル) アミノ) プロポキシ) カルボニル)  
 オキシ) ペンタデシル 4, 4-ビス ( (2-プロピルペンチル) オキシ) ブタノエート、  
 2- (11-ドデシル-3-エチル-9, 15-ジオキソ-8, 10, 14-トリオキサ  
 -3-アザノナデカン-19-イル) プロパン-1, 3-ジイルジオクタノエート、2-  
 (10-ドデシル-3-エチル-8, 15-ジオキソ-7, 9, 14-トリオキサ-3-  
 アザノナデカン-19-イル) プロパン-1, 3-ジイルジオクタノエート、2- (5-  
 ( (4- ( ( (1-メチルピペリジン-4-イル) オキシ) カルボニル) オキシ) ヘキ  
 サデシル) オキシ) -5-オキソペンチル) プロパン-1, 3-ジイルジオクタノエート  
 、2- (5- ( (4- ( ( (1-エチルピペリジン-3-イル) メトキシ) カルボニル  
 ) オキシ) ヘキサデシル) オキシ) -5-オキソペンチル) プロパン-1, 3-ジイルジ  
 オクタノエート、2- (5- ( (4- ( ( ( (R) -1-メチルピロリジン-3-イル  
 ) オキシ) カルボニル) オキシ) ヘキサデシル) オキシ) -5-オキソペンチル) プロパ  
 ン-1, 3-ジイルジオクタノエート、2- (5- ( (4- ( ( ( (S) -1-メチル  
 ピロリジン-3-イル) オキシ) カルボニル) オキシ) ヘキサデシル) オキシ) -5-オ  
 キソペンチル) プロパン-1, 3-ジイルジオクタノエート、2- (5-オキソ-5- ( (4- ( ( (S) -  
 ピロリジン-2-カルボニル) オキシ) ヘキサデシル) オキシ) ペン  
 チル) プロパン-1, 3-ジイルジオクタノエート、2- (5- ( (4- ( (1, 3-ジ  
 メチルピロリジン-3-カルボニル) オキシ) ヘキサデシル) オキシ) -5-オキソペン  
 チル) プロパン-1, 3-ジイルジオクタノエート、2- (5- ( (4- ( (1, 4-ジ  
 メチルピペリジン-4-カルボニル) オキシ) ヘキサデシル) オキシ) -5-オキソペン  
 チル) プロパン-1, 3-ジイルジオクタノエート、4, 4-ビス (オクチルオキシ) ブ  
 チル (3- (ジエチルアミノ) プロピル) ペンタデカン-1, 3-ジイルジカルボネート  
 、3- ( ( (3- (ジエチルアミノ) プロポキシ) カルボニル) オキシ) ペンタデシル 4  
 , 4-ビス ( (2-プロピルペンチル) オキシ) ブタノエート、 ( (2- ( ( (3- (ジ  
 エチルアミノ) プロポキシ) カルボニル) オキシ) メチル) -1, 4-フェニレン) ビ  
 ス (オキシ) ) ビス (オクタン-8, 1-ジイル) ビス (デカノエート)、4, 4-ビス  
 (オクチルオキシ) ブチル 5- ( ( (3- (ジエチルアミノ) プロポキシ) カルボニル)  
 オキシ) ヘプタデカノエート、6- ( (6, 6-ビス (オクチルオキシ) ヘキサノイル)  
 オキシ) -4- ( ( (3- (ジエチルアミノ) プロポキシ) カルボニル) オキシ) ヘキシ  
 ルオクタノエート、 (12Z, 15Z) -3- ( ( (3- (ジエチルアミノ) プロポキシ  
 ) カルボニル) オキシ) ヘニコサ-12, 15-ジエン-1-イル 6, 6-ビス (オクチ  
 ルオキシ) ヘキサノエート、3- ( ( (3- (ジエチルアミノ) プロポキシ) カルボニル  
 ) オキシ) トリデシル 6, 6-ビス (オクチルオキシ) ヘキサノエート、3- ( ( (3-  
 (ジエチルアミノ) プロポキシ) カルボニル) オキシ) ウンデシル 6, 6-ビス (オクチ  
 ルオキシ) ヘキサノエート、3- ( ( (3- (ジエチルアミノ) プロポキシ) カルボニル  
 ) オキシ) ペンタデシル 5- (4, 6-ジヘプチル-1, 3-ジオキサ-2-イル) ペ  
 ンタノエート、3- ( (5- (ジエチルアミノ) ペンタノイル) オキシ) ペンタデシル 6  
 , 6-ビス (オクチルオキシ) ヘキサノエート、1- ( (6, 6-ビス (オクチルオキシ)  
 ) ヘキサノイル) オキシ) ペンタデカン-3-イル 1, 4-ジメチルピペリジン-4-カル  
 ボキシレート、3- ( (3- (1-メチルピペリジン-4-イル) プロパノイル) オキ

10

20

30

40

50

シ) ペンタデシル 6, 6-ビス (オクチルオキシ) ヘキサノエート、1- ( (6, 6-ビス (オクチルオキシ) ヘキサノイル) オキシ) ペンタデカン-3-イル 1, 3-ジメチル  
ピロリジン-3-カルボキシレート、3- ( ( (3- (ジエチルアミノ) プロポキシ) カ  
ルボニル) オキシ) ペンタデシル 4, 4-ビス ( (2-エチルヘキシル) オキシ) ブタノ  
エート、2- ( ( (1, 3-ジメチルピロリジン-3-カルボニル) オキシ) メチル) プ  
ロパン-1, 3-ジイルビス (8- (オクタノイルオキシ) オクタノエート)、 ( (2-  
( ( (3- (ジメチルアミノ) プロポキシ) カルボニル) オキシ) メチル) -1, 4-  
フェニレン) ビス (オキシ) ) ビス (オクタン-8, 1-ジイル) ビス (デカノエート)  
、 (2R) -1- ( (6, 6-ビス (オクチルオキシ) ヘキサノイル) オキシ) ペンタデ  
カン-3-イルピロリジン-2-カルボキシレート、 (2S) -1- ( (6, 6-ビス ( 10  
オクチルオキシ) ヘキサノイル) オキシ) ペンタデカン-3-イル 1-メチルピロリジン  
-2-カルボキシレート、 (2R) -1- ( (6, 6-ビス (オクチルオキシ) ヘキサノ  
イル) オキシ) ペンタデカン-3-イル 1-メチルピロリジン-2-カルボキシレート、  
3- ( ( (3- (ジメチルアミノ) プロポキシ) カルボニル) オキシ) ペンタデシル 6,  
6-ビス ( (3-エチルペンチル) オキシ) ヘキサノエート、3- ( ( (3- (ジメチルア  
ミノ) プロポキシ) カルボニル) オキシ) ペンタデシル 6, 6-ビス ( (2-プロピルペ  
ンチル) オキシ) ヘキサノエート、3- ( ( (3- (ジエチルアミノ) プロポキシ) カル  
ボニル) オキシ) ペンタデシル 6, 6-ビス ( (2-プロピルペンチル) オキシ) ヘキサ  
ノエート、3- ( ( (2- (ジエチルアミノ) エトキシ) カルボニル) オキシ) ペンタデ  
シル 6, 6-ビス (オクチルオキシ) ヘキサノエート、3- ( ( (3-モルホリノプロ  
20  
ロキシ) カルボニル) オキシ) ペンタデシル 6, 6-ビス (オクチルオキシ) ヘキサノエ  
ート、3- ( ( ( (1-メチルピペリジン-4-イル) メトキシ) カルボニル) オキシ)  
ペンタデシル 6, 6-ビス (オクチルオキシ) ヘキサノエート、3- ( ( (3- (4-メ  
チルピペラジン-1-イル) プロポキシ) カルボニル) オキシ) ペンタデシル 6, 6-ビ  
ス (オクチルオキシ) ヘキサノエート、3- ( ( (3- (ジエチルアミノ) プロポキシ)  
カルボニル) オキシ) ペンタデシル 4, 4-ビス (オクチルオキシ) ブタノエート、2-  
( ( (4- (ジメチルアミノ) ブタノイル) オキシ) メチル) -2- ( (ドデカノイルオ  
キシ) メチル) プロパン-1, 3-ジイル (9Z, 9'Z) ビス-テトラデス-9-エノ  
エート、 (9Z, 9'Z, 12Z, 12'Z) -2- ( ( (4- (ジメチルアミノ) ブタノ  
30  
イル) オキシ) メチル) プロパン-1, 3-ジイルビス (オクタデカ-9, 12-ジエノ  
エート)、3- ( ( (4- (ジエチルアミノ) ブトキシ) カルボニル) オキシ) ペンタデ  
シル 6, 6-ビス (オクチルオキシ) ヘキサノエート、3- ( ( (3- (ピペラジン-1-  
イル) プロポキシ) カルボニル) オキシ) ペンタデシル 6, 6-ビス (オクチルオキシ)  
ヘキサノエート、3- ( ( (3- (ピペリジン-1-イル) プロポキシ) カルボニル) オキ  
シ) ペンタデシル 6, 6-ビス (オクチルオキシ) ヘキサノエート、3- ( ( (3- (ジ  
メチルアミノ) プロポキシ) カルボニル) オキシ) ペンタデシル 4, 4-ビス (オクチル  
オキシ) ブタノエート、 (9Z, 9'Z, 12Z, 12'Z) -2- (9-ドデシル-2-  
メチル-7, 12-ジオキソ-6, 8, 13-トリオキサ-2-アザテトラデカン-14  
-イル) プロパン-1, 3-ジイルビス (オクタデカ-9, 12-ジエノエート)、 (9  
40  
Z, 12Z) -10-ドデシル-3-エチル-14- (2- ( (9Z, 12Z) -オクタ  
デカ-9, 12-ジエノイルオキシ) エチル) -8, 13-ジオキソ-7, 9-ジ  
オキサ-3, 14-ジアザヘキサデカン-16-イルオクタデカ-9, 12-ジエノエート  
、2- ( (2- ( ( (3- (ジエチルアミノ) プロポキシ) カルボニル) オキシ) テトラ  
デカノイル) オキシ) プロパン-1, 3-ジイルジオクタノエート、2- (9-ドデシル  
-2-メチル-7, 13-ジオキソ-6, 8, 12-トリオキサ-2-アザノナデカン-  
19-イル) プロパン-1, 3-ジイルジオクタノエート、2- ( (デカノイルオキシ)  
メチル) -2- ( ( (4- (ジメチルアミノ) ブタノイル) オキシ) メチル) プロパン-  
1, 3-ジイル (9Z, 9'Z) ビス-テトラデス-9-エノエート、 (9Z, 9'Z, 1  
2Z, 12'Z) -2- ( ( (3-モルホリノプロパノイル) オキシ) メチル) プロパン  
-1, 3-ジイルビス (オクタデカ-9, 12-ジエノエート)、3- (ジメチルアミノ 50

) プロピルカーボネート (6 Z, 9 Z, 28 Z, 31 Z) - ヘプタトリコンター 6, 9, 28, 31 - テトラエン - 19 - イル、2, 5 - ビス ( (9 Z, 12 Z) - オクタデカ - 9, 12 - ジエン - 1 - イルオキシ) ベンジル 4 - (ジメチルアミノ) ブタノエート、2 - (10 - ドデシル - 3 - エチル - 8, 14 - ジオキソ - 7, 9, 13 - トリオキサ - 3 - アザオクタデカン - 18 - イル) プロパン - 1, 3 - ジイルジオクタノエート、(9 Z, 9' Z, 12 Z, 12' Z) - 2 - ( ( (1, 3 - ジメチルピロリジン - 3 - カルボニル) オキシ) メチル) プロパン - 1, 3 - ジイルビス (オクタデカ - 9, 12 - ジエノエート)、( (5 - ( (ジメチルアミノ) メチル) ベンゼン - 1, 2, 3 - トリイル) トリス (オキシ)) トリス (デカン 10, 1 - ジイル) トリオクタノエート、0', 0 - ( ( (5 - ( (ジメチルアミノ) メチル) - 1, 3 - フェニレン) ビス (オキシ)) ビス (プロパン - 3, 1 - ジイル)) 9 - ジオクチルジノナンジオエート、(9 Z, 12 Z) - 3 - (3 - ( (ジメチルアミノ) メチル) - 5 - (3 - ( (3 - オクチルウンデカノイル) オキシ) プロボキシ) フェノキシ) プロピルオクタデカ - 9, 12 - ジエノエート、( ( (5 - ( (ジメチルアミノ) メチル) - 1, 3 - フェニレン) ビス (オキシ)) ビス (プロパン - 3, 1 - ジイル)) ビス (オキシ)) ビス (4 - オキソブタン - 4, 1 - ジイル) ビス (デカノエート)、(R) - 4 - (3 - ( (R) - 3, 4 - ビス (オクタノイルオキシ) ブトキシ) - 5 - ( (ジメチルアミノ) メチル) フェノキシ) ブタン - 1, 2 - ジイルジオクタノエート、(S) - 4 - (3 - ( (S) - 3, 4 - ビス (オクタノイルオキシ) ブトキシ) - 5 - ( (ジメチルアミノ) メチル) フェノキシ) ブタン - 1, 2 - ジイルジオクタノエート、(R) - 4 - (3 - ( (S) - 3, 4 - ビス (オクタノイルオキシ) ブトキシ) - 5 - ( (ジメチルアミノ) メチル) フェノキシ) ブタン - 1, 2 - ジイルジオクタノエート、4, 4' - ( (5 - ( (ジメチルアミノ) メチル) - 1, 3 - フェニレン) ビス (オキシ)) ビス (ブタン 1, 2 - ジイル) テトラオクタノエート、ジドデシル 6, 6' - ( (5 - ( (ジメチルアミノ) メチル) - 1, 3 - フェニレン) ビス (オキシ)) ジヘキサノエート、ジ ( (9 Z, 12 Z) - オクタデカ - 9, 12 - ジエン - 1 - イル) 5, 5' - ( (5 - ( (ジメチルアミノ) メチル) - 1, 3 - フェニレン) ビス (オキシ)) ジペンタノエート、( ( (5 - ( (ジメチルアミノ) メチル) - 1, 3 - フェニレン) ビス (メチレン)) ビス (オキシ)) ビス (6 - オキソヘキサン - 6, 1 - ジイル) ビス (デカノエート)、(5 - ( (ジメチルアミノ) メチル) - 1, 3 - フェニレン) ビス (メチレン) ビス (8 - (オクタノイルオキシ) オクタノエート)、(5 - ( (ジメチルアミノ) メチル) - 1, 3 - フェニレン) ビス (メチレン) ビス (10 - (オクタノイルオキシ) デカノエート)、( ( (5 - ( (ジメチルアミノ) メチル) - 1, 3 - フェニレン) ビス (メチレン)) ビス (オキシ)) ビス (6 - オキソヘキサン - 6, 1 - ジイル) ジオクタノエート、( ( (5 - ( (ジメチルアミノ) メチル) - 1, 3 - フェニレン) ビス (メチレン)) ビス (オキシ)) ビス (8 - オキソオクタン - 8, 1 - ジイル) ビス (デカノエート)、(9 Z, 9' Z, 12 Z, 12' Z) - ( ( (5 - ( (ジメチルアミノ) メチル) - 1, 3 - フェニレン) ビス (メチレン)) ビス (オキシ)) ビス (4 - オキソブタン - 4, 1 - ジイル) ビス (オクタデカ - 9, 12 - ジエノエート)、0', 0 - ( (5 - ( (ジメチルアミノ) メチル) - 1, 3 - フェニレン) ビス (メチレン)) 8 - ジノニルジオクタンジオエート、0, 0' - ( (5 - ( (ジメチルアミノ) メチル) - 1, 3 - フェニレン) ビス (メチレン)) ビス (10 - (オクタノイルオキシ) デシル) ジスクシネート、0, 0' - ( (5 - ( (ジメチルアミノ) メチル) - 1, 3 - フェニレン) ビス (メチレン)) ジ ( (9 Z, 12 Z) - オクタデカ - 9, 12 - ジエン - 1 - イル) ジスクシネート、(9 Z, 9' Z, 12 Z, 12' Z) - (5 - ( ( (3 - (ジメチルアミノ) プロボキシ) カルボニル) オキシ) メチル) - 1, 3 - フェニレン) ビス (メチレン) ビス (オクタデカ - 9, 12 - ジエノエート)、(9 Z, 12 Z) - 4 - (3 - ( (ジメチルアミノ) メチル) - 5 - (4 - (オレオイルオキシ) ブトキシ) フェノキシ) ブチルオクタデカ - 9, 12 - ジエノエート、(9 Z, 9' Z, 12 Z, 12' Z, 15 Z, 15' Z) - ( (5 - ( (ジメチルアミノ) メチル) - 1, 3 - フェニレン) ビス (オキシ)) ビス (ブタン - 4, 1 - ジイル) ビス (オクタデカ - 9, 12, 15 - トリ

10

20

30

40

50

エノエート)、((5-(ジメチルアミノ)メチル)-1,3-フェニレン)ビス(オキシ))ビス(ブタン-4,1-ジイル)ジテトラデカノエート、(Z)-((5-(ジメチルアミノ)メチル)-1,3-フェニレン)ビス(オキシ))ビス(ブタン-4,1-ジイル)ジオレエート、((5-(ジメチルアミノ)メチル)-1,3-フェニレン)ビス(オキシ))ビス(ヘキサン-6,1-ジイル)ジドデカノエート、(9Z,9'Z,12Z,12'Z)-(((5-(ジエチルアミノ)メチル)-1,3-フェニレン)ビス(オキシ))ビス(エタン-2,1-ジイル))ビス(オキシ))ビス(エタン-2,1-ジイル)ビス(オクタデカ-9,12-ジエノエート)、ジデシル8,8'-((5-(ジメチルアミノ)メチル)-1,3-フェニレン)ビス(オキシ))ジオクタノエート、((5-(ジメチルアミノ)メチル)-1,3-フェニレン)ビス(オキシ))ビス(プロパン-3,1-ジイル)ビス(3-オクチルウンデカノエート)、(9Z,9'Z,12Z,12'Z)-((5-(ジエチルアミノ)メスブ-2-メチル-1,3-フェニレン)ビス(オキシ))ビス(ブタン-4,1-ジイル)ビス(オクタデカ-9,12-ジエノエート)、((5-(ジメチルアミノ)メチル)-1,3-フェニレン)ビス(オキシ))ビス(オクタン-8,1-ジイル)ジドデカノエート、((5-(ジメチルアミノ)メチル)-1,3-フェニレン)ビス(オキシ))ビス(オクタン-8,1-ジイル)ビス(デカノエート)、(9Z,9'Z,12Z,12'Z)-((5-(ジメチルアミノ)メスブ-2-メチル-1,3-フェニレン)ビス(オキシ))ビス(ブタン-4,1-ジイル)ビス(オクタデカ-9,12-ジエノエート)、(8Z,8'Z)-((5-(ジメチルアミノ)メチル)-1,3-フェニレン)ビス(オキシ))ビス(ヘキサン-ビス(ドデス-8-エノエート)、(9Z,9'Z,12Z,12'Z)-((5-(3-ヒドロキシアゼチジン-1-イル)メチル)-1,3-フェニレン)ビス(オキシ))ビス(ブタン-4,1-ジイル)ビス(オクタデカ-9,12-ジエノエート)、((5-(ジメチルアミノ)メチル)-1,3-フェニレン)ビス(オキシ))ビス(ヘキサン-6,1-ジイル)ジオクタノエート、((5-(ジメチルアミノ)メチル)-1,3-フェニレン)ビス(オキシ))ビス(ヘキサン-6,1-ジイル)ビス(デカノエート)、(9Z,9'Z,12Z,12'Z)-((5-(ジメチルアミノ)メスブ-1,3-フェニレン)ビス(オキシ))ビス(オクタン-8,1-ジイル)ビス(オクタデカ-9,12-ジエノエート)、(9Z,9'Z,12Z,12'Z)-((5-(ジメチルアミノ)メチル)-1,3-フェニレン)ビス(オキシ))ビス(ヘキサン-6,1-ジイル)ビス(オクタデカ-9,12-ジエノエート)、((5-(ジメチルアミノ)メチル)-1,3-フェニレン)ビス(オキシ))ビス(デカン-10,1-ジイル)ジヘキサノエート、((5-(ジメチルアミノ)メチル)-1,3-フェニレン)ビス(オキシ))ビス(デカン-10,1-ジイル)ジオクタノエート、((5-(ジメチルアミノ)メチル)-1,3-フェニレン)ビス(オキシ))ビス(オクタン-8,1-ジイル)ジオクタノエート、((5-(ジメチルアミノ)メチル)-1,3-フェニレン)ビス(オキシ))ビス(オクタン-8,1-ジイル)ジヘキサノエート、(9Z,9'Z,12Z,12'Z)-((5-(ジメチルアミノ)メチル)-1,3-フェニレン)ビス(オキシ))ビス(エタン-2,1-ジイル)ビス(オクタデカ-9,12-ジエノエート)、(9Z,9'Z,12Z,12'Z)-((5-(ジメチルアミノ)メチル)-1,3-フェニレン)ビス(オキシ))ビス(プロパン-3,1-ジイル)ビス(オクタデカ-9,12-ジエノエート)、(9Z,9'Z,12Z,12'Z)-((5-(ジメチルアミノ)メチル)-1,3-フェニレン)ビス(オキシ))ビス(ブタン-4,1-ジイル)ビス(オクタデカ-9,12-ジエノエート)、(5-(ジメチルアミノ)メチル)-1,3-フェニレン)ビス(メチレン)ジトリデカノエート、(9Z,9'Z,12Z,12'Z)-((5-(ジメチルアミノ)メチル)-1,3-フェニレン)ビス(メチレン)ビス(オクタデカ-9,12-ジエノエート)、(2,6-ビス((9Z,12Z)-オクタデカ-9,12-ジエン-1-イルオキシ)ピリジン-4-イル)メチル3-(ジメチルアミノ)プロパノエート、(9Z,9'Z,12Z,12'Z)-5-(((3-(ジメチルアミノ)プロパノイル)オキ

シ) メチル) - 1, 3-フェニレンビス (オクタデカ-9, 12-ジエノエート)、1-  
 (3, 5-ビス ((9Z, 12Z) -オクタデカ-9, 12-ジエン-1-イルオキシ)  
 フェニル) - N, Nジメチルメタンアミン、3, 5-ビス ((9Z, 12Z) -オクタデ  
 カ-9, 12-ジエン-1-イルオキシ) ベンジル 3- (ジメチルアミノ) プロパノエ  
 ート、1- (3, 5-ビス (4, 4-ビス (オクチルオキシ) ブトキシ) フェニル) - N,  
 N-ジメチルメタンアミン、( ( ( (5- ( (ジメチルアミノ) メチル) - 1, 3-フェ  
 ニレン) ビス (オキシ) ) ビス (ブタン-4, 1-ジイル) ) ビス (オキシ) ) ビス (プ  
 ロパン-3, 2, 1-トリイル) テトラオクタノエート、( (5- ( ( (4- (ジメチル  
 アミノ) ブタノイル) オキシ) メチル) - 1, 3-フェニレン) ビス (オキシ) ) ビス (オ  
 クタン-8, 1-ジイル) ビス (デカノエート)、( (5- ( ( (3- (ジメチルアミ  
 ノ) プロパノイル) オキシ) メチル) - 1, 3-フェニレン) ビス (オキシ) ) ビス (オ  
 クタン-8, 1-ジイル) ビス (デカノエート)、(9Z, 9'Z, 12Z, 12'Z) -  
 ( (5- (3-モルホリノプロピル) - 1, 3-フェニレン) ビス (オキシ) ) ビス (ブ  
 タン4, 1-ジイル) ビス (オクタデカ-9, 12-ジエノエート)、(9Z, 9'Z,  
 12Z, 12'Z) - ( (5- (3- (ジメチルアミノ) プロピル) - 1, 3-フェニレ  
 ン) ビス (オキシ) ) ビス (ブタン-4, 1-ジイル) ビス (オクタデカ-9, 12-ジ  
 エノエート)、(9Z, 9'Z, 12Z, 12'Z) - ( (5- (3- (ピペリジン-1-  
 イル) プロピル) - 1, 3-フェニレン) ビス (オキシ) ) ビス (ブタン-4, 1-ジイ  
 ル) ビス (オクタデカ-9, 12-ジエノエート)、(5  
 - ( (ジメチルアミノ) メチル) - 1, 3-フェニレン) ビス (メチレン) ビス (9-ペ  
 ンチルテトラデカノエート)、(5- ( (ジメチルアミノ) メチル) - 1, 3-フェニレ  
 ン) ビス (メチレン) ビス (7-ヘキシルトリデカノエート)、(5- ( (ジメチルアミ  
 ノ) メチル) - 1, 3-フェニレン) ビス (メチレン) ビス (5-ヘプチルドデカノエ  
 ート)、( (5- ( (ジメチルアミノ) メチル) - 1, 3-フェニレン) ビス (オキシ) )  
 ビス (ブタン-4, 1-ジイル) ビス (3-オクチルウンデカノエート)、( (5- ( (ジ  
 メチルアミノ) メチル) - 1, 3-フェニレン) ビス (オキシ) ) ビス (ブタン-4,  
 1-ジイル) ビス (5-ヘプチルドデカノエート)、( (5- ( (ジメチルアミノ) メチ  
 ル) - 1, 3-フェニレン) ビス (オキシ) ) ビス (ブタン-4, 1-ジイル) ビス (9-  
 ペンチルテトラデカノエート)、( (5- ( (ジメチルアミノ) メチル) - 1, 3-フ  
 エニレン) ビス (オキシ) ) ビス (ブタン-4, 1-ジイル) ビス (7-ヘキシルトリデ  
 カノエート)、(9Z, 9'Z, 12Z, 12'Z) - ( (5- (ピロリジン-1-イルメ  
 チル) - 1, 3-フェニレン) ビス (オキシ) ) ビス (ブタン4, 1-ジイル) ビス (オ  
 クタデカ-9, 12-ジエノエート)、( ( (5- ( (ジメチルアミノ) メチル) - 1,  
 3-フェニレン) ビス (オキシ) ) ビス (メチレン) ) ビス (プロパン-3, 2, 1-ト  
 リイル) テトラオクタノエート、( ( (5- ( (ジメチルアミノ) メチル) - 1, 3-フ  
 エニレン) ビス (オキシ) ) ビス (ブタン-4, 1-ジイル) ) ビス (プロパン-3, 2,  
 1-トリイル) テトラオクタノエート、(9Z, 12Z) - 4- (3- ( (ジメチルア  
 ミノ) メスブ-5- (4- ( (3-オクチルウンデカノイル) オキシ) ブトキシ) フェ  
 ノキシ) ブチルオクタデカ-9, 12-ジエノエート、ビス (1, 3-ビス (オクタノイ  
 ルオキシ) プロパン-2-イル) 0, 0'- ( (5- ( (ジメチルアミノ) メチル) - 1,  
 3-フェニレン) ビス (メチレン) ) ジスクシネート、(5- ( (ジメチルアミノ) メ  
 チル) - 1, 3-フェニレン) ビス (メチレン) ビス (6- ( ( (ノニルオキシ) カルボ  
 ニル) オキシ) ヘキサノエート)、2- (3- (4- (5- ( (ジメチルアミノ) メチル  
 ) - 2-メチル-3- ( (9Z, 12Z) -オクタデカ9, 12-ジエン-1-イルオキシ)  
 フェノキシ) ブトキシ) - 3-オキソプロピル) プロパン-1, 3-ジイルジヘキサ  
 ノエート、3- ( (ジメチルアミノ) メチル) - 5- ( ( (8- (オクタノイルオキシ)  
 オクタノイル) オキシ) メチル) ベンジル 3-オクチルウンデカノエート、( (5- ( (ジ  
 エチルアミノ) メチル) ベンゼン-1, 2, 3-トリイル) トリス (オキシ) ) トリス  
 (デカン-10, 1-ジイル) トリオクタノエート、1- (3, 5-ビス ((Z) -オク  
 タデス-9-エン-1-イルオキシ) フェニル) - N, N-ジメチルメタンアミン、N'

-メチル-N', N". N"-トリス((2E, 6E)-3, 7, 11-トリメチルドデカ  
 -2, 6, 10-トリエン-1-ブンプロパン-1, 3-ジアミン、し、17-ビス(2  
 -(2-ペンチルシクロプロピル)メチル)シクロプロピル)ヘプタデカン-9-イル  
 4-(ジメチルアミノ)ブタノエート、エチル(7Z)-17-{[4-(ジメチルアミ  
 ノ)ブタノイル]オキシ}ヘキサコス-7-エノエート、(Z)-メチル6-(2-(ジ  
 メチルアミノ)-3-(オクタデス-9-エン-1-イルオキシ)プロポキシ)ヘキサノ  
 エート、2-(ジドデシルアミノ)-1-(4-(N-(2-(ジノニルアミノ)エチル)  
 )-N-ドデシルグリシル)ピペラジン-1-イル)エタン-1-オン、3-(3-(  
 1-(3-(2-(ジノニルアミノ)エチル)(ノニル)アミノ)プロパノイル)ピペ  
 リジン-4-イル)プロピル)(ノニル)アミノ)プロピルヘキサノエート、3-(3  
 -(4-(3-(2-(ジノニルアミノ)エチル)(ノニル)アミノ)プロパノイル)  
 ピペラジン-1-イル)-3-オキソプロピル)(ノニル)アミノ)プロピルヘキサノエ  
 ート、3-(2-(ジノニルアミノ)エチル)(ノニル)アミノ)-1-(4-(3-(  
 ジノニルアミノ)プロピル)ピペリジン-1-イル)プロパン-1-オン、ペンチル4  
 -(3-(1-(3-(2-(ジノニルアミノ)エチル)(ノニル)アミノ)プロパ  
 ノイル)ピペリジン-4-イル)プロピル)(ノニル)アミノ)ブタノ、ペンチル4-(  
 (2-(1-(N-(2-(ジノニルアミノ)エチル)-N-ノニルグリシル)ピペリジ  
 ン-4-イル)エチル)(ノニル)アミノ)ブタノエート、ペンチル4-(1-(N  
 -(2-(ジノニルアミノ)エチル)-N-ノニルグリシル)ピロリジン-3-イル)メ  
 チル)(ノニル)アミノ)ブタノエート、ペンチル4-(2-(1-(N-(2-(ジ  
 ノニルアミノ)エチル)-N-ノニルグリシル)ピロリジン-3-イル)エチル)(ノ  
 ニル)アミノ)ブタノエート、ペンチル4-(2-(1-(N-(2-(ジノニルアミノ  
 )エチル)-N-ノニルグリシル)ピペリジン-3-イル)エチル)(ノニル)アミノ  
 )ブタノエート、2-(ジドデシルアミノ)-1-(4-(N-(2-(ジノニルアミノ)  
 エチル)-N-ノニルグリシル)ピペラジン-1-イル)エタン-1-オン、2-(2  
 -(ジノニルアミノ)エチル)(ノニル)アミノ)-1-(3-(2-(ジノニルアミノ  
 )エチル)ピペリジン-1-イル)エタン-1-オン、ジペンチル4, 4'-((2-(  
 4-(N-(2-(ジノニルアミノ)エチル)-N-ノニルグリシル)ピペラジン-1-  
 イル)-2-オキソエチル)アザネジル)ジブチレート、ペンチル4-(ノニル(2-(  
 4-(N-ノニル-N-(2-(ノニル(4-オキソ-4-(ペン1イルオキシ)ブリル  
 )アミノ)エチル)グリシル)ピペラジン-1-イル)-2-オキソエチル)アミノ)ブ  
 タノエート、2-(2-(ジノニルアミノ)エチル)(ノニル)アミノ)-1-(3-(  
 (ジノニルアミノ)メチル)ピロリジン-1-イル)エタン-1-オン、2-(2-(  
 ジドデシルアミノ)エチル)(ドデシル)アミノ)-1-(4-(ジノニルグリシル)  
 ピペラジン-1-イル)エタン-1-オン、2-(2-(ジノニルアミノ)エチル)(  
 ノニル)アミノ)-1-(3-(2-(ジノニルアミノ)エチル)ピロリジン-1-イル  
 )エタン-1-オン、ペンチル4-(3-(4-(3-(2-(ジノニルアミノ)エ  
 チル)(ノニル)アミノ)プロパノイル)ピペラジン-1-イル)-3-オキソプロピル  
 )(ノニル)アミノ)ブタノエート、3-(2-(1-(N-(2-(ジノニルアミノ  
 )エチル)-N-ノニルグリシル)ピペリジン-4-イル)エチル)(ノニル)アミノ  
 )プロピルヘキサノエート、ブチル5-(2-(1-(N-(2-(ジノニルアミノ)エ  
 チル)-N-ノニルグリシル)ピペリジン-4-イル)エチル)(ノニル)アミノ)ペン  
 タノエート、2-(2-(ジドデシルアミノ)エチル)(ノニル)アミノ)-1-(4  
 -(ジノニルグリシル)ピペラジン-1-イル)エタン-1-オン、プロピル6-(2  
 -(1-(N-(2-(ジノニルアミノ)エチル)-N-ノニルグリシル)ピペリジン-  
 4-イル)エチル)(ノニル)アミノ)ヘキサノエート、エチル7-(2-(1-(N  
 -(2-(ジノニルアミノ)エチル)-N-ノニルグリシル)ピペリジン-4-イル)エ  
 チル)(ノニル)アミノ)ヘプタノエート、メチル8-(2-(1-(N-(2-(ジ  
 ノニルアミノ)エチル)-N-ノニルグリシル)ピペリジン-4-イル)エチル)(ノ  
 ニル)アミノ)オクタノエート、3-(2-(4-(N-(2-(ジノニルアミノ)エチ

10

20

30

40

50

ル) - N - ノニルグリシル) ピペラジン - 1 - イル) - 2 - オキソエチル) (ノニル) ア  
 ミノ) プロピルヘキサノエート、ブチル 5 - ( ( 2 - ( 4 - ( N - ( 2 - ( ジノニルアミ  
 ノ) エチル) - N - ノニルグリシル) ピペラジン - 1 - イル) - 2 - オキソエチル) (ノ  
 ニル) アミノ) ペンタノエート、プロピル 6 - ( ( 2 - ( 4 - ( N - ( 2 - ( ジノニルア  
 ミノ) エチル) - N - ノニルグリシル) ピペラジン - 2 - オキソエチル) (ノニル) アミ  
 ノ) ヘキサノエート、エチル 7 - ( ( 2 - ( 4 - ( N - ( 2 - ( ジノニルアミノ) エチル  
 ) - N - ノニルグリシル) ピペラジン - 1 - イル) - 2 - オキソエチル) (ノニル) アミ  
 ノ) ヘプタノエート、3 - ( ジノニルアミノ) - 1 - ( 4 - ( 3 - ( ( 2 - ( ジノニルア  
 ミノ) エチル) (ノニル) アミノ) プロパノイル) ピペラジン - 1 - イル) プロパン - 1  
 - オン、2 - ( ( 2 - ( ジノニルアミノ) エチル) (ノニル) アミノ) - 1 - ( 4 - ( ジ  
 テトラデシルグリシル) ピペラジン - 1 - イル) エタン - 1 - オン、2 - ( ジノニルアミ  
 ノ) - 1 - ( 4 - ( 2 - ( ( 2 - ( ジノニルアミノ) エチル) (ノニル) アミノ) エチル  
 ) ピペリジン - 1 - イル) エタン - 1 - オン、2 - ( ジノニルアミノ) - l - ( 4 - ( N  
 - ( 2 - ( ジノニルアミノ) エチル) - N - ドデシルグリシル) ピペラジン - 1 - イル)  
 エタン - 1 - オン、2 - ( ( 2 - ( ジノニルアミノ) エチル) (ノニル) アミノ) - 1 -  
 ( 4 - ( 2 - ( ジノニルアミノ) エチル) ピペリジン - 1 - イル) エタン - 1 - オン、メ  
 チル 8 - ( ( 2 - ( 4 - ( ジノニルグリシル) ピペラジン - 1 - イル) - 2 - オキソエチ  
 ル) ( 2 - ( ( 8 - メトキシ - 8 - オキソオクチル) (ノニル) アミノ) エチル) アミノ  
 ) オクタノエート、メチル 8 - ( ( 2 - ( ジノニルアミノ) エチル) ( 2 - ( 4 - ( ジノ  
 ニルグリシル) ピペラジン - 1 - イル) - 2 - オキソエチル) アミノ) オクタノエート、  
 メチル 8 - ( ( 2 - ( ( 2 - ( 4 - ( ジノニルグリシル) ピペラジン - 1 - イル) - 2 -  
 オキソエチル) (ノニル) アミノ) エチル) (ノニル) アミノ) オクタノエート、ペンチ  
 ル 4 - ( ( 2 - ( 4 - ( N - ( 2 - ( ジノニルアミノ) エチル) - N - ノニルグリシル)  
 ピペラジン - 2 - オキソエチル) (ノニル) アミノ) ブタノエート、メチル 8 - ( ( 2 -  
 ( 4 - ( N - ( 2 - ( ジノニルアミノ) エチル) - N - ノニルグリシル) ピペラジン - 1  
 - イル) - 2 - オキソエチル) (ノニル) アミノ) オクタノエート、2 - ( ( 2 - ( ジド  
 デシルアミノ) エチル) (ドデシル) アミノ) - 1 - ( 5 - ( ジノニルグリシル) - 2 ,  
 5 - ジアザビシクロ [ 2 . 2 . 1 ] ヘプタン - 2 - イル) エタン - 1 - オン 3 , 2 - ( ジ  
 ノニルアミノ) - 1 - ( 5 - ( N - ( 2 - ( ジノニルアミノ) エチル) - N - ノニルグリ  
 シル) - 2 , 5 - ジアザビシクロ [ 2 . 2 . 1 ] ヘプタン - 2 - イル) エタン - 1 - オン  
 、 N 1 , N 1 , N 2 - トリ ( ( 9 Z , 1 2 Z ) - オクタデカ - 9 , 1 2 - ジエン - 1 - イ  
 ル) - N 2 - ( 2 - ( ピペラジン - 1 - イル) エチル) エタン - 1 , 2 - ジアミン、 N 1  
 , N 1 , N 2 - トリ ( ( Z ) - オクタデス - 9 - エン - 1 - イル) - N 2 - ( 2 - ( ピペ  
 ラジン - 1 - イル) エチル) エタン - 1 , 2 - ジアミン、 2 - ( ジノニルアミノ) - l -  
 ( 4 - ( N - ( 2 - ( ジノニルアミノ) エチル) - N - ノニルグリシル) ピペラジン - l  
 - イル) エタン - l - オン、 N 1 , N 1 , N 2 - トリドデシル - N 2 - ( 2 - ( ピペラジ  
 ン - 1 - イル) エチル) エタン - 1 , 2 - ジアミン、 N 1 , N 1 , N 2 - トリノニル - N  
 2 - ( 2 - ( ピペラジン - 1 - イル) エチル) エタン - 1 , 2 - ジアミン、 N 1 , N 1 ,  
 N 2 - トリヘキシル - N 2 - ( 2 - ( ピペラジン - 1 - イル) エチル) エタン - 1 , 2 -  
 ジアミン、 N 1 - ( 2 - ( 4 - ( 2 - ( ジドデシルアミノ) エチル) ピペラジン - 1 - イ  
 ル) エチル) - N 1 , N 2 , N 2 - トリ ( ( 9 Z , 1 2 Z ) - オクタデカ - 9 , 1 2 - ジ  
 エン - 1 - イル) エタン - 1 , 2 - ジアミン、 N 1 - ( 2 - ( 4 - ( 2 - ( ジドデシルア  
 ミノ) エチル) ピペラジン - 1 - イル) エチル) - N 1 , N 2 , N 2 - トリ ( ( Z ) - オ  
 クタデス - 9 - エン - 1 - イル) エタン - 1 , 2 - ジアミン、 N 1 - ( 2 - ( 4 - ( 2 -  
 ( ジテトラデシルアミノ) エチル) ピペラジン - 1 - イル) エチル) - N 1 , N 2 , N 2  
 - トリテトラデシルエタン - 1 , 2 - ジアミン、 N 1 - ( 2 - ( 4 - ( 2 - ( ジドデシル  
 アミノ) エチル) ピペラジン - 1 - イル) エチル) - N 1 , N 2 , N 2 - トリテトラデ  
 シルエタン - 1 , 2 - ジアミン、 N 1 - ( 2 - ( 4 - ( 2 - ( ジノニルアミノ) エチル)  
 ピペラジン - 1 - イル) エチル) - N 1 , N 2 , N 2 - トリテトラデシルエタン - 1 , 2  
 - ジアミン、 2 - ( ジドデシルアミノ) - l - ( 4 - ( 2 - ( ( 2 - ( ジドデシルアミノ

10

20

30

40

50

) エチル) (ドデシル) アミノ) エチル) ピペラジン-1-イル) エタン-1-オン、N  
 1-(2-(4-(2-(ジ((9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエン-1-  
 イル) アミノ) エチル) ピペラジン-1-イル) エチル)-N1, N2, N2-トリドデ  
 シルエタン-1, 2-ジアミン、N1-(2-(4-(2-(ジ((Z)-オクタデス-  
 9-エン-1-イル) アミノ) エチル) ピペラジン-1-イル) エチル)-N1, N2,  
 N2-トリドデシルエタン-1, 2-ジアミン、N1, N1, N2-トリドデシル-N2  
 -(2-(4-(2-(ドデシル((9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエン-  
 1-イル) アミノ) エチル) ピペラジン-1-イル) エチル) エタン-1, 2-ジアミン  
 、N1-(2-(4-(2-(ジテトラデシルアミノ) エチル) ピペラジン-1-イル)  
 エチル)-N1, N2, N2-トリドデシルエタン-1, 2-ジアミン、N1-(2-(4-  
 (2-(ジ((Z)-ドデス-6-エン-1-イル) アミノ) エチル) ピペラジン-  
 1-イル) エチル)-N1, N2, N2-トリドデシルエタン-1, 2-ジアミン、(Z)-  
 N1-(2-(4-(2-(ドデス-6-エン-1-イル(ドデシル) アミノ) エチル)  
 ) ピペラジン-1-イル) エチル)-N, N2, N2-トリドデシルエタン-1, 2-ジ  
 アミン、N1-(2-(4-(2-(ジノニルアミノ) エチル) ピペラジン-1-イル)  
 エチル)-N1, N2, N2-トリドデシルエタン-1, 2-ジアミン、N1-(2-(4-  
 (2-(ジオクチルアミノ) エチル) ピペラジン-1-イル) エチル)-N1, N2  
 , N2-トリドデシルエタン-1, 2-ジアミン、N1-(2-(4-(2-(ジヘキシ  
 ルアミノ) エチル) ピペラジン-1-イル) エチル)-N1, N2, N2-トリドデシル  
 エタン-1, 2-ジアミン、N1-(2-(4-(2-(ジテトラデシルアミノ) エチル  
 ) ピペラジン-1-イル) エチル)-N1, N2, N2-トリノニルエタン-1, 2-ジ  
 アミン、2-(2-(ジドデシルアミノ) エチル) (ドデシル) アミノ)-1-(4-  
 (2-(ジドデシルアミノ) エチル) ピペラジン-1-イル) エタン-1-オン、N1-  
 (2-(4-(2-(ジドデシルアミノ) エチル) ピペラジン-1-イル) エチル)-N  
 1, N2, N2-トリノニルエタン-1, 2-ジアミン、N1-(2-(4-(2-(ジ  
 ノニルアミノ) エチル) ピペラジン-1-イル) エチル)-N1, N2, N2-トリノニ  
 ルエタン-1, 2-ジアミン、N1-(2-(4-(2-(ジドデシルアミノ) エチル)  
 ピペラジン-1-イル) エチル)-N1, N2, N2-トリヘキシルエタン-1, 2-ジ  
 アミン、ジメチル12, 12'-((2-(4-(2-(2-(ジドデシルアミノ) エ  
 チル) (ドデシル) アミノ) エチル) ピペラジン-1-イル) エチル) アザネジル) ジド  
 デカノエート、メチル12-((2-(4-(2-(2-(ジドデシルアミノ) エチル  
 ) (ドデシル) アミノ) エチル) ピペラジン-1-イル) エチル) (ドデシル) アミノ)  
 ドデカノエート、ジペンチル6, 6'-((2-(4-(2-(2-(ジドデシルアミ  
 ノ) エチル) (ドデシル) アミノ) エチル) ピペラジン-1-イル) エチル) アザネジル  
 ) ジヘキサノエート、ペンチル6-((2-(4-(2-(2-(ジテトラデシルアミ  
 ノ) エチル) (テトラデシル) アミノ) エチル) ピペラジン-1-イル) エチル) (ドデ  
 シル) アミノ) ヘキサノエート、ペンチル6-((2-(4-(2-(2-(ジドデシ  
 ルアミノ) エチル) (ドデシル) アミノ) エチル) ピペラジン-1-イル) エチル) (ド  
 デシル) アミノ) ヘキサノエート、2-(ジドデシルアミノ)-1-(4-(N-(2-  
 (ジドデシルアミノ) エチル)-N-ドデシルグリシル) ピペラジン-1-イル) エタン  
 -1-オン、2-(ジドデシルアミノ)-1-(4-(N-(2-(ジドデシルアミノ)  
 エチル)-N-ノニルグリシル) ピペラジン-1-イル) エタン-1-オン、2-(ジド  
 デシルアミノ)-N-(2-(4-(2-(ジドデシルアミノ) エチル) ピペラジン-1-  
 イル) エチル)-N-ドデシルアセトアミド、((2-(3, S', 4R)-3, 4-  
 ジヒドロキシピロリジン-1-イル) アセチル) アザネジル) ビス(エタン-2, 1-  
 ジイル) (9Z, 9'Z, 12Z, 12'Z)-ビス(オクタデカ-9, 12-ジエノエ-  
 ト)、2-アミノ-N, N-ジヘキサデシル-3-(1H-イミダゾール-5-イル) プ  
 ロパンアミド、(2-アミノ-N, N-ジヘキサデシル-3-(1H-イミダゾール-5-  
 イル) プロパンアミド、メチル(9Z)-19-[2-(ジメチルアミノ) エチル] ヘ  
 プタコス-9-エノエート、メチル8-(2-{9-[2-(ジメチルアミノ) エチル]



オクタデシル} シクロプロピル) オクタノエート、メチル (9 Z) - 19 - [2 - (ジメチルアミノ) エチル] オクタコス-9-エノエート、エチル 8 - (2 - {11 - [(ジメチルアミノ) メチル] ヘプタデシル} シクロプロピル) オクタノエート、エチル 8 - (2 - {11 - [(ジメチルアミノ) メチル] オクタデシル} シクロプロピル) オクタノエート、ジ ( (9 Z, 12 Z) - オクタデカ-9, 12 - ジエン-1-イル) 3 - ( (2 - (ジメチルアミノ) エトキシ) カルボニル) アミノ) ペンタネジオエート、ヘプチル 6 - ( (2 - (1 - (N - (2 - (ジノニルアミノ) エチル) - N - ノニルグリシル) ピペリジン-4-イル) エチル) (テトラデシル) アミノ) ヘキサノエート、エチル 8 - (2 - {11 - [(ジメチルアミノ) メチル] ノナデシル} シクロプロピル) オクタノエート、ペンチル 8 - ( (2 - (1 - (N - (2 - (ジノニルアミノ) エチル) - N - ノニルグリシル) ピペリジン-4-イル) エチル) (テトラデシル) アミノ) オクタノエート、エチル 8 - (2 - {11 - [(ジメチルアミノ) メチル] イコシル} シクロプロピル) オクタノエート、エチル 8 - (2 - {9 - [(ジメチルアミノ) メチル] ペンタデシル} シクロプロピル) オクタノエート、3 - ( (2 - (1 - (N - (2 - (ジノニルアミノ) エチル) - N - ノニルグリシル) ピペリジン-4-イル) エチル) (テトラデシル) アミノ) プロピルデカノエート、ヘプチル 6 - ( (2 - (4 - (N - (2 - (ジノニルアミノ) エチル) - N - ノニルグリシル) ピペラジン-1-イル) - 2 - オキソエチル) (テトラデシル) アミノ) ヘキサノエート、エチル 8 - (2 - {9 - [(ジメチルアミノ) メチル] ヘキサデシル} シクロプロピル) オクタノエート、ペンチル 8 - ( (2 - (4 - (N - (2 - (ジノニルアミノ) エチル) - N - ノニルグリシル) ピペラジン-2-オキソエチル) (テトラデシル) アミノ) オクタノエート、エチル 8 - (2 - {9 - [(ジメチルアミノ) メチル] ヘプタデシル} シクロプロピル) オクタノエート、メチル 6 - (2 - (8 - (2 - (ジメチルアミノ) - 3 - (ノニルオキシ) プロポキシ) オクチル) シクロプロピル) ヘキサノエート、メチル (9 Z) - 21 - (ジメチルアミノ) ヘプタコス-9-エノエート、メチル (9 Z) - 21 - { [4 - (ジメチルアミノ) ブタノイル] オキシ} ヘプタコス-9-エノエート、(2 R) - N, N - ジメチル-1 - [(9 Z, 12 Z) - オクタデカ-9, 12 - ジエン-1-イルオキシ] ドデカン-2-アミン、(15 Z, 18 Z) - N, N - ジメチルテトラコダ-15, 18 - ジエン-5-アミン、エチル 8 - (2 - {9 - [(ジメチルアミノ) メチル] オクタデシル} シクロプロピル) オクタノエート、3 - ( (2 - (4 - (N - (2 - (ジノニルアミノ) エチル) - N - ノニルグリシル) ピペラジン-1-イル) - 2 - オキソエチル) (テトラデシル) アミノ) プロピルデカノエート、エチル 4 - (2 - {11 - [(ジメチルアミノ) メチル] イコシル} シクロプロピル) ブタノエート、エチル 8 - (2 - {7 - [(ジメチルアミノ) メチル] ヘキサデシル} シクロプロピル) オクタノエート、3 - ( (3 - (1 - (3 - ( (2 - (ジノニルアミノ) エチル) (ノニル) アミノ) プロパノイル) ピペリジン-4-イル) プロピル) (ノニル) アミノ) プロピルヘキサノエート、エチル 6 - (2 - {9 - [(ジメチルアミノ) メチル] ペンタデシル} シクロプロピル) ヘキサノエート、3 - ( (3 - (4 - (3 - ( (2 - (ジノニルアミノ) エチル) (ノニル) アミノ) プロパノイル) ピペラジン-1-イル) - 3 - オキソプロピル) (ノニル) アミノ) プロピルヘキサノエート、エチル 6 - (2 - {9 - [(ジメチルアミノ) メチル] ヘキサデシル} シクロプロピル) ヘキサノエート、3 - ( (2 - (ジノニルアミノ) エチル) (ノニル) アミノ) - 1 - (4 - (3 - (ジノニルアミノ) プロピル) ピペリジン-1-イル) プロパン-1-オン、ペンチル 4 - ( (3 - (1 - (3 - ( (2 - (ジノニルアミノ) エチル) (ノニル) アミノ) プロパノイル) ピペリジン-4-イル) プロピル) (ノニル) アミノ) ブタノエート、エチル 6 - (2 - {9 - [(ジメチルアミノ) メチル] ヘプタデシル} シクロプロピル) ヘキサノエート、ペンチル 4 - ( (2 - (1 - (N - (2 - (ジノニルアミノ) エチル) - N - ノニルグリシル) ピペリジン-4-イル) エチル) (ノニル) アミノ) ブタノエート、エチル 6 - (2 - {9 - [(ジメチルアミノ) メチル] オクタデシル} シクロプロピル) ヘキサノエート、ペンチル 4 - ( (1 - (N - (2 - (ジノニルアミノ) エチル) - N - ノニルグリシル) ピロリジン-3-イル) メチル) (ノニル) アミノ) ブタノエート、エチル (9 Z

10

20

30

40

50

) - 21 - [ (ジメチルアミノ) メチル] ヘプタコス - 9 - エノエート、ペンチル 4 - ( (2 - (1 - (N - (2 - (ジノニルアミノ) エチル) - N - ノニルグリシル) ピロリジン - 3 - イル) エチル) (ノニル) アミノ) ブタノエート、エチル (9 Z) - 21 - [ (ジメチルアミノ) メチル] オクタコス - 9 - エノエート、( (2 - ( (3, S', 4 R) - 3, 4 - ジヒドロキシピロリジン - 1 - イル) アセチル) アザネジル) ビス (エタン - 2, 1 - ジイル) (9 Z, 9' Z, 12 Z, 12' Z) - ビス (オクタデカ - 9, 12 - ジエノエート)、ペンチル 4 - ( (2 - (1 - (N - (2 - (ジノニルアミノ) エチル) - N - ノニルグリシル) ピペリジン - 3 - イル) エチル) (ノニル) アミノ) ブタノエート、エチル (9 Z) - 21 - [ (ジメチルアミノ) メチル] ノナコス - 9 - エノエート、メチル 6 - (2 - (8 - (2 - (ジメチルアミノ) - 3 - (ヘプチルオキシ) プロポキシ) オクチル) シクロプロピル) ヘキサノエート、メチル (9 Z) - 21 - { [4 - (ジメチルアミノ) ブタノイル] オキシ} オクタコス - 9 - エノエート、メチル (9 Z) - 21 - (ジメチルアミノ) オクタコス - 9 - エノエート、2 - (ジドデシルアミノ) - 1 - (4 - (N - (2 - (ジノニルアミノ) エチル) - N - ノニルグリシル) ピペラジン - 1 - イル) エタン - 1 - (2 S) - N, N - ジメチル - 1 - [ (9 Z, 12 Z) - オクタデカ - 9, 12 - ジエン - 1 - イルオキシ] ノナン - 2 - アミン、(18 Z, 21 Z) - N, N - ジメチルヘプタコサ - 18, 21 - ジエン - 10 - アミン、エチル (9 Z) - 21 - [ (ジメチルアミノ) メチル] トリアCONT - 9 - エノエート、エチル (9 Z) - 19 - [ (ジメチルアミノ) メチル] ペンタコス - 9 - エノエート、エチル (9 Z) - 19 - [ (ジメチルアミノ) メチル] ヘキサコス - 9 - エノエート、エチル (9 Z) - 19 - [ (ジメチルアミノ) メチル] ヘプタコス - 9 - エノエート、エチル (9 Z) - 19 - [ (ジメチルアミノ) メチル] オクタコス - 9 - エノエート、エチル (5 Z) - 17 - [ (ジメチルアミノ) メチル] ヘキサコス - 5 - エノエート、エチル (9 Z) - 17 - [ (ジメチルアミノ) メチル] ヘキサコス - 9 - エノエート、2 - ( (2 - (ジノニルアミノ) エチル) (ノニル) アミノ) - 1 - (3 - (2 - (ジノニルアミノ) エチル) ピペリジン - 1 - イル) エタン - 1 - オン、エチル (7 Z) - 17 - [ (ジメチルアミノ) メチル] トリコス - 7 - エノエート、ジペンチル 4, 4' - ( (2 - (4 - (N - (2 - (ジノニルアミノ) エチル) - N - ノニルグリシル) ピペラジン - 1 - イル) - 2 - オキソエチル) アザネジル) ジブチレート、ペンチル 4 - (ノニル (2 - (4 - (N - ノニル - N - (2 - (ノニル (4 - オキソ - 4 - (ペンチルオキシ) ブチル) アミノ) エチル) グリシル) ピペラジン - 1 - イル) - 2 - オキソエチル) アミノ) ブタノエート、エチル (7 Z) - 17 - [ (ジメチルアミノ) メチル] テトラコス - 7 - エノエート、エチル (7 Z) - 17 - [ (ジメチルアミノ) メチル] ペンタコス - 7 - エノエート、2 - ( (2 - (ジノニルアミノ) エチル) (ノニル) アミノ) - 1 - (3 - ( (ジノニルアミノ) メチル) ピロリジン - 1 - イル) エタン - 1 - オン、trans - 3 - [ (3) 7 - ジメチルオクチル) オキシ] - 1 - メチル - 4 ~ [ (9 Z, 12 Z) - オクタデカ - 9 5 12 - ジエン - 1 - イルオキシ] ピロリジン、メチル 6 - (2 - (8 - (2 - (ジメチルアミノ) - 3 - (ヘキシルオキシ) プロポキシ) オクチル) シクロプロピル) ヘキサノエート、メチル (9 Z) - 21 - { [4 - (ジメチルアミノ) ブタノイル] オキシ} ノナコス - 9 - エノエート、メチル (9 Z) - 21 - (ジメチルアミノ) ノナコス - 9 - エノエート、(2 S) - N, N - ジメチル - 1 - [ (9 Z, 12 Z) - オクタデカ - 9, 12 - ジエン - 1 - イルオキシ] トリデカン - 2 - アミン、(15 Z, 18 Z) - N, N - ジメチルテトラコサ - 15, 18 - ジエン - 7 - アミン、エチル (7 Z) - 17 - [ (ジメチルアミノ) メチル] ヘキサコス - 7 - エノエート、2 - ( (2 - (ジノニルアミノ) エチル) (ノニル) アミノ) - 1 - (3 - (2 - (ジノニルアミノ) エチル) ピロリジン - 1 - イル) エタン - 1 - オン、メチル 6 - (2 - {11 - [ (ジメチルアミノ) メチル] イコシル} シクロプロピル) ヘキサノエート、メチル 10 - (2 - {7 - [ (ジメチルアミノ) メチル] ヘキサデシル} シクロプロピル) デカノエート、メチル 8 - (2 - {11 - [ (ジメチルアミノ) メチル] ヘプタデシル} シクロプロピル) オクタノエート、メチル 8 - (2 - {11 - [ (ジメチルアミノ) メチル] オクタデシル} シクロプロピル) オクタノエート、メチル

10

20

30

40

50

ル 8 - ( 2 - { l l - [ (ジメチルアミノ) メチル] ノナデシル} シクロプロピル) オクタノエート、メチル 8 - ( 2 - { l l - [ (ジメチルアミノ) メチル] イコシル} シクロプロピル) オクタノエート、ペンチル 4 - ( ( 3 - ( 4 - ( 3 - ( ( 2 - (ジノニルアミノ) エチル) (ノニル) アミノ) プロパノイル) ピペラジン- l - イル) - 3 - オキソプロピル) (ノニル) アミノ) ブタノエート、メチル 8 - ( 2 - { 9 - [ (ジメチルアミノ) メチル] ペンタデシル} シクロプロピル) オクタノエート、メチル 8 - ( 2 - { 9 - [ (ジメチルアミノ) メチル] ヘキサデシル} シクロプロピル) オクタノエート、3 - ( ( 2 - ( l - ( N - ( 2 - (ジノニルアミノ) エチル) - N - ノニルグリシル) ピペリジン- 4 - イル) エチル) (ノニル) アミノ) プロピルヘキサノエート、メチル 8 - ( 2 - { 9 - [ (ジメチルアミノ) メチル] ヘプタデシル} シクロプロピル) オクタノエート、メチル 8 - ( 2 - (ジメチルアミノ) - 3 - ( ( 6 - ( ( 2 - オクチルシクロプロピル) メトキシ) - 6 - オキソヘキシル) オキシ) プロポキシ) オクタノエート、ブチル 5 - ( ( 2 - ( l - ( N - ( 2 - (ジノニルアミノ) エチル) - N - ノニルグリシル) ピペリジン- 4 - イル) エチル) (ノニル) アミノ) ペンタノエート、trans-1-メチル-3-[ (12Z) - オクタデス-12-エン-1-イルオキシ] - 4 - (オクチルオキシ) ピロリジン、メチル (9Z) - 21 - { [4 - (ジメチルアミノ) ブタノイル] オキシ} トリアコント-9-エノエート、メチル (9Z) - 21 - (ジメチルアミノ) トリアコント-9-エノエート、2 - ( ( 2 - (ジドデシルアミノ) エチル) (ノニル) アミノ) - 1 - (4 - (ジノニルグリシル) ピペラジン-1-イル) エタン-1-オン工程 1 : メチル N - ( 2 - (ジドデシルアミノ) エチル) - N - ノニルグリシネート、1 - ( ( 2R, 3S, 5R) - 3 - (ビス (ヘキサデシルオキシ) メトキシ) - 5 - (5-メチル-2, 4-ジオキソ-3, 4-ジヒドロピリミジン-1 (2H) - イル) テトラヒドロフメタン スルホネート、(Z) - メチル 16 - (3 - (デシルオキシ) - 2 - (ジメチルアミノ) プロポキシ) ヘキサデス-7-エノエート、(2S) - 1 - [ (9Z, 12Z) - オクタデカ-9, 12-ジエン-1-イルオキシ] ノナン-2-アミン、(14Z, 17Z) - N, N-ジメチルトリコサ-14, 17-ジエン-6-アミン、プロピル 6 - ( ( 2 - ( l - ( N - ( 2 - (ジノニルアミノ) エチル) - N - ノニルグリシル) ピペリジン-4-イル) エチル) (ノニル) アミノ) ヘキサノエート、メチル 7 - ( 2 - (ジメチルアミノ) - 3 - ( ( 6 - ( ( 2 - オクチルシクロプロピル) メトキシ) - 6 - オキソヘキシル) オキシ) プロポキシ) ヘプタノエート、メチル (7Z) - 19 - [ (ジメチルアミノ) メチル] オクタコス-7-エノエート、メチル (HZ) - 19 - [ (ジメチルアミノ) メチル] オクタコス- l l - エノエート、エチル 7 - ( ( 2 - ( l - ( N - ( 2 - (ジノニルアミノ) エチル) - N - ノニルグリシル) ピペリジン-4-イル) エチル) (ノニル) アミノ) ヘプタノエート、( 2 - オクチルシクロプロピル) メチル 6 - ( 2 - (ジメチルアミノ) - 3 - ( ( 5 - メトキシ-5 - オキソペンチル) オキシ) プロポキシ) ヘキサノエート、メチル 8 - ( ( 2 - ( l - ( N - ( 2 - (ジノニルアミノ) エチル) - N - ノニルグリシル) ピペリジン-4-イル) エチル) (ノニル) アミノ) オクタノエート、メチル (9Z) - 21 - [ (ジメチルアミノ) メチル] ヘプタコス-9-エノエート、( 2 - オクチルシクロプロピル) メチル 6 - ( 2 - (ジメチルアミノ) - 3 - (4 - メトキシ-4 - オキソプトキシ) プロポキシ) ヘキサノエート、メチル (9Z) - 21 - [ (ジメチルアミノ) メチル] オクタコス-9-エノエート、3 - ( ( 2 - (4 - (N - ( 2 - (ジノニルアミノ) エチル) - N - ノニルグリシル) ピペラジン- l - イル) - 2 - オキソエチル) (ノニル) アミノ) プロピルヘキサノエート、(Z) - メチル 8 - ( 2 - (ジメチルアミノ) - 3 - ( ( 6 - オキソ-6 - (ウンデス-2-エン- l - イルオキシ) ヘキシル) オキシ) プロポキシ) オクタノエート、メチル (9Z) - 21 - [ (ジメチルアミノ) メチル] ノナコス-9-エノエート、ブチル 5 - ( ( 2 - (4 - (N - ( 2 - (ジノニルアミノ) エチル) - N - ノニルグリシル) ピペラジン- l - イル) - 2 - オキソエチル) (ノニル) アミノ) ペンタノエート、(Z) - メチル 7 - ( 2 - (ジメチルアミノ) - 3 - ( ( 6 - オキソ-6 - (ウンデス-2-エン- l - イルオキシ) ヘキシル) オキシ) プロポキシ) ヘプタノエート、プロピル 6 - ( ( 2 - (4 - (N - ( 2 - (ジノニルアミノ

) エチル) - N - ノニルグリシル) ピペラジン - l - イル) - 2 - オキソエチル) (ノニ  
 ル) アミノ) ヘキサノエート、メチル (9 Z) - 21 - [(ジメチルアミノ) メチル] ト  
 リアコント - 9 - エノエート、(Z) - ウンデス - 2 - エン - 1 - イル 6 - (2 - (ジメ  
 チルアミノ) - 3 - ((5 - メトキシ - 5 - オキソペンチル) オキシ) プロポキシ) ヘキ  
 サノエート、メチル (9 Z) - 19 - [(ジメチルアミノ) メチル] ペンタコス - 9 - エ  
 ノエート、エチル 7 - ((2 - (4 - (N - (2 - (ジノニルアミノ) エチル) - N - ノ  
 ニルグリシル) ピペラジン - l - イル) - 2 - オキソエチル) (ノニル) アミノ) ヘプタ  
 ノエート、(Z) - ウンデス - 2 - エン - 1 - イル 6 - (2 - (ジメチルアミノ) - 3 -  
 (4 - メトキシ - 4 - オキソブトキシ) プロポキシ) ヘキサノエート、メチル 6 - (2 -  
 (ジメチルアミノ) - 3 - ((6 - ((2 - オクチルシクロプロピル) メトキシ) - 6 -  
 オキソヘキシル) オキシ) プロポキシ) ヘキサノエート、メチル (9 Z) - 19 - [(ジ  
 メチルアミノ) メチル] ヘキサコス - 9 - エノエート、3 - (ジノニルアミノ) - l - (4 -  
 (3 - ((2 - (ジノニルアミノ) エチル) (ノニル) アミノ) プロパノイル) ピペ  
 ラジン - 1 - イル) プロパン - 1 - オン、メチル (9 Z) - 19 - [(ジメチルアミノ)  
 メチル] ヘプタコス - 9 - エノエート、2 - ((2 - (ジノニルアミノ) エチル) (ノニ  
 ル) アミノ) - l - (4 - (ジテトラデシルグリシル) ピペラジン - 1 - イル) エタン -  
 1 - オン、(Z) - メチル 6 - (2 - (ジメチルアミノ) - 3 - ((6 - オキソ - 6 - (ウ  
 ンデス - 2 - エン - l - イル オキシ) ヘキシル) オキシ) プロポキシ) ヘキサノエート  
 、メチル 8 - (2 - (ジメチルアミノ) - 3 - ((8 - (2 - (6 - メトキシ - 6 - オキ  
 ソヘキシル) シクロプロピル) オクチル) オキシ) プロポキシ) オクタノエート、メチル  
 8 - (2 - {9 - [(ジメチルアミノ) メチル] オクタデシル} シクロプロピル) オクタ  
 ノエート、2 - (ジノニルアミノ) - l - (4 - (2 - ((2 - (ジノニルアミノ) エチ  
 ル) (ノニル) アミノ) エチル) ピペリジン - 1 - イル) エタン - 1 - オン、trans  
 - l - メチル - 3 - [(9 Z) - オクタデス - 9 - エン - l - イル オキシ] - 4 - (オク  
 チル オキシ) ピロリジン、メチル (9 Z) - 19 - {[4 - (ジメチルアミノ) ブタノイ  
 ル] オキシ} ペンタコス - 9 - エノエート、メチル (9 Z) - 19 - (ジメチルアミノ)  
 ペンタコス - 9 - エノエート、(Z) - メチル 16 - (2 - (ジメチルアミノ) - 3 - (ノ  
 ニル オキシ) プロポキシ) ヘキサデス - 7 - エノエート、(2 S) - 1 - [(9 Z, 1  
 2 Z) - オクタデカ - 9, 12 - ジエン - 1 - イル オキシ] デカン - 2 - アミン、(12  
 Z, 15 Z) - N, N - ジメチルヘニコサ - 12, 15 - ジエン - 4 - アミン、メチル 7  
 - (2 - (ジメチルアミノ) - 3 - ((8 - (2 - (6 - メトキシ - 6 - オキソヘキシル)  
 ) シクロプロピル) オクチル) オキシ) プロポキシ) ヘプタノエート、メチル (9 Z) -  
 19 - [(ジメチルアミノ) メチル] オクタコス - 9 - エノエート、2 - ((2 - (ジノ  
 ニルアミノ) エチル) (ノニル) アミノ) - l - (4 - (2 - (ジノニルアミノ) エチル)  
 ) ピペリジン - l - イル) エタン - l - オン、メチル 8 - ((2 - (4 - (ジノニルグリ  
 シル) ピペラジン - l - イル) - 2 - オキソエチル) (2 - ((8 - メトキシ - 8 - オキ  
 ソオクチル) (ノニル) アミノ) エチル) アミノ) オクタノエート、メチル 6 - (2 - (8 -  
 (2 - (ジメチルアミノ) - 3 - ((5 - メトキシ - 5 - オキソペンチル) オキシ)  
 プロポキシ) オクチル) シクロプロピル) ヘキサノエート、エチル 8 - {2 - [l - l - (ジ  
 メチルアミノ) ヘプタデシル] シクロプロピル} オクタノエート、メチル 8 - ((2 -  
 (ジノニルアミノ) エチル) (2 - (4 - (ジノニルグリシル) ピペラジン - l - イル)  
 - 2 - オキソエチル) アミノ) オクタノエート、メチル 6 - (2 - (8 - (2 - (ジメチ  
 ルアミノ) - 3 - (4 - メトキシ - 4 - オキソブトキシ) プロポキシ) オクチル) シクロ  
 プロピル) ヘキサノエート、エチル 8 - {2 - [l - l - (ジメチルアミノ) オクタデシル]  
 } シクロプロピル} オクタノエート、メチル 8 - ((2 - ((2 - (4 - (ジノニルグリ  
 シル) ピペラジン - l - イル) - 2 - オキソエチル) (ノニル) アミノ) エチル) (ノニ  
 ル) アミノ) オクタノエート、エチル 8 - {2 - [l - l - (ジメチルアミノ) ノナデシル]  
 } シクロプロピル} オクタノエート、(Z) - メチル 16 - (2 - (ジメチルアミノ) - 3 -  
 ((8 - メトキシ - 8 - オキソオクチル) オキシ) プロポキシ) ヘキサデス - 7 - エ  
 ノエート、ペンチル 4 - ((2 - (4 - (N - (2 - (ジノニルアミノ) エチル) - N -

10

20

30

40

50

ノニルグリシル) ピペラジン- $\gamma$ -イル)-2-オキソエチル) (ノニル) アミノ) ブタ  
 ノエート、エチル 8- {2- [11- (ジメチルアミノ) イコシル] シクロプロピル} オ  
 クタノエート、(Z)-メチル 16- (2- (ジメチルアミノ)-3- ( (7-メトキシ  
 -  
 7-オキソヘプチル) オキシ) プロポキシ) ヘキサデス-7-エノエート、メチル 8- (   
 (2- (4- (N- (2- (ジノニルアミノ) エチル)-N-ノニルグリシル) ピペラジ  
 ン- $\gamma$ -イル)-2-オキソエチル) (ノニル) アミノ) オクタノエート、エチル 8- {   
 2- [9- (ジメチルアミノ) ペンタデシル] シクロプロピル} オクタノエート、(Z)   
 -メチル 16- (2- (ジメチルアミノ)-3- ( (5-メトキシ-5-オキソペンチル   
 ) オキシ) プロポキシ) ヘキサデス-7-エノエート、(11E, 20Z, 23Z)-N   
 , N-ジメチルノナコサ-11, 20, 23-トリエン-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] ペンタデカン-8-アミン、   
 エチル 8- {2- [9- (ジメチルアミノ) ヘキサデシル] シクロプロピル} オクタノエ   
 ート、2- ( (2- (ジドデシルアミノ) エチル) (ドデシル) アミノ)- $\gamma$ - (5- (   
 ジノニルグリシル)-2, 5-ジアザビシクロ [2.2.1] ヘプタン-2-イル) エタ   
 ン-1-オン3、(Z)-メチル 16- (2- (ジメチルアミノ)-3- (4-メトキシ   
 -4-オキソブトキシ) プロポキシ) ヘキサデス-7-エノエート、メチル 6- (2- (   
 8- (2- (ジメチルアミノ)-3- ( (6-メトキシ-6-オキソヘキシル) オキシ)   
 プロポキシ) オクチル) シクロプロピル) ヘキサノエート、エチル 8- {2- [9- (ジ   
 メチルアミノ) ヘプタデシル] シクロプロピル} オクタノエート、2- (ジノニルアミノ   
 ) - $\gamma$ - (5- (N- (2- (ジノニルアミノ) エチル)-N-ノニルグリシル)-2,   
 5-ジアザビシクロ [2.2.1] ヘプタン-2-イル) エタン- $\gamma$ -オン、1- [ (1   
 S, 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   
 、N1, N1, N2-トリ ( (9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエン- $\gamma$ -イル)   
 -N2- (2- (ピペラジン- $\gamma$ -イル) エチル) エタン-1, 2-ジアミン、エチ   
 ル 8- {2- [9- (ジメチルアミノ) オクタデシル] シクロプロピル} オクタノエート   
 、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、(Z)-メチル 16- (2- (ジメチルアミノ)-3- ( (6-メトキシ   
 -6-オキソヘキシル) オキシ) プロポキシ) ヘキサデス-7-エノエート、N1, N   
 1, N2-トリ ( (Z)-オクタデス-9-エン- $\gamma$ -イル) -N2- (2- (ピペラジ   
 ン- $\gamma$ -イル) エチル) エタン- $\gamma$ , 2-ジアミン、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、メチル   
 8- (2- (ジメチルアミノ)-3- ( (8- (2- ( (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) プロポキシ) オクタノエート、エチル 4-   
 {2- [11- (ジメチルアミノ) イコシル] シクロプロピル} ブタノエート、trans-1-   
 メチル-3- [ ( (9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエニル) オキシ]   
 -4-オクチルオキシ-ピロリジン、メチル (9Z)-19- (ジメチルアミノ) ヘキ   
 サコス-9-エノエート、メチル (9Z)-19- { [4- (ジメチルアミノ) ブタノイ   
 ル] オキシ} ヘキサコス-9-エノエート、(Z)-メチル 16- (2- (ジメチルアミ   
 ノ)-3- (ヘプチルオキシ) プロポキシ) ヘキサデス-7-エノエート、(2R)-1   
 - [ (9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエン-1-イルオキシ] ドデカン-2   
 -アミン、(13Z, 16Z)-N, N-ジメチルドコサ-13, 16-ジエン-5-ア   
 ミン、N, N-ジメチル-1- [ (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、メチル 7- (2- (ジメチルアミノ)-3- ( (8- (2- ( (   
 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) プロポキシ   
 ) ヘプタノエート、エチル 8- {2- [7- (ジメチルアミノ) ヘキサデシル] シクロプ   
 ロピル} オクタノエート、2- (ジドデシルアミノ)-N-ドデシル-N- (2- (ピペ   
 ラジン- $\gamma$ -イル) エチル) アセトアミド、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、N1- (2- (ピペラジン-   
 $\gamma$ -イル) エチル)-N1, N2, N2-トリテトラデシルエタン- $\gamma$ , 2-ジアミン、

10

20

30

40

50

メチル 6 - (2 - (ジメチルアミノ) - 3 - ( (8 - (2 - ( (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) プロポキシ) ヘキサノエート、エチル 6 - {2 - [9 - (ジメチルアミノ) ペンタデシル] シクロプロピル} ヘキサノエート、N, N - ジメチル - 1 - [ (1 S, 2 S) - 2 - { [ (1 R, 2 R) - 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、NN 1, N 2 - トリドデシル - N 2 - (2 - (ピペラジン - 1 - イル) エチル) エタン - 1, 2 - ジアミン、メチル 5 - (2 - (ジメチルアミノ) - 3 - ( (8 - (2 - ( (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) プロポキシ) ペンタノエート、エチル 6 - {2 - [9 - (ジメチルアミノ) ヘキサデシル] シクロプロピル} ヘキサノエート、N, N - ジメチル - 21 - [ (1 S, 2 R) - 2 - オクチルシクロプロピル] ヘニコサン - 10 - アミン、NNN 2 - トリノニル - N 2 - (2 - (ピペラジン - 1 - イル) エチル) エタン - 1, 2 - ジアミン、メチル 4 - (2 - (ジメチルアミノ) - 3 - ( (8 - (2 - ( (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) プロポキシ) ブタノエート、エチル 6 - {2 - [9 - (ジメチルアミノ) ヘプタデシル] シクロプロピル} ヘキサノエート、N, N - ジメチル - 1 - [ (1 S, 2 R) - 2 - オクチルシクロプロピル] ノナデカン - 10 - アミン、N 1, N 1, N 2 - トリヘキシル - N 2 - (2 - (ピペラジン - 1 - イル) エチル) エタン - 1, 2 - ジアミン、メチル 8 - (2 - (ジメチルアミノ) - 3 - ( (9 Z, 12 Z) - オクタデカ - 9, 12 - ジエン - 1 - イルオキシ) プロポキシ) オクタノエート、エチル 6 - {2 - [9 - (ジメチルアミノ) オクタデシル] シクロプロピル} ヘキサノエート、N 1 - (2 - (4 - (2 - (ジドデシルアミノ) エチル) ピペラジン - 1 - イル) エチル) - N 1, N 2, N 2 - トリ ( (9 Z, 12 Z) - オクタデカ - 9, 12 - ジエン - 1 - イル) エタン - 1, 2 - ジアミン、メチル 7 - (2 - (ジメチルアミノ) - 3 - ( (9 Z, 12 Z) - オクタデカ - 9, 12 - ジエン - 1 - イルオキシ) プロポキシ) ヘプタノエート、エチル (9 Z) - 21 - (ジメチルアミノ) ヘプタコス - 9 - エノエート、1 - [ (1 S, 2 R) - 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、1 - メチル 18 - [ (2 Z) - ノン - 2 - エン - 1 - イル] 9 - { [4 - (ジメチルアミノ) ブタノイル] オキシ} オクタデカンジオエート、N 1 - (2 - (4 - (2 - (ジドデシルアミノ) エチル) ピペラジン - 1 - イル) エチル) - N 1, N 2, N 2 - トリ ( (Z) - オクタデス - 9 - エン - 1 - イル) エタン - 1, 2 - ジアミン、N, N - ジメチル - 1 - [ (1 S, 2 R) - 2 - オクチルシクロプロピル] ヘプタデカン - 8 - アミン、メチル 6 - (2 - (ジメチルアミノ) - 3 - ( (9 Z, 12 Z) - オクタデカ - 9, 12 - ジエン - 1 - イルオキシ) プロポキシ) ヘキサノエート、エチル (9 Z) - 21 - (ジメチルアミノ) オクタコス - 9 - エノエート、ジメチル (9 Z) - 19 - { [4 - (ジメチルアミノ) ブタノイル] オキシ} ヘプタコス - 9 - エンジオエート、N 1 - (2 - (4 - (2 - (ジテトラデシルアミノ) エチル) ピペラジン - 1 - イル) エチル) - N 1, N 2, N 2 - トリテトラデシルエタン - 1, 2 - ジアミン、メチル 5 - (2 - (ジメチルアミノ) - 3 - ( (9 Z, 12 Z) - オクタデカ - 9, 12 - ジエン - 1 - イルオキシ) プロポキシ) ペンタノエート、エチル 8 - { [4 - (ジメチルアミノ) ブタノイル] オキシ} - 15 - (2 - オクチルシクロプロピル) ペンタデカノエート、エチル (9 Z) - 21 - (ジメチルアミノ) ノナコス - 9 - エノエート、(13 Z, 16 Z) - N, N - ジメチル - 3 - ノニルドコサ - 13, 16 - ジエン - 1 - アミン、N 1 - (2 - (4 - (2 - (ジドデシルアミノ) エチル) ピペラジン - 1 - イル) エチル) - N 1, N 2, N 2 - トリテトラデシルエタン - 1, 2 - ジアミン、メチル 9 - { [4 - (ジメチルアミノ) ブタノイル] オキシ} - 16 - (2 - オクチルシクロプロピル) ヘキサデカノエート、メチル 4 - (2 - (ジメチルアミノ) - 3 - ( (9 Z, 12 Z) - オクタデカ - 9, 12 - ジエン - 1 - イルオキシ) プロポキシ) ブタノエート、エチル (9 Z) - 21 - (ジメチルアミノ) トリアコント - 9 - エノエート、(12 Z, 15 Z) - N, N - ジメチル - 2 - ノニルヘニコサ - 12, 15 - ジエン - 1 - アミン、メチル 8 - (2 - (ジメチルアミノ) - 3 - ( (8 - (2 - オクチルシクロプロピル) オクチル) オキシ) プロポキシ) オクタノエート、エチル (9 Z) - 19

