(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2025-516226
(P2025-516226A)
(43)公表日　令和7年5月27日(2025.5.27)

(51)国際特許分類			FI			テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ	*48/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	48/00		４Ｃ０７６
Ｃ１２Ｎ	*15/09*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/09	Ｚ ＺＮＡ	４Ｃ０８４
Ｃ１２Ｎ	*15/12*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/12		４Ｃ０８５
Ｃ１２Ｎ	*15/62*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/62	Ｚ	４Ｃ０８６
Ａ６１Ｐ	*35/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/00		４Ｃ０８７

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全103頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2024-563620(P2024-563620)
(86)(22)出願日　令和5年4月26日(2023.4.26)
(85)翻訳文提出日　令和6年11月21日(2024.11.21)
(86)国際出願番号　PCT/US2023/066266
(87)国際公開番号　WO2023/212618
(87)国際公開日　令和5年11月2日(2023.11.2)
(31)優先権主張番号　63/335,092
(32)優先日　令和4年4月26日(2022.4.26)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,CV,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
最終頁に続く

(71)出願人　523026950
ストランド セラピューティクス インコーポレイテッド
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２２１５， ボストン， オーバーランド ストリート ２０， スイート エー
(74)代理人　100145403
弁理士　山尾 憲人
(74)代理人　100106518
弁理士　松谷 道子
(74)代理人　100138911
弁理士　櫻井 陽子
(72)発明者　ソウエル，ライアン
アメリカ合衆国０２２１５マサチューセッツ州ボストン、オーバーランド・スト
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　ベネズエラウマ脳炎（ＶＥＥ）レプリコンを含む脂質ナノ粒子及びその使用

(57)【要約】
本開示は、ＶＥＥレプリコンを含む脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）に関し、ＬＮＰは、肝臓内でのペイロードの発現を選択的に減少及び／または回避させるのに有用である。本開示はまた、様々な疾患及び障害を治療するためのそのようなＬＮＰの使用に関する。
【選択図】なし

10

20

【特許請求の範囲】
【請求項１】
肝臓における異種タンパク質の発現を減少または回避させることを、それを必要とする対象において行う方法であって、（ｉ）１種以上の脂質、及び（ｉｉ）ベネズエラウマ脳炎（ＶＥＥ）ウイルスに由来するレプリコン（「ＶＥＥレプリコン」）を含む脂質ナノ粒子を前記対象に投与することを含み、ここで、前記ＶＥＥレプリコンは、前記異種タンパク質をコードする核酸配列を含む、前記方法。
【請求項２】
前記発現を減少させることが、参照対象（例えば、対応する脂質ナノ粒子を投与されたが、前記レプリコンがＶＥＥレプリコンではない対象）と比較して、（ｉ）前記肝臓で発現される前記異種タンパク質の量を減少させること、（ｉｉ）前記肝臓における前記異種タンパク質の発現継続期間を減少させること、または（ｉｉｉ）（ｉ）と（ｉｉ）の両方を含む、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記投与後、前記肝臓で発現される前記異種タンパク質の量が、前記参照対象のそれと比較して、少なくとも約５％、少なくとも約１０％、少なくとも約２０％、少なくとも約３０％、少なくとも約４０％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、または約１００％減少する、請求項２に記載の方法。
【請求項４】
前記投与後、前記肝臓が、前記異種タンパク質を発現しない、請求項３に記載の方法。
【請求項５】
前記投与後、前記肝臓における前記異種タンパク質の前記発現継続期間が、前記参照対象のそれと比較して、少なくとも約５％、少なくとも約１０％、少なくとも約２０％、少なくとも約３０％、少なくとも約４０％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、または約１００％減少する、請求項２または３に記載の方法。
【請求項６】
前記投与後、前記異種タンパク質が、前記対象の非肝臓組織で発現され、前記非肝臓組織は、脾臓、肺、腫瘍、またはこれらの組み合わせから選択される、請求項１～５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項７】
前記投与後、前記非肝臓組織で発現される前記異種タンパク質の量が、前記参照対象の前記非肝臓組織で観察されるそれと比較して、少なくとも約９０％、少なくとも約９１％、少なくとも約９２％、少なくとも約９３％、少なくとも約９４％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、少なくとも約９９％、または少なくとも約１００％以上である、請求項６に記載の方法。
【請求項８】
前記投与後、前記非肝臓組織における前記異種タンパク質の前記発現継続期間が、前記参照対象の前記非肝臓組織で観察されるそれと比較して、少なくとも約９０％、少なくとも約９１％、少なくとも約９２％、少なくとも約９３％、少なくとも約９４％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、少なくとも約９９％、または少なくとも約１００％である、請求項６または７に記載の方法。
【請求項９】
非肝臓組織において異種タンパク質を選択的に発現させることを、それを必要とする対象において行う方法であって、（ｉ）１種以上の脂質、及び（ｉｉ）ベネズエラウマ脳炎（ＶＥＥ）ウイルスに由来するレプリコン（「ＶＥＥレプリコン」）を含む脂質ナノ粒子を前記対象に投与することを含み、ここで、前記ＶＥＥレプリコンは、前記異種タンパク質をコードする核酸配列を含む、前記方法。
【請求項１０】

前記投与後、前記非肝臓組織で発現される前記異種タンパク質の量が、前記対象の前記肝臓で観察される対応する量よりも少なくとも約２倍、少なくとも約３倍、少なくとも約４倍、少なくとも約５倍、少なくとも約６倍、少なくとも約７倍、少なくとも約８倍、少なくとも約９倍、少なくとも約１０倍、少なくとも約１５倍、少なくとも約２０倍、少なくとも約２５倍、少なくとも約３０倍、少なくとも約３５倍、少なくとも約４０倍、少なくとも約４５倍、または少なくとも約５０倍多い、請求項９に記載の方法。

【請求項１１】

前記投与後、前記非肝臓組織における前記異種タンパク質の前記発現継続期間が、前記対象の前記肝臓において観察される対応する継続期間よりも少なくとも約２倍、少なくとも約３倍、少なくとも約４倍、少なくとも約５倍、少なくとも約６倍、少なくとも約７倍、少なくとも約８倍、少なくとも約９倍、少なくとも約１０倍、少なくとも約１５倍、少なくとも約２０倍、少なくとも約２５倍、少なくとも約３０倍、少なくとも約３５倍、少なくとも約４０倍、少なくとも約４５倍、または少なくとも約５０倍以上長い、請求項９または１０に記載の方法。

【請求項１２】

前記非肝臓組織が、脾臓、肺、またはその両方を含む、請求項９～１１のいずれか１項に記載の方法。

【請求項１３】

疾患または障害を治療することを、それを必要とする対象において行う方法であって、（ｉ）１種以上の脂質、及び（ｉｉ）ベネズエラウマ脳炎（ＶＥＥ）ウイルスに由来するレプリコン（「ＶＥＥレプリコン」）を含む脂質ナノ粒子を前記対象に投与することを含み、ここで、前記ＶＥＥレプリコンは、前記異種タンパク質をコードする核酸配列を含み、前記投与後、前記異種タンパク質は、前記対象の非肝臓組織において優先的に発現される、前記方法。

【請求項１４】

前記投与後、前記非肝臓組織で発現される前記異種タンパク質の量が、前記対象の前記肝臓で観察される対応する量よりも少なくとも約２倍、少なくとも約３倍、少なくとも約４倍、少なくとも約５倍、少なくとも約６倍、少なくとも約７倍、少なくとも約８倍、少なくとも約９倍、少なくとも約１０倍、少なくとも約１５倍、少なくとも約２０倍、少なくとも約２５倍、少なくとも約３０倍、少なくとも約３５倍、少なくとも約４０倍、少なくとも約４５倍、または少なくとも約５０倍以上多い、請求項１３に記載の方法。

【請求項１５】

前記投与後、前記非肝臓組織における前記異種タンパク質の前記発現継続期間が、前記対象の前記肝臓において観察される対応する継続期間よりも少なくとも約２倍、少なくとも約３倍、少なくとも約４倍、少なくとも約５倍、少なくとも約６倍、少なくとも約７倍、少なくとも約８倍、少なくとも約９倍、少なくとも約１０倍、少なくとも約１５倍、少なくとも約２０倍、少なくとも約２５倍、少なくとも約３０倍、少なくとも約３５倍、少なくとも約４０倍、少なくとも約４５倍、または少なくとも約５０倍以上長い、請求項１３または１４に記載の方法。

【請求項１６】

前記非肝臓組織が、脾臓、肺、またはその両方を含む、請求項１３～１５のいずれか１項に記載の方法。

【請求項１７】

前記疾患または障害が、がん、炎症性障害、単一遺伝子障害、神経障害、精神障害、またはこれらの組み合わせを含む、請求項１３～１６のいずれか１項に記載の方法。

【請求項１８】

前記がんが、黒色腫、扁平上皮細胞癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺腺癌、肺扁平上皮癌、腹膜癌、肝細胞癌、消化器癌、膵臓癌、膠芽腫、子宮頸癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、肝細胞癌、乳癌、結腸癌、大腸癌、子宮内膜または子宮癌、唾液腺癌腫、腎臓癌、前立腺癌、外陰癌、甲状腺癌、肝臓癌、胃癌、頭頸部癌、またはこれらの組み合わせを含む

、請求項１７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１９】
脂質ナノ粒子に基づく治療法の忍容性の向上を、それを必要とする対象において行う方法であって、（ｉ）１種以上の脂質、及び（ｉｉ）ベネズエラウマ脳炎（ＶＥＥ）ウイルスに由来するレプリコン（「ＶＥＥレプリコン」）を含む脂質ナノ粒子を前記対象に投与することを含み、ここで、前記ＶＥＥレプリコンは、異種タンパク質をコードする核酸配列を含む、前記方法。
【請求項２０】
前記脂質ナノ粒子に基づく治療法の前記忍容性が、前記対象において、参照対象（例えば、対応する脂質ナノ粒子を投与されたが、前記レプリコンがＶＥＥレプリコンではない対象）において観察される対応する忍容性よりも少なくとも約２倍、少なくとも約３倍、少なくとも約４倍、少なくとも約５倍、少なくとも約６倍、少なくとも約７倍、少なくとも約８倍、少なくとも約９倍、少なくとも約１０倍、少なくとも約１５倍、少なくとも約２０倍、少なくとも約２５倍、少なくとも約３０倍、少なくとも約３５倍、少なくとも約４０倍、少なくとも約４５倍、または少なくとも約５０倍以上高い、請求項１９に記載の方法。
【請求項２１】
前記脂質ナノ粒子に基づく治療法の忍容性の向上が、肝毒性の低減に関連する、請求項２０に記載の方法。
【請求項２２】
前記投与後、前記対象が、前記参照対象において観察される対応する肝毒性と比較して、低減された肝毒性を示す、請求項２１に記載の方法。
【請求項２３】
前記対象における前記肝毒性が、前記参照対象のそれと比較して、少なくとも約５％、少なくとも約１０％、少なくとも約２０％、少なくとも約３０％、少なくとも約４０％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、または約１００％低減する、請求項２２に記載の方法。
【請求項２４】
前記投与後、前記対象が、前記参照対象の前記肝臓で観察される対応する発現と比較して、低減された前記肝臓における前記異種タンパク質の発現を示す、請求項１９～２３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２５】
前記投与後、前記対象の前記肝臓で発現される前記異種タンパク質の量が、前記参照対象の前記肝臓で観察されるそれと比較して、少なくとも約５％、少なくとも約１０％、少なくとも約２０％、少なくとも約３０％、少なくとも約４０％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、または約１００％減少する、請求項２４に記載の方法。
【請求項２６】
前記投与後、前記対象の前記肝臓における前記異種タンパク質の前記発現継続期間が、前記参照対象の前記肝臓で観察されるそれと比較して、少なくとも約５％、少なくとも約１０％、少なくとも約２０％、少なくとも約３０％、少なくとも約４０％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、または約１００％減少する、請求項２４または２５に記載の方法。
【請求項２７】
前記対象の前記非肝臓組織で発現される前記異種タンパク質の量が、前記参照対象の前記非肝臓組織で観察されるそれと比較して、少なくとも約９０％、少なくとも約９１％、少なくとも約９２％、少なくとも約９３％、少なくとも約９４％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、少なくとも約９９％、または少なくとも約１００％以上である、請求項１９～２６のいずれか１項に記載の方法。

【請求項２８】
前記対象の前記非肝臓組織における前記異種タンパク質の前記発現継続期間が、前記参照対象のそれと比較して、少なくとも約９０％、少なくとも約９１％、少なくとも約９２％、少なくとも約９３％、少なくとも約９４％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、少なくとも約９９％、または少なくとも約１００％である、請求項１９～２７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２９】
肝毒性の低減に関連する脂質ナノ粒子に基づく治療法を作製する方法であって、（ｉ）１種以上の脂質を含む脂質ナノ粒子、及び（ｉｉ）ベネズエラウマ脳炎（ＶＥＥ）ウイルスに由来するレプリコン（「ＶＥＥレプリコン」）を組み合わせることを含み、ここで、前記ＶＥＥレプリコンは、異種タンパク質をコードする核酸配列を含む、前記方法。
【請求項３０】
前記ＶＥＥレプリコンが、配列番号１８７に記載されるヌクレオチド配列を有する、請求項１～２９のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３１】
前記異種タンパク質が、サイトカイン、抗体もしくはその抗原結合断片、キメラ抗原受容体、またはこれらの組み合わせを含む、請求項１～３０のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３２】
前記サイトカインが、インターロイキン（ＩＬ）－１２タンパク質を含む、請求項３１に記載の方法。
【請求項３３】
前記ＶＥＥレプリコンの前記核酸配列が、
（ｉ）ＩＬ－１２βサブユニットをコードし、配列番号５１、配列番号５２、配列番号５３、配列番号５４、配列番号５５、配列番号５６、配列番号５７、配列番号５８、配列番号５９、配列番号６０、配列番号６１、配列番号６２、配列番号６３、配列番号６４、配列番号６５、配列番号６６、配列番号６７、配列番号６８、配列番号６９、配列番号７０、配列番号７１、配列番号７２、配列番号７３、配列番号７４、もしくは配列番号７５に記載される配列に対して、少なくとも約７５％、少なくとも約７６％、少なくとも約７７％、少なくとも約７８％、少なくとも約７９％、少なくとも約８０％、少なくとも約８１％、少なくとも約８２％、少なくとも約８３％、少なくとも約８４％、少なくとも約８５％、少なくとも約８６％、少なくとも約８７％、少なくとも約８８％、少なくとも約８９％、少なくとも約９０％、少なくとも約９１％、少なくとも約９２％、少なくとも約９３％、少なくとも約９４％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、少なくとも約９９％、もしくは約１００％の配列同一性を有するヌクレオチド配列、（ｉｉ）ＩＬ－１２αサブユニットをコードし、配列番号１０１、配列番号１０２、配列番号１０３、配列番号１０４、配列番号１０５、配列番号１０６、配列番号１０７、配列番号１０８、配列番号１０９、配列番号１１０、配列番号１１１、配列番号１１２、配列番号１１３、配列番号１１４、配列番号１１５、配列番号１１６、配列番号１１７、配列番号１１８、配列番号１１９、配列番号１２０、配列番号１２１、配列番号１２２、配列番号１２３、配列番号１２４、もしくは配列番号１２５に記載される配列に対して、少なくとも約７７％、少なくとも約７８％、少なくとも約７９％、少なくとも約８０％、少なくとも約８１％、少なくとも約８２％、少なくとも約８３％、少なくとも約８４％、少なくとも約８５％、少なくとも約８６％、少なくとも約８７％、少なくとも約８８％、少なくとも約８９％、少なくとも約９０％、少なくとも約９１％、少なくとも約９２％、少なくとも約９３％、少なくとも約９４％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、少なくとも約９９％、もしくは約１００％同一であるヌクレオチド配列、または（ｉｉｉ）（ｉ）と（ｉｉ）の両方を含む、請求項３２に記載の方法。
【請求項３４】
前記サイトカインが、ＩＬ－１２タンパク質を含まない、請求項３３に記載の方法。

【請求項３５】
前記１種以上の脂質が、イオン化脂質、カチオン性脂質、リピドイド、リン脂質、ステロール、またはこれらの組み合わせを含む、請求項１～３４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３６】
前記１種以上の脂質が、ＴＴ３、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）、コレステロール、Ｃ１４－ＰＥＧ２０００、またはこれらの組み合わせを含む、請求項３５に記載の方法。
【請求項３７】
前記１種以上の脂質が、ＴＴ３である、請求項３６に記載の方法。
【請求項３８】
前記Ｃ１４－ＰＥＧ２０００が、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）、１，２－ジミリストイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン－Ｎ－［メトキシ（ポリエチレングリコール）－２０００］（ＤＭＰＥ－ＰＥＧ２０００）、またはその両方を含む、請求項３６または３７に記載の方法。
【請求項３９】
前記Ｃ１４－ＰＥＧ２０００が、脂質ナノ粒子に埋め込まれる、請求項３６～３８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項４０】
前記単離されたポリヌクレオチドが前記脂質ナノ粒子に内包された後に、前記Ｃ１４－ＰＥＧ２０００が付加されている、請求項３６～３８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項４１】
前記脂質ナノ粒子が、約３０～５００ｎｍの直径を有する、請求項１～４０のいずれか１項に記載の方法。
【請求項４２】
前記脂質ナノ粒子が、約５０～４００ｎｍの直径を有する、請求項１～４１のいずれか１項に記載の方法。
【請求項４３】
前記脂質ナノ粒子が、約７０～３００ｎｍの直径を有する、請求項１～４２のいずれか１項に記載の方法。
【請求項４４】
前記脂質ナノ粒子が、約１００～２００ｎｍの直径を有する、請求項１～４３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項４５】
前記脂質ナノ粒子が、約１００～１７５の直径を有する、請求項１～４４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項４６】
前記脂質ナノ粒子が、約１００～１６０の直径を有する、請求項１～４５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項４７】
前記１種以上の脂質及び前記ＶＥＥレプリコンが、約１：２～約１５：１の質量比を有する、請求項１～４６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項４８】
前記１種以上の脂質及び前記ＶＥＥレプリコンが、１：２、１：１．５、１：１．２、１：１．１、１：１、１．１：１、１．２：１、１．５：１、２：１、２．５：１、３：１、３．５：１、４：１、４．５：１、５：１、５．５：１、６：１、６．５：１、７：１、７．５：１、８：１、８．５：１、９：１、９．５：１、１０：１、１０．５：１、１１：１、１１．５：１、１２：１、１２．５：１、１３：１、１３．５：１、１４：１、１４．５：１、または１５：１の質量比を有する、請求項４７に記載の方法。