10

20

30

40

50

- (ジメチルアミノ) ペンタコス-9-エノエート、エチル (18Z, 21Z) - 8 - {  
 [4 - (ジメチルアミノ) ブタノイル] オキシ} ヘプタコサ-18, 21-ジエノエート  
 、 (16Z) - N, N-ジメチルペンタコス-16-エン-8-アミン、メチル (9Z)  
 - 19 - { [4 - (ジメチルアミノ) ブタノイル] オキシ} ヘプタコス-9-エノエート  
 、メチル (9Z) - 19 - (ジメチルアミノ) ヘプタコス-9-エノエート、2 - (ジド  
 デシルアミノ) - l - (4 - (2 - (2 - (ジドデシルアミノ) エチル) (ドデシル)  
 アミノ) エチル) ピペラジン- l - イル) エタン- l - オン、 (Z) - メチル 16 - (2  
 - (ジメチルアミノ) - 3 - (ヘキシルオキシ) プロポキシ) ヘキサデス-7-エノエ  
 ート、 (2S) - 1 - [ (9Z, 12Z) - オクタデカ-9, 12-ジエン-1-イルオキシ] ド  
 デカン-2-アミン、 (16Z, 19Z) - N, N-ジメチルペンタコサ~16, 19-ジ  
 エン-8-アミン、 N1 - (2 - (4 - (2 - (ジノニルアミノ) エチル) ピペ  
 ラジン- l - イル) エチル) - N1, N2 ^ V 2-トリテトラデシルエタン- l, 2-ジ  
 アミン、メチル 7 - (2 - (ジメチルアミノ) - 3 - ( (8 - (2-オクチルシクロプロ  
 ピル) オクチル) オキシ) プロポキシ) ヘプタノエート、メチル (19Z, 22Z) - 9  
 - { [4 - (ジメチルアミノ) ブタノイル] オキシ} オクタコサ-19, 22-ジエノエ  
 ート、エチル (9Z) - 19 - (ジメチルアミノ) ヘキサコス-9-エノエート、 (22  
 Z) - N, N-ジメチルヘントリアコント-22-エン-10-アミン、 N1 - (2 - (4 - (2 - (ジ  
 (Z) - オクタデス-9-エン- l - イル) アミノ) エチル) ピペラジ  
 ン- l - イル) エチル) - ! ^ ^ - トリドデシルエタン-1, 2-ジアミン、メチル 5 -  
 (2 - (ジメチルアミノ) - 3 - ( (8 - (2-オクチルシクロプロピル) オクチル) オ  
 キシ) プロポキシ) ペンタノエート、エチル (9Z) - 19 - (ジメチルアミノ) ヘプタ  
 コス-9-エノエート、 (2-ブチルシクロプロピル) メチル 12 - { [4 - (ジメチル  
 アミノ) ブタノイル] オキシ} ヘニコサノエート、 (20Z) - N, N-ジメチルノナコ  
 ス-20-エン-10-アミン、 N1, N1, N2-トリドデシル- N2 - (2 - (4 - (2 - (ドデシル  
 (9Z, 12Z) - オクタデカ-9, 12-ジエン- l - イル) アミノ  
 ) エチル) ピペラジン-1-イル) エチル) エタン-1, 2-ジアミン、メチル 4 - (2  
 - (ジメチルアミノ) - 3 - ( (8 - (2-オクチルシクロプロピル) オクチル) オキシ  
 ) プロポキシ) ブタノエート、エチル (9Z) - 19 - (ジメチルアミノ) オクタコス-  
 9-エノエート、 (2-オクチルシクロプロピル) メチル 8 - { [4 - (ジメチルアミノ  
 ) ブタノイル] オキシ} ヘプタデカノエート、 (24Z) - N, N-ジメチルトリトリア  
 コント-24-エン-10-アミン、 N1 - (2 - (4 - (2 - (ジテトラデシルアミノ  
 ) エチル) ピペラジン- l - イル) エチル) - N1, N2, N2-トリドデシルエタン-  
 1  
 , 2-ジアミン、エチル (5Z) - 17 - (ジメチルアミノ) ヘキサコス-5-エノエ  
 ート、 (Z) - メチル 8 - (2 - (ジメチルアミノ) - 3 - (オクタデス-9-エン- l -  
 イルオキシ) プロポキシ) オクタノエート、 (2Z) - ヘプト-2-エン- l - イル 12  
 - { [4 - (ジメチルアミノ) ブタノイル] オキシ} ヘニコサノエート、 (17Z) - N  
 , N-ジメチルノナコス-17-エン-10-アミン、 N1 - (2 - (4 - (2 - (ジ  
 (Z) - ドデス-6-エン- l - イル) アミノ) エチル) ピペラジン- l - イル) エチル  
 ) - N1, N2, N2-トリドデシルエタン-1, 2, -ジアミン、エチル (9Z) - 17  
 - (ジメチルアミノ) ヘキサコス-9-エノエート、 (Z) - メチル 7 - (2 - (ジメ  
 チルアミノ) - 3 - (オクタデス-9-エン-1-イルオキシ) プロポキシ) ヘプタノエ  
 ート、 (2Z) - ウンデス-2-エン- l - イル 8 - { [4 - (ジメチルアミノ) ブタノ  
 イル] オキシ} ヘプタデカノエート、 (14Z) - N, N-ジメチルノナコス-14-エ  
 ン-10-アミン、エチル (7Z) - 17 - (ジメチルアミノ) トリコス-7-エノエ  
 ート、 (Z) - N1 - (2 - (4 - (2 - (ドデス-6-エン- l - イル (ドデシル) アミ  
 ノ) エチル) ピペラジン- N ! ^ ^ - トリドデシルエタン-1, 2-ジアミン、 (Z) -  
 メチル 5 - (2 - (ジメチルアミノ) - 3 - (オクタデス-9-エン-1-イルオキシ)  
 プロポキシ) ペンタノエート、 (2-ヘキシルシクロプロピル) メチル 10 - { [4 - (ジ  
 メチルアミノ) ブタノイル] オキシ} ノナデカノエート、 (15Z) - N, N-ジメチ

ルヘブタコス-15-エン-10-アミン、エチル(7Z)-17-(ジメチルアミノ)  
 テトラコス-7-エノエート、(Z)-メチル4-(2-(ジメチルアミノ)-3-(オ  
 クタデス-9-エン-1-イルオキシ)プロポキシ)ブタノエート、(2Z)-ノン-2  
 -エン-1-イル10-{[4-(ジメチルアミノ)ブタノイル]オキシ}ノナデカノエ  
 ート、(20Z)-N, N-ジメチルヘブタコス-20-エン-10-アミン、N1-(  
 2-(4-(2-(ジオクチルアミノ)エチル)ピペラジン-1-イル)エチル)-N1  
 , N2<sup>^</sup>V2-トリドデシルエタン-1, 2-ジアミン、メチル6-(2-(ジメチルア  
 ミノ)-3-(8-(2-オクチルシクロプロピル)オクチル)オキシ)プロポキシ)  
 ヘキサノエート、エチル6-[2-(9-{[4-(ジメチルアミノ)ブタノイル]オキ  
 シ}オクタデシル)シクロプロピル]ヘキサノエート、エチル(7Z)-17-(ジメ  
 チルアミノ)ペンタコス-7-エノエート、1-[(11Z, 14Z)-1-ノニルイコサ  
 -11, 14-ジエン-1-イル]ピロリジン、エチル(7Z)-17-(ジメチルアミ  
 ノ)ヘキサコス-7-エノエート、(20Z, 23Z)-N-エチル-N-メチルノナコ  
 サ-20, 23-ジエン-10-アミン、N, N-ジメチルヘブタコサn-10-アミン  
 、メチル6-{2-[11-(ジメチルアミノ)イコシル]シクロプロピル}ヘキサノエ  
 ート、メチル6-[2-(11-{[4-(ジメチルアミノ)ブタノイル]オキシ}イコ  
 シル)シクロプロピル]ヘキサノエート、(2-オクチルシクロプロピル)メチル6-(  
 3-(デシルオキシ)-2-(ジメチルアミノ)プロポキシ)ヘキサノエート、メチル8  
 -{2-[9-(ジメチルアミノ)オクタデシル]シクロプロピル}オクタノエート、メ  
 チル8-[2-(9-{[4-(ジメチルアミノ)ブタノイル]オキシ}オクタデシル)  
 シクロプロピル]オクタノエート、メチル7-(2-(8-(2-(ジメチルアミノ)-  
 3-(オクチルオキシ)プロポキシ)オクチル)シクロプロピル)ヘブタノエート、ヘ  
 プタデカン-9-イル8-(2-ヒドロキシエチル)(テトラデシル)アミノ)オクタノ  
 エート代表、2-(2-(ジドデシルアミノ)エチル)(ドデシル)アミノ)-1-(  
 4-(2-(ジドデシルアミノ)エチル)ピペラジン-1-イル)エタン-1-オン、(  
 2S)-1-[(9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエン-1-イルオキシ]ウン  
 デカン-2-アミン、(17Z, 20Z)-N, N-ジメチルヘキサコサ-17, 20  
 -ジエン-9-アミン、(18Z)-ヘブタコス-18-エン-10-イル4-(ジメチ  
 ルアミノ)ブタノエート、(2S)-1-(6-[3B])-コレスト-5-エン-3  
 -イルオキシ]ヘキシル}オキシ)-N, N-ジメチル-3-[(9Z)-オクタデス-  
 9-エン-1-イルオキシ]プロパン-2-アミン、メチル10-{2-[7-(ジメチ  
 ルアミノ)ヘキサデシル]シクロプロピル}デカノエート、メチル10-[2-(7-{  
 [4-(ジメチルアミノ)ブタノイル]オキシ}ヘキサデシル)シクロプロピル]デカノ  
 エート、(2S)-N, N-ジメチル-1-(8-[(1R, 2R)-2-{[(1S  
 , 2S)-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)  
 トリデカン-2-アミン、(2-オクチルシクロプロピル)メチル6-(2-(ジメチル  
 アミノ)-3-(ノニルオキシ)プロポキシ)ヘキサノエート、(19Z, 22Z)-N  
 , N-ジメチルオクタコサ-19, 22-ジエン-7-アミン、4-(N-(2-(ジ  
 ノニルアミノ)エチル)-N-ノニルグリシル)オキシ)ペンタン-2-イルジノニルグ  
 リシネート、3-ヒドロキシブタン-2-イルN-(2-(ジノニルアミノ)エチル)-  
 N-ノニル、ジ(ヘブタデカン-9-イル)8, 8'-26, 28-ジメチル-11, 24, 30, 43-  
 テトラオキソ-10, 25, 29, 44-テトラオキサ-19, 35-  
 ジアザトリペンタコンタン-19, 35-ジイル)ジオクタノエート、ジ(ヘブタデカ  
 ン-9-イル)8, 8'-26, 27-ジメチル-11, 24, 29, 42-テトラオ  
 キソ-10, 25, 28, 43-テトラオキサ-19, 34-  
 ジアザドペンタコンタン-19, 34-ジイル)ジオクタノエート、ジ(ヘブタデカ  
 ン-9-イル)8, 8'-11, 24, 29, 42-テトラオキソ-10, 25, 28, 43-  
 テトラオキサ-19, 34-  
 ジアザドペンタコンタン-19, 34-ジイル)ジオクタノエート、ジ(ヘブタデ  
 カン-9-イル)8, 8'-(ピペラジン-1, 4-ジイルビス(5-オキソペンタン  
 -5, 1-ジイル))ビス(8-(ノニルオキシ)-8-オキソオクチル)アザネジル

10

20

30

40

50



) ) ジオクタノエート、ジ (ヘプタデカン-9-イル) 15, 18-ジメチル-9, 24-  
 -ビス (8- (ノニルオキシ)-8-オキソオクチル)-14, 19-ジオキソ-9, 1  
 5, 18, 24-テトラアザトリリアコンタンジオエート、ジ (ヘプタデカン-9-イル)  
 ) 15, 19-ジメチル-9, 25-ビス (8- (ノニルオキシ)-8-オキソオクチル)  
 ) -14, 20-ジオキソ-9, 15, 19, 25-テトラアザトリトリリアコンタンジオ  
 エート、ジ (ヘプタデカン-9-イル) 15, 18-ジエチル-9, 24-ビス (8- (ノ  
 ニルオキシ)-8-オキソオクチル)-14, 19-ジオキソ-9, 15, 18, 24  
 -テトラアザトリリアコンタンジオエート、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] メチル} ドデカン-1-アミン、  
 メチル8- [2- (11- { [4- (ジメチルアミノ) ブタノイル] オキシ} オクタデシ  
 ル) シクロプロピル] オクタノエート、メチル8- {2- [11- (ジメチルアミノ) ヘ  
 プタデシル] シクロプロピル} オクタノエート (化合物18) ;、ヘプタデカン-9-イ  
 ル8- ( (2-ヒドロキシエチル) (8- (ノニルオキシ)-8-オキソオクチル) アミ  
 ノ) オクタノエート、(2-オクチルシクロプロピル) メチル6- (2- (ジメチルアミ  
 ノ)-3- (ヘプチルオキシ) プロポキシ) ヘキサノエート、(17Z)-N, N-ジメ  
 チルヘキサコス-17-エン-9-アミン、N1- (2- (4- (2- (ジドデシルアミ  
 ノ) エチル) ピペラジン-1-イル) エチル)-N1<sup>^</sup>V2, N2-トリヘキシルエタン  
 -1, 2-ジアミン、N, N-ジメチル-2- { [ (9Z, 12Z) -オクタデカ-9,  
 12-ジエン-1-イルオキシ] メチル} ウンデカン-1-アミン、メチル8- {2- [1  
 1- (ジメチルアミノ) オクタデシル] シクロプロピル} オクタノエート、(2-オク  
 チルシクロプロピル) メチル6- (2- (ジメチルアミノ)-3- (ヘキシルオキシ) プ  
 ロポキシ) ヘキサノエート、(18Z)-N, N-ジメチルヘプタコス-18-エン-1  
 0-アミン、2- ( (2- (ジノニルアミノ) エチル) (ノニル) アミノ) エチルテトラ  
 デカノエート、2- ( (2- (ジノニルアミノ) エチル) (ノニル) アミノ) エチルノナ  
 ノエート、テトラデシルN- (2- (ジノニルアミノ) エチル)-N-ノニルグリシネー  
 ト、ノニルN- (2- (ジノニルアミノ) エチル)-N-ノニルグリシネート、4- (2  
 - ( (2- (ジノニルアミノ) エチル) (ノニル) アミノ) アセトアミド) ブチルペンタ  
 ノエート、1, 1'- (ピペラジン-1, 4-ジイル) ビス (5- (ジデシルアミノ) ペ  
 ンタン-1-オン、2- ( (2- (ジノニルアミノ) エチル) (ノニル) アルムノ)-N  
 -テトラデシルアセトアミド、N-デシル-2- ( (2- (ジノニルアミノ) エチル) (ノ  
 ニル) アミノ)、N1- (3- (3- (ジノニルアミノ) プロポキシ) プロピル)-N  
 1, N2, N2-トリノニルエタン-1, 2-ジアミン、N1- (2- (ジノニルアミノ)  
 ) エチル)-N\N8, N8-トリノニルオクタン-1, 8-ジアミン、メチル8- [2  
 - (11- { [4- (ジメチルアミノ) ブタノイル] オキシ} ノナデシル) シクロプロピ  
 ル] オクタノエート、メチル8- {2- [11- (ジメチルアミノ) ノナデシル] シクロ  
 プロピル} オクタノエート、(Z)-ウンデス-2-エン-1-イル6- (3- (デシル  
 オキシ)-2- (ジメチルアミノ) プロポキシ) ヘキサノエート、(2R, 12Z, 15  
 Z)-N, N-ジメチル-1- (ウンデシルオキシ) ヘニコサ-12, 15-ジエン-2  
 -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、2- (ジノニルアミノ)-N- (4- (2- ( (2- (ジノニルアミノ) エ  
 チル) (ノニル) アミノ)-N-メチルアセトアミド) ブチル)-N-メチルアセトアミ  
 ド、7, 10-ジメチル-13, 16-ジノニル-6, 11-ジオキソ-4-テトラデシ  
 ル-4, 7, 10, 13, 16-ペンタアザペンタコシルデカノエート、2- (ジノニル  
 アミノ)-N- (2- (2- ( (2- (ジノニルアミノ) エチル) (ノニル) アミノ)-  
 N-エチルアセトアミド) エチル)-N-エチルアセトアミド、2- (ジノニルアミノ)  
 -N- (3- (2- ( (2- (ジノニルアミノ) エチル) (ノニル) アミノ)-N-メチ  
 ルアセトアミド) プロピル)-N-メチルアセトアミド、2- ( (2- (ジ ( (Z)-ノ  
 ン-3-エン-1-イル) アミノ) エチル) ( (Z)-ノン-3-エン-1-イル) アミ  
 ノ)-N- (2- (2- (ジノニルアミノ)-N-メチルアセトアミド) エチル)-N-  
 メチルアセトアミド、2- (ジノニルアミノ)-N- (2- (2- ( (2- (ジノニルア

10

20

30

40

50

ミノ) エチル) (ノニル) アミノ) アセトアミド) エチル) アセトアミド、ペンチル 8 ,  
 1 しージメチルー5 , 1 4 , 1 7ートリノニルー7 , 1 2ージオキソー5 , 8 , し1 , 1  
 4 , 1 7ーペンタアザヘキサコサノエート2ー( ( 2ー(ジノニルアミノ) エチル) (ノ  
 ニル) アニイノ)ーNーメチルーNー( 2ー(メチルアンドノ) エチル) アセタミ、2ー  
 (ジノニルアミノ)ーNー( 2ー( 2ー( ( 2ー(ジノニルアミノ) エチル) (ノニル)  
 アミノ)ーNーメチルアセトアミド) エチル)ーNーメチルアセトアミド2ー(ジノニル  
 アミノ)ーNーメチルーNー( 2ー(メチルアミノ) エチル) アセトアミド、2ー( (N  
 ー( 2ー(ジノニルアミノ) エチル)ーNーノニルグリシル) オキシ) エチルジノニルグ  
 リシネート2ーヒドロキシエチルジノニルグリシネート、メチル8ー[ 2ー(ししー{ [ 10  
 4ー(ジメチルアミノ) ブタノイル] オキシ} イコシル) シクロプロピル] オクタノエー  
 ト、メチル8ー{ 2ー[ししー(ジメチルアミノ) イコシル] シクロプロピル} オクタノ  
 エ  
 ート、( Z)ーウンデスー2ーエンーしーイル6ー( 2ー(ジメチルアミノ)ー3ー(ノ  
 ニルオキシ) プロポキシ) ヘキサノエート、( 2 R , 1 2 Z , 1 5 Z)ー1ー(ヘキサデ  
 シルオキシ)ーN , Nージメチルヘニコサー1 2 , 1 5ージエンー2ーアミン、( 2 2 Z  
 , 2 5 Z)ーN , Nージメチルヘントリアコンター2 2 , 2 5ージエンー1 0ーアミン、  
 し , しー(ピペラジンーし , 4ージイル) ビス( 4ー(ジデシルアミノ) ブタンーしーオン)  
 フェルトーブチル4ー(ジデシルアミノブタノエート、ヘプチル5ー( 4ー(Nー( 20  
 2ー(ジノニルアミノ) エチル)ーNーノニルグリシル) ピペラジンーしーイル)ー5ー  
 オキソペンタノエート5ー(ヘプトしオキシ)ー5ーオキソペンタノイカシド、ヘプチル  
 5ー( 4ー(Nー( 2ー(ジノニルアミノ) エチル)ーNーノニルグリシル) ピペラジン  
 ーしーイル)ー5ーオキソペンタノエート5ー(ヘプトしオキシ)ー5ーオキソペンタノ  
 イック、( Z)ー4ー( ( 2ー( 4ー(Nー( 2ー(ジノニルアミノ) エチル)ーNーノ  
 ニルグリシル) ピペラジンーしーイル)ー2ーオキソエチル) (テトラデシル) アミノ)  
 ブトー2ーエンー1ーy 1ノナノエート( Z)ー4ーヒドロキシブトー2ーエンーしーイル  
 ノナノエート、( Z)ー3ー( ( 2ー( 4ー(Nー( 2ー(ジノニルアミノ) エチル)  
 ーNーノニルグリシル) ピペラジンーしーイル)ー2ーオキソエチル) (テトラデスー9  
 ーエンー1ーイル) アミノ) プロピルデカノエート( Z)ーテトラデスー9ーエンーしー  
 イルメタンスルホネート、メチル8ー[ 2ー( 9ー{ [ 4ー(ジメチルアミノ) ブタノイ  
 ル] オキシ} ペンタデシル) シクロプロピル] オクタノエート、メチル8ー{ 2ー[ 9ー 30  
 (ジメチルアミノ) ペンタデシル] シクロプロピル} オクタノエート、( Z)ーウンデス  
 ー2ーエンーしーイル6ー( 2ー(ジメチルアミノ)ー3ー(ヘプチルオキシ) プロポキ  
 シ) ヘキサノエート、( 2 R , 1 2 Z , 1 5 Z)ー1ー(ヘキシルオキシ)ーN , Nージ  
 メチルヘニコサー1 2 , 1 5ージエンー2ーアミン、( 1 6 Z , 1 9 Z)ーN , Nージメ  
 チルペンタコサー1 6 , 1 9ージエンー6ーアミン、メチル8ー( ( 2ー( 4ー(Nー( 2  
 ー(ジ ( ( Z)ーノンー3ーエンーしーイル) アミノ) エチル)ーNー( ( Z)ーノン  
 ー3ーエンーしーイル) グリシル) ピペラジンーしーイル)ー2ーオキソエチル) (ノニ  
 ル) アミノ) オクタノエートフェルトーブチル4ー(ノニルグリシル) ピペラジンー1ー  
 カルボキシレート、3ー( ( 2ー( 4ー(Nー( 2ー(ジノニルアミノ) エチル)ーNー  
 ノニルグリシル) ピペラジンーしーイル)ー2ーオキソエチル) (テトラデシル) アミノ 40  
 ) プロピル( Z)ーデスー3ーエノエート( Z)ーデスー3ーエンーしーオール、2ー( ( 2  
 ー(ジ ( ( Z)ーノンー3ーエンーしーイル) アミノ) エチル) ( ( Z)ーノンー3  
 ーエンーしーイル) アミノ)ーしー( 4ー(ジノニルグリシル) ピペラジンー1ーイル)  
 エタンー1ーオン( Z)ー1ープロモノンー4ーエン、3ー( ( 2ー( 4ー(Nー( 2  
 ー(ジノニルアミノ) エチル)ーNーノニルグリシル) ピペラジンーオキソエチル) (ドデ  
 シル) アミノ) プロピルオクタノエートトトーブチルドデシルグリシネート、Sーペンチ  
 ル4ー( ( 2ー( 4ー(Nー( 2ー(ジノニルアミノ) エチル)ーNーノニルグリシル)  
 ピペラジンーしーイル)ー2ーオキソエチル) (ノニル) アミノ) ブタンチオエート、3  
 ー( ( 2ー(しー(Nー( 2ー(ジノニルアミノ) エチル)ーNーノニルグリシル) ピペ  
 リジンー<sup>^</sup>イル) エチル) (ノニル) アミノ) プロピル3ーメチルヘキサノエートフェル 50

10

20

30

40

50

トープチル 4 - ( 2 - ( ( 3 - ( ( 3 - メチルヘキサノイル) オキシ) プロピル) (ノニ  
 ル) アミノ) エチル) ピペリジン - l - , 3 - ( ( 2 - ( l - ( N - ( 2 - ( ジノニルア  
 ミノ) エチル) - N - ノニルグリシル) ピペリジン - 4 - イル) エチル) (ノニル) アミ  
 ノ) - 2 - メチルプロピルヘキサノエート、 3 - ( ( 2 - ( 4 - ( N - ( 2 - ( ジノニルア  
 ミノ) エチル) - N - ノニルグリシル) ピペラジン - オキソエチル) (ノニル) アミノ  
 ) プロピル 3 - メチルヘキサノエート、 3 - ( ( 2 - ( 4 - ( N - ( 2 - ( ジノニルアミ  
 ノ) エチル) - N - ノニルグリシル) ピペラジン - オキソエチル) (ノニル) アミノ) -  
 2 - メチルプロピルヘキサノエート、メチル 8 - [ 2 - ( 9 - { [ 4 - ( ジメチルアミノ  
 ) ブタノイル] オキシ} ヘキサデシル) シクロプロピル] オクタノエート、メチル 8 - {  
 2 - [ 9 - ( ジメチルアミノ) ヘキサデシル] シクロプロピル} オクタノエート、 ( Z )  
 - ウンデス - 2 - エン - l - イル 6 - ( 2 - ( ジメチルアミノ) - 3 - (ヘキシロキシ  
 ) プロボキシ) ヘキサノエート、 ( 2 R , 1 2 Z , 1 5 Z ) - 1 - (デシルオキシ) - N  
 , N - ジメチルヘニコサ - l 2 , 1 5 - ジエン - 2 - アミン、 ( 1 7 Z , 2 0 Z ) - N ,  
 N - ジメチルヘキサコサ - 1 7 , 2 0 - ジエン - 7 - アミン、 2 - ( ( 2 - ( ジノニルア  
 ミノ) エチル) (ノニル) アミノ) エチル 1 - (ジノニルグリシル) ピペリジン - 4 - カ  
 ルボキシレート、 l - ( 2 - ( ジノニルアミノ) エチル) 4 - ( 2 - ( ( 2 - ( ジノニル  
 アミノ) エチル) (ノニル) アミノ) エチル) シクロヘキサン - 1 , 4 - ジカルボキシレ  
 ート 2 - (ジノニルアミノ) エタン - 1 - オール、メチル 1 2 - ( ( 2 - ( l - ( N - ( 2  
 - ( ジノニルアミノ) エチル) - N - ノニルグリシル) ピロリジン - 3 - イル) エチル  
 ) (テトラデシル) アミノ) ドデカノエートフェルト - ブチル 3 - ( 2 - ( ( 1 2 - メト  
 キシ - 1 2 - オキソドデシル) (テトラデシル) アミノ) エチル) ピロリジン - l - カル  
 ボキシレート、 3 - ( ( 2 - ( l - ( N - ( 2 - ( ジノニルアミノ) エチル) - N - ノニ  
 ルグリシル) ピロリジン - 3 - イル) エチル) (テトラデシル) アミノ) プロピルデカノ  
 エートテル / - ブチル 3 - ( 2 - ( ( 3 - (デカノイルオキシ) プロピル) (テトラデシ  
 ル) アミノ) エチル) ピロリジン - l - カルボキシレート、 “ヘブチル 6 - ( ( 2 - ( l  
 - ( N - ( 2 - ( ジノニルアミノ) エチル) - N - ノニルグリシル) ピロリジン - 3 - イ  
 ル) エチル) (テトラデシル) アミノ) ヘキサノエートト - ブチル 3 - ( 2 - ( ( 6 -  
 (ヘブチルオキシ) - 6 - オキソヘキシル) (テトラデシル) アミノ) エチル) ピロリジ  
 ン - 1 - カルボキシレート、 ”、ペンチル 8 - ( ( 2 - ( l - ( N - ( 2 - ( ジノニルア  
 ミノ) エチル) - N - ノニルグリシル) ピロリジン - 3 - イル) エチル) (テトラデシル  
 ) アミノ) オクタノエート / エル / - ブチル 3 - ( 2 - (テトラデシルアミノ) エチル)  
 ピロリジン - l - カルボキシレート、メチル 1 2 - ( ( 2 - ( l - ( N - ( 2 - ( ジノニ  
 ルアミノ) エチル) - N - ノニルグリシル) ピペリジン - 3 - イル) エチル) (テトラデ  
 シル) アミノ) ドデカノエート - ブチル 3 - ( 2 - ( ( 1 2 - メトキシ - 1 2 - オキソド  
 デシル) (テトラデシル) アミノ) エチル) ピペリジン - l - カルボキシレート、 3 - ( ( 2  
 - ( l - ( N - ( 2 - ( ジノニルアミノ) エチル) - N - ノニルグリシル) ピペリジ  
 ン - 3 - イル) エチル) (テトラデシル) アミノ) プロピルデカノエート、ヘブチル 6 -  
 ( ( 2 - ( l - ( N - ( 2 - ( ジノニルアミノ) エチル) - N - ノニルグリシル) ピペリ  
 ジン - 3 - イル) エチル) (テトラデシル) アミノ) ヘキサノエート、ペンチル 8 - ( ( 2  
 - ( l - ( N - ( 2 - ( ジノニルアミノ) エチル) - N - ノニルグリシル) ピペリジン  
 - 3 - イル) エチル) (テトラデシル) アミノ) オクタノエート、ペンチル 6 - ( ( 2 -  
 ( 4 - ( 2 - ( ( 2 - (ジドデシルアミノ) エチル) (ドデシル) アミノ) エチル) ピペ  
 ラジン - l - イル) エチル) (ドデシル) アミノ) ヘキサノエート工程 1 : ペンチル 6 -  
 プロモヘキサノエート、メチル 8 - [ 2 - ( 9 - { [ 4 - ( ジメチルアミノ) ブタノイル  
 ] オキシ} ヘブタデシル) シクロプロピル] オクタノエート、メチル 8 - { 2 - [ 9 - ( 2  
 ジメチルアミノ) ヘブタデシル] シクロプロピル} オクタノエート、 ( 2 S , 1 2 Z , 1  
 5 Z ) - N , N - ジメチル - 1 - (オクチルオキシ) ヘニコサ - 1 2 , 1 5 - ジエン - 2  
 - アミン、 ( 2 - オクチルシクロプロピル) メチル 6 - ( 2 - ( ジメチルアミノ) - 3 -  
 (オクチルオキシ) プロボキシ) ヘキサノエート、 ( 1 8 Z , 2 1 Z ) - N , N - ジメチ  
 ルヘブタコサ - 1 8 , 2 1 - ジエン - 8 - アミン、 t r a n s - 1 - メチル - 3 , 4 - ビ

10

20

30

40

50

ス ( ( ( Z ) - ヘキサデス - 9 - エノイルオキシ) メチル) ピロリジン、 ( Z ) - ノン -  
 2 - エン - 1 - イル 4 - ( ( 2 - ( 4 - ( N - ( 2 - ( ジノニルアミノ) エチル) - N -  
 ノニルグリシル) ピペラジン - 1 - イル) - 2 - オキソエチル) (テトラデシル) アミノ  
 ) ブタノエート、trans - 1 - メチル - 3, 4 - ビス ( ( ( 9 Z, 12 Z ) - オクタ  
 デカ - 9, 12 - ジエノイルオキシ) メチル) ピロリジン、メチル 12 - ( ( 2 - ( 4 -  
 ( N - ( 2 - ( ジノニルアミノ) エチル) - N - ノニルグリシル) ピペラジン - 1 - イル  
 ) - 2 - オキソエチル) (テトラデシル) アミノ) ドデカノエート、エチル ( 7 Z ) - 1  
 7 - [ 2 - ( ジメチルアミノ) エチル] ヘキサコス - 7 - エノエート、trans - 1 -  
 メチル - 3, 4 - ビス ( ( ( Z ) - オクタデカ - 9 - エノイルオキシ) メチル) ピロリジ  
 ン、メチル 6 - ( 2 - { } 11 - ^ 2 - ( ジメチルアミノ) エチル] イコシル} シクロプ  
 ロピル) ヘキサノエート、メチル 12 - ( ( 2 - ( 1 - ( N - ( 2 - ( ジノニルアミノ)  
 エチル) - N - ノニルグリシル) ピペリジン - 4 - イル) エチル) (テトラデシル) アミ  
 ノ) ドデカノエート、メチル 10 - ( 2 - V - ^ 2 - ( ジメチルアミノ) エチル] ヘキサ  
 デシル} シクロプロピル) デカノエート、メチル 8 - ( 2 - { 111 - ; 2 - ( ジメチル  
 アミノ) エチル] ヘプタデシル} シクロプロピル) オクタノエート、2 - ( 1 - ( N - ( 2 -  
 ( ジノニルアミノ) エチル) - N - ノニルグリシル) ピペリジン - 4 - イル) エチル  
 ジノニルグリシネートフェルト - ブチル 4 - ( 2 - ( ( ジノニルグリシル) オキシ) エチ  
 ル) ピペリジン - 1 - カルボキシレート、メチル 8 - ( 2 - { 111 - ; 2 - ( ジメチル  
 アミノ) エチル] オクタデシル} シクロプロピル) オクタノエート、メチル 8 - ( 2 - {  
 111 - " 2 - ( ジメチルアミノ) エチル] ノナデシル} シクロプロピル) オクタノエ  
 ート、1, - ( ピペラジン - 1, 4 - ジイル) ビス ( 2 - ( ジノニルアミノ) エタン - 1 -  
 オン)、メチル 8 - [ 2 - { } 11 - ^ 2 - ( ジメチルアミノ) エチル] イコシル} シク  
 ロプロピル) オクタノエート、メチル 8 - ( 2 - { 9 - [ 2 - ( ジメチルアミノ) エチル  
 ] ペンタデシル} シクロプロピル) オクタノエート、メチル ( 7 Z ) - 19 - { [ 4 - ( 30  
 ジメチルアミノ) ブタノイル] オキシ} オクタコス - 7 - エノエート、メチル ( 7 Z ) -  
 19 - ( ジメチルアミノ) オクタコス - 7 - エノエート、cis - 1 - メチル - 3 - [ ( 9 Z,  
 12 Z ) - オクタデカ - 9, 12 - ジエン - 1 - イルオキシ] - 4 - ( オクチルオ  
 キシ) ピロリジン、2 - ( ジドデシルアミノ) - 1 - ( 4 - ( N - ( 2 - ( ジドデシルア  
 ミノ) エチル) - N - ドデシルグリシル) ピペラジン - 1 - イル) エタン - 1 - オン、( Z ) -  
 ウンデス - 2 - エン - 1 - イル 6 - ( 2 - ( ジメチルアミノ) - 3 - ( オクチルオ  
 キシ) プロボキシ) ヘキサノエート、( 2 SN, N - ジメチル - 1 - [ ( 9 Z, 12 Z )  
 - オクタデカ - 9, 12 - ジエン - 1 - イルオキシ] デカン - 2 - アミン ( 化合物 11 )  
 、( 19 Z, 22 Z ) - N, N - ジメチルオクタコサ - 19, 22 - ジエン - 9 - アミ  
 ン、メチル 8 - ( 2 - { 9 - [ 2 - ( ジメチルアミノ) エチル] ヘキサデシル} シクロプ  
 ロピル) オクタノエート、5 - ( ( 2 - ( 4 - ( N - ( 2 - ( ジノニルアミノ) エチル)  
 - N - ノニルグリシル) ピペラジン - オキソエチル) (ノニル) アミノ) ペンチルメチル  
 カルボネート、メチル 8 - ( 2 - { 9 - [ 2 - ( ジメチルアミノ) エチル] ヘプタデシル  
 } シクロプロピル) オクタノエート、メチル ( 7 Z ) - 19 - [ 2 - ( ジメチルアミノ)  
 エチル] オクタコス - 7 - エノエート、( Z ) - ペント - 2 - エン - 1 - イル 4 - ( ( 2  
 - ( 4 - ( N - ( 2 - ( ジノニルアミノ) エチル) - N - ノニルグリシル) ピペラジン -  
 1 - イル) - 2 - オキソエチル) (ノニル) アミノ) ブタノエート、メチル ( 11 Z ) - 1  
 9 - [ 2 - ( ジメチルアミノ) エチル] オクタコス - 11 - エノエート、メチル ( 9 Z )  
 - 21 - [ 2 - ( ジメチルアミノ) エチル] ヘプタコス - 9 - エノエート、メチル ( 9 Z )  
 - 21 - [ 2 - ( ジメチルアミノ) エチル] オクタコス - 9 - エノエート、メチル ( 9  
 Z ) - 21 - [ 2 - ( ジメチルアミノ) エチル] ノナコス - 9 - エノエート、2 - ( 1 -  
 ( N - ( 2 - ( ジノニルアミノ) エチル) - N - ノニルグリシル) ピロリジン - 3 - イル  
 ) エチルジノニルグリシネート、メチル ( 9 Z ) - 21 - [ 2 - ( ジメチルアミノ) エチ  
 ル] トリアコント - 9 - エノエート、( 1 - ( N - ( 2 - ( ジノニルアミノ) エチル) -  
 N - ノニルグリシル) ピロリジン - 3 - イル) メチルジノニルグリシネート、メチル ( 9

10

20

30

40

50

Z) - 19 - [2 - (ジメチルアミノ) エチル] ペンタコス - 9 - エノエート、メチル (9 Z) - 19 - [2 - (ジメチルアミノ) エチル] ヘキサコス - 9 - エノエート、メチル 6 - (2 - (8 - (3 - (デシルオキシ) - 2 - (ジメチルアミノ) プロポキシ) オクチル) シクロプロピル) ヘキサノエート、メチル (1 l Z) - 19 - { [4 - (ジメチルアミノ) ブタノイル] オキシ } オクタコス - l 1 - エノエート、メチル (1 l Z) - 19 - (ジメチルアミノ) オクタコス - l 1 - エノエート、(2 S) - N, N - ジメチル - 1 - [ (9 Z, 12 Z) - オクタデカ - 9, 12 - ジエン - 1 - イルオキシ ] ドデカン - 2 - アミン、(14 Z, 17 Z) - N, N - ジメチルトリコサ - 14, 17 - ジエン - 4 - アミン、メチルジ ( (9 Z, 12 Z) - オクタデカ - 9, 12 - ジエニル ) アミン、メチル (9 Z) - 19 - { [4 - (ジメチルアミノ) ブタノイル] オキシ } オクタコス - 9 - エノエート、メチル (9 Z) - 19 - (ジメチルアミノ) オクタコス - 9 - エノエート、(Z) - メチル 17 - (2 - (ジメチルアミノ) - 3 - (オクチルオキシ) プロポキシ) ヘプタデス - 8 - エノエート、(3 R, 4 R) - 3, 4 - ビス ( (Z) - ヘキサデス - 9 - エニルオキシ ) - 1 - メチルピロリジン、(2 S) - N, N - ジメチル - 1 - [ (9 Z, 12 Z) - オクタデカ - 9, 12 - ジエン - 1 - イルオキシ ] ウンデカン - 2 - アミン、(20 Z, 23 Z) - ノナコサ - 20, 23 - ジエン - 10 - イル 4 - (ジメチルアミノ) ブタノエート、(20 Z, 23 Z) - N, N - ジメチルノナコサ - 20, 23 - ジエン - 10 - アミン、3 - ( (6 Z, 9 Z, 28 Z, 31 Z) - ヘプタトリアコンタ - 6, 9, 28, 31 - テトラエン - 19 - イルオキシ ) - N, N - ジメチルプロパン - l - アミン、3 - ( (6 Z, 9 Z, 28 Z, 31 Z) - ヘプタトリアコンタ - 6, 9, 28, 31 - テトラエン - 19 - イルオキシ ) - N, N - ジメチルプロパン - 1 - アミン、(6 Z, 9 Z, 28 Z, 31 Z) - 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、(6 Z, 16 Z) - 12 - ( (Z) - デス - 4 - エニル ) ドコサ - 6, 16 - ジエン - l 1 - イル 5 - (ジメチルアミノ) ペンタノエート、(6 Z, 16 Z) - 12 - ( (Z) - デス - 4 - エニル ) ドコサ - 6, 16 - ジエン - l 1 - イル 5 - (ジメチルアミノ) ペンタノアト、(6 Z, 16 Z) - 12 - ( (Z) - デス - 4 - エニル ) ドコサ - 6, 16 - ジエン - 11 - イル 5 - (ジメチルアミノ) ペンタノエート、l - アルギニン - アルファー (2, 3 - ジラウリルオキシ) プロピルアミド、l - リジン - アルファー (2, 3 - ジラウリルオキシ) プロピルアミド、2, 3 - ジオレイルオキシプロピルアミン、2, 3 - ジステアリルオキシプロピルアミン、2, 3 - ジラウリルオキシプロピルアミン、ジリノレイルメチル 4 - (ジメチルアミノ) プロピルエーテル、ジリノレイルメチル 4 - (ジメチルアミノ) ブチルエーテル、及び 2, 2 - ジリノレイル - 4 - (2 - ジメチルアミノエチル) - [ l, 3 ] - ジオキソランのうちの少なくとも 1 つから選択され得る。

10

20

30

40

50

#### 【0629】

いくつかの実施形態では、少なくとも 1 つの非カチオン性脂質は、少なくとも 1 つのリン脂質、少なくとも 1 つの融合性脂質、少なくとも 1 つのアニオン性脂質、少なくとも 1 つのヘルパー脂質、少なくとも 1 つの中性脂質、またはそれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、LNP は、少なくとも 1 つの非カチオン性脂質を本質的に欠き得る。いくつかの実施形態では、LNP は、少なくとも 1 つの非カチオン性脂質の量を含有しない場合がある。

#### 【0630】

いくつかの実施形態では、少なくとも 1 つの非カチオン性脂質は、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)、DS PC (1 つの尾部当たり 3 つの不飽和二重結合を有する) (18:3 PC)、アシルカルノシン (AC)、1 - ヘキサデシル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (C16 LysO PC)、N - オレオイル - SPM (C18:1)、N - リグノセリル SPM (C24:0)、N - ネルバシル C (C24:1)、カルバモイル] コレステロール (Cet-P)、コレステロールヘミスクシネート (CHEMS)、コレステロール (Chol)、コレステロールヘミドデカンジカルボン酸 (Chol-C12)、12 - コレステリル

オキシカルボニルアミノドデカン酸 (Chol-C13N)、コレステロールヘミオキサレート (Chol-C2)、コレステロールヘミマロネート (Chol-C3)、N-(コレステリル-オキシカルボニル)グリシン (Chol-C3N)、コレステロールヘミグルタレート (Chol-C5)、コレステロールヘミアジペート (Chol-C6)、コレステロールヘミピメレート (Chol-C7)、コレステロールヘミスベレート (Chol-C8)、カルジオリピド (CL)、l, 2-ビス(トリコサ-10, 12-ジイノイル)-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (DC8-9PC)、ジセチルホスフェート (DCP)、ジヘキサデシルホスフェート (DCP1)、1, 2-ジパルミトイルグリセロール-3-ヘミスクシネート (DG Succ)、短鎖ビス-n-ヘプタデカノイルホスファチジルコリン (DHP C)、ジヘキサデコイルホスホエタノールアミン (DHPE)、1, 2-ジリノレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (DLPC)、l, 2-ジラウロイル-sn-グリセロ-3-PE (DLPE)、ジミリストイルグリセロールヘミスクシネート (DMGS)、ジミリストイルホスファチジルコリン (DMPC)、ジミリストイルホスホエタノールアミン (DMPE)、ジミリストイルホスファチジルグリセロール (DMPG)、ジオレイルオキシベンジルアルコール (DOBA)、1, 2-ジオレオイルグリセリル-3-ヘミスクシネート (DOGHMS)、N-[2~(2-{2-[2-(2, 3-ビス-オクタデス-9-エニルオキシ-プロポキシ)-エトキシ]-エトキシ)-エチル]-3-(3, 4, 5-1リヒドロキシ-6-ヒドロキシメチル-1エトラヒドロ-ピラン-2-イルスルファニル)-プロピオンアミド (DOGP4αMan)、ジオレオイルホスファチジルコリン (DOPC)、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン (DOPE)、ジオレオイル-ホスファチジルエタノールアミン4-(N-マレイミドメチル)-シクロヘキサン-1-カルボキシレート (DOPE-mal)、ジオレオイルホスファチジルグリセロール (DOPG)、1, 2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-(ホスホ-ル-セリン) (DOPS)、アセル-融合性リン脂質 (DPHPE)、ジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC)、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン (DPPE)、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール (DPPG)、ジパルミトイルホスファチジルセリン (DPPS)、ジステアロイルホスファチジルコリン (DSPC)、ジステアロイル-ホスファチジル-エタノールアミン (DSPE)、ジステアロイルホスホエタノールアミンイミダゾール (DSPEI)、1, 2-ジウンデカノイル-sn-グリセロ-ホスホコリン (DUPC)、エッグホスファチジルコリン (EPC)、N-ヒスチジニルコレステロールカルバメート (HCChol)、ヒスタミンジステアロイルグリセロール (HDSG)、N-ヒスチジニルコレステロールヘミスクシネート (HistChol)、1, 2-ジパルミトイルグリセロール-ヘミスクシネート-Nα-ヒスチジニル-ヘミスクシネート (HistSuccDG)、N-(5'-ヒドロキシ-3'-オキシペンチル)-10-12-ペンタコサジイナミド (h-Peg-PCDA)、2-[1-ヘキシルオキシエチル]-2-デビニルピロフェオホルビド-a (HPPH)、水素化大豆ホスファチジルコリン (HSPC)、1, 2-ジパルミトイルグリセロール-Oα-ヒスチジニル-Nα-ヘミスクシネート (IsohistSuccDG)、マンノシアライズドジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン (ManDOG)、l, 2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[4-(p-マレイミドメチル)シクロヘキサン-カルボキサミド] (MCC-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 (ME 16.0 PE)、1-ミリストイル-2-ヒドロキシ-sn-グリセロ-ホスホコリン (MHP C)、チオール反応性マレイミド頭部基脂質、例えば、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-N-[4-(p-マレイミドフェニル)ブチラミド (MPB-PE)、ネルボン酸 (NA)、コール酸ナトリウム (NaChol)、l, 2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-[ホスホエタノールアミン-N-ドデカノイル (NC12-DOPE)、WO2008042973A2における合成例によって定義される (ND98)、「式1のN-グルタリルホスファチジルエタノールアミン(複

10

20

30

40

50

数可)」(NG-PE)、N-ヒドロキシスルホスクシンイミド(NHS-「x」)、「式1に包含されるN~(コ)-ジカルボン酸誘導体化ホスファチジルエタノールアミン」(NωPE-「x」)、オレイン酸(OA)、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)、ホスファチジン酸(PA)、ホスファチジルエタノールアミン脂質(PE)、ポリエチレングリコール(PEG)とコンジュゲートされたPE脂質のうちの少なくとも1つから選択され得るがこれらに限定されない。PEG-PEの1つの例は、ポリエチレングリコール-ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン脂質(PEG-PE)、ホスファチジルグリセロール(PG)、部分的水素化大豆ホスファチジルクロリン(PHSPC)、ホスファチジリンシトール脂質(PI)、ホスホチジリンシトール-4-ホスフェート(PIP)、  
10 パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン(POPC)、ホスファチジルエタノールアミン(POPE)、パルミトイルオレイオールホスファチジルグリセロール(POPG)、ホスファチジルセリン(PS)、リッサミンローダミンB-ホスファチジルエタノールアミン脂質(Rh-PE)、リン脂質の精製された大豆由来混合物(SIOO)、ホスファチジルコリン(SM)、18-1-トランスPE、1-ステアロイル-2-オレオイル-ホスファチジエタノールアミン(SOPE)、大豆ホスファチジルコリン(SPC)、スフィ  
ンゴミエリン(SPM)、アルファ・アルファ'-トラハロース6,6'-ジベヘネート(TDB)、1,2-ジエライドイル-sn-グリセロ-3-ホホエタノールアミン(トランスDOPE)、((23S,5R)-3-(ビス(ヘキサデシルオキシ)メトキシ)-  
20 5-(5-メチル-2,4-ジオキソ-3,4-ジヒドロピリミジン-1(2H)-イル)テトラヒドロフラン-2-イル)メチルメチルホスフェート、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-ホスホコリン、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-ジオレイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン、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、16-O-モノメチルPE、16-O-ジメチルPE、及びジオレイル  
30 ホスファチジルエタノールアミンであり得る。

#### 【0631】

いくつかの実施形態では、LNPは、イオン化可能な脂質または脂質様物質を含む。非限定的な例として、イオン化可能な脂質は、C12-200、CKK-E12、5A2-SC8、BAMEA-016B、または7C1であり得る。他のイオン化可能な脂質は、当該技術分野で知られており、本明細書において有用である。

#### 【0632】

いくつかの実施形態では、LNPは、リン脂質を含む。非限定的な例として、リン脂質(ヘルパー)は、DOPE、DSPC、DOTAP、またはDOTMAであり得る。

#### 【0633】

いくつかの実施形態では、LNPは、PEG誘導体を含む。非限定的な例として、PEG誘導体は、脂質固定であり得、例えば、PEGは、C14-PEG2000、C14-PEG1000、C14-PEG3000、C14-PEG5000、C12-PEG1000、C12-PEG2000、C12-PEG3000、C12-PEG5000、C16-PEG1000、C16-PEG2000、C16-PEG3000、C16-PEG5000、C18-PEG1000、C18-PEG2000、C18-PEG3000、またはC18-PEG5000である。

#### 【0634】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つのステロールは、少なくとも1つのコレステロールまたはコレステロール誘導体を含む。いくつかの実施形態では、LNPは、少なく

10

20

30

40

50

とも1つのステロールを本質的に欠き得る。いくつかの実施形態では、LNPは、少なくとも1つのステロールの量を含む場合がある。

【0635】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つの粒子活性修飾剤は、粒子の凝集を低減した少なくとも1つの成分、対象における循環からのLNPの消失を減少させる少なくとも1つの成分、少なくとも粘液層を横断するLNPの能力を増加させる成分、LNPの投与に対する対象の免疫反応を減少させる少なくとも1つの成分、LNPの膜流動性を修飾する少なくとも1つの成分、LNPの安定性に寄与する少なくとも1つの成分、またはそれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、LNPは、少なくとも1つの粒子活性修飾剤を本質的に欠き得る。いくつかの実施形態では、LNPは、少なくとも1つの粒子活性修飾剤の量を含む場合がある。

10

【0636】

いくつかの実施形態では、粒子活性修飾剤は、ポリマーを含み得る。いくつかの実施形態では、粒子活性修飾剤を含むポリマーは、少なくとも1つのポリエチレングリコール（PEG）、少なくとも1つのポリプロピレングリコール（PPG）、ポリ（2-オキサゾリン）（POZ）、少なくとも1つのポリアミド（ATTA）、少なくとも1つのカチオン性ポリマー、またはそれらの任意の組み合わせを含み得る。

【0637】

いくつかの実施形態では、ポリマー部位（例えば、PEG）の平均分子量は、500～20,000ダルトンであり得る。いくつかの実施形態では、ポリマーの分子量は、約500～20,000、1,000～20,000、1,500～20,000、2,000～20,000、2,500～20,000、3,000～20,000、3,500～20,000、4,000～20,000、4,500～20,000、5,000～20,000、5,500～20,000、6,000～20,000、6,500～20,000、7,000～20,000、7,500～20,000、8,000～20,000、8,500～20,000、9,000～20,000、9,500～20,000、10,000～20,000、10,500～20,000、11,000～20,000、11,500～20,000、12,000～20,000、12,500～20,000、13,000～20,000、13,500～20,000、14,000～20,000、14,500～20,000、15,000～20,000、15,500～20,000、16,000～20,000、16,500～20,000、17,000～20,000、17,500～20,000、18,000～20,000、18,500～20,000、19,000～20,000、19,500～20,000、500～19,500、1,000～19,500、1,500～19,500、2,000～19,500、2,500～19,500、3,000～19,500、3,500～19,500、4,000～19,500、4,500～19,500、5,000～19,500、5,500～19,500、6,000～19,500、6,500～19,500、7,000～19,500、7,500～19,500、8,000～19,500、8,500～19,500、9,000～19,500、9,500～19,500、10,000～19,500、10,500～19,500、11,000～19,500、11,500～19,500、12,000～19,500、12,500～19,500、13,000～19,500、13,500～19,500、14,000～19,500、14,500～19,500、15,000～19,500、15,500～19,500、16,000～19,500、16,500～19,500、17,000～19,500、17,500～19,500、18,000～19,500、18,500～19,500、19,000～19,500、1,500～19,000、2,000～19,000、2,500～19,000、3,000～19,000、3,500～19,000、4,000～19,000、4,500～19,000、5,000～19,000、5,500～19,000、6,000～19,000、6,500～19,000、7,000～19,000、7,500～19,

20

30

40

50



000、8、000~19、000、8、500~19、000、9、000~19、0  
00、9、500~19、000、10、000~19、000、10、500~19、  
000、11、000~19、000、11、500~19、000、12、000~1  
9、000、12、500~19、000、13、000~19、000、13、500  
~19、000、14、000~19、000、14、500~19、000、15、0  
00~19、000、15、500~19、000、16、000~19、000、16  
、500~19、000、17、000~19、000、17、500~19、000、  
18、000~19、000、18、500~19、000、1、500~18、500  
、2、000~18、500、2、500~18、500、3、000~18、500、  
3、500~18、500、4、000~18、500、4、500~18、500、5  
、000~18、500、5、500~18、500、6、000~18、500、6、  
500~18、500、7、000~18、500、7、500~18、500、8、0  
00~18、500、8、500~18、500、9、000~18、500、9、50  
0~18、500、10、000~18、500、10、500~18、500、11、  
000~18、500、11、500~18、500、12、000~18、500、1  
2、500~18、500、13、000~18、500、13、500~18、500  
、14、000~18、500、14、500~18、500、15、000~18、5  
00、15、500~18、500、16、000~18、500、16、500~18  
、500、17、000~18、500、17、500~18、500、18、000~  
18、500、1、500~18、000、2、000~18、000、2、500~1  
8、000、3、000~18、000、3、500~18、000、4、000~18  
、000、4、500~18、000、5、000~18、000、5、500~18、  
000、6、000~18、000、6、500~18、000、7、000~18、0  
00、7、500~18、000、8、000~18、000、8、500~18、00  
0、9、000~18、000、9、500~18、000、10、000~18、00  
0、10、500~18、000、11、000~18、000、11、500~18、  
000、12、000~18、000、12、500~18、000、13、000~1  
8、000、13、500~18、000、14、000~18、000、14、500  
~18、000、15、000~18、000、15、500~18、000、16、0  
00~18、000、16、500~18、000、17、000~18、000、17  
、500~18、000、1、500~17、500、2、000~17、500、2、  
500~17、500、3、000~17、500、3、500~17、500、4、0  
00~17、500、4、500~17、500、5、000~17、500、5、50  
0~17、500、6、000~17、500、6、500~17、500、7、000  
~17、500、7、500~17、500、8、000~17、500、8、500~  
17、500、9、000~17、500、9、500~17、500、10、000~  
17、500、10、500~17、500、11、000~17、500、11、50  
0~17、500、12、000~17、500、12、500~17、500、13、  
000~17、500、13、500~17、500、14、000~17、500、1  
4、500~17、500、15、000~17、500、15、500~17、500  
、16、000~17、500、16、500~17、500、17、000~17、5  
00、1、500~17、000、2、000~17、000、2、500~17、00  
0、3、000~17、000、3、500~17、000、4、000~17、000  
、4、500~17、000、5、000~17、000、5、500~17、000、  
6、000~17、000、6、500~17、000、7、000~17、000、7  
、500~17、000、8、000~17、000、8、500~17、000、9、  
000~17、000、9、500~17、000、10、000~17、000、10  
、500~17、000、11、000~17、000、11、500~17、000、  
12、000~17、000、12、500~17、000、13、000~17、00  
0、13、500~17、000、14、000~17、000、14、500~17、

10

20

30

40

50

0 0 0、1 5、0 0 0~1 7、0 0 0、1 5、5 0 0~1 7、0 0 0、1 6、0 0 0~1  
7、0 0 0、1 6、5 0 0~1 7、0 0 0、1、5 0 0~1 6、5 0 0、2、0 0 0~1  
6、5 0 0、2、5 0 0~1 6、5 0 0、3、0 0 0~1 6、5 0 0、3、5 0 0~1 6  
、5 0 0、4、0 0 0~1 6、5 0 0、4、5 0 0~1 6、5 0 0、5、0 0 0~1 6、  
5 0 0、5、5 0 0~1 6、5 0 0、6、0 0 0~1 6、5 0 0、6、5 0 0~1 6、5  
0 0、7、0 0 0~1 6、5 0 0、7、5 0 0~1 6、5 0 0、8、0 0 0~1 6、5 0  
0、8、5 0 0~1 6、5 0 0、9、0 0 0~1 6、5 0 0、9、5 0 0~1 6、5 0 0  
、1 0、0 0 0~1 6、5 0 0、1 0、5 0 0~1 6、5 0 0、1 1、0 0 0~1 6、5  
0 0、1 1、5 0 0~1 6、5 0 0、1 2、0 0 0~1 6、5 0 0、1 2、5 0 0~1 6  
、5 0 0、1 3、0 0 0~1 6、5 0 0、1 3、5 0 0~1 6、5 0 0、1 4、0 0 0~ 10  
1 6、5 0 0、1 4、5 0 0~1 6、5 0 0、1 5、0 0 0~1 6、5 0 0、1 5、5 0  
0~1 6、5 0 0、1 6、0 0 0~1 6、5 0 0、1、5 0 0~1 6、0 0 0、2、0 0  
0~1 6、0 0 0、2、5 0 0~1 6、0 0 0、3、0 0 0~1 6、0 0 0、3、5 0 0  
~1 6、0 0 0、4、0 0 0~1 6、0 0 0、4、5 0 0~1 6、0 0 0、5、0 0 0~  
1 6、0 0 0、5、5 0 0~1 6、0 0 0、6、0 0 0~1 6、0 0 0、6、5 0 0~1  
6、0 0 0、7、0 0 0~1 6、0 0 0、7、5 0 0~1 6、0 0 0、8、0 0 0~1 6  
、0 0 0、8、5 0 0~1 6、0 0 0、9、0 0 0~1 6、0 0 0、9、5 0 0~1 6、  
0 0 0、1 0、0 0 0~1 6、0 0 0、1 0、5 0 0~1 6、0 0 0、1 1、0 0 0~1  
6、0 0 0、1 1、5 0 0~1 6、0 0 0、1 2、0 0 0~1 6、0 0 0、1 2、5 0 0  
~1 6、0 0 0、1 3、0 0 0~1 6、0 0 0、1 3、5 0 0~1 6、0 0 0、1 4、0 20  
0 0~1 6、0 0 0、1 4、5 0 0~1 6、0 0 0、1 5、0 0 0~1 6、0 0 0、1 5  
、5 0 0~1 6、0 0 0、1、5 0 0~1 5、5 0 0、2、0 0 0~1 5、5 0 0、2、  
5 0 0~1 5、5 0 0、3、0 0 0~1 5、5 0 0、3、5 0 0~1 5、5 0 0、4、0  
0 0~1 5、5 0 0、4、5 0 0~1 5、5 0 0、5、0 0 0~1 5、5 0 0、5、5 0  
0~1 5、5 0 0、6、0 0 0~1 5、5 0 0、6、5 0 0~1 5、5 0 0、7、0 0 0  
~1 5、5 0 0、7、5 0 0~1 5、5 0 0、8、0 0 0~1 5、5 0 0、8、5 0 0~  
1 5、5 0 0、9、0 0 0~1 5、5 0 0、9、5 0 0~1 5、5 0 0、1 0、0 0 0~  
1 5、5 0 0、1 0、5 0 0~1 5、5 0 0、1 1、0 0 0~1 5、5 0 0、1 1、5 0  
0~1 5、5 0 0、1 2、0 0 0~1 5、5 0 0、1 2、5 0 0~1 5、5 0 0、1 3、  
0 0 0~1 5、5 0 0、1 3、5 0 0~1 5、5 0 0、1 4、0 0 0~1 5、5 0 0、1 30  
4、5 0 0~1 5、5 0 0、1 5、0 0 0~1 5、5 0 0、1、5 0 0~1 5、0 0 0、  
2、0 0 0~1 5、0 0 0、2、5 0 0~1 5、0 0 0、3、0 0 0~1 5、0 0 0、3  
、5 0 0~1 5、0 0 0、4、0 0 0~1 5、0 0 0、4、5 0 0~1 5、0 0 0、5、  
0 0 0~1 5、0 0 0、5、5 0 0~1 5、0 0 0、6、0 0 0~1 5、0 0 0、6、5  
0 0~1 5、0 0 0、7、0 0 0~1 5、0 0 0、7、5 0 0~1 5、0 0 0、8、0 0  
0~1 5、0 0 0、8、5 0 0~1 5、0 0 0、9、0 0 0~1 5、0 0 0、9、5 0 0  
~1 5、0 0 0、1 0、0 0 0~1 5、0 0 0、1 0、5 0 0~1 5、0 0 0、1 1、0  
0 0~1 5、0 0 0、1 1、5 0 0~1 5、0 0 0、1 2、0 0 0~1 5、0 0 0、1 2  
、5 0 0~1 5、0 0 0、1 3、0 0 0~1 5、0 0 0、1 3、5 0 0~1 5、0 0 0、  
1 4、0 0 0~1 5、0 0 0、1 4、5 0 0~1 5、0 0 0、1、5 0 0~1 4、5 0 0 40  
、2、0 0 0~1 4、5 0 0、2、5 0 0~1 4、5 0 0、3、0 0 0~1 4、5 0 0、  
3、5 0 0~1 4、5 0 0、4、0 0 0~1 4、5 0 0、4、5 0 0~1 4、5 0 0、5  
、0 0 0~1 4、5 0 0、5、5 0 0~1 4、5 0 0、6、0 0 0~1 4、5 0 0、6、  
5 0 0~1 4、5 0 0、7、0 0 0~1 4、5 0 0、7、5 0 0~1 4、5 0 0、8、0  
0 0~1 4、5 0 0、8、5 0 0~1 4、5 0 0、9、0 0 0~1 4、5 0 0、9、5 0  
0~1 4、5 0 0、1 0、0 0 0~1 4、5 0 0、1 0、5 0 0~1 4、5 0 0、1 1、  
0  
0 0~1 4、5 0 0、1 1、5 0 0~1 4、5 0 0、1 2、0 0 0~1 4、5 0 0、1 2  
、5 0 0~1 4、5 0 0、1 3、0 0 0~1 4、5 0 0、1 3、5 0 0~1 4、5 0 0、  
1 4、0 0 0~1 4、5 0 0、1、5 0 0~1 4、0 0 0、2、0 0 0~1 4、0 0 0、 50

50

10  
20  
30  
40  
50

00、2、500～3、500、3、000～3、500、1、500～3、000、2、000～3、000、2、500～3、000、1、500～2、500、2、000～2、500、及び1、500～2、000ダルトンであり得る。

#### 【0638】

いくつかの実施形態では、ポリマー（例えば、PEG）は、少なくとも1つの脂質にコンジュゲートされている。いくつかの実施形態では、ポリマーにコンジュゲートされた脂質は、少なくとも1つの中性脂質、少なくとも1つのリン脂質、少なくとも1つのアニオン性脂質、少なくとも1つのカチオン性脂質、少なくとも1つのコレステロール、少なくとも1つのコレステロール誘導体、またはそれらの任意の組み合わせを含む。

#### 【0639】

いくつかの実施形態では、ポリマーにコンジュゲートされた脂質は、先に列挙されたカチオン性、非カチオン性、またはステロール脂質のうちの少なくとも1つから選択され得るがこれらに限定されない。

#### 【0640】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つのPEG-脂質コンジュゲートは、Singlec-1L-PEG-DSPE、R)-2,3-ビス(オクタデシルオキシ)プロピル-1-(メトキシポリ(エチレングリコール)2000)プロピルカルバメート、PEG-S-DSG、PEG-S-DMG、PEG-PE、PEG-PAA、PEG-OH DSPE C18、PEG-DSPE、PEG-DSG、PEG-DPG、PEG-DOMG、PEG-DMPE Na、PEG-DMPE、PEG-DMG2000、PEG-DMG C14、PEG-DMG 2000、PEG-DMG、PEG-DMA、PEG-セラミドC16、PEG-C-DOMG、PEG-c-DMOG、PEG-c-DMA、PEG-cDMA、PEGA、PEG750-C-DMA、PEG400、PEG2k-DMG、PEG2k-C11、PEG2000-PE、PEG2000P、PEG2000-DSPE、PEG2000-DOMG、PEG2000-DMG、PEG2000-C-DMA、PEG2000、PEG200、PEG(2k)-DMG、PEG DSPE C18、PEG DMPE C14、PEG DLPE C12、PEG Click DMG C14、PEGクリックC12、PEGクリックC10、N(カルボニル-メトキシポリエチレングリコール-2000)-l,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、Myrj52、mPEG-PLA、MPEG-DSPE、mPEG3000-DMPE、MPEG-2000-DSPE、MPEG2000-DSPE、mPEG2000-DPPE、mPEG2000-DMPE、mPEG2000-DMG、mDPPE-PEG2000、l,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-PEG2000、HPEG-2K-LIPD、葉酸PEG-DSPE、DSPE-PEGMA 500、DSPE-PEGMA、DSPE-PEG6000、DSPE-PEG5000、DSPE-PEG2K-NAG、DSPE-PEG2k、DSPE-PEG2000マレイミド、DSPE-PEG2000、DSPE-PEG、DSG-PEGMA、DSG-PEG5000、DPPE-PEG-2K、DPPE-PEG、DPPE-mPEG2000、DPPE-mPEG、DPG-PEGMA、DOPE-PEG2000、DMPE-PEGMA、DMPE-PEG2000、DMPE-Peg、DMPE-mPEG2000、DMG-PEGMA、DMG-PEG2000、DMG-PEG、ジステアロイル-グリセロール-ポリエチレングリコール、C18PEG750、C18PEG5000、C18PEG3000、C18PEG2000、C16PEG2000、C14PEG2000、C18-PEG5000、C18PEG、C16PEG、C16 mPEG(ポリエチレングリコール)2000セラミド、C14-PEG-DSPE2000、C14-PEG2000、C14PEG2000、C14-PEG2000、C14-PEG、C14PEG、14:0-PEG2KPE、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-PEG2000、(R)-2,3-ビス(オクタデシルオキシ)プロピル-1-(メトキシポリ(エチレングリコール)2000)プロピルカルバメート、(PEG)-C-DOMG、PEG-C-D

10

20

30

40

50

MA、及びDSPC-PEG-Xのうちの少なくとも1つから選択され得るがこれらに限定されない。

【0641】

いくつかの実施形態では、LNPは、本開示の脂質、ジステアロイルホスファチジルコリン(DSPC)、コレステロール、及び1,2-ジミリストイル-rac-グリセロ-3-メトキシポリエチレングリコール-2000(DMG-PEG2000)を含む。

【0642】

いくつかの実施形態では、LNPは、本開示の脂質、ジステアロイルホスファチジルコリン(DSPC)、コレステロール、及び1,2-ジミリストイル-rac-グリセロ-3-メトキシポリエチレングリコール-2000(DMG-PEG2000)を約48.5:10:40:1.5のモル比でそれぞれ含む。

【0643】

いくつかの実施形態では、LNPは、本開示の脂質、ジステアロイルホスファチジルコリン(DSPC)、コレステロール、及び1,2-ジミリストイル-rac-グリセロ-3-メトキシポリエチレングリコール-2000(DMG-PEG2000)を約48.5:10:39:2.5のモル比でそれぞれ含む。

【0644】

LNP成分の量及び比は、所望の形態、構造、機能、カーゴ、標的、またはそれらの任意の組み合わせに依存して任意の量によって様々であり得る。各成分の量は、様々な実施形態では、示された成分によって占められるすべての脂質または脂質コンジュゲート成分の総モル質量のパーセント(mol%)として表され得る。各成分の量は、様々な実施形態では、モル質量に基づく各成分の相対比(モル比)として表され得る。各成分の量は、様々な実施形態では、構築前のLNPを製剤化するために使用される各成分の重量(mgまたは当量)として表され得る。各成分の量は、様々な実施形態では、当該技術分野で知られている任意の他の方法によって表され得る。成分量の1つの表記(「単位」)で与えられる任意の製剤は、成分量の異なる単位で表される任意の製剤を包含することを明示的に意味し、それらの表記は、同じ単位に変換された場合に効果的に同等である。いくつかの実施形態では、「有効に同等」は、互いに約10%以内の2つ以上の値を意味する。

【0645】

いくつかの実施形態では、LNPは、少なくとも1つのカチオン性脂質を約0.1~100mol%の量で含む。いくつかの実施形態では、LNPは、少なくとも1つのカチオン性脂質を約20~60mol%の量で含む。いくつかの実施形態では、LNPは、少なくとも1つのカチオン性脂質を約50~85mol%の量で含む。いくつかの実施形態では、LNPは、少なくとも1つのカチオン性脂質を約20mol%未満の量で含む。いくつかの実施形態では、LNPは、少なくとも1つのカチオン性脂質を約60mol%または約85mol%を超える量で含む。いくつかの実施形態では、LNPは、少なくとも1つのカチオン性脂質を約95mol%以下の量で含む。いくつかの実施形態では、LNPは、カチオン性脂質を約95、90、85、80、75、70、65、60、55、50、45、40、35、30、25、20、15、10、及び5mol%以下の量で含む。いくつかの実施形態では、LNPは、少なくとも1つのカチオン性脂質を約5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、及び95mol%以上の量で含む。いくつかの実施形態では、LNPは、少なくとも1つのカチオン性脂質を約20~30mol%、20~35mol%、20~40mol%、20~45mol%、20~50mol%、20~55mol%、20~60mol%、20~65mol%、20~70mol%、20~75mol%、20~80mol%、20~85mol%、20~90mol%、25~35mol%、25~40mol%、25~45mol%、25~50mol%、25~55mol%、25~60mol%、25~65mol%、25~70mol%、25~75mol%、25~80mol%、25~85mol%、25~90mol%、30~40mol%、30~45mol%、30~50mol%、30~55mol%、30~60mol%、30~

65mol%、30~70mol%、30~75mol%、30~80mol%、30~85mol%、30~90mol%、35~40mol%、35~45mol%、35~50mol%、35~55mol%、35~60mol%、35~65mol%、35~70mol%、35~75mol%、35~80mol%、35~85mol%、35~90mol%、40~45mol%、40~50mol%、40~55mol%、40~60mol%、40~65mol%、40~70mol%、40~75mol%、40~80mol%、40~85mol%、40~90mol%、45~55mol%、45~60mol%、45~65mol%、45~70mol%、45~75mol%、45~80mol%、45~85mol%、45~90mol%、50~60mol%、50~65mol%、50~70mol%、50~75mol%、50~80mol%、50~85mol%、50~90mol%、55~65mol%、55~70mol%、55~75mol%、55~80mol%、55~85mol%、55~90mol%、60~70mol%、60~75mol%、60~80mol%、60~85mol%、60~90mol%、65~75mol%、65~80mol%、65~85mol%、65~90mol%、70~80mol%、70~85mol%、70~90mol%、75~85mol%、75~90mol%、80~90mol%または85~95mol%の量で含む。

#### 【0646】

いくつかの実施形態では、LNPは、少なくとも1つの非カチオン性脂質を約0.1~100mol%の量で含む。いくつかの実施形態では、LNPは、少なくとも1つの非カチオン性脂質を約5~35mol%の量で含む。いくつかの実施形態では、LNPは、少なくとも1つのカチオン性脂質を約5~25mol%の量で含む。いくつかの実施形態では、LNPは、少なくとも1つの非カチオン性脂質を約5mol%未満の量で含む。いくつかの実施形態では、LNPは、少なくとも1つの非カチオン性脂質を約25mol%または約35mol%を超える量で含む。いくつかの実施形態では、LNPは、少なくとも1つの非カチオン性脂質を約95mol%以下の量で含む。いくつかの実施形態では、LNPは、少なくとも1つの非カチオン性脂質を約95、90、85、80、75、70、65、60、55、50、45、40、35、30、25、20、15、10、及び5mol%以下の量で含む。いくつかの実施形態では、LNPは、少なくとも1つの非カチオン性脂質を約5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、及び95mol%以上の量で含む。いくつかの実施形態では、LNPは、少なくとも1つの非カチオン性脂質を約5~15mol%、5~25mol%、5~35mol%、5~45mol%、5~55mol%、10~20mol%、10~30mol%、10~40mol%、10~50mol%、15~25mol%、15~35mol%、15~45mol%、20~30mol%、20~40mol%、20~50mol%、25~35mol%、25~45mol%、30~40mol%、30~50mol%、及び35~45mol%の量で含む。

#### 【0647】

いくつかの実施形態では、LNPは、少なくとも1つのステロールを約0.1~100mol%の量で含む。いくつかの実施形態では、LNPは、少なくとも1つのステロールを約20~45mol%の量で含む。いくつかの実施形態では、LNPは、少なくとも1つのステロールを約25~55mol%の量で含む。いくつかの実施形態では、LNPは、少なくとも1つのステロールを約20mol%未満の量で含む。いくつかの実施形態では、LNPは、少なくとも1つのステロールを約45mol%または約55mol%を超える量で含む。いくつかの実施形態では、LNPは、少なくとも1つのステロールを約95mol%以下の量で含む。いくつかの実施形態では、LNPは、少なくとも1つのステロールを約95、90、85、80、75、70、65、60、55、50、45、40、35、30、25、20、15、10、及び5mol%以下の量で含む。いくつかの実施形態では、LNPは、少なくとも1つのステロールを約5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、及

び95mol%以上の量で含む。いくつかの実施形態では、LNPは、少なくとも1つのステロールを約10~20mol%、10~30mol%、10~40mol%、10~50mol%、10~60mol%、15~25mol%、15~35mol%、15~45mol%、15~55mol%、15~65mol%、20~30mol%、20~40mol%、20~50mol%、20~60mol%、25~35mol%、25~45mol%、25~55mol%、25~65mol%、30~40mol%、30~50mol%、30~60mol%、35~45mol%、35~55mol%、35~65mol%、40~50mol%、40~60mol%、45~55mol%、45~65mol%、50~60mol%、及び55~65mol%の量で含む。

【0648】

いくつかの実施形態では、LNPは、少なくとも1つの粒子活性修飾剤を約0.1~100mol%の量で含む。いくつかの実施形態では、LNPは、少なくとも1つの粒子活性修飾剤を約0.5~15mol%の量で含む。いくつかの実施形態では、LNPは、少なくとも1つの粒子活性修飾剤を約15~40mol%の量で含む。いくつかの実施形態では、LNPは、少なくとも1つの粒子活性修飾剤を約0.1mol%未満の量で含む。いくつかの実施形態では、LNPは、少なくとも1つの粒子活性修飾剤を約15mol%または約40mol%を超える量で含む。いくつかの実施形態では、LNPは、少なくとも1つの粒子活性修飾剤を約95mol%以下の量で含む。いくつかの実施形態では、LNPは、少なくとも1つの粒子活性修飾剤を約95、90、85、80、75、70、65、60、55、50、45、40、35、30、25、20、15、10、及び5mol%以下の量で含む。いくつかの実施形態では、LNPは、少なくとも1つの粒子活性修飾剤を約5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、及び95mol%以上の量で含む。いくつかの実施形態では、LNPは、少なくとも1つの粒子活性修飾剤を約0.1~1mol%、0.1~2mol%、0.1~3mol%、0.1~4mol%、0.1~5mol%、0.1~6mol%、0.1~7mol%、0.1~8mol%、0.1~9mol%、0.1~10mol%、0.1~15mol%、0.1~20mol%、0.1~25mol%、1~2mol%、1~3mol%、1~4mol%、1~5mol%、1~6mol%、1~7mol%、1~8mol%、1~9mol%、1~10mol%、1~15mol%、1~20mol%、1~25mol%、2~3mol%、2~4mol%、2~5mol%、2~6mol%、2~7mol%、2~8mol%、2~9mol%、2~10mol%、2~15mol%、2~25mol%、3~4mol%、3~5mol%、3~6mol%、3~7mol%、3~8mol%、3~9mol%、3~10mol%、3~15mol%、3~20mol%、3~25mol%、4~5mol%、4~6mol%、4~7mol%、4~8mol%、4~9mol%、4~10mol%、4~15mol%、4~20mol%、4~25mol%、5~10mol%、5~15mol%、5~20mol%、5~25mol%、10~15mol%、10~20mol%、10~25mol%、15~20mol%、15~25mol%、及び20~25mol%の量で含む。

【0649】

いくつかの実施形態では、LNPは、約30~60mol%の少なくとも1つのカチオン性脂質、約0~30mol%の少なくとも1つの非カチオン性脂質（例えば、リン脂質）、約18.5~48.5mol%の少なくとも1つのステロール（例えば、コレステロール）、及び約0~10mol%の少なくとも1つの粒子活性修飾剤（例えば、PEG化脂質）を含む。

【0650】

いくつかの実施形態では、LNPは、約35~55mol%の少なくとも1つのカチオン性脂質、約5~25mol%の少なくとも1つの非カチオン性脂質（例えば、リン脂質）、約30~40mol%の少なくとも1つのステロール（例えば、コレステロール）、及び約0~10mol%の少なくとも1つの粒子活性修飾剤（例えば、PEG化脂質）を



含む。

【0651】

いくつかの実施形態では、LNPは、約35～45mol%の少なくとも1つのカチオン性脂質、約25～35mol%の少なくとも1つの非カチオン性脂質（例えば、リン脂質）、約20～30mol%の少なくとも1つのステロール（例えば、コレステロール）、及び約0～10mol%の少なくとも1つの粒子活性修飾剤（例えば、PEG化脂質）を含む。

【0652】

いくつかの実施形態では、LNPは、約45～65mol%の少なくとも1つのカチオン性脂質、約5～10mol%の少なくとも1つの非カチオン性脂質（例えば、リン脂質）、約25～40mol%の少なくとも1つのステロール（例えば、コレステロール）、及び約0.5～10mol%の少なくとも1つの粒子活性修飾剤（例えば、PEG化脂質）を含む。

10

【0653】

いくつかの実施形態では、LNPは、約40～60mol%の少なくとも1つのカチオン性脂質、約5～15mol%の少なくとも1つの非カチオン性脂質（例えば、リン脂質）、約35～45mol%の少なくとも1つのステロール（例えば、コレステロール）、及び約0.5～3mol%の少なくとも1つの粒子活性修飾剤（例えば、PEG化脂質）を含む。

【0654】

いくつかの実施形態では、LNPは、約30～60mol%の少なくとも1つのカチオン性脂質、約0～30mol%の少なくとも1つの非カチオン性脂質（例えば、リン脂質）、約15～50mol%の少なくとも1つのステロール（例えば、コレステロール）、及び約0.01～10mol%の少なくとも1つの粒子活性修飾剤（例えば、PEG化脂質）を含む。

20

【0655】

いくつかの実施形態では、LNPは、約10～75mol%の少なくとも1つのカチオン性脂質、約0.5～50mol%の少なくとも1つの非カチオン性脂質（例えば、リン脂質）、約5～60mol%の少なくとも1つのステロール（例えば、コレステロール）、及び約0.1～20mol%の少なくとも1つの粒子活性修飾剤（例えば、PEG化脂質）を含む。

30

【0656】

いくつかの実施形態では、LNPは、約50～65mol%の少なくとも1つのカチオン性脂質、約3～15mol%の少なくとも1つの非カチオン性脂質（例えば、リン脂質）、約30～40mol%の少なくとも1つのステロール（例えば、コレステロール）、及び約0.5～2mol%の少なくとも1つの粒子活性修飾剤（例えば、PEG化脂質）を含む。

【0657】

いくつかの実施形態では、LNPは、約50～85mol%の少なくとも1つのカチオン性脂質、約3～15mol%の少なくとも1つの非カチオン性脂質（例えば、リン脂質）、約30～40mol%の少なくとも1つのステロール（例えば、コレステロール）、及び約0.5～2mol%の少なくとも1つの粒子活性修飾剤（例えば、PEG化脂質）を含む。

40

【0658】

いくつかの実施形態では、LNPは、約25～75mol%の少なくとも1つのカチオン性脂質、約0.1～15mol%の少なくとも1つの非カチオン性脂質（例えば、リン脂質）、約5～50mol%の少なくとも1つのステロール（例えば、コレステロール）、及び約0.5～20mol%の少なくとも1つの粒子活性修飾剤（例えば、PEG化脂質）を含む。

【0659】

50

いくつかの実施形態では、LNPは、約50～65mol%の少なくとも1つのカチオン性脂質、約5～10mol%の少なくとも1つの非カチオン性脂質（例えば、リン脂質）、約25～35mol%の少なくとも1つのステロール（例えば、コレステロール）、及び約5～10mol%の少なくとも1つの粒子活性修飾剤（例えば、PEG化脂質）を含む。

【0660】

いくつかの実施形態では、LNPは、約20～60mol%の少なくとも1つのカチオン性脂質、約5～25mol%の少なくとも1つの非カチオン性脂質（例えば、リン脂質）、約25～55mol%の少なくとも1つのステロール（例えば、コレステロール）、及び約0.5～15mol%の少なくとも1つの粒子活性修飾剤（例えば、PEG化脂質）を含む。

10

【0661】

いくつかの実施形態では、LNPは、それらの形状によって特性化され得る。いくつかの実施形態では、LNPは、本質的に球状である。いくつかの実施形態では、LNPは、本質的に棒形状（すなわち、シリンダー状）である。いくつかの実施形態では、LNPは、本質的にディスク形状である。

【0662】

いくつかの実施形態では、LNPは、それらのサイズによって特性化され得る。いくつかの実施形態では、LNPのサイズは、単にその直径として本明細書において言及される、その最も大きな環状断面の直径として定義され得る。いくつかの実施形態では、LNPは、30nm～約150nmの直径を有し得る。いくつかの実施形態では、LNPは、40～150nm、50～150nm、60～150nm、約70～150nm、または80～150nm、90～150nm、100～nm、110～150nm、120～150nm、130～150nm、140～150nm、30～30～140mol%、40～140mol%、50～140mol%、60～140mol%、70～140mol%、80～140mol%、90～140mol%、100～140mol%、110～140mol%、120～140mol%、130～140mol%、140～140mol%、30～140mol%、40～130mol%、50～130mol%、60～130mol%、70～130mol%、80～130mol%、90～130mol%、100～130mol%、110～130mol%、120～130mol%、30～120mol%、40～120mol%、50～120mol%、60～120mol%、70～120mol%、80～120mol%、90～120mol%、100～120mol%、110～120mol%、30～110mol%、40～110mol%、50～110mol%、60～110mol%、70～110mol%、80～110mol%、90～110mol%、100～110mol%、30～100mol%、40～100mol%、50～100mol%、60～100mol%、70～100mol%、80～100mol%、90～100mol%、30～90mol%、40～90mol%、50～90mol%、60～90mol%、70～90mol%、80～90mol%、30～80mol%、40～80mol%、50～80mol%、60～80mol%、70～80mol%、30～70mol%、40～70mol%、50～70mol%、60～70mol%、30～60mol%、40～60mol%、50～60mol%、30～50mol%、40～50mol%、及び30～40mol%の範囲の直径を有し得る。

20

30

40

【0663】

いくつかの実施形態では、LNPの集団、例えば、同じ製剤に起因するものは、集団における粒子のサイズ、形状、または質量の均一性を測定することによって特性化され得る。均一性は、いくつかの実施形態では、集団の多分散指数（PI）として表され得る。いくつかの実施形態では、均一性は、いくつかの実施形態では、集団の差違（D）として表され得る。用語「多分散指数」及び「差違」は、同等であることが本明細書で理解され、互換的に使用され得る。いくつかの実施形態では、所与の製剤に起因するLNPの集団は

50

、約 0.1～1 の P I を有する。いくつかの実施形態では、所与の製剤に起因する L N P の集団は、約 1 未満、約 0.5 未満、約 0.4 未満、約 0.3 未満、約 0.2 未満、約 0.1 未満の P I を有する。いくつかの実施形態では、所与の製剤に起因する L N P の集団は、約 0.1～1、0.1～0.8、0.1～0.6、0.1～0.4、0.1～0.2、0.2～1、0.2～0.8、0.2～0.6、0.2～0.4、0.4～1、0.4～0.8、0.4～0.6、0.6～1、0.6～0.8、及び 0.8～1 の P I を有する。

#### 【0664】

いくつかの実施形態では、L N P は、本開示のオリジネーターコンストラクト及びベンチマークコンストラクト等のカーゴを十分にまたは部分的に封入し得る。いくつかの実施形態では、最終製剤に存在するカーゴの本質的に 0 % は、L N P の外側の環境に露出している（すなわち、カーゴは、完全に封入されている。いくつかの実施形態では、カーゴは、L N P に関連付けられているが、L N P の外側の環境に少なくとも部分的に露出している。いくつかの実施形態では、L N P は、L N P の外側の環境に露出していないカーゴの %、例えば、封入効率によって特性化され得る。明確性のため、約 100 % の封入効率は、カーゴの本質的にすべてが L N P によって十分に封入されている L N P 製剤を指すのに対し、約 0 % の封入率は、カーゴが L N P の外部表面に結合している L N P のように、カーゴの実質的にいずれもが L N P に封入されていない L N P を指す。いくつかの実施形態では、L N P は、約 100 % 未満、約 95 % 未満、約 85 % 未満、約 80 % 未満、約 75 % 未満、約 70 % 未満、約 65 % 未満、約 60 % 未満、約 55 % 未満、約 50 % 未満、約 45 % 未満、約 40 % 未満、約 35 % 未満、約 30 % 未満、約 25 % 未満、約 20 % 未満、約 15 % 未満、約 10 % 未満、または 5 % 未満の封入効率を有し得る。いくつかの実施形態では、L N P は、約 90～100 %、80～100 %、70～100 %、60～100 %、50～100 %、40～100 %、30～100 %、20～100 %、10～100 %、80～90 %、70～90 %、60～90 %、50～90 %、40～90 %、30～90 %、20～90 %、10～90 %、70～80 %、60～80 %、50～80 %、40～80 %、30～80 %、20～80 %、10～80 %、60～70 %、50～70 %、40～70 %、30～70 %、20～70 %、10～70 %、40～50 %、30～50 %、20～50 %、10～50 %、30～40 %、20～40 %、10～40 %、20～30 %、10～30 %、及び 10～20 % の封入効率を有し得る。

#### 【0665】

いくつかの実施形態では、L N P には、図 5 に示されているように少なくとも 1 つの識別子部位が含まれ得る。識別子部位の非限定的な例には、グリカン、抗体、ペプチド、小分子、及びそれらの任意の組み合わせが含まれる。いくつかの実施形態では、少なくとも 1 つの標的化剤は、脂質ベースのナノ粒子の脂質膜に組み込まれ得る。いくつかの実施形態では、少なくとも 1 つの標的化剤は、ナノ粒子の外部表面に提示され得る。いくつかの実施形態では、少なくとも 1 つの標的化剤は、ナノ粒子の脂質成分にコンジュゲートされ得る。いくつかの実施形態では、少なくとも 1 つの標的化剤は、ナノ粒子のポリマー成分にコンジュゲートされ得る。いくつかの実施形態では、少なくとも 1 つの標的化剤は、少なくとも 1 つの標的化剤、ナノ粒子膜、及びナノ粒子の内側または外側の水性環境間で疎水性及び親水性相互作用を介してナノ粒子に固定され得る。いくつかの実施形態では、少なくとも 1 つの標的化剤は、ナノ粒子膜のペプチド／タンパク質成分にコンジュゲートされる。いくつかの実施形態では、少なくとも 1 つの標的化剤は、ナノ粒子膜の成分にコンジュゲートされた好適なリンカー部位にコンジュゲートされる。いくつかの実施形態では、力及び結合の任意の組み合わせは、ナノ粒子に関連付けられている標的化剤をもたらし得る。

#### 【0666】

本明細書に記載の L N P は、当該技術分野で知られている技術を使用して形成され得る。非限定的な例として、脂質を含有する有機溶液が、マイクロ流体チャネルにおいてオリジネーターコンストラクトまたはベンチマークコンストラクトを含有する酸性水溶液と一

緒に混合され、標的化システム（送達ビヒクル及びベンチマークコンストラクト）の形成をもたらす。

【0667】

いくつかの実施形態では、各LNP製剤には、独自に識別可能なヌクレオチド識別子配列（例えば、バーコード）を有するベンチマークコンストラクトが含まれる。独自の識別子配列は、所望の結果を生み出す特定のLNPを識別する能力を提供する。LNP製剤はまた、LNPを生成するために使用されるLNP形成組成物が異なり得る。例えば、LNP形成組成物は、イオン化可能な脂質のモル量及び／または構造、ヘルパー脂質のモル量及び／または構造、PEGのモル量／または構造、及び／またはコレステロールのモル量が様々であり得る。追加的に、または代替的に、LNP製剤は、生物学的に活性な分子のためのコード配列が異なるベンチマークコンストラクトを含み得る。追加的に、または代替的に、LNP製剤は、核酸配列になされた修飾が異なるベンチマークコンストラクトを含み得る。

10

【0668】

いくつかの実施形態では、脂質組成物は、製剤における成分脂質のそれぞれのモル比に従って記載される。非限定的な例として、イオン化可能な脂質のmol%は、約10mol%～約80mol%であり得る。非限定的な例として、イオン化可能な脂質のmol%は、約20mol%～約70mol%であり得る。非限定的な例として、イオン化可能な脂質のmol%は、約30mol%～約60mol%であり得る。非限定的な例として、イオン化可能な脂質のmol%は、約35mol%～約55mol%であり得る。非限定的な例として、イオン化可能な脂質のmol%は、約40mol%～約50mol%であり得る。非限定的な例として、トランスファービヒクルバッチのイオン化可能な脂質mol%は、標的mol%の±30%、±25%、±20%、±15%、±10%、±5%、または±2.5%となる。いくつかの実施形態では、ロット間のトランスファービヒクル変動は、15%未満、10%未満または5%未満となる。

20

【0669】

いくつかの実施形態では、ヘルパー脂質のmol%は、約1mol%～約50mol%であり得る。いくつかの実施形態では、ヘルパー脂質のmol%は、約2mol%～約45mol%であり得る。いくつかの実施形態では、ヘルパー脂質のmol%は、約3mol%～約40mol%であり得る。いくつかの実施形態では、ヘルパー脂質のmol%は、約4mol%～約35mol%であり得る。いくつかの実施形態では、ヘルパー脂質のmol%は、約5mol%～約30mol%であり得る。いくつかの実施形態では、ヘルパー脂質のmol%は、約10mol%～約20mol%であり得る。いくつかの実施形態では、トランスファービヒクルバッチのヘルパー脂質mol%は、標的mol%の±30%、±25%、±20%、±15%、±10%、±5%、または±2.5%となる。

30

【0670】

いくつかの実施形態では、構造脂質のmol%は、約10mol%～約80mol%であり得る。いくつかの実施形態では、構造脂質のmol%は、約20mol%～約70mol%であり得る。いくつかの実施形態では、構造脂質のmol%は、約30mol%～約60mol%であり得る。いくつかの実施形態では、構造脂質のmol%は、約35mol%～約55mol%であり得る。いくつかの実施形態では、構造脂質のmol%は、約40mol%～約50mol%であり得る。いくつかの実施形態では、トランスファービヒクルバッチの構造脂質mol%は、標的mol%の±30%、±25%、±20%、±15%、±10%、±5%、または±2.5%である。

40

【0671】

いくつかの実施形態では、PEG修飾脂質のmol%は、約0.1mol%～約10mol%であり得る。いくつかの実施形態では、PEG修飾脂質のmol%は、約0.2mol%～約5mol%であり得る。いくつかの実施形態では、PEG修飾脂質のmol%は、約0.5mol%～約3mol%であり得る。いくつかの実施形態では、PEG修飾脂質のmol%は、約1mol%～約2mol%であり得る。いくつかの実施形態では、

50

P E G 修飾脂質の m o l % は、約 1 . 5 m o l % であり得る。いくつかの実施形態では、トランスファービヒクルバッチの P E G 修飾脂質 m o l % は、標的 m o l % の  $\pm 30\%$ 、 $\pm 25\%$ 、 $\pm 20\%$ 、 $\pm 15\%$ 、 $\pm 10\%$ 、 $\pm 5\%$ 、または  $\pm 2.5\%$  となる。

【0672】

いくつかの実施形態では、送達ビヒクルは、W O 2 0 2 1 1 1 3 7 7 7（その内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載の脂質ナノ粒子のいずれかであり得る。

【0673】

いくつかの実施形態では、送達ビヒクルは、W O 2 0 2 1 1 1 3 7 7 7（その内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる）におけるイオン化可能な脂質（例えば、アミン脂質）、P E G 脂質、非カチオン性（ヘルパー）脂質、または構造脂質のいずれかを含む脂質ナノ粒子である。

【0674】

いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子製剤は、国際公開番号 W O 2 0 1 1 1 2 7 2 5 5 または W O 2 0 0 8 1 0 3 2 7 6（これらの各々の内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載の方法によって調製され得る。いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子製剤は、国際公開番号 W O 2 0 1 9 1 3 1 7 7 0（その内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているとおりであり得る。

【0675】

いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子製剤は、国際公開番号 W O 2 0 2 0 2 3 7 2 2 7（これらの各々の内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載の方法によって調製され得る。いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子製剤は、国際公開番号 W O 2 0 2 0 2 3 7 2 2 7（その内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているとおりであり得る。

【0676】

非脂質ナノ粒子

いくつかの実施形態では、ナノ粒子は、非脂質ベースのナノ粒子である。非脂質ベースのナノ粒子には、ケイ素ベースのナノ粒子（すなわち、多孔性ケイ素ナノ粒子）、金ナノ粒子、ポリペプチドベースのナノ粒子、ヌクレオチドベースのナノ粒子、及び炭素ベースのナノ粒子が含まれるがこれらに限定されない。

【0677】

エクソソーム

いくつかの実施形態では、送達ビヒクルは、少なくとも1つのエクソソームを含む。本明細書で使用される場合、「エクソソーム」は、エンドサイトーシス起源を有する小さな膜結合ベシクルを指す。理論に縛られることを望むものではなく、エクソソームは通常、細胞膜への多小胞体の融合後に宿主／前駆細胞から細胞外環境に放出される。このように、エクソソームは、設計された成分及びカーゴに加えて、前駆膜の成分を含む傾向がある。エクソソーム膜は通常、層状であり、水性のナノ粒子間空間を有する脂質の二重層から構成される。

【0678】

いくつかの実施形態では、エクソソームには、図5に示されているように少なくとも1つの識別子部位が含まれ得る。識別子部位の非限定的な例には、グリカン、抗体、ペプチド、小分子、及びそれらの任意の組み合わせが含まれる。

【0679】

リボソーム

いくつかの実施形態では、送達ビヒクルは、少なくとも1つのリボソームを含む。本明細書で使用される場合、「リボソーム」は、通常は祖先／宿主細胞に由来しない水性内部ナノ粒子空間を取り囲む少なくとも1つの脂質二重層膜を含む小さなベシクルである。リボソームは、狭い水性空間によって分離された一連の同心二重層を含む潜在的に直径が数百ナノメートルの（大型）多層状ベシクル（MLV）、潜在的に直径が50nmよりも小

10

20

30

40

50

さな小型単細胞ベシクル（SUV）、潜在的に直径が50～500nmの大型単層状ベシクル（LUV）であり得る。いくつかの実施形態では、リポソームは、主にそれらの製造方法が異なる、脂質ナノ粒子と同じ成分及び同じ成分量のあらゆるものを含み得る。

#### 【0680】

##### ミセル

いくつかの実施形態では、送達ビヒクルは、少なくとも1つのミセルを含む。本明細書で使用される場合、「ミセル」は、水性粒子内空間を有する小さな粒子を指す。理論に縛られることを望むものではなく、ミセルの内部粒子空間は、任意の追加の脂質－頭部基ではなく、ミセル膜及び可能性のある関連するカーゴを含む脂質の疎水性テールによって占有される。いくつかの実施形態では、ミセルは、主にそれらの製造方法が異なる、脂質ナノ粒子と同じ成分のあらゆるものを含み得る。

10

#### 【0681】

いくつかの実施形態では、ミセルには、図5に示されているように少なくとも1つの識別子部位が含まれ得る。識別子部位の非限定的な例には、グリカン、抗体、ペプチド、小分子、及びそれらの任意の組み合わせが含まれる。

#### 【0682】

##### ウイルス粒子

いくつかの実施形態では、送達ビヒクルは、少なくとも1つのウイルス様粒子を含む。本明細書で使用される場合、「ウイルス様粒子」は、主にカーゴ部位がロードされ得るウイルスに由来するタンパク質カプシド、シース、シェル、またはコート（すべてが本明細書で互換的に使用される）のベシクルを指す。通常、ウイルス様粒子は、非感染性であり、ウイルスカプシドタンパク質配列を発現するように細胞機構を使用して合成され得、これは次いで自己構築し、関連付けられたカーゴ部位を組み込むが、発現関連細胞機構を伴わずにカプシド及びカーゴ成分を提供し、それらが自己構築することを可能とすることによってウイルス様粒子を形成することが可能である。

20

#### 【0683】

いくつかの実施形態では、ウイルス様粒子は、限定されないが、Parvoviridae、Retroviridae、Flaviviridae、Paramyxoviridae、及びバクテリオファージ等のウイルスの種の少なくとも1つに由来し得る。いくつかの実施形態では、ウイルス様粒子は、アデノ随伴ウイルス、HIV、C型肝炎ウイルス、HPV、またはそれらの任意の組み合わせに由来し得る。

30

#### 【0684】

いくつかの実施形態では、ウイルス様粒子は、AAV粒子であり、AAV粒子には、図5に示されているように少なくとも1つの識別子部位が含まれ得る。識別子部位の非限定的な例には、グリカン、抗体、ペプチド、小分子、及びそれらの任意の組み合わせが含まれる。

#### 【0685】

##### ポリマー送達技術

いくつかの実施形態では、送達ビヒクルは、少なくとも1つのポリマー送達剤を含み得る。本明細書で使用される場合、「ポリマー送達剤」は、様々な結合基を介してカーゴ部位にコンジュゲートされた可溶性ポリマーを含む非凝集送達剤を指す。いくつかの実施形態では、ポリマー送達剤は、本明細書に記載のポリマーのいずれかを含み得る。

40

#### 【0686】

##### トラッキングシステム

本明細書に開示される指向性発見プラットフォームは、投与後に送達ビヒクル及び／またはベンチマークコンストラクト、カーゴ及びペイロードの定量を可能とするために、識別子配列及び部位（「バーコード」とも称される）を含む多様なトラッキングシステムを利用し得る。

#### 【0687】

いくつかの実施形態では、トラッキングシステムは、単一の識別子配列または部位であ

50

る。識別子配列または部位は、送達ビヒクル、ベンチマークコンストラクト、カーゴもしくはペイロード領域、5'UTR、3'UTR、プロモーター領域またはテール領域に位置し得る。非限定的な例として、識別子配列または部位は、送達ビヒクル内または上に位置し得る。非限定的な例として、識別子配列または部位は、ベンチマークコンストラクト内または上に位置し得る。非限定的な例として、識別子配列または部位は、5'UTR内または上に位置し得る。非限定的な例として、識別子配列または部位は、3'UTR内または上に位置し得る。非限定的な例として、識別子配列または部位は、プロモーター領域内または上に位置し得る。非限定的な例として、識別子配列または部位は、ペイロード領域内または上に位置し得る。非限定的な例として、識別子配列または部位は、テール領域内または上に位置し得る。

10

**【0688】**

いくつかの実施形態では、トラッキングシステムは、送達ビヒクルのための第1の識別子配列または部位及びベンチマークコンストラクト、カーゴ及びペイロードのための第2の識別子配列または部位を有する識別子配列または部位のセットである。第1及び第2の識別子配列または部位は、同じまたは異なり得る。追加のベンチマークコンストラクト、カーゴ及びペイロードが送達ビヒクルに存在する場合、そのときは各ベンチマークコンストラクト、カーゴ及びペイロードは、それ自体の識別子配列または部位を有し得、またはそれは、第2の識別子配列または部位と同じであり得る。

**【0689】**

いくつかの実施形態では、指向性発見プラットフォームは、複数のトラッキングシステムを含み、各トラッキングシステムは、異なる分解レベルで送達ビヒクル及び／またはベンチマークコンストラクト、カーゴ及びペイロードを検出することを可能とする。

20

**【0690】**

いくつかの実施形態では、トラッキングシステムは、少なくとも1つのバーコード配列を含む。本明細書で使用される場合、「バーコード」または「バーコード配列」は、当該技術分野で知られている方法を使用して検出され得る任意の配列であり、細胞、組織、器官及び／または生物における配列または投与されている任意の配列とは区別される。バーコード配列は、送達ビヒクル及び／またはベンチマークコンストラクト、カーゴ及びペイロードに含まれ、または結合され得る。非限定的な例として、送達ビヒクルは、バーコード配列を含む。非限定的な例として、カーゴまたはペイロードは、バーコード配列を含む。非限定的な例として、ベンチマークコンストラクトは、バーコード配列を含む。

30

**【0691】**

いくつかの実施形態では、標的化システムにおける識別子配列または部位の位置は、ランダムである。非限定的な例として、識別子配列または部位は、送達ビヒクルにある。非限定的な例として、識別子配列または部位は、送達ビヒクルにある。非限定的な例として、識別子配列または部位は、ベンチマークコンストラクトにある。非限定的な例として、識別子配列または部位は、カーゴまたはペイロードにある。非限定的な例として、識別子配列または部位は、送達ビヒクル及びベンチマークコンストラクトにある。非限定的な例として、識別子配列または部位は、送達ビヒクル及びカーゴまたはペイロードにある。非限定的な例として、識別子配列または部位は、ベンチマークコンストラクト及びカーゴまたはペイロードにある。非限定的な例として、識別子配列または部位は、送達ビヒクル、ベンチマークコンストラクト、及びカーゴまたはペイロードにある。

40

**【0692】**

いくつかの実施形態では、標的化システムにおける識別子配列または部位の位置は、事前決定される。非限定的な例として、識別子配列または部位は、送達ビヒクルにある。非限定的な例として、識別子配列または部位は、送達ビヒクルにある。非限定的な例として、識別子配列または部位は、ベンチマークコンストラクトにある。非限定的な例として、識別子配列または部位は、カーゴまたはペイロードにある。非限定的な例として、識別子配列または部位は、送達ビヒクル及びベンチマークコンストラクトにある。非限定的な例として、識別子配列または部位は、送達ビヒクル及びカーゴまたはペイロードにある。非

50

限定的な例として、識別子配列または部位は、ベンチマークコンストラクト及びカーゴまたはペイロードにある。非限定的な例として、識別子配列または部位は、送達ビヒクル、ベンチマークコンストラクト、及びカーゴまたはペイロードにある。

【0693】

いくつかの実施形態では、標的化システムにおける識別子配列または部位の位置は、逆になっている。非限定的な例として、識別子配列または部位は、送達ビヒクルにある。非限定的な例として、識別子配列または部位は、送達ビヒクルにある。非限定的な例として、識別子配列または部位は、ベンチマークコンストラクトにある。非限定的な例として、識別子配列または部位は、カーゴまたはペイロードにある。非限定的な例として、識別子配列または部位は、送達ビヒクル及びベンチマークコンストラクトにある。非限定的な例として、識別子配列または部位は、送達ビヒクル及びカーゴまたはペイロードにある。非限定的な例として、識別子配列または部位は、ベンチマークコンストラクト及びカーゴまたはペイロードにある。非限定的な例として、識別子配列または部位は、送達ビヒクル、ベンチマークコンストラクト、及びカーゴまたはペイロードにある。

10

【0694】

いくつかの実施形態では、識別子配列は、ディープシーケンシング中に複製を回避するように機能するランダムに生成された配列である。いくつかの実施形態では、識別子配列は、ヌクレオチドまたはアミノ酸の繰り返し配列である。いくつかの実施形態では、識別子配列は、限定されないが、カーゴまたはペイロード等のより大きな配列の断片である。識別子配列は、合成技術を使用して利用可能な任意の長さに設計され得る（Clement et al., AmpUMI: design and analysis of unique molecular identifiers for deep amplicon sequencing, Bioinformatics, Volume 34, Issue 13, 01 July 2018, Pages i202-i210（その内容は、本明細書その全体が参照により本明細書に組み込まれる）を参照されたい）。

20

【0695】

いくつかの実施形態では、識別子配列は、2～1000ヌクレオチドの長さを有する。例えば、識別子配列は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、1000ヌクレオチドまたは1000ヌクレオチド超の長さを有し得る。識別子配列は、2～5、2～10、2～15、2～20、2～30、2～50、2～70、2～90、2～100、2～250、2～300、2～350、2～400、2～450、2～500、2～550、2～600、2～650、2～700、2～750、2～800、2～850、2～900、2～950、2～1000、5～10、5～15、5～20、5～30、5～50、5～70、5～90、5～100、5～250、5～300、5～350、5～400、5～450、5～500、5～550、5～600、5～650、5～700、5～750、5～800、5～850、5～900、5～950、5～1000、10～30、10～50、10～70、10～90、10～100、10～250、10～300、10～350、10～400、10～450、10～500、10～550、10～600、10～650、10～700、10～750、10～800、10～850、10～900、10～950、10～1000、20

30

40

50



~ 30、20~50、20~70、20~90、20~100、20~250、20~300、20~350、20~400、20~450、20~500、20~550、20~600、20~650、20~700、20~750、20~800、20~850、20~900、20~950、20~1000、30~50、30~70、30~90、30~100、30~250、30~300、30~350、30~400、30~450、30~500、30~550、30~600、30~650、30~700、30~750、30~800、30~850、30~900、30~950、30~1000、40~50、40~70、40~90、40~100、40~250、40~300、40~350、40~400、40~450、40~500、40~550、40~600、40~650、40~700、40~750、40~800、40~850、40~900、40~950、40~1000、50~70、50~90、50~100、50~250、50~300、50~350、50~400、50~450、50~500、50~550、50~600、50~650、50~700、50~750、50~800、50~850、50~900、50~950、50~1000、60~70、60~90、60~100、60~250、60~300、60~350、60~400、60~450、60~500、60~550、60~600、60~650、60~700、60~750、60~800、60~850、60~900、60~950、60~1000、70~90、70~100、70~250、70~300、70~350、70~400、70~450、70~500、70~550、70~600、70~650、70~700、70~750、70~800、70~850、70~900、70~950、70~1000、80~90、80~100、80~250、80~300、80~350、80~400、80~450、80~500、80~550、80~600、80~650、80~700、80~750、80~800、80~850、80~900、80~950、80~1000、90~100、90~250、90~300、90~350、90~400、90~450、90~500、90~550、90~600、90~650、90~700、90~750、90~800、90~850、90~900、90~950、90~1000、100~250、100~300、100~350、100~400、100~450、100~500、100~550、100~600、100~650、100~700、100~750、100~800、100~850、100~900、100~950、100~1000、150~250、150~300、150~350、150~400、150~450、150~500、150~550、150~600、150~650、150~700、150~750、150~800、150~850、150~900、150~950、150~1000、200~250、200~300、200~350、200~400、200~450、200~500、200~550、200~600、200~650、200~700、200~750、200~800、200~850、200~900、200~950、200~1000、250~300、250~350、250~400、250~450、250~500、250~550、250~600、250~650、250~700、250~750、250~800、250~850、250~900、250~950、250~1000、300~350、300~400、300~450、300~500、300~550、300~600、300~650、300~700、300~750、300~800、300~850、300~900、300~950、300~1000、350~400、350~450、350~500、350~550、350~600、350~650、350~700、350~750、350~800、350~850、350~900、350~950、350~1000、400~450、400~500、400~550、400~600、400~650、400~700、400~750、400~800、400~850、400~900、400~950、400~1000、450~500、450~550、450~600、450~650、450~700、450~750、450~800、450~850、450~900、450~950、450~1000、500~550、500~600、500~650、500~700、500

0～750、500～800、500～850、500～900、500～950、500～1000、550～600、550～650、550～700、550～750、550～800、550～850、550～900、550～950、550～1000、600～650、600～700、600～750、600～800、600～850、600～900、600～950、600～1000、650～700、650～750、650～800、650～850、650～900、650～950、650～1000、700～750、700～800、700～850、700～900、700～950、700～1000、750～800、750～850、750～900、750～950、750～1000、800～850、800～900、800～950、800～1000、850～900、850～950、850～1000、900～950、900～1000、950～1000または1000を超えるヌクレオチドの長さを有し得る。

10

## 【0696】

いくつかの実施形態では、識別子配列または部位は、投与の直後に検出可能であるシグナルを生成し得る。いくつかの実施形態では、識別子配列または部位は、投与の後の不定量の時間、検出可能であるシグナルを生成し得る。いくつかの実施形態では、識別子配列または部位は、投与後1日、2日、3日、4日、5日、6日または7日を超える間、検出可能であるシグナルを生成し得る。いくつかの実施形態では、識別子配列または部位は、約1～24時間、検出可能であるシグナルを生成し得る。非限定的な例として、シグナルは、約1～6、1～12、1～18、6～12、6～18、6～24、または18～24時間、または1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、または24時間、検出可能であり得る。いくつかの実施形態では、識別子配列または部位は、約1～60分、例えば、限定されないが、1～5、1～10、1～20、1～30、1～40、1～50、10～20、10～30、10～40、10～50、10～60、20～30、20～40、20～50、20～60、30～40、30～50、30～60、40～50、40～60、または50～60分、または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または60分の間、検出可能であるシグナルを生成し得る。いくつかの実施形態では、識別子配列または部位は、投与後1分未満の間、検出可能であるシグナルを生成し得る。

20

30

## 【0697】

いくつかの実施形態では、識別子配列または部位は、対象の身体外から検出可能であるシグナルを生成し得る。いくつかの実施形態では、識別子配列または部位は、非侵襲的画像技術を介して、例えば、対象の器官または組織の外側であるが、対象の身体内で検出可能なシグナルを生成し得る。いくつかの実施形態では、識別子配列または部位は、巨視的レベルで検出可能であるシグナルを生成し得る。いくつかの実施形態では、識別子配列または部位は、顕微鏡的レベルで検出可能であるシグナルを生成し得る。いくつかの実施形態では、識別子配列または部位は、ナノスケールレベルで検出可能であるシグナルを生成し得る。いくつかの実施形態では、識別子配列または部位は、標的細胞が採取され、非限定的な例として、質量分析計、電気泳動、フローサイトメトリー、またはディープシーケンシングを介して、アッセイされた後にのみ検出可能であるシグナルを生成し得る。

40

## 【0698】

いくつかの実施形態では、送達ビヒクルは、識別子部位を含み、または識別子部位に機能可能に連結される。

## 【0699】

いくつかの実施形態では、送達ビヒクルは、免疫細胞抗原に結合する識別子部位を含み、またはそれに機能可能に連結される。非限定的な例として、免疫細胞抗原は、T細胞抗

50

原、例えば、CD 2、CD 3、CD 5、CD 7、CD 8、CD 4、ベータ7インテグリン、ベータ2インテグリン、及びC1qであり得る。非限定的な例として、免疫細胞抗原は、NK細胞、NKT細胞、マクロファージまたは好中球であり得る。非限定的な例として、免疫細胞抗原は、マクロファージ抗原、例えば、マンノース受容体、CD 206及びC1qであり得る。

【0700】

いくつかの実施形態では、送達ビヒクルは、免疫細胞上の外酵素に結合する小分子である識別子部位を含み、またはそれに機能可能に連結される。外酵素は、CD 38、CD 73、アデノシン2a受容体及びアデノシン2b受容体であり得るがこれらに限定されない。

10

【0701】

いくつかの実施形態では、送達ビヒクルは、小分子、例えば、限定されないが、マンノース、レクチン、アシピシン、ビオチン、またはジゴキシゲニンである識別子部位を含み、またはそれに機能可能に連結される。

【0702】

いくつかの実施形態では、送達ビヒクルは、一本鎖Fv (scFv) 断片、ナノボディ、ペプチド、ペプチドベースのマクロサイクル、ミニボディ、小分子リガンド (例えば、葉酸、アルギニルグリシルアスパラギン酸 (RGD)、またはフェノール可溶性モジュリンアルファ1ペプチド (PSMA1))、重鎖可変領域、軽鎖可変領域またはその断片である識別子部位を含み、またはそれに機能可能に連結される。

20

【0703】

トラッキングシステム：蛍光

いくつかの実施形態では、少なくとも1つのトラッキングシステムは、蛍光によって検出可能な識別子配列または部位を含む。

【0704】

いくつかの実施形態では、蛍光は、送達ビヒクルにおける少なくとも1つの蛍光色素の包含を介して達成される。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの蛍光色素は、フルオレセイン、TAMRA (カルボキシテトラメチルローダミン)、Cy色素、テキサスレッド、HEX、JOE、オレゴングリーン、ローダミン6G、クマリン、ピレン、及びDiOC6 (3, 3'-ジヘキシルオキサカルボシアニンヨウ化物) から選択され得るがこれらに限定されない。

30

【0705】

いくつかの実施形態では、蛍光は、送達ビヒクル内の、またはそれに関連付けられた少なくとも1つの蛍光タンパク質の包含を介して達成される。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの蛍光タンパク質は、ベンチマークコンストラクトにおいてコードされ、またはベンチマークコンストラクトは、蛍光タンパク質を含む。蛍光タンパク質の非限定的な例には、緑色蛍光タンパク質 (GFP)、黄色蛍光タンパク質 (YFP)、赤色蛍光タンパク質 (RFP)、Sirius、励起可能な青色蛍光タンパク質 (EBFP2)、シアン蛍光タンパク質 (CFP)、Cerulean、励起可能な緑色蛍光タンパク質 (EGFP)、励起可能な黄色蛍光タンパク質 (EYFP)、mOrange、mCherry、mPlum、NIR、iRFP、EosFP、PamCherry、Dronpa、Dreiklang、asFP595、mMaple、mGeo、mEos2、Dendra2、psCFP2、及び2, 3, 5, 6-テトラカルバゾール-4-シアノーピリジン (CPy) が含まれる。

40

【0706】

いくつかの実施形態では、蛍光は、送達ビヒクルまたはベンチマークコンストラクトに関連付けられた少なくとも1つの蛍光ナノ粒子の包含を介して達成される。いくつかの実施形態では、蛍光ナノ粒子は、炭素ドット、グラフェン量子ドット、金ナノロッド、ポリマーベースのナノ粒子、凝集誘起発光ドット、コンジュゲートされたポリマーナノ粒子 (CPドット)、金ナノスフィア、金ナノシェル、金ナノケージ、及びAIEフェロモン

50

であり得るがこれらに限定されない。

【0707】

いくつかの実施形態では、蛍光は、送達ビヒクルに関連付けられたまたはそれに含まれる少なくとも1つの蛍光脂質の包含を介して達成される。いくつかの実施形態では、蛍光脂質は、DiR、DiD、DiO、及びDiI、リン脂質のDiシリーズの他のメンバー、Bodipy、及びFL-スフィンゴミエリンであり得るがこれらに限定されない。

【0708】

いくつかの実施形態では、蛍光は、送達ビヒクル内の、またはそれに関連付けられた少なくとも1つのルシフェラーゼの包含を介して達成される。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのルシフェラーゼタンパク質は、ベンチマークコンストラクトにおいてコードされ、またはベンチマークコンストラクトは、ルシフェラーゼを含む。使用され得るルシフェラーゼのタイプの非限定的な例には、ウミシイタケルシフェラーゼ、ガウシアルルシフェラーゼ、NanoLucルシフェラーゼ、ホタルルシフェラーゼ、及びコメツキムルシフェラーゼが含まれる。

【0709】

いくつかの実施形態では、蛍光は、送達ビヒクルに関連付けられたまたはそれに含まれるβ-ガラクトシダーゼ (β-gal) の包含を介して達成される。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのβ-ガラクトシダーゼ (β-gal) タンパク質は、ベンチマークコンストラクトにおいてコードされ、またはベンチマークコンストラクトは、β-ガラクトシダーゼ (β-gal) を含む。

【0710】

いくつかの実施形態では、蛍光は、送達ビヒクルに関連付けられたまたはそれに含まれる少なくとも1つのクエンチャー分子の包含を介して達成される。いくつかの実施形態では、蛍光は、ベンチマークコンストラクトに関連付けられたまたはそれによってコードされる少なくとも1つのクエンチャー分子の包含を介して達成される。クエンチャー分子の非限定的な例には、ジメチルアミノフェニルアゾ安息香酸 (DABCYL)、QSY7、Cu (II) イオン、Dabcyl、QSY35、BHQ-0、Eclipse、BHQ-1、QSY9、BHQ-2、ElleQuencher、Iowa Black、QSY21、及びBHQ-3が含まれる。

【0711】

トラッキングシステム：フルオロフォア及び放射性ホスフェート

いくつかの実施形態では、少なくとも1つのトラッキングシステムは、フルオロフォアまたは放射性ホスフェートである識別子配列または部位を含む。

【0712】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つのトラッキングシステムは、送達ビヒクルに関連付けられたまたはそれに含まれる少なくとも1つのフルオロフォアの包含を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのトラッキングシステムは、ベンチマークコンストラクトに関連付けられた、それにコードされるまたはそれに含まれる少なくとも1つのフルオロフォアの包含を含む。フルオロフォアの非限定的な例には、量子ドット及び有機小分子が含まれる。

【0713】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つのトラッキングシステムは、送達ビヒクルに関連付けられたまたはそれに含まれる少なくとも1つの量子ドットの包含を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのトラッキングシステムは、ベンチマークコンストラクトに関連付けられた、それにコードされるまたはそれに含まれる少なくとも1つの量子ドットの包含を含む。量子ドットの非限定的な例には、CdSe/ZnS、CdTe/ZnS、CdTe/CdSe、CdSe/ZnTe、CdSe/CdTe/ZnSe、nAs/ZnSe、InAs/CdSe、InAs/InP、Cu:InP/ZnSe、InAs<sub>x</sub>P<sub>1-x</sub>/InP/ZnSe、CdS/CdSe、ZnSe/CdSe、ZnSe/InP/ZnS、ZnSe/InP/ZnS、CdTe/ZnSe、QD585、及び

10

20

30

40

50

Q D 6 5 5 が含まれる。

【 0 7 1 4 】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つのトラッキングシステムは、送達ビヒクルに関連付けられたまたはそれに含まれる少なくとも1つの有機小分子の包含を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのトラッキングシステムは、ベンチマークコンストラクトに関連付けられた、それにコードされるまたはそれに含まれる少なくとも1つの有機小分子の包含を含む。有機小分子の非限定的な例には、クマリン、ナフタルイミド、フルオレセイン及びローダミン誘導体、BODIPY、シアニン、キサンテン、オキサジン、オリゴチオフェン、及びフタロシアニン誘導体 (P c D e r) のクラスが含まれる。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの有機小分子は、7-ジアルキル-アミノ-4-トリフルオロメチルクマリン、ローダミンB、クマリン314、ルシファーイエローCH、フルオレセイン、ローダミン123、BODIPY FL NHSエステル、Cy5、ローダミン6G、ケイ素-ローダミン (S i R)、Cy3、Cy5.5、Cy7、Cy2、ATTO655、ATTO680、ATTO700、ニトロベンゾキサジアゾール (N B D)、1,6-ジフェニル-1,3,5-ヘキサトリエン (D P H)、A B B E R I O R (商標)、A L E X A F L U O R (商標)、A T T O (商標)、D Y L I G H T F L U O R (商標)、A L E X A F L U O R 647 (商標)、及びT O P F L U O R (商標) から選択され得るがこれらに限定されない。

10

【 0 7 1 5 】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つのトラッキングシステムは、送達ビヒクルに関連付けられたまたはそれに含まれる少なくとも1つの画像化造影剤の包含を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのトラッキングシステムは、ベンチマークコンストラクトに関連付けられた、それにコードされるまたはそれに含まれる少なくとも1つの画像化造影剤の包含を含む。画像化造影剤の非限定的な例には、ガドリニウムベースの小分子、ガドリニウム封入リボソーム、マンガンベースの小分子、及び酸化鉄ナノ粒子が含まれる。

20

【 0 7 1 6 】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つのトラッキングシステムは、送達ビヒクルに関連付けられたまたはそれに含まれる少なくとも1つの放射性標識の包含を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのトラッキングシステムは、ベンチマークコンストラクトに関連付けられた、それにコードされるまたはそれに含まれる少なくとも1つの放射性標識の包含を含む。放射性標識の非限定的な例には、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{13}\text{N}$ 、 $^{68}\text{Ga}$ 、 $^{18}\text{F}$ 、 $^{64}\text{Cu}$ 、 $^{86}\text{Y}$ 、 $^{76}\text{Br}$ 、 $^{89}\text{Zr}$ 、 $^{72}\text{As}$ 、 $^{124}\text{I}$ 、 $^{74}\text{As}$ 、フッ素-18、ガリウム-68、窒素-13、銅-64、臭素-76、ヨウ素-125、ヒ素-74、炭素-11、ヨウ素-131、 $^{153}\text{Sm}$ 、 $^{177}\text{Lu}$ 、 $^{186}\text{Re}$ 、 $^{188}\text{Re}$ 、 $^{198}\text{Au}$ 、及び $^{225}\text{Ac}$ が含まれる。

30

【 0 7 1 7 】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つのトラッキングシステムは、送達ビヒクルに関連付けられたまたはそれに含まれる少なくとも1つのビオチンの包含を含む。

【 0 7 1 8 】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つのトラッキングシステムは、送達ビヒクルに関連付けられたまたはそれに含まれる少なくとも1つのジゴキシゲニンの包含を含む。

40

【 0 7 1 9 】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つのトラッキングシステムは、送達ビヒクルに関連付けられたまたはそれに含まれる少なくとも1つのジニトロフェニル (D N P) の包含を含む。

【 0 7 2 0 】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つのトラッキングシステムは、送達ビヒクルに関連付けられたまたはそれに含まれる少なくとも1つのフルオレセインの包含を含む。

【 0 7 2 1 】

50

いくつかの実施形態では、少なくとも1つのトラッキングシステムは、送達ビヒクルに関連付けられたまたはそれに含まれる少なくとも1つのフコースの包含を含む。

【0722】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つのトラッキングシステムは、送達ビヒクルに関連付けられたまたはそれに含まれる少なくとも1つのアミンの包含を含む。

【0723】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つのトラッキングシステムは、送達ビヒクルに関連付けられたまたはそれに含まれる少なくとも1つのテキサスレッド（登録商標）の包含を含む。

【0724】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つのトラッキングシステムは、ベンチマークコンストラクトに関連付けられた、それにコードされるまたはそれに含まれる少なくとも1つのピオチンの包含を含む。

【0725】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つのトラッキングシステムは、ベンチマークコンストラクトに関連付けられた、それにコードされるまたはそれに含まれる少なくとも1つのジゴキシゲニンの包含を含む。

【0726】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つのトラッキングシステムは、ベンチマークコンストラクトに関連付けられた、それにコードされるまたはそれに含まれる少なくとも1つのジニトロフェニル（DNP）の包含を含む。

【0727】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つのトラッキングシステムは、ベンチマークコンストラクトに関連付けられた、それにコードされるまたはそれに含まれる少なくとも1つのフルオレセインの包含を含む。

【0728】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つのトラッキングシステムは、ベンチマークコンストラクトに関連付けられた、それにコードされるまたはそれに含まれる少なくとも1つのフコースの包含を含む。

【0729】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つのトラッキングシステムは、ベンチマークコンストラクトに関連付けられた、それにコードされるまたはそれに含まれる少なくとも1つのアミンの包含を含む。

【0730】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つのトラッキングシステムは、ベンチマークコンストラクトに関連付けられた、それにコードされるまたはそれに含まれる少なくとも1つのテキサスレッド（登録商標）の包含を含む。

【0731】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つのトラッキングシステムは、送達ビヒクルに関連付けられたまたはそれに含まれる少なくとも1つのレポーター配列またはタンパク質の包含を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのトラッキングシステムは、ベンチマークコンストラクトに関連付けられた、それにコードされるまたはそれに含まれる少なくとも1つのレポーター配列またはタンパク質の包含を含む。レポーター配列またはタンパク質の非限定的な例には、eGFP、ルシフェラーゼ、遺伝子編集体（例えば、Cas9編集、DNAリードアウト）、ox-40、ベータ6インテグリン、CD45、HAタグを有する表面マーカー、TEVプロテアーゼ部位を有するまたは有しないフラグタグ、またはそれらの任意の組み合わせが含まれる。

【0732】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つのトラッキングシステムは、送達ビヒクルに関連付けられたまたはそれに含まれる少なくとも1つの機能的配列またはタンパク質の包

10

20

30

40

50

含を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのトラッキングシステムは、ベンチマークコンストラクトに関連付けられた、それにコードされるまたはそれに含まれる少なくとも1つの機能的配列またはタンパク質の包含を含む。機能的配列またはタンパク質の非限定的な例には、蛍光タンパク質、表面タンパク質、C r e e リコンビナーゼ、C R I S P R / C A S システム、エピトープタグ（例えば、H A、F L A G 等）を有する表面タンパク質またはそれらの任意の組み合わせが含まれる。

【0733】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つのトラッキングシステムは、送達ビヒクルに関連付けられ、またはそれに含まれ得るプロテアーゼ切断部位（例えば、T E V）を含む少なくとも1つの機能的配列またはタンパク質の包含を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのトラッキングシステムは、ベンチマークコンストラクトに関連付けられ、それにコードされ、またはそれに含まれ得るプロテアーゼ切断部位（例えば、T E V）を含む少なくとも1つの機能的配列またはタンパク質の包含を含む。

10

【0734】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つのトラッキングシステムは、送達ビヒクルに関連付けられ、またはそれに含まれ得る親和性タグ（例えば、3 x H A、F L A G、H i s）を含む少なくとも1つの機能的配列またはタンパク質の包含を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのトラッキングシステムは、ベンチマークコンストラクトに関連付けられ、それにコードされ、またはそれに含まれ得る親和性タグ（例えば、3 x H A、F L A G、H i s）を含む少なくとも1つの機能的配列またはタンパク質の包含を含む。

20

【0735】

V. 薬学的組成物及び投与経路

薬学的組成物及び製剤

オリジネーターコンストラクト、ベンチマークコンストラクト、及び標的化システムは、（1）安定性を増加させる；（2）細胞トランスフェクションまたは形質導入を増加させる；（3）ペイロードの持続または遅延した発現を可能とする；（4）生体内分布を改変する（例えば、ウイルス粒子を特定の組織または細胞タイプに標的化する）；（5）コードされるタンパク質の翻訳を増加させる；（6）コードされるタンパク質の放出プロファイルを改変する；及び／または（7）カーゴ及び／またはペイロードの制御可能な発現を可能とするための1つ以上の賦形剤を使用して製剤化され得る。

30

【0736】

製剤には、限定されないが、生理食塩水、リポソーム、脂質ナノ粒子、ポリマー、ペプチド、タンパク質、ウイルスベクター（例えば、対象への移行または移植用）でトランスフェクションされた細胞及びそれらの組み合わせが含まれ得る。

【0737】

本明細書に記載の薬学的組成物の製剤は、薬理学の技術分野で知られているまたは後に開発される任意の方法によって調製され得る。本明細書で使用される場合、用語「薬学的組成物」は、少なくとも1つの活性成分及び任意に1つ以上の薬学的に許容可能な賦形剤を含む組成物を指す。

40

【0738】

通常、そのような調製方法には、活性成分を賦形剤及び／または1つ以上の他の付随成分に関連付ける工程が含まれる。本明細書で使用される場合、語句「活性成分」は通常、本明細書に記載されるペイロード領域またはカーゴまたはペイロードを有するオリジネーターコンストラクトまたはベンチマークコンストラクトのいずれかを指す。

【0739】

本明細書に記載のオリジネーターコンストラクト、ベンチマークコンストラクト、及び標的化システムならびに薬学的組成物の製剤は、薬理学の技術分野で知られているまたは後に開発される任意の方法によって調製され得る。通常、そのような調製方法には、活性成分を賦形剤及び／または1つ以上の他の付随成分に関連付け、次いで、必要に応じて及

50

び／または所望により、生成物を所望の単一または複数の用量単位に分割、成形及び／または包装する工程が含まれる。

【0740】

本開示による薬学的組成物は、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され、包装され、及び／または販売され得る。本明細書で使用される場合、「単位用量」は、既定の量の活性成分を含む薬学的組成物の個別の量を指す。活性成分の量は、通常、対象に投与されるであろう活性成分の投薬量、及び／または、例えば、そのような投薬量の2分の1または3分の1等のそのような投薬量の好都合な分数と同等である。

【0741】

いくつかの実施形態では、薬学的に許容可能な賦形剤は、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では、賦形剤は、ヒトのための使用のために及び獣医学的使用のために承認されている。いくつかの実施形態では、賦形剤は、米国食品医薬品局によって承認されている場合がある。いくつかの実施形態では、賦形剤は、薬学的グレードのものであり得る。いくつかの実施形態では、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基準を満たし得る。

【0742】

本開示による薬学的組成物における活性成分、薬学的に許容可能な賦形剤、及び／または任意の追加の成分の相対量は、処置されている対象の同一性、サイズ、及び／または状態に応じて、及びさらに組成物が投与される経路に応じて様々であり得る。例えば、組成物は、0.1%～99%（w/w）の活性成分を含み得る。例として、組成物は、0.1%～100%、例えば、0.5～50%、1～30%、5～80%、または少なくとも80%（w/w）の活性成分を含み得る。

【0743】

1つの態様では、本開示は、本明細書に開示される治療的ペイロードの送達のための送達システムをさらに提供する。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される治療的ペイロードの送達のための好適な送達システムは、脂質ナノ粒子（LNP）製剤を含む。

【0744】

いくつかの実施形態では、本開示のLNPは、イオン化可能な脂質、構造脂質、PEG化脂質（別名PEG脂質）、及びリン脂質を含む。代替的实施形態では、LNPは、イオン化可能な脂質、構造脂質、PEG化脂質（別名PEG脂質）、及び双性イオン性アミノ酸脂質を含む。いくつかの実施形態では、LNPは、前述した脂質成分のいずれかに加えて、5番目の脂質をさらに含む。いくつかの実施形態では、LNPは、本開示の活性剤の1つ以上の要素を封入する。いくつかの実施形態では、LNPは、LNPの外側表面に共有結合的または非共有結合的に結合した標的化部位をさらに含む。いくつかの実施形態では、標的化部位は、特定の器官システムの細胞に結合する、またはそうでなければその細胞による取り込みを容易化する標的化部位である。

【0745】

いくつかの実施形態では、LNPは、少なくとも約20nm、30nm、40nm、50nm、60nm、70nm、80nm、または90nmの直径を有する。いくつかの実施形態では、LNPは、約100nm、110nm、120nm、130nm、140nm、150nm、または160nm未満の直径を有する。いくつかの実施形態では、LNPは、約100nm未満の直径を有する。いくつかの実施形態では、LNPは、約90nm未満の直径を有する。いくつかの実施形態では、LNPは、約80nm未満の直径を有する。いくつかの実施形態では、LNPは、約60～100nmの直径を有する。いくつかの実施形態では、LNPは、約75～80nmの直径を有する。

【0746】

いくつかの実施形態では、本開示の脂質ナノ粒子組成物は、製剤における成分脂質のそれぞれのモル比に従って記載される。非限定的な例として、イオン化可能な脂質のmol

10

20

30

40

50



%は、約10mol%～約80mol%であり得る。非限定的な例として、イオン化可能な脂質のmol%は、約20mol%～約70mol%であり得る。非限定的な例として、イオン化可能な脂質のmol%は、約30mol%～約60mol%であり得る。非限定的な例として、イオン化可能な脂質のmol%は、約35mol%～約55mol%であり得る。非限定的な例として、イオン化可能な脂質のmol%は、約40mol%～約50mol%であり得る。

【0747】

いくつかの実施形態では、リン脂質のmol%は、約1mol%～約50mol%であり得る。いくつかの実施形態では、リン脂質のmol%は、約2mol%～約45mol%であり得る。いくつかの実施形態では、リン脂質のmol%は、約3mol%～約40mol%であり得る。いくつかの実施形態では、リン脂質のmol%は、約4mol%～約35mol%であり得る。いくつかの実施形態では、リン脂質のmol%は、約5mol%～約30mol%であり得る。いくつかの実施形態では、リン脂質のmol%は、約10mol%～約20mol%であり得る。いくつかの実施形態では、リン脂質のmol%は、約5mol%～約20mol%であり得る。

10

【0748】

いくつかの実施形態では、構造脂質のmol%は、約10mol%～約80mol%であり得る。いくつかの実施形態では、構造脂質のmol%は、約20mol%～約70mol%であり得る。いくつかの実施形態では、構造脂質のmol%は、約30mol%～約60mol%であり得る。いくつかの実施形態では、構造脂質のmol%は、約35mol%～約55mol%であり得る。いくつかの実施形態では、構造脂質のmol%は、約40mol%～約50mol%であり得る。

20

【0749】

いくつかの実施形態では、PEG脂質のmol%は、約0.1mol%～約10mol%であり得る。いくつかの実施形態では、PEG脂質のmol%は、約0.2mol%～約5mol%であり得る。いくつかの実施形態では、PEG脂質のmol%は、約0.5mol%～約3mol%であり得る。いくつかの実施形態では、PEG脂質のmol%は、約1mol%～約2mol%であり得る。いくつかの実施形態では、PEG脂質のmol%は、約1.5mol%であり得る。

【0750】

30

いくつかの実施形態では、ナノ粒子には、イオン化可能な脂質、リン脂質、PEG脂質、及び構造脂質が含まれる。所定の実施形態では、ナノ粒子組成物の脂質成分には、約30mol%～約60mol%のイオン化可能な脂質、約0mol%～約30mol%のリン脂質、約18.5mol%～約48.5mol%の構造脂質、及び約0mol%～約10mol%のPEG脂質が含まれ、但し、総mol%は、100%を超えない。いくつかの実施形態では、ナノ粒子組成物の脂質成分には、約35mol%～約55mol%のイオン化可能な脂質、約5mol%～約25mol%のリン脂質、約30mol%～約40mol%の構造脂質、及び約0mol%～約10mol%のPEG脂質が含まれる。特定の実施形態では、脂質成分には、約50mol%のイオン化可能な脂質、約10mol%のリン脂質、約38.5mol%の構造脂質、及び約1.5mol%のPEG脂質が含まれる。別の特定の実施形態では、脂質成分には、約40mol%のイオン化可能な脂質、約20mol%のリン脂質、約38.5mol%の構造脂質、及び約1.5mol%のPEG脂質が含まれる。別の特定の実施形態では、脂質成分には、約48.5mol%のイオン化可能な脂質、約10mol%のリン脂質、約40mol%の構造脂質、及び約1.5mol%のPEG脂質が含まれる。別の特定の実施形態では、脂質成分には、約48.5mol%のイオン化可能な脂質、約10mol%のリン脂質、約39mol%の構造脂質、及び約2.5mol%のPEG脂質が含まれる。いくつかの実施形態では、リン脂質は、DOPEまたはDSPCであり得る。他の実施形態では、PEG脂質は、PEG-DMGであり得、及び／または構造脂質は、コレステロールであり得る。ナノ粒子組成物における活性剤の量は、ナノ粒子組成物のサイズ、組成、所望の標的及び／または適用、ま

40

50

たは他の特性ならびに活性剤の特性に依存し得る。例えば、ナノ粒子組成物において有用な活性剤の量は、活性剤のサイズ、配列、及び他の特徴に依存し得る。ナノ粒子組成物における活性剤及び他の要素（例えば、脂質）の相対量はまた、様々であり得る。いくつかの実施形態では、ナノ粒子組成物における脂質成分の酵素に対する  $w t / w t$  比は、約 5 : 1 ~ 約 60 : 1、例えば、5 : 1、6 : 1、7 : 1、8 : 1、9 : 1、10 : 1、11 : 1、12 : 1、13 : 1、14 : 1、15 : 1、16 : 1、17 : 1、18 : 1、19 : 1、20 : 1、25 : 1、30 : 1、35 : 1、40 : 1、45 : 1、50 : 1、及び 60 : 1 であり得る。ナノ粒子組成物における酵素の量は、例えば、吸収分光法（例えば、紫外-可視分光法）を使用して測定され得る。

【0751】

いくつかの実施形態では、本開示の活性剤を含むナノ粒子組成物は、特定の E : P 比を提供するように製剤化される。組成物の E : P 比は、RNA 活性剤におけるホスフェート基の数に対する 1 つ以上の脂質における窒素原子のモル比を指す。通常、より低い E : P 比が好ましい。1 つ以上の酵素、脂質、及びその量は、約 2 : 1 ~ 約 30 : 1、例えば、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 の E : P 比を提供するように選択され得る。所定の実施形態では、E : P 比は、約 2 : 1 ~ 約 8 : 1 であり得る。他の実施形態では、E : P 比は、約 5 : 1 ~ 約 8 : 1 である。例えば、E : P 比は、約 5.0 : 1、約 5.5 : 1、約 5.67 : 1、約 6.0 : 1、約 6.5 : 1、または約 7.0 : 1 であり得る。

【0752】

ナノ粒子組成物の特徴は、その成分に依存し得る。例えば、構造脂質としてコレステロールを含むナノ粒子組成物は、異なる構造脂質を含むナノ粒子組成物とは異なる特徴を有し得る。同様に、ナノ粒子組成物の特徴は、その成分の絶対または相対量に依存し得る。例えば、より高いモル分率のリン脂質を含むナノ粒子組成物は、より低いモル分率のリン脂質を含むナノ粒子組成物とは異なる特徴を有し得る。特徴はまた、ナノ粒子組成物の調製の方法及び条件に応じて様々であり得る。ナノ粒子組成物は、多様な方法によって特性化され得る。例えば、顕微鏡検査（例えば、透過電子顕微鏡検査または走査電子顕微鏡検査）は、ナノ粒子組成物の形態及びサイズ分布を調べるために使用され得る。動的光散乱または電位差測定（例えば、電位差滴定）は、ゼータ電位を測定するために使用され得る。動的光散乱はまた、粒子サイズを決定するために利用され得る。ナノ粒子組成物の複数の特徴、例えば、粒子サイズ、多分散指数、及びゼータ電位を測定するために Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, Malvern, Worcestershire, UK) 等の機器も使用され得る。

【0753】

ナノ粒子組成物の平均サイズは、例えば、動的光散乱 (DLS) によって測定される、10 s の nm ~ 100 s の nm であり得る。例えば、平均サイズは、約 40 nm ~ 約 150 nm、例えば、約 40 nm、45 nm、50 nm、55 nm、60 nm、65 nm、70 nm、75 nm、80 nm、85 nm、90 nm、95 nm、100 nm、105 nm、110 nm、115 nm、120 nm、125 nm、130 nm、135 nm、140 nm、145 nm、または 150 nm であり得る。いくつかの実施形態では、ナノ粒子組成物の平均サイズは、約 50 nm ~ 約 100 nm、約 50 nm ~ 約 90 nm、約 50 nm ~ 約 80 nm、約 50 nm ~ 約 70 nm、約 50 nm ~ 約 60 nm、約 60 nm ~ 約 100 nm、約 60 nm ~ 約 90 nm、約 60 nm ~ 約 80 nm、約 60 nm ~ 約 70 nm、約 70 nm ~ 約 100 nm、約 70 nm ~ 約 90 nm、約 70 nm ~ 約 80 nm、約 80 nm ~ 約 100 nm、約 80 nm ~ 約 90 nm、または約 90 nm ~ 約 100 nm であり得る。所定の実施形態では、ナノ粒子組成物の平均サイズは、約 70 nm ~ 約 100 nm であり得る。特定の実施形態では、平均サイズは、約 80 nm であり得る。他の実施形態では、平均サイズは、約 100 nm であり得る。

【0754】

ナノ粒子組成物は、相対的に均質であり得る。多分散指数は、ナノ粒子組成物の均一性、例えば、ナノ粒子組成物の粒子サイズ分布を示すために使用され得る。低い（例えば、0.3未満の）多分散指数は通常、狭い粒子サイズ分布を示す。ナノ粒子組成物は、約0～約0.25、例えば、0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.10、0.11、0.12、0.13、0.14、0.15、0.16、0.17、0.18、0.19、0.20、0.21、0.22、0.23、0.24、または0.25の多分散指数を有し得る。

#### 【0755】

ナノ粒子組成物のゼータ電位は、組成物の動電学的潜在性を示すために使用され得る。例えば、ゼータ電位は、ナノ粒子組成物の表面電荷を表し得る。より高く荷電した種は、細胞、組織、及び身体における他の要素と不要に相互作用し得るので、比較的低い電荷（正または負）を有するナノ粒子組成物が通常所望である。いくつかの実施形態では、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。

#### 【0756】

ペイロードの封入の効率は、提供される初期量と比べて、調製の後のナノ粒子組成物に封入されたまたはそうでなければ関連付けられたペイロードの量を表す。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1つ以上の有機溶媒または洗浄剤で分解する前または後にナノ粒子組成物を含有する溶液におけるペイロードの量を比較することによって測定され得る。蛍光は、溶液中の遊離ペイロードの量を測定するために使用され得る。本明細書に記載のナノ粒子組成物のため、治療剤及び／または予防剤の封入効率は、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では、封入効率は、少なくとも80%であり得る。所定の実施形態では、封入効率は、少なくとも90%であり得る。

#### 【0757】

脂質及びそれらの調製方法は、例えば、米国特許番号8,569,256、5,965,542及び米国特許公開番号2016/0199485、2016/0009637、2015/0273068、2015/0265708、2015/0203446、2015/0005363、2014/0308304、2014/0200257、2013/086373、2013/0338210、2013/0323269、2013/0245107、2013/0195920、2013/0123338、2013/0022649、2013/0017223、2012/0295832、2012/0183581、2012/0172411、2012/0027803、2012/0058188、2011/0311583、2011/0311582、2011/0262527、2011/0216622、2011/0117125、2011/0091525、2011/0076335、2011/0060032、2010/0130588、2007/0042031、2006/0240093、2006/0083780、2006/0008910、2005/0175682、2005/017054、2005/0118253、2005/0064595、2004/0142025、2007/0042031、1999/009076及びPCT公開番号WO99/39741、WO2017/117528、WO2017/004143、WO2017/075531、WO2015/199952、WO2014/008334、WO2013/086373、WO2013/086322、WO2013/016058、WO201

3 / 0 8 6 3 7 3、WO 2 0 1 1 / 1 4 1 7 0 5、及びWO 2 0 0 1 / 0 7 5 4 8ならびにSimple et. al, Nature Biotechnology, 2010, 28, 172-176 (これらの完全な開示は、すべての目的のためにそれらの全体が参照により本明細書に組み込まれる) に開示されている。

#### 【0758】

ナノ粒子組成物には、薬学的組成物において有用な任意の物質が含まれ得る。例えば、ナノ粒子組成物には、1つ以上の薬学的に許容可能な賦形剤または付随成分、例えば、限定されないが、1つ以上の溶媒、分散媒体、希釈剤、分散助剤、懸濁助剤、顆粒化助剤、崩壊剤、充填剤、流動促進剤、液体ビヒクル、結合剤、表面活性剤、等張剤、増粘または乳化剤、緩衝剤、滑沢剤、油、防腐剤、及び他の種が含まれ得る。賦形剤、例えば、ワックス、バター、着色剤、コーティング剤、香味剤、及び芳香剤もまた、含まれ得る。薬学的に許容可能な賦形剤は、当該技術分野でよく知られている (例えば、Remington's The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, A. R. Gennaro: Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore, Md., 2006を参照されたい)。

10

#### 【0759】

##### 賦形剤及び希釈剤

賦形剤には、本明細書で使用される場合、所望の特定の投薬形態に適するような、あらゆる溶媒、分散媒体、希釈剤、または他の液体ビヒクル、分散または懸濁助剤、表面活性剤、等張剤、増粘または乳化剤、防腐剤等が含まれるがこれらに限定されない。薬学的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、当該技術分野で知られている (Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, A. R. Gennaro, Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2006 (その全体が参照により本明細書に組み込まれる) を参照されたい)。従来の賦形剤媒体の使用は、任意の従来の賦形剤が、例えば、任意の望ましくない生物学的効果を生成することまたはそうでなければ薬学的組成物の任意の他の成分 (複数可) と有害な様式で相互作用することによって、物質またはその誘導体と不適合性である場合がない限り、本開示の範囲内で企図され得る。

20

30

#### 【0760】

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、リン酸ニカルシウム、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、微結晶性セルロース、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、コーンデンプン、粉末化糖等、及び/またはそれらの組み合わせが含まれるがこれらに限定されない。

#### 【0761】

##### イオン化可能な脂質

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるLNPは、イオン化可能な脂質を含む。いくつかの実施形態では、LNPは、2つ以上のイオン化可能な脂質を含む。いくつかの実施形態では、イオン化可能な脂質は、本明細書に開示される任意のイオン化可能な脂質、またはそれらの任意の組み合わせである。

40

#### 【0762】

##### 構造脂質

いくつかの実施形態では、LNPは、構造脂質を含む。構造脂質は、コレステロール、フェコステロール、フコステロール、ベータシトステロール、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、コール酸、シトスタノール、リトコール酸、トマチン、ウルソル酸、アルファートコフェロール、ビタミンD3、ビタミンD2、カルシポトリオール、ボツリン、ルペオール、オレアノール酸、ベータシトステロールアセテート及びそれらの混合物からなる群から

50

選択され得るがこれらに限定されない。いくつかの実施形態では、構造脂質は、コレステロールである。いくつかの実施形態では、構造脂質は、Patel, et al., Nat Commun., 11, 983 (2020) (その全体が参照により本明細書に組み込まれる) によって開示されるコレステロールアナログである。いくつかの実施形態では、構造脂質には、コレステロール及びコルチコステロイド (例えば、プレドニゾン、デキサメタゾン、プレドニゾン、及びヒドロコルチゾン)、またはそれらの任意の組み合わせが含まれる。いくつかの実施形態では、構造脂質は、国際特許出願WO2019152557A1 (その全体が参照により本明細書に組み込まれる) に記載されている。

【0763】

いくつかの実施形態では、構造脂質は、コレステロールアナログである。コレステロールアナログを使用することは、Patel et al., Naturally-occurring cholesterol analogues in lipid nanoparticles induce polymorphic shape and enhance intracellular delivery of mRNA, Nature Communications (2020) (参照により本明細書に組み込まれる) に記載されているようにエンドソーム脱出を向上させ得る。

【0764】

いくつかの実施形態では、構造脂質は、フィトステロールである。フィトステロールを使用することは、Herrera et al., Illuminating endosomal escape of polymorphic lipid nanoparticles that boost mRNA delivery, Biomaterials Science (2020) (参照により本明細書に組み込まれる) に記載されているようにエンドソーム脱出を向上させ得る。

【0765】

いくつかの実施形態では、構造脂質は、向上したエンドソーム放出のための植物ステロール模倣体を含む。

【0766】

PEG化脂質

PEG化脂質は、ポリエチレングリコールで修飾された脂質である。いくつかの実施形態では、LNPは、本明細書で上述したように、式Iの化合物またはその薬学的に許容可能な塩を含む。いくつかの実施形態では、LNPは、本明細書で上述したように、式IIの化合物またはその薬学的に許容可能な塩を含む。いくつかの実施形態では、LNPは、本明細書で上述したように、表(I)に示される化合物を含む。

【0767】

いくつかの実施形態では、LNPは、追加のPEG化脂質またはPEG修飾脂質を含む。PEG化脂質は、PEG修飾ホスファチジルエタノールアミン、PEG修飾ホスファチジン酸、PEG修飾セラミド、PEG修飾ジアルキルアミン、PEG修飾ジアシルグリセロール、PEG修飾ジアルキルグリセロール、及びそれらの混合物からなる非限定的な群から選択され得る。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。

【0768】

いくつかの実施形態では、LNPは、US2019/0240354; US2010/0130588; US2021/0087135; WO2021/204179; US2021/0128488; US2020/0121809; US2017/0119904; US2013/0108685; US2013/0195920; US2015/0005363; US2014/0308304; US2013/0053572; WO2019/232095A1; WO2021/077067; WO2019/152557; US2015/0203446; US2017/0210697; US2014/0200257; またはWO2019/089828A1 (これらの各々は、それらの全体が

参照により本明細書に組み込まれる)のうちの1つに開示されるPEG化脂質を含む。

【0769】

いくつかの実施形態では、LNPは、PEG化脂質の代わりにPEG化脂質代用物を含む。PEG化脂質を企図する本明細書に開示されるすべての実施形態は、PEG化脂質代用物にも適用されることが理解されるべきである。いくつかの実施形態では、LNPは、ポリサルコシン-脂質コンジュゲート、例えば、US2022/0001025A1(その全体が参照により本明細書に組み込まれる)に開示されているものを含む。

【0770】

リン脂質

いくつかの実施形態では、本開示のLNPは、リン脂質を含む。組成物及び方法において有用なリン脂質は、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-ジオ-オ-オクタデセニル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(18:0 ジエテル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-ジフィタノイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン(ME16.0PE)、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)、ナトリウム(S)-2-アンモニオ-3-(((R)-2-(オレオイルオキシ)-3-(ステアロイルオキシ)プロポキシ)オキシドホスホリル)オキシ)プロパノエート(L-α-ホスファチジルセリン;脳PS)、ジミリストイルホスファチジルコリン(DMPC)、ジミリストイルホスホエタノールアミン(DMPE)、ジミリストイルホスファチジルグリセロール(DMPG)、ジオレオイル-ホスファチジルエタノールアミン4-(N-マレイミドメチル)-シクロヘキサン-1-カルボキシレート(DOPE-mal)、ジオレオイルホスファチジルグリセロール(DOPG)、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-(ホスホ-L-セリン)(DOPS)、アセル-融合性リン脂質(DPHE)、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン(DPPE)、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール(DPPG)、ジパルミトイルホスファチジルセリン(DPPS)、ジステアロイルホスファチジルコリン(DSPC)、ジステアロイル-ホスファチジル-エタノールアミン(DSPE)、ジステアロイルホスホエタノールアミンイミダゾール(DSPEI)、1,2-ジウンデカノイル-sn-グリセロ-ホスホコリン(DUPC)、卵黄ホスファチジルコリン(EPC)、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスフェート(18:1 PA;DOPA)、アンモニウムビス(((S)-2-ヒドロキシ-3-(オレオイルオキシ)プロピル)ホスフェート(18:1 DMP;LBPA))、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホ-(1'-ミオ-イノシトール)(DOPi;18:1 PI)、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホ-L-セリン(18:0 PS)、1,2-ジリノレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホ-L-セリン(18:2 PS)、1-パルミトイル-2-オレオイル-sn-グリ

10

20

30

40

50

セロ-3-ホスホ-Ｌ-セリン（１６：０－１８：１　ＰＳ；ＰＯＰＳ）、１-ステアロイル-2-オレオイル-*sn*-グリセロ-3-ホスホ-Ｌ-セリン（１８：０－１８：１　ＰＳ）、１-ステアロイル-2-リノレオイル-*sn*-グリセロ-3-ホスホ-Ｌ-セリン（１８：０－１８：２　ＰＳ）、１-オレオイル-2-ヒドロキシ-*sn*-グリセロ-3-ホスホ-Ｌ-セリン（１８：１　Ｌｙｓｏ　ＰＳ）、１-ステアロイル-2-ヒドロキシ-*sn*-グリセロ-3-ホスホ-Ｌ-セリン（１８：０　Ｌｙｓｏ　ＰＳ）、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され得る。いくつかの実施形態では、ＬＮＰには、ＤＳＰＣが含まれる。所定の実施形態では、ＬＮＰには、ＤＯＰＥが含まれる。いくつかの実施形態では、ＬＮＰには、ＤＳＰＣ及びＤＯＰＥの両方が含まれる。

【０７７１】

いくつかの実施形態では、リン脂質テールは、Ｕ．Ｓ．２０２１／０１２１４１１（参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているようにエンドソーム脱出を促進するために修飾され得る。

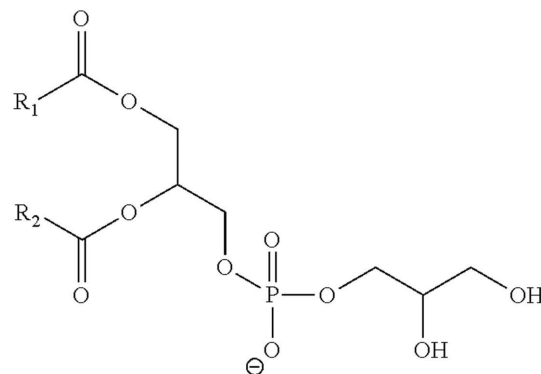
【０７７２】

いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、ＵＳ２０１９／０２４０３５４；ＵＳ２０１０／０１３０５８８；ＵＳ２０２１／００８７１３５；ＷＯ２０２１／２０４１７９；ＵＳ２０２１／０１２８４８８；ＵＳ２０２０／０１２１８０９；ＵＳ２０１７／０１１９９０４；ＵＳ２０１３／０１０８６８５；ＵＳ２０１３／０１９５９２０；ＵＳ２０１５／０００５３６３；ＵＳ２０１４／０３０８３０４；ＵＳ２０１３／００５３５７２；ＷＯ２０１９／２３２０９５Ａ１；ＷＯ２０２１／０７７０６７；ＷＯ２０１９／１５２５５７；ＵＳ２０１７／０２１０６９７；またはＷＯ２０１９／０８９８２８Ａ１（これらの各々は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる）のうちの１つに開示されるリン脂質を含む。

【０７７３】

いくつかの実施形態では、ＵＳ２０２０／０１２１８０９に開示されるリン脂質は、以下の構造：

【化６４】



【０７７４】

（式中、 $R_1$  及び  $R_2$  は、それぞれ独立して、分岐状または直鎖、飽和または不飽和炭素鎖（例えば、アルキル、アルケニル、アルキニル）を有する。

【０７７５】

標的化部位

いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子は、標的化部位をさらに含む。標的化部位は、抗体またはその断片であり得る。標的化部位は、標的抗原に結合することが可能であり得る。

【０７７６】

いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、脂質ナノ粒子に機能可能に接続された標的

化部位を含む。いくつかの実施形態では、標的化部位は、標的抗原に結合することが可能である。いくつかの実施形態では、標的抗原は、標的器官において発現する。いくつかの実施形態では、標的抗原は、肝臓よりも標的器官において多く発現する。

【0777】

いくつかの実施形態では、標的化部位は、WO2016189532A1（参照により本明細書に組み込まれるである）に記載される抗体である。例えば、いくつかの実施形態では、標的化粒子は、特定の抗CD38モノクローナル抗体（mAb）にコンジュゲートされ、これにより、他のサブタイプの白血球よりも高い割合でB細胞リンパ球悪性腫瘍（例えば、MCL）への粒子内に封入されたsiRNAの特異的送達が可能となる。

【0778】

いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子は、標的化部位、例えば、抗体とコンジュゲート／結合／関連付けられた場合、標的化され得る。

【0779】

双性イオン性アミノ脂質

いくつかの実施形態では、LNPは、双性イオン性脂質を含む。いくつかの実施形態では、双性イオン性脂質を含むLNPは、リン脂質を含まない。

【0780】

双性イオン性アミノ脂質は、米国特許出願20210121411（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるようにmRNAを細胞内にロードし、安定化し、放出するためにリン脂質を伴わずにLNPへ自己構築することができることが示されている。双性イオン性、イオン化可能なカチオン性及び永続的にカチオン性のヘルパー脂質は、Liu et al., Membrane-destablizing ionizable phospholipids for organ-selective mRNA delivery and CRISPR-Cas gene editing, Nat Mater. (2021)（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるように脾臓、肝臓及び肺における組織選択的mRNA送達及びCRISPR-Cas9遺伝子編集を可能とする。

【0781】

双性イオン性脂質は、Walsh et al., Synthesis, Characterization and Evaluation of Ionizable Lysine-Based Lipids for siRNA Delivery, Bioconj Chem. (2013)（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているようにカチオン性アミン及びアニオン性カルボキシレートを含有する頭部基を有し得る。リジン $\alpha$ -アミンでアミド結合を介して長鎖ジアルキルアミンに連結されたリジン頭部基を含有するイオン化可能なリジンベースの脂質は、Walsh et al., Synthesis, Characterization and Evaluation of Ionizable Lysine-Based Lipids for siRNA Delivery, Bioconj Chem. (2013)に記載されているように免疫原性を低減し得る。

【0782】

追加の脂質成分

いくつかの実施形態では、本開示のLNP組成物は、LNPの指向性に影響を及ぼすことが可能な1つ以上の追加の脂質成分をさらに含む。いくつかの実施形態では、LNPは、DDAB、EPC、14PA、18BMP、DODAP、DOTAP、及びC12-200から選択される少なくとも1つの脂質をさらに含む（Cheng, et al. Nat Nanotechnol. 2020 April; 15 (4): 313-320.; Dillard, et al. PNAS 2021 Vol. 118 No. 52を参照されたい）。

【0783】

ポリヌクレオチド

10

20

30

40

50



いくつかの実施形態では、本開示の LNP は、活性剤を含有する。いくつかの実施形態では、活性剤は、ポリヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、LNP は、ポリヌクレオチドを標的器官に送達することが可能である。ポリヌクレオチドには、その用語のその最も広い意味で、オリゴヌクレオチド鎖であり、またはそれに組み込まれ得る任意の化合物及び／または物質が含まれる。本開示に従って使用するための例示的なポリヌクレオチドには、デオキシリボ核酸 (DNA)、メッセンジャー mRNA (mRNA) を含むリボ核酸 (RNA)、それらのハイブリッド、RNAi 誘導剤、RNAi 剤、siRNA、shRNA、miRNA、アンチセンス RNA、リボザイム、触媒 DNA、三重ヘリックス形成を誘導する RNA、アプタマー、ベクター等のうちの 1 つ以上が含まれるがこれらに限定されない。本明細書に記載の組成物及び方法において有用な RNA には、ショールティマー (shortimer)、アンタゴミア (antagomir)、アンチセンス、リボザイム、低分子干渉 RNA (siRNA)、非対称干渉 RNA (aiRNA)、マイクロ RNA (miRNA)、Dicer 基質 RNA (dsRNA)、ショートヘアピン RNA (shRNA)、トランスファー RNA (tRNA)、メッセンジャー RNA (mRNA)、及びそれらの混合物からなる群から選択され得るこれらに限定されない。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、mRNA である。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、環状 RNA である。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、タンパク質をコードする。ポリヌクレオチドは、任意の天然に存在するまたは天然に存在しないまたはそうでなければ修飾されたポリペプチドを含む、対象となる任意のポリペプチドをコードし得る。ポリペプチドは、任意のサイズのものであり得、任意の二次構造または活性を有し得る。いくつかの実施形態では、mRNA によってコードされるポリペプチドは、細胞において発現した場合に治療効果を有し得る。

10

20

30

40

50

#### 【0784】

他の実施形態では、ポリヌクレオチドは、siRNA である。siRNA は、対象となる遺伝子の発現を選択的にノックダウンまたは下方制御することが可能であり得る。例えば、siRNA は、それを必要とする対象への siRNA を含むナノ粒子組成物の投与により、特定の疾患、障害、または病態に関連する遺伝子をサイレンシングするために選択され得る。siRNA は、対象となる遺伝子またはタンパク質をコードする mRNA 配列に相補的な配列を含み得る。いくつかの実施形態では、siRNA は、免疫調節性 siRNA であり得る。

#### 【0785】

いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、shRNA またはそれをコードするベクターもしくはプラスミドである。shRNA は、核への適切なコンストラクトの送達により標的細胞内で生成され得る。shRNA に関するコンストラクト及びメカニズムは、関連する技術分野においてよく知られている。

#### 【0786】

ポリヌクレオチドには、対象となるポリペプチドをコードする連結されたヌクレオシドの第 1 の領域 (例えば、コード領域)、第 1 の領域の 5' 末端 (例えば、5'-UTR) に位置する第 1 の隣接領域、第 1 の領域の 3' 末端 (例えば、3'-UTR) に位置する第 2 の隣接領域、少なくとも 1 つの 5' キャップ領域、及び 3' 安定化領域が含まれ得る。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドには、ポリ-A 領域または Kozak 配列 (例えば、5'-UTR に) がさらに含まれる。いくつかの場合では、ポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチドから切除されることが可能な 1 つ以上のイントロンヌクレオチド配列を含有し得る。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチド (例えば、mRNA) には、5' キャップ構造、鎖終結ヌクレオチド、ステムループ、ポリ A 配列、及び／またはポリアデニル化シグナルが含まれ得る。核酸の領域のいずれか 1 つには、1 つ以上の代替的成分 (例えば、代替的ヌクレオシド) が含まれ得る。例えば、3' 安定化領域は、代替的ヌクレオシド、例えば、L-ヌクレオシド、逆チミジン、または 2'-O-メチルヌクレオシド及び／またはコード領域、5'-UTR、3'-UTR を含有し得、またはキャップ領域には、代替的ヌクレオシド、例えば、5 置換ウリジン (例えば、5-メトキシウリジン)、

1 置換シュードウリジン（例えば、1-メチルシュードウリジンまたは1-エチルシュードウリジン）、及び／または5置換シチジン（例えば、5-メチルシチジン）が含まれ得る。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、天然に存在するヌクレオシドのみを含有する。

【0787】

いくつかの場合では、ポリヌクレオチドは、長さが30ヌクレオチドを超える。別の実施形態では、ポリヌクレオチド分子は、長さが35ヌクレオチドを超える。別の実施形態では、長さは、少なくとも40ヌクレオチドである。別の実施形態では、長さは、少なくとも45ヌクレオチドである。別の実施形態では、長さは、少なくとも55ヌクレオチドである。別の実施形態では、長さは、少なくとも50ヌクレオチドである。別の実施形態では、長さは、少なくとも60ヌクレオチドである。別の実施形態では、長さは、少なくとも80ヌクレオチドである。別の実施形態では、長さは、少なくとも90ヌクレオチドである。別の実施形態では、長さは、少なくとも100ヌクレオチドである。別の実施形態では、長さは、少なくとも120ヌクレオチドである。別の実施形態では、長さは、少なくとも140ヌクレオチドである。別の実施形態では、長さは、少なくとも160ヌクレオチドである。別の実施形態では、長さは、少なくとも180ヌクレオチドである。別の実施形態では、長さは、少なくとも200ヌクレオチドである。別の実施形態では、長さは、少なくとも250ヌクレオチドである。別の実施形態では、長さは、少なくとも300ヌクレオチドである。別の実施形態では、長さは、少なくとも350ヌクレオチドである。別の実施形態では、長さは、少なくとも400ヌクレオチドである。別の実施形態では、長さは、少なくとも450ヌクレオチドである。別の実施形態では、長さは、少なくとも500ヌクレオチドである。別の実施形態では、長さは、少なくとも600ヌクレオチドである。別の実施形態では、長さは、少なくとも700ヌクレオチドである。別の実施形態では、長さは、少なくとも800ヌクレオチドである。別の実施形態では、長さは、少なくとも900ヌクレオチドである。別の実施形態では、長さは、少なくとも1000ヌクレオチドである。別の実施形態では、長さは、少なくとも1100ヌクレオチドである。別の実施形態では、長さは、少なくとも1200ヌクレオチドである。別の実施形態では、長さは、少なくとも1300ヌクレオチドである。別の実施形態では、長さは、少なくとも1400ヌクレオチドである。別の実施形態では、長さは、少なくとも1500ヌクレオチドである。別の実施形態では、長さは、少なくとも1600ヌクレオチドである。別の実施形態では、長さは、少なくとも1800ヌクレオチドである。別の実施形態では、長さは、少なくとも2000ヌクレオチドである。別の実施形態では、長さは、少なくとも2500ヌクレオチドである。別の実施形態では、長さは、少なくとも3000ヌクレオチドである。別の実施形態では、長さは、少なくとも4000ヌクレオチドである。別の実施形態では、長さは、少なくとも5000ヌクレオチド、または5000ヌクレオチドを超える。

【0788】

いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチド分子、式、組成物またはそれに関連する方法は、WO2002/098443、WO2003/051401、WO2008/052770、WO2009/127230、WO2006/122828、WO2008/083949、WO2010/088927、WO2010/037539、WO2004/004743、WO2005/016376、WO2006/024518、WO2007/095,976、WO2008/014979、WO2008/077592、WO2009/030481、WO2009/095226、WO2011/069586、WO2011/026641、WO2011/144358、WO2012/019780、WO2012/013326、WO2012/089338、WO2012/113513、WO2012/116811、WO2012/116810、WO2013/113502、WO2013/113501、WO2013/113736、WO2013/143698、WO2013/143699、WO2013/143700、WO2013/120626、WO2013/120627、WO2013/120628、

WO 2013/120629、WO 2013/174409、WO 2014/127917、WO 2015/024669、WO 2015/024668、WO 2015/024667、WO 2015/024665、WO 2015/024666、WO 2015/024664、WO 2015/101415、WO 2015/101414、WO 2015/024667、WO 2015/062738、WO 2015/101416（これらのすべては、参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているような特徴を含む1つ以上のポリヌクレオチドを含む。

#### 【0789】

ポリヌクレオチド、例えば、環状RNAは、内部リボソーム進入部位（IRES）を含有し得る。IRESは、唯一のリボソーム結合部位として作用し得、またはmRNAの複数のリボソーム結合部位の1つとして機能し得る。複数の機能的リボソーム結合部位を含有するポリヌクレオチドは、リボソームによって独立して翻訳されるいくつかのペプチドまたはポリペプチドをコードし得る（例えば、多シストロン性mRNA）。ポリヌクレオチドがIRESと共に提供される場合、第2の翻訳可能な領域がさらに任意に提供される。本開示に従って使用され得るIRES配列の例には、限定されないが、ピコルナウイルス（例えば、FMDV）、ペストウイルス（CFPV）、ポリオウイルス（PV）、脳心筋炎ウイルス（ECMV）、足口病ウイルス（FMDV）、C型肝炎ウイルス（HCV）、古典的ブタ熱ウイルス（CSFV）、ネズミ白血病ウイルス（MLV）、シミアン免疫不全ウイルス（SIV）またはコオロギ麻痺ウイルス（CrPV）からのものが含まれる。

#### 【0790】

いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、1つ以上のマイクロRNA結合部位を含む。いくつかの実施形態では、マイクロRNA結合部位は、非標的器官においてマイクロRNAによって認識される。いくつかの実施形態では、マイクロRNA結合部位は、肝臓においてマイクロRNAによって認識される。いくつかの実施形態では、マイクロRNA結合部位は、肝臓細胞においてマイクロRNAによって認識される。

#### 【0791】

##### 不活性成分

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の製剤は、少なくとも1つの不活性成分を含み得る。本明細書で使用される場合、用語「不活性成分」は、製剤に含まれる薬学的組成物の活性成分の活性に寄与しない1つ以上の薬剤を指す。いくつかの実施形態では、本開示の製剤において使用され得る不活性成分のすべてが米国食品医薬品局（FDA）によって承認されている場合があり、そのいずれも承認されていない場合があり、またはその一部が承認されている場合がある。

#### 【0792】

いくつかの実施形態では本明細書に開示される製剤には、カチオンまたはアニオンが含まれ得る。製剤には、金属カチオン、例えば、限定されないが、 $Zn^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$ 、及びそれらの組み合わせが含まれる。非限定的な例として、製剤には、金属カチオンを有するポリマー及び複合体が含まれ得る。

#### 【0793】

本開示の製剤にはまた、1つ以上の薬学的に許容可能な塩が含まれ得る。本明細書で使用される場合、「薬学的に許容可能な塩」は、開示される化合物の誘導体であって、親化合物が、既存の酸または塩基部位をその塩形態に変換すること（例えば、遊離塩基を好適な有機酸と反応させること）によって修飾されているものを指す。薬学的に許容可能な塩の例には、アミン等の塩基性残基の鉱酸または有機酸塩；カルボン酸等の酸性残基のアルカリまたは有機塩等が含まれるがこれらに限定されない。代表的な酸付加塩には、酢酸塩、酢酸、アジピン酸塩、アルギニン酸塩、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、重硫酸塩、ホウ酸塩、酪酸塩、樟脳酸塩、カンファースルホン酸塩、クエン酸塩、シクロペンタンプロピオン酸塩、ジグルコン酸塩、ドデシル硫酸塩、エタンスルホン酸塩、フマル酸塩、グルコヘプトン酸塩、グ

リセロリン酸塩、ヘミ硫酸塩、ヘプタン酸塩、ヘキサン酸塩、臭化水素酸塩、塩化水素酸塩、ヨウ化水素酸塩、2-ヒドロキシー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、吉草酸塩等が含まれる。代表的なアルカリまたはアルカリ土類金属塩には、ナトリウム、リチウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム等、ならびに非毒性アンモニウム、第4級アンモニウム、及びアミンカチオン（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、エチルアミンを含むがこれらに限定されない）等が含まれる。本開示の薬学的に許容可能な塩には、例えば、非毒性の無機または有機酸から形成された親化合物の従来の非毒性塩が含まれる。