【請求項４９】
前記ＶＥＥレプリコンが、５’－キャップを含む、請求項１～４８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項５０】
前記ＶＥＥレプリコンが、調節エレメントを更に含む、請求項１～４９のいずれか１項に記載の方法。
【請求項５１】
前記調節エレメントが、少なくとも１つの翻訳エンハンサーエレメント（ＴＥＥ）、翻訳開始配列、少なくとも１つのマイクロＲＮＡ結合部位またはそのシード、連結ヌクレオシドの３’テーリング領域、ＡＵリッチエレメント（ＡＲＥ）、転写後制御モジュレーター、５’ＵＴＲ、３’ＵＴＲ、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項５０に記載の方法。
【請求項５２】
前記連結ヌクレオシドの３’テーリング領域が、ポリＡテール、ポリＡ－Ｇカルテット、またはステムループ配列を含む、請求項５１に記載の方法。
【請求項５３】
前記ＶＥＥレプリコンが、少なくとも１つの修飾ヌクレオシドを含む、請求項１～５２のいずれか１項に記載の方法。
【請求項５４】
前記少なくとも１つの修飾ヌクレオシドが、６－アザ－シチジン、２－チオ－シチジン、α－チオ－シチジン、シュード－イソ－シチジン、５－アミノアリル－ウリジン、５－ヨード－ウリジン、Ｎ１－メチル－シュードウリジン、５，６－ジヒドロウリジン、α－チオ－ウリジン、４－チオ－ウリジン、６－アザ－ウリジン、５－ヒドロキシ－ウリジン、デオキシ－チミジン、シュード－ウリジン、イノシン、α－チオ－グアノシン、８－オキソ－グアノシン、Ｏ６－メチル－グアノシン、７－デアザ－グアノシン、Ｎ１－メチルアデノシン、２－アミノ－６－クロロ－プリン、Ｎ６－メチル－２－アミノ－プリン、６－クロロ－プリン、Ｎ６－メチル－アデノシン、α－チオ－アデノシン、８－アジド－アデノシン、７－デアザ－アデノシン、ピロロ－シチジン、５－メチル－シチジン、Ｎ４－アセチル－シチジン、５－メチル－ウリジン、５－ヨード－シチジン、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項５３に記載の方法。
【請求項５５】
前記１種以上の脂質及び前記ＶＥＥレプリコンが、約１０：１の質量比を有する、請求項１～５４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項５６】
前記脂質ナノ粒子が、腫瘍内、髄腔内、筋肉内、静脈内、皮下、吸入、皮内、リンパ管内、眼内、腹腔内、胸膜内、脊髄内、脈管内、経鼻、経皮（ｐｅｒｃｕｔａｎｅｏｕｓ）、舌下、粘膜下、経皮（ｔｒａｎｓｄｅｒｍａｌ）、または経粘膜投与を介して、前記対象に投与される、請求項１～５５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項５７】
少なくとも１つの追加の治療剤を前記対象に投与することを更に含む、請求項１～５６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項５８】
前記少なくとも１つの追加の治療剤が、化学療法薬、標的化抗がん療法、腫瘍溶解薬、細胞傷害薬、免疫系療法、サイトカイン、外科的処置、放射線処置、共刺激分子の活性化因子、免疫チェックポイント阻害剤、ワクチン、細胞免疫療法、またはこれらの任意の組み合わせを含む、請求項５７に記載の方法。
【請求項５９】
前記免疫チェックポイント阻害剤が、抗ＰＤ－１抗体、抗ＰＤ－Ｌ１抗体、抗ＬＡＧ－３抗体、抗ＣＴＬＡ－４抗体、抗ＧＩＴＲ抗体、抗ＴＩＭ３抗体、またはこれらの任意の組み合わせを含む、請求項５８に記載の方法。

【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願の相互参照
本ＰＣＴ出願は、２０２２年４月２６日に出願された米国仮出願第６３／３３５，０９２号の優先権の利益を主張するものであり、その全体が参照により本明細書に援用される。
【０００２】
ＥＦＳ－ＷＥＢを介して電子的に提出された配列表への参照
配列表の内容は、電子的に送信され（名称：４５９７＿０１６ＰＣ０１＿ＳｅｑｕｅｎｃｅＬｉｓｔｉｎｇ＿ＳＴ２６．ＸＭＬ；サイズ：４１０，２６３バイト；及び作成日：２０２３年４月２４日）、本願とともに提出され、その全体が参照により本明細書に援用される。
【背景技術】
【０００３】
核酸に基づく治療（例えば、ｍＲＮＡワクチン）は、様々な疾患の治療にとって、ますます重要なアプローチとなりつつある。投与により、コードされたタンパク質が、免疫応答を誘導するために（例えば、抗腫瘍免疫応答を誘導する腫瘍抗原）、または健康な状態を維持するための重要な機能を提供するために、産生され得る。しかしながら、核酸分子を送達するための現在の送達プラットホームは、効果がないか、または望ましくない副作用を伴うことから、核酸に基づく療法の完全な可能性が制限されている。例えば、ｍＲＮＡが関与する場合、ｍＲＮＡを内包するために脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）が一般に使用される。また、ＬＮＰ送達を改善するために、例えば、様々な種類の哺乳動物の組織、器官及び／または細胞（例えば、哺乳動物の肝臓細胞）におけるｍＲＮＡの細胞内送達及び／または発現に影響を与えることができる新規の脂質または特定の脂質組成物を特定することに、多くの努力が注がれてきた。しかしながら、これらの既存のアプローチは、費用も時間もかかり、予測不可能である。加えて、ＬＮＰは、ｉｎ　ｖｉｖｏで投与される場合、肝毒性とも関連している。したがって、より安全でより効果的に対象に核酸を送達する手段を提供できる、改善されたＬＮＰが当該技術分野において必要とされている。
【発明の概要】
【０００４】
本明細書で提供されるのは、肝臓における異種タンパク質の発現を減少または回避させることを、それを必要とする対象において行う方法であって、（ｉ）１種以上の脂質、及び（ｉｉ）ベネズエラウマ脳炎（ＶＥＥ）ウイルスに由来するレプリコン（「ＶＥＥレプリコン」）を含む脂質ナノ粒子を対象に投与することを含み、ここで、ＶＥＥレプリコンは、異種タンパク質をコードする核酸配列を含む、方法である。いくつかの態様において、発現を減少させることは、参照対象（例えば、対応する脂質ナノ粒子を投与されたが、レプリコンがＶＥＥレプリコンではない対象）と比較して、（ｉ）肝臓で発現される異種タンパク質の量を減少させること、（ｉｉ）肝臓における異種タンパク質の発現継続期間を減少させること、または（ｉｉｉ）（ｉ）と（ｉｉ）の両方を含む。
【０００５】
いくつかの態様において、投与後、肝臓で発現される異種タンパク質の量は、参照対象のそれと比較して、少なくとも約５％、少なくとも約１０％、少なくとも約２０％、少なくとも約３０％、少なくとも約４０％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、または約１００％減少する。いくつかの態様において、投与後、肝臓は、異種タンパク質を発現しない。
【０００６】
いくつかの態様において、投与後、肝臓における異種タンパク質の発現継続期間は、参照対象のそれと比較して、少なくとも約５％、少なくとも約１０％、少なくとも約２０％、少なくとも約３０％、少なくとも約４０％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％

、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、または約１００％減少する。

【０００７】

いくつかの態様において、投与後、異種タンパク質は、対象の非肝臓組織で発現され、ここで、非肝臓組織は、脾臓、肺、腫瘍、またはこれらの組み合わせから選択される。いくつかの態様において、投与後、非肝臓組織で発現される異種タンパク質の量は、参照対象の非肝臓組織で観察されるそれと比較して、少なくとも約９０％、少なくとも約９１％、少なくとも約９２％、少なくとも約９３％、少なくとも約９４％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、少なくとも約９９％、または少なくとも約１００％以上である。いくつかの態様において、非肝臓組織における異種タンパク質の発現継続期間は、参照対象の非肝臓組織で観察されるそれと比較して、少なくとも約９０％、少なくとも約９１％、少なくとも約９２％、少なくとも約９３％、少なくとも約９４％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、少なくとも約９９％、または少なくとも約１００％である。

【０００８】

また、本明細書で提供されるのは、非肝臓組織において異種タンパク質を選択的に発現させることを、それを必要とする対象において行う方法であって、（ｉ）１種以上の脂質、及び（ｉｉ）ベネズエラウマ脳炎（ＶＥＥ）ウイルスに由来するレプリコン（「ＶＥＥレプリコン」）を含む脂質ナノ粒子を対象に投与することを含み、ここで、ＶＥＥレプリコンは、異種タンパク質をコードする核酸配列を含む、方法である。

【０００９】

いくつかの態様において、投与後、非肝臓組織で発現される異種タンパク質の量は、対象の肝臓で観察される対応する量よりも少なくとも約２倍、少なくとも約３倍、少なくとも約４倍、少なくとも約５倍、少なくとも約６倍、少なくとも約７倍、少なくとも約８倍、少なくとも約９倍、少なくとも約１０倍、少なくとも約１５倍、少なくとも約２０倍、少なくとも約２５倍、少なくとも約３０倍、少なくとも約３５倍、少なくとも約４０倍、少なくとも約４５倍、または少なくとも約５０倍多い。いくつかの態様において、投与後、非肝臓組織における異種タンパク質の発現継続期間は、対象の肝臓において観察される対応する継続期間よりも少なくとも約２倍、少なくとも約３倍、少なくとも約４倍、少なくとも約５倍、少なくとも約６倍、少なくとも約７倍、少なくとも約８倍、少なくとも約９倍、少なくとも約１０倍、少なくとも約１５倍、少なくとも約２０倍、少なくとも約２５倍、少なくとも約３０倍、少なくとも約３５倍、少なくとも約４０倍、少なくとも約４５倍、または少なくとも約５０倍以上長い。いくつかの態様において、非肝臓組織は、脾臓、肺、またはその両方を含む。

【００１０】

本明細書で開示されるのは、疾患または障害を治療することを、それを必要とする対象において行う方法であって、（ｉ）１種以上の脂質、及び（ｉｉ）ベネズエラウマ脳炎（ＶＥＥ）ウイルスに由来するレプリコン（「ＶＥＥレプリコン」）を含む脂質ナノ粒子を対象に投与することを含み、ここで、ＶＥＥレプリコンは、異種タンパク質をコードする核酸配列を含み、投与後、異種タンパク質は、対象の非肝臓組織において優先的に発現される、方法である。

【００１１】

いくつかの態様において、投与後、非肝臓組織で発現される異種タンパク質の量は、対象の肝臓で観察される対応する量よりも少なくとも約２倍、少なくとも約３倍、少なくとも約４倍、少なくとも約５倍、少なくとも約６倍、少なくとも約７倍、少なくとも約８倍、少なくとも約９倍、少なくとも約１０倍、少なくとも約１５倍、少なくとも約２０倍、少なくとも約２５倍、少なくとも約３０倍、少なくとも約３５倍、少なくとも約４０倍、少なくとも約４５倍、または少なくとも約５０倍以上多い。いくつかの態様において、投与後、非肝臓組織における異種タンパク質の発現継続期間は、対象の肝臓において観察される対応する継続期間よりも少なくとも約２倍、少なくとも約３倍、少なくとも約４倍、

少なくとも約５倍、少なくとも約６倍、少なくとも約７倍、少なくとも約８倍、少なくとも約９倍、少なくとも約１０倍、少なくとも約１５倍、少なくとも約２０倍、少なくとも約２５倍、少なくとも約３０倍、少なくとも約３５倍、少なくとも約４０倍、少なくとも約４５倍、または少なくとも約５０倍以上長い。いくつかの態様において、非肝臓組織は、脾臓、肺、またはその両方を含む。

【００１２】

いくつかの態様において、本開示で治療することができる疾患または障害は、がん、炎症性障害、単一遺伝子障害、神経障害、精神障害、またはこれらの組み合わせを含む。いくつかの態様において、がんは、黒色腫、扁平上皮細胞癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺腺癌、肺扁平上皮癌、腹膜癌、肝細胞癌、消化器癌、膵臓癌、膠芽腫、子宮頸癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、肝細胞癌、乳癌、結腸癌、大腸癌、子宮内膜または子宮癌、唾液腺癌腫、腎臓癌、前立腺癌、外陰癌、甲状腺癌、肝臓癌、胃癌、頭頸部癌、またはこれらの組み合わせを含む。

【００１３】

本開示は、脂質ナノ粒子に基づく治療法の忍容性の向上を、それを必要とする対象において行う方法であって、（ｉ）１種以上の脂質、及び（ｉｉ）ベネズエラウマ脳炎（ＶＥＥ）ウイルスに由来するレプリコン（「ＶＥＥレプリコン」）を含む脂質ナノ粒子を対象に投与することを含み、ここで、ＶＥＥレプリコンは、異種タンパク質をコードする核酸配列を含む、方法を更に提供する。

【００１４】

いくつかの態様において、脂質ナノ粒子に基づく治療法の忍容性は、対象において、参照対象（例えば、対応する脂質ナノ粒子を投与されたが、レプリコンがＶＥＥレプリコンではない対象）で観察される対応する忍容性よりも少なくとも約２倍、少なくとも約３倍、少なくとも約４倍、少なくとも約５倍、少なくとも約６倍、少なくとも約７倍、少なくとも約８倍、少なくとも約９倍、少なくとも約１０倍、少なくとも約１５倍、少なくとも約２０倍、少なくとも約２５倍、少なくとも約３０倍、少なくとも約３５倍、少なくとも約４０倍、少なくとも約４５倍、または少なくとも約５０倍以上高い。

【００１５】

いくつかの態様において、脂質ナノ粒子に基づく治療法の忍容性の向上は、肝毒性の低減に関連する。いくつかの態様において、投与後、対象は、参照対象において観察される対応する肝毒性と比較して、低減された肝毒性を示す。いくつかの態様において、対象における肝毒性は、参照対象のそれと比較して、少なくとも約５％、少なくとも約１０％、少なくとも約２０％、少なくとも約３０％、少なくとも約４０％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、または約１００％低減する。

【００１６】

いくつかの態様において、投与後、対象は、参照対象の肝臓で観察される対応する発現と比較して、低減された肝臓における異種タンパク質の発現を示す。

【００１７】

いくつかの態様において、投与後、対象の肝臓で発現される異種タンパク質の量は、参照対象の肝臓で観察されるそれと比較して、少なくとも約５％、少なくとも約１０％、少なくとも約２０％、少なくとも約３０％、少なくとも約４０％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、または約１００％減少する。いくつかの態様において、投与後、対象の肝臓における異種タンパク質の発現継続期間は、参照対象の肝臓で観察されるそれと比較して、少なくとも約５％、少なくとも約１０％、少なくとも約２０％、少なくとも約３０％、少なくとも約４０％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、または約１００％減少する。いくつかの態様において、対象の非肝臓組織で発現される異種タンパク質の量は、参照対象の非肝臓組織で観察されるそれと比較して、少なくとも約９０％、少なくとも約９１％、少なくとも約９２％、少なく

とも約９３％、少なくとも約９４％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、少なくとも約９９％、または少なくとも約１００％以上である。いくつかの態様において、対象の非肝臓組織における異種タンパク質の発現継続期間は、参照対象のそれと比較して、少なくとも約９０％、少なくとも約９１％、少なくとも約９２％、少なくとも約９３％、少なくとも約９４％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、少なくとも約９９％、または少なくとも約１００％である。

【００１８】

本明細書で提供されるのは、肝毒性の低減に関連する脂質ナノ粒子に基づく治療法を作製する方法であって、（ｉ）１種以上の脂質を含む脂質ナノ粒子、及び（ｉｉ）ベネズエラウマ脳炎（ＶＥＥ）ウイルスに由来するレプリコン（「ＶＥＥレプリコン」）を組み合わせることを含み、ここで、ＶＥＥレプリコンは、異種タンパク質をコードする核酸配列である、方法である。

【００１９】

本明細書で提供される方法のいずれかでは、いくつかの態様において、ＶＥＥレプリコンは、配列番号１８７に記載されるヌクレオチド配列を有する。いくつかの態様において、異種タンパク質は、サイトカイン、抗体もしくはその抗原結合断片、キメラ抗原受容体、またはこれらの組み合わせを含む。いくつかの態様において、サイトカインは、インターロイキン（ＩＬ）－１２タンパク質を含む。