10

#### 【0794】

溶媒和物は、有機溶媒、水、またはそれらの混合物を含む溶液からの結晶化、再結晶化、または沈殿によって調製され得る。好適な溶媒の例は、エタノール、水（例えば、一、二、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（DM SO）、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、安息香酸ベンジル等である。水が溶媒である場合、溶媒和物は、「水和物」と称される。

20

#### 【0795】

##### 投与経路

本明細書に記載のオリジネーターコンストラクト、ベンチマークコンストラクト、及び標的化システムは、治療的に有効なアウトカムをもたらす任意の送達経路によって投与され得る。これらには、経腸（腸内に）、胃腸、硬膜周囲（硬膜内に）、経口（口經由で）、経皮、脳内（大脳内に）、脳室内（脳室内に）、皮膚上（皮膚への塗布）、皮内（皮膚自体の中に）、皮下（皮膚の下に）、鼻腔内投与（経鼻で）、静脈内（静脈の中に）、静脈内ボラス、点滴静注、動脈内（動脈の中に）、筋肉内（筋肉の中に）、心臓内（心臓の中に）、骨内注入（骨髄の中に）、髄腔内（脊柱管の中に）、実質内（脳組織の中に）、腹腔内（腹腔の中への注入または注射）、膀胱内注入、硝子体内（経眼で）、海綿体内注入（病的腔の中に）、腔内（陰茎の基部の中に）、腔内投与、子宮内、羊膜外投与、経皮（全身分布用のインタクトな皮膚を介した拡散）、経粘膜（粘膜を介した拡散）、経膈、吹送法（吸引）、舌下、唇下、浣腸、点眼（結膜の上に）、点耳、耳介（耳の中または耳を介して）、頬側（頬に向けて）、結膜、皮膚、歯科的（歯（複数可）に）、電気浸透、子宮頸管内、洞内、気管内、体外、血液透析、浸透、間質内、腹腔内、羊膜内、関節内、胆管内、気管支内、嚢内、軟骨内（軟骨の中に）、尾内（馬尾の中に）、大槽内（小脳延髄大槽の中に）、角膜内（角膜の中に）、歯冠内、冠動脈内（冠動脈の中に）、海綿体内（陰茎の海綿体の拡張可能な空間の中に）、椎間板内（椎間板の中に）、管内（腺管の中に）、十二指腸内（十二指腸の中に）、硬膜内（硬膜の中または下に）、表皮内（表皮に）、食道内（食道に）、胃内（胃の中に）、歯肉内（歯肉の中に）、回腸内（小腸の遠位部分の中に）、病巣内（局在化病巣の中にまたはそれに直接導入される）、管腔内（管の内腔内）、リンパ内（リンパの中に）、髄内（骨の骨髄腔の中に）、髄膜内（髄膜の中に）、心筋内（心筋の中に）、眼内（眼の中に）、卵巣内（卵巣の中に）、心膜内（心膜の中に）、胸膜内（胸膜の中に）、前立腺内（前立腺の中に）、肺内（肺またはその気管支の中に）、洞内（鼻または眼窩周囲の洞の中に）、髄腔内（脊柱の中に）、関節滑液嚢内（関節の滑液腔の中に）、腱内（腱の中に）、精巣内（精巣の中に）、くも膜下腔内（

30

40

50

任意レベルの脳脊髄軸の脳脊髄液の中に)、胸腔内(胸部の中に)、管内(器官の細管の中に)、腫瘍内(腫瘍の中に)、鼓室内(中耳の中に)、血管内(血管(複数可)の中に)、脳室内(脳室の中に)、イオントフォoresis(可溶性塩のイオンを身体組織に移動させる電流による)、灌注(傷口または体腔を浸し、または洗い流すこと)、喉頭(喉頭に直接)、経鼻胃(鼻から胃の中に)、密封包帯技術(局所経路投与後、領域を閉塞する包帯によって覆う)、眼(外眼部へ)、口腔咽頭(口腔及び咽頭に直接)、非経口、経皮、関節周囲、硬膜外、神経周囲、歯周、直腸、呼吸器(局所的または全身的效果のための経口または経鼻吸入によって気道の中に)、眼球後方(脳橋の背後または眼球の背後)、軟部組織、くも膜下、結膜下、粘膜下、局所、経胎盤(胎盤を介してまたは通過して)、経気管(気管の壁を介して)、経鼓膜(鼓室を通過してまたは介して)、尿管(尿管に)、尿道(尿道に)、膣、仙骨麻酔、診断、神経ブロック、胆汁灌流、心臓灌流、フォトフェレーシス、及び脊髄が含まれるがこれらに限定されない。

10

#### 【0796】

いくつかの実施形態では、組成物は、それらを血液脳関門、血管障壁、または他の上皮障壁を通過させることを可能とする方法で投与され得る。オリジネーターコンストラクト、ベンチマークコンストラクト、及び標的化システムは、液体溶液または懸濁液として、液体溶液中の液体溶液または懸濁液に好適な固体形態としてのいずれかの任意の好適な形態で投与され得る。オリジネーターコンストラクト、ベンチマークコンストラクト、及び標的化システムは、任意の適切な及び薬学的に許容可能な賦形剤を用いて製剤化され得る。

20

#### 【0797】

いくつかの実施形態では、オリジネーターコンストラクト、ベンチマークコンストラクト、及び標的化システムは、単一の経路投与を介して対象に送達され得る。

#### 【0798】

いくつかの実施形態では、オリジネーターコンストラクト、ベンチマークコンストラクト、及び標的化システムは、複数部位の経路投与を介して対象に送達され得る。対象は、2、3、4、5、または5を超える部位で投与され得る。

#### 【0799】

いくつかの実施形態では、対象は、ボラス注入を使用してオリジネーターコンストラクト、ベンチマークコンストラクト、及び標的化システムが投与され得る。

30

#### 【0800】

いくつかの実施形態では、対象は、数分、数時間、または数日の期間にわたって持続送達を使用してオリジネーターコンストラクト、ベンチマークコンストラクト、及び標的化システムが投与され得る。注入速度は、対象、分布、製剤または別の送達パラメータに応じて変更され得る。

#### 【0801】

いくつかの実施形態では、オリジネーターコンストラクト、ベンチマークコンストラクト、及び標的化システムは、筋肉内送達経路によって送達され得る。筋肉内投与の非限定的な例には、静脈内注射または皮下注射が含まれる。

#### 【0802】

いくつかの実施形態では、オリジネーターコンストラクト、ベンチマークコンストラクト、及び標的化システムは、経口投与によって送達され得る。経口送達の非限定的な例には、消化管投与及び口腔内投与が含まれる。

40

#### 【0803】

いくつかの実施形態では、オリジネーターコンストラクト、ベンチマークコンストラクト、及び標的化システムは、眼内送達経路によって送達され得る。眼内送達の非限定的な例には、硝子体内注射が含まれる。

#### 【0804】

いくつかの実施形態では、オリジネーターコンストラクト、ベンチマークコンストラクト、及び標的化システムは、鼻腔内送達経路によって送達され得る。鼻腔内送達の非限定

50

的な例には、点鼻または鼻スプレーが含まれる。

【0805】

いくつかの実施形態では、オリジネーターコンストラクト、ベンチマークコンストラクト、及び標的化システムは、末梢注射によって対象に投与され得る。末梢注射の非限定的な例には、腹腔内、筋肉内、静脈内、結膜、または関節注射が含まれる。

【0806】

いくつかの実施形態では、オリジネーターコンストラクト、ベンチマークコンストラクト、及び標的化システムは、脳脊髄液への注射によって送達され得る。脳脊髄液への送達の非限定的な例には、髄腔内及び脳室内投与が含まれる。

【0807】

いくつかの実施形態では、オリジネーターコンストラクト、ベンチマークコンストラクト、及び標的化システムは、全身性送達によって送達され得る。非限定的な例として、全身性送達は、血管内投与によるものであり得る。

【0808】

いくつかの実施形態では、オリジネーターコンストラクト、ベンチマークコンストラクト、及び標的化システムは、頭蓋内送達によって対象に投与され得る。

【0809】

いくつかの実施形態では、オリジネーターコンストラクト、ベンチマークコンストラクト、及び標的化システムは、実質内投与によって対象に投与され得る。

【0810】

いくつかの実施形態では、オリジネーターコンストラクト、ベンチマークコンストラクト、及び標的化システムは、筋肉内投与によって対象に投与され得る。

【0811】

いくつかの実施形態では、オリジネーターコンストラクト、ベンチマークコンストラクト、及び標的化システムは、対象に投与され、対象の筋肉を形質導入する。非限定的な例として、オリジネーターコンストラクト、ベンチマークコンストラクト、及び標的化システムは、筋肉内投与によって投与される。

【0812】

いくつかの実施形態では、オリジネーターコンストラクト、ベンチマークコンストラクト、及び標的化システムは、静脈内投与によって対象に投与され得る。

【0813】

いくつかの実施形態では、オリジネーターコンストラクト、ベンチマークコンストラクト、及び標的化システムは、皮下投与によって対象に投与され得る。

【0814】

いくつかの実施形態では、オリジネーターコンストラクト、ベンチマークコンストラクト、及び標的化システムは、局所投与によって対象に投与され得る。

【0815】

いくつかの実施形態では、オリジネーターコンストラクト、ベンチマークコンストラクト、及び標的化システムは、複数の投与経路によって送達され得る。

【0816】

本明細書に記載のオリジネーターコンストラクト、ベンチマークコンストラクト、及び標的化システムは、1つ以上のオリジネーターコンストラクト、ベンチマークコンストラクト、標的化システム、または治療剤または部位と併せて共投与され得る。

【0817】

VI. 送達のための標的領域、組織または細胞

核酸配列、ポリペプチドまたはペプチド及びその製剤の送達は、本明細書に記載の方法及び標的化送達システムを使用して特定の標的領域、組織または細胞に局在化され得る。

【0818】

腫瘍

いくつかの実施形態では、核酸配列、ポリペプチドまたはペプチド及びその製剤の送達

10

20

30

40

50

は、腫瘍に局在化され得る。腫瘍は、良性腫瘍または悪性腫瘍であり得る。

【0819】

いくつかの実施形態では、核酸配列、ポリペプチドまたはペプチド及びその製剤の送達  
は、結合組織腫瘍、例えば、限定されないが、成人線維組織、胚（粘液腫状）線維組織、  
脂肪組織、軟骨、骨、及び脊索に位置する。非限定的な例として、腫瘍は、成人線維組織  
に位置する線維腫と呼ばれる良性腫瘍である。非限定的な例として、腫瘍は、成人線維組  
織に位置する線維肉腫と呼ばれる悪性腫瘍である。非限定的な例として、腫瘍は、胚線維  
組織に位置する粘液腫と呼ばれる良性腫瘍である。非限定的な例として、腫瘍は、胚線維  
組織に位置する粘液肉腫と呼ばれる悪性腫瘍である。非限定的な例として、腫瘍は、脂肪  
組織に位置する脂肪腫と呼ばれる良性腫瘍である。非限定的な例として、腫瘍は、脂肪組  
織に位置する脂肪肉腫と呼ばれる悪性腫瘍である。非限定的な例として、腫瘍は、軟骨に  
位置する軟骨腫と呼ばれる良性腫瘍である。非限定的な例として、腫瘍は、軟骨に位置す  
る軟骨肉腫と呼ばれる悪性腫瘍である。非限定的な例として、腫瘍は、骨に位置する骨腫  
と呼ばれる良性腫瘍である。非限定的な例として、腫瘍は、骨に位置する骨肉腫と呼ばれ  
る悪性腫瘍である。非限定的な例として、腫瘍は、脊索に位置する脊索腫と呼ばれる悪性  
腫瘍である。非限定的な例として、腫瘍は、結合組織に位置する線維性組織球腫と呼ばれ  
る良性腫瘍である。非限定的な例として、腫瘍は、結合組織に位置する悪性線維性組織球  
腫と呼ばれる悪性腫瘍である。

10

【0820】

いくつかの実施形態では、核酸配列、ポリペプチドまたはペプチド及びその製剤の送達  
は、内皮及び／または中皮腫瘍組織、例えば、限定されないが、血管、リンパ管及び中皮  
に局在化される。非限定的な例として、腫瘍は、血管に位置する血管腫と呼ばれる良性腫  
瘍である。非限定的な例として、腫瘍は、血管に位置する血管周囲細胞腫と呼ばれる良性  
腫瘍である。非限定的な例として、腫瘍は、血管に位置する血管肉腫と呼ばれる悪性腫瘍  
である。非限定的な例として、腫瘍は、血管に位置する脈管肉腫と呼ばれる悪性腫瘍であ  
る。非限定的な例として、腫瘍は、リンパ管に位置するリンパ管腫と呼ばれる良性腫瘍で  
ある。非限定的な例として、腫瘍は、リンパ管に位置するリンパ管肉腫と呼ばれる悪性腫  
瘍である。非限定的な例として、腫瘍は、中皮に位置する中皮腫と呼ばれる悪性腫瘍であ  
る。

20

【0821】

いくつかの実施形態では、核酸配列、ポリペプチドまたはペプチド及びその製剤の送達  
は、血液及びリンパ細胞組織、例えば、限定されないが、造血細胞及びリンパ組織に局在  
化される。非限定的な例として、腫瘍は、造血細胞に位置する前白血病と呼ばれる良性腫  
瘍である。非限定的な例として、腫瘍は、造血細胞に位置する骨髓増殖性障害と呼ばれる  
良性腫瘍である。非限定的な例として、腫瘍は、造血細胞に位置する白血病と呼ばれる悪  
性腫瘍である。非限定的な例として、腫瘍は、リンパ組織に位置する形質細胞増加症と呼  
ばれる良性腫瘍である。非限定的な例として、腫瘍は、リンパ組織に位置する形質細胞腫  
と呼ばれる悪性腫瘍である。非限定的な例として、腫瘍は、リンパ組織に位置する多発性  
骨髓腫と呼ばれる悪性腫瘍である。非限定的な例として、腫瘍は、リンパ組織に位置す  
るホジキンリンパ腫と呼ばれる悪性腫瘍である。非限定的な例として、腫瘍は、リンパ組織  
に位置する非ホジキンリンパ腫と呼ばれる悪性腫瘍である。

30

40

【0822】

いくつかの実施形態では、核酸配列、ポリペプチドまたはペプチド及びその製剤の送達  
は、筋肉組織、例えば、限定されないが、平滑筋及び横紋筋に局在化される。非限定的な  
例として、腫瘍は、平滑筋に位置する平滑筋腫と呼ばれる良性腫瘍である。非限定的な例  
として、腫瘍は、平滑筋に位置する平滑筋肉腫と呼ばれる悪性腫瘍である。非限定的な例  
として、腫瘍は、横紋筋に位置する横紋筋腫と呼ばれる良性腫瘍である。非限定的な例と  
して、腫瘍は、横紋筋に位置する横紋筋肉腫と呼ばれる悪性腫瘍である。

【0823】

いくつかの実施形態では、核酸配列、ポリペプチドまたはペプチド及びその製剤の送達

50

は、上皮組織、例えば、限定されないが、重層扁平組織、腺上皮組織（例えば、肝臓、腎臓、胆管）、移行上皮組織、胎盤及び精巣へ位置する。非限定的な例として、腫瘍は、重層扁平に位置するパピローマと呼ばれる良性腫瘍である。非限定的な例として、腫瘍は、重層扁平に位置する脂漏性角化症と呼ばれる良性腫瘍である。非限定的な例として、腫瘍は、重層扁平組織に位置する扁平上皮癌と呼ばれる悪性腫瘍である。非限定的な例として、腫瘍は、重層扁平組織に位置する類表皮癌と呼ばれる悪性腫瘍である。非限定的な例として、腫瘍は、腺上皮組織に位置する腺腫と呼ばれる良性腫瘍である。非限定的な例として、腫瘍は、肝臓腺上皮組織に位置する肝臓腺腫と呼ばれる良性腫瘍である。非限定的な例として、腫瘍は、腎臓腺上皮組織に位置する尿細管腺腫と呼ばれる良性腫瘍である。非限定的な例として、腫瘍は、胆管腺上皮組織に位置する胆管腺腫と呼ばれる良性腫瘍である。非限定的な例として、腫瘍は、腺上皮組織に位置する腺癌と呼ばれる悪性腫瘍である。非限定的な例として、腫瘍は、肝臓腺上皮組織に位置する肝癌と呼ばれる悪性腫瘍である。非限定的な例として、腫瘍は、肝臓腺上皮組織に位置する肝細胞癌と呼ばれる悪性腫瘍である。非限定的な例として、腫瘍は、腎臓腺上皮組織に位置する腎細胞癌と呼ばれる悪性腫瘍である。非限定的な例として、腫瘍は、腎臓腺上皮組織に位置する副腎腫と呼ばれる悪性腫瘍である。非限定的な例として、腫瘍は、胆管腺上皮組織に位置する胆管癌と呼ばれる悪性腫瘍である。非限定的な例として、腫瘍は、移行上皮組織に位置する移行細胞パピローマと呼ばれる良性腫瘍である。非限定的な例として、腫瘍は、移行上皮組織に位置する移行細胞癌と呼ばれる悪性腫瘍である。非限定的な例として、腫瘍は、胎盤に位置する胞状奇胎と呼ばれる良性腫瘍である。非限定的な例として、腫瘍は、胎盤に位置する絨毛癌と呼ばれる悪性腫瘍である。非限定的な例として、腫瘍は、精巣に位置する精上皮腫と呼ばれる悪性腫瘍である。非限定的な例として、腫瘍は、精巣に位置する胚細胞癌と呼ばれる悪性腫瘍である。

10

20

30

40

50

#### 【0824】

いくつかの実施形態では、核酸配列、ポリペプチドまたはペプチド及びその製剤の送達は、神経組織、例えば、限定されないが、グリア細胞、神経細胞、髄膜、及び神経鞘へ位置する。非限定的な例として、腫瘍は、グリア細胞に位置する神経膠腫（グレードⅠ～Ⅲ）と呼ばれる悪性腫瘍である。非限定的な例として、腫瘍は、グリア細胞に位置する未分化神経膠腫（グレードⅣ）と呼ばれる悪性腫瘍である。非限定的な例として、腫瘍は、グリア細胞に位置する多形性膠芽腫（グレードⅣ）と呼ばれる悪性腫瘍である。非限定的な例として、腫瘍は、神経細胞に位置する神経節細胞腫と呼ばれる良性腫瘍である。非限定的な例として、腫瘍は、神経細胞に位置する神経芽細胞腫と呼ばれる悪性腫瘍である。非限定的な例として、腫瘍は、神経細胞に位置する髄芽腫と呼ばれる悪性腫瘍である。非限定的な例として、腫瘍は、髄膜組織に位置する髄膜腫と呼ばれる良性腫瘍である。非限定的な例として、腫瘍は、髄膜組織に位置する悪性髄膜腫と呼ばれる悪性腫瘍である。非限定的な例として、腫瘍は、神経鞘に位置する神経鞘腫と呼ばれる良性腫瘍である。非限定的な例として、腫瘍は、神経鞘に位置する神経鞘腫と呼ばれる良性腫瘍である。非限定的な例として、腫瘍は、神経鞘に位置する神経線維腫と呼ばれる良性腫瘍である。非限定的な例として、腫瘍は、神経鞘に位置する悪性髄膜腫と呼ばれる悪性腫瘍である。非限定的な例として、腫瘍は、神経鞘に位置する悪性神経鞘腫と呼ばれる悪性腫瘍である。非限定的な例として、腫瘍は、神経鞘に位置する神経線維肉腫と呼ばれる悪性腫瘍である。

#### 【0825】

いくつかの実施形態では、核酸配列、ポリペプチドまたはペプチド及びその製剤の送達

は、アミン前駆体取り込み及び脱炭酸（APUD）システム、例えば、限定されないが、下垂体組織、副甲状腺組織、甲状腺組織、気管支組織、副腎髄質組織、膵臓組織、胃及び腸、頸動脈小体ならびに化学受容体システム組織へ位置する。APUDシステムは、内分泌機能を有し、かつ多様な小さなアミンまたはポリペプチドホルモンを分泌する一連の細胞である。非限定的な例として、腫瘍は、下垂体組織に位置する好塩基性腺腫と呼ばれる良性腫瘍である。非限定的な例として、腫瘍は、下垂体組織に位置する好酸性腺腫と呼ば



れる良性腫瘍である。非限定的な例として、腫瘍は、下垂体組織に位置する嫌色素性腺腫と呼ばれる良性腫瘍である。非限定的な例として、腫瘍は、副甲状腺に位置する副甲状腺腺腫と呼ばれる良性腫瘍である。非限定的な例として、腫瘍は、副甲状腺に位置する副甲状腺がんと呼ばれる悪性腫瘍である。非限定的な例として、腫瘍は、甲状腺組織（C細胞）に位置するc細胞過形成と呼ばれる良性腫瘍である。非限定的な例として、腫瘍は、甲状腺組織（C細胞）に位置する甲状腺の髄様癌と呼ばれる悪性腫瘍である。非限定的な例として、腫瘍は、気管支内膜（クルチッキー細胞）に位置する気管支カルチノイドと呼ばれる悪性腫瘍である。非限定的な例として、腫瘍は、気管支内膜（クルチッキー細胞）に位置する燕麦細胞癌と呼ばれる悪性腫瘍である。非限定的な例として、腫瘍は、副腎髄質に位置する褐色細胞腫と呼ばれる良性腫瘍である。非限定的な例として、腫瘍は、副腎髄質に位置する悪性褐色細胞腫と呼ばれる悪性腫瘍である。非限定的な例として、腫瘍は、脾臓に位置する脾島細胞腺腫と呼ばれる良性腫瘍である。非限定的な例として、腫瘍は、脾臓に位置するインスリノーマと呼ばれる良性腫瘍である。非限定的な例として、腫瘍は、脾臓に位置するガストリノーマと呼ばれる良性腫瘍である。非限定的な例として、腫瘍は、胃及び腸に位置するカルチノイドと呼ばれる良性腫瘍である。非限定的な例として、腫瘍は、胃及び腸に位置する悪性カルチノイドと呼ばれる悪性腫瘍である。非限定的な例として、腫瘍は、頸動脈小体及び化学受容体システムに位置するケモデクトーマと呼ばれる良性腫瘍である。非限定的な例として、腫瘍は、頸動脈小体及び化学受容体システムに位置する傍神経節腫と呼ばれる良性腫瘍である。非限定的な例として、腫瘍は、頸動脈小体及び化学受容体システムに位置する悪性カルチノイドと呼ばれる悪性腫瘍である。非限定的な例として、腫瘍は、頸動脈小体及び化学受容体システムに位置する悪性傍神経節腫と呼ばれる悪性腫瘍である。

10

20

30

40

50

#### 【0826】

いくつかの実施形態では、核酸配列、ポリペプチドまたはペプチド及びその製剤の送達は、神経堤由来細胞、例えば、限定されないが、色素生成細胞（例えば、皮膚及び眼）、末梢神経系のシュワン細胞、及び扁平上皮におけるメルケル細胞に位置する。非限定的な例として、腫瘍は、色素生成細胞、例えば、皮膚及び眼に位置する母斑と呼ばれる良性腫瘍である。非限定的な例として、腫瘍は、色素生成細胞、例えば、皮膚及び眼に位置する黒色腫と呼ばれる悪性腫瘍である。非限定的な例として、腫瘍は、末梢神経系のシュワン細胞に位置する神経鞘腫（schwannoma）または神経鞘腫（neurilemmoma）と呼ばれる良性腫瘍である。非限定的な例として、腫瘍は、末梢神経系のシュワン細胞に位置する悪性神経鞘腫と呼ばれる悪性腫瘍である。非限定的な例として、腫瘍は、扁平上皮におけるメルケル細胞に位置するメルケル細胞新生物と呼ばれる悪性腫瘍である。

#### 【0827】

いくつかの実施形態では、核酸配列、ポリペプチドまたはペプチド及びその製剤の送達は、乳房組織に位置する。非限定的な例として、腫瘍は、線維腺腫と呼ばれる良性腫瘍である。非限定的な例として、腫瘍は、葉状嚢肉腫と呼ばれる悪性腫瘍である。

#### 【0828】

いくつかの実施形態では、核酸配列、ポリペプチドまたはペプチド及びその製剤の送達は、腎原基組織に位置する。非限定的な例として、腫瘍は、ウィルムス腫瘍と呼ばれる悪性腫瘍である。

#### 【0829】

いくつかの実施形態では、核酸配列、ポリペプチドまたはペプチド及びその製剤の送達は、卵巣組織に位置する。

#### 【0830】

いくつかの実施形態では、核酸配列、ポリペプチドまたはペプチド及びその製剤の送達は、精巣組織に位置する。

#### 【0831】

いくつかの実施形態では、核酸配列、ポリペプチドまたはペプチド及びその製剤の送達  
は、胚細胞腫瘍組織に位置する。胚細胞腫瘍の非限定的な例には、精上皮腫、未分化胚細胞腫、絨毛癌、胚性癌、内胚葉洞腫瘍、及び奇形癌が含まれる。

#### 【0832】

いくつかの実施形態では、核酸配列、ポリペプチドまたはペプチド及びその製剤の送達  
は、結合組織ストローマに位置する。これらの腫瘍の非限定的な例は、セルトリ・ライデ  
イツヒ細胞腫瘍、男化腫瘍、粒状包膜細胞腫瘍、門細胞腫瘍、脂質細胞腫瘍である。

#### 【0833】

##### 器官

いくつかの実施形態では、核酸配列、ポリペプチドまたはペプチド及びその製剤の送達  
は、器官に局在化され得る。器官の非限定的な例には、肛門管、動脈、上行結腸、膀胱、  
骨髄、脳、気管支、細気管支、尿道球腺、毛細血管、盲腸、小脳、大脳半球、大脳、子宮  
頸部、脈絡叢、陰核、脳神経、下行結腸、間脳、十二指腸、耳、腸神経系、精巣上体、食  
道、外性器、卵管、胆嚢、神経節、味覚、消化管関連リンパ組織、心臓、回腸、内性器、  
間質、空腸、閥節、腎臓、大腸、喉頭、靱帯、肝臓、肺、リンパ節、リンパ管、乳腺、延  
髄、腸間膜、中脳、口、呼吸筋、鼻腔、神経、嗅覚、卵巣、脾臓、耳下腺、陰茎、咽頭、  
胎盤、橋、前立腺、直腸、唾液腺、陰嚢、精嚢、S状結腸、骨格、皮膚、小腸、脊髄神経  
、脾臓、胃、皮下組織、舌下腺、顎下腺、歯、腱、精巣、脳幹、脊髄、脳室系、胸腺、舌  
、扁桃腺、気管、横行結腸、尿管、尿道、子宮、膺、精管、静脈、及び外陰が含まれる。

#### 【0834】

##### 組織

いくつかの実施形態では、核酸配列、ポリペプチドまたはペプチド及びその製剤の送達  
は、組織に局在化され得る。副腎髄質、成人線維組織、血管、骨、乳房、気管支内膜、頸  
動脈小体、軟骨、結合組織、胚（粘液腫様）線維組織、上皮系、上皮、脂肪、腺上皮（肝  
臓、腎臓、胆管）、生殖腺、造血細胞、リンパ管、リンパ組織、髄膜、中皮、筋肉、神経  
鞘、神経系、脊索、卵巣、脾臓、副甲状腺、下垂体、胎盤、腎原基、平滑筋、胃及び腸、  
重層扁平、横紋筋、ストローマ、精巣、甲状腺、及び移行上皮の非限定的な例。非限定的  
な例として、組織は、結合組織である。

#### 【0835】

##### 細胞

いくつかの実施形態では、核酸配列、ポリペプチドまたはペプチド及びその製剤の送達  
は、特定の細胞タイプに局在化され得る。細胞の非限定的な例には、脂肪細胞、アドレナ  
リン作動性神経細胞、アルファ細胞、アマクリン細胞、エナメル芽細胞、前水晶体上皮細  
胞、脳下垂体前葉／中葉細胞、アポクリン汗腺細胞、星状細胞、コルチ器官の聴覚内有毛  
細胞、コルチ器官の聴覚外有毛細胞、b細胞、バルトリン腺細胞、角膜、舌、口、鼻腔、  
遠位肛門管、遠位尿道、及び遠位膺の基底細胞（幹細胞）、嗅覚上皮の基底細胞、かご細  
胞、好塩基性顆粒球及び前駆体、ベータ細胞、ベッツ細胞、骨髄網状組織線維芽細胞、コ  
ルチ器官のボーダー細胞、境界細胞、ボーマン腺細胞、褐色脂肪細胞、ブルナー腺細胞  
、尿道球腺細胞、房状細胞、c細胞、カハール・レチウス細胞、心筋細胞、心筋細胞、カ  
ートホイール細胞、グルココルチコイドを生成する束状帯の細胞、鉱質コルチコイドを生  
成する球状帯の細胞、アンドロゲンを生成する網状帯の細胞、副腎皮質の細胞、セメント  
芽細胞、腺房中心細胞、耳における耳道腺細胞、シャンドリア細胞、頸動脈小体細胞の化  
学受容体グロムス細胞、主細胞、コリン作動性ニューロン、クロム親和性細胞、クラブ細  
胞、冷感一次感覚ニューロン、結合組織マクロファージ（すべてのタイプ）、角膜線維芽  
細胞（角膜実質細胞）、プロゲステロンを分泌する破裂性卵胞の黄体細胞、皮質毛幹細胞  
、コルチコトロフ、クリスタリン含有レンズ線維細胞、表皮毛幹細胞、細胞傷害性T細  
胞、d細胞、デルタ細胞、樹状細胞、二重ブーケ細胞、導管細胞、エクリン汗腺明細胞、  
エクリン汗腺暗細胞、輸出管細胞、弾性軟骨細胞、内皮細胞、腸グリア細胞、エンテロク  
ロマフィン細胞、エンテロクロマフィン様細胞、腸内分泌細胞、好酸性顆粒球及び前駆体  
、上衣細胞、表皮基底細胞、表皮ランゲルハンス細胞、精巣上体基底細胞、精巣上体主細

胞、上皮細胞、イプシロン細胞、赤血球、線維軟骨細胞、フォークニューロン、腺窩細胞、g細胞、胆嚢上皮細胞、胚細胞、リトレ細胞の腺、まぶたにおけるモル細胞の腺、グリア細胞、ゴルジ細胞、性腺間質細胞、ゴナドトロプ、顆粒細胞、顆粒膜細胞、顆粒膜黄体細胞、グリッド細胞、方向細胞、及び造血幹細胞が含まれる。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの細胞タイプは、がん細胞を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの細胞タイプは、非がん細胞を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの細胞タイプは、がんタイプ及び非がんタイプの両方を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの細胞タイプのがん状態は、不明である。

#### 【0836】

##### 生理的システム

いくつかの実施形態では、核酸配列、ポリペプチドまたはペプチド及びその製剤の送達、生理的システムに局在化され得る。生理的システムの非限定的な例には聴覚、心臓血管、中枢神経系、化学受容体系、循環、消化、内分泌、排泄、外分泌腺、生殖器、外皮、リンパ、筋肉、筋骨格、神経系、末梢神経系、腎臓、生殖、呼吸、泌尿器、及び視覚系が含まれる。

#### 【0837】

##### VII. 検出及び分析の方法

標的化システム（例えば、候補標的化システム及び検証された標的化システム）を含む指向性発見プラットフォームの検出は、使用されるトラッキングシステムに基づいて選択され得る多様な技術（すなわち、検出技術または分析技術（これらの両方は、本明細書で互換的に使用される））を介して行われ得る。

#### 【0838】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の標的化システムは、核画像化技術を利用して検出される。核画像化技術は、本明細書で使用される場合、対象または外部源から放射されたエーテルである放射性発光を利用する任意の画像化、検出、カウント、またはソーティング技術を包含することを意味する。限定されないが、核画像化技術には、X線、機能的磁気共鳴映像法（fMRI）及び核磁気共鳴画像化を含む磁気共鳴映像法（MRI）、コンピューター断層撮影法（CT）、陽電子断層撮影法（PET）、単一光子放射断層撮影（SPECT）、吸収画像化、またはそれらの任意の組み合わせが含まれ得る。これらのアプローチの一般的原理及び手順は、当該技術分野で知られており、Perez-Medina, et. al., Nuclear imaging approaches facilitating nanomedicine translation. Advanced Drug Delivery Reviews 154-155 (2020) 123-141（その内容は、核画像化技術に関してそれらの全体が参照により本明細書に組み込まれる）を参照されたい。

#### 【0839】

いくつかの実施形態では、対象における本明細書に記載の標的化システムの検出は、MRI技術を利用して実施され得る。このアプローチは、知られているまたは発見された任意の方法によって行われ得る。理論に縛られることを望むものではないが、MRIは、所定の核種スピン特徴の検出を利用する。いくつかの実施形態では、MRIは、MRI造影剤、例えば、ガドリニウムベースの小分子、マンガンベースの小分子、酸化鉄ナノ粒子、 $^{19}\text{F}$ ベースの化合物、及びそれらの任意の組み合わせを含む本明細書に記載の標的化システムと共に非侵襲的検出技術として使用され得る。MRI技術は、例として、in vivoでの対象の特定の器官及び組織における標的化システム、ならびに経時的なそれらの分布の変化の検出を可能とし得る。

#### 【0840】

いくつかの実施形態では、対象における本明細書に記載の標的化システムの検出は、CT技術を利用して実施され得る。このアプローチは、知られているまたは発見された任意の方法によって行われ得る。理論に縛られることを望むものではないが、CTは、X線光子と物質との相互作用を利用し、CTは、CT造影剤、例えば、金高比重リポタンパク質

10

20

30

40

50

ナノ粒子（Au-HDL）を含む標的化システムと共に非侵襲的検出技術として使用され得る。CT技術は、例として、*in vivo*での対象の特定の器官及び組織における標的化システム、ならびに経時的なそれらの分布の変化の検出を可能とし得る。

#### 【0841】

いくつかの実施形態では、対象における本明細書に記載の標的化システムの検出は、PET技術を利用して実施され得る。このアプローチは、知られているまたは発見された任意の方法によって行われ得る。理論に縛られることを望むものではないが、PETは、外因的に投与された放射線学的物質、すなわち、放射性トレーサーからの光子放出の検出を利用する。原理的に、PETスキャナーは、陽電子-電子対消滅（同時計数事象）後に反対方向に放射される2つの光子を検出する。PETは、適切な放射性標識、例えば、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{13}\text{N}$ 、 $^{68}\text{Ga}$ 、 $^{18}\text{F}$ 、 $^{64}\text{Cu}$ 、 $^{86}\text{Y}$ 、 $^{76}\text{Br}$ 、 $^{89}\text{Zr}$ 、 $^{72}\text{As}$ 、 $^{124}\text{I}$ 、 $^{74}\text{As}$ 、フッ素-18、ガリウム-68、窒素-13、銅-64、臭素-76、ヨウ素-125、ヒ素-74、炭素-11、ヨウ素-131、 $^{153}\text{Sm}$ 、 $^{177}\text{Lu}$ 、 $^{186}\text{Re}$ 、 $^{188}\text{Re}$ 、 $^{198}\text{Au}$ 、及び $^{225}\text{Ac}$ のいずれかを含む標的化システムと共に侵襲的または非侵襲的検出技術として使用され得る。これらの標識は、構造的要素、カーゴ成分、またはその両方のいずれかにコンジュゲートされ得る。PETスキャンは、経時的なそれらの分布の変化を含む、*in vivo*での対象上、または対象の切除されたサンプル上のいずれかの標的化システムの分布を検出するために実施され得る。PET技術は、器官／組織レベルから細胞タイプレベルまで対象における標的化システムの検出を可能とし得る。いくつかのPET技術は、細胞内レベルでの標的化システムの検出を可能とし得る。

#### 【0842】

いくつかの実施形態では、対象における本明細書に記載の標的化システムの検出は、SPECT技術を利用して実施され得る。このアプローチは、知られているまたは発見された任意の方法によって行われ得る。理論に縛られることを望むものではないが、SPECTは、外因的に投与された放射線学的物質、すなわち、放射性トレーサーからの光子放出の検出を利用する。主に、SPECTスキャナーは、核状態遷移に関連するX線及びガンマ光子を検出する。SPECTは、適切な放射性標識、例えば、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{13}\text{N}$ 、 $^{68}\text{Ga}$ 、 $^{18}\text{F}$ 、 $^{64}\text{Cu}$ 、 $^{86}\text{Y}$ 、 $^{76}\text{Br}$ 、 $^{89}\text{Zr}$ 、 $^{72}\text{As}$ 、 $^{124}\text{I}$ 、 $^{74}\text{As}$ 、フッ素-18、ガリウム-68、窒素-13、銅-64、臭素-76、ヨウ素-125、ヒ素-74、炭素-11、ヨウ素-131、 $^{153}\text{Sm}$ 、 $^{177}\text{Lu}$ 、 $^{186}\text{Re}$ 、 $^{188}\text{Re}$ 、 $^{198}\text{Au}$ 、及び $^{225}\text{Ac}$ のいずれかを含む標的化システムと共に侵襲的または非侵襲的検出技術として使用され得る。これらの標識は、構造的要素、カーゴ成分、またはその両方のいずれかにコンジュゲートされ得る。SPECTスキャンは、経時的なそれらの分布の変化を含む、*in vivo*での対象上、または対象の切除されたサンプル上のいずれかの標的化システムの分布を検出するために実施され得る。SPECT技術は、器官／組織レベルから細胞タイプレベルまでの対象における標的化システムの検出を可能とし得る。いくつかのSPECT技術は、細胞内レベルでの標的化システムの検出を可能とし得る。

#### 【0843】

いくつかの実施形態では、複数の核画像化技術が、単一のトラッキングシステムを含む標的化システムと共に使用され得る。いくつかの実施形態では、複数の核画像化技術は、複数のトラッキングシステムを含む標的化システムを用いて使用され得る。

#### 【0844】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の標的化システムは、光学的画像化技術を利用して検出される。光学的画像化技術は、本明細書で使用される場合、対象または外部源から放射されたエーテルである光子の光放射及び特別な特性を利用する任意の画像化、検出、カウント、またはソーティング技術を包含することを意味する。限定されないが、光学的画像化技術には、可視光学顕微鏡検査、ラマン分光法、蛍光顕微鏡検査、生物発光画像化（BLI）、光断層撮影、またはそれらの任意の組み合わせが含まれ得る。これらの

アプローチの一般的原理及び手順は、当該技術分野で知られており、Drummen, Fluorescent Probes and Fluorescence (Microscopy) Techniques – Illuminating Biological and Biomedical Research. Molecules 2012, 17, 14067–14090, Boutorine, et. al., Fluorescent Probes for Nucleic Acid Visualization in Fixed and Live Cells. Molecules 2013, 18, 15357–15397、及びJuskowiak, Nucleic acid-based fluorescent probes and their analytical potential. Anal. Bioanal. Chem. (2011) 399:3157–3176 (これらの内容は、光学的画像化技術に関してそれらの全体が参照により本明細書に組み込まれる)を参照されたい。

10

【0845】

いくつかの実施形態では、対象における本明細書に記載の標的化システムの検出は、可視蛍光顕微鏡検査技術を利用して実施され得る。蛍光顕微鏡検査技術には、限定されないが共焦点蛍光顕微鏡検査、蛍光反射率画像化、蛍光分子トモグラフィー画像化、及びフェルスター共鳴エネルギー移動(FRET)を含む当該技術分野で知られている広範囲の技術が含まれる。通常、すべての蛍光顕微鏡検査技術は、内因的に存在するまたは外因的に投与された蛍光化合物、すなわち、光または他の電磁波放射線を吸収し、より長い波長で再発光する化合物から放射された光の検出を利用する。蛍光顕微鏡検査技術は、適切な蛍光化合物を含む少なくとも1つのトラッキングシステムを含む標的化システムと共に、侵略的または非侵略的検出技術のいずれかとして使用され得る。限定されないが、そのような蛍光化合物には、緑色蛍光タンパク質、黄色蛍光タンパク質、赤色蛍光タンパク質、Siri-ius、EBFP2、CFP、Cerulean、EGFP、EYFP、mOrange、mCherry、mPlum、NIR、iRFP、EosFP、PamCherry、Dronpa、Dreiklang、asFP595、mMaple、mGeo、mEos2、Dendra2、psCFP2、2, 3, 5, 6-テトラカルバゾール-4-シアノーピリジン(CPy)、蛍光ナノ粒子、または蛍光脂質、フルオレセイン、TAMRA、Cy色素、テキサスレッド、HEX、JOE、オレゴングリーン、ローダミン6G、クマリン、ピレン、DiOC6(3, 3'-ジヘキシルオキサカルボシアニンヨウ化物)、またはそれらの任意の組み合わせが含まれ得る。いくつかの実施形態では、蛍光顕微鏡検査での検出のための標的化システムは、限定されないが、量子ドット、クマリン、ナフタルイミド、フルオレセイン、BODIPY、シアニン、キサンテン、オキサジン、オリゴチオフェン、及びフタロシアニン誘導体(PcDer)を含み得る少なくとも1つのフルオロフォアを含む。これらの蛍光化合物は、標的化システムの構造に組み込まれ、カーゴまたはペイロードとしてロードされ、カーゴまたはペイロードの生成物として発現され、またはそれらの任意の組み合わせであり得る。蛍光顕微鏡検査技術は、経時的なそれらの分布の変化を含む、in vivoでの対象上、または対象の切除されたサンプル上のいずれかの標的化システムの分布を検出するために実施され得る。蛍光顕微鏡検査技術は、器官／組織レベルから細胞タイプレベルまでの対象における標的化システムの検出を可能とし得る。いくつかの蛍光顕微鏡検査技術は、細胞内レベルでの標的化システムの検出を可能とし得る。いくつかの実施形態では、蛍光顕微鏡検査技術は、蛍光活性化セルソーティング(FACS)を利用して投与後に細胞のサンプルをソートするために使用され得る。

20

30

40

【0846】

いくつかの実施形態では、対象における標的化システムの検出は、生物発光画像化(BLI)技術を利用して実施され得る。このアプローチは、知られているまたは発見された任意の方法によって行われ得る。理論に縛られることを望むものではないが、BLI画像化は、生理的条件下で化学的反応の生成物として光を放射する外因的に供給された化合物を利用する。これらの発光は、光及び蛍光顕微鏡検査の様々な技術を介して検出され得る

50

。いくつかの実施形態では、B L I 技術は、生物発光化合物を含む標的化システムと併せて使用され得る。そのような化合物は、ナノ粒子内にまたは送達後の発現のためのカーゴまたはペイロードとして組み込まれ得る。いくつかの実施形態では、生物発光化合物には、ウミシイタケルシフェラーゼ、ガウシアルシフェラーゼ、N a n o l u c ルシフェラーゼ、ホタルルシフェラーゼ、コメツキムシルシフェラーゼ、またはそれらの任意の組み合わせを含むルシフェラーゼが含まれ得るがこれらに限定されない。B L I 技術は、経時的なそれらの分布の変化を含む、i n v i v o での対象上、または対象の切除されたサンプル上のいずれかの指向性発見プラットフォームの分布を検出するために実施され得る。B L I は、器官／組織レベルから細胞タイプレベルまでの対象における標的化システムの検出を可能とし得る。いくつかの B L I 技術は、細胞内レベルでの標的化システムの検出を可能とし得る。いくつかの実施形態では、B L I 技術には、i n v i v o 画像化システム (I V I S) で異なる器官からのルシフェラーゼ発現を定量することが含まれ得る。

10

【0847】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の標的化システムの検出は、ヌクレオチドシーケンシング技術を利用して実施され得る。ヌクレオチドシーケンシング技術は、サンプルにおける識別子 (例えば、バーコード) 配列等のヌクレオチドの既知の配列の存在を検出するために使用され得る。標的化システムを検出するために使用され得るヌクレオチドシーケンシング技術の非限定的な例には、ハイスループットシーケンシング、P C R、ディープシーケンシング、及びそれらの任意の組み合わせが含まれる。

【0848】

20

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の標的化システムの検出は、既知のペプチド配列またはタンパク質 (すなわち、レポーター配列) をコードする機能的ポリヌクレオチド (例えば、D N A、m R N A、または o R N A) を含むトラッキングシステムの生成物を検出することによって実施され得る。いくつかの実施形態では、機能的ポリヌクレオチドは、独自の非機能的ポリペプチド配列 (すなわち、ペプチドまたはタンパク質) をコードする配列を含み得る。いくつかの実施形態では、レポーター配列は、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ ( $\beta$ -g a l) 配列を含み得る。いくつかの実施形態では、レポーター配列は、e G F P、ルシフェラーゼ、遺伝子編集体 (例えば、c a s 9 編集、D N A リードアウト)、o x - 4 0、ベータ6インテグリン、C D 4 5、(3 x) - H A タグを有する表面マーカー、T E V プロテアーゼ部位 (を有するまたは有しない) (3 x) - フラッグタグ、またはそれらの任意の組み合わせを含み得る。いくつかの実施形態では、レポーター配列は、ルシフェラーゼまたは蛍光化合物配列を含み得る。いくつかの実施形態では、機能的配列の発現、及び転じて、標的化システムの存在は、先行開示された任意の技術によって実施され得る。いくつかの実施形態では、レポーター配列を含むトラッキングシステムの生成物を検出することは、発現の生成物を検出するために知られているまたは発見された任意の方法を使用して実施され得る。そのような技術には、液体／ガスクロマトグラフィー、質量分析、光分光法 (吸光度)、ゲル電気泳動、定量的酵素結合免疫吸着アッセイ (E L I S A)、ウエスタンブロットティング、ドットブロットティング、ノーザンブロットティング、タンパク質免疫染色、タンパク質免疫沈降、またはそれらの任意の組み合わせが含まれるがこれらに限定されない。

30

40

【0849】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の標的化システムの検出は、特別に設計されたトラッキングシステムとマッチするように選択された検出システムを利用することによって実施され得る。非限定的な例として、本明細書に記載の標的化システムは、電子顕微鏡検査、熱画像化、超音波画像化、光音響画像化、l a b アッセイ、及びそれらの任意の組み合わせによって検出され得る。

【0850】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の標的化システムの検出は、セルソーティング方法によって認識される成分を含むトラッキングシステムナノ粒子と組み合わせられた、磁性ビーズ、フローサイトメトリー、L C - M S / M S でのペプチドの切断、蛍光活性化

50

セルソーティング（FACS）、またはそれらの任意の組み合わせを含むがこれらに限定されないセルソーティング技術を利用することによって実施され得る。

【0851】

いくつかの実施形態では、検出技術は、1つの製剤またはカーゴのみを一度に分析し得る。いくつかの実施形態では、検出技術は、複数の製剤またはカーゴを一度に分析し得る。いくつかの実施形態では、検出技術は、約1個の製剤、2個の製剤、3個の製剤、4個の製剤、5個の製剤、6個の製剤、7個の製剤、8個の製剤、9個の製剤、10個の製剤、11個の製剤、12個の製剤、13個の製剤、14個の製剤、15個の製剤、16個の製剤、17個の製剤、18個の製剤、19個の製剤、20個の製剤、21個の製剤、22個の製剤、23個の製剤、24個の製剤、25個の製剤、またはそれを超える製剤を一度に分析し得る。いくつかの実施形態では、検出技術は、約1～100個の製剤を分析し得る。非限定的な例として、検出技術は、約1～10、1～20、1～30、1～40、1～50、1～60、1～70、1～80、または1～90個の製剤を分析し得る。いくつかの実施形態では、検出技術は、一度に100個を超える製剤を分析し得る。

10

【0852】

いくつかの実施形態では、標的化システムのライブラリが分析され得る。非限定的な例として、標的化システムは、同じ製剤及び異なる識別子配列または部位を有し得る。別の非限定的な例として、標的化システムは、同じ製剤及び同じ識別子配列または部位を有し得る。別の非限定的な例として、標的化システムは、異なる製剤及び同じ識別子配列または部位を有し得る。別の非限定的な例として、標的化システムは、異なる製剤及び異なる識別子配列または部位を有し得る。

20

【0853】

いくつかの実施形態では、標的化システムのライブラリは、分析のための1つの識別子配列または部位を有し得る。

【0854】

いくつかの実施形態では、標的化システムのライブラリは、分析のための少なくとも2つの識別子配列または部位を有し得る。ライブラリは、分析のための2～10個の識別子配列または部位を有し得る。ライブラリは、分析のための2～100個の識別子配列または部位を有し得る。ライブラリは、分析のための2～500個の識別子配列または部位を有し得る。ライブラリは、分析のための100～500個の識別子配列または部位を有し得る。ライブラリは、分析のための2～1000個の識別子配列または部位を有し得る。ライブラリは、分析のための2～2500個の識別子配列または部位を有し得る。ライブラリは、分析のための1000～2500個の識別子配列または部位を有し得る。ライブラリは、分析のための1000～5000個の識別子配列または部位を有し得る。ライブラリは、分析のための2500～5000個の識別子配列または部位を有し得る。ライブラリは、分析のための4000～5000個の識別子配列または部位を有し得る。

30

【0855】

いくつかの実施形態では、標的化システムのライブラリは、ナノ粒子送達ビヒクルにおいて製剤化された少なくとも1つのオリジネーターコンストラクトまたはベンチマークコンストラクトを有し得る。ライブラリは、1～10000個のナノ粒子を有し得る。ライブラリは、1～10個のナノ粒子を有し得る。ライブラリは、1～100個のナノ粒子を有し得る。ライブラリは、1～500個のナノ粒子を有し得る。ライブラリは、100～500個のナノ粒子を有し得る。ライブラリは、1～1000個のナノ粒子を有し得る。ライブラリは、100～500個のナノ粒子を有し得る。ライブラリは、1000～5000個のナノ粒子を有し得る。ライブラリは、2500～5000個のナノ粒子を有し得る。ライブラリは、1～5000個のナノ粒子を有し得る。ライブラリは、1～10000個のナノ粒子を有し得る。ライブラリは、5000～10000個のナノ粒子を有し得る。非限定的な例として、ナノ粒子は、脂質ナノ粒子であり得る。

40

【0856】

VIII. 使用方法

50

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の指向性送達システムは、疾患、障害及び病態を診断、予防、処置及び／または管理するための治療剤として、または診断剤として使用され得る。治療剤は、個別化医療、イムノオンコロジー、がん、ワクチン、遺伝子編集（例えば、C R I S P R）において使用され得る。

【0857】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の指向性送達システムは、診断目的のためにまたは診断ツールとして使用され得る。

【0858】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の送達システムは、食中毒、胃腸炎、感染性疾患、放置された局所疾患、熱帯病、ベクター媒介疾患、毒素曝露を処置するために使用され得る。

【0859】

薬学的組成物は、P C T公開W O 2 0 1 2 1 3 5 8 0 5（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているように送達され得る。

【0860】

本開示は、薬学的組成物をそれを必要とする対象に投与することを含む方法を提供する。薬学的組成物は、疾患、障害、及び／または病態を予防、処置、診断、または画像化するために有効であり得る任意の投与量及び任意の投与経路を使用して対象に投与され得る。必要とされる正確な量は、限定されないが、対象の種、年齢、及び全般的状態、疾患の重症度、特定の組成物、その投与様式、その活性様式等の要因に応じて対象毎に様々となる。薬学的組成物は、動物、例えば、哺乳動物（例えば、ヒト、飼いならされた動物、ネコ、イヌ、サル、マウス、ラット等）に投与され得る。薬学的組成物のペイロードは、ポリヌクレオチドである。

【0861】

いくつかの実施形態では、その薬学的、予防的、診断的、または画像化組成物は、ヒトに投与される。

【0862】

いくつかの実施形態では、活性剤は、局在的、経口、静脈内、筋肉内、動脈内、髄内、髄腔内、皮下、脳室内、経皮、皮間、直腸、膈内、腹腔内、局所（例えば、粉末、軟膏、クリーム、ゲル、ローション、及び／または液滴による）、粘膜、鼻、口腔内、腸内、硝子体、腫瘍内、舌下；気管内滴下、気管支滴下、及び／または吸入によって；経口スプレー、鼻スプレー、及び／またはエアロゾルとして、及び／または門脈カテーテルを介して、を含むがこれらに限定されない多様な経路のうちの1つ以上によって投与される。

【0863】

いくつかの実施形態では、活性剤は、全身性静脈内注射によって投与される。

【0864】

いくつかの実施形態では、活性剤は、静脈内に及び／または経口で投与される。

【0865】

特定の実施形態では、活性剤は、活性剤が血液脳関門、血管障壁、または他の上皮障壁を通過することを可能とする方法で投与され得る。

【0866】

注射用調製物、例えば、滅菌注射用水性または油性懸濁液は、好適な分散剤、湿潤剤、及び／または懸濁剤を使用して既知の技術に従って製剤化され得る。滅菌注射用調製物は、非毒性の非経口で許容可能な希釈剤及び／または溶媒中の滅菌注射用溶液、懸濁液、及び／またはエマルション、例えば、1，3-ブタンジオール中の溶液であり得る。用いられ得る許容可能なビヒクル及び溶媒の中には、水、リンゲル液、U．S．P．及び等張性塩化ナトリウム溶液がある。滅菌固定油が、溶媒または懸濁媒体として従来から用いられる。この目的のため、合成モノまたはジグリセリドを含む任意の無菌性固定油が用いられ得る。脂肪酸、例えば、オレイン酸は、注射剤の調製において使用され得る。

【0867】

10

20

30

40

50



注射用製剤は、例えば、細菌保持フィルターを介する濾過によって、及び／または使用前に滅菌水または他の滅菌注射用媒体に溶解または分散され得る滅菌固体組成物の形態の滅菌剤を組み込むことによって滅菌され得る。

【0868】

薬学的組成物の局在的、局所及び／または経皮投与のための投薬形態には、軟膏、ペースト、クリーム、ローション、ゲル、粉末、溶液、スプレー、吸入剤及び／またはパッチが含まれ得る。また、本開示は、身体への化合物のコントロールされた送達を提供する付加された利点をしばしば有する経皮パッチの使用を企図する。そのような投薬形態は、例えば、適切な培地に化合物を溶解及び／または分配することによって調製され得る。代替的にまたは追加的に、速度は、速度コントロール膜を提供すること及び／または化合物を

10

【0869】

局所投与に好適な製剤には、液体及び／または半液体調製物、例えば、塗布剤、ローション、水中油及び／または油中水エマルション、例えば、クリーム、軟膏及び／またはペースト、及び／または溶液及び／または懸濁液が含まれるがこれらに限定されない。局所に投与可能な製剤は、例えば、約1%～約10% (w/w) の活性成分を含み得るが、活性成分の濃度は、溶媒における活性成分の溶解限度と同じくらい高い場合があり得る。局所投与のための製剤は、本明細書に記載の追加の成分の1つ以上をさらに含み得る。

【0870】

20

薬学的組成物は、眼投与に好適な製剤で調製、包装、及び／または販売され得る。そのような製剤は、例えば、水性または油性液体賦形剤中の活性成分の0.1/1.0% (w/w) の溶液及び／または懸濁液を含む、点眼剤の形態であり得る。そのような点眼剤は、緩衝剤、塩、及び／または本明細書に記載の任意の追加の成分のうちの1つ以上の他をさらに含み得る。有用である他の眼に投与可能な製剤には、微結晶形態及び／またはリポソーム調製物で活性成分を含むものが含まれる。点耳剤及び／または点眼剤は、本開示の範囲内にあるものとして企図される。

【0871】

通常、最も適切な投与経路は、送達される活性剤の特質（例えば、消化管、血流等の環境におけるその安定性）、患者の状態（例えば、患者が特定の投与経路に耐えることができるかどうか）等を含む多様な要素に依存する。本開示は、薬物送達の科学における可能性のある進歩を考慮した任意の適切な経路による活性剤の送達を包含する。

30

【0872】

所定の実施形態では、本開示による薬学的組成物は、所望の治療的、診断的または予防的効果を得るために、1日当たり約0.0001mg/kg～約100mg/kg、約0.01mg/kg～約50mg/kg、約0.1mg/kg～約40mg/kg、約0.5mg/kg～約30mg/kg、約0.01mg/kg～約10mg/kg、約0.1mg/kg～約10mg/kg、または約1mg/kg～約25mg/kg（対象の体重）を1日1回以上送達するために十分な投薬量レベルで投与され得る。所望の投薬量は、1日3回、1日2回、1日1回、隔日、3日毎、毎週、2週毎、3週毎、または4週毎に送達され得る。所定の実施形態では、所望の投薬量は、複数回の投与（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14回、またはそれを超える投与）を使用して送達され得る。複数回の投与が用いられる場合、分割投薬レジメン、例えば、本明細書に記載のものが使用され得る。

40

【0873】

本開示によれば、分割用量レジメンでの活性剤の投与は、哺乳動物対象においてより高いレベルのタンパク質を生成し得る。本明細書で使用される場合、「分割用量」は、単回単位用量または全1日用量の、2つ以上の用量への分割である。本明細書で使用される場合、「単回単位用量」は、1つの用量で／1回／単一経路／単一接触点で、すなわち、単一投与事象で投与される任意の治療剤の用量である。本明細書で使用される場合、「全1

50

日用量」は、24時間の期間で与えられるまたは処方される量である。それは、単回単位用量として投与され得る。1つの実施形態では、本開示の活性剤は、分割用量で対象に投与される。いくつかの実施形態では、活性剤は、緩衝液のみでまたは本明細書に記載の製剤で製剤化される。

#### 【0874】

本開示のLNPは、1つ以上の他の治療剤、予防剤、診断剤、または造影剤と組み合わせて使用または投与され得る。「と組み合わせて」は、薬剤が同時に投与されなければならない及び／または一緒に送達するために製剤化されなければならないことを意味することは意図されていないが、これらの送達方法は、本開示の範囲内である。薬学的組成物は、1つ以上の他の所望の治療剤または医学的処置と同時に、その前に、またはその後に投与され得る。通常、各薬剤は、その薬剤について決定された用量及び／または時間スケジュールで投与される。いくつかの実施形態では、本開示は、それらのバイオアベイラビリティを改善する、それらの代謝を低減及び／または修飾する、それらの排泄を阻害する、及び／または身体内のそれらの分布を修飾する場合がある薬剤と組み合わせた薬学的、予防的、診断的、または画像化組成物の送達を包含する。

10

#### 【0875】

組み合わせて利用される治療的、予防的、診断的、または画像化活性剤は、単一の薬学的組成物と一緒に投与され、または異なる薬学的組成物で別々に投与され得ることがさらに理解されるであろう。通常、組み合わせて利用される薬剤は、それらが個々に利用されるレベルを超えないレベルで利用されることが予期される。いくつかの実施形態では、組み合わせて利用されるレベルは、個々に利用されるものよりも低くなる。1つの実施形態では、組み合わせは、それぞれまたは一緒に、本明細書に記載の分割投薬レジメンに従って投与され得る。

20

#### 【0876】

組み合わせレジメンにおいて用いるための療法（治療剤または処置）の特定の組み合わせは、所望の治療剤及び／または処置及び達成される所望の治療効果の適合性を考慮する。用いられる療法は、同じ障害について所望の効果を達成し得（例えば、本開示に従ってがんを処置するために有用な薬学的組成物は、化学療法剤と同時に投与され得る）、またはそれらは、異なる効果（例えば、任意の有害作用のコントロール）を達成し得ることも理解される。

30

#### 【0877】

本明細書に開示されるLNPを含有する薬学的組成物は、筋肉内、経動脈的、眼球内、腔、直腸、腹腔内、静脈内、鼻腔内、皮下、内視鏡的、経皮的、筋肉内、脳室内、皮内、髄腔内、局所（例えば、粉末、軟膏、クリーム、ゲル、ローション、及び／または液滴による）、粘膜、鼻、腸、腫瘍内、気管内滴下、気管支滴下、及び／または吸入による；鼻スプレー及び／またはエアロゾル、及び／または門脈カテーテルを介する投与のために製剤化される。

#### 【0878】

薬学的組成物はまた、直接浸漬または浴入れ、カテーテルを介するもの、ゲル、粉末、軟膏、クリーム、ゲル、ローション、及び／または液滴によるもの、薬学的組成物で被覆または含浸されたファブリックまたは生分解性物質等の基材を使用することによるもの等を含むがこれらに限定されない当該技術分野におけるいくつかの方法のいずれかで器官または組織への直接送達のために製剤化され得る。いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、延長放出のために製剤化され得る。特定の実施形態では、活性剤及び／またはその薬学的、予防的、診断的、または画像化組成物は、活性剤が血液脳関門、血管障壁、または他の上皮障壁を通過することを可能とする方法で投与され得る。

40

#### 【0879】

本開示のいくつかの態様では、本開示の活性剤は、標的組織内にまたはその近くに空間的に保持される。薬学的組成物、特に薬学的組成物の活性剤成分（複数可）が標的組織において実質的に保持される（薬学的組成物の少なくとも10、20、30、40、50、

50

60、70、80、85、90、95、96、97、98、99、99.9、99.99 または99.99%超が標的組織において保持されることを意味する) ような条件下で標的組織(1つ以上の標的細胞を含有する)を薬学的組成物と接触させることによって哺乳動物対象の標的組織に薬学的組成物を提供する方法が提供される。有利には、保持は、1つ以上の標的細胞に進入する薬学的組成物に存在する活性剤の成分の量を測定することによって決定される。例えば、対象に投与された活性剤の少なくとも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%超は、投与後の所定期間で細胞内に存在する。

#### 【0880】

本開示の態様は、薬学的組成物が標的組織または器官において実質的に保持されるような条件下で標的組織(1つ以上の標的細胞を含有する)または器官(1つ以上の標的細胞を含有する)を薬学的組成物と接触させることによって、薬学的組成物を哺乳動物対象の標的組織または器官に提供する方法を対象とする。薬学的組成物は、有効量の活性剤を含有する。

10

#### 【0881】

筋肉内及び／または皮下に投与され得る薬学的組成物には、ポリマー、コポリマー、及びゲルが含まれ得るがこれらに限定されない。ポリマー、コポリマー及び／またはゲルは、限定されないが、分子量、粒子サイズ、ペイロード及び／またはモノマーの比等の要素を調整することによって放出動態を修飾するためにさらに調整され得る。非限定的な例として、筋肉内及び／または皮下に投与される製剤には、コポリマー、例えば、ポリ(乳酸-コグリコール酸)が含まれ得る。

20

#### 【0882】

本明細書に記載の薬学的組成物の局在化送達は、例えば、限定されないが、局所送達、眼送達、経皮送達等の方法によって投与され得る。薬学的組成物はまた、例えば、限定されないが、対象の身体が処置中に環境に開放されている場合、局在化送達に通常利用可能ではない身体の一部に局所投与され得る。薬学的組成物はさらに、身体部分を薬学的組成物で浴入れ、浸漬及び／または包囲することによって送達され得る。

#### 【0883】

しかしながら、本開示は、薬物送達の科学における可能性のある進歩を考慮した任意の適切な経路による、本明細書に開示される活性剤、及び／またはその薬学的、予防的、診断的、または画像化組成物の送達を包含する。

30

#### 【0884】

細胞においてポリペプチドを生成する方法

本開示は、哺乳動物細胞において対象となるポリペプチドを生成する方法を提供する。ポリペプチドを生成する方法は、細胞を、対象となるポリペプチドをコードするmRNAを含むLNPを含む本開示の製剤と接触させることを伴う。細胞を脂質ナノ粒子と接触させることにより、mRNAは、細胞に取り込まれ、翻訳されて、対象となるポリペプチドを生成し得る。

#### 【0885】

通常、哺乳動物細胞を、対象となるポリペプチドをコードするmRNAを含むLNPと接触させる工程は、*in vivo*で、*ex vivo*で、培養下で、または*in vitro*で実施され得る。細胞と接触させられる脂質ナノ粒子の量、及び／またはその中のmRNAの量は、接触させられる細胞または組織のタイプ、投与の手段、脂質ナノ粒子及びその中のmRNAの生理化学的特徴(例えば、サイズ、電荷、及び化学的組成)、及び他の因子に依存し得る。通常、脂質ナノ粒子の有効量は、細胞における効率的なポリペプチド生成を可能とするであろう。効率のための測定基準には、ポリペプチド翻訳(ポリペプチド発現によって示される)、mRNA分解のレベル、及び免疫反応インディケーターが含まれ得る。

40

#### 【0886】

mRNAを含むLNPを細胞と接触させる工程は、トランスフェクションを伴い、また

50

は引き起こし得る。LNPの脂質成分に含むリン脂質は、例えば、細胞膜又細胞内膜と相互作用及び／または融合することによって、トランスフェクションを容易化し、及び／またはトランスフェクション効率を増加させ得る。トランスフェクションは、細胞内のmRNAの翻訳を可能とし得る。

#### 【0887】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の脂質ナノ粒子は、治療的に使用され得る。例えば、LNPに含まれるmRNAは、（例えば、翻訳可能な領域において）治療的ポリペプチドをコードし、細胞との接触及び／または細胞への進入（例えば、トランスフェクション）により治療的ポリペプチドを生成し得る。他の実施形態では、LNPに含まれるmRNAは、対象の免疫を改善または増加させ得るポリペプチドをコードし得る。いくつかの実施形態では、mRNAは、顆粒球-コロニー刺激因子またはトラスツズマブをコードし得る。

10

#### 【0888】

いくつかの実施形態では、LNPに含まれるmRNAは、脂質ナノ粒子と接触させられる細胞において実質的に非存在であり得る1つ以上のポリペプチドを置き換え得る組換えポリペプチドをコードし得る。1つ以上の実質的に非存在のポリペプチドは、コード遺伝子またはその制御経路の遺伝子変異に起因して欠いている場合がある。代替的には、mRNAの翻訳によって生成される組換えポリペプチドは、細胞内の、細胞の表面上の、または細胞から分泌された内因性タンパク質の活性をアンタゴナイズし得る。アンタゴナイズ組換えポリペプチドは、変異によって引き起こされる改変された活性または局在化等の内因性タンパク質の活性によって引き起こされる有害な作用に対抗するために所望であり得る。別の代替手段では、mRNAの翻訳によって生成される組換えポリペプチドは、細胞内の、細胞の表面上の、または細胞から分泌された生物学的部位の活性を間接的または直接的にアンタゴナイズし得る。アンタゴナイズされる生物学的部位には、脂質（例えば、コレステロール）、リボタンパク質（例えば、低密度リボタンパク質）、核酸、炭水化物、及び小分子毒素が含まれ得るがこれらに限定されない。mRNAの翻訳によって生成される組換えポリペプチドは、細胞内、例えば、特定の区画、例えば、核内の局在化のために操作され得、または細胞からの分泌または細胞の細胞膜への転移のために操作され得る。

20

#### 【0889】

いくつかの実施形態では、細胞をmRNAを含むLNPと接触させることは、外因性核酸に対する細胞の自然免疫反応を低減し得る。細胞は、翻訳可能な領域を含む第1の外因性mRNAの第1の量を含む第1の脂質ナノ粒子と接触させられ得、第1の外因性mRNAに対する細胞の自然免疫反応のレベルが決定され得る。その後、細胞は、第1の外因性mRNAを含む第2の量を含む第2の組成物と接触させられ得、第2の量は、第1の量と比較して第1の外因性mRNAの量が少ない。代替的には、第2の組成物には、第1の外因性mRNAとは異なる第2の外因性mRNAの第1の量が含まれ得る。細胞を第1及び第2の組成物と接触させる工程は、1回以上繰り返され得る。また、細胞におけるポリペプチド生成（例えば、翻訳）の効率が任意に決定され得、細胞は、標的タンパク質生成効率が達成されるまで第1及び／または第2の組成物と繰り返し再接触させられ得る。

30

40

#### 【0890】

治療剤を細胞及び器官に送達する方法

本明細書では、疾患または障害を処置する方法であって、方法は、それを必要とする対象に本開示の薬学的組成物、例えば、本明細書に記載のLNPを含む薬学的組成物を投与することを含む、方法が提供される。

#### 【0891】

本開示は、活性剤及び／または予防剤、例えば、核酸を哺乳動物細胞または器官に送達する方法を提供する。細胞への治療剤及び／または予防剤の送達は、治療剤及び／または予防剤、例えば、核酸を含むLNPを含む本開示の製剤を対象に投与することを伴い、組成物の投与は、細胞を組成物と接触させることを含む。いくつかの実施形態では、タンパ

50

ク質、細胞傷害剤、放射性イオン、化学療法剤、または核酸（RNA、例えば、mRNA等）は、細胞または器官に送達され得る。治療剤及び／または予防剤がmRNAである例では、細胞を脂質ナノ粒子と接触させることにより、翻訳可能なmRNAは、対象となるポリペプチドを生成するために細胞において翻訳され得る。しかしながら、実質的に翻訳可能ではないmRNAもまた、細胞に送達され得る。実質的に非翻訳可能なmRNAは、ワクチンとして有用であり得、及び／または細胞において他の種の発現を低減するために細胞の翻訳成分を隔離し得る。

#### 【0892】

いくつかの実施形態では、LNPは、特定のタイプまたはクラスの細胞（例えば、特定の器官またはそのシステムの細胞）を標的とし得る。いくつかの実施形態では、対象となる治療剤及び／または予防剤を含むLNPは、哺乳動物肝臓、腎臓、脾臓、大腿、または肺に特異的に送達され得る。特定のクラスの細胞、器官、またはそのシステムもしくはグループへの「特異的送達」は、例えば、哺乳動物へのLNPの投与により、他の目的地と比べてより高い割合の治療剤及び／または予防剤を含む脂質ナノ粒子が対象となる目的地（例えば、組織）に送達されることを意味する。いくつかの実施形態では、特異的送達は、別の目的地（例えば、脾臓）と比較した場合、標的とされる目的地（例えば、対象となる組織、例えば、肝臓）の組織1g当たり治療剤及び／または予防剤の量の2倍、5倍、10倍、15倍、または20倍を超える増加をもたらし得る。いくつかの実施形態では、対象となる組織は、肝臓、腎臓、肺、脾臓、大腿、血管における血管内皮（例えば、冠動脈内または大腿内）または腎臓、及び腫瘍組織（例えば、腫瘍内注射を介する）からなる群から選択される。

#### 【0893】

標的化または特異的送達の別の例として、タンパク質-結合パートナー（例えば、抗体またはその機能的断片、骨格タンパク質、またはペプチド）または細胞表面上の受容体をコードするmRNAがLNPに含まれ得る。mRNAは、脂質、炭水化物、または他の生物学的部位の合成及び細胞外局在化を誘導するために追加的にまたは代わりに使用され得る。代替的には、LNPの他の治療剤及び／または予防剤または要素（例えば、脂質またはリガンド）は、LNPが受容体を含む標的細胞集団とより容易に相互作用し得るように、特定の受容体（例えば、低密度リポタンパク質受容体）に対するそれらの親和性に基づいて選択され得る。いくつかの実施形態では、リガンドには、特異的結合対のメンバー、抗体、モノクローナル抗体、Fv断片、一本鎖Fv（scFv）断片、Fab'断片、F（ab'）<sub>2</sub>断片、シングルドメイン抗体、ラクダ科動物化抗体及びその断片、ヒト化抗体及びその断片、及びその多価バージョン；単一または二重特異的抗体を含む多価結合試薬、例えば、ジスルフィド安定化Fv断片、scFvタンデム、ダイアボディ、トリボディ、またはテトラボディ；ならびにアプタマー、受容体、及び融合タンパク質が含まれ得るがこれらに限定されない。

#### 【0894】

いくつかの実施形態では、リガンドは、細胞標的化特異性の調整を可能とし得る表面結合抗体であり得る。これは、高度に特異的な抗体が所望の標的化部位のための対象となるエピトープに対して樹立され得るので、特に有用である。いくつかの実施形態では、複数の抗体が細胞の表面上に発現し、各抗体は、所望の標的に対する異なる特異性を有し得る。そのようなアプローチは、標的化相互作用のアビディティ及び特異性を増加させ得る。

#### 【0895】

リガンドは、例えば、細胞の所望の局在化または機能に基づいて、生物学的分野における当業者によって、選択され得る。いくつかの実施形態では、エストロゲン受容体リガンド、例えば、タモキシフェンは、細胞表面上の増加した数のエストロゲン受容体を有するエストロゲン依存性乳癌細胞に細胞を標的化し得る。リガンド／受容体相互作用の他の非限定的な例には、CCR1（例えば、関節リウマチ、及び／または多発性硬化症における炎症性関節組織または脳の処置のため）、CCR7、CCR8（例えば、リンパ節組織への標的化）、CCR6、CCR9、CCR10（例えば、腸組織に標的化するため）、C

C R 4、C C R 1 0（例えば、皮膚への標的化のため）、C X C R 4（例えば、向上した移動のため）、H C E L L（例えば、炎症及び炎症性障害、骨髄の処置のため）、アルファ 4 ベータ 7（例えば、腸粘膜標的化のため）、及び V L A - 4 N C A M - 1（例えば、内皮への標的化）が含まれる。通常、標的化（例えば、がん転移）に關与する任意の受容体は、本明細書に記載の方法及び組成物において使用するために利用され得る。

【0896】

標的とされる細胞には、肝細胞、上皮細胞、造血細胞、上皮細胞、内皮細胞、肺細胞、骨細胞、幹細胞、間葉細胞、神経細胞、心臓細胞、脂肪細胞、血管平滑筋細胞、心筋細胞、骨格筋細胞、ベータ細胞、下垂体細胞、滑膜表層細胞、卵巣細胞、精巣細胞、線維芽細胞、B細胞、T細胞、網状赤血球、白血球、顆粒球、及び腫瘍細胞が含まれ得るがこれらに限定されない。

10

【0897】

いくつかの実施形態では、L N Pは、肝細胞を標的とし得る。アポリポタンパク質、例えば、アポリポタンパク質 E（a p o E）は、身体において中性またはほぼ中性の脂質含有脂質ナノ粒子と会合することが示されており、肝細胞の表面上に見られる低密度リポタンパク質受容体（L D L R）等の受容体と会合することが知られている。よって、対象に投与される中性またはほぼ中性の電荷を有する脂質成分を含む L N Pは、対象の身体において a p o Eを獲得し得、その後、標的化様式で L D L Rを含む肝細胞に治療剤及び／または予防剤（例えば、R N A）を送達し得る。

【0898】

20

疾患及び障害を処置する方法

脂質ナノ粒子は、疾患、障害、または病態を処置するために有用である。特に、そのような組成物は、欠けているまたは異常なタンパク質またはポリペプチド活性によって特性化される疾患、障害、または病態の処置において有用である。いくつかの実施形態では、欠けているまたは異常なポリペプチドをコードする m R N Aを含む L N Pを含む本開示の製剤は、細胞に投与または送達され得る。その後の m R N Aの翻訳は、ポリペプチドを生成し得、それにより、ポリペプチドによって引き起こされる活性の非存在または異常な活性によって引き起こされる問題を低減または排除する。翻訳は急速に生じ得るので、方法及び組成物は、急性疾患、障害、または病態、例えば、敗血症、脳卒中、及び心筋梗塞の処置において有用であり得る。L N Pに含まれる治療剤及び／または予防剤はまた、所与の種の転写率を改変することが可能で得、それにより遺伝子発現に影響を及ぼす。

30

【0899】

組成物が投与され得る機能障害性または異常なタンパク質またはポリペプチド活性によって特性化される疾患、障害、及び／または病態には、希少疾患、感染性疾患（ワクチン及び治療剤の両方として）、がん及び増殖性疾患、遺伝子疾患（例えば、嚢胞性線維症）、自己免疫疾患、糖尿病、神経変性疾患、心臓及び腎臓血管疾患、ならびに代謝疾患が含まれるがこれらに限定されない。複数の疾患、障害、及び／または病態は、タンパク質活性の欠如（または適切なタンパク質機能が生じないように実質的に減弱される）によって特性化され得る。そのようなタンパク質は、存在しない場合があり、またはそれらは、本質的に非機能的であり得る。機能障害性タンパク質の特定の例は、嚢胞性線維症を引き起こす C F T Rタンパク質の機能障害性タンパク質バリエントを生成する嚢胞性線維症膜貫通コンダクタンス制御因子（C F T R）遺伝子のミスセンス変異バリエントである。本開示は、R N Aならびに本明細書に開示される P E G化脂質化合物、リン脂質（任意に不飽和）、任意に第2の P E G化脂質、及び構造脂質を含む脂質成分を含む L N Pを投与することによって対象におけるそのような疾患、障害、及び／または病態を処置するための方法であって、R N Aは、対象の細胞に存在する異常なタンパク質活性をアンタゴナイズする、またはそうでなければ克服するポリペプチドをコードする m R N Aであり得る、方法を提供する。

40

【0900】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される脂質ナノ粒子は、抗原タンパク質をコ

50

ードするポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、抗原タンパク質をコードするmRNAまたはcircRNAである。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号1～54から選択されるタンパク質、または配列番号1～54から選択されるタンパク質と約60%の配列同一性、約70%の配列同一性、約80%の配列同一性、約90%の配列同一性、または約95%の配列同一性を有する配列をコードする。

#### 【0901】

本出願は、XML形式で電子的に提出された配列表を含有する。配列表XMLは、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。2022年9月13日に作成された前記XMLファイルは、REG006\_\_SLと名付けられており、サイズが97,563バイトである。

10

#### 【0902】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される脂質ナノ粒子は、疾患または障害を処置する方法において有用である。いくつかの実施形態では、疾患または障害は、食中毒または胃腸炎である。いくつかの実施形態では、食中毒は、Campylobacter jejuni菌、Clostridium difficile菌、Entamoeba histolytica、エンテロトキシンB、ノーウォークウイルス／ノロウイルス、Helicobacter pylori、及びロタウイルスからなる群から選択される病原体によって引き起こされる。

#### 【0903】

いくつかの実施形態では、疾患または障害は、感染性疾患である。いくつかの実施形態では、感染性物質は、カンジダ酵母、コロナウイルス（例えば、SARS-CoV、SARS-CoV-2、MERS-CoV）、エンテロウイルス71、エプスタイン・バーウイルス、グラム陰性菌（例えば、Bordetella）、グラム陽性菌（例えば、Clostridium Tetani、Francisella tularensis、Streptococcus菌、Staphylococcus菌）、肝炎ウイルス、ヒトサイトメガロウイルス、HIV、HPV、インフルエンザウイルス、JCV、Mycobacterium、ポックスウイルス、pseudomonas aeruginosa、toxoplasma gondii、水痘帯状疱疹ウイルス、チクングンヤウイルス、デングウイルス、狂犬病ウイルス、typanosoma cruzi、エボラウイルス、plasmodium falciparum、マールブルグウイルス、日本脳炎ウイルス、セントルイス脳炎ウイルス、ウエストナイルウイルス、及び黄熱病ウイルスからなる群から選択される物質での感染症の結果である。予防的適用

20

30

#### 【0904】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の指向性送達システムは、疾患を予防するためにまたは疾患の進行を安定化するために使用され得る。

#### 【0905】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の指向性送達システムは、将来の疾患または障害を予防するための予防剤として使用され得る。

#### 【0906】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の指向性送達システムは、疾患または障害のさらなる進行を停止させるために使用され得る。

40

#### 【0907】

##### ワクチン

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の指向性送達システムは、ワクチンとして、及び／またはワクチンのものと同様の様式で使用され得る。本明細書で使用される場合、「ワクチン」は、特定の疾患または感染性物質に対する免疫を改善する生物学的調製物である。

#### 【0908】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の指向性送達システムは、治療的領域、例え

50

ば、限定されないが、心臓血管、CNS、皮膚科学、内分泌学、腫瘍学、免疫学、呼吸、及び抗感染症剤のためのワクチンとして、及び／またはそのワクチンのものと同様の様式で使用され得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の指向性送達システムは、食中毒を診断、予防、処置及び／または管理するためのワクチンとして使用され得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の指向性送達システムは、胃腸炎を診断、予防、処置及び／または管理するためのワクチンとして使用され得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の指向性送達システムは、インフルエンザを診断、予防、処置及び／または管理するためのワクチンとして使用され得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の指向性送達システムは、HIVを診断、予防、処置及び／または管理するための予防剤として使用され得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の指向性送達システムは、コロナウイルスを診断、予防、処置及び／または管理するための予防剤として使用され得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の指向性送達システムは、COVID-19を診断、予防、処置及び／または管理するための予防剤として使用され得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の指向性送達システムは、ポリオを診断、予防、処置及び／または管理するための予防剤として使用され得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の指向性送達システムは、破傷風を診断、予防、処置及び／または管理するための予防剤として使用され得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の指向性送達システムは、A型肝炎を診断、予防、処置及び／または管理するための予防剤として使用され得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の指向性送達システムは、B型肝炎を診断、予防、処置及び／または管理するための予防剤として使用され得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の指向性送達システムは、C型肝炎を診断、予防、処置及び／または管理するための予防剤として使用され得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の指向性送達システムは、風疹を診断、予防、処置及び／または管理するための予防剤として使用され得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の指向性送達システムは、Hib (Haemophilus influenzae b型) を診断、予防、処置及び／または管理するための予防剤として使用され得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の指向性送達システムは、麻疹を診断、予防、処置及び／または管理するための予防剤として使用され得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の指向性送達システムは、百日咳 (Pertussis) (百日咳 (Whooping Cough)) を診断、予防、処置及び／または管理するための予防剤として使用され得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の指向性送達システムは、肺炎球菌疾患を診断、予防、処置及び／または管理するための予防剤として使用され得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の指向性送達システムは、ロタウイルスを診断、予防、処置及び／または管理するための予防剤として使用され得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の指向性送達システムは、おたふく風邪を診断、予防、処置及び／または管理するための予防剤として使用され得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の指向性送達システムは、水痘を診断、予防、処置及び／または管理するための予防剤として使用され得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の指向性送達システムは、ジフテリアを診断、予防、処置及び／または管理するための予防剤として使用され得る。

10

20

30

40

#### 【0909】

##### 避妊剤

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の指向性送達システムは、避妊剤として、及び／または避妊剤のものと同様の様式で使用され得る。本明細書で使用される場合、用語、「避妊剤」は、妊娠を予防するために使用され得る任意の薬剤または方法として定義され得る。

#### 【0910】

いくつかの実施形態では、避妊剤は、短期または長期で使用され得る。

#### 【0911】

いくつかの実施形態では、避妊剤は、可逆的または永続的であり得る。

50



## 【0912】

## 診断

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の指向性送達システムは、前述した疾患または障害のいずれかのための診断目的のためにまたは診断ツールとして使用され得る。

## 【0913】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の指向性送達システムは、疾患診断のためのバイオマーカーを検出するために使用され得る。

## 【0914】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の指向性送達システムは、診断画像化目的、例えば、MRI、PET、CTまたは超音波のために使用され得る。

10

## 【0915】

## 研究

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の指向性送達システムは、前述した疾患または障害のいずれかのための診断目的のためにまたは研究ツールとして使用され得る。