【００２０】

いくつかの態様において、ＶＥＥレプリコンの核酸配列は、（ｉ）ＩＬ－１２βサブユニットをコードし、配列番号５１、配列番号５２、配列番号５３、配列番号５４、配列番号５５、配列番号５６、配列番号５７、配列番号５８、配列番号５９、配列番号６０、配列番号６１、配列番号６２、配列番号６３、配列番号６４、配列番号６５、配列番号６６、配列番号６７、配列番号６８、配列番号６９、配列番号７０、配列番号７１、配列番号７２、配列番号７３、配列番号７４、もしくは配列番号７５に記載される配列に対して、少なくとも約７５％、少なくとも約７６％、少なくとも約７７％、少なくとも約７８％、少なくとも約７９％、少なくとも約８０％、少なくとも約８１％、少なくとも約８２％、少なくとも約８３％、少なくとも約８４％、少なくとも約８５％、少なくとも約８６％、少なくとも約８７％、少なくとも約８８％、少なくとも約８９％、少なくとも約９０％、少なくとも約９１％、少なくとも約９２％、少なくとも約９３％、少なくとも約９４％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、少なくとも約９９％、もしくは約１００％の配列同一性を有するヌクレオチド配列、（ｉｉ）ＩＬ－１２αサブユニットをコードし、配列番号１０１、配列番号１０２、配列番号１０３、配列番号１０４、配列番号１０５、配列番号１０６、配列番号１０７、配列番号１０８、配列番号１０９、配列番号１１０、配列番号１１１、配列番号１１２、配列番号１１３、配列番号１１４、配列番号１１５、配列番号１１６、配列番号１１７、配列番号１１８、配列番号１１９、配列番号１２０、配列番号１２１、配列番号１２２、配列番号１２３、配列番号１２４、もしくは配列番号１２５に記載される配列に対して、少なくとも約７７％、少なくとも約７８％、少なくとも約７９％、少なくとも約８０％、少なくとも約８１％、少なくとも約８２％、少なくとも約８３％、少なくとも約８４％、少なくとも約８５％、少なくとも約８６％、少なくとも約８７％、少なくとも約８８％、少なくとも約８９％、少なくとも約９０％、少なくとも約９１％、少なくとも約９２％、少なくとも約９３％、少なくとも約９４％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、少なくとも約９９％、もしくは約１００％同一であるヌクレオチド配列、または（ｉｉｉ）（ｉ）と（ｉｉ）の両方を含む。

【００２１】

いくつかの態様において、サイトカインは、ＩＬ－１２タンパク質を含まない。

【００２２】

いくつかの態様において、１種以上の脂質は、イオン化脂質、カチオン性脂質、リピド

イド、リン脂質、ステロール、またはこれらの組み合わせを含む。いくつかの態様において、１種以上の脂質は、ＴＴ３、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）、コレステロール、Ｃ１４－ＰＥＧ２０００、またはこれらの組み合わせを含む。いくつかの態様において、１種以上の脂質は、ＴＴ３である。いくつかの態様において、Ｃ１４－ＰＥＧ２０００は、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）、１，２－ジミリストイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン－Ｎ－［メトキシ（ポリエチレングリコール）－２０００］（ＤＭＰＥ－ＰＥＧ２０００）、またはその両方を含む。いくつかの態様において、Ｃ１４－ＰＥＧ２０００は、脂質ナノ粒子に埋め込まれる。いくつかの態様において、Ｃ１４－ＰＥＧ２０００は、単離されたポリヌクレオチドが脂質ナノ粒子に内包された後に付加されている。

【００２３】

いくつかの態様において、脂質ナノ粒子は、約３０～５００ｎｍの直径を有する。いくつかの態様において、脂質ナノ粒子は、約５０～４００ｎｍの直径を有する。いくつかの態様において、脂質ナノ粒子は、約７０～３００ｎｍの直径を有する。いくつかの態様において、脂質ナノ粒子は、約１００～２００ｎｍの直径を有する。いくつかの態様において、脂質ナノ粒子は、約１００～１７５ｎｍの直径を有する。いくつかの態様において、脂質ナノ粒子は、約１００～１６０ｎｍの直径を有する。

【００２４】

いくつかの態様において、１種以上の脂質及びＶＥＥレプリコンは、約１：２～約１５：１の質量比を有する。いくつかの態様において、１種以上の脂質及びＶＥＥレプリコンは、１：２、１：１．５、１：１．２、１：１．１、１：１、１．１：１、１．２：１、１．５：１、２：１、２．５：１、３：１、３．５：１、４：１、４．５：１、５：１、５．５：１、６：１、６．５：１、７：１、７．５：１、８：１、８．５：１、９：１、９．５：１、１０：１、１０．５：１、１１：１、１１．５：１、１２：１、１２．５：１、１３：１、１３．５：１、１４：１、１４．５：１、または１５：１の質量比を有する。

【００２５】

いくつかの態様において、ＶＥＥレプリコンは、５’－キャップを含む。

【００２６】

いくつかの態様において、ＶＥＥレプリコンは、調節エレメントを更に含む。いくつかの態様において、調節エレメントは、少なくとも１つの翻訳エンハンサーエレメント（ＴＥＥ）、翻訳開始配列、少なくとも１つのマイクロＲＮＡ結合部位またはそのシード、連結ヌクレオシドの３’テーリング領域、ＡＵリッチエレメント（ＡＲＥ）、転写後制御モジュレーター、５’ＵＴＲ、３’ＵＴＲ、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される。いくつかの態様において、連結ヌクレオシドの３’テーリング領域は、ポリＡテール、ポリＡ－Ｇカルテット、またはステムループ配列を含む。

【００２７】

いくつかの態様において、ＶＥＥレプリコンは、少なくとも１つの修飾ヌクレオシドを含む。いくつかの態様において、少なくとも１つの修飾ヌクレオシドは、６－アザ－シチジン、２－チオ－シチジン、α－チオ－シチジン、シュード－イソ－シチジン、５－アミノアリル－ウリジン、５－ヨード－ウリジン、Ｎ１－メチル－シュードウリジン、５，６－ジヒドロウリジン、α－チオ－ウリジン、４－チオ－ウリジン、６－アザ－ウリジン、５－ヒドロキシ－ウリジン、デオキシ－チミジン、シュード－ウリジン、イノシン、α－チオ－グアノシン、８－オキソ－グアノシン、Ｏ６－メチル－グアノシン、７－デアザ－グアノシン、Ｎ１－メチルアデノシン、２－アミノ－６－クロロ－プリン、Ｎ６－メチル－２－アミノ－プリン、６－クロロ－プリン、Ｎ６－メチル－アデノシン、α－チオ－アデノシン、８－アジド－アデノシン、７－デアザ－アデノシン、ピロロ－シチジン、５－メチル－シチジン、Ｎ４－アセチル－シチジン、５－メチル－ウリジン、５－ヨード－シチジン、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される。

【００２８】
いくつかの態様において、１種以上の脂質及びＶＥＥレプリコンは、約１０：１の質量比を有する。
【００２９】
いくつかの態様において、脂質ナノ粒子は、腫瘍内、髄腔内、筋肉内、静脈内、皮下、吸入、皮内、リンパ管内、眼内、腹腔内、胸膜内、脊髄内、脈管内、経鼻、経皮（ｐｅｒｃｕｔａｎｅｏｕｓ）、舌下、粘膜下、経皮（ｔｒａｎｓｄｅｒｍａｌ）、または経粘膜投与を介して、対象に投与される。
【００３０】
本明細書で提供される方法のいずれかでは、いくつかの態様において、方法は、少なくとも１つの追加の治療剤を対象に投与することを更に含む。いくつかの態様において、少なくとも１つの追加の治療剤は、化学療法薬、標的化抗がん療法、腫瘍溶解薬、細胞傷害薬、免疫系療法、サイトカイン、外科的処置、放射線処置、共刺激分子の活性化因子、免疫チェックポイント阻害剤、ワクチン、細胞免疫療法、またはこれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの態様において、免疫チェックポイント阻害剤は、抗ＰＤ－１抗体、抗ＰＤ－Ｌ１抗体、抗ＬＡＧ－３抗体、抗ＣＴＬＡ－４抗体、抗ＧＩＴＲ抗体、抗ＴＩＭ３抗体、またはこれらの任意の組み合わせを含む。
【図面の簡単な説明】
【００３１】
【図１】次のうちの１つを静脈内投与した後のマウスの肝臓における発光発現の比較を示す：（１）いずれのＶＥＥレプリコンも含まないＲＮＡ（ＲＮＡ－ＶＥＥなし）、（２）ＶＥＥレプリコンを含むＲＮＡ（ＲＮＡ－ＶＥＥ）、及び（３）ＰＢＳ。比較のため、腎臓、脾臓、及び肺における発光発現も示す。
【図２】ＬＮＰ１またはＬＮＰ２を単回静脈内投与した後のマウスの肝臓におけるｔｄ－Ｔｏｍａｔｏタンパク質の蛍光発現の比較を示す。ＬＮＰ１とＬＮＰ２の両方には、ＶＥＥレプリコンを含み、核局在化シグナルに融合されたＣｒｅリコンビナーゼ（Ｃｒｅ－ＮＬＳ）をコードするｍＲＮＡが封入された。対照動物には、ＰＢＳが投与された。Ａにおいて、蛍光発現は、放射効率％（対照に対して正規化）で示される。Ｂにおいて、蛍光発現は、平均放射効率で示される。いずれの図においても、各記号は、測定された１つの臓器を表し、エラーバーは、平均値の標準誤差を表す。ＬＮＰ群と対照群との間の蛍光強度における差は、両側の対応のないスチューデントのｔ検定を使用して統計的に解析した（Ｎ＝３）。
【図３】ＬＮＰ３、ＬＮＰ４、ＬＮＰ５、またはＬＮＰ６を単回静脈内投与した後のマウスの肝臓におけるｔｄ－Ｔｏｍａｔｏタンパク質の蛍光発現の比較を示す。ＬＮＰ３－ＬＮＰ６のそれぞれには、いかなるＶＥＥレプリコンも含まない（ＲＮＡ－ＶＥＥなし）、核局在化シグナルに融合されたＣｒｅリコンビナーゼ（Ｃｒｅ－ＮＬＳ）をコードするｍＲＮＡが封入された。対照動物には、ＰＢＳが投与された。Ａにおいて、蛍光発現は、平均放射効率％（対照に対して正規化）で示される。Ｂにおいて、蛍光発現は、平均放射効率で示される。
【図４】ＬＮＰ７またはＬＮＰ３を単回静脈内投与した後のマウスの肝臓におけるｔｄ－Ｔｏｍａｔｏタンパク質の蛍光発現の比較を示す。ＬＮＰ３とＬＮＰ７の両方には、いかなるＶＥＥレプリコンも含まない（ＲＮＡ－ＶＥＥなし）、核局在化シグナルに融合されたＣｒｅリコンビナーゼ（Ｃｒｅ－ＮＬＳ）をコードするｍＲＮＡが封入された。対照動物には、ＰＢＳが投与された。Ａにおいて、蛍光発現は、放射効率％（対照に対して正規化）で示される。Ｂにおいて、蛍光発現は、平均放射効率で示される。
【図５】全てＶＥＥレプリコンを含み、ホタルルシフェラーゼをコードするｍＲＮＡを封入させたＬＮＰ８、ＬＮＰ９、またはＬＮＰ２を単回投与した後のマウスの肝臓におけるホタルルシフェラーゼ発現の比較を示す。ＬＮＰ８は、動物に静脈内（ＩＶ）または腫瘍内（ＩＴ）のいずれかで投与された。ＬＮＰ９及びＬＮＰ２は、動物に静脈内投与された。対照動物には、ＰＢＳが投与された。Ａにおいて、ルシフェラーゼ発現は、放射％（対

照に対して正規化）で示される。Ｂにおいて、ルシフェラーゼ発現は、平均放射で示される。いずれの図においても、各記号は、測定された１つの臓器を表し、エラーバーは、平均値の標準誤差を表す。

【図６】ＬＮＰ８、ＬＮＰ９、またはＬＮＰ２（全て、いずれのＶＥＥレプリコンも含まない（ＲＮＡ－ＶＥＥなし）、ホタルルシフェラーゼをコードするｍＲＮＡが封入されている）を単回静脈内投与した後のマウスの肝臓におけるホタルルシフェラーゼ発現の比較を示す。対照動物には、ＰＢＳが投与された。Ａにおいて、ルシフェラーゼ発現は、放射％（対照に対して正規化）で示される。Ｂにおいて、ルシフェラーゼ発現は、平均放射で示される。いずれの図においても、各記号は、測定された１つの臓器を表し、エラーバーは、平均値の標準誤差を表す。ＬＮＰ群と対照群との間の生物発光強度における差は、両側の対応のないスチューデントのｔ検定を使用して統計的に解析した（Ｎ＝５）。

【図７】（ａ）いずれのＶＥＥレプリコンも含まない（ＲＮＡ－ＶＥＥなし）、ホタルルシフェラーゼをコードするｍＲＮＡが封入されたＬＮＰ８、または（ｂ）ＶＥＥレプリコンを含み、ホタルルシフェラーゼをコードするｍＲＮＡが封入されたＬＮＰ８のいずれかを単回投与した後のマウスの肝臓におけるホタルルシフェラーゼ発現の比較を示す。Ａにおいて、ルシフェラーゼ発現は、放射％（対照に対して正規化で示される。Ｂにおいて、ルシフェラーゼ発現は、平均放射で示される。いずれの図においても、各記号は、測定された１つの臓器を表し、エラーバーは、平均値の標準誤差を表す。ＬＮＰ群と対照群との間の生物発光強度における差は、両側の対応のないスチューデントのｔ検定を使用して統計的に解析した。

【発明を実施するための形態】

【００３２】

本開示は、対象においてペイロード（例えば、異種タンパク質）を選択的に送達するための脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）及び当該ＬＮＰの使用を対象とする。より具体的には、本開示のＬＮＰは、（ｉ）１種以上の脂質、及び（ｉｉ）ベネズエラウマ脳炎（ＶＥＥ）ウイルスに由来するレプリコン（「ＶＥＥレプリコン」）を含み、ここで、ＶＥＥレプリコンは、ペイロードをコードする核酸配列を含む。本明細書に示されるように、いくつかの態様において、本明細書に記載されるＬＮＰは、対象に投与された場合、対象の肝臓内におけるコードされたペイロードの発現を選択的に回避及び／または防止することが可能である。したがって、いくつかの態様において、本開示のＬＮＰは、当該技術分野において利用可能な他の送達プラットホームと比較して低減された肝毒性に関連する。本開示の追加の態様は、本出願全体を通じて提供される。

【００３３】

記載される特定の組成物またはプロセスステップは無論のこと異なり得ることから、本開示をより詳細に記載するのに先立って、本開示は、特定の組成物またはプロセスステップに限定されない点を理解されたい。本開示を読むことで当業者には明らかであるように、本明細書に記載及び例示される個々の態様のそれぞれは、本開示の範囲または趣旨から逸脱することなく、他のいくつかの態様のいずれかの特徴から容易に分離され得るか、またはそれらの特徴と組み合わされ得る別の構成要素及び特徴を有する。記載される方法はいずれも、記載される事象の順序で実行することも、論理的に可能な他の順序で実行することもできる。

【００３４】

本明細書で提供される見出しは、本開示の様々な態様を制限するものではなく、明細書全体を参照することによって定義され得る。また、本明細書で使用される用語は、特定の態様を説明することを目的とするにすぎず、本開示の範囲は、添付の特許請求の範囲によってのみ限定されるため、限定することを意図するものではないことも理解されたい。

【００３５】

Ｉ．定義

別途の定義がない限り、本明細書で使用される全ての技術用語及び科学用語は、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ている意味と同一の意味を有する。

矛盾する場合は、定義も含めて、本出願が優先される。文脈により別途要求される場合を除き、単数形の用語は複数形を含むものとし、複数形の用語は単数形を含むものとする。

【００３６】

本開示全体を通じて、「ａ」実体または「ａｎ」実体という用語は、その実体の１つ以上を指し、例えば、「ポリヌクレオチド（ａ　ｐｏｌｙｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ）」は、１つ以上のポリヌクレオチドを表すものと理解される。したがって、「ａ」（または「ａｎ」）、「１つ以上」、及び「少なくとも１つ」という用語は、本明細書において区別なく使用される。

【００３７】

更に、本明細書で使用される場合、「及び／または」は、２つの指定された特徴または構成成分のそれぞれについて、一方を伴う場合または伴わない場合の具体的な開示とみなされるものとする。したがって、本明細書において「Ａ及び／またはＢ」などの表現で使用される「及び／または」という用語は、「Ａ及びＢ」、「ＡまたはＢ」、「Ａ」（単独）、及び「Ｂ」（単独）を含むことが意図される。同様に、「Ａ、Ｂ、及び／またはＣ」などの表現で使用される「及び／または」という用語は、次の態様のそれぞれ：Ａ、Ｂ、及びＣ；Ａ、Ｂ、またはＣ；ＡまたはＣ；ＡまたはＢ；ＢまたはＣ；Ａ及びＣ；Ａ及びＢ；Ｂ及びＣ；Ａ（単独）；Ｂ（単独）；ならびにＣ（単独）を包含することが意図される。

【００３８】

本明細書において、「含む」という言葉を用いて態様が記載される場合、「～からなる」及び／または「～から本質的になる」という用語で記載される類似の態様も提供されることが理解される。

【００３９】

「約」という用語は、本明細書において、およそ、ほぼ、その前後、またはその範囲内を意味するために使用される。この用語が数値範囲とともに使用される場合、記載された数値の上下にその境界を拡張することによって、その範囲を修飾するものである。一般に、「約」という用語は、本明細書において、別途の記載がない限り、指定された値を上下（高低）１０パーセントの変動率で上下の数値に加減するために使用される。