## 【0916】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の指向性送達システムは、研究のためのバイオマーカーを検出するために使用され得る。

## 【0917】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の指向性送達システムは、任意の研究実験、例えば、*in vivo*または*in vitro*実験において使用され得る。

20

## 【0918】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の指向性送達システムは、培養細胞において使用され得る。培養細胞は、当業者に知られている任意の起源に由来し得、非限定的な例として、安定な細胞株、動物モデルまたはヒト患者または対照対象に由来し得る。

## 【0919】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の指向性送達システムは、動物モデル（すなわち、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、非ヒト霊長類、モルモット、フェレット、*celegans*、ショウジョウバエ、ゼブラフィッシュ、または当該技術分野で知られている研究目的のために使用される任意の他の動物）において*in vivo*実験において使用され得る。

30

## 【0920】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の指向性送達システムは、ヒト研究実験またはヒト臨床試験において使用され得る。

## 【0921】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の指向性送達システムは、幹細胞及び／または細胞分化において使用され得る。

## 【0922】

## IX. 列挙される実施形態

本開示の実施形態では、本明細書では、薬学的組成物であって、

## 【0923】

a) 対象となる少なくとも1つのタンパク質をコードするポリヌクレオチド、及び

40

## 【0924】

b) 少なくとも1つの脂質を含む送達ビヒクル

## 【0925】

を含み、組成物は、対象における免疫反応を誘発させる、薬学的組成物が提供される。

## 【0926】

一実施形態では、ポリヌクレオチドは、DNAである。

## 【0927】

一実施形態では、ポリヌクレオチドは、RNAである。

## 【0928】

50

一実施形態では、RNAは、低分子干渉RNA (siRNA) である。

【0929】

一実施形態では、siRNAは、細胞における対象となる標的の発現を阻害または抑制する。

【0930】

一実施形態では、阻害または抑制は、約30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%及び100%、または少なくとも20~30%、20~40%、20~50%、20~60%、20~70%、20~80%、20~90%、20~95%、20~100%、30~40%、30~50%、30~60%、30~70%、30~80%、30~90%、30~95%、30~100%、40~50%、40~60%、40~70%、40~80%、40~90%、40~95%、40~100%、50~60%、50~70%、50~80%、50~90%、50~95%、50~100%、60~70%、60~80%、60~90%、60~95%、60~100%、70~80%、70~90%、70~95%、70~100%、80~90%、80~95%、80~100%、90~95%、90~100%または95~100%である。

10

【0931】

一実施形態では、ポリヌクレオチドは、実質的に環状である。

【0932】

一実施形態では、ポリヌクレオチドは、ペイロード配列領域に機能可能に連結された内部リボソーム進入部位 (IRES) 配列を含む。

20

【0933】

一実施形態では、IRES配列は、ピコルナウイルス相補的DNA、脳心筋炎ウイルス (EMCV) 相補的DNA、ポリオウイルス相補的DNA、またはDrosophila melanogasterからのアンテナペディア遺伝子に由来する配列を含む。

【0934】

一実施形態では、ポリヌクレオチドは、終結要素を含み、終結要素は、少なくとも1つの終止コドンを含む。

【0935】

一実施形態では、ポリヌクレオチドは、制御性要素を含む。

【0936】

一実施形態では、ポリヌクレオチドは、少なくとも1つのマスキング剤を含む。

30

【0937】

一実施形態では、実質的に環状のポリヌクレオチドは、in vitro転写を使用して生成される。

【0938】

一実施形態では、ペイロード配列領域は、非コード核酸配列を含む。

【0939】

一実施形態では、ペイロード配列領域は、コード核酸配列を含む。

【0940】

一実施形態では、コード核酸配列は、Campylobacter jejuniのための対象となるタンパク質をコードする。

40

【0941】

一実施形態では、コード核酸配列は、Clostridium difficileのための対象となるタンパク質をコードする。

【0942】

一実施形態では、コード核酸配列は、Entamoeba histolyticaのための対象となるタンパク質をコードする。

【0943】

一実施形態では、コード核酸配列は、エンテロトキシンBのための対象となるタンパク質をコードする。

50

## 【0944】

一実施形態では、コード核酸配列は、ノーウォークウイルスまたはノロウイルスのための対象となるタンパク質をコードする。

## 【0945】

一実施形態では、コード核酸配列は、*Helicobacter pylori*のための対象となるタンパク質をコードする。

## 【0946】

一実施形態では、コード核酸配列は、ロタウイルスのための対象となるタンパク質をコードする。

## 【0947】

一実施形態では、コード核酸配列は、カンジダ酵母のための対象となるタンパク質をコードする。

## 【0948】

一実施形態では、コード核酸配列は、コロナウイルスのための対象となるタンパク質をコードする。

## 【0949】

一実施形態では、コード核酸配列は、SARS-CoVのための対象となるタンパク質をコードする。

## 【0950】

一実施形態では、コード核酸配列は、SARS-CoV-2のための対象となるタンパク質をコードする。

## 【0951】

一実施形態では、コード核酸配列は、MERS-CoVのための対象となるタンパク質をコードする。

## 【0952】

一実施形態では、コード核酸配列は、エンテロウイルス71のための対象となるタンパク質をコードする。

## 【0953】

一実施形態では、コード核酸配列は、エプスタイン・バーウイルスのための対象となるタンパク質をコードする。

## 【0954】

一実施形態では、コード核酸配列は、グラム陰性菌のための対象となるタンパク質をコードする。

## 【0955】

一実施形態では、グラム陰性菌は、*Bordetella*である。

## 【0956】

一実施形態では、コード核酸配列は、グラム陽性菌のための対象となるタンパク質をコードする。

## 【0957】

一実施形態では、グラム陽性菌は、*Clostridium tetani*である。

## 【0958】

一実施形態では、グラム陽性菌は、*Francisella tularensis*である。

## 【0959】

一実施形態では、グラム陽性菌は、*Streptococcus* 菌である。

## 【0960】

一実施形態では、グラム陽性菌は、*Staphylococcus* 菌である。

## 【0961】

一実施形態では、コード核酸配列は、肝炎のための対象となるタンパク質をコードする。

10

20

30

40

50

## 【0962】

一実施形態では、コード核酸配列は、ヒトサイトメガロウイルスのための対象となるタンパク質をコードする。

## 【0963】

一実施形態では、コード核酸配列は、ヒト免疫不全ウイルスのための対象となるタンパク質をコードする。

## 【0964】

一実施形態では、コード核酸配列は、ヒトパピローマウイルスのための対象となるタンパク質をコードする。

## 【0965】

一実施形態では、コード核酸配列は、インフルエンザのための対象となるタンパク質をコードする。

## 【0966】

一実施形態では、コード核酸配列は、ジョンカニンガムウイルスのための対象となるタンパク質をコードする。

## 【0967】

一実施形態では、コード核酸配列は、*Mycobacterium*のための対象となるタンパク質をコードする。

## 【0968】

一実施形態では、コード核酸配列は、ボックスウイルスのための対象となるタンパク質をコードする。

## 【0969】

一実施形態では、コード核酸配列は、*Pseudomonas aeruginosa*のための対象となるタンパク質をコードする。

## 【0970】

一実施形態では、コード核酸配列は、呼吸器合胞体ウイルスのための対象となるタンパク質をコードする。

## 【0971】

一実施形態では、コード核酸配列は、風疹ウイルスのための対象となるタンパク質をコードする。

## 【0972】

一実施形態では、コード核酸配列は、水痘帯状疱疹ウイルスのための対象となるタンパク質をコードする。

## 【0973】

一実施形態では、コード核酸配列は、チクングンヤウイルスのための対象となるタンパク質をコードする。

## 【0974】

一実施形態では、コード核酸配列は、デングウイルスのための対象となるタンパク質をコードする。

## 【0975】

一実施形態では、コード核酸配列は、狂犬病ウイルスのための対象となるタンパク質をコードする。

## 【0976】

一実施形態では、コード核酸配列は、*Trypanosoma cruzi*及び／またはシャーガス病のための対象となるタンパク質をコードする。

## 【0977】

一実施形態では、コード核酸配列は、エボラウイルスのための対象となるタンパク質をコードする。

## 【0978】

一実施形態では、コード核酸配列は、*Plasmodium falciparum*の

10

20

30

40

50

ための対象となるタンパク質をコードする。

【0979】

一実施形態では、コード核酸配列は、マールブルグウイルスのための対象となるタンパク質をコードする。

【0980】

一実施形態では、コード核酸配列は、日本脳炎ウイルスのための対象となるタンパク質をコードする。

【0981】

一実施形態では、コード核酸配列は、セントルイス脳炎ウイルスのための対象となるタンパク質をコードする。

【0982】

一実施形態では、コード核酸配列は、ウエストナイルウイルスのための対象となるタンパク質をコードする。

【0983】

一実施形態では、コード核酸配列は、黄熱病ウイルスのための対象となるタンパク質をコードする。

【0984】

一実施形態では、コード核酸配列は、*Bacillus anthracis*のための対象となるタンパク質をコードする。

【0985】

一実施形態では、コード核酸配列は、ボツリヌス毒素のための対象となるタンパク質をコードする。

【0986】

一実施形態では、コード核酸配列は、リシンのための対象となるタンパク質をコードする。

【0987】

一実施形態では、コード核酸配列は、志賀毒素及び／または志賀様毒素のための対象となるタンパク質をコードする。

【0988】

一実施形態では、ポリヌクレオチドは、少なくとも1つの修飾を含む。

【0989】

一実施形態では、少なくとも1つの修飾は、ピリジン-4-オンリボヌクレオシド、5-アザ-ウリジン、2-チオ-5-アザ-ウリジン、2-チオウリジン、4-チオ-シュードウリジン、2-チオ-シュードウリジン、5-ヒドロキシウリジン、3-メチルウリジン、5-カルボキシメチル-ウリジン、1-カルボキシメチル-シュードウリジン、5-プロピニル-ウリジン、1-プロピニル-シュードウリジン、5-タウリノメチルウリジン、1-タウリノメチル-シュードウリジン、5-タウリノメチル-2-チオ-ウリジン、1-タウリノメチル-4-チオ-ウリジン、5-メチル-ウリジン、1-メチル-シュードウリジン、4-チオ-1-メチル-シュードウリジン、2-チオ-1-メチル-シュードウリジン、1-メチル-1-デアザ-シュードウリジン、2-チオ-1-メチル-1-デアザ-シュードウリジン、ジヒドロウリジン、ジヒドロシュードウリジン、2-チオ-ジヒドロウリジン、2-チオ-ジヒドロシュードウリジン、2-メトキシウリジン、2-メトキシ-4-チオ-ウリジン、4-メトキシ-シュードウリジン、及び4-メトキシ-2-チオ-シュードウリジン、5-アザ-シチジン、シュードイソシチジン、3-メチル-シチジン、N4-アセチルシチジン、5-ホルミルシチジン、N4-メチルシチジン、5-ヒドロキシメチルシチジン、1-メチル-シュードイソシチジン、ピロロ-シチジン、ピロロ-シュードイソシチジン、2-チオ-シチジン、2-チオ-5-メチル-シチジン、4-チオ-シュードイソシチジン、4-チオ-1-メチル-シュードイソシチジン、4-チオ-1-メチル-1-デアザ-シュードイソシチジン、1-メチル-1-デアザ-シュードイソシチジン、ゼブラリン、5-アザ-ゼブラリン、5-メチル-ゼブラリ

10

20

30

40

50

ン、5-アザ-2-チオ-ゼブラリン、2-チオ-ゼブラリン、2-メトキシ-シチジン、2-メトキシ-5-メチル-シチジン、4-メトキシ-シュードイソシチジン、及び4-メトキシ-1-メチル-シュードイソシチジン、2-アミノプリン、2、6-ジアミノプリン、7-デアザ-アデニン、7-デアザ-8-アザ-アデニン、7-デアザ-2-アミノプリン、7-デアザ-8-アザ-2-アミノプリン、7-デアザ-2，6-ジアミノプリン、7-デアザ-8-アザ-2，6-ジアミノプリン、1-メチルアデノシン、N6-メチルアデノシン、N6-イソペンテニルアデノシン、N6-(cis-ヒドロキシイソペンテニル)アデノシン、2-メチルチオ-N6-(cis-ヒドロキシイソペンテニル)アデノシン、N6-グリシニルカルバモイルアデノシン、N6-トレオニルカルバモイルアデノシン、2-メチルチオ-N6-トレオニルカルバモイルアデノシン、N6，N6-ジメチルアデノシン、7-メチルアデニン、2-メチルチオ-アデニン、及び2-メトキシ-アデニン、イノシン、1-メチル-イノシン、ワイオシン、ワイプトシン、7-デアザ-グアノシン、7-デアザ-8-アザ-グアノシン、6-チオ-グアノシン、6-チオ-7-デアザ-グアノシン、6-チオ-7-デアザ-8-アザ-グアノシン、7-メチル-グアノシン、6-チオ-7-メチル-グアノシン、7-メチルイノシン、6-メトキシ-グアノシン、1-メチルグアノシン、N2-メチルグアノシン、N2，N2-ジメチルグアノシン、8-オキソ-グアノシン、7-メチル-8-オキソ-グアノシン、1-メチル-6-チオ-グアノシン、N2-メチル-6-チオ-グアノシン、またはN2，N2-ジメチル-6-チオ-グアノシンである。

10

20

【0990】

一実施形態では、薬学的組成物は、表(I)における任意の脂質、式(CY-I)の構造を有する任意の脂質、式(CY-II)の構造を有する任意の脂質、式(CY-III)の構造を有する任意の脂質、式(CY-IV)の構造を有する任意の脂質、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される少なくとも1つのカチオン性脂質を含む。

【0991】

一実施形態では、カチオン性脂質は、式(CY-I)の構造を有する任意の脂質である。

【0992】

一実施形態では、カチオン性脂質は、化合物CY1、CY2、CY3、CY9、CY10、CY11、CY12、CY22、CY23、CY24、CY30、CY31、CY32、CY33、CY43、CY44、CY45、CY50、CY51、CY52、及びCY53からなる群から選択される。

30

【0993】

一実施形態では、カチオン性脂質は、式(CY-II)の構造を有する任意の脂質である。

【0994】

一実施形態では、カチオン性脂質は、化合物CY4、CY5、CY16、CY17、CY18、CY25、CY26、CY37、CY38、CY39、CY46、CY56、及びCY57からなる群から選択される。

【0995】

一実施形態では、カチオン性脂質は、式(CY-III)の構造を有する任意の脂質である。

40

【0996】

一実施形態では、カチオン性脂質は、化合物CY6、CY14、CY27、CY35、CY47、及びCY55からなる群から選択される。

【0997】

一実施形態では、カチオン性脂質は、式(CY-IV)の構造を有する任意の脂質である。

【0998】

一実施形態では、カチオン性脂質は、化合物CY7、CY8、CY19、CY20、C

50

Y 2 1、C Y 2 8、C Y 2 9、C Y 4 0、C Y 4 1、C Y 4 2、C Y 4 8、C Y 4 9、C Y 5 8、C Y 5 9、及びC Y 6 0からなる群から選択される。

【0999】

一実施形態では、薬学的組成物は、追加のカチオン性脂質を含む。

【1000】

一実施形態では、薬学的組成物は、中性脂質を含む。

【1001】

一実施形態では、薬学的組成物は、アニオン性脂質を含む。

【1002】

一実施形態では、薬学的組成物は、ヘルパー脂質を含む。

10

【1003】

一実施形態では、薬学的組成物は、ステルス脂質を含む。

【1004】

一実施形態では、脂質及びポリヌクレオチドの重量比は、100：1～1：1である。

【1005】

一実施形態では、本明細書に開示される薬学的組成物は、免疫細胞、例えば、T細胞、例えば、T制御性細胞を優先的に標的とする。例えば、開示される薬学的組成物は、肝細胞よりも優先的に免疫細胞を標的とし得る。例示的な非限定的な免疫細胞には、CD8+、CD4+、またはCD8+CD4+細胞が含まれる。いくつかの実施形態では、開示される薬学的組成物は、ペプチド、タンパク質、またはアプタマーベースの標的化リガンドを必要とすることなくカーゴまたはペイロードを免疫細胞に送達する。例えば、WO2021/021634を参照されたい。

20

【1006】

一実施形態では、本明細書に開示される薬学的組成物は、標的化リガンドの非存在下で哺乳動物の肝臓免疫細胞、脾臓T細胞、または肺内皮細胞に送達される。特定のクラスまたはタイプの細胞への特異的送達は、より高い割合の薬学的組成物が、標的タイプまたはクラスの細胞に送達されることを示す。例えば、特異的送達は、標的とされる目的地の組織1g当たりカーゴまたはペイロードの量の2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、15倍、または20倍を超える増加をもたらし得る。

【1007】

一実施形態では、ワクチン製剤は、薬学的組成物を含む。

30

【1008】

一実施形態では、ワクチンは、式(I)～(VI)のいずれかを用いて調製される。

【1009】

一実施形態では、本明細書では、感染性物質に対して対象を免疫する方法であって、対象をワクチン製剤または調製物と接触させること及び免疫反応を誘発させることを含む、方法が提供される。

【1010】

一実施形態では、感染性物質は、*Campylobacter jejuni*、*Clostridium difficile*、*Entamoeba histolytica*、エンテロトキシンB、ノーウォークウイルスまたはノロウイルス、*Helicobacter pylori*、ロタウイルス、カンジダ酵母、SARS-CoV、SARS-CoV-2及びMERS-CoVを含むコロナウイルス、エンテロウイルス71、エプスタイン・バーウイルス、*Bordetella*を含むグラム陰性菌、*Clostridium tetani*、*Francisella tularensis*、*Streptococcus*菌及び*Staphylococcus*菌を含むグラム陽性菌、及び肝炎、ヒトサイトメガロウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、ヒトパピローマウイルス、インフルエンザ、ジョンカニンガムウイルス、*Mycobacterium*、ポックスウイルス、*Pseudomonas aeruginosa*、呼吸器合胞体ウイルス、風疹ウイルス、水痘帯状疱疹ウイルス、チクングンヤウイルス、デングウイルス、狂犬病ウイルス、Try

40

50

panosoma cruzi 及び／またはシャーガス病、エボラウイルス、Plasmodium falciparum、マールブルグウイルス、日本脳炎ウイルス、セントルイス脳炎ウイルス、ウエストナイルウイルス、黄熱病ウイルス、Bacillus anthracis、ボツリヌス毒素、リシン、または志賀毒素及び／または志賀様毒素である。

【1011】

本開示には、以下の列挙される実施形態が含まれる。

【1012】

1. 薬学的組成物であって、

a) 対象となる少なくとも1つのタンパク質をコードするポリヌクレオチド、及び

b) 少なくとも1つの脂質を含む送達ビヒクル

を含み、前記組成物は、対象における免疫反応を誘発させる、前記薬学的組成物。

【1013】

2. 前記ポリヌクレオチドは、DNAである、実施形態1に記載の薬学的組成物。

【1014】

3. 前記ポリヌクレオチドは、RNAである、実施形態1に記載の薬学的組成物。

【1015】

4. 前記RNAは、低分子干渉RNA (siRNA) である、実施形態3に記載の薬学的組成物。

【1016】

5. 前記siRNAは、細胞における対象となる標的の発現を阻害または抑制する、実施形態4に記載の薬学的組成物。

【1017】

6. 前記阻害または抑制は、約30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%及び100%、または少なくとも20~30%、20~40%、20~50%、20~60%、20~70%、20~80%、20~90%、20~95%、20~100%、30~40%、30~50%、30~60%、30~70%、30~80%、30~90%、30~95%、30~100%、40~50%、40~60%、40~70%、40~80%、40~90%、40~95%、40~100%、50~60%、50~70%、50~80%、50~90%、50~95%、50~100%、60~70%、60~80%、60~90%、60~95%、60~100%、70~80%、70~90%、70~95%、70~100%、80~90%、80~95%、80~100%、90~95%、90~100%または95~100%である、実施形態5に記載の薬学的組成物。

【1018】

7. 前記ポリヌクレオチドは、実質的に環状である、実施形態2または3に記載の薬学的組成物。

【1019】

8. 前記ポリヌクレオチドは、ペイロード配列領域に機能可能に連結された内部リボソーム進入部位 (IRES) 配列を含む、実施形態7に記載の薬学的組成物。

【1020】

9. 前記IRES配列は、ピコルナウイルス相補的DNA、脳心筋炎ウイルス (EMCV) 相補的DNA、ポリオウイルス相補的DNA、またはDrosophila melanogasterからのアンテナペディア遺伝子に由来する配列を含む、実施形態8に記載の薬学的組成物。

【1021】

10. 前記ポリヌクレオチドは、終結要素を含み、前記終結要素は、少なくとも1つの終止コドンを含む、実施形態7に記載の薬学的組成物。

【1022】

11. 前記ポリヌクレオチドは、制御性要素を含む、実施形態7に記載の薬学的組成物

10

20

30

40

50



。

【1023】

12. 前記ポリヌクレオチドは、少なくとも1つのマスキング剤を含む、実施形態7～11のいずれかに記載の薬学的組成物。

【1024】

13. 前記実質的に環状のポリヌクレオチドは、*in vitro*転写を使用して生成される、実施形態7～12のいずれかに記載の薬学的組成物。

【1025】

14. 前記ペイロード配列領域は、非コード核酸配列を含む、実施形態7～14のいずれかに記載の薬学的組成物。

【1026】

15. 前記ペイロード配列領域は、コード核酸配列を含む、実施形態7～13のいずれかに記載の薬学的組成物。

【1027】

16. 前記コード核酸配列は、*Campylobacter jejuni*のための対象となるタンパク質をコードする、実施形態15に記載の薬学的組成物。

【1028】

17. 前記コード核酸配列は、*Clostridium difficile*のための対象となるタンパク質をコードする、実施形態15に記載の薬学的組成物。

【1029】

18. 前記コード核酸配列は、*Entamoeba histolytica*のための対象となるタンパク質をコードする、実施形態15に記載の薬学的組成物。

【1030】

19. 前記コード核酸配列は、エンテロトキシンBのための対象となるタンパク質をコードする、実施形態15に記載の薬学的組成物。

【1031】

20. 前記コード核酸配列は、ノーウォークウイルスまたはノロウイルスのための対象となるタンパク質をコードする、実施形態15に記載の薬学的組成物。

【1032】

21. 前記コード核酸配列は、*Helicobacter pylori*のための対象となるタンパク質をコードする、実施形態15に記載の薬学的組成物。

【1033】

22. 前記コード核酸配列は、ロタウイルスのための対象となるタンパク質をコードする、実施形態15に記載の薬学的組成物。

【1034】

23. 前記コード核酸配列は、カンジダ酵母のための対象となるタンパク質をコードする、実施形態15に記載の薬学的組成物。

【1035】

24. 前記コード核酸配列は、コロナウイルスのための対象となるタンパク質をコードする、実施形態15に記載の薬学的組成物。

【1036】

25. 前記コード核酸配列は、SARS-CoVのための対象となるタンパク質をコードする、実施形態15に記載の薬学的組成物。

【1037】

26. 前記コード核酸配列は、SARS-CoV-2のための対象となるタンパク質をコードする、実施形態15に記載の薬学的組成物。

【1038】

27. 前記コード核酸配列は、MERS-CoVのための対象となるタンパク質をコードする、実施形態15に記載の薬学的組成物。

【1039】

10

20

30

40

50

28. 前記コード核酸配列は、エンテロウイルス71のための対象となるタンパク質をコードする、実施形態15に記載の薬学的組成物。

【1040】

29. 前記コード核酸配列は、エプスタイン・バーウイルスのための対象となるタンパク質をコードする、実施形態15に記載の薬学的組成物。

【1041】

30. 前記コード核酸配列は、グラム陰性菌のための対象となるタンパク質をコードする、実施形態15に記載の薬学的組成物。

【1042】

31. 前記グラム陰性菌は、*Bordetella*である、実施形態30に記載の薬学的組成物。

【1043】

32. 前記コード核酸配列は、グラム陽性菌のための対象となるタンパク質をコードする、実施形態15に記載の薬学的組成物。

【1044】

33. 前記グラム陽性菌は、*Clostridium tetani*である、実施形態32に記載の薬学的組成物。

【1045】

34. 前記グラム陽性菌は、*Francisella tularensis*である、実施形態32に記載の薬学的組成物。

【1046】

35. 前記グラム陽性菌は、*Streptococcus*菌である、実施形態32に記載の薬学的組成物。

【1047】

36. 前記グラム陽性菌は、*Staphylococcus*菌である、実施形態32に記載の薬学的組成物。

【1048】

37. 前記コード核酸配列は、肝炎のための対象となるタンパク質をコードする、実施形態15に記載の薬学的組成物。

【1049】

38. 前記コード核酸配列は、ヒトサイトメガロウイルスのための対象となるタンパク質をコードする、実施形態15に記載の薬学的組成物。

【1050】

39. 前記コード核酸配列は、ヒト免疫不全ウイルスのための対象となるタンパク質をコードする、実施形態15に記載の薬学的組成物。

【1051】

40. 前記コード核酸配列は、ヒトパピローマウイルスのための対象となるタンパク質をコードする、実施形態15に記載の薬学的組成物。

【1052】

41. 前記コード核酸配列は、インフルエンザのための対象となるタンパク質をコードする、実施形態15に記載の薬学的組成物。

【1053】

42. 前記コード核酸配列は、ジョンカニンガムウイルスのための対象となるタンパク質をコードする、実施形態15に記載の薬学的組成物。

【1054】

43. 前記コード核酸配列は、*Mycobacterium*のための対象となるタンパク質をコードする、実施形態15に記載の薬学的組成物。

【1055】

44. 前記コード核酸配列は、ボックスウイルスのための対象となるタンパク質をコードする、実施形態15に記載の薬学的組成物。

10

20

30

40

50

## 【1056】

45. 前記コード核酸配列は、*Pseudomonas aeruginosa*のための対象となるタンパク質をコードする、実施形態15に記載の薬学的組成物。

## 【1057】

46. 前記コード核酸配列は、呼吸器合胞体ウイルスのための対象となるタンパク質をコードする、実施形態15に記載の薬学的組成物。

## 【1058】

47. 前記コード核酸配列は、風疹ウイルスのための対象となるタンパク質をコードする、実施形態15に記載の薬学的組成物。

## 【1059】

48. 前記コード核酸配列は、水痘帯状疱疹ウイルスのための対象となるタンパク質をコードする、実施形態15に記載の薬学的組成物。

## 【1060】

49. 前記コード核酸配列は、チクングンヤウイルスのための対象となるタンパク質をコードする、実施形態15に記載の薬学的組成物。

## 【1061】

50. 前記コード核酸配列は、デングウイルスのための対象となるタンパク質をコードする、実施形態15に記載の薬学的組成物。

## 【1062】

51. 前記コード核酸配列は、狂犬病ウイルスのための対象となるタンパク質をコードする、実施形態15に記載の薬学的組成物。

## 【1063】

52. 前記コード核酸配列は、*Trypanosoma cruzi*及び／またはシャーガス病のための対象となるタンパク質をコードする、実施形態15に記載の薬学的組成物。

## 【1064】

53. 前記コード核酸配列は、エボラウイルスのための対象となるタンパク質をコードする、実施形態15に記載の薬学的組成物。

## 【1065】

54. 前記コード核酸配列は、*Plasmodium falciparum*のための対象となるタンパク質をコードする、実施形態15に記載の薬学的組成物。

## 【1066】

55. 前記コード核酸配列は、マールブルグウイルスのための対象となるタンパク質をコードする、実施形態15に記載の薬学的組成物。

## 【1067】

56. 前記コード核酸配列は、日本脳炎ウイルスのための対象となるタンパク質をコードする、実施形態15に記載の薬学的組成物。

## 【1068】

57. 前記コード核酸配列は、セントルイス脳炎ウイルスのための対象となるタンパク質をコードする、実施形態15に記載の薬学的組成物。

## 【1069】

58. 前記コード核酸配列は、ウエストナイルウイルスのための対象となるタンパク質をコードする、実施形態15に記載の薬学的組成物。

## 【1070】

59. 前記コード核酸配列は、黄熱病ウイルスのための対象となるタンパク質をコードする、実施形態15に記載の薬学的組成物。

## 【1071】

60. 前記コード核酸配列は、*Bacillus anthracis*のための対象となるタンパク質をコードする、実施形態15に記載の薬学的組成物。

## 【1072】

10

20

30

40

50

61. 前記コード核酸配列は、ボツリヌス毒素のための対象となるタンパク質をコードする、実施形態15に記載の薬学的組成物。

【1073】

62. 前記コード核酸配列は、リシンのための対象となるタンパク質をコードする、実施形態15に記載の薬学的組成物。

【1074】

63. 前記コード核酸配列は、志賀毒素及び／または志賀様毒素のための対象となるタンパク質をコードする、実施形態15に記載の薬学的組成物。

【1075】

64. 前記ポリヌクレオチドは、少なくとも1つの修飾を含む、実施形態3～63のいずれか1つに記載の薬学的組成物。 10

【1076】

65. 塩基の少なくとも20%が修飾されている、実施形態64に記載の薬学的組成物。

【1077】

66. 塩基の少なくとも30%が修飾されている、実施形態64に記載の薬学的組成物。

【1078】

67. 塩基の少なくとも40%が修飾されている、実施形態64に記載の薬学的組成物。

【1079】

68. 塩基の少なくとも50%が修飾されている、実施形態64に記載の薬学的組成物。

【1080】

69. 塩基の少なくとも60%が修飾されている、実施形態64に記載の薬学的組成物。

【1081】

70. 塩基の少なくとも70%が修飾されている、実施形態64に記載の薬学的組成物。

【1082】

71. 塩基の少なくとも80%が修飾されている、実施形態64に記載の薬学的組成物。 30

【1083】

72. 塩基の少なくとも90%が修飾されている、実施形態64に記載の薬学的組成物。

【1084】

73. 塩基の少なくとも100%が修飾されている、実施形態64に記載の薬学的組成物。

【1085】

74. 特定の塩基が少なくとも1つの修飾を含む、実施形態64に記載の薬学的組成物。 40

【1086】

75. 前記塩基は、アデニンである、実施形態74に記載の薬学的組成物。

【1087】

76. 前記アデニン塩基の少なくとも20%が修飾されている、実施形態75に記載の薬学的組成物。

【1088】

77. 前記アデニン塩基の少なくとも30%が修飾されている、実施形態75に記載の薬学的組成物。

【1089】

78. 前記アデニン塩基の少なくとも40%が修飾されている、実施形態75に記載の薬学的組成物。

【1090】

79. 前記アデニン塩基の少なくとも50%が修飾されている、実施形態75に記載の薬学的組成物。

【1091】

80. 前記アデニン塩基の少なくとも60%が修飾されている、実施形態75に記載の薬学的組成物。

【1092】

81. 前記アデニン塩基の少なくとも70%が修飾されている、実施形態75に記載の薬学的組成物。

【1093】

82. 前記アデニン塩基の少なくとも80%が修飾されている、実施形態75に記載の薬学的組成物。

【1094】

83. 前記アデニン塩基の少なくとも90%が修飾されている、実施形態75に記載の薬学的組成物。

【1095】

84. 前記アデニン塩基の少なくとも100%が修飾されている、実施形態75に記載の薬学的組成物。

【1096】

85. 前記塩基は、グアニンである、実施形態74に記載の薬学的組成物。

【1097】

86. 前記グアニン塩基の少なくとも20%が修飾されている、実施形態85に記載の薬学的組成物。

【1098】

87. 前記グアニン塩基の少なくとも30%が修飾されている、実施形態85に記載の薬学的組成物。

【1099】

88. 前記グアニン塩基の少なくとも40%が修飾されている、実施形態85に記載の薬学的組成物。

【1100】

89. 前記グアニン塩基の少なくとも50%が修飾されている、実施形態85に記載の薬学的組成物。

【1101】

90. 前記グアニン塩基の少なくとも60%が修飾されている、実施形態85に記載の薬学的組成物。

【1102】

91. 前記グアニン塩基の少なくとも70%が修飾されている、実施形態85に記載の薬学的組成物。

【1103】

92. 前記グアニン塩基の少なくとも80%が修飾されている、実施形態85に記載の薬学的組成物。

【1104】

93. 前記グアニン塩基の少なくとも90%が修飾されている、実施形態85に記載の薬学的組成物。

【1105】

94. 前記グアニン塩基の少なくとも100%が修飾されている、実施形態85に記載の薬学的組成物。

【1106】

10

20

30

40

50

95. 前記塩基は、シトシンである、実施形態74に記載の薬学的組成物。

【1107】

96. 前記シトシン塩基の少なくとも20%が修飾されている、実施形態95に記載の薬学的組成物。

【1108】

97. 前記シトシン塩基の少なくとも30%が修飾されている、実施形態95に記載の薬学的組成物。

【1109】

98. 前記シトシン塩基の少なくとも40%が修飾されている、実施形態95に記載の薬学的組成物。

【1110】

99. 前記シトシン塩基の少なくとも50%が修飾されている、実施形態95に記載の薬学的組成物。

【1111】

100. 前記シトシン塩基の少なくとも60%が修飾されている、実施形態95に記載の薬学的組成物。

【1112】

101. 前記シトシン塩基の少なくとも70%が修飾されている、実施形態95に記載の薬学的組成物。

【1113】

102. 前記シトシン塩基の少なくとも80%が修飾されている、実施形態95に記載の薬学的組成物。

【1114】

103. 前記シトシン塩基の少なくとも90%が修飾されている、実施形態95に記載の薬学的組成物。

【1115】

104. 前記シトシン塩基の少なくとも100%が修飾されている、実施形態95に記載の薬学的組成物。

【1116】

105. 前記塩基は、ウラシルである、実施形態74に記載の薬学的組成物。

【1117】

106. 前記ウラシル塩基の少なくとも20%が修飾されている、実施形態105に記載の薬学的組成物。

【1118】

107. 前記ウラシル塩基の少なくとも30%が修飾されている、実施形態105に記載の薬学的組成物。

【1119】

108. 前記ウラシル塩基の少なくとも40%が修飾されている、実施形態105に記載の薬学的組成物。

【1120】

109. 前記ウラシル塩基の少なくとも50%が修飾されている、実施形態105に記載の薬学的組成物。

【1121】

110. 前記ウラシル塩基の少なくとも60%が修飾されている、実施形態105に記載の薬学的組成物。

【1122】

111. 前記ウラシル塩基の少なくとも70%が修飾されている、実施形態105に記載の薬学的組成物。

【1123】

112. 前記ウラシル塩基の少なくとも80%が修飾されている、実施形態105に記載の薬学的組成物。

10

20

30

40

50

載の薬学的組成物。

【1124】

113. 前記ウラシル塩基の少なくとも90%が修飾されている、実施形態105に記載の薬学的組成物。

【1125】

114. 前記ウラシル塩基の少なくとも100%が修飾されている、実施形態105に記載の薬学的組成物。

【1126】

115. 前記少なくとも1つの修飾は、ピリジン-4-オンリボヌクレオシド、5-アザ-ウリジン、2-チオ-5-アザ-ウリジン、2-チオウリジン、4-チオ-シュードウリジン、2-チオ-シュードウリジン、5-ヒドロキシウリジン、3-メチルウリジン、5-カルボキシメチル-ウリジン、1-カルボキシメチル-シュードウリジン、5-プロピニル-ウリジン、1-プロピニル-シュードウリジン、5-タウリノメチルウリジン、1-タウリノメチル-シュードウリジン、5-タウリノメチル-2-チオ-ウリジン、1-タウリノメチル-4-チオ-ウリジン、5-メチル-ウリジン、1-メチル-シュードウリジン、4-チオ-1-メチル-シュードウリジン、2-チオ-1-メチル-シュードウリジン、1-メチル-1-デアザ-シュードウリジン、2-チオ-1-メチル-1-デアザ-シュードウリジン、ジヒドロウリジン、ジヒドロシュードウリジン、2-チオ-ジヒドロウリジン、2-チオ-ジヒドロシュードウリジン、2-メトキシウリジン、2-メトキシ-4-チオ-ウリジン、4-メトキシ-シュードウリジン、及び4-メトキシ-2-チオ-シュードウリジン、5-アザ-シチジン、シュードイソシチジン、3-メチル-シチジン、N4-アセチルシチジン、5-ホルミルシチジン、N4-メチルシチジン、5-ヒドロキシメチルシチジン、1-メチル-シュードイソシチジン、ピロロ-シチジン、ピロロ-シュードイソシチジン、2-チオ-シチジン、2-チオ-5-メチル-シチジン、4-チオ-シュードイソシチジン、4-チオ-1-メチル-シュードイソシチジン、4-チオ-1-メチル-1-デアザ-シュードイソシチジン、1-メチル-1-デアザ-シュードイソシチジン、ゼブラリン、5-アザ-ゼブラリン、5-メチル-ゼブラリン、5-アザ-2-チオ-ゼブラリン、2-チオ-ゼブラリン、2-メトキシ-シチジン、2-メトキシ-5-メチル-シチジン、4-メトキシ-シュードイソシチジン、及び4-メトキシ-1-メチル-シュードイソシチジン、2-アミノプリン、2,6-ジアミノプリン、7-デアザ-アデニン、7-デアザ-8-アザ-アデニン、7-デアザ-2-アミノプリン、7-デアザ-8-アザ-2-アミノプリン、7-デアザ-2,6-ジアミノプリン、7-デアザ-8-アザ-2,6-ジアミノプリン、1-メチルアデノシン、N6-メチルアデノシン、N6-イソペンテニルアデノシン、N6-(cis-ヒドロキシイソペンテニル)アデノシン、2-メチルチオ-N6-(cis-ヒドロキシイソペンテニル)アデノシン、N6-グリシニルカルバモイルアデノシン、N6-トレオニルカルバモイルアデノシン、2-メチルチオ-N6-トレオニルカルバモイルアデノシン、N6, N6-ジメチルアデノシン、7-メチルアデニン、2-メチルチオ-アデニン、及び2-メトキシ-アデニン、イノシン、1-メチル-イノシン、ワイオシン、ワイプトシン、7-デアザ-グアノシン、7-デアザ-8-アザ-グアノシン、6-チオ-グアノシン、6-チオ-7-デアザ-グアノシン、6-チオ-7-デアザ-8-アザ-グアノシン、7-メチル-グアノシン、6-チオ-7-メチル-グアノシン、7-メチルイノシン、6-メトキシ-グアノシン、1-メチルグアノシン、N2-メチルグアノシン、N2, N2-ジメチルグアノシン、8-オキソ-グアノシン、7-メチル-8-オキソ-グアノシン、1-メチル-6-チオ-グアノシン、N2-メチル-6-チオ-グアノシン、またはN2, N2-ジメチル-6-チオ-グアノシンである、実施形態64~114のいずれかに記載の薬学的組成物。

【1127】

116. 表(I)における任意の脂質、式(CY-I)の構造を有する任意の脂質、式(CY-III)の構造を有する任意の脂質、式(CY-IIII)の構造を有する任意の脂

10

20

30

40

50

質、式（CY－IV）の構造を有する任意の脂質、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される少なくとも1つのカチオン性脂質をさらに含む、実施形態1に記載の薬学的組成物。

【1128】

117．前記カチオン性脂質は、式（CY－I）の構造を有する任意の脂質である、実施形態116に記載の薬学的組成物。

【1129】

118．前記カチオン性脂質は、化合物CY1、CY2、CY3、CY9、CY10、CY11、CY12、CY22、CY23、CY24、CY30、CY31、CY32、CY33、CY43、CY44、CY45、CY50、CY51、CY52、及びCY53からなる群から選択される、実施形態117に記載の薬学的組成物。 10

【1130】

119．前記カチオン性脂質は、式（CY－II）の構造を有する任意の脂質である、実施形態116に記載の薬学的組成物。

【1131】

120．前記カチオン性脂質は、化合物CY4、CY5、CY16、CY17、CY18、CY25、CY26、CY37、CY38、CY39、CY46、CY56、及びCY57からなる群から選択される、実施形態119に記載の薬学的組成物。

【1132】

121．前記カチオン性脂質は、式（CY－III）の構造を有する任意の脂質である、実施形態116に記載の薬学的組成物。 20

【1133】

122．前記カチオン性脂質は、化合物CY6、CY14、CY27、CY35、CY47、及びCY55からなる群から選択される、実施形態121に記載の薬学的組成物。

【1134】

123．前記カチオン性脂質は、式（CY－IV）の構造を有する任意の脂質である、実施形態116に記載の薬学的組成物。

【1135】

124．前記カチオン性脂質は、化合物CY7、CY8、CY19、CY20、CY21、CY28、CY29、CY40、CY41、CY42、CY48、CY49、CY58、CY59、及びCY60からなる群から選択される、実施形態123に記載の薬学的組成物。 30

【1136】

125．追加のカチオン性脂質をさらに含む、実施形態116～124のいずれかに記載の薬学的組成物。

【1137】

126．中性脂質をさらに含む、実施形態116～125のいずれかに記載の薬学的組成物。

【1138】

127．アニオン性脂質をさらに含む、実施形態116～126のいずれかに記載の薬学的組成物。 40

【1139】

128．ヘルパー脂質をさらに含む、実施形態116～127のいずれかに記載の薬学的組成物。

【1140】

129．ステルス脂質をさらに含む、実施形態116～128のいずれかに記載の薬学的組成物。

【1141】

130．前記脂質及び前記ポリヌクレオチドの重量比は、約100：1～約1：1である、実施形態116～129のいずれかに記載の薬学的組成物。 50



## 【1142】

131. 実施形態1～130のいずれかに記載の薬学的組成物を含むワクチン製剤。

## 【1143】

132. 実施形態116～130のいずれかに記載の薬学的組成物を含むワクチン調製物。

## 【1144】

133. 感染性物質に対して対象を免疫する方法であって、

a) 対象を実施形態131に記載のワクチン製剤または実施形態132のワクチン調製物と接触させること、及び

b) 免疫反応を誘発させることを含む、前記方法。

10

## 【1145】

134. 前記感染性物質は、*Campylobacter jejuni*、*Clostridium difficile*、*Entamoeba histolytica*、エントロトキシンB、ノーウォークウイルスまたはノロウイルス、*Helicobacter pylori*、ロタウイルス、カンジダ酵母、SARS-CoV、SARS-CoV-2及びMERS-CoVを含むコロナウイルス、エンテロウイルス71、エプスタイン・バーウイルス、*Bordetella*を含むグラム陰性菌、*Clostridium tetani*、*Francisella tularensis*、*Streptococcus*菌及び*Staphylococcus*菌を含むグラム陽性菌、及び肝炎、ヒトサイトメガロウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、ヒトパピローマウイルス、インフルエンザ、ジョンカニンガムウイルス、*Mycobacterium*、ポックスウイルス、*Pseudomonas aeruginosa*、呼吸器合胞体ウイルス、風疹ウイルス、水痘帯状疱疹ウイルス、チクングンヤウイルス、デングウイルス、狂犬病ウイルス、*Trypanosoma cruzi*及び／またはシャーガス病、エボラウイルス、*Plasmodium falciparum*、マールブルグウイルス、日本脳炎ウイルス、セントルイス脳炎ウイルス、ウエストナイルウイルス、黄熱病ウイルス、*Bacillus anthracis*、ボツリヌス毒素、リシン、または志賀毒素及び／または志賀様毒素である、実施形態133に記載の方法。

20

## 【1146】

135. 前記接触させることは、経腸（腸内に）、胃腸、硬膜周囲（硬膜内に）、経口（口經由で）、経皮、脳内（大脳内に）、脳室内（脳室内に）、皮膚上（皮膚への塗布）、皮内（皮膚自体の中に）、皮下（皮膚の下に）、鼻腔内投与（経鼻で）、静脈内（静脈の中に）、静脈内ボラス、点滴静注、動脈内（動脈の中に）、筋肉内（筋肉の中に）、心臓内（心臓の中に）、骨内注入（骨髄の中に）、髄腔内（脊柱管の中に）、実質内（脳組織の中に）、腹腔内（腹腔の中への注入または注射）、膀胱内注入、硝子体内（経眼で）、海綿体内注入（病的腔の中に）、腔内（陰茎の基部の中に）、腔内投与、子宮内、羊膜外投与、経皮（全身分布用のインタクトな皮膚を介した拡散）、経粘膜（粘膜を介した拡散）、経腔、吹送法（吸引）、舌下、唇下、浣腸、点眼（結膜の上に）、点耳、耳介（耳の中または耳を介して）、頬側（頬に向けて）、結膜、皮膚、歯科的（歯（複数可）に）、電気浸透、子宮頸管内、洞内、気管内、体外、血液透析、浸透、間質内、腹腔内、羊膜内、関節内、胆管内、気管支内、嚢内、軟骨内（軟骨の中に）、尾内（馬尾の中に）、大槽内（小脳延髄大槽の中に）、角膜内（角膜の中に）、歯冠内、冠動脈内（冠動脈の中に）、海綿体内（陰茎の海綿体の拡張可能な空間の中に）、椎間板内（椎間板の中に）、管内（腺管の中に）、十二指腸内（十二指腸の中に）、硬膜内（硬膜の中または下に）、表皮内（表皮に）、食道内（食道に）、胃内（胃の中に）、歯肉内（歯肉の中に）、回腸内（小腸の遠位部分の中に）、病巣内（局在化病巣の中にまたはそれに直接導入される）、管腔内（管の内腔内）、リンパ内（リンパの中に）、髄内（骨の骨髄腔の中に）、髄膜内（髄膜の中に）、心筋内（心筋の中に）、眼内（眼の中に）、卵巣内（卵巣の中に）、心膜内（心膜の中に）、胸膜内（胸膜の中に）、前立腺内（前立腺の中に）、肺内（肺またはその気管支の中に）、洞内（鼻または眼窩周囲の洞の中に）、髄腔内（脊柱の中に）

30

40

50

、関節滑液嚢内（関節の滑液腔の中に）、腱内（腱の中に）、精巣内（精巣の中に）、くも膜下腔内（任意レベルの脳脊髄軸の脳脊髄液の中に）、胸腔内（胸部の中に）、管内（器官の細管の中に）、腫瘍内（腫瘍の中に）、鼓室内（中耳の中に）、血管内（血管（複数可）の中に）、脳室内（脳室の中に）、イオントフォレシス（可溶性塩のイオンを身体組織に移動させる電流による）、灌注（傷口または体腔を浸し、または洗い流すこと）、喉頭（喉頭に直接）、経鼻胃（鼻から胃の中に）、密封包帯技術（局所経路投与後、領域を閉塞する包帯によって覆う）、眼（外眼部へ）、口腔咽頭（口腔及び咽頭に直接）、非経口、経皮、関節周囲、硬膜外、神経周囲、歯周、直腸、呼吸器（局在的または全身的效果のための経口または経鼻吸入によって気道の中に）、眼球後方（脳橋の背後または眼球の背後）、軟部組織、くも膜下、結膜下、粘膜下、局所、経胎盤（胎盤を介してまたは通過して）、経気管（気管の壁を介して）、経鼓膜（鼓室を通過してまたは介して）、尿管（尿管に）、尿道（尿道に）、膣、仙骨麻酔、診断、神経ブロック、胆汁灌流、心臓灌流、フォトフェレーシス、または脊髄である、実施形態 1 3 3 に記載の方法。

10

【1 1 4 7】

1 3 6. 対象となる少なくとも 1 つのタンパク質をコードするポリヌクレオチドを、それを必要とする対象の免疫細胞に送達する方法であって、前記方法は、実施形態 1 ~ 1 3 0 のいずれか 1 つに記載の薬学的組成物を前記対象に投与することを含む、前記方法。

【1 1 4 8】

1 3 7. 前記免疫細胞は、T 細胞である、実施形態 1 3 6 に記載の方法。

【1 1 4 9】

1 3 8. 前記 T 細胞は、CD 8 + T 細胞である、実施形態 1 3 7 に記載の方法。

【1 1 5 0】

1 3 9. 前記 T 細胞は、T 制御性細胞である、実施形態 1 3 7 に記載の方法。

【1 1 5 1】

1 4 0. 前記 T 細胞は、CD 4 + T 細胞である、実施形態 1 3 7 に記載の方法。

【1 1 5 2】

1 4 1. 前記免疫細胞は、マクロファージ、樹状細胞、または肝臓免疫細胞である、実施形態 1 3 6 に記載の方法。

【1 1 5 3】

X. 定義

用語「化合物」または「構造」は、本明細書で使用される場合、示される構造のすべての立体異性体、幾何異性体、互変異性体、及び同位体を含むことを意味する。

【1 1 5 4】

本明細書に記載の化合物または構造は、非対称であり得る（例えば、1 つ以上の立体中心を有する）。別途示されない限り、すべての立体異性体、例えば、エナンチオマー及びジアステレオマーが意図される。非対称的に置換された炭素原子を含有する本開示の化合物は、光学活性またはラセミ形態で単離され得る。光学的に活性な出発物質から光学的に活性な形態を調製する手法に関する方法は、当該技術分野において知られており、ラセミ混合物の分割によるもの、または立体選択的合成によるもの等である。オレフィン、C = N 二重結合等の多くの幾何異性体も本明細書に記載の化合物に存在し得、すべてのそのような安定な異性体は、本開示において企図される。本開示の化合物のシス及びトランス幾何異性体が記載され、異性体の混合物としてまたは分離された異性体形態として単離され得る。

40

【1 1 5 5】

本開示の化合物または構造にはまた、互変異性形態が含まれる。互変異性形態は、単結合と隣接二重結合との交換及びプロトンの付随移動に起因する。互変異性形態には、同じ実験式及び全電荷を有する異性体プロトン化状態であるプロトトロピー互変異性体が含まれる。例示的なプロトトロピー互変異性体には、ケトン-エノール対、アミド-イミド酸対、ラクタム-ラクチム対、アミド-イミド酸対、エナミン-イミン対、ならびにプロトンが複素環系の 2 つ以上の位置を占有し得る環状形態、例えば、1 H-及び 3 H-イミダ

50

ゾール、1 H-、2 H-及び4 H-1, 2, 4-トリアゾール、1 H-及び2 H-イソインドール、ならびに1 H-及び2 H-ピラゾールが含まれる。互変異性形態は、平衡であり得、または適切な置換によって1つの形態に立体的に固定され得る。

#### 【1156】

本開示の化合物または構造にはまた、中間体または最終化合物において存在する原子の同位体のすべてが含まれる。「同位体」は、同じ原子番号を有するが、核における異なる中性子数に起因して異なる質量数を有する原子を指す。例えば、水素の同位体には、トリチウム及び重水素が含まれる。

#### 【1157】

本開示の化合物または構造及び塩は、慣用の方法によって溶媒和物及び水和物を形成するために溶媒または水分子と組み合わせて調製され得る。

#### 【1158】

用語「アルキル」は、直鎖アルキル基、分岐鎖アルキル基、シクロアルキル（脂環式）基、アルキルで置換されたシクロアルキル基、及びシクロアルキルで置換されたアルキル基を含む飽和脂肪族基のラジカルを指す。

#### 【1159】

いくつかの実施形態では、直鎖または分岐鎖アルキルは、その骨格において30個以下（例えば、直鎖の場合C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub>、分岐鎖の場合C<sub>3</sub>-C<sub>30</sub>）、20個以下、12個以下、または7個以下の炭素原子を有する。同様に、いくつかの実施形態では、シクロアルキルは、それらの環構造において3~10個の炭素原子を有し、例えば、環構造において5、6または7個の炭素を有する。明細書、実施例、及び特許請求の範囲全体を通して使用される用語「アルキル」（または「低級アルキル」）は、「非置換アルキル」及び「置換アルキル」の両方を含むことが意図され、その後者は、炭化水素骨格の1つ以上の炭素上の水素を置き換える1つ以上の置換基を有するアルキル部位を指す。そのような置換基には、ハロゲン、ヒドロキシル、カルボニル（例えば、カルボキシル、アルコキシカルボニル、ホルミル、またはアシル）、チオカルボニル（例えば、チオエステル、チオアセテート、またはチオホルメート）、アルコキシル、ホスホリル、ホスフェート、ホスホネート、ホスフィネート、アミノ、アミド、アミジン、イミン、シアノ、ニトロ、アジド、スルフヒドリル、アルキルチオ、スルフェート、スルホネート、スルファモイル、スルホンアミド、スルホニル、ヘテロシクリル、アラルキル、または芳香族もしくはヘテロ芳香族部位が含まれるがこれらに限定されない。

#### 【1160】

別途炭素の数が指定されない限り、「低級アルキル」は、本明細書で使用される場合、上で定義されるとおりのアルキル基であるが、その骨格構造において1~10個の炭素、または1~6個の炭素原子を有するものを意味する。同様に、「低級アルケニル」及び「低級アルキニル」は、同様の鎖長を有する。いくつかの実施形態では、アルキル基は、低級アルキルである。いくつかの実施形態では、本明細書でアルキルと指定される置換基は、低級アルキルである。

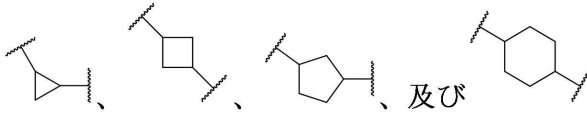
#### 【1161】

用語「アルキレニル」は、本明細書で使用される場合、直鎖または分岐鎖アルキル基の二価ラジカルを指す。1つの実施形態では、アルキレニルは、C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>アルキルの二価形態、すなわち、C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>アルキレニルである。1つの実施形態では、アルキレニルは、C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>アルキルの二価形態、すなわち、C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>アルキレニルである。1つの実施形態では、アルキレニルは、C<sub>2</sub>-C<sub>14</sub>アルキルの二価形態、すなわち、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>アルキレニルである。1つの実施形態では、アルキレニルは、非置換C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>アルキルの二価形態、すなわち、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>アルキレニルである。別の実施形態では、アルキレニルは、非置換C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>アルキルの二価形態、すなわち、C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>アルキレニルである。非限定的な例示的なアルキレニル基には、-CH<sub>2</sub>-、-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-、-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-、-CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>-、-CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-、-CH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>-、及び-CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>-が含まれる。

## 【1162】

用語「シクロアルキレニル」は、本明細書で使用される場合、シクロアルキル基の二価ラジカルを指す。1つの実施形態では、シクロアルキレニルは、 $C_3 - 8$ シクロアルキルの二価形態、すなわち、 $C_3 - C_8$ シクロアルキレニルである。非限定的な例示的なシクロアルキレニル基には、

## 【化65】



10

が含まれる。

## 【1163】

炭化水素鎖上で置換された部位は、適切な場合、それら自体が置換され得ることが当業者によって理解される。例えば、置換されたアルキル置換基には、ハロゲン、ヒドロキシ、ニトロ、チオール、アミノ、アジド、イミノ、アミド、ホスホリル（ホスホネート及びホスフィネートを含む）、スルホニル（スルフェート、スルホンアミド、スルファモイル及びスルホネートを含む）、及びシリル基、ならびにエーテル、アルキルチオ、カルボニル（ケトン、アルデヒド、カルボキシレート、及びエステルを含む）、 $-CF_3$ 、 $-CN$ 等が含まれ得る。シクロアルキルは、同じ様式で置換され得る。

20

## 【1164】

用語「ヘテロアルキル」は、本明細書で使用される場合、少なくとも1つのヘテロ原子を含有する直鎖または分岐鎖、または環状炭素を含有するラジカル、またはそれらの組み合わせを指す。好適なヘテロ原子には、O、N、Si、P、Se、B、及びSが含まれるがこれらに限定されず、リン及び硫黄原子は、任意に酸化されており、窒素ヘテロ原子は、任意に四級化されている。ヘテロアルキルは、アルキル基について上で定義されるように置換され得る。

## 【1165】

用語「アルキルチオ」は、上で定義されるとおりのアルキル基であって、それに結合した硫黄ラジカルを有するものを指す。いくつかの実施形態では、「アルキルチオ」部位は、 $-S-$ アルキル、 $-S-$ アルケニル、及び $-S-$ アルキニルのうちの1つによって表される。代表的なアルキルチオ基には、メチルチオ、及びエチルチオが含まれる。用語「アルキルチオ」はまた、シクロアルキル基、アルケン及びシクロアルケン基、及びアルキン基を包含する。「アリールチオ」は、アリールまたはヘテロアリール基を指す。アルキルチオ基は、アルキル基について上で定義されるように置換され得る。

30

## 【1166】

用語「アルケニル」及び「アルキニル」は、上述したアルキルと長さ及び可能性のある置換が類似するが、少なくとも1つの二重または三重結合をそれぞれ含有する不飽和脂肪族基を指す。1つの実施形態では、アルケニルは、1つの二重結合を含有する。別の実施形態では、アルケニルは、2つの二重結合を含有する。別の実施形態では、アルケニルは、3つの二重結合を含有する。

40

## 【1167】

用語「アルケニレニル」は、本明細書で使用される場合、アルケニル基の二価ラジカルを指す。1つの実施形態では、アルケニレニルは、 $C_2 - 12$ アルケニル、すなわち、 $C_2 - C_{12}$ アルケニレニルの二価形態である。1つの実施形態では、アルケニレニルは、 $C_2 - 6$ アルケニル、すなわち、 $C_2 - C_{10}$ アルケニレニルの二価形態である。1つの実施形態では、アルケニレニルは、 $C_2 - 14$ アルケニル、すなわち、 $C_2 - C_8$ アルケニレニルの二価形態である。1つの実施形態では、アルキレニルは、非置換 $C_2 - 6$ アル

50

ケニル、すなわち、 $C_2-C_6$  アルケニレニルの二価形態である。別の実施形態では、アルキレニルは、非置換  $C_2-4$  アルキル、すなわち、 $C_2-C_4$  アルケニレニルの二価形態である。非限定的な例示的なアルケニレニル基には、 $-CH=CH-$ 、 $-CH_2CH=CH-$ 、 $-CH_2CH_2CH=CHCH_2-$ 、及び  $-CH_2CH=CHCH_2CH=CHCH_2CH_2-$  が含まれる。

【1168】

用語「アルコキシル」または「アルコキシ」は、本明細書で使用される場合、上で定義されるとおりのアルキル基であって、それに結合した酸素ラジカルを有するものを指す。代表的なアルコキシル基には、メトキシ、エトキシ、プロピルオキシ、及び *tert*-ブトキシが含まれる。「エーテル」は、酸素によって共有結合的に連結された2つの炭化水素である。したがって、アルキルの置換基であって、そのアルキルをエーテルにするものは、 $-O-$ アルキル、 $-O-$ アルケニル、及び  $-O-$ アルキニルのうちの1つによって表され得るように、アルコキシルであり、またはそれに似ている。アロキシは、 $-O-$ アリールまたは  $O-$ ヘテロアリールによって表され得、アリール及びヘテロアリールは、下で定義されるとおりである。アルコキシ及びアロキシ基は、アルキルについて上述したように置換され得る。

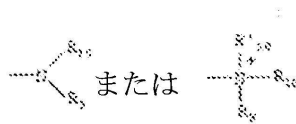
10

【1169】

用語「アミン」及び「アミノ」は、当該技術分野で認識されており、非置換及び置換アミンの両方、例えば、一般式：

【化66】

20



(式中、 $R_9$ 、 $R_{10}$ 、及び  $R'_{10}$  は、それぞれ独立して、水素、アルキル、アルケニル、 $-(CH_2)_m-R_8$  を表し、または  $R_9$  及び  $R_{10}$  は、それらが結合したN原子と一緒に、環構造において4~8個の原子を有する完全な複素環を形成し； $R_8$  は、アリール、シクロアルキル、シクロアルケニル、複素環または多環を表し； $m$  は、ゼロまたは1~8の範囲の整数である) によって表され得る部位を指す。いくつかの実施形態では、 $R_9$  または  $R_{10}$  の一方のみがカルボニルであり得、例えば、 $R_9$ 、 $R_{10}$  及び窒素は一緒にイミドを形成しない。さらに他の実施形態では、用語「アミン」は、アミド、例えば、 $R_9$  及び  $R_{10}$  の一方がカルボニルを表すものを包含しない。追加の実施形態では、 $R_9$  及び  $R_{10}$  (及び任意に  $R'_{10}$ ) は、それぞれ独立して、水素、アルキルもしくはシクロアルキル、アルケニルもしくはシクロアルケニル、またはアルキニルを表す。よって、用語「アルキルアミン」は、本明細書で使用される場合、上で定義されるとおりのアミン基であって、それに結合した置換(アルキルについて上述されている)または非置換アルキルを有するものを意味し、すなわち、 $R_9$  及び  $R_{10}$  のうちの少なくとも1つは、アルキル基である。

30

【1170】

用語「アミド」は、アミノで置換されたカルボニルとして当該技術分野で認識されており、それには、一般式：

【化67】

40



(式中、 $R_9$  及び  $R_{10}$  は、上で定義されるとおりである) によって表され得る部位が含まれる。

50

## 【1171】

「アリール」は、本明細書で使用される場合、 $C_5-C_{10}$ 員芳香族、複素環式、縮合芳香族、縮合複素環式、二芳香族、または二複素環環系を指す。広く定義される「アリール」には、本明細書で使用される場合、0～4個のヘテロ原子を含み得る5、6、7、8、9、及び10員単環芳香族基、例えば、ベンゼン、ピロール、フラン、チオフェン、イミダゾール、オキサゾール、チアゾール、トリアゾール、ピラゾール、ピリジン、ピラジン、ピリダジン及びピリミジン等が含まれる。環構造においてヘテロ原子を有するそれらのアリール基はまた、「アリール複素環」または「ヘテロ芳香族」と称され得る。芳香族環は、1つ以上の環位置でハロゲン、アジド、アルキル、アラルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヒドロキシル、アルコキシル、アミノ（または四級化アミノ）、ニトロ、スルフヒドリル、イミノ、アミド、ホスホネート、ホスフィネート、カルボニル、カルボキシル、シリル、エーテル、アルキルチオ、スルホニル、スルホンアミド、ケトン、アルデヒド、エステル、ヘテロシクリル、芳香族またはヘテロ芳香族部位、 $-CF_3$ 、 $-CN$ ；及びそれらの組み合わせを含むがこれらに限定されない1つ以上の置換基で置換され得る。

10

## 【1172】

用語「アリール」にはまた、2つ以上の炭素が2つの隣接環（すなわち、「縮合環」）に共通している2つ以上の環式環を有する多環式環系であって、環の少なくとも1つが芳香族であり、例えば、他の環式環（複数可）がシクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、アリール及び／またはヘテロシクリルであり得るものが含まれる。複素環式環の例には、ベンズイミダゾリル、ベンゾフラニル、ベンゾチオフラニル、ベンゾチオフェニル、ベンゾキサゾリル、ベンゾキサゾリニル、ベンズチアゾリル、ベンズトリアゾリル、ベンズテトラゾリル、ベンズイソキサゾリル、ベンズイソチアゾリル、ベンズイミダゾリニル、カルバゾリル、4aH-カルバゾリル、カルポリニル、クロマニル、クロメニル、シノリニル、デカヒドロキノリニル、2H-, 6H-1, 5, 2-ジチアジニル、ジヒドロフロ[2, 3-b]テトラヒドロフラン、フラニル、フラザニル、イミダゾリジニル、イミダゾリニル、イミダゾリル、1H-インダゾリル、インドレニル、インドリニル、インドリジニル、インドリル、3H-インドリル、イサチノイル、イソベンゾフラニル、イソクロマニル、イソインダゾリル、イソインドリニル、イソインドリル、イソキノリニル、イソチアゾリル、イソキサゾリル、メチレンジオキシフェニル、モルホリニル、ナフチリジニル、オクタヒドロイソキノリニル、オキサジアゾリル、1, 2, 3-オキサジアゾリル、1, 2, 4-オキサジアゾリル、1, 2, 5-オキサジアゾリル、1, 3, 4-オキサジアゾリル、オキサゾリジニル、オキサゾリル、オキシインドリル、ピリミジニル、フェナントリジニル、フェナントロリニル、フェナジニル、フェノチアジニル、フェノキサチニル、フェノキサジニル、フタラジニル、ピペラジニル、ピペリジニル、ピペリドニル、4-ピペリドニル、ピペロニル、プテリジニル、プリニル、ピラニル、ピラジニル、ピラゾリジニル、ピラゾリニル、ピラゾリル、ピリダジニル、ピリドオキサゾール、ピリドイミダゾール、ピリドチアゾール、ピリジニル、ピリジル、ピリミジニル、ピロリジニル、ピロリニル、2H-ピロリル、ピロリル、キナゾリニル、キノリニル、4H-キノリジニル、キノキサリニル、キヌクリジニル、テトラヒドロフラニル、テトラヒドロイソキノリニル、テトラヒドロキノリニル、テトラゾリル、6H-1, 2, 5-チアジアジニル、1, 2, 3-チアジアゾリル、1, 2, 4-チアジアゾリル、1, 2, 5-チアジアゾリル、1, 3, 4-チアジアゾリル、チアントレニル、チアゾリル、チエニル、チエノチアゾリル、チエノオキサゾリル、チエノイミダゾリル、チオフェニル及びキサンテニルが含まれるがこれらに限定されない。環の1つ以上は、「アリール」について上で定義されるように置換され得る。

20

30

40

## 【1173】

用語「アラルキル」は、本明細書で使用される場合、アリール基（例えば、芳香族またはヘテロ芳香族基）で置換されたアルキル基を指す。

## 【1174】

50

用語「炭素環」は、本明細書で使用される場合、環の各原子が炭素である芳香族または非芳香族環を指す。

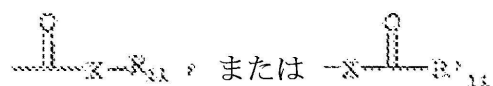
【1175】

「複素環」または「複素環式」は、本明細書で使用される場合、炭素及び1～4個のヘテロ原子（各々が、非過酸化物酸素、硫黄、及びN（Y）（式中、Yは、非存在であり、またはH、O、（C<sub>1</sub>～C<sub>10</sub>）アルキル、フェニルまたはベンジルである）からなる群から選択される）からなる3～10個の環原子、例えば、5～6個の環原子を含有し、任意に1～3個の二重結合を含有し、任意に1つ以上の置換基で置換されている単環式または二環式環の環炭素または窒素を介して結合した環状ラジカルを指す。複素環式環の例には、ベンズイミダゾリル、ベンゾフラニル、ベンゾチオフラニル、ベンゾチオフェニル、ベンゾキサゾリル、ベンゾキサゾリニル、ベンズチアゾリル、ベンズトリアゾリル、ベンズテトラゾリル、ベンズイソキサゾリル、ベンズイソチアゾリル、ベンズイミダゾリニル、カルバゾリル、4aH-カルバゾリル、カルボリニル、クロマニル、クロメニル、シノリニル、デカヒドロキノリニル、2H, 6H-1, 5, 2-ジチアジニル、ジヒドロフロ[2, 3-b]テトラヒドロフラン、フラニル、フラザニル、イミダゾリジニル、イミダゾリニル、イミダゾリル、1H-インダゾリル、インドレニル、インドリニル、インドリジニル、インドリル、3H-インドリル、イサチノイル、イソベンゾフラニル、イソクロマニル、イソインダゾリル、イソインドリニル、イソインドリル、イソキノリニル、イソチアゾリル、イソキサゾリル、メチレンジオキシフェニル、モルホリニル、ナフチリジニル、オクタヒドロイソキノリニル、オキサジアゾリル、1, 2, 3-オキサジアゾリル、1, 2, 4-オキサジアゾリル、1, 2, 5-オキサジアゾリル、1, 3, 4-オキサジアゾリル、オキサゾリジニル、オキサゾリル、オキセパニル、オキセタニル、オキシインドリル、ピリミジニル、フェナントリジニル、フェナントロリニル、フェナジニル、フェノチアジニル、フェノキサチニル、フェノキサジニル、フタラジニル、ピペラジニル、ペリジニル、ペリドニル、4-ペリドニル、ピペロニル、プテリジニル、プリニル、ピラニル、ピラジニル、ピラゾリジニル、ピラゾリニル、ピラゾリル、ピリダジニル、ピリドオキサゾール、ピリドイミダゾール、ピリドチアゾール、ピリジニル、ピリジル、ピリミジニル、ピロリジニル、ピロリニル、2H-ピロリル、ピロリル、キナゾリニル、キノリニル、4H-キノリジニル、キノキサリニル、キヌクリジニル、テトラヒドロフラニル、テトラヒドロイソキノリニル、テトラヒドロピラニル、テトラヒドロキノリニル、テトラゾリル、6H-1, 2, 5-チアジニアジニル、1, 2, 3-チアジニアゾリル、1, 2, 4-チアジニアゾリル、1, 2, 5-チアジニアゾリル、1, 3, 4-チアジニアゾリル、チアントレニル、チアゾリル、チエニル、チエノチアゾリル、チエノオキサゾリル、チエノイミダゾリル、チオフェニル及びキサンテニルが含まれるがこれらに限定されない。複素環式基は、アルキル及びアリールについて上で定義されるとおり1つ以上の位置で1つ以上の置換基、例えば、ハロゲン、アルキル、アラルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヒドロキシル、アミノ、ニトロ、スルフヒドリル、イミノ、アミド、ホスフェート、ホスホネート、ホスフィネート、カルボニル、カルボキシル、シリル、エーテル、アルキルチオ、スルホニル、ケトン、アルデヒド、エステル、ヘテロシクリル、芳香族またはヘテロ芳香族部位、-CF<sub>3</sub>、及び-CNで任意に置換され得る。

【1176】

用語「カルボニル」は、当該技術分野で認識されており、それには、一般式：

【化68】



（式中、Xは、結合であり、または酸素または硫黄を表し、R<sub>11</sub>は、水素、アルキル、シクロアルキル、アルケニル、シクロアルケニル、またはアルキニルを表し、R'<sub>11</sub>は、水素、アルキル、シクロアルキル、アルケニル、シクロアルケニル、またはアルキニル

を表す) によって表され得るような部位が含まれる。Xが酸素であり、 $R_{11}$ または $R'_{11}$ が水素ではない場合、式は、「エステル」を表す。Xが酸素であり、 $R_{11}$ が上で定義されるとおりである場合、部位は、本明細書でカルボキシル基と称され、特に $R_{11}$ が水素である場合、式は、「カルボン酸」を表す。Xが酸素であり、 $R'_{11}$ が水素である場合、式は、「ホルメート」を表す。通常、上記式の酸素原子が硫黄によって置き換えられた場合、式は、「チオカルボニル」基を表す。Xが硫黄であり、 $R_{11}$ または $R'_{11}$ が水素ではない場合、式は、「チオエステル」を表す。Xが硫黄であり、 $R_{11}$ が水素である場合、式は、「チオカルボン酸」を表す。Xが硫黄であり、 $R'_{11}$ が水素である場合、式は、「チオホルメート」を表す。一方、Xが結合であり、 $R_{11}$ が水素ではない場合、上記式は、「ケトン」基を表す。Xが水素であり、 $R_{11}$ が水素である場合、上記式は、「アルデヒド」基を表す。

10

#### 【1177】

用語「ヘテロ原子」は、本明細書で使用される場合、炭素または水素以外の任意の元素の原子を意味する。ヘテロ原子の例は、ホウ素、窒素、酸素、リン、硫黄及びセレンである。他の有用なヘテロ原子には、ケイ素及びヒ素が含まれる。

#### 【1178】

本明細書で使用される場合、用語「ニトロ」は、 $-NO_2$ を意味する；用語「ハロゲン」は、 $-F$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ または $-I$ を指定する；用語「スルフヒドリル」は、 $-SH$ を意味する；用語「ヒドロキシル」は、 $-OH$ を意味する；用語「スルホニル」は、 $-SO_2-$ を意味する。

20

#### 【1179】

用語「置換された」は、本明細書で使用される場合、本明細書に記載の化合物のすべての許容可能な置換基を指す。最も広い意味で、許容可能な置換基には、有機化合物の非環状及び環状、分岐状及び非分岐状、炭素環式及び複素環式、芳香族及び非芳香族置換基が含まれる。例示的な置換基には、ハロゲン、ヒドロキシル基、または任意の数の炭素原子、例えば、1～14個の炭素原子を含有する任意の他の有機グループが含まれるがこれらに限定されず、任意に線状、分岐状、または環状の構造的形式の1つ以上のヘテロ原子、例えば、酸素、硫黄、または窒素グループが含まれる。代表的な置換基には、アルキル、置換されたアルキル、アルケニル、置換されたアルケニル、アルキニル、置換されたアルキニル、フェニル、置換されたフェニル、アリール、置換されたアリール、ヘテロアリール、置換されたヘテロアリール、ハロ、ヒドロキシル、アルコキシ、置換されたアルコキシ、フェノキシ、置換されたフェノキシ、アロキシ、置換されたアロキシ、アルキルチオ、置換されたアルキルチオ、フェニルチオ、置換されたフェニルチオ、アリールチオ、置換されたアリールチオ、シアノ、イソシアノ、置換されたイソシアノ、カルボニル、置換されたカルボニル、カルボキシル、置換されたカルボキシル、アミノ、置換されたアミノ、アミド、置換されたアミド、スルホニル、置換されたスルホニル、スルホン酸、ホスホリル、置換されたホスホリル、ホスホニル、置換されたホスホニル、ポリアリール、置換されたポリアリール、 $C_3-C_{20}$ 環式、置換された $C_3-C_{20}$ 環式、複素環式、置換された複素環式、アミノ酸、ペプチド、及びポリペプチド基が含まれる。

30

#### 【1180】

本明細書に記載されるように、本開示の化合物は、「任意に置換された」部位を含有し得る。通常、用語「置換された」は、用語「任意に」が先行しているか否かにかかわらず、指定された部位の1つ以上の水素が、好適な置換基で置き換えられていることを意味する。別途示されない限り、「任意に置換された」基は、基の各々の置換可能な位置で好適な置換基を有し得、任意の所与の構造における複数の位置が、特定の基から選択される複数の置換基で置換され得る場合、置換基は、すべての位置で同じまたは異なり得る。本開示によって想定される置換基の組み合わせは、好ましくは、安定なまたは化学的に実現可能な化合物の形成をもたらすものである。用語「安定な」は、本明細書で使用される場合、それらの生成、検出、ならびに、所定の実施形態では、それらの回収、精製、及び本明細書に開示される目的の1つ以上のための使用を可能とするための条件に供された場合、

40

50





) )  $2-3S-$  (式中、 $R^*$ の各々の独立した存在は、水素、下で定義されるように置換され得る $C_1-6$ 脂肪族、または窒素、酸素、または硫黄から独立して選択される0~4個のヘテロ原子を有する非置換5~6員飽和、部分的に不飽和、またはアリール環から選択される)が含まれる。「任意に置換された」基の近接の置換可能な炭素に結合した好適な二価置換基には、 $-O(CR^*2)2-3O-$  (式中、 $R^*$ の各々の独立した存在は、水素、下で定義されるように置換され得る $C_1-6$ 脂肪族、または窒素、酸素、または硫黄から独立して選択される0~4個のヘテロ原子を有する非置換5~6員飽和、部分的に不飽和、またはアリール環から選択される)が含まれる。

#### 【1184】

$R^*$ の脂肪族基の好適な置換基には、ハロゲン、 $-R^\bullet$ 、 $-(ハロR^\bullet)$ 、 $-OH$ 、 $-OR^\bullet$ 、 $-O(ハロR^\bullet)$ 、 $-CN$ 、 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)OR^\bullet$ 、 $-NH_2$ 、 $-NHR^\bullet$ 、 $-NR^\bullet_2$ 、または $-NO_2$  (式中、各 $R^\bullet$ は、非置換であり、または「ハロ」が先行する場合、1つ以上のハロゲンのみで置換されており、独立して、 $C_1-4$ 脂肪族、 $-CH_2Ph$ 、 $-O(CH_2)_{0-1}Ph$ 、または窒素、酸素、または硫黄から独立して選択される0~4個のヘテロ原子を有する5~6員飽和、部分的に不飽和、またはアリール環である)が含まれる。

#### 【1185】

「任意に置換された」基の置換可能な窒素上の好適な置換基には、 $-R^+$ 、 $-NR^+_2$ 、 $-C(O)R^+$ 、 $-C(O)OR^+$ 、 $-C(O)C(O)R^+$ 、 $-C(O)CH_2C(O)R^+$ 、 $-S(O)_2R^+$ 、 $-S(O)_2NR^+_2$ 、 $-C(S)NR^+_2$ 、 $-C(NH)NR^+_2$ 、または $-N(R^+)S(O)_2R^+$  (式中、各 $R^+$ は、独立して、水素、下で定義されるように置換され得る $C_1-6$ 脂肪族、非置換 $-OPh$ 、または窒素、酸素、または硫黄から独立して選択される0~4個のヘテロ原子を有する非置換5~6員飽和、部分的に不飽和、またはアリール環であり、または、上の定義にかかわらず、 $R^+$ の2つの独立した存在は、それらの介在原子(複数可)と一緒に、窒素、酸素、または硫黄から独立して選択される0~4個のヘテロ原子を有する非置換3~12員飽和、部分的に不飽和、またはアリールまたは二環式環を形成する)が含まれる。

#### 【1186】

$R^+$ の脂肪族基上の好適な置換基は、独立して、ハロゲン、 $-R^\bullet$ 、 $-(ハロR^\bullet)$ 、 $-OH$ 、 $-OR^\bullet$ 、 $-O(ハロR^\bullet)$ 、 $-CN$ 、 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)OR^\bullet$ 、 $-NH_2$ 、 $-NHR^\bullet$ 、 $-NR^\bullet_2$ 、または $-NO_2$  (式中、各 $R^\bullet$ は、非置換であり、または「ハロ」が先行する場合、1つ以上のハロゲンのみで置換されており、独立して、 $C_1-4$ 脂肪族、 $-CH_2Ph$ 、 $-O(CH_2)_{0-1}Ph$ 、または窒素、酸素、または硫黄から独立して選択される0~4個のヘテロ原子を有する5~6員飽和、部分的に不飽和、またはアリール環である)である。

#### 【1187】

窒素等のヘテロ原子は、ヘテロ原子の原子価を満たす、本明細書に記載の有機化合物の水素置換基及び／または任意の許容可能な置換基を有し得る。「置換」または「置換された」には、そのような置換が、置換原子及び置換基の許容原子価に従っていること、及びその置換が、安定な化合物、すなわち、例えば、転位、環状化、または脱離による変換を自発的に受けない化合物をもたらすという暗黙の但し書きが含まれると理解される。

#### 【1188】

広い態様では、許容可能な置換基には、有機化合物の非環状及び環状、分岐状及び非分岐状、炭素環式及び複素環式、芳香族及び非芳香族置換基が含まれる。例示的な置換基には、例えば、本明細書に記載のものが含まれる。許容可能な置換基は、適切な有機化合物について1つ以上であり、同じまたは異なり得る。窒素等のヘテロ原子は、ヘテロ原子の原子価を満たす、本明細書に記載の有機化合物の水素置換基及び／または任意の許容可能な置換基を有し得る。

#### 【1189】

様々な実施形態では、置換基は、アルコキシ、アリールオキシ、アルキル、アルケニル

10

20

30

40

50

、アルキニル、アミド、アミノ、アリール、アリールアルキル、カルバメート、カルボキシ、シアノ、シクロアルキル、エステル、エーテル、ホルミル、ハロゲン、ハロアルキル、ヘテロアリール、ヘテロシクリル、ヒドロキシル、ケトン、ニトロ、ホスフェート、スルフィド、スルフィニル、スルホニル、スルホン酸、スルホンアミド、及びチオケトンから選択され、これらの各々は、1つ以上の好適な置換基で任意に置換される。いくつかの実施形態では、置換基は、アルコキシ、アリールオキシ、アルキル、アルケニル、アルキニル、アミド、アミノ、アリール、アリールアルキル、カルバメート、カルボキシ、シクロアルキル、エステル、エーテル、ホルミル、ハロアルキル、ヘテロアリール、ヘテロシクリル、ケトン、ホスフェート、スルフィド、スルフィニル、スルホニル、スルホン酸、スルホンアミド、及びチオケトンから選択され、アルコキシ、アリールオキシ、アルキル、アルケニル、アルキニル、アミド、アミノ、アリール、アリールアルキル、カルバメート、カルボキシ、シクロアルキル、エステル、エーテル、ホルミル、ハロアルキル、ヘテロアリール、ヘテロシクリル、ケトン、ホスフェート、スルフィド、スルフィニル、スルホニル、スルホン酸、スルホンアミド、及びチオケトンの各々は、1つ以上の好適な置換基でさらに置換され得る。

10

20

30

40

50

#### 【1190】

置換基の例には、ハロゲン、アジド、アルキル、アラルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヒドロキシル、アルコキシ、アミノ、ニトロ、スルフヒドリル、イミノ、アミド、ホスホネート、ホスフィネート、カルボニル、カルボキシル、シリル、エーテル、アルキルチオ、スルホニル、スルホンアミド、ケトン、アルデヒド、チオケトン、エステル、ヘテロシクリル、 $-CN$ 、アリール、アリールオキシ、パーハロアルコキシ、アラルコキシ、ヘテロアリール、ヘテロアリールオキシ、ヘテロアリールアルキル、ヘテロアラルコキシ、アジド、アルキルチオ、オキソ、アシルアルキル、カルボキシエステル、カルボキサミド、アシルオキシ、アミノアルキル、アルキルアミノアリール、アルキルアリール、アルキルアミノアルキル、アルコキシアリール、アリールアミノ、アラルキルアミノ、アルキルスルホニル、カルボキサミドアルキルアリール、カルボキサミドアリール、ヒドロキシアルキル、ハロアルキル、アルキルアミノアルキルカルボキシ、アミノカルボキサミドアルキル、シアノ、アルコキシアルキル、パーハロアルキル、アリールアルキルオキシアルキル等が含まれるがこれらに限定されない。いくつかの実施形態では、置換基は、シアノ、ハロゲン、ヒドロキシル、及びニトロから選択される。

#### 【1191】

抗体：本明細書で使用される場合、用語「抗体」は、最も広い意味で称され、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多重特異的抗体（例えば、少なくとも2つのインタクト抗体から形成された二重特異的抗体）、及び所望の生物学的活性を示す（例えば、「機能的である」）限り抗体断片（例えば、ダイアボディ）を含むがこれらに限定されない様々な実施形態を具体的に包含する。抗体は、主としてアミノ酸ベースの分子であるが、1つ以上の修飾（糖部位、蛍光部位、化学的タグ等の付加を含むがこれらに限定されない）も含み得る。抗体またはその断片の非限定的な例には、VH及びVLドメイン、scFv、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv断片、ダイアボディ、線状抗体、一本鎖抗体分子、多重特異的抗体、二重特異的抗体、イントラボディ、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、ヒト化抗体、コドン最適化抗体、タンデムscFv抗体、二重特異的T細胞エンゲージャー、mAb2抗体、キメラ抗原受容体(CAR)、四価二重特異的抗体、生合成抗体、ネイティブ抗体、小型化抗体、ユニボディ、マキシボディ、老化細胞に対する抗体、コンフォーマーに対する抗体、疾患特異的エピトープに対する抗体、または先天的防御分子に対する抗体が含まれる。