【００４０】

ある数または一連の数の前にある「少なくとも」という用語は、「少なくとも」という用語に隣接する数及び文脈から明らかな論理的に含まれ得る後続の全ての数または整数を含むものと理解される。例えば、核酸分子中のヌクレオチドの数は、整数であるはずである。例えば、「２１ヌクレオチド核酸分子の少なくとも１８ヌクレオチド」は、１８、１９、２０、または２１ヌクレオチドが指定の特性を有することを意味する。一連の数または範囲の前に少なくともがある場合、「少なくとも」は、その一連の数または範囲のそれぞれの数を修飾し得ることが理解される。「少なくとも」は、整数に限定されるものではない（例えば、「少なくとも５％」には、有効数字の数を考慮せず、５．０％、５．１％、５．１８％が含まれる。

【００４１】

「由来する」という用語は、本明細書で使用される場合、特定の分子もしくは生物、または特定の分子もしくは生物からの情報（例えば、アミノ酸または核酸配列）を使用して、単離されたまたは作られた構成成分を指す。例えば、第２の核酸配列に由来する核酸配列は、第２の核酸配列のヌクレオチド配列と同一であるか、または実質的に類似するヌクレオチド配列を含み得る。ヌクレオチドまたはポリペプチドの場合、誘導種は、例えば、自然に生じる変異導入、人工的な特異的変異導入または人工的なランダム変異導入によって得ることができる。ヌクレオチドまたはポリペプチドの誘導に使用される変異導入は、意図的に特異的とすることも、もしくは意図的にランダムであることも、または各々の組み合わせであってもよい。ヌクレオチドまたはポリペプチドの変異導入により、最初のヌクレオチドまたはポリペプチドに由来する異なるヌクレオチドまたはポリペプチドを作製することは、ランダム事象（例えば、ポリメラーゼ不忠実度により生じる）であり得、誘

導されたヌクレオチドまたはポリペプチドの同定は、適切なスクリーニング法、例えば、本明細書において述べられるものによって行うことができる。いくつかの態様において、第２のヌクレオチドまたはアミノ酸配列に由来するヌクレオチドまたはアミノ酸配列は、第２のヌクレオチドまたはアミノ酸配列それぞれに対して、少なくとも約５０％、少なくとも約５１％、少なくとも約５２％、少なくとも約５３％、少なくとも約５４％、少なくとも約５５％、少なくとも約５６％、少なくとも約５７％、少なくとも約５８％、少なくとも約５９％、少なくとも約６０％、少なくとも約６１％、少なくとも約６２％、少なくとも約６３％、少なくとも約６４％、少なくとも約６５％、少なくとも約６６％、少なくとも約６７％、少なくとも約６８％、少なくとも約６９％、少なくとも約７０％、少なくとも約７１％、少なくとも約７２％、少なくとも約７３％、少なくとも約７４％、少なくとも約７５％、少なくとも約７６％、少なくとも約７７％、少なくとも約７８％、少なくとも約７９％、少なくとも約８０％、少なくとも約８１％、少なくとも約８２％、少なくとも約８３％、少なくとも約８４％、少なくとも約８５％、少なくとも約８６％、少なくとも約８７％、少なくとも約８８％、少なくとも約８９％、少なくとも約９０％、少なくとも約９１％、少なくとも約９２％、少なくとも約９３％、少なくとも約９４％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、少なくとも約９９％、または約１００％の配列同一性を有し、第１のヌクレオチドまたはアミノ酸配列は、第２のヌクレオチドまたはアミノ酸配列の生物学的活性を保持している。

【００４２】

「核酸」、「核酸分子」、「ヌクレオチド配列」、「核酸配列」、「ポリヌクレオチド」、及びその文法的変形は、区別なく使用され、一本鎖形態または二本鎖ヘリックスのいずれかのリボヌクレオシド（アデノシン、グアノシン、ウリジンまたはシチジン；「ＲＮＡ分子」）もしくはデオキシリボヌクレオシド（デオキシアデノシン、デオキシグアノシン、デオキシチミジン、またはデオキシシチジン；「ＤＮＡ分子」）のリン酸エステル重合体、またはその任意のホスホエステル類似体、例えば、ホスホロチオエート及びチオエステルを指す。一本鎖核酸配列は、一本鎖ＤＮＡ（ｓｓＤＮＡ）または一本鎖ＲＮＡ（ｓｓＲＮＡ）を指す。二本鎖ＤＮＡ－ＤＮＡ、ＤＮＡ－ＲＮＡ、及びＲＮＡ－ＲＮＡ螺旋が可能である。核酸分子及び特にＤＮＡまたはＲＮＡ分子という用語は、分子の一次及び二次構造のみを指し、任意の特定の三次形態に限定されない。したがって、この用語は、とりわけ、直鎖状または環状のＤＮＡ分子（例えば、制限断片）、プラスミド、スーパーコイルＤＮＡ及び染色体に見られる二本鎖ＤＮＡを含む。特定の二本鎖ＤＮＡ分子の構造について述べる場合、配列は、ＤＮＡの非転写鎖（すなわち、ｍＲＮＡと相同な配列を有する鎖）に沿って、５’から３’方向の配列のみを提供する通常の慣例に従って、本明細書に記載され得る。「組み換えＤＮＡ分子」は、分子生物学的操作を受けたＤＮＡ分子である。ＤＮＡとしては、限定されるものではないが、ｃＤＮＡ、ゲノムＤＮＡ、プラスミドＤＮＡ、合成ＤＮＡ、及び半合成ＤＮＡが挙げられる。本開示の「核酸組成物」は、本明細書に記載されるような１つ以上の核酸を含む。本明細書に記載されるように、本開示のポリヌクレオチドは、ＤＮＡ、ＲＮＡ、またはその両方を含む。いくつかの態様において、「ポリヌクレオチド」という用語は、ポリデオキシリボヌクレオチド（２－デオキシ－Ｄ－リボースを含有する）、スプライシングを受けているか受けていないかを問わない、ｔＲＮＡ、ｒＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ、ｓｉＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ及びｍＲＮＡを含む、ポリリボヌクレオチド（Ｄ－リボース含有を含有する）、プリンまたはピリミジン塩基のＮ－配糖体またはＣ－配糖体である任意の他の種類のポリヌクレオチド、ならびに非ヌクレオチド骨格を含有する他のポリマー、例えば、ポリアミド（例えば、ペプチド核酸「ＰＮＡ」）及びポリモルホリノポリマー、ならびにＤＮＡ及びＲＮＡに見られるような塩基対形成及び塩基スタッキングを可能にする配置で核酸塩基を含有することを条件とする他の配列特異的合成核酸ポリマーを含む。

【００４３】

「レプリコン」という用語は、本明細書で使用される場合、目的の細胞内でのポリヌクレオチドの複製を可能にする複製起点を含むポリヌクレオチドを指す。本明細書に更に記

載されるように、いくつかの態様において、レプリコンは、自己増幅型ｍＲＮＡである（すなわち、標的細胞内で自身の増幅または複製を誘導することが可能である）（本明細書において「ｒｅｐＲＮＡ」または「ＲＮＡ－ＶＥＥ」とも称される）。ＲＮＡ分子は、自身の増幅を誘導するために、ＲＮＡ増幅の触媒に必要な酵素（複数可）（例えば、アルファウイルス非構造タンパク質ｎｓＰ１、ｎｓＰ２、ｎｓＰ３、ｎｓＰ４）をコードし、また、コードされた酵素（複数可）によって認識され利用される、複製に必要なシスＲＮＡ配列を含有する必要がある。アルファウイルスＲＮＡベクターレプリコンは、次の順序の要素を含有しなければならない：非構造タンパク質を媒介とした増幅に必要な５’ウイルス配列または細胞配列（５’ＣＳＥ、または５’シス複製配列、または複製に必要なシスの５’ウイルス配列、またはアルファウイルスの転写を開始することが可能な５’配列とも称され得る）、発現された場合に生物学的に活性なアルファウイルス非構造タンパク質（例えば、ｎｓＰ１、ｎｓＰ２、ｎｓＰ３、ｎｓＰ４）をコードする配列、及び非構造タンパク質を媒介とした増幅に必要な３’ウイルス配列または細胞配列（３’ＣＳＥ、または複製に必要なシスの３’ウイルス配列、またはアルファウイルスＲＮＡポリメラーゼ認識配列とも称され得る）。アルファウイルスＲＮＡベクターレプリコンは、ある特定の態様において、サブゲノム断片のウイルス転写を増加もしくは減少させるために、または欠失型ヘルパーまたは構造タンパク質発現カセットとの相同性を減少させるために改変されてもよい１つ以上の異種配列を発現する手段、例えば、ＩＲＥＳまたはウイルス（例えば、アルファウイルス）サブゲノムプロモーター（例えば、連結領域プロモーター）と、発現される１つ以上の異種配列とを含有し得る。レプリコンはまた、追加の配列、例えば、１つ以上のポリペプチドをコードする１つ以上の異種配列（例えば、タンパク質をコードする遺伝子または３’近位遺伝子）及び／またはポリアデニル化領域を含有し得る。レプリコンは、アルファウイルス構造タンパク質（カプシド、Ｅ１、Ｅ２）の全てをコードする配列を含有すべきではない。レプリコンベクターによって発現され得る異種配列の非限定的な例は、例えば、米国特許第６，０１５，６８６号に記載されており（その全体が参照により本明細書に援用される）、例えば、抗原、リンホカイン、サイトカインなどが挙げられる。本開示から明らかなように、本明細書で提供されるＶＥＥレプリコンは、ｒｅｐＲＮＡである。したがって、「ＶＥＥレプリコン」、「ＲＮＡ－ＶＥＥ」、及び「ｒｅｐＲＮＡ」は、本出願において区別なく使用される。更に、「いかなるＶＥＥレプリコンも含まないｍＲＮＡ」、「いかなるＶＥＥレプリコンも含まないＲＮＡ」、及び「ＲＮＡ－ＶＥＥなし」という用語は、本明細書において、「ｍｏｄＲＮＡ」という用語と区別なく使用される。

【００４４】

「薬学的に許容される担体」、「薬学的に許容される賦形剤」という用語、及びその文法的変形は、ヒトを含む動物における使用に関して米国連邦政府の規制機関によって承認されたか、または米国薬局方において列挙されている薬剤のうちのいずれか、ならびに対象への化合物の投与を禁止するほどの望ましくない生理学的作用を生じさせず、かつ投与される化合物の生物学的活性及び特性を阻害しない、任意の担体または希釈剤を包含する。医薬組成物の調製に有用であり、一般的に安全で非毒性であり、望ましい賦形剤及び担体が含まれる。

【００４５】

本明細書で使用される場合、「医薬組成物」という用語は、例えば、本開示のポリヌクレオチドなどの本明細書に記載される化合物のうちの１つ以上が、薬学的に許容される担体及び賦形剤などの１つ以上の他の化学成分と混合もしくは混和されたもの、またはその中に懸濁されたものを指す。

【００４６】

「ポリペプチド」、「ペプチド」、及び「タンパク質」という用語は、例えば、本明細書に記載されるポリヌクレオチドによってコードされた、任意の長さのアミノ酸のポリマーを指すために、本明細書において区別なく使用される。ポリマーは、修飾アミノ酸を含み得る。これらの用語はまた、天然に修飾されたアミノ酸ポリマー、または介入によって

、例えば、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質化、アセチル化、リン酸化、もしくは標識成分とのコンジュゲーションなどの他の任意の操作もしくは改変によって修飾されたアミノ酸ポリマーも包含する。この定義にはまた、例えば、１つ以上のアミノ酸類似体（例えば、ホモシステイン、オルニチン、ｐ－アセチルフェニルアラニン、Ｄ－アミノ酸、及びクレアチンなどの非天然アミノ酸を含む）、及び当該技術分野において知られている他の修飾を含有するポリペプチドも含まれる。「ポリペプチド」という用語は、本明細書で使用される場合、任意のサイズ、構造、または機能のタンパク質、ポリペプチド、及びペプチドを指す。

【００４７】

ポリペプチドには、遺伝子産物、天然に存在するポリペプチド、合成ポリペプチド、ホモログ、オルソログ、パラログ、断片ならびに前述の他の等価物、バリアント、及び類似体が含まれる。

【００４８】

ポリペプチドは、単一のポリペプチドであることもあれば、二量体、三量体または四量体などの多分子複合体であることもある。単鎖ポリペプチドまたは多鎖ポリペプチドも含まれ得る。多鎖ポリペプチドでは、最も一般的には、ジスルフィド連結が見られる。ポリペプチドという用語は、１つ以上のアミノ酸残基が、対応する天然に存在するアミノ酸の人工的な化学的類似体であるアミノ酸ポリマーにも適用され得る。いくつかの態様において、「ペプチド」は、約５０アミノ酸長以下、例えば、約５、約１０、約１５、約２０、約２５、約３０、約３５、約４０、約４５、または約５０アミノ酸長であり得る。

【００４９】

「コーディング配列」または「コードする」配列という用語は、特定のタンパク質、例えば、ＩＬ－１２などを「コードする」ＤＮＡ領域またはＲＮＡ領域（転写領域）を意味するために本明細書で使用される。コーディング配列は、プロモーターなどの適切な調節領域の制御下に置かれると、ｉｎ　ｖｉｔｒｏまたはｉｎ　ｖｉｖｏで、転写され（ＤＮＡ）、ポリペプチドに翻訳される（ＲＮＡ）。コーディング配列の境界は、５’（アミノ）末端の開始コドン及び３’（カルボキシ）末端の翻訳終止コドンによって決定される。コーディング配列には、原核生物または真核生物に由来するｃＤＮＡ、原核生物または真核生物に由来するゲノムＤＮＡ、及び合成ＤＮＡ配列が含まれ得るが、これらに限定されない。転写終結配列は、コーディング配列の３’側に配置され得る。

【００５０】

Ｋｏｚａｋコンセンサス配列、Ｋｏｚａｋコンセンサスまたは Ｋｏｚａｋ配列は、真核生物ｍＲＮＡに存在し、共通の（ｇｃｃ）ｇｃｃＲｃｃＡＵＧＧ（配列番号１７４）を有する配列として知られており、ここで、Ｒは、別の「Ｇ」が後に続く開始コドン（ＡＵＧ）の３塩基上流にあるプリン（アデニンまたはグアニン）である。いくつかの態様において、ポリヌクレオチドは、Ｋｏｚａｋコンセンサス配列に対して、少なくとも約９５％以上、例えば、少なくとも９９％の配列同一性を有する核酸配列を含む。いくつかの態様において、ポリヌクレオチドは、Ｋｏｚａｋコンセンサス配列を含む。

【００５１】

「ＲＮＡ」という用語は、少なくとも１つのリボヌクレオチド残基を含む分子を意味するために本明細書で使用される。「リボヌクレオチド」は、β－Ｄ－リボフラノシル基の２’位にヒドロキシル基を有するヌクレオチドを指す。この用語は、二本鎖ＲＮＡ、一本鎖ＲＮＡ、単離されたＲＮＡ、例えば、部分的または完全に精製されたＲＮＡ、本質的に純粋なＲＮＡ、合成ＲＮＡ、１つ以上のヌクレオチドの付加、欠失、置換及び／または改変により天然に存在するＲＮＡとは異なる組み換え生成されたＲＮＡを含む。「ｍＲＮＡ」という用語は、「メッセンジャーＲＮＡ」を意味し、ＤＮＡ鋳型を使用して生成され、ペプチドまたはタンパク質をコードする「転写物」に関する。典型的に、ｍＲＮＡは、５’－ＵＴＲ、タンパク質コーディング領域及び３’－ＵＴＲを含む。ｍＲＮＡは、細胞及びｉｎ　ｖｉｔｒｏにおいて、限られた半減期しか持たない。本開示との関係において、ｍＲＮＡは、ＤＮＡ鋳型からのｉｎ　ｖｉｔｒｏ転写によって生成され得る。ｉｎ　ｖｉｔ

ｒｏ転写法は、当業者に知られている。例えば、様々なｉｎ　ｖｉｔｒｏ転写キットが市販されている。本開示のいくつかの態様において、ＲＮＡ、好ましくは、ｍＲＮＡは、５’－キャップ構造で修飾される。

【００５２】

本明細書で使用される場合、「同一性」（例えば、配列同一性）という用語は、ポリマー分子間、例えば、ポリヌクレオチド分子間における全体的なモノマーの保存性を指す。例えば、ポリヌクレオチドＡはポリヌクレオチドＢと同一であるという、いかなる追加の修飾語もない「同一」という用語は、ポリヌクレオチド配列同士が１００％同一であることを意味する（１００％の配列同一性）。２つの配列を、例えば、「７０％同一である」と表現することは、例えば、「７０％の配列同一性」を有すると表現することと同等である。

【００５３】

２つのポリペプチドまたはポリヌクレオチド配列の同一性パーセントの算出は、例えば、２つの配列を最適な比較成果を得るようにアラインメントすることにより実行され得る（例えば、最適なアラインメントを得るために第１と第２のポリペプチド配列またはポリヌクレオチド配列の一方または両方にギャップを導入することができ、比較目的のために同一でない配列を無視することができる）。いくつかの態様において、比較目的のためにアライン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、対応するアミノ酸位置のアミノ酸、またはポリヌクレオチドの場合は塩基が比較される。

【００５４】

第１の配列中のある位置が、第２の配列中の対応する位置と同じアミノ酸またはヌクレオチドによって占められている場合、その分子はその位置で同一である。２つの配列間の同一性パーセントは、２つの配列の最適なアラインメントのために導入する必要があるギャップの数及び各ギャップの長さを考慮に入れた、配列が共有している同一の位置の数に応じて決まる。配列の比較及び２つの配列間の同一性パーセントの決定は、数学アルゴリズムを使用して達成され得る。