#### 【1192】

関連付けられた：本明細書で使用される場合、用語「に関連付けられた」、「コンジュゲートされた」、「連結された」、「結合した」、及び「繋がれた」は、2つ以上の部位に関して使用される場合、部位が、直接的にまたは連結剤として機能する1つ以上の追加の部位を介して、互いに物理的に関連付けられ、または接続されることで、構造が使用さ

れる条件、例えば、生理的条件下で部位が物理的に関連付けられたままになるように十分に安定した構造が形成されることを意味する。「関連付け」は、厳密には、直接的な共有化学結合を介するものである必要はない。それはまた、イオンもしくは水素結合または「関連付けられた」実体が物理的に関連付けられたままになるように十分に安定したハイブリダイゼーションベースの接続性を示唆し得る。

【1193】

カーゴ：本明細書で使用される場合、用語「カーゴ」または「ペイロード」は、細胞または組織へのまたはその中への送達のための送達ビヒクルに包含された1つ以上の分子または構造を指し得る。カーゴの非限定的な例には、核酸、ポリペプチド、ペプチド、タンパク質、リボソーム、標識、タグ、小さな化学的分子、大きな生物学的分子、及びそれらの任意の組み合わせが含まれ得る。

10

【1194】

キメラ抗原受容体（CAR）：本明細書で使用される場合、用語「キメラ抗原受容体」または「CAR」は、少なくとも1つの抗原特異的標的化領域（ASTR）、膜貫通ドメイン及び細胞内シグナル伝達ドメインを含む人工キメラタンパク質であって、抗原特異的標的化領域が全長抗体またはその断片であるものを含むものを指す。標的抗原と高い親和性で結合することが可能な任意の分子は、CARのASTRにおいて使用され得る。CARは、細胞外スペースドメイン及び／または共刺激ドメインを任意に有し得る。CARはまた、CARを保有する細胞傷害性細胞を生成するために使用され得る。

【1195】

環状RNA：本明細書で使用される場合、用語「環状RNA」または「circRNA」は、共有結合または非共有結合を介して環状構造を形成するRNAを指す。

20

【1196】

共投与される：本明細書で使用される場合、用語「共投与される」または「共投与すること」は、オリジネーターコンストラクト、ベンチマークコンストラクト、標的化システムまたは他の治療剤もしくは部位の効果が向上するように十分に近い時間内にオリジネーターコンストラクト、ベンチマークコンストラクトまたは標的化システムを1つ以上の追加のオリジネーターコンストラクト、ベンチマークコンストラクト、標的化システムまたは他の治療剤もしくは部位と共に投与することを意味する。

【1197】

相補的及び実質的に相補的：本明細書で使用される場合、用語「相補的」は、ポリヌクレオチドが互いに塩基対を形成する能力を指す。塩基対は、典型的には、逆平行ポリヌクレオチド鎖におけるヌクレオチド単位間の水素結合によって形成される。相補的ポリヌクレオチド鎖は、ワトソン・クリック様式（例えば、A対T、A対U、C対G）、または二本鎖の形成を可能とする任意の他の様式で塩基対を形成し得る。当業者が知っているように、DNAとは対照的にRNAを使用する場合、チミンではなくウラシルがアデノシンと相補的とみなされる塩基である。しかしながら、Uが本開示の文脈において示される場合、別途記述されない限り、Tを置換する能力が暗示される。完全な相補性または100%の相補性は、1つのポリヌクレオチド鎖の各ヌクレオチド単位が、第2のポリヌクレオチド鎖のヌクレオチド単位と水素結合を形成し得る状況を指す。完全に満たない相補性は、2つの鎖のいくつかの、しかしすべてではないヌクレオチド単位が互いに水素結合を形成し得る状況を指す。例えば、2つの20merについて、各鎖上の2つの塩基対のみが互いに水素結合を形成し得る場合、ポリヌクレオチド鎖は、10%の相補性を示す。同じ例では、各鎖上の18個の塩基対が互いに水素結合を形成し得る場合、ポリヌクレオチド鎖は、90%の相補性を示す。本明細書で使用される場合、用語「実質的に相補的」は、siRNAが、所望の標的mRNAを結合するために、及び標的mRNAのRNAサイレンシングを誘発させるために十分な配列（例えば、アンチセンス鎖中）を有することを意味する。

30

40

【1198】

送達：本明細書で使用される場合、「送達」は、化合物、物質、実体、部位、カーゴま

50

たはペイロードを送達する作用または様式を指す。

【1199】

DNA及びRNA：本明細書で使用される場合、用語「RNA」または「RNA分子」または「リボ核酸分子」は、リボヌクレオチドのポリマーを指す；用語「DNA」または「DNA分子」または「デオキシリボ核酸分子」は、デオキシリボヌクレオチドのポリマーを指す。DNA及びRNAは、例えば、DNA複製及びDNAの転写によって、それぞれ天然に合成され得；または化学的に合成され得る。DNA及びRNAは、一本鎖（すなわち、それぞれssRNAまたはssDNA）または多重鎖（例えば、二本鎖、すなわち、それぞれdsRNA及びdsDNA）であり得る。用語「mRNA」または「メッセンジャーRNA」は、本明細書で使用される場合、1つ以上のポリペプチド鎖のアミノ酸配列をコードする一本鎖RNAを指す。

10

【1200】

封入する：本明細書で使用される場合、用語「封入する」は、包囲する、取り囲むまたは包み込むことを意味する。

【1201】

コードする：本明細書で使用される場合、用語「コードする」は、ポリマー性マクロ分子における情報が、第1の分子とは異なる第2の分子の生成を誘導するために使用される任意のプロセスを広く指す。第2の分子は、第1の分子の化学的特質とは異なる化学的構造を有し得る。

【1202】

遺伝子の発現を向上させる：本明細書で使用される場合、語句「アドバック」または「遺伝子の発現を向上させる」は、遺伝子の発現生成物の量の増加を引き起こすことを意味する。発現生成物は、遺伝子から転写されたRNA（例えば、mRNA）または遺伝子から転写されたmRNAから翻訳されたポリペプチドであり得る。典型的には、mRNAのレベルの増加は、それから翻訳されたポリペプチドのレベルの増加をもたらす。発現のレベルは、mRNAまたはタンパク質を測定するための標準的な技術を使用して決定され得る。

20

【1203】

エクソソーム：本明細書で使用される場合、「エクソソーム」は、哺乳動物細胞によって分泌されるベシクルまたはRNA分解に関与する複合体である。

30

【1204】

製剤：本明細書で使用される場合、「製剤」には、少なくとも1つの化合物、物質、実体、部位、カーゴまたはペイロード及び送達剤が含まれる。

【1205】

断片：「断片」は、本明細書で使用される場合、一部分を指す。例えば、タンパク質の断片は、培養細胞から単離された全長タンパク質を消化することによって得られるポリペプチドを含み得る。

【1206】

相同性：本明細書で使用される場合、用語「相同性」は、ポリマー分子間、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関連性を指す。いくつかの実施形態では、ポリマー分子は、それら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%同一または類似する場合、互いに「相同」とするとみなされる。用語「相同」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。本開示に従って、2つのポリヌクレオチド配列は、それら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つの伸長部について少なくとも約50%、60%、70%、80%、90%、95%、またはさらに99%である場合、相同とみなされる。いくつかの実施形態では、相同なポリヌクレオチド配列は、少なくとも4～5個の独自に指定されたアミノ酸の伸長部をコードする能力によって特性化される。長さが60ヌクレオチド

40

50

未満のポリヌクレオチド配列について、相同性は、少なくとも4～5個の独自に指定されたアミノ酸の伸長部をコードする能力によって決定される。本開示に従って、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つの伸長部について少なくとも約50%、60%、70%、80%、または90%同一である場合、相同とみなされる。

#### 【1207】

不活性成分：本明細書で使用される場合、用語「不活性成分」は、製剤に含まれる薬学的組成物の活性成分の活性に寄与しない1つ以上の薬剤を指す。いくつかの実施形態では、本開示の製剤において使用され得る不活性成分のすべてが米国食品医薬品局（FDA）によって承認されている場合があり、そのいずれも承認されていない場合があり、またはその一部が承認されている場合がある。

10

#### 【1208】

IRES：本明細書で使用される場合、用語「内部リボソーム進入部位」または「IRES」は、正常なRNAキャップ構造の非存在下でポリペプチドの翻訳を開始させることが可能である、サイズが10ヌクレオチド～1,000ヌクレオチドまたはそれを超える範囲のRNA配列または構造的要素を指す。

#### 【1209】

同一性：本明細書で使用される場合、用語「同一性」は、ポリマー分子間、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関連性を指す。2つのポリヌクレオチド配列の同一率の計算は、例えば、最適な比較目的のために2つの配列をアライメントすることによって実施され得る（例えば、最適なアライメントのために第1及び第2の核酸配列の一方または両方にギャップが導入され得、非同一致配列は比較目的のために無視され得る）。所定の実施形態では、比較目的のためにアライメントされる配列の長さは、参照配列の長さの少なくとも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おけるヌクレオチドが比較される。第1の配列における位置が第2の配列における対応する位置と同じヌクレオチドによって占められている場合、そのときは分子は、その位置で同一である。2つの配列間の同一率は、ギャップの数を考慮して、配列によって共有される同一位置の数、及び2つの配列の最適なアライメントのために導入される必要がある各ギャップの長さの関数である。2つの配列間の配列の比較及び同一率の決定は、数学的アルゴリズムを使用して達成され得る。例えば、2つのヌクレオチド配列間の同一率は、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（これらの各々は、参照により本明細書に組み込まれる）に記載の方法等の方法を使用して決定され得る。例えば、2つのヌクレオチド配列間の同一率は、PAM120ウェイト残基表、12のギャップ長ペナルティ及び4のギャップペナルティを使用してALIGNプログラム（バージョン2.0）に組み込まれたMeyers及びMiller（CABIOS, 1989, 4:11-17）のアルゴリズムを使用して決定され得る。2つのヌクレオチド配列間の同一率は、代替的に、NWSgapdna.CMPマトリックスを使用してGCGソフトウェアパッケージにおけるGAPプログラ

20

30

40

50

ムを使用して決定され得る。配列間の同一率を決定するために一般的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組み込まれる) 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、公共に利用可能なコンピュータプログラムにおいて体系化されている。2つの配列間の相同性を決定するための例示的なコンピュータソフトウェアには、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) が含まれるがこれらに限定されない。

10

#### 【1210】

遺伝子の発現を阻害する：本明細書で使用される場合、語句「ノックダウン」または「遺伝子の発現を阻害する」は、遺伝子の発現生成物の量の低減を引き起こすことを意味する。発現生成物は、遺伝子から転写されたRNA（例えば、mRNA）または遺伝子から転写されたmRNAから翻訳されたポリペプチドであり得る。典型的には、mRNAのレベルの低減は、それから翻訳されたポリペプチドのレベルの低減をもたらす。発現のレベルは、mRNAまたはタンパク質を測定するための標準的な技術を使用して決定され得る。

#### 【1211】

イオン化可能な脂質：本明細書で使用される場合、「イオン化可能な脂質」は、選択されたpHで正味の正電荷を保有する多数の脂質種のいずれかを指す。

20

#### 【1212】

脂質ナノ粒子：本明細書で使用される場合、「脂質ナノ粒子」または「LNP」は、1つ以上の脂質（例えば、カチオン性脂質、非カチオン性脂質、PEG修飾脂質）を含む送達ビヒクル指す。

#### 【1213】

リボソーム：本明細書で使用される場合、「リボソーム」は通常、1つ以上の球状二重層または二重層で配置された脂質（例えば、両親媒性脂質）から構成されるベシクルを指す。

#### 【1214】

修飾された：本明細書で使用される場合、「修飾された」は、分子の変化した状態または構造を指す。分子は、化学的、構造的、及び機能的を含む多くの方法で修飾され得る。

30

#### 【1215】

非カチオン性脂質：本明細書で使用される場合、「非カチオン性脂質」は、任意の中性、双性イオン性またはアニオン性脂質を指す。

#### 【1216】

ペプチド：本明細書で使用される場合、「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。

#### 【1217】

薬学的組成物：本明細書で使用される場合、用語「薬学的組成物」は、少なくとも1つの活性成分及び任意に1つ以上の薬学的に許容可能な賦形剤を含む組成物を指す。

40

#### 【1218】

PEG：本明細書で使用される場合、「PEG」は、任意のポリエチレングリコールまたは他のポリアルキレンエーテルポリマーを意味する。

#### 【1219】

スペーサー：本明細書で使用される場合、用語「スペーサー」は、配列における2つの他の要素を分離する1残基～数百または数千の残基の範囲のポリヌクレオチドまたはポリペプチドの領域を指す。スペーサーの配列は、定義され、またはランダムであり得る。スペーサー配列は、典型的には非コードであるが、コード配列であり得る。

50

## 【1220】

ステロール：本明細書で使用される場合、「ステロール」は、ステロイドアルコールからなるステロイドの副次群である。

## 【1221】

構造脂質：本明細書で使用される場合、「構造脂質」は、ステロール及びステロール部位を含有する脂質を指す。

## 【1222】

転写：本明細書で使用される場合、用語「転写」は、鋳型としてDNA分子を使用するRNAポリメラーゼによるRNA分子の形成または合成を指す。

## 【1223】

翻訳：本明細書で使用される場合、用語「翻訳」は、RNA鋳型に基づくリボソームによるポリペプチド分子の形成を指す。

## 【1224】

処置する及び予防する：本明細書で使用される場合、用語「処置する」または「予防する」及びそれからステミングする言葉は、100%のまたは完全な処置または予防を必ずしも意味するわけではない。むしろ、当業者が潜在的利益または治療効果を有すると認識する処置または予防の様々な程度が存在する。また、「予防」は、疾患、症状またはその病態の発症を遅延させることを包含し得る。

## 【1225】

未修飾：本明細書で使用される場合、「未修飾」は、いかなる変化の前の任意の物質、化合物または分子を指す。未修飾は、生体分子の野生型またはネイティブ形態を指し得るが、常にそうであるわけではない。分子は、一連の修飾を受け得、これにより各修飾された分子は、後の修飾のための「未修飾」出発分子として機能し得る。

## 【1226】

ベクター：本明細書で使用される場合、「ベクター」は、異種分子を輸送し、形質導入し、またはそうでなければその担体として作用する任意の分子または部位である。本開示のベクターは、組換え的に生成され得、ウイルスの親または参照配列に基づき得、及び／またはウイルスの親または参照配列を含み得る。そのような親または参照ウイルス配列は、ベクターを操作するための元の、第2の、第3のまたはその後の配列として機能し得る。非限定的な例では、そのような親または参照ウイルス配列は、以下の配列のうちの任意の1つ以上を含み得る：ポリペプチドまたは多重ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列であって、配列が野生型であり、または野生型から修飾され得、配列がタンパク質、タンパク質ドメイン、またはタンパク質の1つ以上のサブユニットの全長または部分配列をコードし得る、ポリヌクレオチド配列；調節性または制御性核酸を含むポリヌクレオチドであって、配列が野生型であり、または野生型から修飾され得る、ポリヌクレオチド；及び野生型配列から修飾される場合があり、またはされない場合がある導入遺伝子。これらのウイルス配列は、1つ以上のコドン（核酸レベルで）またはアミノ酸（ポリペプチドレベルで）の「ドナー」配列または1つ以上のコドン（核酸レベルで）またはアミノ酸（ポリペプチドレベルで）の「アクセプター」配列のいずれかとして機能し得る。本開示の1つ以上の実施形態の詳細は、以下の付随する説明に示される。本明細書に記載のものと同様または同等の任意の物質及び方法が本開示の実施または試験において使用され得るが、好ましい物質及び方法をこれより記載する。本開示の他の特徴、目的及び利点は、明細書から明らかになる。明細書において、単数形には、文脈が別途明らかに示さない限り、複数形も含まれる。別途定義されない限り、本明細書で使用されるすべての技術的及び科学的用語は、本開示が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されるものと同じ意味を有する。矛盾がある場合、本明細書が優先する。

## 【1227】

XI. 特定の実施形態

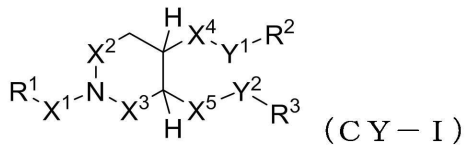
## 【1228】

実施形態1. 式(CY-I)の構造：



【 1 2 2 9 】

【 化 6 9 】



【 1 2 3 0 】

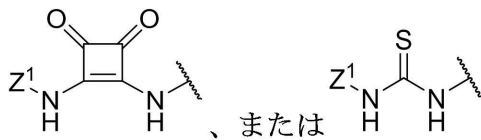
を有する化合物、またはその薬学的に許容可能な塩（式中、

【 1 2 3 1 】

 $R^1$  は、 $-OH$ 、

【 1 2 3 2 】

【 化 7 0 】



であり、

【 1 2 3 3 】

 $Z^1$  は、任意に置換された  $C_1 - C_6$  アルキルであり；

【 1 2 3 4 】

 $X^1$  は、任意に置換された  $C_2 - C_6$  アルキレニルであり；

【 1 2 3 5 】

 $X^2$  及び  $X^3$  は、独立して、結合、 $-CH_2-$ 、または  $-CH_2CH_2-$  であり；

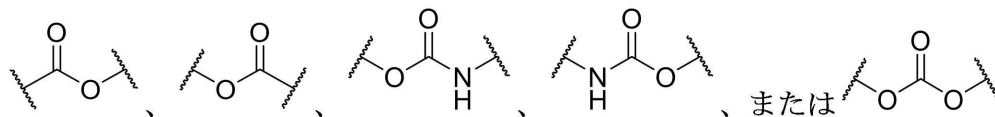
【 1 2 3 6 】

 $X^4$  及び  $X^5$  は、独立して、任意に置換された  $C_2 - C_{14}$  アルキレニルであり；

【 1 2 3 7 】

 $Y^1$  及び  $Y^2$  は、独立して、

【 化 7 1 】



であり；

【 1 2 3 8 】

 $R^2$  及び  $R^3$  は、独立して、任意に置換された  $C_4 - C_{20}$  アルキルである）。

【 1 2 3 9 】

実施形態 2 . 式 (CY-II) の構造：

【 1 2 4 0 】

10

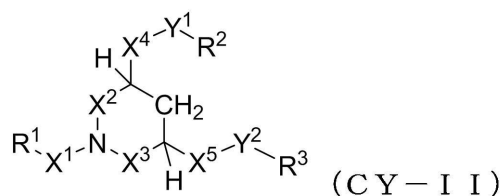
20

30

40

50

【化 7 2】



【1 2 4 1】

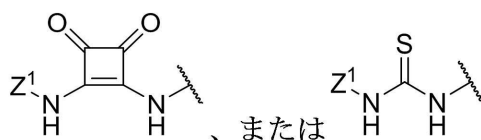
を有する化合物、またはその薬学的に許容可能な塩（式中、

10

【1 2 4 2】

R 1 は、- O H、

【化 7 3】



であり、

20

【1 2 4 3】

Z 1 は、任意に置換された C 1 - C 6 アルキルであり；

【1 2 4 4】

X 1 は、任意に置換された C 2 - C 6 アルキレニルであり；

【1 2 4 5】

X 2 及び X 3 は、独立して、結合、- C H 2 -、または- C H 2 C H 2 -であり；

【1 2 4 6】

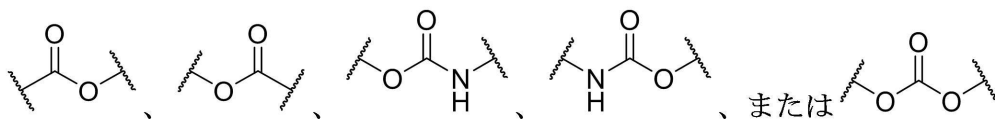
X 4 及び X 5 は、独立して、任意に置換された C 2 - C 1 4 アルキレニルであり；

【1 2 4 7】

Y 1 及び Y 2 は、独立して、

30

【化 7 4】



であり；

【1 2 4 8】

R 2 及び R 3 は、独立して、任意に置換された C 4 - C 2 0 アルキルである）。

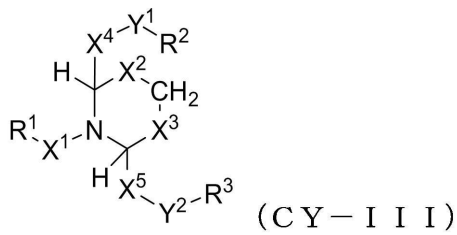
40

【1 2 4 9】

実施形態 3 . 式 ( C Y - I I I ) の構造：

【1 2 5 0】

【化 7 5】



10

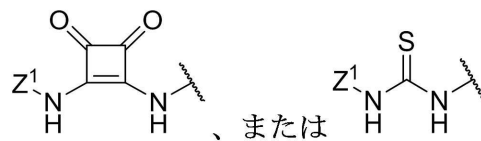
【1 2 5 1】

を有する化合物、またはその薬学的に許容可能な塩（式中、

【1 2 5 2】

 $R^1$  は、 $-OH$ 、

【化 7 6】



20

であり、

【1 2 5 3】

 $Z^1$  は、任意に置換された  $C_1 - C_6$  アルキルであり；

【1 2 5 4】

 $X^1$  は、任意に置換された  $C_2 - C_6$  アルキレニルであり；

【1 2 5 5】

 $X^2$  及び  $X^3$  は、独立して、結合、 $-CH_2-$ 、または  $-CH_2CH_2-$  であり；

【1 2 5 6】

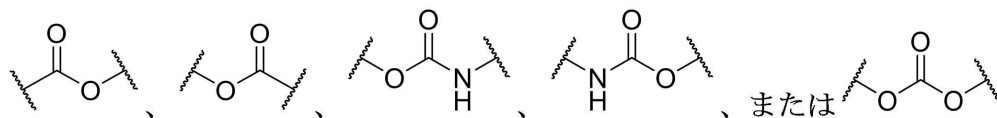
 $X^4$  及び  $X^5$  は、独立して、任意に置換された  $C_2 - C_{14}$  アルキレニルであり；

30

【1 2 5 7】

 $Y^1$  及び  $Y^2$  は、独立して、

【化 7 7】



であり；

40

【1 2 5 8】

 $R^2$  及び  $R^3$  は、独立して、任意に置換された  $C_4 - C_{20}$  アルキルである）。

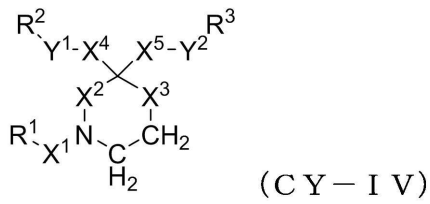
【1 2 5 9】

実施形態 4 . 式 (CY-IV) の構造：

【1 2 6 0】

50

【化 7 8】



10

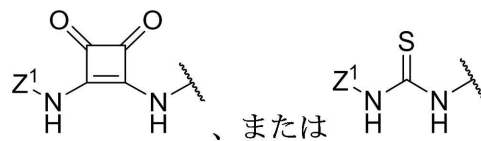
【1 2 6 1】

を有する化合物、またはその薬学的に許容可能な塩（式中、

【1 2 6 2】

 $R^1$  は、 $-OH$ 、

【化 7 9】



20

であり、

【1 2 6 3】

 $Z^1$  は、任意に置換された  $C_1 - C_6$  アルキルであり；

【1 2 6 4】

 $X^1$  は、任意に置換された  $C_2 - C_6$  アルキレニルであり；

【1 2 6 5】

 $X^2$  及び  $X^3$  は、独立して、結合、 $-CH_2-$ 、または  $-CH_2CH_2-$  であり；

【1 2 6 6】

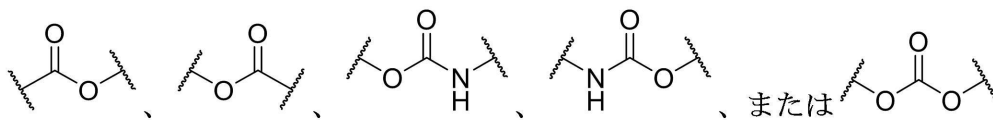
 $X^4$  及び  $X^5$  は、独立して、任意に置換された  $C_2 - C_{14}$  アルキレニルであり；

30

【1 2 6 7】

 $Y^1$  及び  $Y^2$  は、独立して、

【化 8 0】



であり；

40

【1 2 6 8】

 $R^2$  及び  $R^3$  は、独立して、任意に置換された  $C_4 - C_{20}$  アルキルである）。

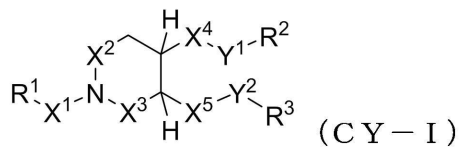
【1 2 6 9】

実施形態 5 . 式 (CY-I) の構造：

【1 2 7 0】

50

## 【化 8 1】



## 【1 2 7 1】

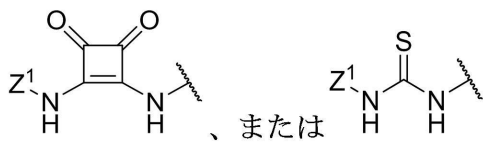
を有する化合物、またはその薬学的に許容可能な塩（式中、

## 【1 2 7 2】

$R^1$  は、 $-OH$ 、 $R^{1a}$ 、

## 【1 2 7 3】

## 【化 8 2】



であり、

## 【1 2 7 4】

$Z^1$  は、任意に置換された  $C_1 - C_6$  アルキルであり；

## 【1 2 7 5】

$X^1$  は、任意に置換された  $C_2 - C_6$  アルキレニルであり；

## 【1 2 7 6】

$X^2$  及び  $X^3$  は、独立して、結合、 $-CH_2-$ 、または  $-CH_2CH_2-$  であり；

## 【1 2 7 7】

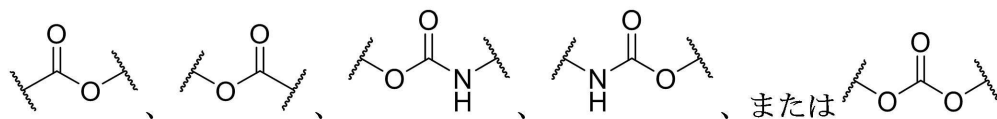
$X^4$  及び  $X^5$  は、独立して、任意に置換された  $C_2 - C_{14}$  アルキレニルであり；

## 【1 2 7 8】

$Y^1$  及び  $Y^2$  は、独立して、

## 【1 2 7 9】

## 【化 8 3】



であり；

## 【1 2 8 0】

$R^2$  及び  $R^3$  は、独立して、任意に置換された  $C_4 - C_{20}$  アルキルであり；

## 【1 2 8 1】

$R^{1a}$  は、

## 【1 2 8 2】

10

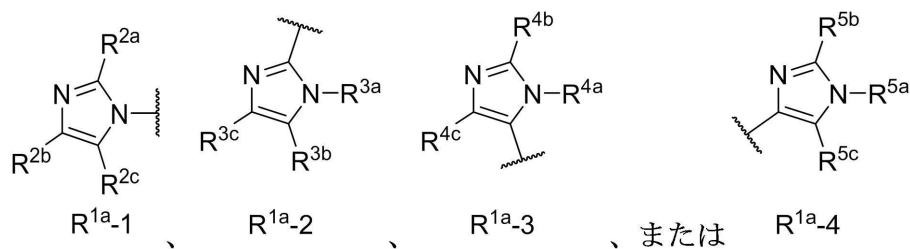
20

30

40

50

## 【化 8 4】



10

であり；

## 【1 2 8 3】

R<sup>2a</sup>、R<sup>2b</sup>、及びR<sup>2c</sup>は、独立して、水素及びC<sub>1</sub>－C<sub>6</sub>アルキルであり；

## 【1 2 8 4】

R<sup>3a</sup>、R<sup>3b</sup>、及びR<sup>3c</sup>は、独立して、水素及びC<sub>1</sub>－C<sub>6</sub>アルキルであり；

## 【1 2 8 5】

R<sup>4a</sup>、R<sup>4b</sup>、及びR<sup>4c</sup>は、独立して、水素及びC<sub>1</sub>－C<sub>6</sub>アルキルであり；

## 【1 2 8 6】

R<sup>5a</sup>、R<sup>5b</sup>、及びR<sup>5c</sup>は、独立して、水素及びC<sub>1</sub>－C<sub>6</sub>アルキルである）。

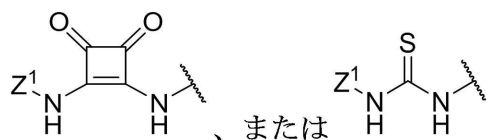
20

## 【1 2 8 7】

実施形態 6 . R<sup>1</sup> は、－OH、

## 【1 2 8 8】

## 【化 8 5】



30

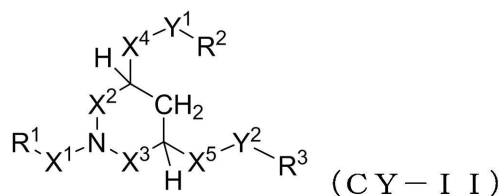
である、実施形態 5 に記載の化合物。

## 【1 2 8 9】

実施形態 7 . 式 (CY-I I) の構造：

## 【1 2 9 0】

## 【化 8 6】



40

## 【1 2 9 1】

を有する化合物、またはその薬学的に許容可能な塩（式中、

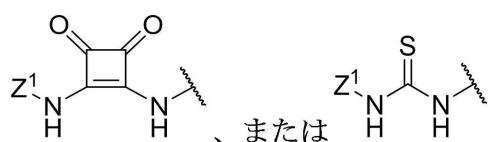
## 【1 2 9 2】

R<sup>1</sup> は、－OH、R<sup>1a</sup>、

## 【1 2 9 3】

50

【化 8 7】



であり、

**【 1 2 9 4 】**

Z<sup>1</sup> は、任意に置換された C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub> アルキルであり；

**【 1 2 9 5 】**

X<sup>1</sup> は、任意に置換された C<sub>2</sub> - C<sub>6</sub> アルキレニルであり；

**【 1 2 9 6 】**

$X^2$  及び  $X^3$  は、独立して、結合、 $-CH_2-$ 、または  $-CH_2CH_2-$  であり；

**【 1 2 9 7 】**

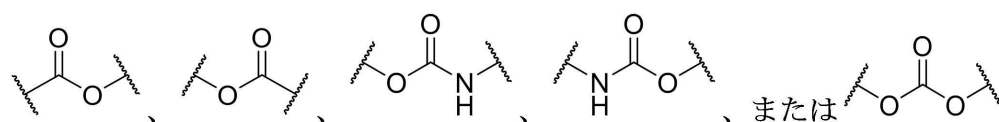
X<sup>4</sup> 及び X<sup>5</sup> は、独立して、任意に置換された C<sub>2</sub> - C<sub>14</sub> アルキレニルであり；

**【 1 2 9 8 】**

$Y^1$  及び  $Y^2$  は、独立して、

【 1 2 9 9 】

【化 8 8】



であり；

**【 1 3 0 0 】**

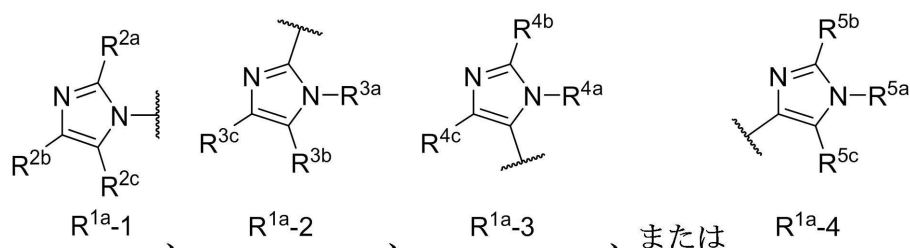
R<sup>2</sup> 及び R<sup>3</sup> は、独立して、任意に置換された C<sub>4</sub> - C<sub>20</sub> アルキルであり；

**【 1 3 0 1 】**

R 1 a は、

**【 1 3 0 2 】**

【化 8 9】



であり；

**【 1 3 0 3 】**

$R^{2a}$ 、 $R^{2b}$ 、及び  $R^{2c}$  は、独立して、水素及び  $C_1 - C_6$  アルキルであり；

【 1 3 0 4 】

$R^{3a}$ 、 $R^{3b}$ 、及び  $R^{3c}$  は、独立して、水素及び  $C_1-C_6$  アルキルであり；

【 1 3 0 5 】

R<sup>4a</sup>、R<sup>4b</sup>、及び R<sup>4c</sup> は、独立して、水素及び C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub> アルキルであり；

【1306】

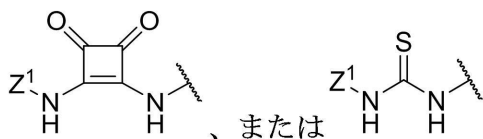
$R^{5a}$ 、 $R^{5b}$ 、及び  $R^{5c}$  は、独立して、水素及び  $C_1 - C_6$  アルキルである）。

【1307】

実施形態 8.  $R^1$  は、 $-OH$ 、

【1308】

【化90】



10

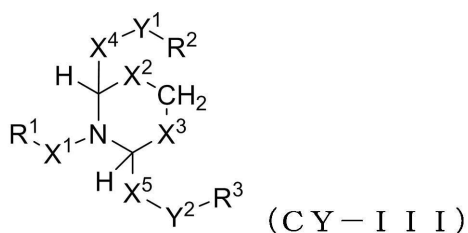
である、実施形態 7 に記載の化合物。

【1309】

実施形態 9. 式 (CY-III) の構造：

【1310】

【化91】



20

【1311】

を有する化合物、またはその薬学的に許容可能な塩（式中、

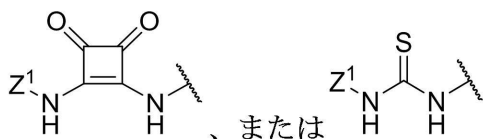
【1312】

$R^1$  は、 $-OH$ 、 $R^{1a}$ 、

30

【1313】

【化92】



であり、

【1314】

$Z^1$  は、任意に置換された  $C_1 - C_6$  アルキルであり；

40

【1315】

$X^1$  は、任意に置換された  $C_2 - C_6$  アルキレニルであり；

【1316】

$X^2$  及び  $X^3$  は、独立して、結合、 $-CH_2-$ 、または  $-CH_2CH_2-$  であり；

【1317】

$X^4$  及び  $X^5$  は、独立して、任意に置換された  $C_2 - C_{14}$  アルキレニルであり；

【1318】

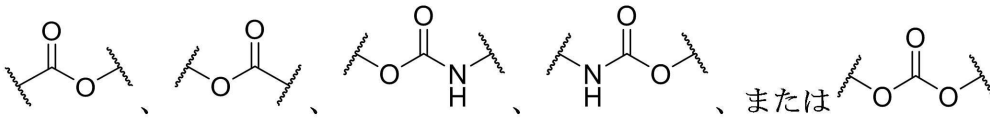
$Y^1$  及び  $Y^2$  は、独立して、

【1319】

50



【化 9 3】



であり；

【1 3 2 0】

 $R^2$  及び  $R^3$  は、独立して、任意に置換された  $C_4 - C_{20}$  アルキルであり；

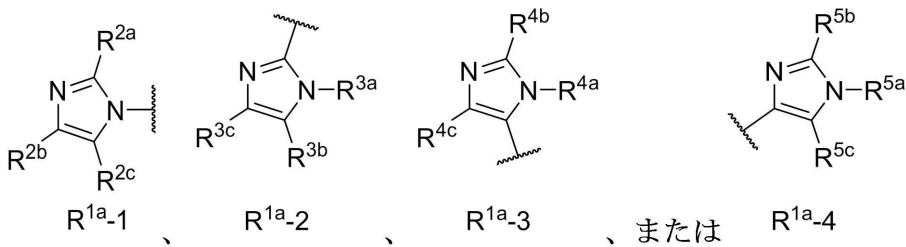
10

【1 3 2 1】

 $R^{1a}$  は、

【1 3 2 2】

【化 9 4】



20

であり；

【1 3 2 3】

 $R^{2a}$ 、 $R^{2b}$ 、及び  $R^{2c}$  は、独立して、水素及び  $C_1 - C_6$  アルキルであり；

【1 3 2 4】

 $R^{3a}$ 、 $R^{3b}$ 、及び  $R^{3c}$  は、独立して、水素及び  $C_1 - C_6$  アルキルであり；

【1 3 2 5】

 $R^{4a}$ 、 $R^{4b}$ 、及び  $R^{4c}$  は、水素及び  $C_1 - C_6$  アルキルであり；

30

【1 3 2 6】

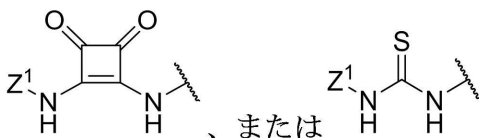
 $R^{5a}$ 、 $R^{5b}$ 、及び  $R^{5c}$  は、水素及び  $C_1 - C_6$  アルキルである）。

【1 3 2 7】

実施形態 10.  $R^1$  は、 $-OH$ 、

【1 3 2 8】

【化 9 5】



40

である、実施形態 9 に記載の化合物。

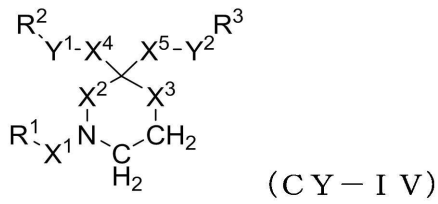
【1 3 2 9】

実施形態 11. 式 (CY-IV) の構造：

【1 3 3 0】

50

【化 9 6】



10

【1 3 3 1】

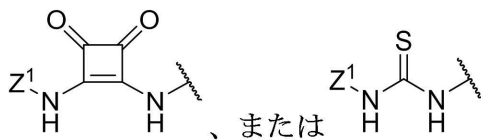
を有する化合物、またはその薬学的に許容可能な塩（式中、

【1 3 3 2】

 $R^1$  は、 $-OH$ 、 $R^{1a}$ 、

【1 3 3 3】

【化 9 7】



20

であり、

【1 3 3 4】

 $Z^1$  は、任意に置換された  $C_1 - C_6$  アルキルであり；

【1 3 3 5】

 $X^1$  は、任意に置換された  $C_2 - C_6$  アルキレニルであり；

【1 3 3 6】

 $X^2$  及び  $X^3$  は、独立して、結合、 $-CH_2-$ 、または  $-CH_2CH_2-$  であり；

【1 3 3 7】

 $X^4$  及び  $X^5$  は、独立して、任意に置換された  $C_2 - C_{14}$  アルキレニルであり；

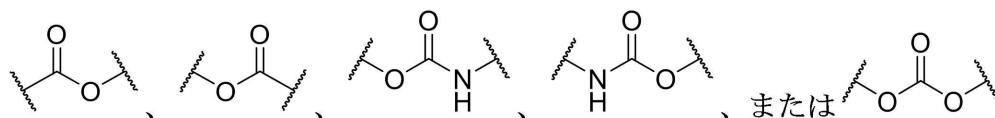
30

【1 3 3 8】

 $Y^1$  及び  $Y^2$  は、独立して、

【1 3 3 9】

【化 9 8】



40

であり；

【1 3 4 0】

 $R^2$  及び  $R^3$  は、独立して、任意に置換された  $C_4 - C_{20}$  アルキルであり；

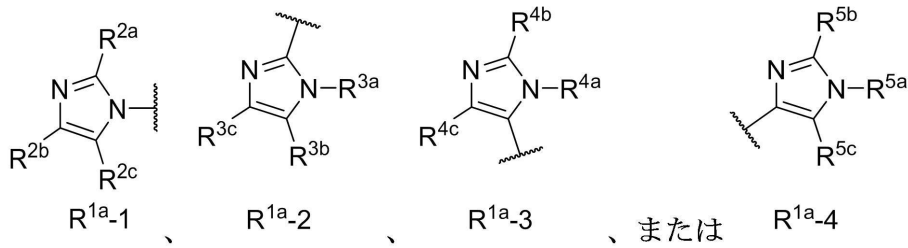
【1 3 4 1】

 $R^{1a}$  は、

【1 3 4 2】

50

【化 9 9】



10

であり；

【1 3 4 3】

R<sup>2a</sup>、R<sup>2b</sup>、及び R<sup>2c</sup> は、独立して、水素及び C<sub>1</sub>－C<sub>6</sub> アルキルであり；

【1 3 4 4】

R<sup>3a</sup>、R<sup>3b</sup>、及び R<sup>3c</sup> は、独立して、水素及び C<sub>1</sub>－C<sub>6</sub> アルキルであり；

【1 3 4 5】

R<sup>4a</sup>、R<sup>4b</sup>、及び R<sup>4c</sup> は、独立して、水素及び C<sub>1</sub>－C<sub>6</sub> アルキルであり；

【1 3 4 6】

R<sup>5a</sup>、R<sup>5b</sup>、及び R<sup>5c</sup> は、水素及び C<sub>1</sub>－C<sub>6</sub> アルキルである）。

20

【1 3 4 7】

実施形態 12 . R<sup>1</sup> は、－OH、

【1 3 4 8】

【化 1 0 0】



30

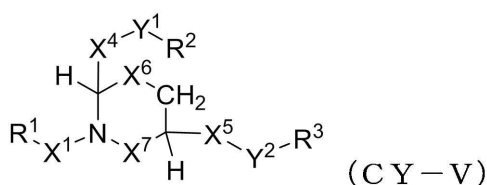
である、実施形態 11 に記載の化合物。

【1 3 4 9】

実施形態 13 . 式 (CY-V) の構造：

【1 3 5 0】

【化 1 0 1】



40

【1 3 5 1】

を有する化合物、またはその薬学的に許容可能な塩（式中、

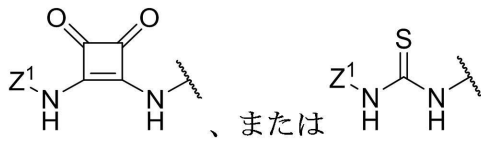
【1 3 5 2】

R<sup>1</sup> は、－OH、R<sup>1a</sup>、

【1 3 5 3】

50

【化 1 0 2】



であり、

【1 3 5 4】

Z<sup>1</sup> は、任意に置換された C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub> アルキルであり；

【1 3 5 5】

X<sup>1</sup> は、任意に置換された C<sub>2</sub> - C<sub>6</sub> アルキレニルであり；

【1 3 5 6】

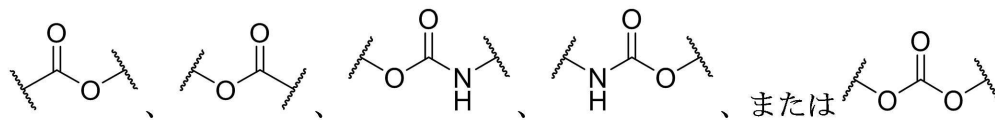
X<sup>4</sup> 及び X<sup>5</sup> は、独立して、任意に置換された C<sub>2</sub> - C<sub>14</sub> アルキレニルであり；

【1 3 5 7】

Y<sup>1</sup> 及び Y<sup>2</sup> は、独立して、

【1 3 5 8】

【化 1 0 3】



であり；

【1 3 5 9】

X<sup>6</sup> 及び X<sup>7</sup> は、独立して、-CH<sub>2</sub>- または -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>- であり；

【1 3 6 0】

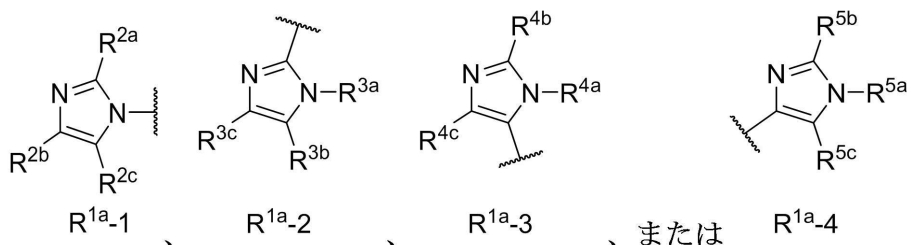
R<sup>2</sup> 及び R<sup>3</sup> は、独立して、任意に置換された C<sub>4</sub> - C<sub>20</sub> アルキルであり；

【1 3 6 1】

R<sup>1a</sup> は、

【1 3 6 2】

【化 1 0 4】



であり；

【1 3 6 3】

R<sup>2a</sup>、R<sup>2b</sup>、及び R<sup>2c</sup> は、独立して、水素及び C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub> アルキルであり；

【1 3 6 4】

R<sup>3a</sup>、R<sup>3b</sup>、及び R<sup>3c</sup> は、独立して、水素及び C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub> アルキルであり；

【1 3 6 5】

R<sup>4a</sup>、R<sup>4b</sup>、及び R<sup>4c</sup> は、水素及び C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub> アルキルであり；

【1366】

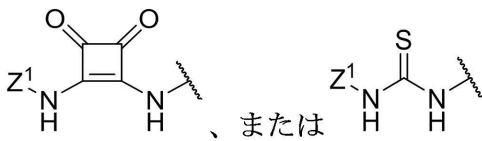
$R^{5a}$ 、 $R^{5b}$ 、及び  $R^{5c}$  は、水素及び  $C_1 - C_6$  アルキルである）。

【1367】

実施形態 14.  $R^1$  は、 $-OH$ 、

【1368】

【化105】



10

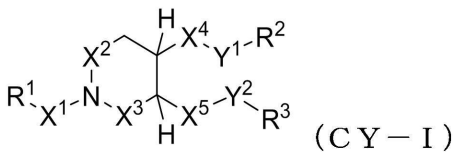
である、実施形態 13 に記載の化合物。

【1369】

実施形態 15. 式 (CY-I) の構造：

【1370】

【化106】



20

【1371】

を有する化合物、またはその薬学的に許容可能な塩（式中、

【1372】

$R^1$  は、 $-OH$ 、 $R^{1a}$ 、

【1373】

【化107】

30



であり；

【1374】

$Z^1$  は、任意に置換された  $C_1 - C_6$  アルキルであり；

【1375】

$X^1$  は、任意に置換された  $C_2 - C_6$  アルキレニルであり；

【1376】

$X^2$  及び  $X^3$  は、独立して、結合、 $-CH_2-$ 、または  $-CH_2CH_2-$  であり；

【1377】

$X^4$  及び  $X^5$  は、独立して、任意に置換された  $C_2 - C_{14}$  アルキレニルまたは任意に置換された  $C_2 - C_{14}$  アルケニレニルであり；

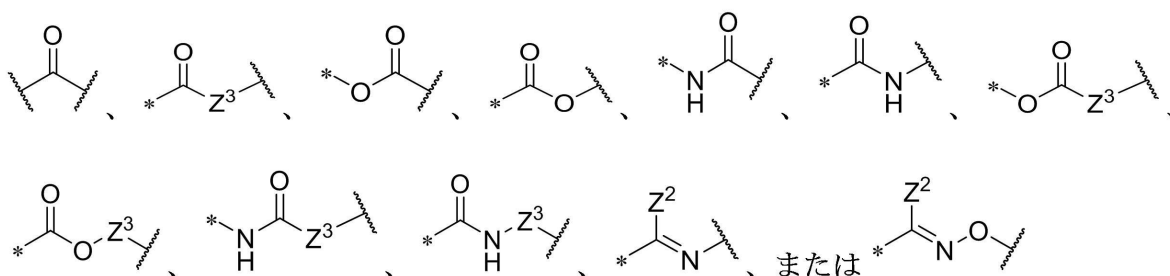
【1378】

$Y^1$  及び  $Y^2$  は、独立して、

【1379】

50

【化 1 0 8】



10

であり；

【1 3 8 0】

「\*」でマークされた結合は、 $X^4$  または  $X^5$  に結合されており；

【1 3 8 1】

各  $Z^2$  は、独立して、H または任意に置換された  $C_1 - C_8$  アルキルであり；

【1 3 8 2】

各  $Z^3$  は、独立して、任意に置換された  $C_1 - C_6$  アルキレニルであり；

【1 3 8 3】

 $R^2$  は、任意に置換された  $C_4 - C_{20}$  アルキル、任意に置換された  $C_2 - C_{14}$  アルケニレニル、または  $-CH(OR^6)(OR^7)$  であり；

20

【1 3 8 4】

 $R^3$  は、任意に置換された  $C_4 - C_{20}$  アルキル、任意に置換された  $C_2 - C_{14}$  アルケニレニル、または  $-CH(OR^8)(OR^9)$  であり；

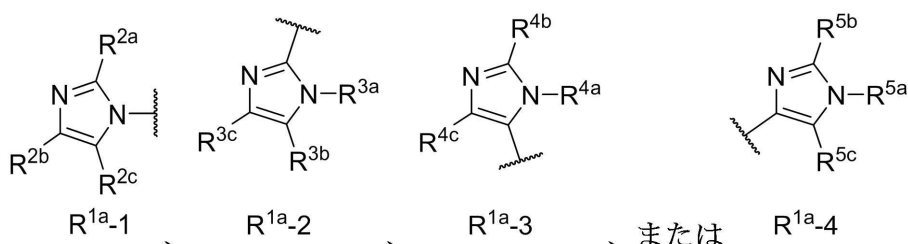
【1 3 8 5】

 $R^{1a}$  は、

【1 3 8 6】

【化 1 0 9】

30



であり；

【1 3 8 7】

 $R^{2a}$ 、 $R^{2b}$ 、及び  $R^{2c}$  は、独立して、水素及び  $C_1 - C_6$  アルキルであり；

40

【1 3 8 8】

 $R^{3a}$ 、 $R^{3b}$ 、及び  $R^{3c}$  は、独立して、水素及び  $C_1 - C_6$  アルキルであり；

【1 3 8 9】

 $R^{4a}$ 、 $R^{4b}$ 、及び  $R^{4c}$  は、独立して、水素及び  $C_1 - C_6$  アルキルであり；

【1 3 9 0】

 $R^{5a}$ 、 $R^{5b}$ 、及び  $R^{5c}$  は、独立して、水素及び  $C_1 - C_6$  アルキルであり；

【1 3 9 1】

 $R^6$ 、 $R^7$ 、 $R^8$ 、及び  $R^9$  は、独立して、任意に置換された  $C_1 - C_{14}$  アルキル、任意に置換された  $C_2 - C_{14}$  アルケニレニル、または  $-(CH_2)_m-A-(CH_2)_nH$  であり；

50

【1392】

Aは、 $C_3 - C_8$ シクロアルキレニルであり；

【1393】

各mは、独立して、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、または12であり；

【1394】

各nは、独立して、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、または12である）。

【1395】

実施形態16。

【1396】

$R^1$ は、 $-OH$ 、 $R^{1a}$ 、

【1397】

【化110】



であり、

【1398】

$Z^1$ は、任意に置換された $C_1 - C_6$ アルキルであり；

【1399】

$X^1$ は、任意に置換された $C_2 - C_6$ アルキレニルであり；

【1400】

$X^2$ 及び $X^3$ は、独立して、結合、 $-CH_2-$ 、または $-CH_2CH_2-$ であり；

【1401】

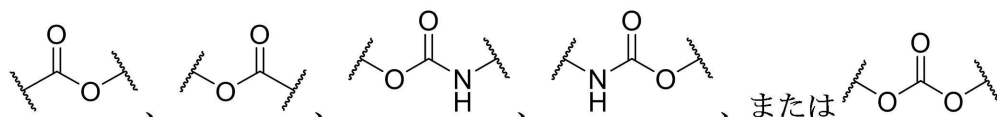
$X^4$ 及び $X^5$ は、独立して、任意に置換された $C_2 - C_{14}$ アルキレニルであり；

【1402】

$Y^1$ 及び $Y^2$ は、独立して、

【1403】

【化111】



であり；

【1404】

$R^2$ 及び $R^3$ は、独立して、任意に置換された $C_4 - C_{20}$ アルキルであり；

【1405】

$R^{1a}$ は、

【1406】

10

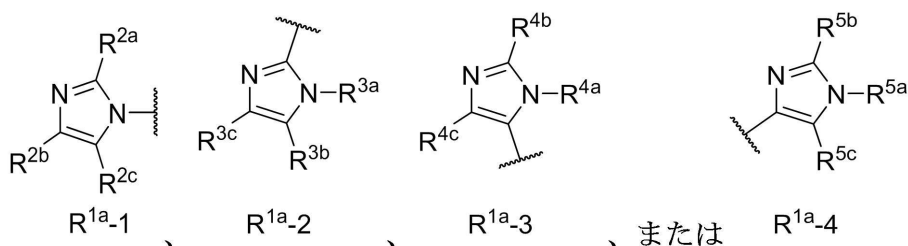
20

30

40

50

【化 1 1 2】



10

であり；

【1 4 0 7】

R<sup>2a</sup>、R<sup>2b</sup>、及び R<sup>2c</sup> は、独立して、水素及び C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub> アルキルであり；

【1 4 0 8】

R<sup>3a</sup>、R<sup>3b</sup>、及び R<sup>3c</sup> は、独立して、水素及び C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub> アルキルであり；

【1 4 0 9】

R<sup>4a</sup>、R<sup>4b</sup>、及び R<sup>4c</sup> は、独立して、水素及び C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub> アルキルであり；

【1 4 1 0】

R<sup>5a</sup>、R<sup>5b</sup>、及び R<sup>5c</sup> は、独立して、水素及び C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub> アルキルである、実施形態 15 に記載の化合物。

20

【1 4 1 1】

実施形態 17 .

【1 4 1 2】

R<sup>1</sup> は、-OH、R<sup>1a</sup>、

【1 4 1 3】

【化 1 1 3】



30

であり、

【1 4 1 4】

Z<sup>1</sup> は、任意に置換された C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub> アルキルであり；

【1 4 1 5】

X<sup>1</sup> は、任意に置換された C<sub>2</sub> - C<sub>6</sub> アルキレニルであり；

【1 4 1 6】

X<sup>2</sup> 及び X<sup>3</sup> は、独立して、結合、-CH<sub>2</sub>-、または -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-であり；

40

【1 4 1 7】

X<sup>4</sup> 及び X<sup>5</sup> は、独立して、任意に置換された C<sub>2</sub> - C<sub>14</sub> アルキレニルであり；

【1 4 1 8】

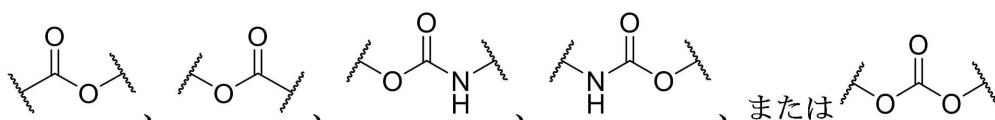
Y<sup>1</sup> 及び Y<sup>2</sup> は、独立して、

【1 4 1 9】

50



【化 1 1 4】



であり；

【1 4 2 0】

$R^2$  及び  $R^3$  は、独立して、任意に置換された  $C_4 - C_{20}$  アルキルであり；

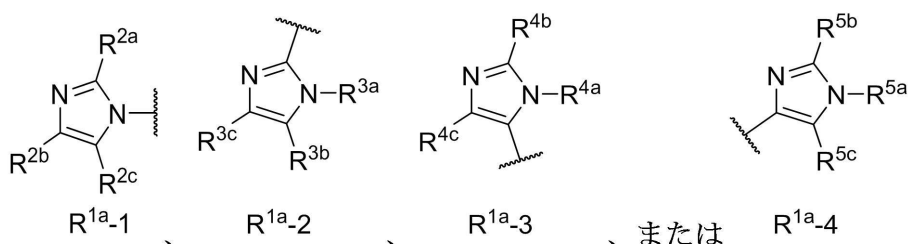
10

【1 4 2 1】

$R^{1a}$  は、

【1 4 2 2】

【化 1 1 5】



20

であり；

【1 4 2 3】

$R^{2a}$ 、 $R^{2b}$ 、及び  $R^{2c}$  は、独立して、水素及び  $C_1 - C_6$  アルキルであり；

【1 4 2 4】

$R^{3a}$ 、 $R^{3b}$ 、及び  $R^{3c}$  は、独立して、水素及び  $C_1 - C_6$  アルキルであり；

【1 4 2 5】

$R^{4a}$ 、 $R^{4b}$ 、及び  $R^{4c}$  は、独立して、水素及び  $C_1 - C_6$  アルキルであり；

30

【1 4 2 6】

$R^{5a}$ 、 $R^{5b}$ 、及び  $R^{5c}$  は、独立して、水素及び  $C_1 - C_6$  アルキルである、実施形態 16 に記載の化合物。

【1 4 2 7】

実施形態 18 .  $R^1$  は、 $-OH$ 、

【1 4 2 8】

【化 1 1 6】



40

である、実施形態 16 または 17 に記載の化合物。

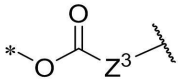
【1 4 2 9】

実施形態 19 .  $Y^1$  及び  $Y^2$  は、独立して、

【1 4 3 0】

50

【化 1 1 7】



である、実施形態 1 6 または 1 7 に記載の化合物。

【1 4 3 1】

実施形態 2 0 .  $R^2$  は、 $-CH(OR^6)(OR^7)$  である、実施形態 1 5、1 8、または 1 9 のいずれか 1 つに記載の化合物。

【1 4 3 2】

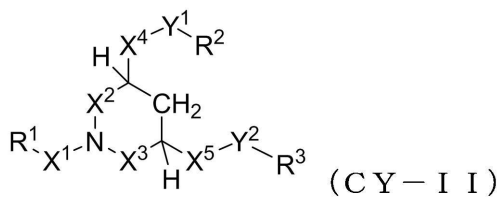
実施形態 2 1 .  $R^3$  は、 $-CH(OR^8)(OR^9)$  である、実施形態 1 5 または 1 8 ~ 2 0 のいずれか 1 つに記載の化合物。

【1 4 3 3】

実施形態 2 2 . 式 (CY-I I) の構造：

【1 4 3 4】

【化 1 1 8】



【1 4 3 5】

を有する化合物、またはその薬学的に許容可能な塩（式中、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $X^1$ 、 $X^2$ 、 $X^3$ 、 $X^4$ 、 $X^5$ 、 $Y^1$ 、及び  $Y^2$  は、実施形態 1 5 の式 (CY-I) に関連して定義されるとおりである）。

【1 4 3 6】

実施形態 2 3 .

【1 4 3 7】

$R^1$  は、 $-OH$ 、 $R^{1a}$ 、

【1 4 3 8】

【化 1 1 9】



であり、

【1 4 3 9】

$Z^1$  は、任意に置換された  $C_1 - C_6$  アルキルであり；

【1 4 4 0】

$X^1$  は、任意に置換された  $C_2 - C_6$  アルキレニルであり；

【1 4 4 1】

$X^2$  及び  $X^3$  は、独立して、結合、 $-CH_2-$ 、または  $-CH_2CH_2-$  であり；

【1 4 4 2】

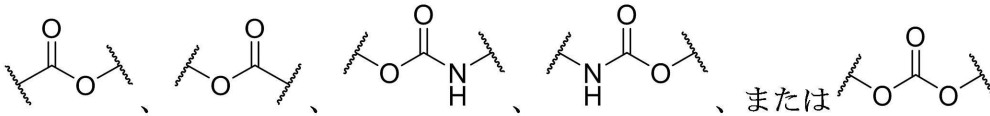
$X^4$  及び  $X^5$  は、独立して、任意に置換された  $C_2 - C_{14}$  アルキレニルであり；

【1443】

$Y^1$  及び  $Y^2$  は、独立して、

【1444】

【化120】



10

であり；

【1445】

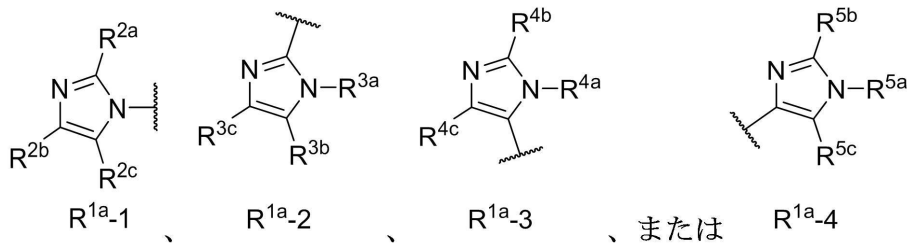
$R^2$  及び  $R^3$  は、独立して、任意に置換された  $C_4 - C_{20}$  アルキルであり；

【1446】

$R^{1a}$  は、

【1447】

【化121】



20

であり；

【1448】

$R^{2a}$ 、 $R^{2b}$ 、及び  $R^{2c}$  は、独立して、水素及び  $C_1 - C_6$  アルキルであり；

【1449】

$R^{3a}$ 、 $R^{3b}$ 、及び  $R^{3c}$  は、独立して、水素及び  $C_1 - C_6$  アルキルであり；

【1450】

$R^{4a}$ 、 $R^{4b}$ 、及び  $R^{4c}$  は、独立して、水素及び  $C_1 - C_6$  アルキルであり；

【1451】

$R^{5a}$ 、 $R^{5b}$ 、及び  $R^{5c}$  は、独立して、水素及び  $C_1 - C_6$  アルキルである、実施形態22に記載の化合物。

【1452】

実施形態24.  $R^1$  は、 $-OH$ 、

【1453】

【化122】



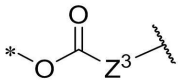
40

である、実施形態22または23に記載の化合物。

【1454】

50

実施形態 25.  $Y^1$  及び  $Y^2$  は、独立して、  
 【1455】  
 【化123】



である、実施形態 22 または 23 に記載の化合物。

【1456】

実施形態 26.  $R^2$  は、 $-CH(OR^6)(OR^7)$  である、実施形態 22、24 または 25 のいずれか 1 つに記載の化合物。

【1457】

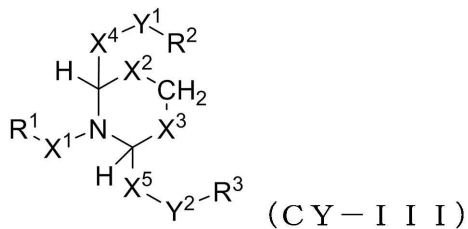
実施形態 27.  $R^3$  は、 $-CH(OR^8)(OR^9)$  である、実施形態 22 または 24 ~ 26 のいずれか 1 つに記載の化合物。

【1458】

実施形態 28. 式 (CY-III) の構造：

【1459】

【化124】



【1460】

を有する化合物、またはその薬学的に許容可能な塩（式中、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $X^1$ 、 $X^2$ 、 $X^3$ 、 $X^4$ 、 $X^5$ 、 $Y^1$ 、及び  $Y^2$  は、実施形態 15 における式 (CY-I) に関連して定義されたとおりである）。

【1461】

実施形態 29.

【1462】

$R^1$  は、 $-OH$ 、 $R^{1a}$ 、

【1463】

【化125】



であり、

【1464】

$Z^1$  は、任意に置換された  $C_1 - C_6$  アルキルであり；

【1465】

$X^1$  は、任意に置換された  $C_2 - C_6$  アルキレニルであり；

【1466】

10

20

30

40

50

$X^2$  及び  $X^3$  は、独立して、結合、 $-CH_2-$ 、または  $-CH_2CH_2-$  であり；

【1467】

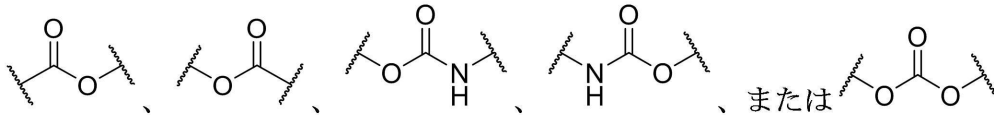
$X^4$  及び  $X^5$  は、独立して、任意に置換された  $C_2-C_{14}$  アルキレニルであり；

【1468】

$Y^1$  及び  $Y^2$  は、独立して、

【1469】

【化126】



10

であり；

【1470】

$R^2$  及び  $R^3$  は、独立して、任意に置換された  $C_4-C_{20}$  アルキルであり；

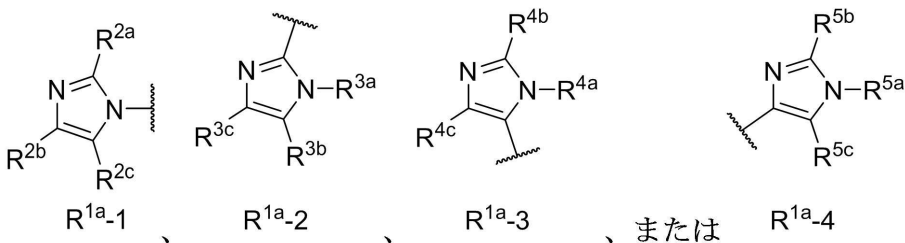
【1471】

$R^{1a}$  は、

【1472】

【化127】

20



30

であり；

【1473】

$R^{2a}$ 、 $R^{2b}$ 、及び  $R^{2c}$  は、独立して、水素及び  $C_1-C_6$  アルキルであり；

【1474】

$R^{3a}$ 、 $R^{3b}$ 、及び  $R^{3c}$  は、独立して、水素及び  $C_1-C_6$  アルキルであり；

【1475】

$R^{4a}$ 、 $R^{4b}$ 、及び  $R^{4c}$  は、独立して、水素及び  $C_1-C_6$  アルキルであり；

【1476】

$R^{5a}$ 、 $R^{5b}$ 、及び  $R^{5c}$  は、独立して、水素及び  $C_1-C_6$  アルキルである、実施形態28に記載の化合物。

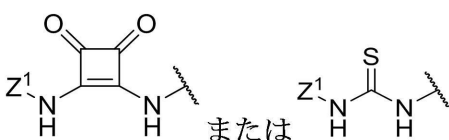
40

【1477】

実施形態30。 $R^1$  は、 $-OH$ 、

【1478】

【化128】



50

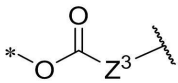
である、実施形態 28 または 29 に記載の化合物。

【1479】

実施形態 31.  $Y^1$  及び  $Y^2$  は、独立して、

【1480】

【化129】



10

である、実施形態 28 または 30 に記載の化合物。

【1481】

実施形態 32.  $R^2$  は、 $-CH(OR^6)(OR^7)$  である、実施形態 28、30、または 31 のいずれか 1 つに記載の化合物。

【1482】

実施形態 33.  $R^3$  は、 $-CH(OR^8)(OR^9)$  である、実施形態 28 または 30 ~ 32 のいずれか 1 つに記載の化合物。

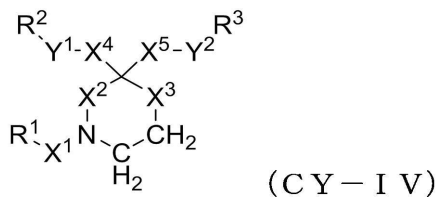
【1483】

実施形態 34. 式 (CY-IV) の構造：

【1484】

【化130】

20



30

【1485】

を有する化合物、またはその薬学的に許容可能な塩（式中、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $X^1$ 、 $X^2$ 、 $X^3$ 、 $X^4$ 、 $X^5$ 、 $Y^1$ 、及び  $Y^2$  は、実施形態 15 の式 (CY-I) に関連して定義されるとおりである）。

【1486】

実施形態 35.

【1487】

$R^1$  は、 $-OH$ 、 $R^{1a}$ 、

【1488】

【化131】

40



であり、

【1489】

$Z^1$  は、任意に置換された  $C_1 - C_6$  アルキルであり；

【1490】

50

$X^1$  は、任意に置換された  $C_2 - C_6$  アルキレニルであり；

【1491】

$X^2$  及び  $X^3$  は、独立して、結合、 $-CH_2-$ 、または  $-CH_2CH_2-$  であり；

【1492】

$X^4$  及び  $X^5$  は、独立して、任意に置換された  $C_2 - C_{14}$  アルキレニルであり；

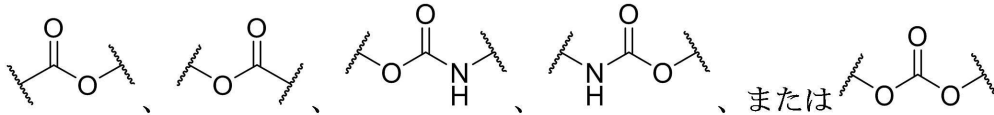
【1493】

$Y^1$  及び  $Y^2$  は、独立して、

【1494】

【化132】

10



であり；

【1495】

$R^2$  及び  $R^3$  は、独立して、任意に置換された  $C_4 - C_{20}$  アルキルであり；

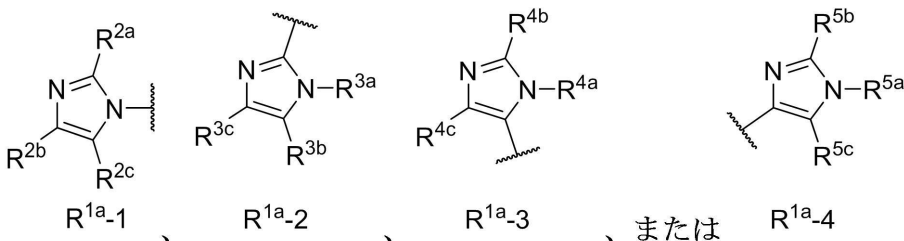
【1496】

$R^{1a}$  は、

【1497】

【化133】

20



30

であり；

【1498】

$R^{2a}$ 、 $R^{2b}$ 、及び  $R^{2c}$  は、独立して、水素及び  $C_1 - C_6$  アルキルであり；

【1499】

$R^{3a}$ 、 $R^{3b}$ 、及び  $R^{3c}$  は、独立して、水素及び  $C_1 - C_6$  アルキルであり；

【1500】

$R^{4a}$ 、 $R^{4b}$ 、及び  $R^{4c}$  は、独立して、水素及び  $C_1 - C_6$  アルキルであり；

【1501】

$R^{5a}$ 、 $R^{5b}$ 、及び  $R^{5c}$  は、独立して、水素及び  $C_1 - C_6$  アルキルである、実施形態34に記載の化合物。

40

【1502】

実施形態36.  $R^1$  は、 $-OH$ 、

【1503】

50

【化 1 3 4】



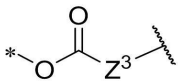
である、実施形態 3 4 または 3 5 に記載の化合物。

【1 5 0 4】

実施形態 3 7 . Y<sup>1</sup> 及び Y<sup>2</sup> は、独立して、

【1 5 0 5】

【化 1 3 5】



である、実施形態 3 4 または 3 6 に記載の化合物。

【1 5 0 6】

実施形態 3 8 . R<sup>2</sup> は、-CH(OR<sup>6</sup>)(OR<sup>7</sup>) である、実施形態 3 4、3 6、または 3 7 のいずれか 1 つに記載の化合物。

【1 5 0 7】

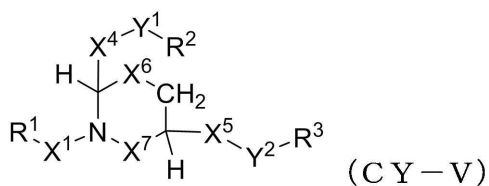
実施形態 3 9 . R<sup>3</sup> は、-CH(OR<sup>8</sup>)(OR<sup>9</sup>) である、実施形態 3 4 または 3 6 ~ 3 8 のいずれか 1 つに記載の化合物。

【1 5 0 8】

実施形態 4 0 . 式 (CY-V) の構造：

【1 5 0 9】

【化 1 3 6】



【1 5 1 0】

を有する化合物、またはその薬学的に許容可能な塩（式中、X<sup>6</sup> 及び X<sup>7</sup> は、独立して、-CH<sub>2</sub>-または-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-；及び R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、X<sup>1</sup>、X<sup>4</sup>、X<sup>5</sup>、Y<sup>1</sup>、及び Y<sup>2</sup> は、実施形態 1 5 の式 (CY-I) に関連して定義されたとおりである）。

【1 5 1 1】

実施形態 4 1 .

【1 5 1 2】

R<sup>1</sup> は、-OH、R<sup>1a</sup>、

【1 5 1 3】

10

20

30

40

50



【化 1 3 7】



であり、

【1 5 1 4】

 $Z^1$  は、任意に置換された  $C_1 - C_6$  アルキルであり；

10

【1 5 1 5】

 $X^1$  は、任意に置換された  $C_2 - C_6$  アルキレニルであり；

【1 5 1 6】

 $X^2$  及び  $X^3$  は、独立して、結合、 $-CH_2-$ 、または  $-CH_2CH_2-$  であり；

【1 5 1 7】

 $X^4$  及び  $X^5$  は、独立して、任意に置換された  $C_2 - C_{14}$  アルキレニルであり；

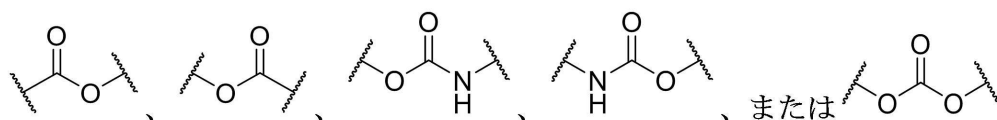
【1 5 1 8】

 $Y^1$  及び  $Y^2$  は、独立して、

【1 5 1 9】

【化 1 3 8】

20



であり；

【1 5 2 0】

 $R^2$  及び  $R^3$  は、独立して、任意に置換された  $C_4 - C_{20}$  アルキルであり；

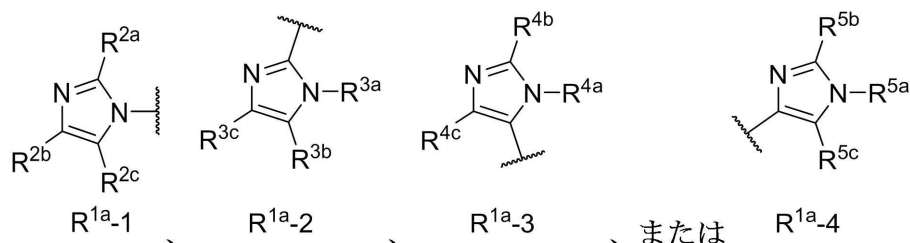
【1 5 2 1】

 $R^{1a}$  は、

30

【1 5 2 2】

【化 1 3 9】



40

であり；

【1 5 2 3】

 $R^{2a}$ 、 $R^{2b}$ 、及び  $R^{2c}$  は、独立して、水素及び  $C_1 - C_6$  アルキルであり；

【1 5 2 4】

 $R^{3a}$ 、 $R^{3b}$ 、及び  $R^{3c}$  は、独立して、水素及び  $C_1 - C_6$  アルキルであり；

【1 5 2 5】

 $R^{4a}$ 、 $R^{4b}$ 、及び  $R^{4c}$  は、独立して、水素及び  $C_1 - C_6$  アルキルであり；

50

【1526】

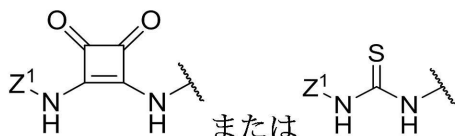
$R^{5a}$ 、 $R^{5b}$ 、及び  $R^{5c}$  は、独立して、水素及び  $C_1 - C_6$  アルキルである、実施形態 40 に記載の化合物。

【1527】

実施形態 42 .  $R^1$  は、 $-OH$ 、

【1528】

【化140】



10

である、実施形態 40 または 41 に記載の化合物。

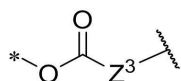
【1529】

実施形態 43 .  $Y^1$  及び  $Y^2$  は、独立して、

【1530】

【化141】

20



である、実施形態 40 または 41 に記載の化合物。

【1531】

実施形態 44 .  $R^2$  は、 $-CH(OR^6)(OR^7)$  である、実施形態 40、42、または 43 のいずれか 1 つに記載の化合物。

【1532】

実施形態 45 .  $R^3$  は、 $-CH(OR^8)(OR^9)$  である、実施形態 40 または 42 ~ 44 のいずれか 1 つに記載の化合物。

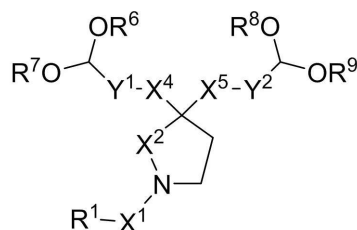
30

【1533】

実施形態 46 . 式 (CY-VI) の構造：

【1534】

【化142】



(CY-VI)

40

【1535】

を有する化合物、またはその薬学的に許容可能な塩（式中、 $R^1$ 、 $R^6$ 、 $R^7$ 、 $R^8$ 、 $R^9$ 、 $X^1$ 、 $X^2$ 、 $X^4$ 、 $X^5$ 、 $Y^1$ 、及び  $Y^2$  は、実施形態 15 の式 (CY-I) に関連して定義されたとおりである）。

【1536】

実施形態 47 .  $R^1$  は、 $-OH$  である、実施形態 46 に記載の化合物、またはその薬学

50

的に許容可能な塩。

【1537】

実施形態48.  $X^1$  は、 $C_2 - C_6$  アルキレニルである、実施形態46または47に記載の化合物、またはその薬学的に許容可能な塩。

【1538】

実施形態49.  $X^2$  は、 $-CH_2CH_2-$  である、実施形態46～48のいずれか1つに記載の化合物、またはその薬学的に許容可能な塩。

【1539】

実施形態50.  $X^4$  は、 $C_2 - C_6$  アルキレニルである、実施形態46～49のいずれか1つに記載の化合物、またはその薬学的に許容可能な塩。

【1540】

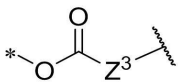
実施形態51.  $X^5$  は、 $C_2 - C_6$  アルキレニルである、実施形態46～50のいずれか1つに記載の化合物、またはその薬学的に許容可能な塩。

【1541】

実施形態52.  $Y^1$  は、

【1542】

【化143】



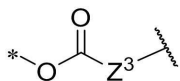
である、実施形態46～41のいずれか1つに記載の化合物、またはその薬学的に許容可能な塩。

【1543】

実施形態53.  $Y^2$  は、

【1544】

【化144】



である、実施形態46～52のいずれか1つに記載の化合物、またはその薬学的に許容可能な塩。

【1545】

実施形態54. 各  $Z^3$  は、独立して、任意に置換された  $C_1 - C_6$  アルキレニルである、実施形態46～53のいずれか1つに記載の化合物、またはその薬学的に許容可能な塩。

【1546】

実施形態55. 各  $Z^3$  は、 $-CH_2CH_2-$  である、実施形態46～54のいずれか1つに記載の化合物、またはその薬学的に許容可能な塩。

【1547】

実施形態56.  $R^6$  は、 $C_5 - C_{14}$  アルキルである、実施形態46～55のいずれか1つに記載の化合物、またはその薬学的に許容可能な塩。

【1548】

実施形態57.  $R^7$  は、 $C_6 - C_{14}$  アルキルである、実施形態46～56のいずれか1つに記載の化合物、またはその薬学的に許容可能な塩。

【1549】

実施形態58.  $R^6$  は、 $C_5 - C_{14}$  アルケニルである、実施形態46～55または5

10

20

30

40

50

7 いずれか 1 つに記載の化合物、またはその薬学的に許容可能な塩。

【1550】

実施形態 59.  $R^7$  は、 $C_6 - C_{14}$  アルケニルである、実施形態 46 ~ 56 または 58 いずれか 1 つに記載の化合物、またはその薬学的に許容可能な塩。

【1551】

実施形態 60.  $R^8$  は、 $C_5 - C_{16}$  アルキルである、実施形態 46 ~ 59 のいずれか 1 つに記載の化合物、またはその薬学的に許容可能な塩。

【1552】

実施形態 61.  $R^9$  は、 $C_6 - C_{14}$  アルキルである、実施形態 46 ~ 60 のいずれか 1 つに記載の化合物、またはその薬学的に許容可能な塩。

【1553】

実施形態 62.  $R^8$  は、 $C_5 - C_{16}$  アルケニルである、実施形態 46 ~ 59 または 61 いずれか 1 つに記載の化合物、またはその薬学的に許容可能な塩。

【1554】

実施形態 63.  $R^9$  は、 $C_6 - C_{14}$  アルキルである、実施形態 46 ~ 60 または 62 いずれか 1 つに記載の化合物、またはその薬学的に許容可能な塩。

【1555】

本開示は、以下の非限定的な例によってさらに説明される。

【実施例】

【1556】

XII. 実施例

脂質を作製する方法

本開示の脂質は、任意の好都合な方法論を使用して調製され得る。合理的なアプローチでは、脂質は、それらの個々の成分から構築される。成分は、当該技術分野で知られているように、官能基を介して互いに共有結合的に結合され得、そのような官能基は、成分上に存在し、または 1 つ以上の工程、例えば、酸化反応、還元反応、切断反応等を使用して成分上に導入され得る。脂質を生成するために成分を互いに共有結合的に結合させる際に使用され得る官能基：ヒドロキシ、スルフヒドリル、アミノ等。必要及び／または所望の場合、成分上の所定の部位は、当該技術分野で知られているようにブロック基を使用して保護され得る。例えば、Green & Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis (John Wiley & Sons) (1991) を参照されたい。

【1557】

代替的には、脂質は、潜在的脂質の大規模ライブラリを生成するために既知のコンビナトリアル方法を使用して生成され得、これは次いで、所望の機能性を有する脂質の同定のためにスクリーニングされ得る。

【1558】

送達ビヒクルを作製する方法

本開示の LNP 等の送達ビヒクルは、任意の好都合な方法論を使用して調製され得る。1 つの非限定的な例では、LNP は、等しい体積のアルコールに溶解した脂質を、クエン酸緩衝液に溶解したオリゴヌクレオチドペイロードと衝突ジェットプロセスによって混合することによって形成される。

【1559】

脂質溶液は、本開示のカチオン性脂質化合物、ヘルパー脂質、中性脂質及び PEG 化脂質を含有する。ペイロードの総脂質に対する比は、およそ 1 : 20 (wt / wt) である。LNP は、等しい体積のエタノール中の脂質溶液を、クエン酸緩衝液に溶解されたオリゴヌクレオチドペイロードと混合デバイスを介して衝突ジェットプロセスによって混合することによって形成される。混合された LNP 溶液は、希釈工程の前に室温で 0 ~ 24 時間保持される。

【1560】

10

20

30

40

50

溶液は、次いで濃縮され、膜を使用して限外濾過または透析プロセスによって好適な緩衝液でダイアフィルトレーションされ得る。最終生成物は、滅菌濾過され、4℃で保存される。

#### 【1561】

候補LNP標的化システムの評価

候補標的化システムが、製剤における少なくとも1つの識別子配列または部位及び核酸コンストラクトにおける少なくとも1つの識別子配列及び／またはペイロードを含む候補標的化システムのライブラリが調製される。

#### 【1562】

候補標的化システム生成

カチオン性脂質成分が少なくとも1つの識別子配列または部位で標識された脂質ナノ粒子（LNP）製剤の集団が生成される。生成されるLNP製剤には、（a）成分がすべての製剤について同じであり、成分のモル比がすべてのLNP製剤について同じである、（b）成分がすべての製剤について同じであるが、成分のモル比がすべてのLNP製剤について異なる、または（c）成分がLNP製剤について異なるLNPが含まれ得る。異なるLNP製剤の各々には、投与後に標的化システムをトラッキングするために異なる識別子配列または部位が含まれ得る。少なくとも1つの識別子配列またはペイロード（例えば、レポーター遺伝子）を含む核酸コンストラクトが生成され、対象に投与される候補標的化システムを生成するためにLNPの集団で製剤化される。

#### 【1563】

候補標的化システムのスクリーニング及び検証

候補標的化システムは次いで、既定の用量及び投薬間隔で対象に投与される。投与後、対象全体または対象の領域は、LNP形成及び／またはベンチマークコンストラクトのペイロードの位置を決定するためにスクリーニングされる。対象は、 $^{64}\text{Cu}$ 放射性標識を利用する陽電子断層撮影法（PET）及びコンピューター断層撮影法（CT）を含む当該技術分野で知られている様々な方法によってスキャンされ得る。LNP形成及び／またはペイロードの局在化は、 $^{64}\text{Cu}$ の最高濃度を有する領域についてのPET画像の視覚検査によって決定され、PET結果の解剖学的位置は、CTスキャンの結果を使用して確認される。スキャンは、局在化が経時的に変化するかどうかを決定するために繰り返され得る。

#### 【1564】

所望の時点で、サンプルは、分布のより高分解のスクリーニングのために上で実施された動物全体局在化スクリーニングにおいてLNP及び／またはペイロードの局在化を示す対象の領域から取得される。

#### 【1565】

次いでサンプルは、セルソーターに同梱された指示書に従って蛍光活性化セルソーティング（FACS）のために調製され得る。これらの細胞の集団は次いで、ペイロード及び／または識別子配列の存在及び同一性を決定するためにディープシーケンシングのために調製され得る。

#### 【1566】

LNPライブラリのスクリーニングからのこれらの結果は、対象に投与されたLNP製剤及び核酸コンストラクトの指向性を提供する。

#### 【1567】

例示的なイオン化可能な脂質の合成

選択中間体の合成

エチル3-ベンチルオクト-2-エノエート（L1-2）の合成

#### 【1568】

無水THF（33mL）中のトリエチルホホノアセテート（26.3g、118mmol）の溶液にTHF（118mL、118mmol）中の1M NaHMDsを-10～-15℃で窒素雰囲気下で滴下して添加した。添加の完了後、混合物を-10～-15℃

10

20

30

40

50

で30分間、次いで0℃で1時間攪拌した。この混合物に6-ウンデカノン(10.0 g、59 mmol)を0℃で落下させ、反応混合物を室温に温め、一晚攪拌した。次いで混合物を45℃に温め、24時間攪拌した。水性飽和NH<sub>4</sub>Cl(8 mL)を添加し、THFを蒸発させた。残渣をEt<sub>2</sub>O(80 mL)及びH<sub>2</sub>O(100 mL)と混合し、得られた相を分離した。水相をEt<sub>2</sub>O(80 mL)で抽出した。組み合わせた有機相をH<sub>2</sub>O(100 mL×2)で洗浄し、無水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で乾燥させた。濾過及び濃縮により粗物質が提供され、これをフラッシュカラムクロマトグラフィー(SiO<sub>2</sub>:ヘキサン中の0~4%酢酸エチルのグラジエント)によって精製してエチル3-ペンチルオクト-2-エノエートL1-2を無色の油として生成した(11.6 g、82%)。<sup>1</sup>H-NMR(300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5.60 (s, 1H), 4.13 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 2.57 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 2.12 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 1.52-1.19 (m, 15H), 0.89 (t, J = 7.2 Hz, 6H); CIMS m/z 241 [M+H]<sup>+</sup>。

10

【1569】

エチル3-ペンチルオクタノエート(L1-3)の合成

【1570】

EtOAc(90 mL)中のL1-2(11.0 g、2.1 mmol)の溶液に10% Pd/C(0.5 g)を添加した。得られた混合物を水素バルーン下で1日間攪拌した。次いで混合物をセライトを通して濾過した。セライトをEtOAc(25 mL×3)で濯いだ。組み合わせた濾液を蒸発させてエチル3-ペンチルオクタノエートL1-3を薄黄色の油(9.0 g、83%)として得た。<sup>1</sup>H-NMR(300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 4.10 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 2.20 (d, J = 6.8 Hz, 2H), 1.82 (s, 1H), 1.40-1.12 (m, 19H), 0.88 (t, J = 7.0 Hz, 6H)。

20

【1571】

3-ペンチルオクタン-1-オール(L1-4)の合成

【1572】

水素化アルミニウムリチウム(28 mL、56 mmol)の2.0 MのTHF溶液に0℃で窒素雰囲気下でTHF(33 mL)中のL1-3(7.0 g、2.9 mmol)の溶液を徐々に添加した。得られた混合物を0℃で1時間、次いで室温で一晩攪拌した。氷水浴冷却を用いて、反応物を飽和水性Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>溶液を添加することによってクエンチして乳状溶液を得た。有機相を分離し、水相をEt<sub>2</sub>O(50 mL×2)で抽出した。組み合わせた有機相をNa<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で乾燥させた。濾過及び濃縮により粗物質が提供され、これをフラッシュカラムクロマトグラフィー(SiO<sub>2</sub>:ヘキサン中の0~15%酢酸エチルのグラジエント)によって精製して3-ペンチルオクタン-1-オールL1-4をわずかに黄色の油として生成した(4.0 g、70%)。<sup>1</sup>H-NMR(300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 3.65 (t, J = 4.4 Hz, 2H), 1.51 (dd, J = 13.7 Hz, 6.8 Hz, 2H), 1.46-1.12 (m, 17H), 0.88 (t, J = 7.1 Hz, 6H)。

30

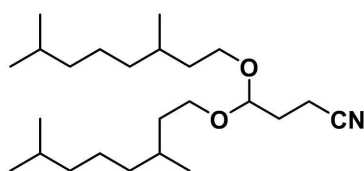
40

【1573】

4,4-ビス(3,7-ジメチルオクチル)オキシ)ブタンニトリル(L4L-2)の合成[手順A]

50

## 【化 1 4 5】



L4L-2

10

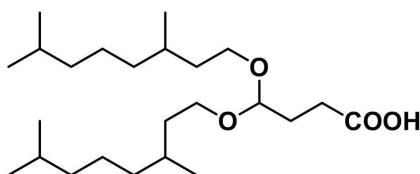
100 mL の丸底フラスコに、4,4-ジメトキシブタンニトリル (3.0 g、23.2 mmol)、アルコール (11.0 g、69.7 mmol) 及びピリジニウム p-トルエンスルホネート (0.29 g、1.2 mmol) を添加した。得られた混合物を 120 °C で 4 時間攪拌し、室温に冷却した。EtOAc (50 mL) 及び H<sub>2</sub>O (20 mL) を添加し、得られた相を分離した。水相を EtOAc (50 mL) で抽出した。組み合わせた有機抽出物を H<sub>2</sub>O (20 mL) で洗浄し、無水 MgSO<sub>4</sub> で乾燥させた。濾過及び濃縮により粗物質が提供され、これをフラッシュカラムクロマトグラフィー (SiO<sub>2</sub>:ヘキサン中の 0~10% 酢酸エチルのグラジエント) によって精製して L4L-2 を無色の油として生成した (6.6 g、74%) ; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 4.50 – 4.53 (t, 1H), 3.58 – 3.60 (m, 2H), 3.41 – 3.49 (m, 2H), 2.39 – 2.44 (t, 2H), 1.92 – 1.94 (q, 2H), 1.50 – 1.55 (m, 6H), 1.38 – 1.42 (m, 2H), 1.11 – 1.14 (m, 14H) 0.88 – 0.84 (t, 18H) ; CIMS m/z [M+H]<sup>+</sup> 381.