【００５５】

異なる配列（例えば、ポリヌクレオチド配列）のアラインメントに使用することができる好適なソフトウェアプログラムは、様々なソースから入手可能である。配列同一性パーセントを決定するための１つの好適なプログラムは、米国政府のＮａｔｉｏｎａｌ　Ｃｅｎｔｅｒ　ｆｏｒ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ　ＢＬＡＳＴウェブサイト（ｂｌａｓｔ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ）から利用可能なＢＬＡＳＴプログラム群の一部である、ｂｌ２ｓｅｑである。Ｂｌ２ｓｅｑは、ＢＬＡＳＴＮまたはＢＬＡＳＴＰアルゴリズムを使用して２つの配列間の比較を実行する。ＢＬＡＳＴＮは、核酸配列を比較するために使用されるのに対し、ＢＬＡＳＴＰは、アミノ酸配列を比較するために使用される。他の好適なプログラムは、例えば、バイオインフォマティクスプログラムのＥＭＢＯＳＳ群の一部であり、Ｅｕｒｏｐｅａｎ　Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ（ＥＢＩ）のｗｏｒｌｄｗｉｄｅｗｅｂ．ｅｂｉ．ａｃ．ｕｋ／Ｔｏｏｌｓ／ｐｓａから利用可能である、Ｎｅｅｄｌｅ、Ｓｔｒｅｔｃｈｅｒ、Ｗａｔｅｒ、またはＭａｔｃｈｅｒである。

【００５６】

配列アラインメントは、当該技術分野において知られている方法、例えば、ＭＡＦＦＴ、Ｃｌｕｓｔａｌ（ＣｌｕｓｔａｌＷ、Ｃｌｕｓｔａｌ　ＸまたはＣｌｕｓｔａｌ　Ｏｍｅｇａ）、ＭＵＳＣＬＥなどを使用して実施することができる。

【００５７】

ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの参照配列とアラインメントさせる１つのポリヌクレオチドまたはポリペプチドの標的配列内の異なる領域は、それぞれ個々の配列同一性パーセントを有し得る。配列同一性パーセントの値は、小数第１位に丸められることに留

意されたい。例えば、８０．１１、８０．１２、８０．１３、及び８０．１４は、８０．１に切り捨てられ、８０．１５、８０．１６、８０．１７、８０．１８、及び８０．１９は、８０．２に切り上げられる。また、長さの値は、常に整数であることにも留意されたい。

【００５８】

いくつかの態様において、第１のアミノ酸配列（または核酸配列）の第２のアミノ酸配列（または核酸配列）に対する同一性パーセンテージ（％ＩＤ）は、％ＩＤ＝１００ｘ（Ｙ／Ｚ）で算出され、式中、Ｙは、第１及び第２の配列のアラインメント（目視確認または特定の配列アラインメントプログラムによって整列されたもの）において同一マッチとしてスコアリングされたアミノ酸残基（または核酸塩基）の数であり、Ｚは、第２の配列の残基総数である。第１の配列の長さが第２の配列よりも長い場合、第１の配列の第２の配列に対する同一性パーセントは、第２の配列の第１の配列に対する同一性パーセントよりも高くなる。

【００５９】

当業者であれば、配列同一性パーセントを算出するための配列アラインメントの生成は、一次配列データによって排他的に導き出される２つの配列間の比較に限定されないことを理解するであろう。また、配列アラインメントは、配列データを、構造的データ（例えば、タンパク質結晶構造）、機能的データ（例えば、変異の位置）、または系統発生学的データなどの起源の異なるデータと統合することによって生成され得ることも理解されよう。起源の異なるデータを統合して多重配列アラインメントを生成するのに好適なプログラムは、ｗｗｗ．ｔｃｏｆｆｅｅ．ｏｒｇで利用可能なＴ－Ｃｏｆｆｅｅであり、代替的に、例えば、ＥＢＩからも入手可能である。また、配列同一性パーセントを算出するために使用される最終的なアラインメントは、自動または手動のいずれかで精選することができることも理解されよう。

【００６０】

本明細書で使用される場合、「単離された」、「精製された」、「抽出された」という用語、及びその文法的変形は、区別なく使用され、１つ以上の精製プロセスを受けた本開示の所望の組成物、例えば、本開示のポリヌクレオチドの調製物の状態を指す。いくつかの態様において、本明細書で使用される単離または精製は、夾雑物を含有する試料から本開示の組成物を取り出す、部分的に（例えば、フラクションを）取り出すプロセスである。

【００６１】

「発現」という用語は、本明細書で使用される場合、ポリヌクレオチドが遺伝子産物、例えば、ＲＮＡまたはポリペプチド（例えば、治療タンパク質、例えば、コロナウイルスタンパク質）を生成するプロセスを指す。発現には、限定するものではないが、ポリヌクレオチドのマイクロＲＮＡ結合部位、小ヘアピンＲＮＡ（ｓｈＲＮＡ）、短い干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）、または任意の他のＲＮＡ産物への転写が含まれる。発現には、限定するものではないが、ポリヌクレオチドのメッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）への転写、及びｍＲＮＡのポリペプチドへの翻訳が含まれる。発現によって、「遺伝子産物」が生成される。本明細書で使用される場合、遺伝子産物は、例えば、遺伝子の転写によって生成されるＲＮＡなどの核酸であり得る。本明細書で使用する場合、遺伝子産物は、遺伝子の転写によって生成される核酸、ＲＮＡもしくはｍｉＲＮＡ、または転写産物から翻訳されたポリペプチドであり得る。本明細書に記載される遺伝子産物は、転写後修飾、例えば、ポリアデニル化もしくはスプライシングを受けた核酸、または翻訳後修飾、例えば、リン酸化、メチル化、グリコシル化、脂質の付加、他のタンパク質サブユニットとの会合、もしくはタンパク質分解による切断を受けたポリペプチドを更に含む。

【００６２】

より大きなポリペプチドまたはポリヌクレオチドの一部であるポリペプチド部分またはポリヌクレオチド部分に関する「異種」は、それぞれ、ポリペプチドまたはポリヌクレオチド分子の残りの部分とは異なるポリペプチドまたはポリヌクレオチドに由来するポリペ

プチドまたはポリヌクレオチドを表す。ポリペプチドまたはポリヌクレオチドの追加の異種成分は、それぞれ本明細書に記載される残りのポリペプチドまたはポリヌクレオチドと同じ生物に由来するものであってもよいし、あるいは追加の成分は、異なる生物に由来するものであってもよい。例えば、異種ポリペプチドは、合成されたものであってもよいし、異なる種、個体の異なる細胞種、または異なる個体の同じもしくは異なる細胞種に由来するものであってもよい。本明細書に記載されるように、本明細書に記載されるポリヌクレオチドのＯＲＦによってコードされるタンパク質（またはポリペプチド）は、ポリヌクレオチドに対して異種である。

【００６３】

「半減期」という用語は、分子の活性、量、または数の半分を消失させるのに必要な時間に関する。本開示との関係において、ＲＮＡの半減期は、当該ＲＮＡの安定性を示す。疾患の「発症」または「進行」は、疾患の初期兆候及び／またはその後の進行を意味する。疾患の発症は、当該技術分野においてよく知られているように、標準的な臨床技術を使用して検出可能であり、評価することができる。しかしながら、発症はまた、予測不可能であり得る進行も指す。本明細書で使用される場合、発症または進行は、症状の生物学的経過を指す。発症は、発生、再発、及び発現を含む。本明細書で使用される場合、標的の疾患または障害の発現または発生は、初回の発現及び／または再発を含む。

【００６４】

ＩＩ．本開示の方法

ＩＩ．Ａ．選択的発現の方法

本開示は、概して、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）を使用した、細胞へのペイロード（本明細書において「生物学的に活性な分子」とも称される）の送達に関する。本開示に有用なＬＮＰは、ＬＮＰが組織特異的な向性を示すように改変または操作される。本明細書で使用される場合、「組織特異的な向性」は、ＬＮＰが特定の組織を標的とし、他の組織は標的としない能力を指す。例えば、本明細書に示されるように、本明細書に記載されるＬＮＰは、非肝臓組織（例えば、脾臓及び肺）においてペイロードの発現を誘発することが可能であるが、肝臓では誘発しない。いかなる理論にも拘束されるものではないが、本出願人は、ベネズエラウマ脳炎（ＶＥＥ）ウイルスに由来するレプリコン（「ＶＥＥレプリコン」）を含むようにＬＮＰを改変または操作することにより、ペイロードの選択的送達が可能になり、それにより、ペイロードの発現が肝臓で回避または減少されることを特定した。

【００６５】

したがって、いくつかの態様において、本明細書で提供されるのは、肝臓におけるペイロード（例えば、異種タンパク質）の発現を減少または回避させることを、それを必要とする対象において行う方法であって、（ｉ）１種以上の脂質、及び（ｉｉ）ベネズエラウマ脳炎（ＶＥＥ）ウイルスに由来するレプリコン（「ＶＥＥレプリコン」）を含む脂質ナノ粒子を対象に投与することを含み、ここで、ＶＥＥレプリコンは、ペイロードをコードする核酸配列を含む。

【００６６】

いくつかの態様において、ペイロードの発現は、完全に回避される（すなわち、ペイロードは、投与後、肝臓で発現されない）。いくつかの態様において、肝臓におけるペイロードの発現は、対象内の非肝臓組織（例えば、脾臓及び肺）と比較して減少する。例えば、いくつかの態様において、投与後、肝臓におけるペイロードの発現は、非肝臓組織における対応する発現と比較して、少なくとも約５％、少なくとも約１０％、少なくとも約２０％、少なくとも約３０％、少なくとも約４０％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、または約１００％減少する。いくつかの態様において、肝臓におけるペイロードの発現は、参照対象（例えば、ＶＥＥレプリコンを含まない対応する脂質ナノ粒子を投与された対象）の肝臓におけるペイロードの発現と比較して減少する。いくつかの態様において、投与後、肝臓におけるペイロードの発現は、参照対象の肝臓における対応する発現と比較して、少なくとも

約５％、少なくとも約１０％、少なくとも約２０％、少なくとも約３０％、少なくとも約４０％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、または約１００％減少する。

【００６７】

本明細書で使用される場合、「発現を減少させること」は、（ｉ）組織（例えば、肝臓）で発現されるペイロードの総量を減らすこと、（ｉｉ）ペイロードが組織（例えば、肝臓）で発現される期間（すなわち、継続期間）を減らすこと、または（ｉｉｉ）（ｉ）と（ｉｉ）の両方を指す。

【００６８】

したがって、いくつかの態様において、本明細書に記載されるＬＮＰ（例えば、ペイロードをコードするＶＥＥレプリコンを含む）の投与後、肝臓で発現されるペイロードの総量は、非肝臓組織（例えば、脾臓及び肺）と比較して減少する。いくつかの態様において、肝臓で発現されるペイロードの総量は、非肝臓組織における対応する量と比較して、少なくとも約５％、少なくとも約１０％、少なくとも約２０％、少なくとも約３０％、少なくとも約４０％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、または約１００％減少する。いくつかの態様において、肝臓で発現されるペイロードの総量は、参照対象（例えば、ＶＥＥレプリコンを含まない対応する脂質ナノ粒子を投与された対象）の肝臓で発現されるペイロードの総量と比較して減少する。いくつかの態様において、本明細書に記載されるＬＮＰ（例えば、ペイロードをコードする核酸配列を含むＶＥＥレプリコンを含む）の投与後、肝臓で発現されるペイロードの総量は、参照対象の肝臓における対応する量と比較して、少なくとも約５％、少なくとも約１０％、少なくとも約２０％、少なくとも約３０％、少なくとも約４０％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、または約１００％減少する。

【００６９】

本明細書に記載されるように、いくつかの態様において、本明細書に記載されるＬＮＰ（例えば、ペイロードをコードする核酸配列を含むＶＥＥレプリコン）の投与後、ペイロードは、例えば、非肝臓組織における対応する発現と比較して及び／または参照対象（例えば、ＶＥＥレプリコンを含まない対応する脂質ナノ粒子を投与された対象）の肝臓における対応する発現と比較して、肝臓で一過性にしか発現されない。したがって、いくつかの態様において、本開示のＬＮＰを投与すると、非肝臓組織（例えば、脾臓及び肺）と比較して、肝臓におけるペイロード発現の継続期間が減少する。いくつかの態様において、肝臓におけるペイロード発現の継続期間は、非肝臓組織における対応する継続期間と比較して、少なくとも約５％、少なくとも約１０％、少なくとも約２０％、少なくとも約３０％、少なくとも約４０％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、または約１００％減少する。いくつかの態様において、本明細書に記載されるＬＮＰ（例えば、ペイロードをコードする核酸配列を含むＶＥＥレプリコンを含む）を、それを必要とする対象に投与した後、対象の肝臓におけるペイロード発現の継続期間は、参照対象（例えば、ＶＥＥレプリコンを含まない対応する脂質ナノ粒子を投与された対象）の肝臓におけるペイロード発現の継続期間と比較して減少する。いくつかの態様において、対象の肝臓におけるペイロード発現の継続期間は、参照対象の肝臓における対応する継続期間と比較して、少なくとも約５％、少なくとも約１０％、少なくとも約２０％、少なくとも約３０％、少なくとも約４０％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、または約１００％減少する。

【００７０】

いくつかの態様において、本明細書に記載されるＬＮＰ（例えば、ペイロードをコードする核酸配列を含むＶＥＥレプリコンを含む）の投与後、肝臓における、（ｉ）発現されるペイロードの総量と、（ｉｉ）ペイロード発現の継続期間の両方が、非肝臓組織（例えば、脾臓及び肺）と比較して減少する。いくつかの態様において、（ｉ）発現されるペイ

ロードの総量と、（ｉｉ）ペイロード発現の継続期間の両方は、非肝臓組織における対応する値と比較して、少なくとも約５％、少なくとも約１０％、少なくとも約２０％、少なくとも約３０％、少なくとも約４０％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、または約１００％減少する。いくつかの態様において、本明細書に記載されるＬＮＰ（例えば、ペイロードをコードする核酸配列を含むＶＥＥレプリコンを含む）の投与後、肝臓における、（ｉ）発現されるペイロードの総量と、（ｉｉ）ペイロード発現の継続期間の両方は、参照対象（例えば、ＶＥＥレプリコンを含まない対応する脂質ナノ粒子を投与された対象）の肝臓における対応する値と比較して、減少する。いくつかの態様において、（ｉ）発現されるペイロードの総量と、（ｉｉ）ペイロード発現の継続期間の両方は、参照対象の肝臓における対応する値と比較して、少なくとも約５％、少なくとも約１０％、少なくとも約２０％、少なくとも約３０％、少なくとも約４０％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、または約１００％減少する。

【００７１】

本開示から明らかなように、いくつかの態様において、本明細書に記載されるＬＮＰは、参照対象（例えば、ＶＥＥレプリコンを含まない対応する脂質ナノ粒子を投与された対象）における対応する発現と比較して、非リンパ組織におけるペイロードの発現に対する影響が最小限である。したがって、いくつかの態様において、投与後、対象の非肝臓組織で発現されるペイロードの総量は、参照対象の非肝臓組織で観察されるそれと比較して、少なくとも約９０％、少なくとも約９１％、少なくとも約９２％、少なくとも約９３％、少なくとも約９４％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、少なくとも約９９％、または少なくとも約１００％以上である。いくつかの態様において、本明細書に記載されるＬＮＰを投与した後（例えば、ＶＥＥレプリコンを含まない対応する脂質ナノ粒子を投与された対象）、非肝臓組織におけるペイロード発現の継続期間は、参照対象の非肝臓組織で観察されるそれと比較して、少なくとも約９０％、少なくとも約９１％、少なくとも約９２％、少なくとも約９３％、少なくとも約９４％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、少なくとも約９９％、または少なくとも約１００％である。

【００７２】

少なくとも上の開示から明らかなように、本開示のいくつかの態様は、ペイロード（例えば、異種タンパク質）を選択的に発現させることを、それを必要とする対象の非肝臓組織において行う方法を対象とする。いくつかの態様において、そのような方法は、（ｉ）１種以上の脂質、及び（ｉｉ）ベネズエラウマ脳炎（ＶＥＥ）ウイルスに由来するレプリコン（「ＶＥＥレプリコン」）を含む脂質ナノ粒子を、それを必要とする対象に投与することを含み、ここで、ＶＥＥレプリコンは、ペイロードをコードする核酸配列を含み、投与後、肝臓におけるペイロード発現は、非肝臓組織における対応する発現と比較して減少する。本明細書に更に記載されるように、非肝臓組織は、対象内の肝臓以外の任意の好適な組織を含み得る。そのような非肝臓組織の非限定的な例としては、脾臓、肺、またはその両方が挙げられる。本明細書で使用される場合、「選択的な発現」もしくは「優先的な発現」、またはその文法的変形は、第１の組織（例えば、非肝臓組織）における発現（例えば、ペイロードの発現）が、第２の組織（例えば、肝臓）と比較して増加していることを指す。いくつかの態様において、ペイロードは、非肝臓組織における発現（例えば、ペイロードの総量及び／またはペイロード発現の継続期間）が肝臓における対応する発現と比較して増加している場合、非肝臓組織で選択的または優先的に発現する。いくつかの態様において、非肝臓組織におけるペイロードの発現は、対象の他の非肝臓組織における対応する発現と同じである。いくつかの態様において、非肝臓組織におけるペイロードの発現は、対象の他の非肝臓組織における対応する発現と比較して増加する。いくつかの態様において、非肝臓組織におけるペイロードの発現は、対象における他の非肝臓組織と比較して減少するが、肝臓における対応する発現と比較して増加する。

【００７３】
本明細書に示されるように、いくつかの態様において、本開示のＬＮＰは、肝臓と比較して、脾臓におけるペイロードの選択的（または優先的）発現を誘導するのに有用である。したがって、いくつかの態様において、脾臓で発現されるペイロードの総量は、肝臓で観察される対応する量と比較して、少なくとも約１倍、少なくとも約２倍、少なくとも約３倍、少なくとも約４倍、少なくとも約５倍、少なくとも約６倍、少なくとも約７倍、少なくとも約８倍、少なくとも約９倍、少なくとも約１０倍、少なくとも約１５倍、少なくとも約２０倍、少なくとも約２５倍、少なくとも約３０倍、少なくとも約３５倍、少なくとも約４０倍、少なくとも約４５倍、少なくとも約５０倍超、少なくとも約７５倍超、または少なくとも約１００倍以上増加する。いくつかの態様において、脾臓におけるペイロード発現の継続期間は、肝臓で観察される対応する継続期間と比較して、少なくとも約１倍、少なくとも約２倍、少なくとも約３倍、少なくとも約４倍、少なくとも約５倍、少なくとも約６倍、少なくとも約７倍、少なくとも約８倍、少なくとも約９倍、少なくとも約１０倍、少なくとも約１５倍、少なくとも約２０倍、少なくとも約２５倍、少なくとも約３０倍、少なくとも約３５倍、少なくとも約４０倍、少なくとも約４５倍、少なくとも約５０倍超、少なくとも約７５倍超、または少なくとも約１００倍以上増加する。
【００７４】
本明細書にも示されるように、いくつかの態様において、本開示のＬＮＰは、肝臓と比較して、肺におけるペイロードの選択的発現を誘導するのに有用である。したがって、いくつかの態様において、肺で発現されるペイロードの総量は、肝臓で観察される対応する量と比較して、少なくとも約１倍、少なくとも約２倍、少なくとも約３倍、少なくとも約４倍、少なくとも約５倍、少なくとも約６倍、少なくとも約７倍、少なくとも約８倍、少なくとも約９倍、少なくとも約１０倍、少なくとも約１５倍、少なくとも約２０倍、少なくとも約２５倍、少なくとも約３０倍、少なくとも約３５倍、少なくとも約４０倍、少なくとも約４５倍、少なくとも約５０倍超、少なくとも約７５倍超、または少なくとも約１００倍以上増加する。いくつかの態様において、肺におけるペイロード発現の継続期間は、肝臓で観察される対応する継続期間と比較して、少なくとも約１倍、少なくとも約２倍、少なくとも約３倍、少なくとも約４倍、少なくとも約５倍、少なくとも約６倍、少なくとも約７倍、少なくとも約８倍、少なくとも約９倍、少なくとも約１０倍、少なくとも約１５倍、少なくとも約２０倍、少なくとも約２５倍、少なくとも約３０倍、少なくとも約３５倍、少なくとも約４０倍、少なくとも約４５倍、少なくとも約５０倍超、少なくとも約７５倍超、または少なくとも約１００倍以上増加する。
【００７５】
ＩＩ．Ｂ．治療方法
本開示から明らかなように、本明細書に記載されるＬＮＰ（例えば、ペイロードをコードする核酸配列を含むＶＥＥレプリコンを含む）は、広範な疾患または障害の治療に有用であり得る。したがって、いくつかの態様において、本明細書で提供されるのは、疾患または障害を治療することを、それを必要とする対象において行う方法であって、（ｉ）１種以上の脂質、及び（ｉｉ）ベネズエラウマ脳炎（ＶＥＥ）ウイルスに由来するレプリコン（「ＶＥＥレプリコン」）を含む脂質ナノ粒子を対象に投与することを含み、ここで、ＶＥＥレプリコンは、ペイロードをコードする核酸配列を含み、投与後、ペイロードは、対象の非肝臓組織において優先的に発現される、方法である。いくつかの態様において、ＬＮＰの投与後、非肝臓組織で発現されるペイロードの量は、対象の肝臓で観察される対応する量よりも少なくとも約１倍、少なくとも約２倍、少なくとも約３倍、少なくとも約４倍、少なくとも約５倍、少なくとも約６倍、少なくとも約７倍、少なくとも約８倍、少なくとも約９倍、少なくとも約１０倍、少なくとも約１５倍、少なくとも約２０倍、少なくとも約２５倍、少なくとも約３０倍、少なくとも約３５倍、少なくとも約４０倍、少なくとも約４５倍、少なくとも約５０倍、少なくとも約７５倍、または少なくとも約１００倍以上多い。いくつかの態様において、ＬＮＰの投与後、非肝臓組織におけるペイロード発現の継続期間は、対象の肝臓で観察される対応する継続期間よりも少なくとも約１倍、

少なくとも約２倍、少なくとも約３倍、少なくとも約４倍、少なくとも約５倍、少なくとも約６倍、少なくとも約７倍、少なくとも約８倍、少なくとも約９倍、少なくとも約１０倍、少なくとも約１５－ｆｏｌｄ、少なくとも約２０倍、少なくとも約２５倍、少なくとも約３０倍、少なくとも約３５倍、少なくとも約４０倍、少なくとも約４５倍、少なくとも約５０倍、少なくとも約７５倍、または少なくとも約１００倍以上長い。

【００７６】

本明細書に記載されるＬＮＰ（例えば、ペイロードをコードする核酸配列を含むＶＥＥレプリコンを含む）は、当該技術分野において知られている任意の好適な疾患または障害を治療するために使用することができる。治療することができる疾患及び障害の非限定的な例としては、がん、炎症性障害、単一遺伝子障害、神経障害、精神障害、またはこれらの組み合わせが挙げられる。本開示から明らかなように、いくつかの態様において、本明細書に記載されるＬＮＰは、免疫応答を制御する（例えば、増加または減少させる）ために使用することができる。いくつかの態様において、本明細書に記載されるＬＮＰは、ワクチンとして使用することができる。いくつかの態様において、疾患または障害は、がんを含む。がんの非限定的な例としては、黒色腫、扁平上皮細胞癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺腺癌、肺扁平上皮癌、腹膜癌、肝細胞癌、消化器癌、膵臓癌、膠芽腫、子宮頸癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、肝細胞癌、乳癌、結腸癌、大腸癌、子宮内膜または子宮癌、唾液腺癌腫、腎臓癌、前立腺癌、外陰癌、甲状腺癌、肝臓癌、胃癌、頭頸部癌、またはこれらの組み合わせが挙げられる。

【００７７】

本開示の他の箇所に更に記載されるように、いくつかの態様において、本明細書に記載されるＬＮＰは、当該技術分野において利用可能な他の送達プラットホームと比較して、望ましくない副作用を減少させ、安全性を高めることができる。例えば、過去の多くのＬＮＰに基づく腫瘍内治療アプローチでは、肝毒性が大きな問題であった（例えば、ＬＮＰが肝臓内に蓄積するため）。例えば、Ｊａｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｔｈｅｒ ２８（５）：２８５－２９６（Ｏｃｔ．２０１８）を参照されたく、その全体が参照により本明細書に援用される。いかなる理論にも拘束されるものではないが、いくつかの態様において、肝臓内におけるペイロードの発現を回避または減少させることにより、本明細書に記載されるＬＮＰ（例えば、ペイロードをコードする核酸配列を含むＶＥＥレプリコン）は、肝毒性の低減に関連する。例えば、いくつかの態様において、本明細書で提供されるＬＮＰの投与後、参照対象（例えば、対応するＬＮＰを投与されたが、ＶＥＥレプリコンを含まない対象）と比較して対象における肝毒性が減少する。いくつかの態様において、対象における肝毒性は、参照対象のそれと比較して、少なくとも約５％、少なくとも約１０％、少なくとも約２０％、少なくとも約３０％、少なくとも約４０％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、または約１００％減少する。肝毒性は、当該技術分野において利用可能な任意の好適な方法を使用して測定することができる。いくつかの態様において、肝毒性は、対象の一般的な毒性評価（例えば、臨床的耐性及び一般的な健康状態）を実施することによって評価することができる。そのような評価の実施に使用することができる非限定的な基準には、対象の活量、食物摂取量、身体スコア指数、水分補給状態、及びこれらの組み合わせが含まれる。いくつかの態様において、対象から生体サンプル（例えば、血液または血清）を採取することができ、血液学及び／または臨床化学を実施することができる。例えば、いくつかの態様において、肝臓トランスアミナーゼ（ＡＬＴ／ＡＳＴ）、総ビリルビン、血清アルブミン、またはこれらの組み合わせのレベルが測定され得る。そのような測定値を参照値（例えば、健康な対象における対応する量）と比較して、肝毒性を評価することができる。いくつかの態様において、より侵襲的な方法（例えば、肝臓の顕微鏡評価）を使用することもできる。

【００７８】

当業者には明らかなように、いくつかの態様において、肝毒性の低減により、投与されるＬＮＰの忍容性が向上し得る。したがって、いくつかの態様において、本明細書で提供

されるのは、ＬＮＰに基づく治療法の忍容性の向上を、それを必要とする対象において行う方法であって、（ｉ）１種以上の脂質、及び（ｉｉ）ベネズエラウマ脳炎（ＶＥＥ）ウイルスに由来するレプリコン（「ＶＥＥレプリコン」）を含む脂質ナノ粒子を対象に投与することを含み、ここで、ＶＥＥレプリコンは、ペイロードをコードする核酸配列（例えば、異種タンパク質）を含む、方法である。いくつかの態様において、脂質ナノ粒子に基づく治療法の忍容性は、対象において、参照対象（例えば、対応する脂質ナノ粒子を投与されたが、レプリコンがＶＥＥレプリコンではない対象）において観察される対応する忍容性よりも少なくとも約２倍、少なくとも約３倍、少なくとも約４倍、少なくとも約５倍、少なくとも約６倍、少なくとも約７倍、少なくとも約８倍、少なくとも約９倍、少なくとも約１０倍、少なくとも約１５倍、少なくとも約２０倍、少なくとも約２５倍、少なくとも約３０倍、少なくとも約３５倍、少なくとも約４０倍、少なくとも約４５倍、または少なくとも約５０倍以上高い。

【００７９】

本開示のいくつかの態様において、本明細書に記載されるポリヌクレオチド、ベクター、脂質ナノ粒子、及び／または医薬組成物（本明細書において、「組成物」とも総称される）は、疾患または障害を治療するために使用される。いくつかの態様において、疾患または障害は、がんを含む。治療することができるがんの非限定的な例は、本開示の他の箇所に提供される。

【００８０】

いくつかの態様において、有効量の本明細書に記載されるＬＮＰまたはそのようなＬＮＰを含む組成物（本明細書において「組成物」とも総称される）のいずれかは、それを必要とする対象に、好適な経路、例えば、腫瘍内投与、静脈内投与（例えば、ボーラスとしてまたは一定期間にわたる持続注入）、筋肉内、腹腔内、脳脊髄内、皮下、関節内、滑液嚢内、髄腔内、経口、吸入、または局所経路を介して投与される。ジェットネブライザー及び超音波ネブライザーを含む、市販の液体製剤用ネブライザーが投与に有用である。液体製剤は噴霧することができ、凍結乾燥粉末は再構成後に噴霧することができる。いくつかの態様において、本明細書に記載される医薬組成物は、フルオロカーボン製剤及び定量吸入器を使用してエアロゾル化されるか、または凍結乾燥させた粉砕粉末として吸入される。いくつかの態様において、本明細書に記載される医薬組成物は、腫瘍内注射用に製剤化される。いくつかの態様において、本明細書に記載される医薬組成物は、局所経路を介して対象に投与され、例えば、腫瘍部位または感染部位などの局所部位に注射される。いくつかの態様において、対象は、ヒトである。

【００８１】

本開示から明らかなように、いくつかの態様において、本明細書に記載される組成物は、単独または１つ以上の他の活性剤との組み合わせのいずれかで、治療効果を付与する有効量で対象に投与される。いくつかの態様において、組成物は、がんに罹患している対象に投与され、治療効果は、腫瘍組織量の減少、がん細胞の減少、免疫活性の増加、またはこれらの組み合わせを含む。投与された組成物（例えば、脂質ナノ粒子）が治療効果を達成したかどうかは、当該技術分野において知られている任意の好適な方法（例えば、腫瘍体積及び／またはＴ細胞活性の測定）を使用して決定することができる。有効量は、当業者によって認識されるように、治療される特定の状態、状態の重症度、個々の患者のパラメーター、例えば、年齢、身体状態、体格、性別及び体重、治療期間、併用療法の性質（ある場合）、特定の投与経路ならびに医療従事者の専門知識内の同様の因子に応じて変化する。

【００８２】

半減期などの経験的考察は、一般に、投与量の決定に寄与する。投与頻度は、治療の経過にわたって決定され、調整することができるが、一般に、標的の疾患／障害の治療及び／または抑制及び／または改善及び／または遅延に基づくが、必ずしもそうではない。あるいは、本明細書に記載される組成物（例えば、脂質ナノ粒子）の持続連続放出製剤が適切であり得る。持続放出を達成するための製剤及びデバイスは、様々なものが当該技術分

野において知られている。

【００８３】

本開示のいくつかの態様において、治療は、本明細書で開示される組成物の単回注射である。いくつかの態様において、単回注射は、それを必要とする対象に腫瘍内投与される。

【００８４】

本開示のいくつかの態様において、本明細書に記載される組成物の投与量は、当該組成物（例えば、本明細書に記載される脂質ナノ粒子）の投与を１回以上受けたことのある個体において、経験的に決定することができる。いくつかの態様において、個体には、漸増投与量の本明細書に記載される組成物が投与される。本明細書の組成物の有効性を評価するために、疾患／障害の指標が追跡され得る。数日間またはそれ以上にわたる反復投与の場合、いくつかの態様において、治療は、状態に応じて、症状の所望の抑制が生じるまで、あるいは標的の疾患もしくは障害、またはその症状を緩和するのに十分な治療レベルが達成されるまで、継続される。

【００８５】

本開示のいくつかの態様において、投与頻度は、約１週間に１回、約２週間に１回、約３週間に１回、約４週間に１回、約５週間に１回、約６週間に１回、約７週間に１回、約８週間に１回、約９週間に１回、もしくは約１０週間に１回、または約１ヶ月に１回、約２ヶ月に１回、もしくは約３ヶ月以上に１回である。使用される本明細書に記載される組成物（例えば、脂質ナノ粒子）の投与レジメン（例えば、投与量及び／または投与頻度）は、経時的に変化し得る。

【００８６】

本開示のいくつかの態様において、方法は、一用量または複数用量の本明細書に記載される組成物を、それを必要とする対象に投与することを含む。

【００８７】

組成物（例えば、本明細書に記載される脂質ナノ粒子）の適切な投与量は、特定の組成物（例えば、脂質ナノ粒子）、疾患／障害（例えば、がん）の種類及び重症度、組成物（例えば、脂質ナノ粒子）が予防目的または治療目的のいずれで投与されるか、前治療、対象の病歴及び組成物（例えば、脂質ナノ粒子）への応答、ならびに主治医の裁量による。いくつかの態様において、臨床医は、所望の結果が達成される投与量に達するまで、本明細書で開示される組成物を投与することができる。いくつかの態様において、所望の結果は、腫瘍組織量の減少、がん細胞の減少、または免疫活性の増加である。１つ以上の本明細書に記載される組成物の投与は、例えば、レシピエントの生理学的条件、投与の目的が治療的であるか予防的であるか、及び当業者に知られている他の因子に応じて、連続的または断続的であり得る。本明細書に記載される組成物の投与は、予め選択された期間にわたって本質的に連続的になされてもよいし、例えば、標的の疾患または障害を発症する前、その間、またはその後のいずれかで、一連の間隔をあけた投与であってもよい。

【００８８】

本明細書で使用される場合、標的の疾患／障害を緩和することには、疾患の発症もしくは進行を遅延させること、または疾患の重症度を軽減させることが含まれる。疾患を緩和することは、必ずしも治癒的な結果を必要としない。本明細書で使用される場合、標的の疾患または障害の発症を「遅延させること」は、疾患の進行を先送りし、妨げ、減速させ、抑制し、安定化させ、及び／または延期させることを意味する。この遅延は、病歴及び／または治療される対象に応じて、様々な時間の長さであり得る。疾患の発症を遅延もしくは緩和する方法、または疾患の発現を遅延させる方法は、当該方法を使用しない場合と比較して、所与の期間内に疾患の１つ以上の症状を発症する確率を減少させ、及び／または所与の期間内に症状の程度を減少させる方法である。そのような比較は、典型的に、統計的に有意な結果を与えるのに十分な数の対象を使用した臨床試験に基づく。

【００８９】

いくつかの態様において、本明細書に記載される組成物は、腫瘍組織量またはがん細胞

成長をｉｎ　ｖｉｖｏで少なくとも約５％、少なくとも約１０％、少なくとも約２０％、少なくとも約３０％、少なくとも約４０％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、またはそれ以上減少させるのに十分な量で、それを必要とする対象に投与される。いくつかの態様において、本明細書に記載される組成物は、免疫活性を少なくとも約５％、少なくとも約１０％、少なくとも約２０％、少なくとも約３０％、少なくとも約４０％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、またはそれ以上増加させるのに有効な量で投与される。