20

## 【1574】

4,4-ビス((3,7-ジメチルオクチル)オキシ)ブタン酸 (L4L-3) の合成 [手順 B]

## 【化 1 4 6】



L4L-3

30

エタノール (50 mL) 中の L4L-2 (8.2 g、21 mmol) の溶液を含有する 100 mL の丸底フラスコに水 (50 mL) 中の KOH (3.6 g、64 mmol) の溶液を添加した。添加の完了後、混合物を 120 °C で 20 時間攪拌した。揮発性物質を除去し、反応 pH を 5 に調整した。EtOAc (150 mL) 及び H<sub>2</sub>O (60 mL) を添加し、得られた相を分離した。水相を EtOAc (50 mL) で抽出した。組み合わせた有機抽出物を H<sub>2</sub>O (60 mL × 2) で洗浄し、無水 MgSO<sub>4</sub> で乾燥させた。濾過及び濃縮により L4L-3 (6.4 g、74%) が提供され、これをさらなる精製をせずに次の工程のために使用した。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 4.54 (t, 1H), 3.60 – 3.65 (m, 2H), 3.45 – 3.49 (m, 2H), 2.39 – 2.44 (t, 2H), 1.92 – 1.94 (m, 2H), 1.50 – 1.95 (m, 6H), 1.26 – 1.55 (m, 8H), 1.11 – 1.14 (m, 6H)。0.84 – 0.88 (d, 18H) ; CIMS m/z [M-H]<sup>-</sup> 399.

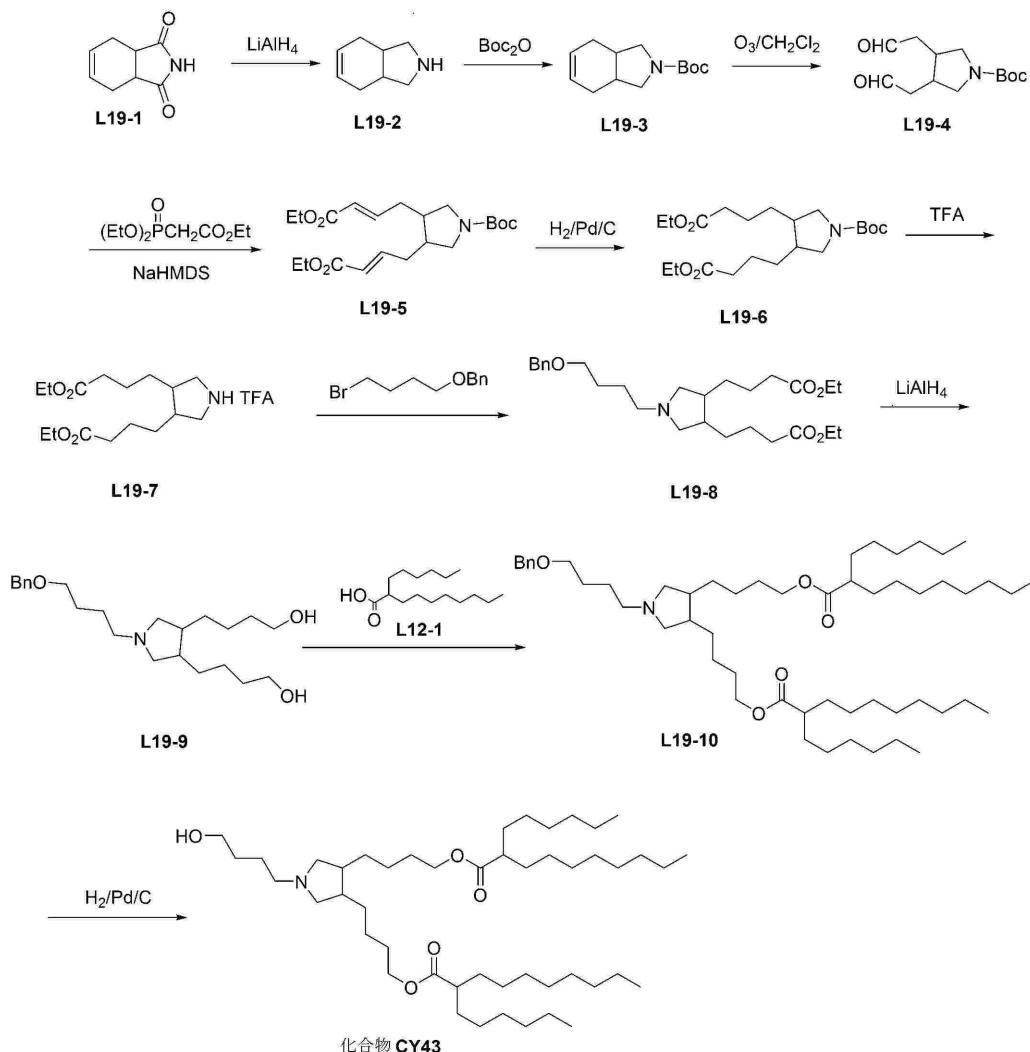
40

50

## 【 1 5 7 5 】

## 選択化合物の合成

実施例 1. (1-(4-ヒドロキシブチル)ピロリジン-3,4-ジイル)ビス(ブタン-4,1-ジイル)ビス(2-ヘキシルデカノエート)(化合物CY43)の合成  
【化147】



2, 3, 3a, 4, 7, 7a-ヘキサヒドロ-1H-イソインドール(L19-2)の合成

0℃に冷却されたTHF(200mL)中の3a, 4, 7, 7a-テトラヒドロ-1H-イソインドール-1, 3(2H)-ジオンL19-1(10g、66.1mmol)の攪拌溶液にTHF中の2M水素化アルミニウムリチウム(82.5mL、165mmol)を滴下して添加した。反応混合物を室温に温め、12時間攪拌した。TLCによって観察される出発物の消費後、反応混合物を0℃に冷却し、THF/水(40mL、v/v9:1)と、それに続くNaOH(40mL)及び水(100mL)の15%水溶液で2時間にわたってクエンチした。得られた混合物を室温で1時間攪拌し、セライトを通して濾過し、続いてDCM(3×100mL)で洗浄した。収集された濾液を減圧下で濃縮してL19-2(5.8g、71%)を茶色の液体として提供し、これをさらなる精製をせずに次の工程のために使用した。CIMS m/z 124.2 [M+H]<sup>+</sup>。

## 【 1 5 7 6 】

tert-ブチル1, 3, 3a, 4, 7, 7a-ヘキサヒドロ-2H-イソインドール-2-カルボキシレート(L19-3)の合成



THF (100 mL) 中の粗製 L19-2 (5.8 g、47.1 mmol) の溶液を 0℃ に窒素下で冷却した。トリエチルアミン (9.8 mL、70.6 mmol) 及び *tert*-ブチルデカルボネート (11.4 g、52.2 mmol) を添加し、反応混合物を室温で 12 時間攪拌した。水及び DCM を添加し、水性相を DCM で抽出した。有機抽出物を飽和水性重炭酸ナトリウムで洗浄し、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で乾燥させた。濾過及び濃縮により L19-3 が無色の油として (7.5 g、71%) 提供された。<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5.62 (s, 2H), 3.42–3.33 (m, 2H), 3.17–3.03 (m, 2H), 2.30–2.16 (m, 4H), 1.91–1.85 (m, 2H), 1.44 (s, 9H)。

【1577】

10

*tert*-ブチル 3, 4-ビス (2-オキソエチル) ピロリジン-1-カルボキシレート (L19-4) の合成

L19-3 (3.0 g、13.4 mmol、1 eq) を DCM (200 mL) に溶解し、溶液を -78℃ に冷却した。オゾンを経由して溶液の色が青色に変わるまでバブリングした。次いで反応物をジメチルスルフィドでクエンチし、窒素下で 30 分間攪拌した。減圧下での溶媒の除去により粗物質が得られ、これをさらなる精製をせずに次の工程のために使用した (2.31 g、67%)。

【1578】

ジエチル 4, 4'-(1-(*tert*-ブトキシカルボニル)ピロリジン-3, 4-ジイル) (2E, 2'E)-ビス (ブト-2-エノエート) (L19-5) の合成

20

窒素下で -15℃ に冷却された THF (60 mL) 中のトリエチルホスホノアセテート (11.2 g、50.1 mmol) の溶液に 1M NaHMDS (10.1 mL、50.1 mmol) を滴下して添加した。添加の完了後、混合物を同じ温度で 30 分間、次いで 0℃ で 60 分間攪拌した。得られた混合物を粗製 L19-4 (3.2 g、12.5 mmol) に 0℃ で徐々に添加した。反応混合物を室温にし、一晩攪拌した。反応物を水性塩化アンモニウムでクエンチし、酢酸エチルで抽出し、無水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で乾燥させた。濾過及び濃縮により粗物質が提供され、これをフラッシュカラムクロマトグラフィー (SiO<sub>2</sub>:ヘキサン中の 0~35% 酢酸エチルのグラジエント) によって精製して L19-5 を無色の油として生成した (1.01 g、20%)。<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 6.91–6.82 (m, 2H), 5.88–5.83 (m, 2H), 4.22–4.14 (m, 4H), 3.43–3.37 (m, 2H), 3.18–3.09 (m, 2H), 2.36–2.11 (m, 6H), 1.44 (s, 9H), 1.28 (t, 6H); CIMS m/z 296.1 [M-Boc+H]<sup>+</sup>。

30

【1579】

ジエチル 4, 4'-(1-(*tert*-ブトキシカルボニル)ピロリジン-3, 4-ジイル)ジブチレート (L19-6) の合成

酢酸エチル (20 mL) 中の化合物 L19-5 (0.58 g、1.46 mmol) の溶液に 10% P/C (0.2 g) を添加した。混合物を室温で水素バルーン下で 12 時間攪拌し、セライトのパッドを通して濾過した。酢酸エチルで洗浄した後、濾液を濃縮し、粗製物をさらなる精製をせずに次の工程のために使用した (0.57 g、97%)。<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 4.15–4.08 (m, 4H), 3.40–3.30 (m, 2H), 3.15–3.01 (m, 4H), 2.29 (t, 4H), 2.09–2.03 (m, 2H), 1.65–1.52 (m, 6H), 1.44 (s, 9H), 1.24 (t, 6H); CIMS m/z 300.2 [M-Boc+H]<sup>+</sup>。

40

【1580】

ジエチル 4, 4'-(ピロリジン-3, 4-ジイル)ジブチレート TFA 塩 (L19-7) の合成

DCM (5 mL) 中の化合物 L19-6 (0.57 g、1.42 mmol) の溶液に T

50

F A (5 mL) を添加し、混合物を室温で 12 時間攪拌した。揮発性成分を減圧下で除去し、粗生成物をさらなる精製をせずに次の工程のために使用した (0.57 g、T F A 塩)。 $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  4.15–4.08 (m, 4H), 3.37–3.10 (m, 4H), 2.35–2.30 (m, 7H), 1.61–1.43 (m, 7H), 1.24 (t, 6H); CIMS  $m/z$  300.2  $[\text{M-Boc}+\text{H}]^+$ 。

#### 【1581】

ジエチル 4, 4' – (1 – (4 – (ベンジルオキシ) ブチル) ピロリジン – 3, 4 – ジイル) ジブチレート (L19 – 8) の合成

窒素下の CPME (5 mL) 及び ACN (5 mL) 中の化合物 L19 – 7 (460 mg、1.5 mmol) 及びベンジル 4 – ブロモブチルエーテル (411 mg、1.69 mmol) の溶液に  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (850 mg、6.1 mmol) 及び KI (255 mg、1.53 mmol) を添加した。反応混合物を 60 °C で 18 時間加熱した。室温に冷却した後、反応混合物をセライトを通して濾過し、酢酸エチルで洗浄し、溶媒を真空下で除去して粗生成物を得、これをフラッシュクロマトグラフィー (40 g の  $\text{SiO}_2$  : ジクロロメタン中の 0 ~ 10 % のメタノールのグラジエント) によって精製して化合物 L19 – 8 を無色の油として得た (0.41 g、57 %)。 $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.30–7.25 (m, 5H), 4.43 (s, 2H), 4.09–4.04 (m, 4H), 3.60–3.46 (m, 4H), 3.13–3.06 (m, 4H), 2.29 (t, 4H), 1.75–1.33 (m, 14H), 1.22 (t, 6H); CIMS  $m/z$  462.2  $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

#### 【1582】

4, 4' – (1 – (4 – (ベンジルオキシ) ブチル) ピロリジン – 3, 4 – ジイル) ビス (ブタン – 1 – オール) (L19 – 9) の合成

0 °C に冷却された THF (10 mL) 中の化合物 L19 – 8 (0.4 g、0.88 mmol) の溶液に THF 中の 1 M 水素化アルミニウムリチウム (1.1 mL、1.1 mmol) を滴下して添加した。反応混合物を室温にし、12 時間攪拌した。TLC によって観察される出発物質の消費後、反応混合物を 0 °C に冷却し、THF で希釈し、15 % NaOH 溶液でクエンチした。得られた混合物を室温で 1 時間攪拌し、セライトを通して濾過し、続いて酢酸エチルで洗浄した。濾液を濃縮して粗生成物 (0.21 g、62 %) を得、これをさらなる精製をせずに次の工程のために使用した。CIMS  $m/z$  378.3  $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

#### 【1583】

(1 – (4 – (ベンジルオキシ) ブチル) ピロリジン – 3, 4 – ジイル) ビス (ブタン – 4, 1 – ジイル) ビス (2 – ヘキシルデカノエート) (L19 – 10) の合成

ジクロロメタン (6 mL) 中の化合物 L19 – 9 (200 mg、0.53 mmol) の溶液に DMAP (65 mg、0.53 mmol) 及び EDC (0.609 g、3.18 mmol) を添加し、続いて酸 L12 – 1 (0.135 g、0.53 mmol) を添加した。反応混合物を室温で 24 時間攪拌し、真空下で蒸発させた。残渣をジクロロメタン (100 mL) に溶解し、ブライン (80 mL  $\times$  3) で洗浄した。無水  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  で乾燥させた後、溶媒を蒸発させ、粗製物をカラムクロマトグラフィー (40 g の  $\text{SiO}_2$  : ジクロロメタン中の 0 ~ 10 % メタノールのグラジエント) によって精製して化合物 L19 – 10 を無色の油として得た。(0.41 g、57 %)。 $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.33–7.26 (m, 5H), 4.46 (s, 2H), 4.04 (t, 4H), 3.48 (t, 2H), 2.91 (s, 2H), 2.33–2.24 (m, 4H), 1.88–1.23 (m, 68H), 0.85 (t, 12H); CIMS  $m/z$  854.7  $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

#### 【1584】

(1 – (4 – ヒドロキシブチル) ピロリジン – 3, 4 – ジイル) ビス (ブタン – 4, 1 – ジイル) ビス (2 – ヘキシルデカノエート) (化合物 CY43) の合成

酢酸エチル（3 mL）中の化合物 L 19-10（125 mg、0.14 mmol）の溶液に 10% P（OH）<sub>2</sub>/C（50 mg）を添加した。反応混合物を水素バルーン下で室温で 6 時間攪拌した。混合物をセライトのパッドを介して濾過し、濾液を濃縮し、粗製物をカラムクロマトグラフィー（12 g の SiO<sub>2</sub>：ジクロロメタン中の 0～10% メタノールのグラジエント）によって精製して化合物 CY 43 を無色の油として得た（43 mg、38%）。<sup>1</sup>H-NMR（300 MHz, CDCl<sub>3</sub>）δ 4.05（t, 4H）, 3.64（t, 2H）, 3.30（s, 1H）, 2.91（s, 2H）, 2.33-2.24（m, 4H）, 1.87-1.23（m, 68H）, 0.85（t, 12H）；CIMS m/z 864.7 [M+H]<sup>+</sup>。分析 HPLC カラム：Agilent Zorbax SB-C18、5 μm、4.6 × 150 mm、移動相 A：0.1% トリフルオロ酢酸を有するアセトニトリル、移動相 B：0.1% トリフルオロ酢酸を有する水、使用グラジエント：B 中の A、15 分で 5% から 95%、流速：1 mL/分、カラム温度：20 ± 2 °C、検出器：ELSD、t<sub>R</sub> = 11.7 分、純度：97.66%；UPLC カラム：Thermo Scientific Hypersil GOLD C4、移動相 A：0.1% トリフルオロ酢酸を有するアセトニトリル、移動相 B：0.1% トリフルオロ酢酸を有する水、使用グラジエント：B 中の A、15 分で 60% から 100%、流速：0.5 mL/分、カラム温度：20 ± 2 °C、検出器：CAD、t<sub>R</sub> = 14.0 分、純度：88.54%。

10

【1585】

実施例 2.（1-（4-ヒドロキシブチル）ピペリジン-4,4-ジイル）ビス（エタン-2,1-ジイル）ビス（2-ヘキシルデカノエート）（化合物 CY 61）の合成

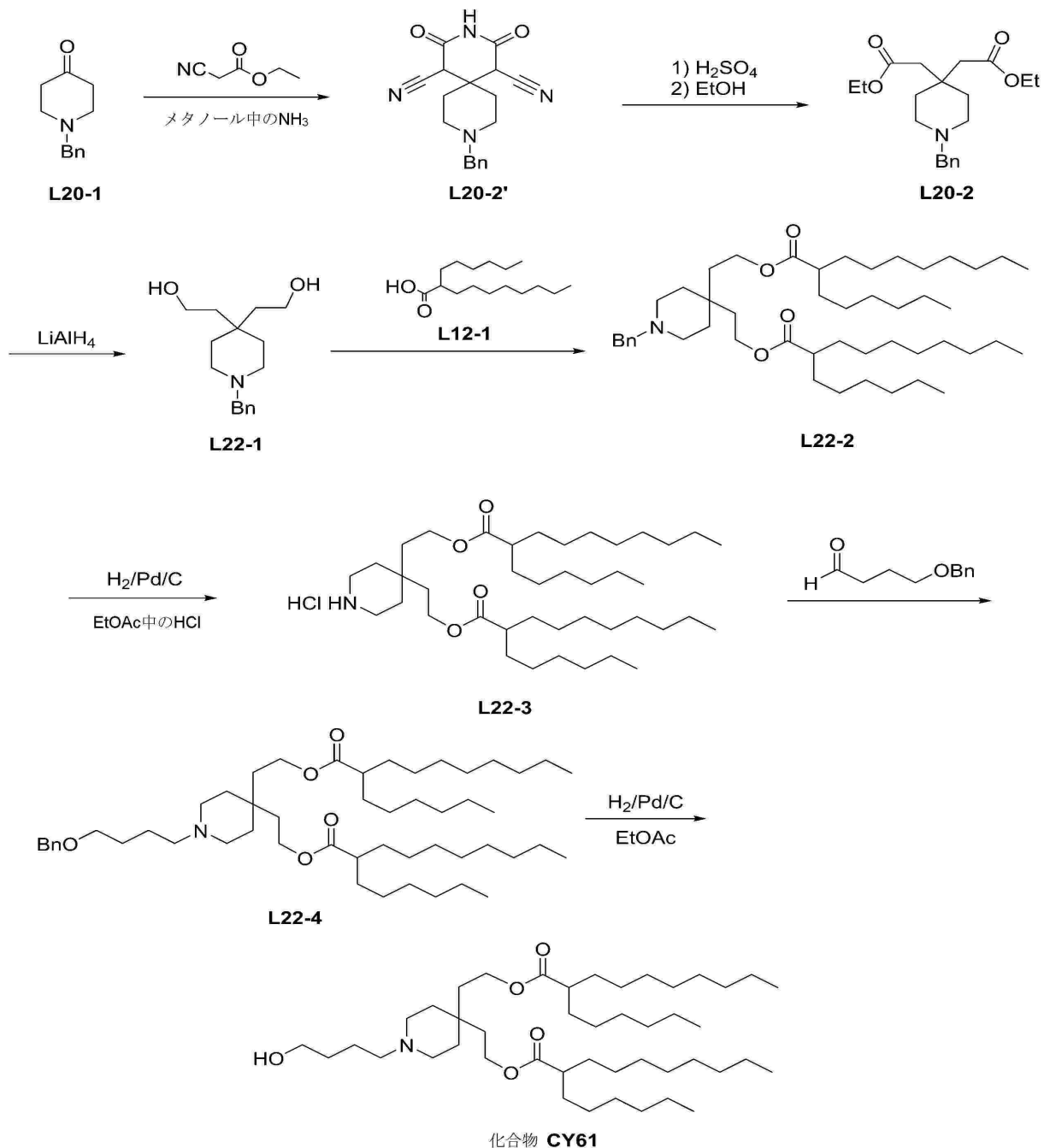
20

30

40

50

## 【化 1 4 8】



9-ベンジル-2,4-ジオキソ-3,9-ジアザスピロ[5.5]ウンデカン-1,5-ジカルボニトリル (L20-2') の合成

氷冷されたメタノール (120 mL) 中の 7 M アンモニアに 1-ベンジル-4-ピペリドン (40 g、212 mmol) を添加し、続いてエチルシアノアセテート (45 mL、2 mmol) を添加した。得られた混合物を冷蔵庫内で  $-2^\circ\text{C}$  で 5 日間放置した。沈殿物を濾過し、低温メタノールで洗浄した。一晩のオープン乾燥により L20-2' がオフホワイト色の固体として提供された (23 g、30%) ; CIMS  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+ 323$ 。

## 【1586】

ジエチル 2,2'-(1-ベンジルピペリジン-4,4-ジイル)ジアセテート (L20-2) の合成

L20-2' (5.0 g、1.6 mmol)、水 (5.1 mL) 及び濃硫酸 (6 mL)

10

20

30

40

50

の混合物を100℃で48時間加熱した。室温に冷却した後、エタノール(60 mL)を混合物に添加し、それを濃縮した。手順を4回繰り返した。次いでエタノール(40 mL)を粗生成物に添加し、溶液を還流下で3日間加熱した。氷冷後、 $\text{Na}_2\text{CO}_3$ (6 g)及び水を添加し、混合物を濃縮した。酢酸エチルを添加し、溶液を水及びブラインで洗浄し、無水 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ で乾燥させた。濾過及び濃縮により粗物質が提供され、これをフラッシュクロマトグラフィー( $\text{SiO}_2$ : 溶離剤中に1%トリエチルアミンを有する酢酸エチル/ヘキサン0~100%)によって精製してL20-2を淡黄色の油として生成した(1.85 g、82%)。 $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.32-7.21 (m, 5H), 4.11 (q,  $J$  = 6.5 Hz, 4H), 3.50 (s, 2H), 2.56 (s, 4H), 2.43 (t,  $J$  = 5.5 Hz, 4H), 1.68 (t,  $J$  = 6.8 Hz, 4H), 1.24 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 6H);  $\text{CIMS } m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  348. [1587]

10

2, 2'- (1-ベンジルピペリジン-4, 4-ジイル)ビス(エタン-1-オール)(L22-1)の合成

THF中の2.0 M水素化アルミニウムリチウムの氷冷溶液(5.0 mL、10 mmol)に無水THF(25 mL)中のL20-2(1.85 g、5.3 mmol)の溶液を窒素雰囲気下で徐々に添加した。得られた混合物を室温で一晩攪拌した。氷水浴冷却しながら、水(0.38 mL)、15%水性水酸化ナトリウム溶液(0.38 mL)及び水(1.15 mL)を連続的に添加した。セライトを介した濾過及び濃縮によりL22-1が油として生成され、これはオフホワイト色の固体に徐々に固形化した(1.32 g、94%)。 $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.39-7.18 (m, 5H), 3.74 (t,  $J$  = 6.5 Hz, 4H), 3.49 (s, 2H), 2.40 (t,  $J$  = 5.2 Hz, 4H), 1.67 (t,  $J$  = 6.8 Hz, 4H), 1.50 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 6H);  $\text{CIMS } m/z$   $[\text{MH}^+]$  264. [1588]

20

(1-ベンジルピペリジン-4, 4-ジイル)ビス(エタン-2, 1-ジイル)ビス(2-ヘキシルデカノエート)(L22-2)の合成

DCM(50 mL)中のL22-1(1.32 g、5 mmol)の溶液にL12-1(3.4 g、13 mmol)を添加し、DMAP(0.61 g、5 mmol)及びEDC(3.7 g、20 mmol)を添加した。得られた混合物を室温で窒素雰囲気下で48時間攪拌した。反応混合物をDCM(50 mL)で希釈し、飽和 $\text{NaHCO}_3$ 水溶液(50 mL)、水(25 mL)及びブライン(25 mL)で洗浄した。有機相を無水 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ で乾燥させた。濾過及び濃縮により粗物質が提供され、これをフラッシュカラムクロマトグラフィー( $\text{SiO}_2$ : 溶離剤中に1%トリエチルアミンを有する酢酸エチル/ヘキサン0~100%)によって精製してL22-2を油として得、これは白色の固体に徐々に固形化した(2.6 g、70%)。 $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.31-7.19 (m, 5H), 4.12 (q,  $J$  = 7.1 Hz, 4H), 3.49 (s, 2H), 2.49-2.22 (m, 6H), 1.73-1.12 (m, 56H), 0.87 (t,  $J$  = 6.3 Hz, 12H);  $\text{CIMS } m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  740. [1589]

30

40

ピペリジン-4, 4-ジイルビス(エタン-2, 1-ジイル)ビス(2-ヘキシルデカノエート)(L22-3)の合成

2-プロパノール(60 mL)中のL22-2(2.6 g、3.5 mmol)の溶液に10%Pd/C(1.5 g)及びEtOAc中の1M HCl(10 mL)を添加した。得られた混合物を水素バルーン下で攪拌し、油浴において80℃で20時間加熱した。反応混合物をセライトを通して濾過した。セライトを2-プロパノール、ジクロロメタン及びEtOAcで濯いだ。組み合わせた濾液を蒸発させてL22-3を薄黄色の油として得

50

た (2.2 g、95%) ; 4.20–4.00 (m, 4H), 3.49–2.90 (m, 4H), 2.35–2.15 (m, 2H), 1.95–0.90 (m, 56H), 0.87 (t,  $J = 6.6$  Hz, 12H) ; CIMS  $m/z$  [M+H]<sup>+</sup> 650.

【1590】

(1-(4-(ベンジルオキシ)ブチル)ピペリジン-4,4-ジイル)ビス(エタン-2,1-ジイル)ビス(2-ヘキシルデカノエート)(L22-4)の合成

ジクロロエタン(60 mL)中のL22-3(1.5 g、2.3 mmol)及び4-ベンジルオキシブタナール(0.8 g、4.6 mmol)の溶液にナトリウムトリアセトキシボロヒドリド(1.5 g、6.9 mmol)を添加し、続いて酢酸(0.16 mL、2.3 mmol)を添加した。得られた混合物を室温で窒素雰囲気下で2日間攪拌した。反応混合物をDCM(40 mL)で希釈し、飽和NaHCO<sub>3</sub>水溶液(50 mL)、水(25 mL)及びブライン(25 mL)で洗浄した。有機相を無水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で乾燥させた。濾過及び濃縮により粗物質が提供され、これをフラッシュカラムクロマトグラフィー(SiO<sub>2</sub>:ヘキサン中の0~100%酢酸エチルのグラジエント)によって濾過してL22-4をわずかに黄色の油として得た(0.9 g、48%)。<sup>1</sup>H-NMR(300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.35–7.21 (m, 5H), 4.49 (s, 2H), 4.13 (q,  $J = 7.1$  Hz, 4H), 3.47 (t,  $J = 5.7$  Hz, 2H), 2.49–2.20 (m, 8H), 1.75–1.12 (m, 60H), 0.87 (t,  $J = 6.0$  Hz, 12H) ; CIMS  $m/z$  [M+H]<sup>+</sup> 812.

10

20

【1591】

(1-(4-ヒドロキシブチル)ピペリジン-4,4-ジイル)ビス(エタン-2,1-ジイル)ビス(2-ヘキシルデカノエート)(化合物CY61)の合成

EtOAc(40 mL)中のL22-4(0.9 g、2.1 mmol)の溶液に10% Pd/C(0.5 g)及びEtOAc中の1M HCl(8 mL)を添加した。得られた混合物を水素バルーン下で一晩攪拌した。次いでそれをセライトを通して濾過した。セライトをEtOAc(25 mL×3)で濯いだ。濃縮により粗物質が提供され、これをフラッシュカラムクロマトグラフィー(SiO<sub>2</sub>:溶離剤中に1%トリエチルアミンを有する酢酸エチル/ヘキサン0~100%)によって精製して化合物CY61を薄黄色の油として生成した(130 mg、16%)。<sup>1</sup>H-NMR(300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 4.12 (q,  $J = 7.1$  Hz, 4H), 3.55 (m, 2H), 2.55–2.20 (m, 8H), 1.75–1.12 (m, 60H), 0.87 (t,  $J = 6.3$  Hz, 12H) ; MS(CI):  $m/z$  [M+H]<sup>+</sup> 722.6 ; 分析HPLCカラム: Agilent Zorbax SB-C18、5 μm、4.6×150 mm、移動相A: 0.1%トリフルオロ酢酸を有するアセトニトリル、移動相B: 0.1%トリフルオロ酢酸を有する水、使用グラジエント: B中のA、15分で5%から95%、流速: 1 mL/分、カラム温度: 20±2℃、検出器: ELSD、 $t_R = 11.2$ 分、純度: >99% ; UPLCカラム: Thermo Scientific Hypersil GOLD C4、移動相A: 0.1%トリフルオロ酢酸を有するアセトニトリル、移動相B: 0.1%トリフルオロ酢酸を有する水、使用グラジエント: B中のA、15分で60%から100%、流速: 0.5 mL/分、カラム温度: 20±2℃、検出器: CAD、 $t_R = 12.1$ 分、純度: 99.21%。アセチル化生成物CY62(550 mg)をまた、わずかに黄色の油として単離した。<sup>1</sup>H-NMR(300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ ppm 4.13 (q,  $J = 7.1$  Hz, 4H), 4.06 (q,  $J = 6.3$  Hz, 2H), 2.46–2.21 (m, 8H), 2.03 (s, 3H), 1.72–1.15 (m, 60H), 0.87 (t,  $J = 6.3$  Hz, 12H) ; MS(CI):  $m/z$  [M+H]<sup>+</sup> 764.6 ; 分析HPLCカラム: Agilent Zorbax SB-C18、5 μm、4.6×150 mm、移動相A: 0.1%トリフルオロ酢酸を有するアセトニトリル

30

40

50

ル、移動相 B : 0 . 1 % トリフルオロ酢酸を有する水、使用グラジエント : B 中の A、15 分で 5 % から 95 %、流速 : 1 mL / 分、カラム温度 :  $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、検出器 : E L S D、 $t_R = 11.3$  分、純度 : 99.83 % ; U P L C カラム : T h e r m o S c i e n t i f i c H y p e r s i l G O L D C 4、移動相 A : 0 . 1 % トリフルオロ酢酸を有するアセトニトリル、移動相 B : 0 . 1 % トリフルオロ酢酸を有する水、使用グラジエント、B 中の A、15 分で 60 % から 100 %、流速 : 0 . 5 mL / 分、カラム温度 :  $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、検出器 : C A D、 $t_R = 13.7$  分、純度 : 97.57 %。

【1592】

実施例 3 . ( 1 - ( 4 - ヒドロキシブチル ) ピペリジン - 4 , 4 - ジイル ) ビス ( エタン - 2 , 1 - ジイル ) ビス ( 2 - ヘキシルデカノエート ) ( 化合物 C Y 5 7 ) の合成

10

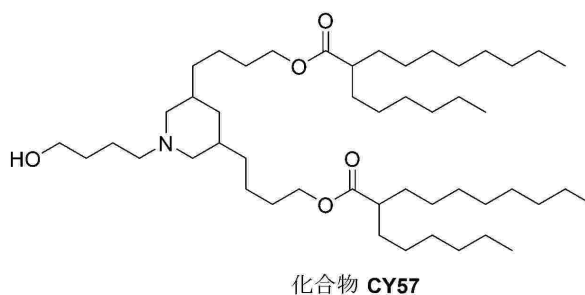
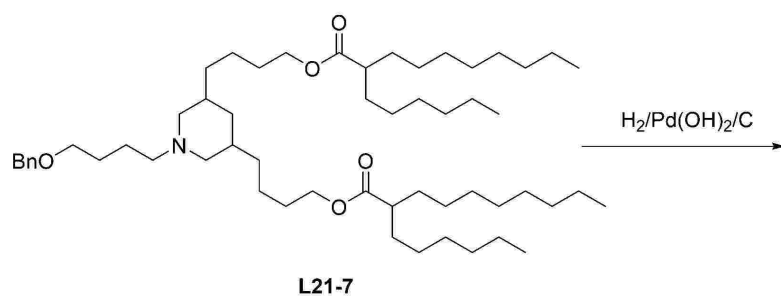
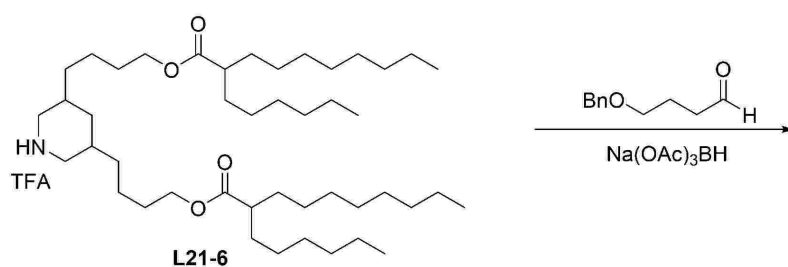
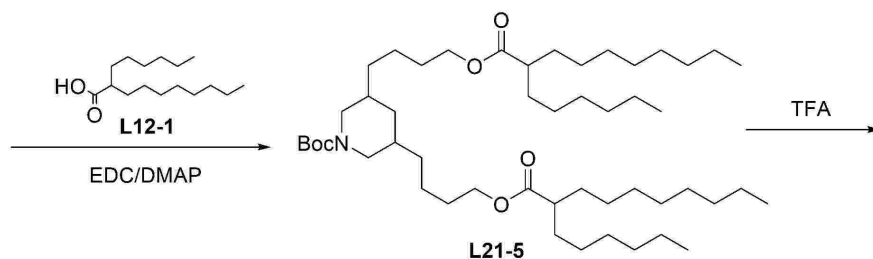
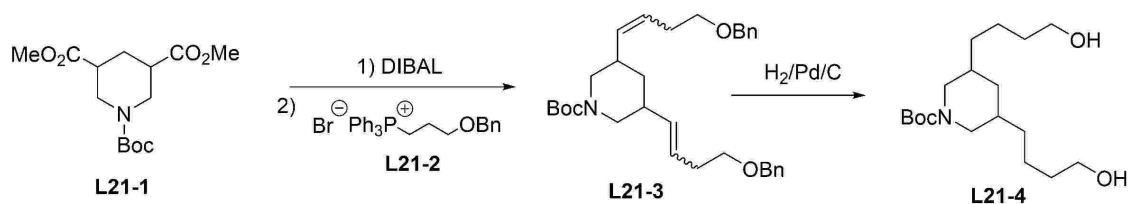
20

30

40

50

## 【化 1 4 9】



## 【1 5 9 3】

tert-ブチル 3, 5-ビス(4-(ベンジルオキシ)ブト-1-エン-1-イル)ピペリジン-1-カルボキシレート (L21-3) の合成

無水トルエン (8 mL) 中の L21-1 (500 mg、1.6 mmol) のドライアイス-アセトン浴冷却された溶液にトルエン (3.4 mL、3.4 mmol) 中の 1.0 M 水素化ジイソブチルアルミニウムを窒素雰囲気下で添加した。得られた混合物を  $-72^\circ\text{C}$  で 2 時間攪拌した。ベンジルオキシプロピリデントリフェニルホスホランの事前冷却された ( $-72^\circ\text{C}$ ) 溶液 (カリウム tert-ブトキシド (1.1 g、9.3 mmol) を  $0^\circ\text{C}$  の無水トルエン (8 mL) 中の (3-ベンジルオキシプロピル) トリフェニルホスホニ



ウムブロミド L 2 1 - 2 ( 4 . 8 6 g、 9 . 6 m m o l ) の溶液に添加することによって得られた「ウィッティヒ試薬」) の約半分を室温で 2 時間攪拌した。反応混合物を室温に温め、 1 6 時間攪拌した。ウィッティヒ試薬の溶液の残部を添加し、反応物を室温でさらに 1 6 時間攪拌した。次いで反応物を水 ( 1 5 m L ) を添加することによってクエンチし、酢酸エチル ( 2 5 m L × 3 ) で抽出した。組み合わせた有機抽出物を水 ( 2 5 m L × 3 ) で洗浄し、無水  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  で乾燥させた。濾過及び濃縮により粗物質が提供され、これをフラッシュカラムクロマトグラフィー (  $\text{SiO}_2$  : 酢酸エチル / ヘキサン 0 ~ 1 0 0 ) によって精製して L 2 1 - 3 を無色の油として生成した ( 2 5 0 m g、 3 0 % )。  $^1\text{H}$ -NMR ( 3 0 0 M H z ,  $\text{CDCl}_3$  )  $\delta$  7 . 3 9 - 7 . 1 8 ( m , 1 0 H ) , 5 . 5 5 - 5 . 4 0 ( m , 2 H ) , 5 . 1 7 ( t , J = 9 . 1 H z , 2 H ) , 4 . 5 1 ( s , 4 H ) , 3 . 9 9 ( s , b r , 4 H ) , 3 . 4 9 ( t , J = 6 . 9 H z , 4 H ) , 2 . 5 8 - 2 . 2 3 ( m , 6 H ) , 1 . 7 7 - 1 . 6 8 ( m , 1 H ) , 1 . 4 5 ( s , 9 H ) , 1 . 0 9 - 0 . 9 6 ( m , 1 H ) ; C I M S m / z [ M - B o c + H ] ^ + 4 0 5 . 7。

10

【 1 5 9 4 】

t e r t - ブチル 3 , 5 - ビス ( 4 - ヒドロキシブチル ) ピペリジン - 1 - カルボキシレート ( L 2 1 - 4 ) の合成

メタノール ( 1 2 m L ) 中の L 2 1 - 3 ( 4 7 0 m g、 0 . 9 m m o l ) 及び 1 0 % P d / C ( 1 0 0 m g ) の混合物を水素バルーン下で室温で 2 0 時間攪拌した。反応混合物をセライトを通して濾過した。セライトをメタノールで洗浄した。組み合わせた濾液を蒸発させて L 2 1 - 4 を薄黄色の油として得た ( 3 0 0 m g、 9 8 % ) ; 4 . 2 0 - 3 . 9 5 ( m , 4 H ) , 3 . 6 3 ( t , J = 6 . 3 H z , 4 H ) , 2 . 2 5 - 2 . 0 5 ( m , 2 H ) , 1 . 9 3 - 1 . 8 2 ( m , 1 H ) , 1 . 7 0 - 1 . 0 5 ( m , 2 3 H ) , 0 . 6 9 - 0 . 5 3 ( m , 1 H ) ; C I M S m / z [ M - B o c + H ] ^ + 2 3 0。

20

【 1 5 9 5 】

( 1 - ( t e r t - ブトキシカルボニル ) ピペリジン - 3 , 5 - ジイル ) ビス ( ブタン - 4 , 1 - ジイル ) ビス ( 2 - ヘキシルデカノエート ) ( L 2 1 - 5 ) の合成

DCM ( 1 0 m L ) 中の L 2 1 - 4 ( 3 0 0 m g、 0 . 9 m m o l ) の溶液に L 1 2 - 1 ( 5 8 0 m g、 2 . 3 m m o l ) を添加し、続いて DMAP ( 1 1 0 m g、 0 . 9 m m o l ) 及び EDC ( 7 0 0 m g、 3 . 6 m m o l ) を添加した。得られた混合物を室温で窒素雰囲気下で 2 0 時間攪拌した。反応混合物を DCM ( 1 5 m L ) で希釈し、ブライン ( 1 0 m L ) で洗浄した。有機相を無水  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  で乾燥させた。濾過及び濃縮により粗物質が提供され、これをフラッシュカラムクロマトグラフィー (  $\text{SiO}_2$  : 酢酸エチル / ヘキサン 0 ~ 1 0 0 % ) によって精製して L 2 1 - 5 を無色の油として生成した ( 6 0 0 m g、 8 2 % )。  $^1\text{H}$ -NMR ( 3 0 0 M H z ,  $\text{CDCl}_3$  )  $\delta$  4 . 2 0 - 3 . 9 5 ( m , 4 H ) , 4 . 0 5 ( t , J = 6 . 6 H z , 4 H ) , 2 . 3 9 - 2 . 2 2 ( m , 2 H ) , 2 . 2 1 - 2 . 0 5 ( m , 2 H ) , 1 . 9 1 - 1 . 8 0 ( m , 1 H ) , 1 . 6 8 - 1 . 1 1 ( m , 6 9 H ) , 0 . 8 6 ( t , J = 6 . 3 H z , 1 2 H ) 0 . 6 9 - 0 . 5 3 ( m , 1 H ) ; C I M S m / z [ M - B o c + H ] ^ + 7 0 6 . 7。

30

40

【 1 5 9 6 】

ピペリジン - 3 , 5 - ジイルビス ( ブタン - 4 , 1 - ジイル ) ビス ( 2 - ヘキシルデカノエート ) ( L 2 1 - 6 ) の合成

ジクロロメタン ( 3 m L ) 中の L 2 1 - 5 ( 4 5 0 m g、 0 . 5 6 m m o l ) の溶液に TFA ( 3 m L ) を 0 °C で添加し、反応混合物を室温で 4 時間攪拌した。揮発性成分を減圧下で除去し、粗製 L 2 1 - 6 ( 4 5 0 m g ) をさらなる精製をせずに次の工程のために使用した。  $^1\text{H}$ -NMR ( 3 0 0 M H z ,  $\text{CDCl}_3$  )  $\delta$  4 . 0 5 ( t , J = 6 . 3 H z , 4 H ) , 3 . 4 9 - 2 . 8 0 ( m , 4 H ) , 2 . 5 1 - 2 . 2 2 ( m , 4 H ) , 2 . 0 2 - 1 . 0 1 ( m , 6 1 H ) , 0 . 6 9 - 0 . 5 3

50

(m, 13H); CIMS  $m/z$  [M+H]<sup>+</sup> 706.7。

【1597】

(1-(4-(ベンジルオキシ)ブチル)ピペリジン-4,4-ジイル)ビス(エタン-2,1-ジイル)ビス(2-ヘキシルデカノエート)(L21-7)の合成

1,2-ジクロロエタン(15mL)中のL21-6(450mg、0.55mmol)及び4-ベンジルオキシブタナール(198mg、1.1mmol)の溶液にナトリウムトリアセトキシボロヒドリド(354mg、1.6mmol)を添加し、続いて酢酸(36μL、0.55mmol)を添加した。得られた混合物を室温で窒素雰囲気下で20時間攪拌した。反応混合物をDCM(20mL)で希釈し、飽和水性重炭酸ナトリウム溶液を泡が生成しなくなるまで徐々に添加した。得られた2つの相を分離し、水性相をDCM(20×2mL)で抽出した。組み合わせた有機抽出物を無水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で乾燥させた。濾過及び濃縮により粗物質が提供され、これをフラッシュカラムクロマトグラフィー(SiO<sub>2</sub>:溶離剤中に1%トリエチルアミンを有する酢酸エチル/ヘキサン0~100%)によって精製してL21-7をわずかに黄色の油として生成した(340mg、71%)。<sup>1</sup>H-NMR(300MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.35-7.21(m, 5H), 4.49(s, 2H), 4.05(t, J = 6.3Hz, 4H), 3.47(m, 2H), 2.95-2.92(m, 2H), 2.50-2.10(m, 6H), 1.81-1.70(m, 1H), 1.65-1.15(m, 66H), 0.86(t, J = 6.9Hz, 12H), 0.55-0.42(m, 1H); CIMS  $m/z$  [M+H]<sup>+</sup> 868。

【1598】

(1-(4-ヒドロキシブチル)ピペリジン-4,4-ジイル)ビス(エタン-2,1-ジイル)ビス(2-ヘキシルデカノエート)(化合物CY57)の合成

EtOAc(12mL)中のL21-7(340mg、0.4mmol)及び10%Pd(OH)<sub>2</sub>/C(120mg)の混合物を水素バルーン下で70時間攪拌した。次いでそれをセライトを通して濾過した。セライトをEtOAc(10mL×3)で濯いだ。濃縮により粗物質が提供され、これをフラッシュカラムクロマトグラフィー(SiO<sub>2</sub>:溶離剤中に1%トリエチルアミンを有する酢酸エチル/ヘキサン0~100%)によって精製して化合物CY57を薄黄色の油として生成した(171mg、56%)。<sup>1</sup>H-NMR(300MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 4.04(t, J = 6.3Hz, 4H), 3.54(m, 2H), 2.95-2.92(m, 2H), 2.61-2.22(m, 6H), 1.85-1.75(m, 1H), 1.76-1.12(m, 66H), 0.87(t, J = 6.9Hz, 12H), 0.55-0.42(m, 1H); MS(CI):  $m/z$  [M+H]<sup>+</sup> 778.7; 分析HPLCカラム: Agilent Zorbax SB-C18、5μm、4.6×150mm、移動相A: 0.1%トリフルオロ酢酸を有するアセトニトリル、移動相B: 0.1%トリフルオロ酢酸を有する水、使用グラジエント: B中のA、15分で5%から95%、流速: 1mL/分、カラム温度: 20±2℃、検出器: ELSA、t<sub>R</sub>=11.6分、純度: >99%; UPLCカラム: Thermo Scientific Hypersil GOLD C4、移動相A: 0.1%トリフルオロ酢酸を有するアセトニトリル、移動相B: 0.1%トリフルオロ酢酸を有する水、使用グラジエント: B中のA、15分で60%から100%、流速: 0.5mL/分、カラム温度: 20±2℃、検出器: CAD、t<sub>R</sub>=13.3分、純度: 97.05%。

実施例4. (1-(4-ヒドロキシブチル)ピペリジン-4,4-ジイル)ビス(エタン-2,1-ジイル)ビス(4,4-ビス(オクチルオキシ)ブタノエート)(CY63)の合成

10

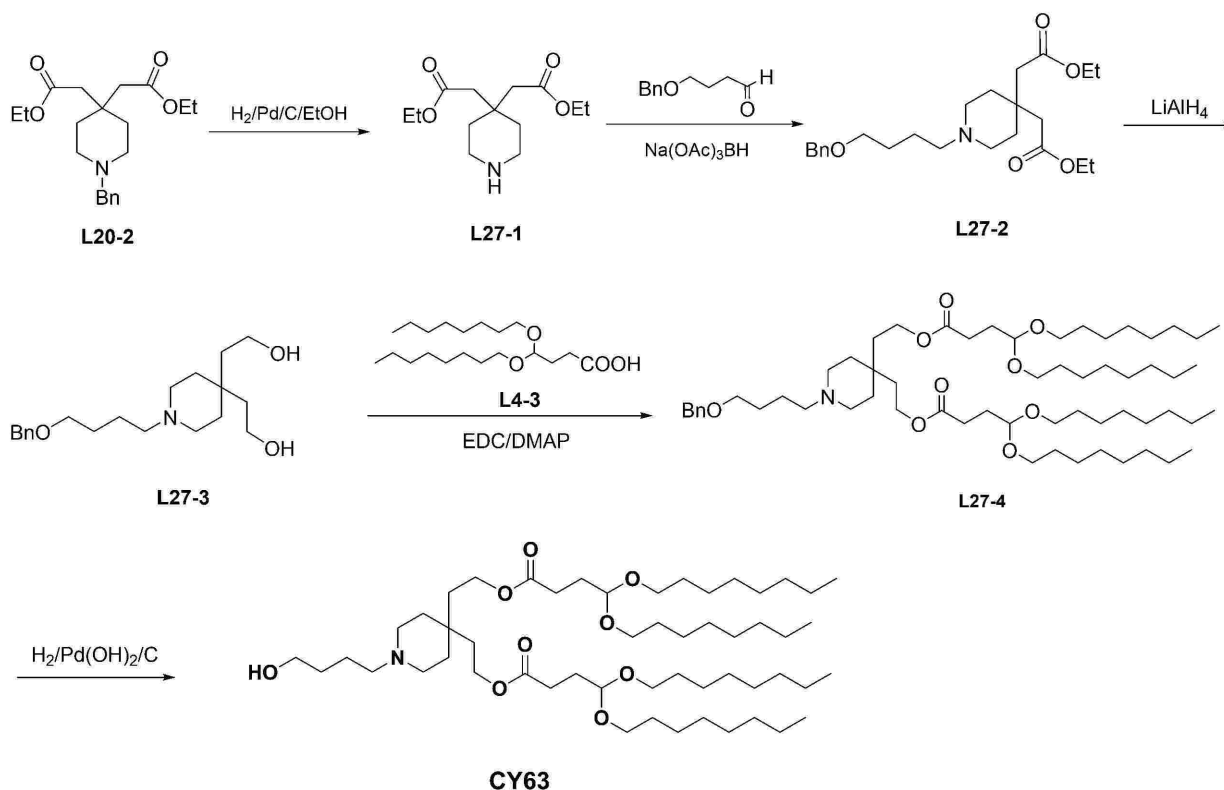
20

30

40

50

## 【化 1 5 0】



10

20

30

40

50

ジエチル 2, 2' - (ピペリジン - 4, 4 - ジイル) ジアセテート (L27-1) の合成  
 室温のエタノール (107 mL) 中の L20-2 (5.4 g、15.4 mmol) の溶液を 10% Pd/C (1.1 g) で窒素雰囲気下で処理した。反応混合物を脱気し、 $\text{H}_2$  ガス (3x) でフラッシュし、次いで  $\text{H}_2$  (1 気圧、 $\text{H}_2$  - バルーン) の雰囲気下で室温で激しく攪拌した。24 時間後、反応混合物をセライトを通して濾過し、濾液を真空中で濃縮して粗生成物 L27-1 (4 g) を得、これをさらなる精製をせずに次の工程のために使用した。APCI MS  $m/z$  [M+H]<sup>+</sup> 257.16。

ジエチル 2, 2' - (1 - (4 - (ベンジルオキシ) ブチル) ピペリジン - 4, 4 - ジイル) ジアセテート (L27-2) の合成

1, 2 - ジクロロエタン (180 mL) 中の L27-1 (4 g、15.5 mmol) 及び 4 - (ベンジルオキシ) ブタナール (5.5 g、31.1 mmol) の混合物に Na(OAc)<sub>3</sub>BH (9.9 g、46.6 mmol) 及び酢酸 (1 mL) を添加した。反応混合物を真空/ $\text{N}_2$  サイクル (3x) に供し、室温で 18 時間攪拌した。反応物を 0°C で飽和 NaHCO<sub>3</sub> (100 mL) を徐々に添加することによってクエンチした。水性相を酢酸エチル (100 mL、3x) を使用して抽出し、組み合わせた有機相を無水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で乾燥させた。濾過と、それに続く濃縮により粗物質が提供され、これを DCM に溶解した。シリカゲル (40 g) 及びトリエチルアミン (40 mL) を粗物質に添加し、10 ~ 15 分間振盪し、溶媒を真空下で除去した。残渣を空のフラッシュカートリッジに搭載し、これを次いで 80 g のフラッシュシリカカラムが搭載されたフラッシュ精製システムに取り付け、フラッシュクロマトグラフィー (SiO<sub>2</sub>:ヘキサン中の 0 ~ 10% 酢酸エチル (10% トリエチルアミン)) によって精製してエチル L27-2 をわずかに黄色の油として生成した (3.7 g、57%)。<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.31 - 7.30 (m, 5H), 4.46 (s, 2H), 4.09 - 4.04 (m, 4H), 3.47 - 3.43 (m, 2H), 2.52 - 2.31 (m, 10H), 1.68 - 1.57 (m, 8H), 1.22 (t, 6H); APCI MS  $m/z$  [M+H]<sup>+</sup> 420.3。

2, 2' - (1 - (4 - (ベンジルオキシ) ブチル) ピペリジン - 4, 4 - ジイル) ビス (エタン - 1 - オール) (L 27 - 3) の合成

THF (14 mL) 中の L 27 - 2 (0.75 g、1.78 mmol) の溶液を氷浴 (0 °C) において冷却し、これに THF 中の 2 M LiAlH<sub>4</sub> (3.56 mL、7.14 mmol) を滴下して添加した。氷浴を除去し、反応混合物を 18 時間室温で攪拌した。混合物を Et<sub>2</sub>O (50 mL) で希釈し、氷浴中で冷却し、水 (10 mL)、20 % NaOH (10 mL) 及び水 (30 mL) で慎重にクエンチした。30 分間攪拌した後、水性相を 20 mL の DCM (3 x) で抽出し、次いで組み合わせた有機相を乾燥させ (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)、濾過し、濃縮して L 27 - 3 (0.54 g、91 % の収率) を白色の固体として得た。APCI MS m/z [M+H]<sup>+</sup> 336.3。

10

【1599】

4, 4 - ビス (ノニルオキシ) ブタン酸 (L 4 - 3 (T 9)) の合成

化合物 L 4 L 合成に記載の手順 B に従って調製した。化合物 L 4 - 3 (T 9) を淡黄色の油として単離して 11.8 g (98 %) を生成した。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ : 4.53 - 4.56 (t, 1H), 3.57 - 3.60 (m, 2H), 3.40 - 3.43 (m, 2H), 2.39 - 2.41 (t, 2H), 1.90 - 1.95 (m, 2H), 1.54 - 1.56 (M, 4H), 1.26 (bs, 28H), 0.85 - 0.87 (t, 6H); CIMS m/z [M-H]<sup>-</sup> 371。

20

【1600】

(1 - (4 - ヒドロキシブチル) ピペリジン - 4, 4 - ジイル) ビス (エタン - 2, 1 - ジイル) ビス (4, 4 - ビス (オクチルオキシ) ブタノエート) (L 27 - 4) の合成 [手順 E]

L 4 - 3 (T 9) (1 g、2.9 mmol、2.5 eq)、EDC (1.01 g、5.28 mmol、4 eq)、DMAP (161 mg、1.32 mmol、1 eq) 及び L 27 - 3 (440 mg、1.32 mmol、1 eq) を含有する 250 mL の丸底フラスコに無水ジクロロメタン (20 mL) を添加し、反応混合物を室温で一晩攪拌した。反応の完了の後、約 30 g のフラッシュシリカを添加し、内容物をよく攪拌して均一な混合物を得た。溶媒をこの混合物から真空下で除去した。残渣を空のフラッシュカートリッジに搭載し、これを次いでフラッシュシリカカラムが搭載されたフラッシュ精製システムに取り付け、フラッシュクロマトグラフィー (SiO<sub>2</sub>:ヘキサン (10 % トリエチルアミン) / 酢酸エチル 0 ~ 20 %) によって精製して化合物 L 27 - 4 (0.94 g、73 %) をわずかに黄色の油として得た。<sup>1</sup>H - NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.33 - 7.31 (m, 5H), 4.48 - 4.47 (m, 4H), 4.10 - 4.08 (m, 4H), 3.56 - 3.37 (m, 10H), 2.37 - 2.32 (m, 10H), 1.90 - 1.80 (m, 20H), 1.31 - 1.10 (m, 40H), 0.84 (t, 12H); APCI MS m/z [M+H]<sup>+</sup> 988.8。

30

【1601】

(1 - (4 - ヒドロキシブチル) ピペリジン - 4, 4 - ジイル) ビス (エタン - 2, 1 - ジイル) ビス (4, 4 - ビス (オクチルオキシ) ブタノエート) (CY 63) の合成 [手順 F]

40

L 27 - 4 (560 mg、0.56 mmol) 及び 10 % Pd/C (186 mg) を含有する 250 mL の丸底フラスコに酢酸エチル (20 mL) を添加し、次いで反応混合物を真空 / N<sub>2</sub> サイクル (3 x) に供し、続いて真空 / H<sub>2</sub> の別のサイクル (3 x) に供した。反応混合物を 1 気圧の H<sub>2</sub> (水素バルーン) 下に置き、一晩攪拌した。反応混合物を酢酸エチル (100 mL) で希釈し、次いでセライトを通して濾過し、酢酸エチルで洗浄し、次いで溶媒を真空下で乾燥するまで除去して粗生成物を薄茶色の油 CY 63 として得た (132 mg、26 %)。<sup>1</sup>H - NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 4.48 (t, 4H), 4.12 - 4.07 (m, 4H), 3.55 - 3.39

50

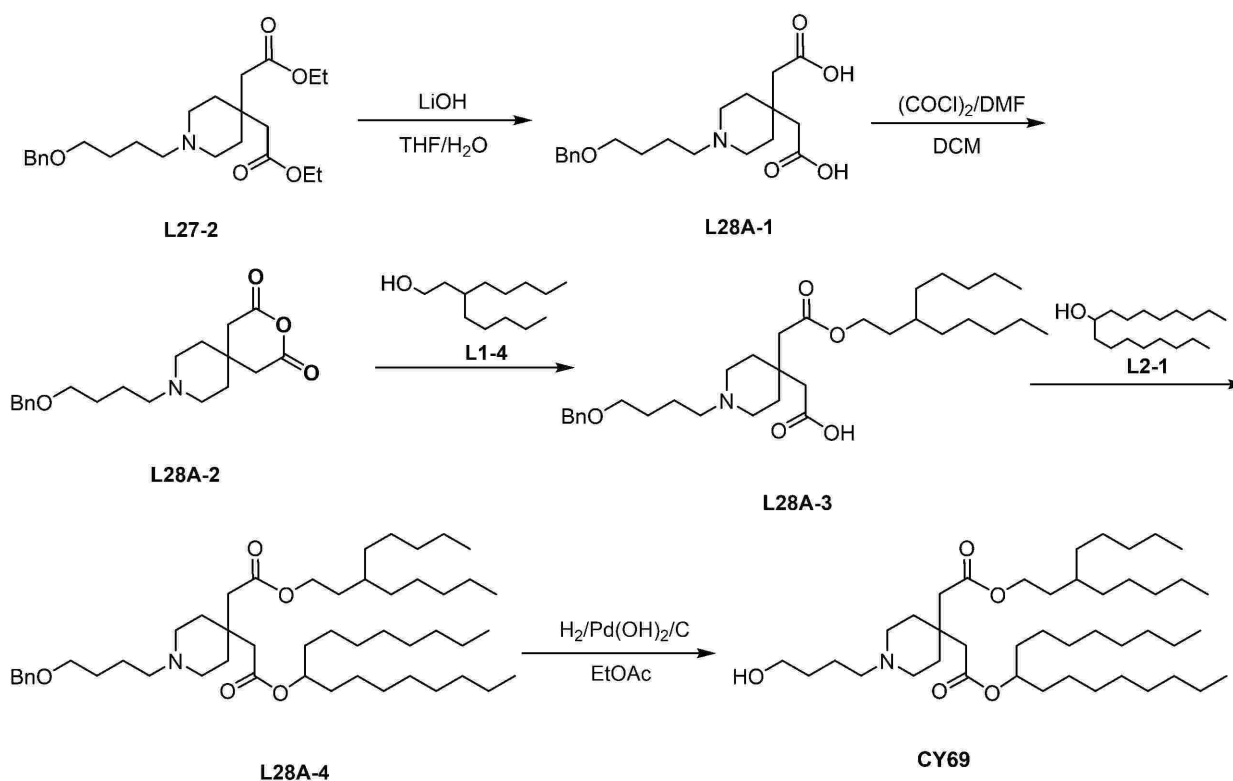
(m, 10H), 2.46–2.31 (m, 10H), 1.90–1.88 (m, 4H), 1.66–1.51 (m, 20H), 1.30–1.00 (m, 40H), 0.86 (t, 12H); APCI MS  $m/z$   $[M+H]^+$  898.8; 分析HPLCカラム: Agilent Zorbax SB-C18、5  $\mu$ m、4.6  $\times$  150 mm、移動相A: 0.1%トリフルオロ酢酸を有するアセトニトリル、移動相B: 0.1%トリフルオロ酢酸を有する水、使用グラジエント: B中のA、15分で5%から95%、流速: 1 mL/分、カラム温度: 20  $\pm$  2  $^{\circ}$ C、検出器: ELSD、 $t_R$  = 11.6分、純度: >99%; UPLCカラム: Waters Aquity UPLC (登録商標) CSH TM、C18、1.7  $\mu$ m、3.0  $\times$  150 mm、(部品番号186005302)、移動相A: 0.1%トリフルオロ酢酸を有するアセトニトリル、移動相B: 0.1%トリフルオロ酢酸を有する水、使用グラジエント: B中のA、15分で5%から95%、流速: 1 mL/分、カラム温度: 20  $\pm$  2  $^{\circ}$ C、検出器: CAD、 $t_R$  = 13.8分、純度: >99%。

10

【1602】

実施例5. ヘプタデカン-9-イル2-(1-(4-ヒドロキシブチル)-4-(2-オキソ-2-((3-ペンチルオクチル)オキシ)エチル)ピペリジン-4-イル)アセテート(化合物CY69)の合成

【化151】



20

30

40

2,2'-(1-(4-(ベンジルオキシ)ブチル)ピペリジン-4,4-ジイル)ニ酢酸(L28A-1)の合成

THF(15 mL)及びメタノール(2.5 mL)中のジエステルL27-2(0.9 g、2.1 mmol)の溶液に水(5 mL)中のLiOH(0.36 g、6.4 mmol)の溶液を添加した。混合物を室温で20時間攪拌した。氷水浴において冷却した後、反応混合物のpHを4に調整した。揮発性成分を減圧下で除去し、残渣を凍結乾燥させてオフホワイト色の固体を得、これを逆カラムクロマトグラフィー(アセトニトリル/水0~100)によって精製してL28A-1をオフホワイト色の発泡固体として生成した(0.62 g、80%)。<sup>1</sup>H-NMR(300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.39

50

− 7.18 (m, 5H), 4.47 (s, 2H), 3.48 (t, J = 6.3 Hz, 2H), 2.90–2.56 (m, 6H), 2.43 (m, 4H), 2.05–1.56 (m, 8H); CIMS m/z [M−H] − 361.5.

【1603】

9-(4-(ベンジルオキシ)ブチル)-3-オキサ-9-アザスピロ[5.5]ウンデカン-2,4-ジオン(L28A-2)の合成

窒素雰囲気下の0℃の無水DCM(15mL)及びピリジン(2mL)中のL28A-1(0.5g、1.4mmol)の溶液に無水DMF(1滴)及び塩化オキサリル(0.15mL、4.2mmol)を添加した。添加の完了後、混合物を室温で18時間撹拌した。さらに塩化オキサリル(0.15mL、4.2mmol)を添加し、混合物を室温で20時間撹拌した。反応混合物を濃縮し、無水トルエンと共蒸発させてL28A-2を薄黄色の油として得た(0.48g、99%); CIMS m/z [M+H]<sup>+</sup> 346.2.

10

【1604】

2-(1-(4-(ベンジルオキシ)ブチル)-4-(2-オキソ-2-((3-ペンチルオクチル)オキシ)エチル)ピペリジン-4-イル)酢酸(L28A-3)の合成

0℃のDCM(15mL)及びピリジン(2mL)中のL28A-2(480mg、1.4mmol)の溶液にL1-4(800mg、4.0mmol)を添加した。得られた混合物を室温で窒素雰囲気下で18時間撹拌した。さらにL1-4(160mg、1.4mmol)を添加し、混合物を50℃で20時間撹拌した。反応混合物を濃縮し、粗物質をフラッシュカラムクロマトグラフィー(SiO<sub>2</sub>:5%トリエチルアミンを有するメタノール/DCM0~30%)によって精製してL28A-3を薄黄色の固体として生成した(330mg、44%)。<sup>1</sup>H-NMR(300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.41–7.15 (m, 5H), 4.46 (s, 2H), 4.06 (t, J = 6.5 Hz, 2H), 2.89–2.36 (m, 10H), 1.97–1.15 (m, 29H), 0.87 (t, J = 6.8 Hz, 6H); CIMS m/z [M+H]<sup>+</sup> 546.4.

20

【1605】

ヘプタデカン-9-イル2-(1-(4-(ベンジルオキシ)ブチル)-4-(2-オキソ-2-((3-ペンチルオクチル)オキシ)エチル)ピペリジン-4-イル)アセテート(L28A-4)の合成

DCM(10mL)中のL28A-3(320mg、0.58mmol)の溶液にヘプタデカン-9-オール(L2-1)(225mg、0.88mmol)を添加し、続いてDMAP(38mg、0.3mmol)及びEDC(225mg、1.2mmol)を添加した。得られた混合物を室温で窒素雰囲気下で18時間撹拌した。反応混合物をDCM(15mL)で希釈し、ブライン(10mL)で洗浄した。有機相を無水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で乾燥させた。濾過及び濃縮により粗物質が提供され、これをフラッシュカラムクロマトグラフィー(SiO<sub>2</sub>:酢酸エチル/ヘキサン0~100%)によって精製してL28A-4を無色の油として生成した(305mg、66%)。<sup>1</sup>H-NMR(300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.38–7.21 (m, 5H), 4.84 (m, 1H), 4.49 (s, 2H), 4.05 (t, J = 7.1 Hz, 2H), 3.47 (t, J = 5.9 Hz, 2H), 2.60–2.28 (m, 10H), 1.76–1.15 (m, 55H), 0.87 (t, J = 6.0 Hz, 12H); CIMS m/z [M+H]<sup>+</sup> 784.8.