【００９０】

いくつかの態様において、対象に組成物を投与すると、対象において、Ｔ細胞活性などの免疫活性が増強される。いくつかの態様において、免疫活性は、参照対象（例えば、組成物が投与される前の対象または組成物の投与に反応しなかった対応する対象）の免疫活性と比較して、少なくとも約０．５倍、少なくとも約１倍、少なくとも約２倍、少なくとも約３倍、少なくとも約４倍、少なくとも約５倍、少なくとも約６倍、少なくとも約７倍、少なくとも約８倍、少なくとも約９倍、少なくとも約１０倍、少なくとも約１５倍、少なくとも約２０倍、少なくとも約２５倍、少なくとも約５０倍、またはそれ以上、増強または増加する。

【００９１】

いくつかの態様において、対象は、がんを有する、がんを有することが疑われる、またはがんのリスクがあるヒトである。いくつかの態様において、がんは、黒色腫、扁平上皮細胞癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺腺癌、肺扁平上皮癌、腹膜癌、肝細胞癌、消化器癌、膵臓癌、膠芽腫、子宮頸癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、肝細胞癌、乳癌、結腸癌、大腸癌、子宮内膜または子宮癌、唾液腺癌腫、腎臓癌、前立腺癌、外陰癌、甲状腺癌、肝臓癌、胃癌、ならびに頭頸部扁平上皮細胞癌を含む様々な種類の頭頸部癌からなる群から選択される。いくつかの態様において、がんは、黒色腫、肺癌、大腸癌、腎細胞癌、尿路上皮癌、またはホジキンリンパ腫であり得る。

【００９２】

標的の疾患または障害を有する対象は、日常的な健康診断、例えば、臨床検査、器官機能検査、ＣＴスキャン、または超音波によって特定することができる。標的の疾患または障害を有することが疑われる対象は、疾患または障害の１つ以上の症状を示し得る。疾患または障害のリスクがある対象は、疾患または障害に関連する危険因子の１つ以上を有する対象であり得る。疾患または障害のリスクがある対象もまた、日常的な医療行為によって特定することができる。

【００９３】

いくつかの態様において、本明細書に記載される組成物は、少なくとも１つの追加の好適な治療剤とともに共投与される。いくつかの態様において、少なくとも１つの追加の好適な治療剤は、抗がん剤、抗ウイルス剤、抗細菌剤、または本明細書に記載される組成物（例えば、脂質ナノ粒子）の免疫賦活効果を増強及び／もしくは補完する役割を果たす他の剤を含む。本明細書に記載される組成物と組み合わせて使用することができる追加の治療剤の更なる例としては、化学療法薬、標的化抗がん療法、腫瘍溶解薬、細胞傷害薬、免疫系療法、サイトカイン、外科的処置、放射線処置、共刺激分子の活性化因子、免疫チェックポイント阻害剤、ワクチン、細胞免疫療法、またはこれらの任意の組み合わせが挙げられる。いくつかの態様において、本明細書に記載される組成物及び少なくとも１つの追加の治療剤は、対象に逐次的に投与され、すなわち、各治療剤は、異なる時間に投与される。いくつかの態様において、本明細書に記載される組成物及び少なくとも１つの追加の治療剤は、対象にほぼ同時に投与される。

【００９４】

当業者であれば、本明細書に記載される組成物及び他の抗がん剤（例えば、化学療法剤）の任意の組み合わせは、がんを治療するために、任意の順序で使用することができることを理解するであろう。本明細書に記載される組み合わせは、多くの因子に基づいて選択

することができ、これらには、腫瘍形成もしくは腫瘍成長の減少、がん細胞の減少、免疫活性の増加、及び／もしくはがんに関連する少なくとも１つの症状の緩和に対する有効性、または組み合わせの別の剤の副作用の軽減に対する有効性が含まれるが、これらに限定されない。例えば、本明細書に記載される併用療法は、その組み合わせのそれぞれ個々のものに関連する副作用のいずれか、例えば、抗がん剤に関連する副作用を低減することができる。

【００９５】

いくつかの態様において、他の抗がん治療剤は、化学療法、放射線療法、外科療法、免疫療法、またはこれらの組み合わせである。いくつかの態様において、化学療法剤は、カルボプラチン、シスプラチン、ドセタキセル、ゲムシタビン、ｎａｂ－パクリタキセル、ペメトレキセド、ビノレルビン、またはこれらの組み合わせである。いくつかの態様において、放射線療法は、電離放射線、ガンマ放射線、中性子線療法、電子線療法、陽子線療法、近接照射療法、全身性放射性同位体、放射線増感剤、またはこれらの組み合わせである。いくつかの態様において、外科療法は、根治的手術（例えば、腫瘍除去手術）、予防的手術、腹腔鏡手術、レーザー手術、またはこれらの組み合わせである。いくつかの態様において、免疫療法は、養子細胞移入、治療用がんワクチン、またはこれらの組み合わせである。

【００９６】

いくつかの態様において、化学療法剤は、プラチナ製剤、例えば、カルボプラチン、オキサリプラチン、シスプラチン、ネダプラチン、サトラプラチン、ロバプラチン、トリプラチン、テトラニトレート、ピコプラチン、プロリンダック、アロプラチン及び他の誘導体；トポイソメラーゼＩ阻害剤、例えば、カンプトテシン、トポテカン、イリノテカン／ＳＮ３８、ルビテカン、ベロテカン、及び他の誘導体；トポイソメラーゼＩＩ阻害剤、例えば、エトポシド（ＶＰ－１６）、ダウノルビシン、ドキソルビシン剤（例えば、ドキソルビシン、ドキソルビシンＨＣｌ、ドキソルビシン類似体、またはリポソーム中のドキソルビシン及びその塩もしくは類似体）、ミトキサントロン、アクラルビシン、エピルビシン、イダルビシン、アムルビシン、アムサクリン、ピラルビシン、バルルビシン、ゾルビシン、テニポシド及び他の誘導体；代謝拮抗物質、例えば、葉酸ファミリー（メトトレキサート、ペメトレキセド、ラルチトレキセド、アミノプテリン、及び関連物）；プリンアンタゴニスト（チオグアニン、フルダラビン、クラドリビン、６－メルカプトプリン、ペントスタチン、クロファラビン及び関連物）及びピリミジンアンタゴニスト（シタラビン、フロクスウリジン、アザシチジン、テガフール、カルモフール、カパシタビン、ゲムシタビン、ヒドロキシウレア、５－フルオロウラシル（５ＦＵ）、及び関連物）；アルキル化剤、例えば、ナイトロジェンマスタード（例えば、シクロホスファミド、メルファラン、クロラムブシル、メクロレタミン、イホスファミド、トロホスファミド、プレドニムスチン、ベンダムスチン、ウラムスチン、エストラムスチン、及び関連物）；ニトロソウレア（例えば、カルムスチン、ロムスチン、セムスチン、フォテムスチン、ニムスチン、ラニムスチン、ストレプトゾシン、及び関連物）；トリアゼン（例えば、ダカルバジン、アルトレタミン、テモゾロミド、及び関連物）；アルキルスルホネート（例えば、ブスルファン、マンノスルファン、トレオスルファン、及び関連物）；プロカルバジン；ミトブロニトール、及びアジリジン（例えば、カルボコン、トリアジクオン、チオテパ、トリエチレンマラミン、及び関連物）；抗生物質、例えば、ヒドロキシウレア、アントラサイクリン（例えば、ドキソルビシン剤、ダウノルビシン、エピルビシン及び他の誘導体）；アントラセンジオン（例えば、ミトキサントロン及び関連物）；ストレプトマイセスファミリー（例えば、ブレオマイシン、マイトマイシンＣ、アクチノマイシン、プリカマイシン）；紫外線；ならびにこれらの組み合わせである。

【００９７】

いくつかの態様において、他の抗がん治療剤は、抗体である。抗体（好ましくは、モノクローナル抗体）は、様々な機序を通してがん細胞に対する治療効果を達成する。抗体は、アポトーシスまたはプログラム細胞死をもたらすのに直接的な影響を有し得る。例えば

、成長因子受容体などのシグナル伝達経路の構成要素を遮断し、腫瘍細胞の増殖を効果的に止めることができる。モノクローナル抗体を発現する細胞では、抗イディオタイプ抗体の形成が生じ得る。間接的な影響には、単球及びマクロファージなど、細胞毒性を有する細胞の動員が含まれる。このタイプの抗体媒介性細胞殺傷は、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（ＡＤＣＣ）と呼ばれる。抗体はまた、補体に結合し、補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）として知られている直接的な細胞毒性を引き起こす。外科的手法と免疫治療薬または免疫治療法を組み合わせることは成功したアプローチであり、例えば、Ｇａｄｒｉ ｅｔ ａｌ．２００９：Ｓｙｎｅｒｇｉｓｔｉｃ ｅｆｆｅｃｔ ｏｆ ｄｅｎｄｒｉｔｉｃ ｃｅｌｌ ｖａｃｃｉｎａｔｉｏｎ ａｎｄ ａｎｔｉ－ＣＤ２０ ａｎｔｉｂｏｄｙ ｔｒｅａｔｍｅｎｔ ｉｎ ｔｈｅ ｔｈｅｒａｐｙ ｏｆ ｍｕｒｉｎｅ ｌｙｍｐｈｏｍａ．Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．３２（４）：３３３－４０に示されているとおりである。以下のリストは、本開示と組み合わせて使用することができる抗がん抗体及び潜在的な抗体標的（括弧内）のいくつかの非限定的な例を提供する：アバゴボマブ（ＣＡ－１２５）、アブシキシマブ（ＣＤ４１）、アデカツムマブ（ＥｐＣＡＭ）、アフツズマブ（ＣＤ２０）、アラシズマブペゴール（ＶＥＧＦＲ２）、アルツモマブペンテテート（ＣＥＡ）、アマツキシマブ（ＭＯＲＡｂ－００９）、アナツモマブマフェナトクス（ＴＡＧ－７２）、アポリズマブ（ＨＬＡ－ＤＲ）、アルシツモマブ（ＣＥＡ）、バビツキシマブ（ホスファチジルセリン）、ベクツモマブ（ＣＤ２２）、ベリムマブ（ＢＡＦＦ）、ベバシズマブ（ＶＥＧＦ－Ａ）、ビバツズマブメルタンシン（ＣＤ４４ ｖ６）、ブリナツモマブ（ＣＤ１９）、ブレンツキシマブベドチン（ＣＤ３０ ＴＮＦＲＳＦ８）、カンツズマブメルタンシン（ムチンＣａｎＡｇ）、カンツズマブラブタンシン（ＭＵＣ１）、カプロマブペンデチド（前立腺癌細胞）、カルルマブ（ＣＮＴ０８８８）、カツマキソマブ（ＥｐＣＡＭ、ＣＤ３）、セツキシマブ（ＥＧＦＲ）、シタツズマブボガトクス（ＥｐＣＡＭ）、シクスツムマブ（ＩＧＦ－１受容体）、クローディキシマブ（クローディン）、クリバツズマブテトラキセタン（ＭＵＣ１）、コナツムマブ（ＴＲＡＩＬ－Ｒ２）、ダセツズマブ（ＣＤ４０）、ダロツズマブ（インスリン様成長因子Ｉ受容体）、デノスマブ（ＲＡＮＫＬ）、デツモマブ（Ｂ－リンパ腫細胞）、ドロジツマブ（ＤＲ５）、エクロメキシマブ（ＧＤ３ガングリオシド）、エドレコロマブ（ＥｐＣＡＭ）、エロツズマブ（ＳＬＡＭＦ７）、エナバツズマブ（ＰＤＬ１９２）、エンシツキシマブ（ＮＰＣ－１Ｃ）、エプラツズマブ（ＣＤ２２）、エルツマキソマブ（ＨＥＲ２／ｎｅｕ、ＣＤ３）、エタラシズマブ（インテグリンαｖβ３）、ファルレツズマブ（葉酸受容体１）、ＦＢＴＡ０５（ＣＤ２０）、フィクラツズマブ（ＳＣＨ ９００１０５）、フィギツムマブ（ＩＧＦ－１受容体）、フランボツマブ（糖タンパク質７５）、フレソリムマブ（ＴＧＦ－β）、ガリキシマブ（ＣＤ８０）、ガニツマブ（ＩＧＦ－Ｉ）、ゲムツズマブオゾガマイシン（ＣＤ３３）、ゲボキズマブ（ＩＬ－１β）、ギレンツキシマブ（炭酸脱水酵素９（ＣＡ－ＩＸ））、グレンバツムマブベドチン（ＧＰＮＭＢ）、イブリツモマブチウキセタン（ＣＤ２０）、イクルクマブ（ＶＥＧＦＲ－１）、イゴボマブ（ＣＡ－１２５）、インダツキシマブラブタンシン（ＳＤＣ１）、インテツムマブ（ＣＤ５１）、イノツズマブオゾガマイシン（ＣＤ２２）、イピリムマブ（ＣＤ１５２）、イラツムマブ（ＣＤ３０）、ラベツズマブ（ＣＥＡ）、レクサツムマブ（ＴＲＡＩＬ－Ｒ２）、リビビルマブ（Ｂ型肝炎表面抗原）、リンツズマブ（ＣＤ３３）、ロルボツズマブメルタンシン（ＣＤ５６）、ルカツムマブ（ＣＤ４０）、ルミリキシマブ（ＣＤ２３）、マパツムマブ（ＴＲＡＩＬ－Ｒ１）、マツズマブ（ＥＧＦＲ）、メポリズマブ（ＩＬ－５）、ミラツズマブ（ＣＤ７４）、ミツモマブ（ＧＤ３ガングリオシド）、モガムリズマブ（ＣＣＲ４）、モキセツモマブパスドトクス（ＣＤ２２）、ナコロマブタフェナトクス（Ｃ２４２抗原）、ナプツモマブエスタフェナトクス（５Ｔ４）、ナルナツマブ（ＲＯＮ）、ネシツムマブ（ＥＧＦＲ）、ニモツズマブ（ＥＧＦＲ）、ニボルマブ（ＩｇＧ４）、オファツムマブ（ＣＤ２０）、オララツマブ（ＰＤＧＦ－Ｒα）、オナルツズマブ（ヒト細胞分散因子受容体キナーゼ）、オポルツズマブモナトクス（ＥｐＣＡＭ）、オレゴボマブ（ＣＡ－１２５）、オキセルマブ（ＯＸ－４０）、パニツムマブ（ＥＧＦＲ）、パトリツマブ（ＨＥＲ３）、ペムツモマ（ＭＵＣ１）

、ペルツズマブ（ＨＥＲ２／ｎｅｕ）、ピンツモマブ（腺癌抗原）、プリツムマブ（ビメンチン）、ラコツモマブ（Ｎ－グリコリルノイラミン酸）、ラドレツマブ（フィブロネクチンエクストラドメイン－Ｂ）、ラフィビルマブ（狂犬病ウイルス糖タンパク質）、ラムシルマブ（ＶＥＧＦＲ２）、リロツムマブ（ＨＧＦ）、リツキシマブ（ＣＤ２０）、ロバツムマブ（ＩＧＦ－１受容体）、サマリズマブ（ＣＤ２００）、シブロツズマブ（ＦＡＰ）、シルツキシマブ（ＩＬ－６）、タバルマブ（ＢＡＦＦ）、タカツズマブテトラキセタン（アルファ－フェトプロテイン）、タプリツモマブマブパプトクス（ＣＤ１９）、テナツモマブ（テネイシンＣ）、テプロツムマブ（ＣＤ２２１）、チシリムマブ（ＣＴＬＡ－４）、チガツズマブ（ＴＲＡＩＬ－Ｒ２）、ＴＮＸ－６５０（ＩＬ－１３）、トシツモマブ（ＣＤ２０）、トラスツズマブ（ＨＥＲ２／ｎｅｕ）、ＴＲＢＳ０７（ＧＤ２）、トレメリムマブ（ＣＴＬＡ－４）、ツコツズマブセルモロイキン（ＥｐＣＡＭ）、ウブリツキシマブ（ＭＳ４Ａ１）、ウレルマブ（４－１ＢＢ）、ヴォロシキシマブ（インテグリンα５β１）、ボツムマブ（腫瘍抗原ＣＴＡＡ１６．８８）、ザルツムマブ（ＥＧＦＲ）、ザノリムマブ（ＣＤ４）。