40

【1606】

ヘプタデカン-9-イル2-(1-(4-ヒドロキシブチル)-4-(2-オキソ-2-((3-ペンチルオクチル)オキシ)エチル)ピペリジン-4-イル)アセテート(化合物CY69)の合成

EtOAc(15mL)中のL28A-4(300mg、0.38mmol)及び10%Pd(OH)<sub>2</sub>/C(150mg)の混合物を水素バルーン下で80時間撹拌した。次

50

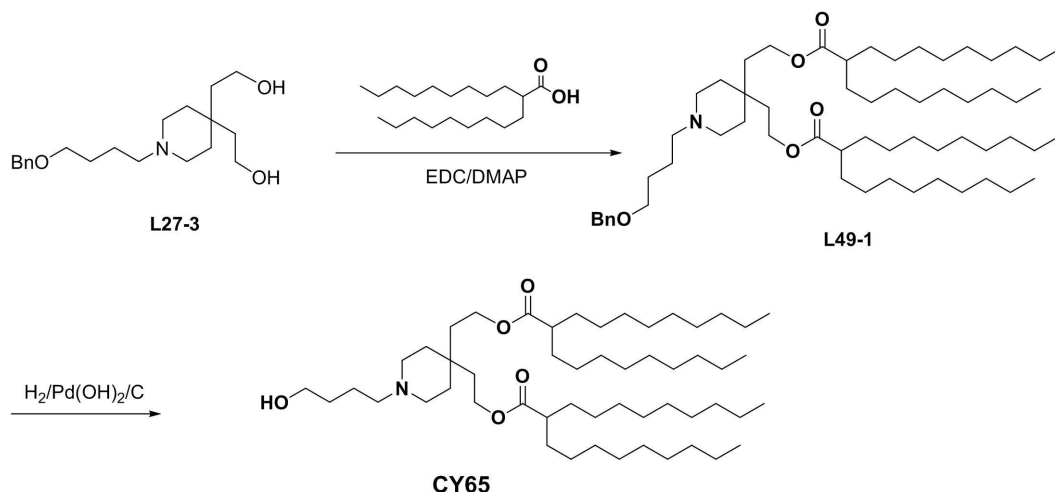
いで混合物をセライトを通して濾過した。セライトをEtOAc (10 mL×3) で濯いだ。濾液の濃縮により粗物質が提供され、これをフラッシュカラムクロマトグラフィー (SiO<sub>2</sub> : 溶離剤中に1%トリエチルアミンを有する酢酸エチル/ヘキサン0~100%) によって精製して化合物CY69を薄黄色の油として生成した (241 mg、91%)。<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 4.84 (m, 1H), 4.05 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 3.56 (m, 2H), 2.71-2.35 (m, 10H), 1.82-1.43 (m, 15H), 1.36-1.15 (m, 40H), 0.87 (t, J = 5.2 Hz, 12H); MS (CI): m/z [M+H]<sup>+</sup> 694.6; 分析HPLCカラム: Agilent Zorbax SB-C18、5 μm、4.6×150 mm、移動相A: 0.1%トリフルオロ酢酸を有するアセトニトリル、移動相B: 0.1%トリフルオロ酢酸を有する水、使用グラジエント: B中のA、15分で5%から95%、流速: 1 mL/分、カラム温度: 20±2℃、検出器: ELSD、t<sub>R</sub>=10.6分、純度: >99%; UPLCカラム: Waters Aquity UPLC (登録商標) CSH TM、C18、1.7 μm、3.0×150 mm、(部品番号186005302)、移動相A: 0.1%トリフルオロ酢酸を有するアセトニトリル、移動相B: 0.1%トリフルオロ酢酸を有する水、使用グラジエント: B中のA、15分で60%から100%、流速: 0.5 mL/分、カラム温度: 20±2℃、検出器: CAD、t<sub>R</sub>=13.4分、純度: >99%。

10

【1607】

実施例6. (1-(4-ヒドロキシブチル)ピペリジン-4,4-ジイル)ビス(エタン-2,1-ジイル)ビス(2-ノニルウンデカノエート)(CY65)の合成  
【化152】

20



30

(1-(4-(ベンジルオキシ)ブチル)ピペリジン-4,4-ジイル)ビス(エタン-2,1-ジイル)ビス(2-ノニルウンデカノエート)(L49-4)の合成

40

化合物L27合成に記載の手順Eに従って調製した。化合物L49-1を無色の油として単離した (580 mg、43%)。<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.33-7.26 (m, 5H), 4.48 (s, 2H), 4.12 (t, 4H), 3.46 (t, 2H), 2.45-2.24 (m, 7H), 1.70-1.37 (m, 19H), 1.29-1.15 (m, 58H), 0.86 (t, 12H); CIMS m/z [M+H]<sup>+</sup> 925.56。

【1608】

(1-(4-ヒドロキシブチル)ピペリジン-4,4-ジイル)ビス(エタン-2,1-ジイル)ビス(2-ノニルウンデカノエート)(CY65)の合成

化合物CY63合成に記載の手順Fに従って調製した。化合物CY65を無色の油とし

50

て単離した (0.52 g、97%)。 $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  4.11 (m, 4H), 3.56 (t, 2H), 2.55–2.41 (m, 4H), 2.27–2.21 (m, 2H), 1.68–1.57 (m, 16H), 1.28–1.15 (m, 54H), 0.86 (t, 12H);  $\text{CIMS } m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+ 834.1$ 。分析 HPLC カラム: Agilent Zorbax SB-C18、 $5\ \mu\text{m}$ 、 $4.6 \times 150\ \text{mm}$ 、移動相 A: 0.1% トリフルオロ酢酸を有するアセトニトリル、移動相 B: 0.1% トリフルオロ酢酸を有する水、使用グラジエント: B 中の A、15 分で 5% から 95%、流速:  $1\ \text{mL}/\text{分}$ 、カラム温度:  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ 、検出器: ELSD、 $t_R = 12.1$  分、純度:  $>99\%$ ; UPLC カラム: Waters Aquity UPLC (登録商標) CSH TM、C18、 $1.7\ \mu\text{m}$ 、 $3.0 \times 150\ \text{mm}$ 、(部品番号 186005302)、移動相 A: 0.1% トリフルオロ酢酸を有するアセトニトリル、移動相 B: 0.1% トリフルオロ酢酸を有する水、使用グラジエント: B 中の A、15 分で 5% から 95%、流速:  $1\ \text{mL}/\text{分}$ 、カラム温度:  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ 、検出器: CAD、 $t_R = 15.4$  分、純度:  $>98.1\%$ 。

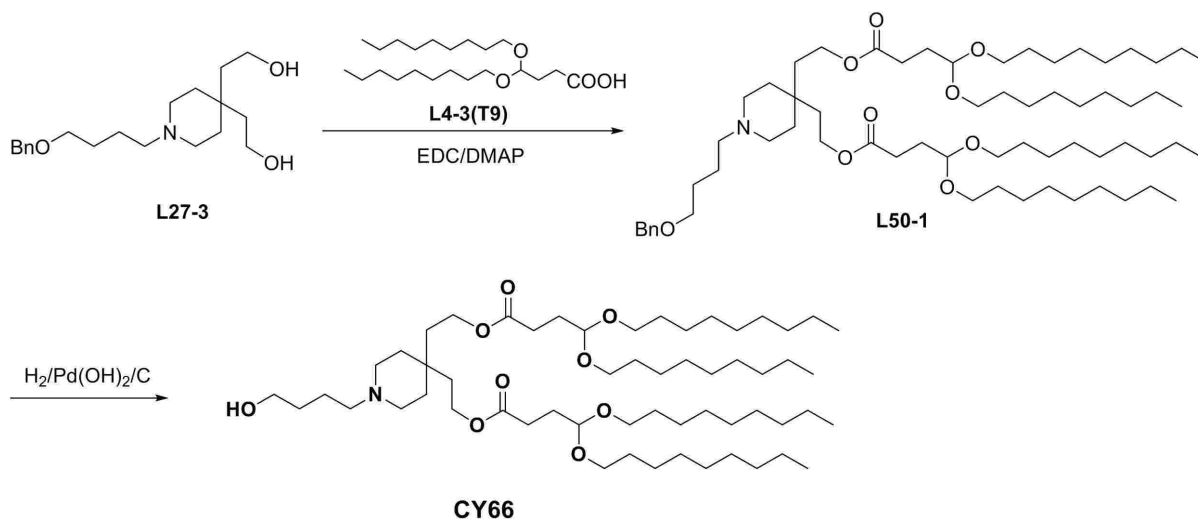
10

【1609】

実施例 7. (1-(4-ヒドロキシブチル)ピペリジン-3,5-ジイル)ビス(エタン-2,1-ジイル)ビス(4,4-ビス(ノニルオキシ)ブタノエート)(CY66)の合成

【化153】

20



30

(1-(4-(ベンジルオキシ)ブチル)ピペリジン-3,5-ジイル)ビス(エタン-2,1-ジイル)ビス(4,4-ビス(ノニルオキシ)ブタノエート)(L50-1)の合成

化合物 CY63 合成に記載の手順 E に従って調製した。化合物 L50-1 (0.55 g、44%) を無色の油として単離した。 $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.33–7.32 (m, 5H), 4.49–4.47 (m, 4H), 4.12–4.10 (m, 4H), 3.56–3.37 (m, 10H), 2.38–2.33 (m, 10H), 2.04–1.89 (m, 4H), 1.66–1.50 (m, 20H), 1.40–0.99 (m, 48H), 0.87 (t, 12H);  $\text{APCI-MS } m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+ 1045.0$ 。

40

【1610】

(1-(4-ヒドロキシブチル)ピペリジン-3,5-ジイル)ビス(エタン-2,1-ジイル)ビス(4,4-ビス(ノニルオキシ)ブタノエート)(CY66)の合成

化合物 CY63 合成に記載の手順 F に従って調製した。化合物 CY66 (0.2 g、4

50



4 %) を無色の油として単離した。 $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  4.47 (t, 4H), 4.13–4.10 (m, 4H), 3.56–3.40 (m, 10H), 2.57–2.39 (m, 10H), 1.91–1.89 (m, 4H), 1.67–1.52 (m, 26H), 1.37–1.00 (m, 48H), 0.87 (t, 12H);  $\text{APCI-MS}$ :  $m/z$  [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$  954.7; 分析  $\text{HPLC}$  カラム: Agilent Zorbax SB-C18、5  $\mu\text{m}$ 、4.6  $\times$  150 mm、移動相 A: 0.1% トリフルオロ酢酸を有するアセトニトリル、移動相 B: 0.1% トリフルオロ酢酸を有する水、使用グラジエント: B 中の A、15 分で 5% から 95%、流速: 1 mL/分、カラム温度:  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ 、検出器: ELS-D、 $t_R = 11.6$  分、純度:  $> 99\%$ ;  $\text{UPLC}$  カラム: Waters Aquity UPLC (登録商標) CSH TM、C18、1.7  $\mu\text{m}$ 、3.0  $\times$  150 mm、(部品番号 186005302)、移動相 A: 0.1% トリフルオロ酢酸を有するアセトニトリル、移動相 B: 0.1% トリフルオロ酢酸を有する水、使用グラジエント: B 中の A、15 分で 5% から 95%、流速: 1 mL/分、カラム温度:  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ 、検出器: CAD、 $t_R = 13.8$  分、純度:  $> 99\%$ 。

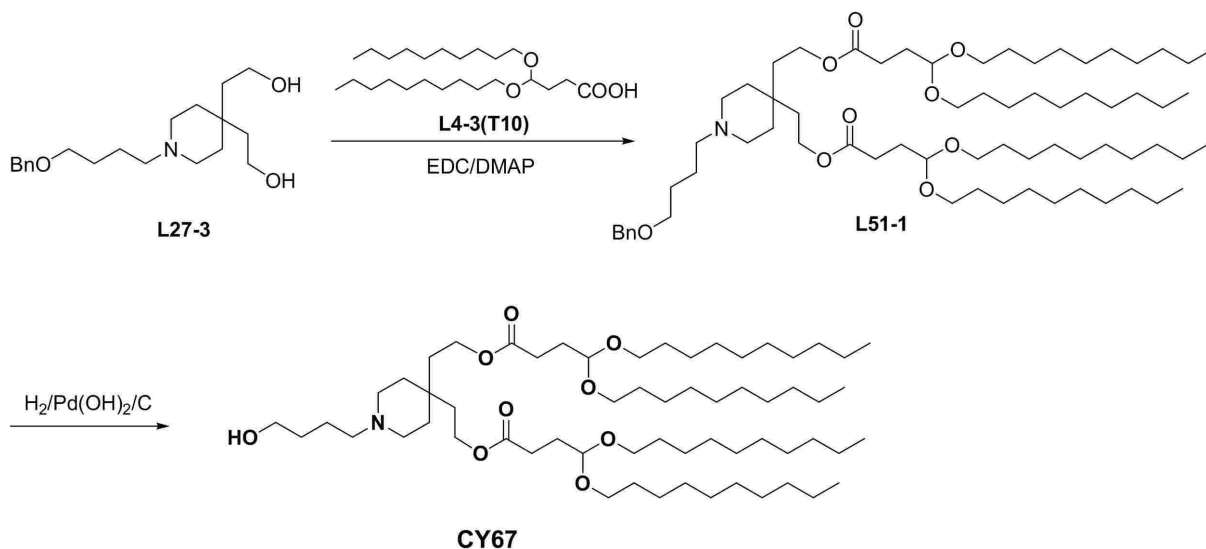
10

【1611】

実施例 8. (1-(4-ヒドロキシブチル)ピペリジン-4,4-ジイル)ビス(エタン-2,1-ジイル)ビス(4,4-ビス(デシルオキシ)ブタノエート)(CY67)の合成

20

【化154】



30

(1-(4-(ベンジルオキシ)ブチル)ピペリジン-4,4-ジイル)ビス(エタン-2,1-ジイル)ビス(4,4-ビス(デシルオキシ)ブタノエート)(L51-1)の合成

40

化合物 CY63 合成に記載の手順 E に従って調製した。L51-1 (1.16 g、88%)、無色の油、 $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.33–7.25 (m, 5H), 4.51–4.46 (m, 4H), 4.11 (t,  $J = 7.5$  Hz, 4H), 3.62–3.33 (m, 10H), 2.45–2.26 (m, 10H), 1.97–1.85 (m, 4H), 1.73–1.41 (m, 18H), 1.40–1.15 (m, 58H), 0.87 (t,  $J = 6.3$  Hz, 12H);  $\text{MS (CI)}$ :  $m/z$  [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$  1100.8。

【1612】

(1-(4-ヒドロキシブチル)ピペリジン-4,4-ジイル)ビス(エタン-2,1-ジイル)ビス(4,4-ビス(デシルオキシ)ブタノエート)(CY67)の合成

50

化合物CY63合成に記載の手順Fに従って調製した。化合物CY67 (615 mg、58%)、無色の油、 $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  4.48 (t,  $J = 5.6$  Hz, 2H), 4.11 (t,  $J = 7.4$  Hz, 4H), 3.61–3.32 (m, 10H), 2.65–2.30 (m, 10H), 1.98–1.85 (m, 4H), 1.76–1.15 (m, 76H), 0.91–0.80 (m, 12H); MS (CI):  $m/z$  [ $M+H$ ] $^+ 1010.8$ ; 分析HPLCカラム: Agilent Zorbax SB-C18、5  $\mu\text{m}$ 、4.6  $\times$  150 mm、移動相A: 0.1%トリフルオロ酢酸を有するアセトニトリル、移動相B: 0.1%トリフルオロ酢酸を有する水、使用グラジエント: B中のA、15分で5%から95%、流速: 1 mL/分、カラム温度:  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ 、検出器: ELS D、 $t_R = 12.4$ 分、純度:  $> 99\%$ ; UPLCカラム: Waters Aquity UPLC (登録商標) CSH TM、C18、1.7  $\mu\text{m}$ 、3.0  $\times$  150 mm、(部品番号186005302)、移動相A: 0.1%トリフルオロ酢酸を有するアセトニトリル、移動相B: 0.1%トリフルオロ酢酸を有する水、使用グラジエント: B中のA、15分で60%から100%、流速: 0.5 mL/分、カラム温度:  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ 、検出器: CAD、 $t_R = 16.0$ 分、純度: 98%。

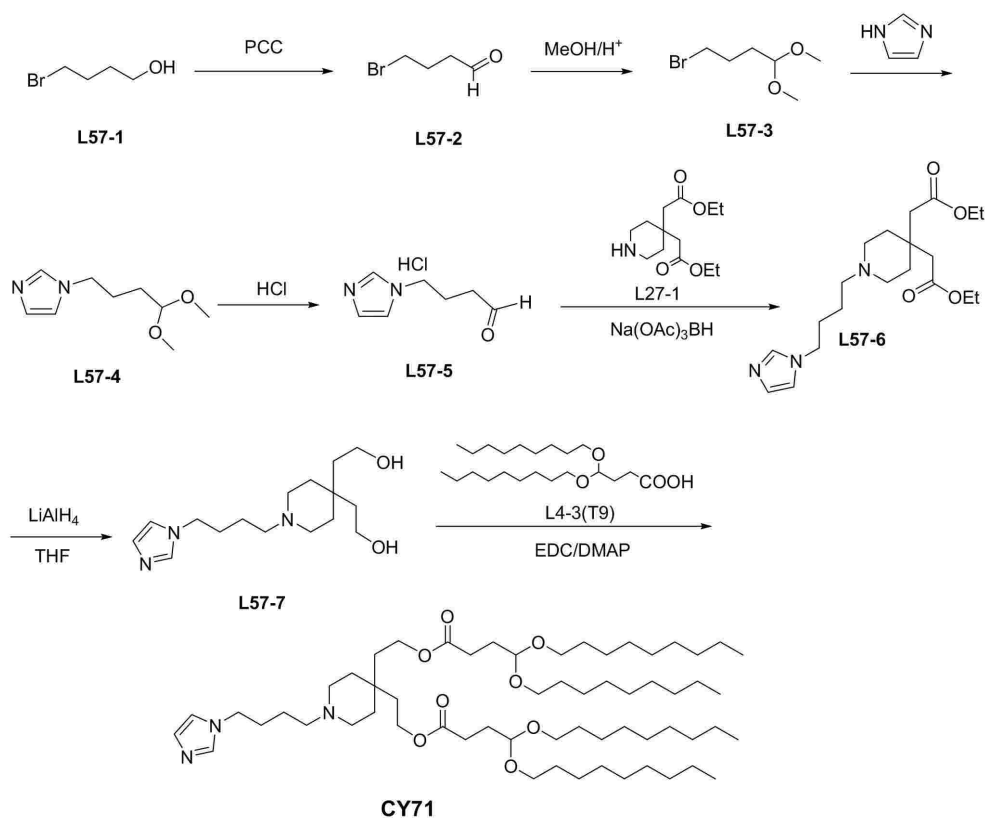
10

【1613】

実施例9. (1-(4-(1H-イミダゾール-1-イル)ブチル)ピペリジン-4,4-ジイル)ビス(エタン-2,1-ジイル)ビス(4,4-ビス(ノニルオキシ)ブタノエート)(CY71)の合成

20

【化155】



30

40

#### 4-ブロモブタナール (L57-2) の合成

DCM (75 mL) 中のピリジニウムクロクロメート (PCC) (12.14 g、56.55 mmol) の溶液に DCM (25 mL) 中の 4-ブロモブタン-1-オール (5.77 g、37.7 mmol) を 10 分にわたって添加した (溶媒還流を防止するために間欠的冷却が必要とされた)。反応混合物を室温で 2 時間攪拌し、次いでジエチルエーテ

50

ルで希釈した。上部エーテル相をフラスコからデカントし、セライトを通して濾過し、セライトケーキをエーテルで洗浄した。組み合わせたエーテル相を減圧下で蒸発させて粗製 4-ブロモブタナール L 5 7-2 を得、これをさらなる精製をせずに次の工程のために使用した (4.5 g、粗製)； $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9.81 (s, 1H), 3.74 (m, 2H), 2.18 (m, 2H), 1.84 (s, 2H)。

#### 【1614】

4-ブロモ-1, 1-ジメトキシブタン (L 5 7-3) の合成

4-ブロモブタナール L 5 7-2 (4.5 g、粗製) をメタノール (10 mL) に溶解し、次いでエーテル中の 2N HCl (10 mL) を次いで添加した。反応混合物を室温で一晩攪拌した。揮発性成分を減圧下で蒸発させて 4-ブロモ-1, 1-ジメトキシブタン L 5 7-3 を淡黄色の油として生成した (3.9 g、粗製)； $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  4.38 (m, 1H), 3.4 (m, 2H), 3.32 (s, 6H), 1.91 (m, 2H), 1.75 (m, 2H)。

#### 【1615】

1-(4, 4-ジメトキシブチル)-1H-イミダゾール (L 5 7-4) の合成

5~10℃の無水 THF (40 mL) 中のイミダゾール (1.48 g、21.76 mmol) の溶液に NaH (948 mg、23.74 mmol、鉱油中に 60%) を攪拌しながら部分ずつ添加した。次いで得られた混合物を室温で 2 時間攪拌した。懸濁液に THF (10 mL) 中の 4-ブロモ-1, 1-ジメトキシブタン L 5 7-3 (3.9 g、19.79 mmol) を 15 分の時間にわたって滴下して添加し、反応物を室温で 3 時間さらに攪拌して均一な混合物を達成した。反応混合物を 60℃で一晩加熱し、室温に冷却し、濾過した。THF を減圧下で除去し、残渣をフラッシュクロマトグラフィー ( $\text{SiO}_2$ :DCM 中の 0~5% の MeOH のグラジエント) によって精製して 1-(4, 4-ジメトキシブチル)-1H-イミダゾール L 5 7-4 を生成した (850 mg、12% (3 工程で))。 $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.45 (s, 1H), 7.04 (s, 1H), 6.9 (s, 1H), 4.32 (t,  $J = 5.49$  Hz, 1H), 3.95 (t,  $J = 7.14$  Hz, 2H), 3.29 (s, 6H), 1.84 (m, 2H), 1.58 (m, 2H)；CIMS  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+ 185$ 。

#### 【1616】

1-(4-オキソブチル)-1H-イミダゾール-1-イウムクロリド (L 5 7-5) の合成

THF (5.0 mL) 中の 1-(4, 4-ジメトキシブチル)-1H-イミダゾール L 5 7-4 (1.05 g、5.7 mmol) の溶液に 1.5N HCl (5.0 mL) を添加した。反応混合物を室温で一晩攪拌した。THF を蒸発させ、水層を DCM (10 mL) 及び EtOAc (10 mL) で洗浄して不純物を除去した。水性層を減圧下で蒸発させ、続いてアセトニトリル (2×10 mL) 及びトルエン (2×10 mL) と共蒸発させ、高真空下で 24 時間乾燥させて 1-(4-オキソブチル)-1H-イミダゾール-1-イウムクロリド L 5 7-5 を薄黄色のゴム状固体として生成し、これをさらなる精製をせずに次の工程のために使用した (1.0 g、粗製)。 $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  9.63 (s, 1H), 9.21 (s, 1H), 7.81 (s, 1H), 7.7 (s, 1H), 4.19 (m, 2H), 3.34-3.62 (m, 2H) 2.05 (m, 2H)；CIMS  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+ 139$ 。

#### 【1617】

ジエチル 2, 2'-(1-(4-(1H-イミダゾール-1-イル)ブチル)ピペリジン-4, 4-ジイル)ジアセテート (L 5 7-6) の合成

DMF (5 mL) 及び DCE (5 mL) の混合物中のジエチル 2, 2'-(ピペリジン-4, 4-ジイル)ジアセテート (850 mg、3.5 mmol) の溶液に DMF (5 mL

10

20

30

40

50

L) 中の 1-(4-オキソブチル)-1H-イミダゾール-1-イウムクロリド L57-5 (1.0 g、5.74 mmol) を添加し、続いて Na(OAc)<sub>3</sub>BH (2.22 g、10.5 mmol) 及び AcOH (240  $\mu$ L、4.2 mmol) を添加した。反応混合物を室温で窒素下で 18 時間攪拌した。LC-MS は、反応の完了を確認した。反応混合物を DCM で希釈し、飽和 NaHCO<sub>3</sub> で洗浄した。水性層を DCM (3 $\times$ 50 mL) で抽出した。組み合わせた有機層を Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で乾燥させ、減圧下で濃縮して粗生成物を得、これをフラッシュクロマトグラフィー (SiO<sub>2</sub>:DCM 中の 0~6% MeOH のグラジエント) によって精製してジエチル 2, 2'-(1-(4-(1H-イミダゾール-1-イル)ブチル)ピペリジン-4, 4-ジイル)ジアセテート L57-6 を生成した (600 mg、45%)。<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.45 (s, 1H), 7.04 (s, 1H), 6.89 (s, 1H), 4.08 (q, J = 7.14 Hz, 4H), 3.93 (t, J = 7.14 Hz, 2H), 2.53 (s, 4H), 2.36 (m, 6H), 1.78 (m, 2H), 1.67 (m, 4H), 1.5 (m, 2H), 1.23 (t, J = 7.14 Hz, 6H); CIMS m/z [M+H]<sup>+</sup> 380。 [1618]

10

2, 2'-(1-(4-(1H-イミダゾール-1-イル)ブチル)ピペリジン-4, 4-ジイル)ビス(エタン-1-オール) (L57-7) の合成

0°C の無水 THF (10 mL) 中の 2, 2'-(1-(4-(1H-イミダゾール-1-イル)ブチル)ピペリジン-4, 4-ジイル)ジアセテート L57-6 (600 mg、1.58 mmol) の溶液に窒素下で無水 THF 中の LiAlH<sub>4</sub> の溶液 (2.0 M、1.6 mL、3.16 mmol) を滴下して添加した。得られた反応混合物を室温で一晩攪拌した。反応混合物を 0°C に冷却し、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>・10H<sub>2</sub>O をすべてのガス発生が停止するまで徐々に添加した。セライトを通して濾過した後、セライトケーキを THF で洗浄した。組み合わせた濾液を減圧下で濃縮して 2, 2'-(1-(4-(1H-イミダゾール-1-イル)ブチル)ピペリジン-4, 4-ジイル)ビス(エタン-1-オール) L57-7 を無色の粘性の液体として得、これをさらなる精製をせずに次の工程のために使用した (440 mg、粗製)。<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.45 (s, 1H), 7.02 (s, 1H), 6.89 (s, 1H), 3.93 (t, J = 7.14 Hz, 2H), 3.7 (t, J = 6.6 Hz, 4H), 2.33 (m, 6H), 1.77 (m, 2H), 1.65 (t, J = 6.75 Hz, 4H), 1.55 (m, 2H), 1.47 (m, 4H); CIMS m/z [M+H]<sup>+</sup> 296。 [1619]

20

30

(1-(4-(1H-イミダゾール-1-イル)ブチル)ピペリジン-4, 4-ジイル)ビス(エタン-2, 1-ジイル)ビス(4, 4-ビス(ノニルオキシ)ブタノエート) (CY71) の合成

DCM (15 mL) 中の 4, 4-ビス(ノニルオキシ)ブタン酸 (1.21 g、3.27 mmol) の溶液に DMAP (363 mg、2.98 mmol) 及び EDC (1.25 g、6.55 mmol) を添加した。反応混合物を室温で 15 分間攪拌し、DCM (5 mL) 中の 2, 2'-(1-(4-(1H-イミダゾール-1-イル)ブチル)ピペリジン-4, 4-ジイル)ビス(エタン-1-オール) L57-7 (440 mg、1.49 mmol) を反応混合物に添加した。反応混合物を室温で一晩攪拌した。生成物の形成を LC-MS によって確認した。反応混合物を DCM で希釈し、次いで水及びブラインで洗浄した。DCM 層を Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で乾燥させ、減圧下で濃縮して粗生成物を得た。粗生成物をフラッシュクロマトグラフィー (SiO<sub>2</sub>:DCM 及び 1% NH<sub>4</sub>OH 中の 0~5% MeOH のグラジエント) によって精製して化合物 CY71 を無色の油として生成した (404 mg、26% (2 工程後))。<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  : 7.45 (s, 1H), 7.04 (s, 1H), 6.89 (s, 1H), 4.47 (t, J = 5.3 Hz, 2H), 4.1 (t, J = 7.4

40

50

H z, 4 H), 3.93 (t, J = 6.75 Hz, 2 H), 3.53 (m, 4 H), 3.4 (m, 4 H), 2.35 (m, 10 H), 1.89 (m, 4 H), 1.75 (m, 2 H), 1.66 (m, 2 H), 1.54 (m, 12 H), 1.25 (m, 48 H), 0.87 (m, 12 H); CIMS m/z [M+H]<sup>+</sup>: 1004.1. 分析 HPLC カラム: Agilent Zorbax SB-C18、5 μm、4.6 × 150 mm、移動相 A: 0.1% トリフルオロ酢酸を有するアセトニトリル、移動相 B: 0.1% トリフルオロ酢酸を有する水、使用グラジエント: B 中の A、15 分で 5% から 95%、流速: 1 mL/分、カラム温度: 20 ± 2 °C、検出器: ELSD、t<sub>R</sub> = 8.5 分、純度: > 99%; UPLC カラム: Waters Aquity UPLC (登録商標) CSH TM、C18、1.7 μm、3.0 × 150 mm、(部品番号 186005302)、移動相 A: 0.1% トリフルオロ酢酸を有するアセトニトリル、移動相 B: 0.1% トリフルオロ酢酸を有する水、使用グラジエント: B 中の A、15 分で 5% から 95%、流速: 1 mL/分、カラム温度: 20 ± 2 °C、検出器: CAD、t<sub>R</sub> = 13.7 分、純度: > 99%。

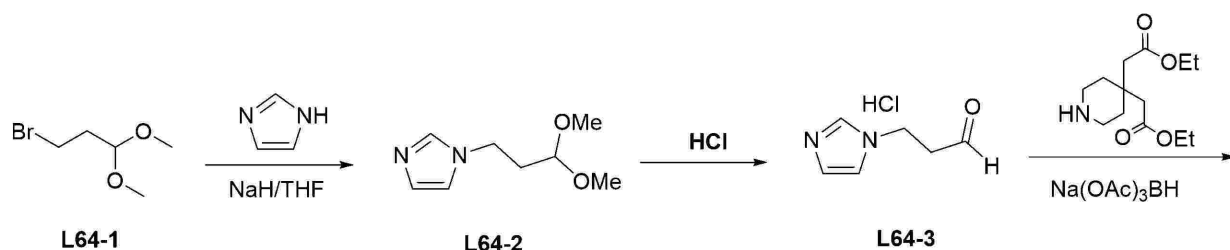
10

【1620】

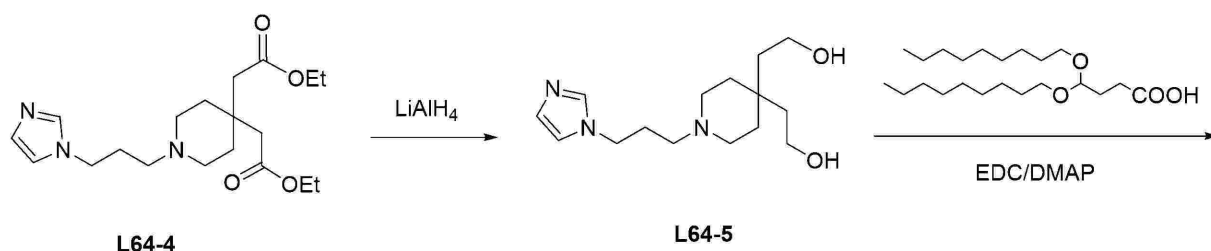
実施例 10. (1-(3-(1H-イミダゾール-1-イル)プロピル)ピペリジン-4,4-ジイル)ビス(エタン-2,1-ジイル)ビス(4,4-ビス(ノニルオキシ)ブタノエート)(CY70)の合成

【化156】

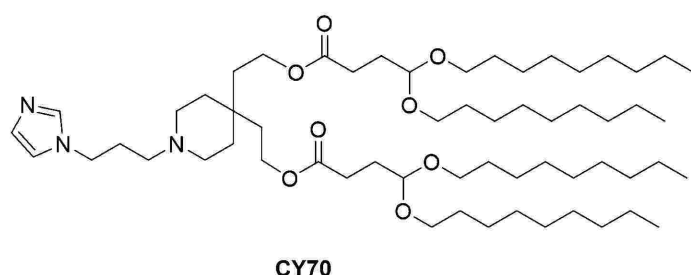
20



30



40



1-(3,3-ジメトキシプロピル)-1H-イミダゾール(L64-2)の合成

無水 THF (60 mL) 中のイミダゾール (2.0 g、30 mmol) の溶液に NaH (1.31 g、32.78 mmol、鉱油中に 60%) を攪拌しながら部分ずつ添加した。得られた混合物を室温で 2 時間攪拌した。形成された懸濁液に THF (15 mL) 中の 3-ブロモ-1,1-ジメトキシプロパン (5.0 g、27.32 mmol) を 10 分の時間にわたって滴下して添加し、3 時間さらに攪拌して均一な混合物を達成した。反応混合物を 60 °C で一晩加熱し、次いで室温に冷却し、濾過した。THF を減圧下で除去した

50

。DCMを添加し、続いて活性炭及び無水 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ を添加し、2時間攪拌し、セライトで濾過した。DCMを減圧下で除去して粗生成物を薄い黄色がかった液体として得、これをフラッシュクロマトグラフィー ( $\text{SiO}_2$ : DCM中の0~5% MeOHのグラジエント) によって精製して1-(3,3-ジメトキシプロピル)-1H-イミダゾールL64-2を生成した(3.64 g、78%)。 $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7.45 (s, 1H), 7.04 (s, 1H), 6.9 (s, 1H), 4.24 (t,  $J$  = 5.49 Hz, 2H), 4.01 (t,  $J$  = 7.14 Hz, 4H), 2.05 (q,  $J$  = 6.84 Hz, 4H); CIMS  $m/z$  [M+H] $^+$  171.1。

【1621】

3-(1H-イミダゾール-1-イル)プロパナル塩酸塩(L64-3)の合成  
THF (15.0 mL)中の化合物1-(3,3-ジメトキシプロピル)-1H-イミダゾールL64-2 (3.0 g 17.64 mmol)の溶液に1.5N HCl (15.0 mL)を添加した。反応混合物を室温で一晩攪拌した。THFを蒸発させ、水層をDCM及びEtOAcで洗浄して不純物を除去した。水性層を減圧下で蒸発させ、続いてアセトニトリル (2×10 mL) 及びトルエン (2×10 mL) で共蒸発させ、高真空下で24時間乾燥させて3-(1H-イミダゾール-1-イル)プロパナル塩酸塩L64-3を薄黄色のゴム状の固体として生成し(2.7 g)、これをさらなる精製をせずに次の工程のために使用した。 $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$ : 9.67 (s, 1H), 9.14 (s, 1H), 7.75 (s, 1H), 7.66 (s, 1H), 4.42 (t,  $J$  = 6.45 Hz, 2H), 3.18 (t,  $J$  = 6.6 Hz, 2H); CIMS  $m/z$  [M+H] $^+$  125.2。

【1622】

ジエチル2,2'-(1-(3-(1H-イミダゾール-1-イル)プロピル)ピペリジン-4,4-ジイル)ジアセテート(L64-4)の合成

DCE (10 mL)中のジエチル2,2'-(ピペリジン-4,4-ジイル)ジアセテート (555 mg、2.28 mmol)の溶液に3-(1H-イミダゾール-1-イル)プロパナル塩酸塩L64-3 (730 mg、4.56 mmol)を添加し、続いてNa(OAc) $_3$ BH (1.45 g、6.84 mmol)及びAcOH (156 mL、2.73 mmol)を添加した。反応混合物を室温で窒素下で18時間攪拌し、次いで50℃で加熱し、2時間攪拌した。反応の完了をLCMSによって確認した。反応混合物をDCMで希釈し、飽和NaHCO $_3$ で洗浄した。水性層をDCMで抽出した。組み合わせた有機層を $\text{Na}_2\text{SO}_4$ で乾燥させ、減圧下で濃縮して粗生成物を得た。粗生成物をフラッシュクロマトグラフィー ( $\text{SiO}_2$ : DCM中の0~6% MeOHのグラジエント) によって精製してジエチル2,2'-(1-(3-(1H-イミダゾール-1-イル)プロピル)ピペリジン-4,4-ジイル)ジアセテートL64-4を生成した(440 mg、52%)。 $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7.48 (s, 1H), 7.04 (s, 1H), 6.89 (s, 1H), 4.09 (q,  $J$  = 7.1 Hz, 2H), 3.99 (t,  $J$  = 6.84 Hz, 4H), 2.54 (s, 4H) 2.4 (m, 4H), 2.28 (t,  $J$  = 7.14 Hz, 2H), 1.92 (m, 2H), 1.69 (m, 4H), 1.26 (t,  $J$  = 7.14 Hz, 6H); CIMS  $m/z$  [M+H] $^+$  366.2。

【1623】

2,2'-(1-(3-(1H-イミダゾール-1-イル)プロピル)ピペリジン-4,4-ジイル)ビス(エタン-1-オール)(L64-5)の合成

無水THF (10 mL)中のジエチル2,2'-(1-(3-(1H-イミダゾール-1-イル)プロピル)ピペリジン-4,4-ジイル)ジアセテートL64-4 (430 mg、1.17 mmol)の溶液にTHF中の2.0M LiAlH $_4$ の溶液 (1.2 mL

10

20

30

40

50

、2.35 mmol)を0℃で滴下して添加した。得られた混合物を室温で一晩攪拌した。反応混合物を0℃に冷却し、 $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ をすべてのガス発生が停止するまで徐々に添加した。セライトを通して濾過した後、セライトケーキをTHFで洗浄した。すべての濾液を減圧下で濃縮して2, 2'-(1-(3-(1H-イミダゾール-1-イル)プロピル)ピペリジン-4, 4-ジイル)ビス(エタン-1-オール) L64-5を無色の粘性の液体(375 mg、粗製)として得、これをさらなる精製をせずに次の工程のために使用した。 $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.64 (s, 1H), 7.12 (s, 1H), 6.91 (s, 1H), 4.05 (t,  $J = 6.6$  Hz, 2H), 3.61 (t,  $J = 7.6$  Hz, 4H), 2.45 (m, 4H), 2.32 (t,  $J = 7.14$  Hz, 2H), 1.9 (m, 2H), 1.56 (m, 8H); CIMS  $m/z$  [ $\text{M} + \text{H}$ ] $^+ 282.2$ 。

10

【1624】

(1-(3-(1H-イミダゾール-1-イル)プロピル)ピペリジン-4, 4-ジイル)ビス(エタン-2, 1-ジイル)ビス(4, 4-ビス(ノニルオキシ)ブタノエート)(CY70)の合成

DCM(15 mL)中の4, 4-ビス(ノニルオキシ)ブタン酸(L4-3(T9))(375 mg、1.31 mmol)の溶液にDMAP(320 mg、2.62 mmol)及びEDC(1.2 g、6.29 mmol)を添加した。反応混合物を室温で15分間攪拌し、DCM(5 mL)中の2, 2'-(1-(3-(1H-イミダゾール-1-イル)プロピル)ピペリジン-4, 4-ジイル)ビス(エタン-1-オール) L64-5を添加した。反応混合物を室温で一晩攪拌し、次いでDCMで希釈し、水及びブラインで洗浄した。DCM層を $\text{Na}_2\text{SO}_4$ で乾燥させ、減圧下で濃縮した。粗生成物をフラッシュクロマトグラフィー( $\text{SiO}_2$ :DCM及び1% $\text{NH}_4\text{OH}$ 中の0~5%MeOHのグラジエント)によって精製して化合物CY70を無色の油として生成した(445 mg、25%(2工程後))。 $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.45 (s, 1H), 7.04 (s, 1H), 6.89 (s, 1H), 4.48 (t,  $J = 5.4$  Hz, 2H), 4.11 (t,  $J = 7.4$  Hz, 4H), 3.99 (t,  $J = 7.17$  Hz, 2H), 3.54 (m, 4H), 3.4 (m, 4H), 2.36 (m, 8H), 2.25 (m, 2H), 1.92 (m, 6H), 1.67 (m, 2H), 1.52 (m, 10H), 1.25 (m, 50H), 0.87 (m, 12H); CIMS  $m/z$  [ $\text{M} + \text{H}$ ] $^+ 990.1$ 。分析HPLCカラム:Agilent Zorbax SB-C18、5  $\mu\text{m}$ 、4.6×150 mm、移動相A:0.1%トリフルオロ酢酸を有するアセトニトリル、移動相B:0.1%トリフルオロ酢酸を有する水、使用グラジエント:B中のA、15分で5%から95%、流速:1 mL/分、カラム温度:20±2℃、検出器:ELSD、 $t_R = 8.3$ 分、純度:>99%;UPLCカラム:Waters Acquity UPLC(登録商標)CSHTM、C18、1.7  $\mu\text{m}$ 、3.0×150 mm、(部品番号186005302)、移動相A:0.1%トリフルオロ酢酸を有するアセトニトリル、移動相B:0.1%トリフルオロ酢酸を有する水、使用グラジエント:B中のA、15分で5%から95%、流速:1 mL/分、カラム温度:20±2℃、検出器:CAD、 $t_R = 13.4$ 分、純度:>99%。

20

30

40

【1625】

脂質ナノ粒子の調製—一般的手順

【1626】

本開示の代表的な脂質、ジステアロイルホスファチジルコリン(DSPC)、コレステロール、及び1, 2-ジミリスチル-rac-グリセロ-3-メトキシポリエチレングリコール-2000(DMG-PEG2000)を48.5:10:40:1.5(IM投与)または48.5:10:39:2.5(IV投与)のモル比で10.8 mMの総脂質濃度で純粋エタノールに溶解した。例えば、Qiu et al., PNAS 118

50

：e 2 0 2 0 4 0 1 1 1 8（2 0 2 1）を参照されたい。次いで脂質溶液を、Nano Assembler マイクロ流体システムを使用することによって mRNA（0.10 mg/mL）を含有する酸性酢酸ナトリウム緩衝液（pH 4.0）またはクエン酸ナトリウム緩衝液（pH 4.0）と混合した。mRNA 溶液及び脂質溶液をそれぞれ 12 mL/分の総流速で 3：1 の比の mRNA 溶液対脂質溶液で Nano Assembler マイクロ流体デバイスに注入し、デバイスは、2 つの成分の急速混合をもたらし、よって、LNP の自己構築をもたらした。製剤をさらに PBS（pH 7.4）または 20 mM トリス（pH 7.4）（8 % スクロース溶液を有する）に対して透析カセットにおいて一晩 4 °C で透析した。製剤の粒子サイズを Zetasizer Ultra（Malvern Panalytical）を使用して動的光散乱（DLS）によって測定した。RNA 封入効率を Ribogreen アッセイによって特性化した。

10

【1 6 2 7】

**実施例 11. LNP 製剤 A**

イオン化可能な脂質、DSPC、コレステロール、及び PEG 2K-DMG を 48.5：10：39：2.5 の mol % 比で 10.8 mM の総脂質濃度で純粋エタノールに溶解した。0.10 mg/mL の mRNA 溶液を、ヒトエリスロポエチン（hEPO）及びホタルルシフェラーゼ（fLuc）（1：2 の比）をコードする mRNA を含有する酸性緩衝液（pH 4.0～5.0）を使用して調製した。ヌクレオチド及び脂質溶液を 3：1 の体積比で Nano Assembler マイクロ流体システムを使用して 12 mL/分の総流速で混合し、LNP の急速混合及び自己アセンブリをもたらした。製剤をさらに PBS（pH 7.4）に対して一晩 4 °C でさらに透析し、遠心濾過を使用して濃縮し、濾過した（0.2 µm の細孔サイズ）。製剤の粒子サイズ及び多分散指数（PDI）を Zetasizer Ultra（Malvern Panalytical）を使用して動的光散乱（DLS）によって測定した。RNA 封入効率（EE %）を Ribogreen アッセイによって決定した。

20

【表 2 A】

表 2 A：LNP 製剤

| 製剤  | イオン化可能な脂質 | 酸性緩衝液 | サイズ (nm) | PDI  | EE%  |
|-----|-----------|-------|----------|------|------|
| F-1 | CY57      | B     | 81.2     | 0.17 | 86.0 |
| F-2 | CY63      | B     | 81.5     | 0.11 | 91.0 |
| F-3 | CY65      | B     | 67.8     | 0.16 | 94.5 |
| F-4 | CY66      | B     | 82.0     | 0.19 | 92.5 |
| F-5 | CY67      | B     | 72.8     | 0.13 | 92.3 |
| F-6 | CY69      | B     | 72.4     | 0.12 | 94.9 |
| F-7 | CY70      | B     | 94.9     | 0.08 | 90.9 |

30

【1 6 2 8】

緩衝液 A：25 mM 酢酸ナトリウム、pH 5.0；緩衝液 B：50 mM クエン酸塩、pH 4.0

【1 6 2 9】

**実施例 12. LNP 製剤 B**

イオン化可能な脂質、DSPC、コレステロール、及び PEG 2K-DSPE を 48.5：10：40：1.5 の mol % 比で 10.8 mM の総脂質濃度で純粋エタノールに溶解した。0.10 mg/mL の mRNA 溶液を、ホタルルシフェラーゼ（fLuc）をコードする mRNA を含有する酸性緩衝液（pH 4.0～5.0）を使用して調製した。ヌクレオチド及び脂質溶液を 3：1 の体積比で Nano Assembler マイクロ流体シス

50



テムを使用して12 mL／分の総流速で混合し、LNPの急速混合及び自己アセンブリをもたらした。製剤をさらにPBS（pH 7.4）に対して一晩4℃でさらに透析し、遠心濾過を使用して濃縮し、濾過した（0.2 μmの細孔サイズ）。製剤の粒子サイズ及び多分散指数（PDI）をZetasizer Ultra（Malvern Panalytical）を使用して動的光散乱（DLS）によって測定した。RNA封入効率（EE%）をRibogreenアッセイによって決定した。

【表 2 B】

表 2 B：LNP 製剤

| 製剤   | イオン化可能な脂質 | 酸性緩衝液 | サイズ (nm) | PDI   | EE%   |
|------|-----------|-------|----------|-------|-------|
| F-8  | CY61      | B     | 75.7     | 0.071 | 91.39 |
| F-9  | CY63      | B     | 87       | 0.078 | 95.1  |
| F-10 | CY69      | B     | 73.1     | 0.05  | 96.03 |
| F-11 | CY66      | B     | 97.8     | 0.091 | 95.04 |
| F-12 | CY67      | B     | 104.9    | 0.066 | 96.5  |
| F-13 | CY65      | B     | 73.7     | 0.032 | 96.75 |
| F-14 | CY70      | B     | 126.6    | 0.083 | 95.28 |
| F-15 | CY71      | B     | 105.3    | 0.081 | 95.38 |

10

20

【1630】

緩衝液 A：25 mM 酢酸ナトリウム、pH 5.0；緩衝液 B：50 mM クエン酸塩、pH 4.0

【1631】

実施例 13．LNP 製剤 C

イオン化可能な脂質、DSPC、コレステロール、及びPEG 2K-DMGを48.5：10：40：1.5のmol%比（本開示のイオン化可能な脂質を含む製剤）または50：10：38.5：1.5のmol%比（SM102製剤）で10.8 mMの総脂質濃度で純粋エタノールに溶解した。表XCに示されるように、COVIDスパイクタンパク質をコードする環状RNA（oRNA）または線状mRNAを含有する酸性緩衝液（pH 4.0～5.0）を使用して0.10 mg/mLのRNA溶液を調製した。ヌクレオチド及び脂質溶液を3：1の体積比でNanoAssemblerマイクロ流体システムを使用して12 mL／分の総流速で混合し、LNPの急速混合及び自己アセンブリをもたらした。製剤をさらに冷凍緩衝液に対して一晩4℃でさらに透析し、遠心濾過を使用して濃縮し、濾過した（0.2 μmの細孔サイズ）。次いで製剤を−80℃で使用されるまで保存した。製剤の粒子サイズ及び多分散指数（PDI）をZetasizer Ultra（Malvern Panalytical）を使用して動的光散乱（DLS）によって測定した。RNA封入効率（EE%）をRibogreenアッセイによって決定した。

30

40

50

【表 2 C】

表 2 C : LNP 製剤

| 製剤   | イオン化可能な脂質     | スパイク RNA | 緩衝液 | サイズ (nm) | PDI   | EE%  |
|------|---------------|----------|-----|----------|-------|------|
| F-16 | CY63          | oRNA     | B   | 86.54    | 0.081 | 94.8 |
| F-17 | Moderna SM102 | oRNA     | A   | 73.39    | 0.041 | 98.5 |
| F-18 | Moderna SM102 | 線状 mRNA  | A   | 76.15    | 0.091 | 98.1 |

10

## 【1632】

緩衝液 A : 25 mM 酢酸ナトリウム、pH 5.0 ; 緩衝液 B : 50 mM クエン酸塩、pH 4.0

## 【1633】

実施例 14. hEPO 及び fLUC in vivo レポーターアッセイ

Balb/c AnNCrL (雌、6~8 週) に LNP (0.1 mg/kg の EPO 及び 0.2 mg/kg の Luc で製剤化された、実施例 11 を参照されたい) を静脈内注射によって投与した。血漿サンプルを hEPO 分析のために投薬から 5、23 及び 47 時間後に採取した。D-ルシフェリン溶液の注射 (150 mg/kg、腹腔内注射 (IP)) 後にマウスの生物発光画像化 (BLI) を IVIS Lumina III LT システム (PerkinElmer) を使用して投薬から 6、24 及び 48 時間後に取得し、決定した。hEPO 濃度を ELISA キット (DEPO0, R&D Systems) を使用して測定した。個々のマウス血漿 hEPO または全身 BLI データの hEPO の最大濃度または BLI シグナル (Cmax) 及び濃度対時間曲線下面積 (AUC) を、ノンコンパートメント解析 (NCA) プログラム (WinNonlin (登録商標)、バージョン 8.3.4 [Pharsight Corp (Mountain View, CA, USA)]) を使用して計算した。

20

## 【1634】

表 Y は、試験された各製剤について、実験を通して全体及び内部標準に対するものの両方の、投薬から 5 時間後の hEPO 濃度及び 48 時間にわたる AUC を報告している。表 Y はまた、試験された各製剤について、投薬から 6 時間後に測定されたルシフェラーゼ生物発光画像化測定及び 48 時間の期間にわたる AUC を報告している。

30

## 【1635】

データ凡例 :

## 【1636】

hEPO C5hr (IU/μL) : += < 10 IU/μL ; 10 IU/μL ≤ +++ < 100 IU/μL ; 100 ≤ ++++ < 1,000 IU/μL

## 【1637】

hEPO AUC (hr \* IU/μL) : += < 10 hr \* IU/μL ; 10 hr \* IU/μL ≤ +++ < 100 hr \* IU/μL ; 100 hr \* IU/μL ≤ ++++ < 1,000 hr \* IU/μL ; 1,000 hr \* IU/μL ≤ +++++ < 10,000 hr \* IU/μL

40

## 【1638】

AUC 比対標準 : \* = < 0.1 ; 0.1 ≤ \*\* < 0.5 ; 0.5 ≤ \*\*\* < 1.0 ; 1.0 ≤ \*\*\*\* < 1.5 ; 1.5 ≤ \*\*\*\*\* < 2.0 ; \*\*\*\*\* ≥ 2.0

## 【1639】

ルシフェラーゼ BLI C6hr (光子/秒) : # = < 1 億 p/s ; 1 億 p/s ≤ ## < 10 億 p/s ; 10 億 p/s ≤ ### < 100 億 p/s ; 100 億 p/s ≤ #### < 1000 億 p/s ; 1000 億 p/s ≤ ##### < 1 兆 p/s

50

## 【1640】

ルシフェラーゼBLI AUC48hr (hr\*光子/秒) : \$ < 100億hr\*p/s ; 100億hr\*p/s ≤ \$ \$ < 1000億hr\*p/s ; 1000億hr\*p/s ≤ \$ \$ \$ < 1兆hr\*p/s ; 1兆hr\*p/s ≤ \$ \$ \$ \$ < 10兆hr\*p/s

## 【表3】

表3 : in vivoアッセイデータ

| 製剤  | hEPO              |                       |      | ルシフェラーゼBLI活性      |                       |
|-----|-------------------|-----------------------|------|-------------------|-----------------------|
|     | C <sub>5</sub> 時間 | AUC <sub>0~48時間</sub> | AUC比 | C <sub>6</sub> 時間 | AUC <sub>0~48時間</sub> |
| F-1 | ++                | ++++                  | ***  | ###               | \$\$\$                |
| F-2 | +                 | ++                    | *    | ##                | \$\$                  |
| F-3 | ++                | ++++                  | **   | ####              | \$\$\$                |
| F-4 | +                 | ++                    | *    | ##                | \$\$                  |
| F-5 | +                 | ++                    | *    | ##                | \$\$                  |
| F-6 | ++                | +++                   | **   | ####              | \$\$\$                |
| F-7 | +                 | ++                    | *    | ##                | \$\$                  |

10

20

## 【1641】

## 実施例15. in vivo器官指向性アッセイ

Balb/c ANNCrL (雌、6~8週) に、LNP製剤 (0.2mg/kgのLuc mRNAで製剤化、実施例12を参照されたい) をIV注射によって投薬した。LNP投薬から6時間後、マウスにD-ルシフェリン溶液 (150mg/kg、腹腔内 (IP)) を注射した。D-ルシフェリン投薬から10分後、マウスを殺して、器官 (肝臓、脾臓、肺、心臓、腎臓) を採取した。各投薬群からの器官の生物発光画像化を、IVIS Lumina III LTシステム (PerkinElmer) を使用して同時に取得した。

## 【1642】

各々の個々のマウスからのすべての器官の生物発光の合計を総フラックス (光子/秒) として合計した。各々の個々の器官の生物発光のパーセンテージを計算してLNP製剤の器官指向性を決定した。

## 【1643】

ルシフェラーゼBLI C6hr (光子/秒) : # = < 1億p/s ; 1億p/s ≤ # # < 10億p/s

30

40

50

【表 4】

表 4. 器官の総フラックス及び各器官におけるフラックスパーセンテージ

| 製剤   | 総フラックス (p/s) | 投薬から 6 時間後の総フラックスの% |      |     |     |     |
|------|--------------|---------------------|------|-----|-----|-----|
|      |              | 肝臓                  | 脾臓   | 肺   | 腎臓  | 心臓  |
| F-8  | ##           | 91.4                | 7.7  | 0.4 | 0.4 | 0.0 |
| F-9  | #            | 57.0                | 38.8 | 3.9 | 0.1 | 0.2 |
| F-10 | ##           | 98.2                | 1.5  | 0.1 | 0.0 | 0.2 |
| F-11 | #            | 74.0                | 23.6 | 2.1 | 0.1 | 0.3 |
| F-12 | #            | 63.3                | 34.5 | 2.1 | 0.1 | 0.1 |
| F-13 | ##           | 98.5                | 1.2  | 0.2 | 0.0 | 0.1 |
| F-14 | #            | 28.8                | 68.4 | 2.2 | 0.3 | 0.3 |
| F-15 | #            | 23.0                | 70.8 | 5.4 | 0.4 | 0.4 |

10

## 【1644】

実施例 16. スパイクタンパク質をコードする RNA に対する *in vivo* T 細胞反応—ネズミ

20

## 投薬プロトコル

LNP 製剤を実施例 13 に記載されているように調製した。各製剤を、0 及び 21 日目に 0.5 mL の総体積中の 0.02 mg/mL の COVID スパイクタンパク質をコードする mRNA または線状 mRNA を用いて 5 匹の BALB/c マウスに筋肉内に注射した。投薬前に、BALB/c マウスを、注射中に動きが生じないように鎮静するまで 0.4 ~ 0.8 リットル/分の流速でイソフルランが事前充填されたチャンバー内に置いた。注射部位を両方の投薬後に刺激についてモニターした。35 日目にすべてのマウスを CO<sub>2</sub> 吸入によって人道的に安楽死させ、脾臓を収集し、処理まで浸潤氷上で保存した。この研究におけるすべての *in vivo* 実験を、承認された動物ケアガイドライン下で実施した。

30

## 【1645】

## 分析

脾臓を採取し、70 µm フィルター (Miltenyi 130-098-462) を使用して濾過によって単一細胞懸濁液に手で解離し、2 mM EDTA (ThermoFisher 15575-020) 及び 0.5% BSA (Miltenyi 130-091-376) を含有する 1×PBS (Fisher 10010049) で洗浄した。赤血球を ACK Lysing Buffer (ThermoFisher A1049201) を使用して溶解し、1×PBS+2 mM EDTA+0.5% BSA で 2 回洗浄した。最終洗浄後、細胞を 1×PBS に再懸濁し、カウントした (ViCell XR, Beckman Coulter 731196)。細胞を、適切な濃度で 1×GlutaMAX (ThermoFisher TP-050122) 及び 1×Pen/Strep (ThermoFisher 15-140-122) を含有する CTL Test Plus Medium (C.T.L. CTLTP-005) に再懸濁し、下流機能性アッセイのために播種した。

40

## 【1646】

ELISpot 分析を、マウス IFN-γ ELISpot PLUS Kit (Mabtech 3321-4HST-10) を使用して製造業者のプロトコルに従って実施した。簡潔には、プレートを 1×PBS で洗浄し、10% FBS (ThermoFisher A38400-01) を含有する RPMI (ThermoFisher 72400

50

ー047)で1時間37℃ブロッキングした。ブロッキング後、細胞を、DMSO及びペプチド刺激ウェルについては200,000細胞/ウェルまたはPMA/イオノマイシン処置については25,000細胞/ウェルで播種した。細胞を1%DMSO(ThermoFisher D12345)、7.5µg/mLのSARS-CoV-2のスパイクタンパク質に及ぶS1またはS2ペプチドプール(JPT PM-WCPV-S-1)、または1×PMA/イオノマイシン(ThermoFisher 00-4970-93)のいずれかと三連でインキュベートした。プレートを一晚37℃、5%CO<sub>2</sub>でインキュベートした。インキュベート後、プレートを洗浄し、1µg/mLの検出抗体を2時間室温で添加した。洗浄を繰り返し、1×ストレプトアビジン-HRPを添加し、1時間室温でインキュベートした。最後に、プレートを洗浄し、TMB基質を添加し、スポット展開のために暗所でインキュベートし、次いで水道水を使用して洗浄除去した。プレートを乾燥させ、ELISpot分析器(ZellNet Consulting)によってカウントした。

10

#### 【1647】

細胞内染色(ICS)のため、1ウェル当たり5,000,000細胞を96ウェル丸底プレート(Costar 3799)に播種し、上述したものと同一ELISpot条件を使用して刺激し、37℃で5%CO<sub>2</sub>で合計で5.5時間インキュベートした。Golgi Plug(BD555029)を刺激の最後の4.5時間すべてのウェルに添加した。インキュベート後、以下の表に列挙される表面または細胞内抗体を使用してフローサイトメトリーについて細胞を染色した。簡潔には、細胞を1×PBSで洗浄し、Live/Dead Fixable Aqua(Invitrogen L34966)で20分間室温で染色した。次いで細胞を細胞染色緩衝液(BioLegend 420201)で2回洗浄し、Fc Block(BioLegend 156604)と5分間4℃でインキュベートし、続いて30分間4℃で表面抗体染色した。その後、細胞を細胞染色緩衝液で2回洗浄し、4℃で30分間IC固定緩衝液(ThermoFisher 88-8824-00)で固定し、1×透過処理緩衝液(ThermoFisher 88-8824-00)で透過処理し、細胞内染色を一晚4℃で実施した。その後、細胞を1×透過処理緩衝液で2回洗浄し、1×PBSに再懸濁し、ハイスループットオートサンプラー(ThermoFisher CytKick)を備えるサイトメーター(青(3)/赤(3)/紫(4)/黄色(4)のレーザー構成を用いるThermoFisher Attune NXT)で取得した。UltraComp eBeads(ThermoFisher 01-3333-41)及びArc Amine Reactive Compensation Bead Kit(ThermoFisher A10346)を使用して補正を実施した。

20

30

#### 【1648】

##### 結果

LNP製剤F-16が投薬されたマウスは、Moderna SM102 LNP製剤F-16及びF-17と同等のスパイク特異的多機能性CD4<sup>+</sup>T細胞反応を実証した。

#### 【1649】

実施例17. スパイクタンパク質をコードするRNAに対するin vivo T細胞反応-非ヒト霊長類

40

##### 投薬プロトコル

LNP製剤を実施例13に記載されているように調製した。各製剤を、1日目に1回及び22日目に1回、100µgの用量レベルで筋肉内注射を介して3匹の非ナীবカニクイザルに注射した。すべてのNHPを用量投与のために一時的に拘束し、鎮静させなかった。投薬前に、投薬部位を剃毛し、臨床的観察のために必要に応じてマークした。各用量を区画された領域内でシリンジ/針を使用して投与した。サンプルを臨床病理パラメータ、薬物動態分析及び免疫原性分析のための研究を通して収集した。

#### 【1650】

##### 分析

50

凍結保存されたPBM Cを37℃の水浴において解凍し、細胞を10%FBS [ThermoFisher A38400-01] 及び1×Pen/Strep [ThermoFisher 15-140-122] を含有する完全RPMI (RPMI [ThermoFisher 72400-047] を含有する円錐チューブに移した。細胞を遠心分離し、50U/mLベンゾナーゼ (EMD 70664-10KUN) を含有する完全RPMIに再懸濁し、15分間37℃でインキュベートした。細胞を遠心分離し、完全RPMIに再懸濁し、3時間静置した。細胞を遠心分離し、1×GlutaMAX (ThermoFisher TP-050122) 及び1×Pen/Strepを含有するCTL Test Plus Medium (C. T. L. CTLTP-005) に再懸濁し、カウントした (ViCell XR, Beckman Coulter 731196) 。濃度を調整し、細胞を下流機能性アッセイのために播種した。

10

#### 【1651】

ELISpot分析を、サルIFN-γ ELISpotPLUS Kit (Mabtech 3421M-4HST-10) を使用して製造業者のプロトコルに従って実施した。簡潔には、プレートを1×PBSで洗浄し、10%FBS (ThermoFisher A38400-01) を含有するRPMI (ThermoFisher 72400-047) で1時間37℃ブロッキングした。ブロッキング後、細胞を三連で播種し、以下の条件下で刺激した：ペプチドなし (1%DMSO (ThermoFisher D12345) )、0.5μg/mLのSARS-CoV-2のスパイクタンパク質に及ぶS1+S2ペプチドプール (JPT PM-WCPV-S-1) 、及び1×PMA/イオノマイシン (ThermoFisher 00-4970-93) 。200,000細胞/ウェルをDMSO及びペプチドプール刺激について播種し、各群からのプールされたサンプルからの10,000/ウェルをPMA/イオノマイシン刺激について播種した。

20

#### 【1652】

プレートを一晚37℃、5%CO<sub>2</sub>でインキュベートした。インキュベート後、プレートを洗浄し、1μg/mLの検出抗体を2時間室温で添加した。洗浄を繰り返し、1×ストレプトアビジン-HRPを添加し、1時間室温でインキュベートした。最後に、プレートを洗浄し、TMB基質を添加し、スポット展開のために暗所でインキュベートし、次いで水道水を使用して洗浄除去した。プレートを乾燥させ、ELISpot分析器 (ZellNet Consulting) を使用してカウントした。

30

#### 【1653】

細胞内染色 (ICS) について、各動物からの1ウェル当たりおよそ2,000,000細胞を96ウェル丸底プレート (Costar 3799) に播種し、上述した同じELISpot条件を使用して刺激した。1時間の刺激後、Golgi Plug (BD555029) をすべてのウェルに添加し、一晚37℃で5%CO<sub>2</sub>でプレートインキュベートした。その後、細胞を洗浄し、フローサイトメトリーのために染色した。簡潔には、細胞を1×PBSで洗浄し、Live/Dead Fixable Aqua (Invitrogen L34966) で20分間室温で染色した。次いで細胞を細胞染色緩衝液 (BioLegend 420201) で2回洗浄し、Fc Block (BioLegend 156604) と5分間4℃でインキュベートし、続いて30分間4℃で表面抗体染色した。表面染色後、次いで細胞を細胞染色緩衝液で2回洗浄し、4℃で30分間IC固定緩衝液中で固定し、(ThermoFisher 88-8824-00) 1×透過処理緩衝液 (ThermoFisher 88-8824-00) 中で透過処理した。細胞内染色を1時間4℃で実施した。その後、細胞を1×透過処理緩衝液で2回洗浄し、1×PBSに再懸濁し、ハイスループットオートサンプラー (ThermoFisher CytKick) を備えるサイトメーター (青 (3) / 赤 (3) / 紫 (4) / 黄色 (4) のレーザー構成を用いるThermoFisher Attune NXT) で取得した。UltraComp eBeads (ThermoFisher 01-3333-41) 及びArc Amine Reactive Compensation Bead Kit (ThermoFisher A10346) を使用して補正を実施した。

40

50

## 【1654】

## 結果

LNP製剤F-16が投薬されたNHPは、ICSアッセイによって決定される場合、Moderna SM102 LNP製剤よりも高いまたはそれと同等のスパイク特異的多機能性CD4 T細胞反応を実証した。36日目で、製剤F-16は、対照製剤F-17と比較した場合、約10倍高いスパイク特異的T細胞反応、及び対照製剤F-18と同様の反応を実証した。36日目で、F-16が投薬されたNHPからのT細胞はまた、ELISpotアッセイを介して決定された場合、F-17によって誘導されたものよりも3倍高く、F-18製剤と同等の増加したスパイク特異的IFN $\gamma$ 分泌T細胞を実証した。

10

## 【1655】

## XIII. 均等物及び範囲

当業者は、慣用的なものを超えない実験を使用して、本明細書に記載の開示による特定の実施形態に対する多くの均等物を認識し、または確認することができるであろう。本開示の範囲は、上記の説明に限定されることを意図するものではなく、むしろ添付の特許請求の範囲に示されるとおりである。

## 【1656】

特許請求の範囲において、「a」、「an」、及び「the」等の冠詞は、逆に示されない限りまたは別途文脈から明らかでない限り、1つまたは複数を意味し得る。群の1つ以上のメンバーの間に「または」を含む請求項または記載は、逆に示されない限りまたは別途文脈から明らかでない限り、群のメンバーの1つ、複数、またはすべてが、所与の生成物またはプロセスに存在する、用いられる、またはそうでなければ関連する場合に満たされると考えられる。本開示には、群の正確に1つのメンバーが所与の生成物またはプロセスに存在する、用いられる、またはそうでなければ関連する実施形態が含まれる。本開示には、群のメンバーの複数、または全体が所与の生成物またはプロセスに存在する、用いられる、またはそうでなければ関連する実施形態が含まれる。

20

## 【1657】

また、用語「含む」は、オープンであることが意図されており、追加の要素または工程の包含を許可するが、必要としないことが留意される。用語「含む」が本明細書で 사용되는場合、用語「からなる」は、故に包含され、開示される。

30

## 【1658】

用語「約」は、本明細書で 사용되는場合、所与の値または範囲の10%以内を意味する。よって、「約10」は、9~11を意味する。

## 【1659】

範囲が与えられる場合、端点は含まれる。さらに、別途示されない限りまたは別途文脈及び当業者の理解から明らかでない限り、範囲として表される値は、文脈が別途明らかに示していない限り、範囲の下限の単位の10分の1まで、本開示の異なる実施形態において記述された範囲内の任意の特定の値または副次的範囲を想定し得ることを理解されたい。

## 【1660】

また、先行技術に入る本開示の任意の特定の実施形態は、請求項の1つ以上から明白に除外され得ることが理解されるべきである。そのような実施形態は、当業者に知られているとみなされるので、それらは、除外が本明細書で明白に示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、任意の抗生物質、治療剤または活性成分；任意の生成方法；任意の使用方法等）は、先行技術の存在に関連するかどうかにかかわらず、任意の理由のため、任意の1つ以上の請求項から除外され得る。

40

## 【1661】

使用されている用語は、限定ではなく説明の用語であること、及びそのより広い態様における本開示の真の範囲及び趣旨から逸脱することなく添付の特許請求の範囲の範囲内で変更がなされ得ることが理解されるべきである。

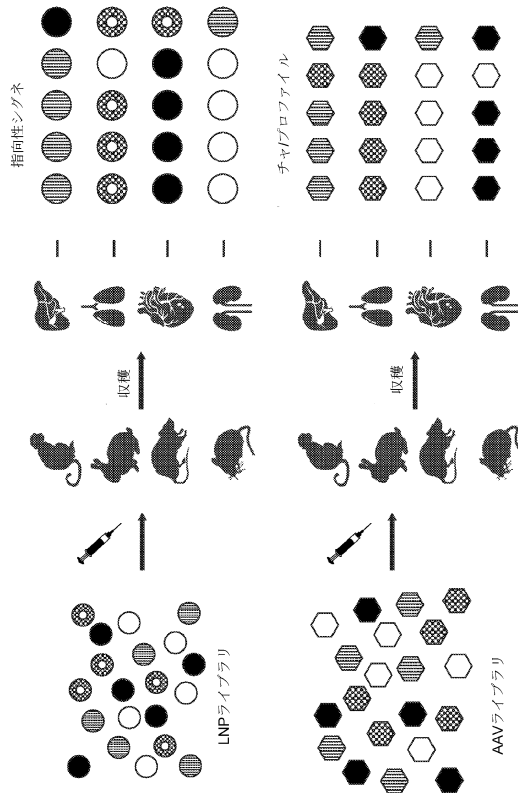
50

## 【 1 6 6 2 】

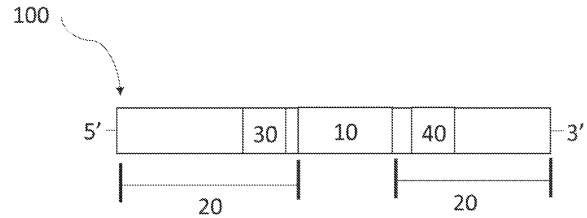
本開示は、いくつかの記載された実施形態に関して、ある程度の長さである程度の特定性をもって説明されているが、任意のそのような特定物もしくは実施形態または任意の特定の実施形態に限定されるべきことは意図されていないが、先行技術に鑑みてそのような特許請求の範囲の最も広い可能な解釈を提供し、そのため、本開示の意図された範囲を効果的に包含するように添付の特許請求の範囲を参照して解釈されたい。

## 【 図 面 】

## 【 図 1 】



## 【 図 2 】



10

20

30

40

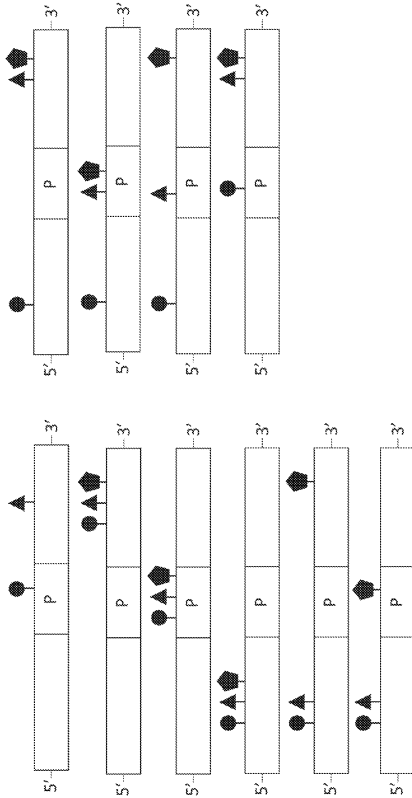
50



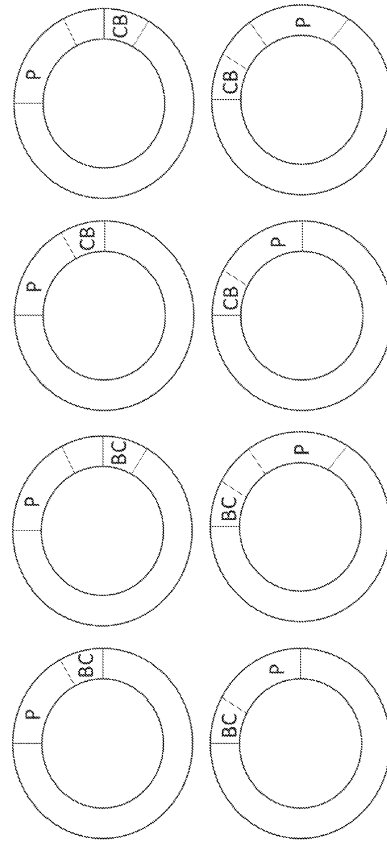


【図 3 C - 2】

(続き)



【図 4 A - 1】

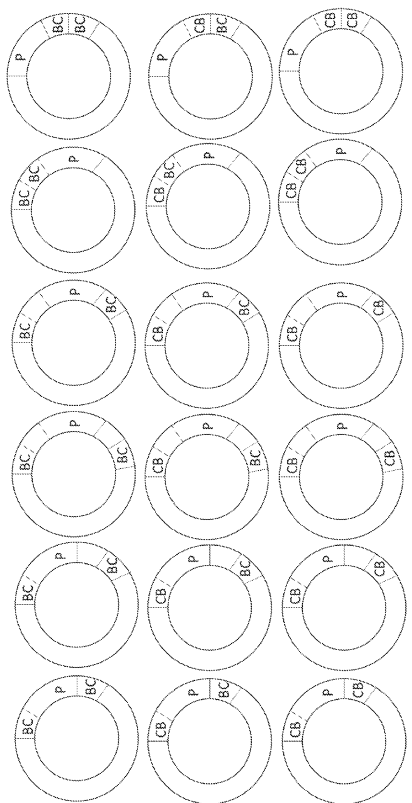


10

20

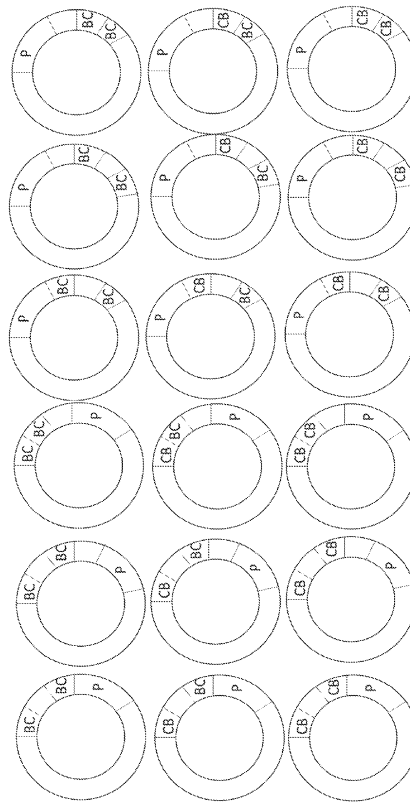
【図 4 A - 2】

(続き)



【図 4 A - 3】

(続き)

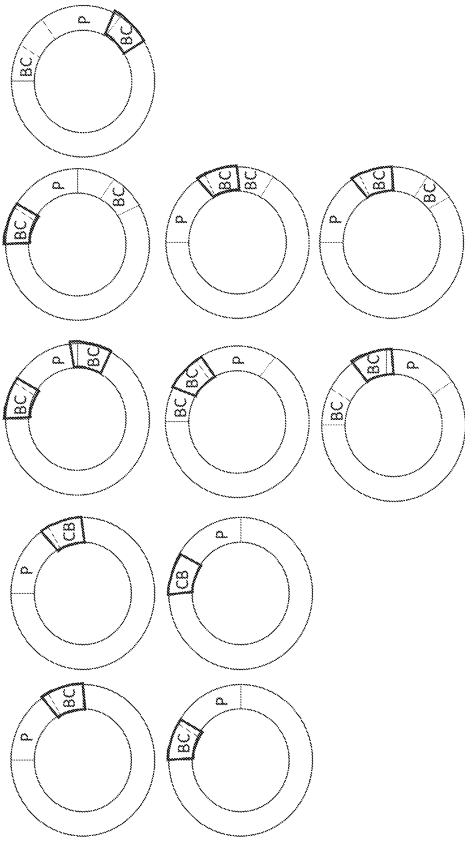


30

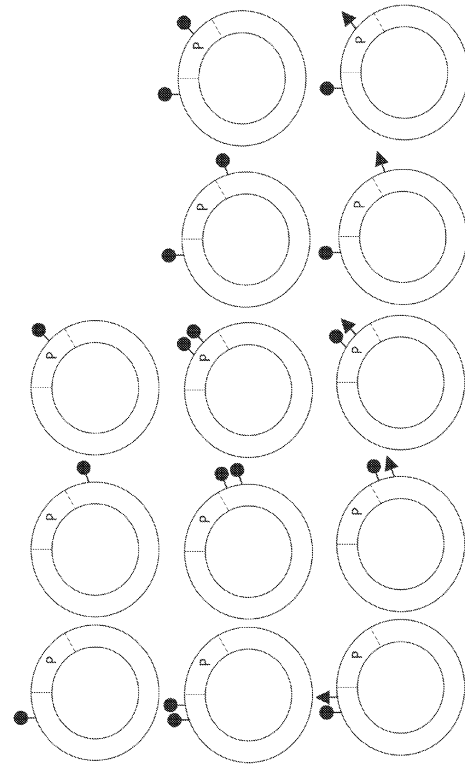
40

50

【図 4 B】



【図 4 C - 1】

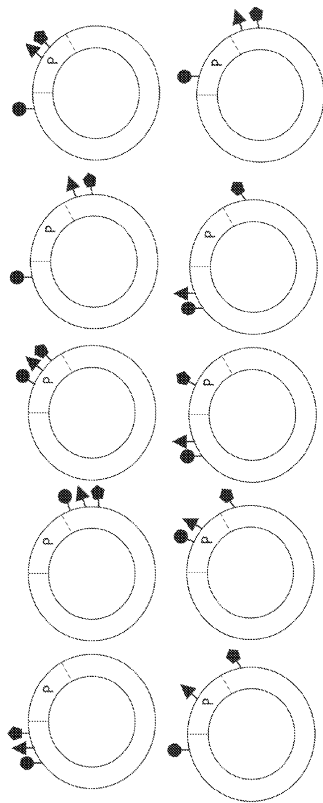


10

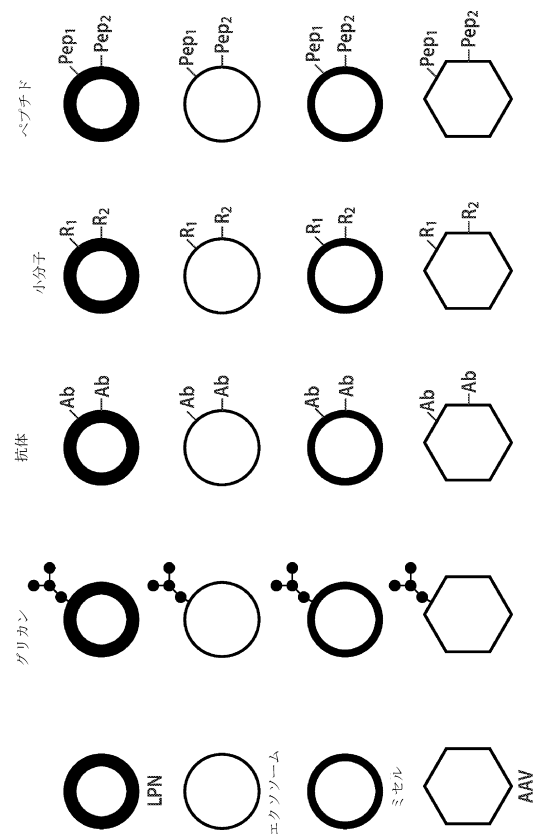
20

【図 4 C - 2】

(続き)



【図 5】



30

40

50

【配列表】  
2024533865000001.xml

10

20

30

40

50

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
**PCT/US2022/076415**

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

INV. **C07D207/18 C07D211/34 C07D401/06 A61K31/4409 A61K31/4427**  
**A61K9/00**

**ADD.**

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

**C07D A61K**

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

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

**EPO-Internal, WPI Data, CHEM ABS Data**

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                            | Relevant to claim No. |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| <b>A</b>  | <b>WO 2016/176330 A1 (UNIV PENNSYLVANIA [US];<br/>ACUITAS THERAPEUTICS INC [CA] ET AL.)<br/>3 November 2016 (2016-11-03)<br/>page 68; claim 1; table 1; compounds<br/>I-1-I-41</b><br>-----                   | <b>1-84</b>           |
| <b>A</b>  | <b>WO 2017/180917 A2 (MODERNATX INC [US])<br/>19 October 2017 (2017-10-19)<br/>page 106, paragraphs 0015-0017, 0039-0046,<br/>0095 - page 113; claims 1,11,12</b><br>-----                                    | <b>1-84</b>           |
| <b>A</b>  | <b>WO 2021/055833 A1 (BENENATO KERRY E [US]<br/>ET AL) 25 March 2021 (2021-03-25)<br/>cited in the application<br/>abstract<br/>paragraphs [0014] - [0035]; claims 1-30;<br/>tables 1,3-7</b><br>-----<br>-/- | <b>1-84</b>           |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

**\* Special categories of cited documents :**

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

**30 November 2022**

Date of mailing of the international search report

**09/12/2022**

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

**Goss, Ilaria**

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2022/076415

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                       |
|------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Category*                                            | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                                                | Relevant to claim No. |
| A                                                    | WO 2013/185116 A1 (PAYNE JOSEPH E [US];<br>GAUDETTE JOHN A [US] ET AL.)<br>12 December 2013 (2013-12-12)<br>Examples;<br>page 18 - page 20; claim 1; table 1<br>-----                                                                                                                                                                             | 1-84                  |
| A                                                    | WO 2017/112865 A1 (MODERNATX INC [US])<br>29 June 2017 (2017-06-29)<br>Tables;<br>page 38 - page 50; compounds 1-109<br>-----                                                                                                                                                                                                                     | 1-84                  |
| A                                                    | STACI SABNIS ET AL: "A Novel Amino Lipid<br>Series for mRNA Delivery: Improved<br>Endosomal Escape and Sustained<br>Pharmacology and Safety in Non-human<br>Primates",<br>MOLECULAR THERAPY,<br>vol. 26, no. 6, 1 June 2018 (2018-06-01),<br>pages 1509-1519, XP055644778,<br>US<br>ISSN: 1525-0016, DOI:<br>10.1016/j.ymthe.2018.03.010<br>----- | 1-84                  |
| X,P                                                  | WO 2022/037652 A1 (SUZHOU ABOGEN<br>BIOSCIENCES CO LTD [CN])<br>24 February 2022 (2022-02-24)<br>the whole document<br>-----                                                                                                                                                                                                                      | 1-84                  |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2022/076415

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed.
- b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)).
- ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

10

20

30

40

50

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2022/076415

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|-------------------------------------------|---------------------|----------------------------|---------------------|
| WO 2016176330 A1                          | 03-11-2016          | AU 2016253972 A1           | 14-12-2017          |
|                                           |                     | AU 2020202322 A1           | 23-04-2020          |
|                                           |                     | CA 2984125 A1              | 03-11-2016          |
|                                           |                     | EP 3289083 A1              | 07-03-2018          |
|                                           |                     | JP 2018526321 A            | 13-09-2018          |
|                                           |                     | JP 2021138741 A            | 16-09-2021          |
|                                           |                     | US 2018303925 A1           | 25-10-2018          |
|                                           |                     | US 2022040285 A1           | 10-02-2022          |
|                                           |                     | US 2022226461 A1           | 21-07-2022          |
|                                           |                     | WO 2016176330 A1           | 03-11-2016          |
| WO 2017180917 A2                          | 19-10-2017          | EP 3442590 A2              | 20-02-2019          |
|                                           |                     | US 2019167811 A1           | 06-06-2019          |
|                                           |                     | WO 2017180917 A2           | 19-10-2017          |
| WO 2021055833 A1                          | 25-03-2021          | AR 120080 A1               | 02-02-2022          |
|                                           |                     | AU 2020350759 A1           | 31-03-2022          |
|                                           |                     | BR 112022004759 A2         | 21-06-2022          |
|                                           |                     | CA 3154618 A1              | 25-03-2021          |
|                                           |                     | CN 114728887 A             | 08-07-2022          |
|                                           |                     | EP 4031524 A1              | 27-07-2022          |
|                                           |                     | IL 291219 A                | 01-05-2022          |
|                                           |                     | JP 2022548304 A            | 17-11-2022          |
|                                           |                     | KR 20220101077 A           | 19-07-2022          |
|                                           |                     | TW 202124360 A             | 01-07-2021          |
|                                           |                     | US 2021087135 A1           | 25-03-2021          |
|                                           |                     | US 2022106259 A1           | 07-04-2022          |
|                                           |                     | WO 2021055833 A1           | 25-03-2021          |
| WO 2013185116 A1                          | 12-12-2013          | AU 2013270685 A1           | 29-01-2015          |
|                                           |                     | BR 112014030714 A2         | 27-06-2017          |
|                                           |                     | CA 2876148 A1              | 12-12-2013          |
|                                           |                     | CN 104640841 A             | 20-05-2015          |
|                                           |                     | CY 1120929 T1              | 11-12-2019          |
|                                           |                     | DK 2858974 T3              | 03-12-2018          |
|                                           |                     | DK 3489220 T3              | 06-09-2021          |
|                                           |                     | EP 2858974 A1              | 15-04-2015          |
|                                           |                     | EP 3489220 A1              | 29-05-2019          |
|                                           |                     | ES 2697680 T3              | 25-01-2019          |
|                                           |                     | ES 2897216 T3              | 28-02-2022          |
|                                           |                     | HR P20181855 T1            | 28-12-2018          |
|                                           |                     | HR P20211424 T1            | 04-02-2022          |
|                                           |                     | HU E041882 T2              | 28-06-2019          |
|                                           |                     | HU E056014 T2              | 28-01-2022          |
|                                           |                     | JP 5873604 B2              | 01-03-2016          |
|                                           |                     | JP 2015523990 A            | 20-08-2015          |
|                                           |                     | KR 20150021566 A           | 02-03-2015          |
|                                           |                     | LT 2858974 T               | 10-12-2018          |
|                                           |                     | LT 3489220 T               | 27-09-2021          |
|                                           |                     | PL 2858974 T3              | 29-03-2019          |
|                                           |                     | PL 3489220 T3              | 02-11-2021          |
|                                           |                     | PT 2858974 T               | 29-11-2018          |
|                                           |                     | PT 3489220 T               | 22-10-2021          |
|                                           |                     | RS 62288 B1                | 30-09-2021          |
|                                           |                     | RU 2014153658 A            | 27-07-2016          |
|                                           |                     | SI 2858974 T1              | 31-01-2019          |
|                                           |                     | SI 3489220 T1              | 30-11-2021          |
|                                           |                     | TR 201816986 T4            | 21-01-2019          |

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

10

20

30

40

50



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2022/076415

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|-------------------------------------------|---------------------|----------------------------|---------------------|
|                                           |                     | TW 201402146 A             | 16-01-2014          |
|                                           |                     | US 2013330401 A1           | 12-12-2013          |
|                                           |                     | US 2016074514 A1           | 17-03-2016          |
|                                           |                     | US 2020085957 A1           | 19-03-2020          |
|                                           |                     | WO 2013185116 A1           | 12-12-2013          |
| -----                                     |                     |                            |                     |
| WO 2017112865 A1                          | 29-06-2017          | AU 2016377681 A1           | 14-06-2018          |
|                                           |                     | AU 2021215174 A1           | 02-09-2021          |
|                                           |                     | CA 3007297 A1              | 29-06-2017          |
|                                           |                     | DK 3394030 T3              | 28-03-2022          |
|                                           |                     | EP 3394030 A1              | 31-10-2018          |
|                                           |                     | EP 4036079 A2              | 03-08-2022          |
|                                           |                     | ES 2913626 T3              | 03-06-2022          |
|                                           |                     | HR P20220268 T1            | 13-05-2022          |
|                                           |                     | HU E057877 T2              | 28-06-2022          |
|                                           |                     | JP 7114465 B2              | 08-08-2022          |
|                                           |                     | JP 2019508371 A            | 28-03-2019          |
|                                           |                     | JP 2022160523 A            | 19-10-2022          |
|                                           |                     | LT 3394030 T               | 11-04-2022          |
|                                           |                     | PL 3394030 T3              | 11-04-2022          |
|                                           |                     | RS 63051 B1                | 29-04-2022          |
|                                           |                     | SI 3394030 T1              | 29-04-2022          |
|                                           |                     | US 2018333366 A1           | 22-11-2018          |
|                                           |                     | US 2018369419 A1           | 27-12-2018          |
|                                           |                     | US 2021161829 A1           | 03-06-2021          |
|                                           |                     | WO 2017112865 A1           | 29-06-2017          |
| -----                                     |                     |                            |                     |
| WO 2022037652 A1                          | 24-02-2022          | CN 114391008 A             | 22-04-2022          |
|                                           |                     | TW 202214566 A             | 16-04-2022          |
|                                           |                     | WO 2022037652 A1           | 24-02-2022          |
| -----                                     |                     |                            |                     |

## フロントページの続き

| (51)国際特許分類 |                   | F I     | テーマコード (参考) |         |
|------------|-------------------|---------|-------------|---------|
| A 6 1 K    | 47/22 (2006.01)   | A 6 1 K | 47/22       |         |
| A 6 1 K    | 9/51 (2006.01)    | A 6 1 K | 9/51        |         |
| A 6 1 K    | 48/00 (2006.01)   | A 6 1 K | 48/00       |         |
| A 6 1 P    | 31/00 (2006.01)   | A 6 1 P | 31/00       |         |
| A 6 1 P    | 31/14 (2006.01)   | A 6 1 P | 31/14       |         |
| A 6 1 P    | 35/00 (2006.01)   | A 6 1 P | 35/00       |         |
| A 6 1 P    | 37/04 (2006.01)   | A 6 1 P | 37/04       |         |
| A 6 1 P    | 43/00 (2006.01)   | A 6 1 P | 43/00       | 1 0 5   |
| A 6 1 K    | 38/18 (2006.01)   | A 6 1 K | 38/18       |         |
| A 6 1 K    | 47/14 (2017.01)   | A 6 1 K | 47/14       |         |
| A 6 1 K    | 47/34 (2017.01)   | A 6 1 K | 47/34       |         |
| A 6 1 K    | 47/24 (2006.01)   | A 6 1 K | 47/24       |         |
| A 6 1 K    | 47/28 (2006.01)   | A 6 1 K | 47/28       |         |
| A 6 1 K    | 31/713 (2006.01)  | A 6 1 K | 31/713      |         |
| A 6 1 K    | 31/711 (2006.01)  | A 6 1 K | 31/711      |         |
| A 6 1 K    | 31/7105 (2006.01) | A 6 1 K | 31/7105     |         |
| A 6 1 K    | 47/69 (2017.01)   | A 6 1 K | 47/69       |         |
| A 6 1 K    | 38/47 (2006.01)   | A 6 1 K | 38/47       |         |
| C 1 2 N    | 15/113 (2010.01)  | C 1 2 N | 15/113      | Z Z N A |
| C 0 7 K    | 16/00 (2006.01)   | C 0 7 K | 16/00       |         |
| C 1 2 N    | 15/12 (2006.01)   | C 1 2 N | 15/12       |         |
| C 1 2 N    | 15/09 (2006.01)   | C 1 2 N | 15/09       | 1 1 0   |
| A 6 1 K    | 39/215 (2006.01)  | A 6 1 K | 39/215      |         |
| A 6 1 K    | 39/00 (2006.01)   | A 6 1 K | 39/00       | H       |

(32)優先日 令和4年4月28日(2022.4.28)

(33)優先権主張国・地域又は機関  
米国(US)

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

弁護士 山本 健策

(72)発明者 ジャヤラマン, ムスサミー

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 3 9, ケンブリッジ, メモリアル ドライブ 6 4 0, スイート 2 3 0 0, レナゲード セラピューティクス マネージメント インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 スカリー, ステイーブン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 3 9, ケンブリッジ, メモリアル ドライブ 6 4 0, スイート 2 3 0 0, レナゲード セラピューティクス マネージメント インコーポレイテッド 気付

F ターム (参考) 4C076 AA65 AA95 BB13 BB15 CC06 CC07 CC27 CC35 DD60 DD63

DD70 EE20 EE23

4C084 AA02 AA03 AA13 CA53 DB56 DC22 MA05 MA38 MA66 NA05  
NA13 NA14 ZB091 ZB211 ZB261 ZB311 ZB331

4C085 AA02 AA06 BA71 BB01 BB23 CC08 CC31 DD62 EE01 GG02  
GG03

4C086 AA01 EA16 MA02 MA03 MA05 MA38 MA66 NA05 NA13 NA14  
ZB21

4H045 AA10 AA30 CA40 DA75 EA20