【００９８】

いくつかの態様において、他の抗がん治療剤は、サイトカイン、ケモカイン、共刺激分子、融合タンパク質、またはこれらの組み合わせである。ケモカインの例としては、ＣＣＲ７ならびにそのリガンドＣＣＬ１９及びＣＣＬ２１、更にＣＣＬ２、ＣＣＬ３、ＣＣＬ５、及びＣＣＬ１６が挙げられるが、これらに限定されない。他の例は、ＣＸＣＲ４、ＣＸＣＲ７及びＣＸＣＬ１２である。更に、共刺激分子または調節分子、例えば、Ｂ７リガンド（Ｂ７．１及びＢ７．２）などが有用である。また、例えば、特にインターロイキン（例えば、ＩＬ－１～ＩＬ１７）、インターフェロン（例えば、ＩＦＮα１～ＩＦＮα８、ＩＦＮα１０、ＩＦＮα１３、ＩＦＮα１４、ＩＦＮα１６、ＩＦＮα１７、ＩＦＮα２１、ＩＦＮβ１、ＩＦＮＷ、ＩＦＮＥ１及びＩＦＮＫ）、造血因子、ＴＧＦ（例えば、ＴＧＦ－α、ＴＧＦ－β、及びＴＧＦファミリーの他のメンバー）、最後に、腫瘍壊死因子ファミリーメンバーの受容体及びそのリガンドなどの他のサイトカイン、ならびに、４１ＢＢ、４１ＢＢ－Ｌ、ＣＤ１３７、ＣＤ１３７Ｌ、ＣＴＬＡ－４ＧＩＴＲ、ＧＩＴＲＬ、Ｆａｓ、Ｆａｓ－Ｌ、ＴＮＦＲ１、ＴＲＡＩＬ－Ｒ１、ＴＲＡＩＬ－Ｒ２、ｐ７５ＮＧＦ－Ｒ、ＤＲ６、ＬＴ．β．Ｒ、ＲＡＮＫ、ＥＤＡＲ１、ＸＥＤＡＲ、Ｆｎ１１４、Ｔｒｏｙ／Ｔｒａｄｅ、ＴＡＪ、ＴＮＦＲＩＩ、ＨＶＥＭ、ＣＤ２７、ＣＤ３０、ＣＤ４０、４－１ＢＢ、ＯＸ４０、ＧＩＴＲ、ＧＩＴＲＬ、ＴＡＣＩ、ＢＡＦＦ－Ｒ、ＢＣＭＡ、ＲＥＬＴ、及びＣＤ９５（Ｆａｓ／ＡＰＯ－１）、糖質コルチコイド誘発性ＴＮＦＲ関連タンパク質、ＴＮＦ受容体関連アポトーシス媒介タンパク質（ＴＲＡＭＰ）及び細胞死受容体６（ＤＲ６）を含むがこれらに限定されない他の刺激分子も有用である。特に、ＣＤ４０／ＣＤ４０Ｌ及びＯＸ４０／ＯＸ４０Ｌは、Ｔ細胞の生存及び増殖に直接的な影響を与えるため、併用免疫療法の重要な標的である。概説については、Ｌｅｃｈｎｅｒ ｅｔ ａｌ．２０１１：Ｃｈｅｍｏｋｉｎｅｓ，ｃｏｓｔｉｍｕｌａｔｏｒｙ ｍｏｌｅｃｕｌｅｓ ａｎｄ ｆｕｓｉｏｎ ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｆｏｒ ｔｈｅ ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｙ ｏｆ ｓｏｌｉｄ ｔｕｍｏｒｓ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｙ ３（１１），１３１７－１３４０を参照されたい。

【００９９】

いくつかの態様において、他の抗がん治療剤は、細菌治療である。研究者らは、Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ｎｏｖｙｉなどの嫌気性細菌を使用して、低酸素腫瘍の内部を消耗させている。そして、これらは、腫瘍の酸素のある側に接触すると死滅するはずであり、体内の他の部分には無害であることを意味する。別の戦略は、無毒性プロドラッグを毒性薬物に変換することができる酵素を含むように形質転換した嫌気性細菌を使用することである。酵素は、細菌が腫瘍の壊死部及び低酸素部で増殖するにつれて、腫瘍のみで発現する。したがって、全身投与されたプロドラッグは、腫瘍内でのみ毒性薬物へと代謝される。これは、非病原性嫌気性のＣｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ｓｐｏｒｏｇｅｎｅｓで有効であることが示されている。

【０１００】
いくつかの態様において、他の抗がん治療剤は、キナーゼ阻害剤である。がん細胞の成長及び生存は、キナーゼ活性の脱制御と密接に連動している。正常なキナーゼ活性を回復させ、それにより、腫瘍成長を減少させるために、幅広い阻害剤が使用されている。標的キナーゼ群は、受容体チロシンキナーゼ、例えば、ＢＣＲ－ＡＢＬ、Ｂ－Ｒａｆ、ＥＧＦＲ、ＨＥＲ－２／ＥｒｂＢ２、ＩＧＦ－ＩＲ、ＰＤＧＦＲ－α、ＰＤＧＦＲ－β、ｃ－Ｋｉｔ、Ｆｌｔ－４、Ｆｌｔ３、ＦＧＦＲ１、ＦＧＦＲ３、ＦＧＦＲ４、ＣＳＦ１Ｒ、ｃ－Ｍｅｔ、ＲＯＮ、ｃ－Ｒｅｔ、ＡＬＫ、細胞質チロシンキナーゼ、例えば、ｃ－ＳＲＣ、ｃ－ＹＥＳ、Ａｂｌ、ＪＡＫ－２、セリン／トレオニンキナーゼ、例えば、ＡＴＭ、オーロラＡ＆Ｂ、ＣＤＫ、ｍＴＯＲ、ＰＫＣｉ、ＰＬＫ、ｂ－Ｒａｆ、Ｓ６Ｋ、ＳＴＫ１１／ＬＫＢ１、及び脂質キナーゼ、例えば、ＰＩ３Ｋ、ＳＫ１を含む。小分子キナーゼ阻害剤は、例えば、ＰＨＡ－７３９３５８、ニロチニブ、ダサチニブ、及びＰＤ１６６３２６、ＮＳＣ　７４３４１１、ラパチニブ（ＧＷ－５７２０１６）、カネルチニブ（ＣＩ－１０３３）、セマキシニブ（ＳＵ５４１６）、バタラニブ（ＰＴＫ７８７／ＺＫ２２２５８４）、スーテント（ＳＵ１１２４８）、ソラフェニブ（ＢＡＹ４３－９００６）及びレフルノミド（ＳＵ１０１）である。更なる情報については、例えば、Ｚｈａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．２００９：Ｔａｒｇｅｔｉｎｇ　ｃａｎｃｅｒ　ｗｉｔｈ　ｓｍａｌｌ　ｍｏｌｅｃｕｌｅ　ｋｉｎａｓｅ　ｉｎｈｉｂｉｔｏｒｓ．Ｎａｔｕｒｅ　Ｒｅｖｉｅｗｓ　Ｃａｎｃｅｒ　９，２８－３９を参照されたい。

【０１０１】
いくつかの態様において、他の抗がん治療剤は、ｔｏｌｌ様受容体である。Ｔｏｌｌ様受容体（ＴＬＲ）ファミリーのメンバーは、自然免疫と適応免疫との間の重要な橋渡し役であり、多くのアジュバント効果は、ＴＬＲの活性化に依存している。がんに対して確立されたワクチンの多くは、ワクチン応答を高めるためにＴＬＲのリガンドを組み込んでいる。ＴＬＲ２、ＴＬＲ３、ＴＬＲ４の他には、特に、ＴＬＲ７及びＴＬＲ８が受動免疫療法アプローチのがん療法のために検討されている。密接に関連するＴＬＲ７及びＴＬＲ８は、免疫細胞、腫瘍細胞、及び腫瘍微小環境に影響を与えることによって抗腫瘍応答に寄与し、ヌクレオシド類似構造によって活性化され得る。全てのＴＬＲが単独の免疫治療薬またはがんワクチンアジュバントとして使用されており、本開示の製剤及び方法と相乗的に組み合わせることができる。更なる情報については、ｖａｎ　Ｄｕｉｎ　ｅｔ　ａｌ．２００５：Ｔｒｉｇｇｅｒｉｎｇ　ＴＬＲ　ｓｉｇｎａｌｉｎｇ　ｉｎ　ｖａｃｃｉｎａｔｉｏｎ．Ｔｒｅｎｄｓ　ｉｎ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，２７（１）：４９－５５を参照されたい。

【０１０２】
いくつかの態様において、他の抗がん治療剤は、血管新生阻害剤である。血管新生阻害剤は、腫瘍の生存に必要な広範な血管成長（血管新生）を阻害する。例えば、増大する栄養素及び酸素の需要を満たすために腫瘍細胞によって促進される血管新生は、異なる分子を標的とすることによって遮断することができる。本開示と組み合わせることができる血管新生媒介分子または血管新生阻害剤の非限定的な例は、可溶性ＶＥＧＦ（ＶＥＧＦアイソフォームＶＥＧＦ１２１及びＶＥＧＦ１６５、受容体ＶＥＧＦＲ１、ＶＥＧＦＲ２ならびに共受容体ニューロピリン－１及びニューロピリン－２）１及びＮＲＰ－１、アンジオポエチン２、ＴＳＰ－１及びＴＳＰ－２、アンギオスタチン及び関連分子、エンドスタチン、バソスタチン、カルレティキュリン、血小板第４因子、ＴＩＭＰ及びＣＤＡＩ、Ｍｅｔｈ－１及びＭｅｔｈ－２、ＩＦＮ－α、ＩＦＮ－β及びＩＦＮ－γ、ＣＸＣＬ１０、ＩＬ－４、ＩＬ－１２及びＩＬ－１８、プロトロンビン（クリングルドメイン－２）、アンチトロンビンＩＩＩ断片、プロラクチン、ＶＥＧＩ、ＳＰＡＲＣ、オステオポンチン、マスピン、カンスタチン、プロリフェリン関連タンパク質、レスチンならびに薬物、例えば、ベバシズマブ、イトラコナゾール、カルボキシアミドトリアゾール、ＴＮＰ－４７０、ＣＭ１０１、ＩＦＮ－α、血小板第４因子、スラミン、ＳＵ５４１６、トロンボスポンジン、ＶＥＧＦＲアンタゴニスト、抗血管新生ステロイド＋ヘパリン、軟骨由来血管新生阻

害因子、マトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤、２－メトキシエストラジオール、テコガラン、テトラチオモリブデイト、サリドマイド、トロンボスポンジン、プロラクチンＶβ３阻害剤、リノミド、タスキニモドなどであり、概要については、Ｓｃｈｏｅｎｆｅｌｄ ａｎｄ Ｄｒａｎｏｆｆ ２０１１：Ａｎｔｉ－ａｎｇｉｏｇｅｎｅｓｉｓ ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｙ．Ｈｕｍ Ｖａｃｃｉｎ．（９）：９７６－８１を参照されたい。

【０１０３】

いくつかの態様において、他の抗がん治療剤は、ウイルス系ワクチンである。ウイルス系がんワクチンは、利用可能なものまたは開発中のものが多数存在し、本開示の製剤とともに併用治療アプローチにおいて使用することができる。そのようなウイルスベクターを使用する利点の１つは、免疫応答を開始する固有の能力であり、ウイルス感染の結果として炎症反応が生じ、免疫活性化に必要な危険シグナルが生じることである。理想的なウイルスベクターは、安全であるべきであり、抗ベクター免疫応答を生じさせず、抗腫瘍特異的応答を高めることができるものでなければならない。ワクシニアウイルス、単純ヘルペスウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、レトロウイルス及びアビポックスウイルスなどの組み換えウイルスが動物腫瘍モデルで使用されており、その期待の持てる結果に基づいて、ヒト臨床試験が開始されている。特に重要なウイルス系ワクチンは、ウイルスの外被に由来する特定のタンパク質を含有する小粒子である、ウイルス様粒子（ＶＬＰ）である。ウイルス様粒子は、ウイルスのいかなる遺伝物質も含有しておらず、感染を引き起こすことはないが、その被膜上に腫瘍抗原を提示するように構築することができる。ＶＬＰは、例えば、Ｂ型肝炎ウイルスまたはＰａｒｖｏｖｉｒｉｄａｅ（例えば、アデノ随伴ウイルス）、Ｒｅｔｒｏｖｉｒｉｄａｅ（例えば、ＨＩＶ）、及びＦｌａｖｉｖｉｒｉｄａｅ（例えば、Ｃ型ウイルス）を含む他のウイルスファミリーなどの様々なウイルスに由来し得る。総説については、Ｓｏｒｅｎｓｅｎ ａｎｄ Ｔｈｏｍｐｓｅｎ ２００７：“Ｖｉｒｕｓ－ｂａｓｅｄ ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｙ ｏｆ ｃａｎｃｅｒ：ｗｈａｔ ｄｏ ｗｅ ｋｎｏｗ ａｎｄ ｗｈｅｒｅ ａｒｅ ｗｅ ｇｏｉｎｇ？”ＡＰＭＩＳ １１５（１１）：１１７７－９３を参照されたく、がんに対するウイルス様粒子については、Ｂｕｏｎａｇｕｒｏ ｅｔ ａｌ．２０１１：Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔｓ ｉｎ ｖｉｒｕｓ－ｌｉｋｅ ｐａｒｔｉｃｌｅ－ｂａｓｅｄ ｖａｃｃｉｎｅｓ ｆｏｒ ｉｎｆｅｃｔｉｏｕｓ ｄｉｓｅａｓｅｓ ａｎｄ ｃａｎｃｅｒ．Ｅｘｐｅｒｔ Ｒｅｖ Ｖａｃｃｉｎｅｓ １０（１１）：１５６９－８３；及びＧｕｉｌｌｅｎ ｅｔ ａｌ．２０１０：Ｖｉｒｕｓ－ｌｉｋｅ ｐａｒｔｉｃｌｅｓ ａｓ ｖａｃｃｉｎｅ ａｎｔｉｇｅｎｓ ａｎｄ ａｄｊｕｖａｎｔｓ：ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎ ｔｏ ｃｈｒｏｎｉｃ ｄｉｓｅａｓｅ，ｃａｎｃｅｒ ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｙ ａｎｄ ｉｎｆｅｃｔｉｏｕｓ ｄｉｓｅａｓｅ ｐｒｅｖｅｎｔｉｖｅ ｓｔｒａｔｅｇｉｅｓ．Ｐｒｏｃｅｄｉａ ｉｎ Ｖａｃｃｉｎｏｌｏｇｙ ２（２），１２８－１３３に概説されている。

【０１０４】

いくつかの態様において、他の抗がん治療剤は、ペプチドに基づく標的療法である。ペプチドは、細胞表面受容体または腫瘍を取り囲む罹患した細胞外マトリックスに結合することができる。これらのペプチド（例えば、ＲＧＤ）に結合した放射性核種は、その核種が細胞近傍で崩壊すれば、最終的にがんが死滅する。特に、これらの結合モチーフのオリゴマーまたはマルチマーは、腫瘍特異性及びアビディティの向上につながり得ることから、非常に関心対象が高い。非限定的な例については、Ｙａｍａｄａ ２０１１：Ｐｅｐｔｉｄｅ－ｂａｓｅｄ ｃａｎｃｅｒ ｖａｃｃｉｎｅ ｔｈｅｒａｐｙ ｆｏｒ ｐｒｏｓｔａｔｅ ｃａｎｃｅｒ，ｂｌａｄｄｅｒ ｃａｎｃｅｒ，ａｎｄ ｍａｌｉｇｎａｎｔ ｇｌｉｏｍａ．Ｎｉｈｏｎ Ｒｉｎｓｈｏ ６９（９）：１６５７－６１を参照されたい。

【０１０５】

ＩＩＩ．脂質ナノ粒子

本明細書に記載されるように、本開示のＬＮＰは、ＬＮＰがペイロード（例えば、異種

タンパク質）を細胞（例えば、非肝臓組織内の細胞）に選択的に送達することを可能にするような組織特異的な向性を示す。いくつかの態様において、送達は、ｉｎ　ｖｉｖｏ（例えば、本明細書に記載されるＬＮＰを対象に投与することによって）またはｅｘ　ｖｉｖｏ（例えば、本明細書に記載されるＬＮＰを細胞とｉｎ　ｖｉｔｒｏで培養することによって）で生じ得る。「脂質ナノ粒子」（ＬＮＰ）は、本明細書で使用される場合、連続した脂質二重層を有する、球状小胞などの小胞を指す。脂質ナノ粒子は、薬物療法を標的位置に送達する方法に使用することができる。ＬＮＰの非限定的な例としては、リポソーム、ボラ両親媒性物質、固体脂質ナノ粒子（ＳＬＮ）、ナノ構造脂質担体（ＮＬＣ）、単層膜構造（例えば、アーキアソーム及びミセル）、脂質様ナノ粒子（ＬＬＮ）、ポリマーナノ粒子（ＰＮＰ）、脂質ポリマーハイブリッドナノ粒子（ＬＰＮ）、またはこれらの組み合わせが挙げられる。

【０１０６】

いくつかの態様において、脂質ナノ粒子は、１種以上の脂質を含む。「脂質」は、本明細書で使用される場合、脂肪酸エステルを含むがこれらに限定されない有機化合物群を指し、いくつかの態様において、水に不溶性であるが、多くの有機溶媒に可溶性であることを特徴とする。したがって、別途の記載がない限り、脂質は、天然脂質及び脂質様物質（例えば、リピドイド）を含む。脂質は、通常、（１）油脂及びロウを含む「単純脂質」、（２）リン脂質及び糖脂質を含む「複合脂質」、及び（３）ステロイドなどの「誘導脂質」の少なくとも３つのクラスに分類される。脂質の非限定的な例としては、トリグリセリド（例えば、トリステアリン）、ジグリセリド（例えば、ベヘン酸グリセロール）、モノグリセリド（例えば、モノステアリン酸グリセロール）、脂肪酸（例えば、ステアリン酸）、ステロイド（例えば、コレステロール）、及びロウ（例えば、パルミチン酸セチル）が挙げられる。いくつかの態様において、本開示に有用な脂質には、イオン化脂質、カチオン性脂質、リピドイド、リン脂質、ステロール、またはこれらの組み合わせが含まれる。

【０１０７】

いくつかの態様において、ＬＮＰ中の１種以上の脂質は、イオン化脂質を含む。したがって、いくつかの態様において、本開示に有用なＬＮＰは、（ｉ）イオン化脂質及び（ｉｉ）ペイロードをコードする核酸配列を含むＶＥＥレプリコンを含む。

【０１０８】

イオン化脂質の非限定的な例としては、（（４－ヒドロキシブチル）アザンジイル）ビス（ヘキサン－６，１－ジイル）ビス（２－ヘキシルデカノエート）（ＡＬＣ－０３１５）、ヘプタデカン－９－イル８－（（２－ヒドロキシエチル）（６－オキソ－６－（ウンデシルオキシ）ヘキシル）アミノ）オクタノエート（ＳＭ－１０２）、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（脂質５）、ジ（（Ｚ）－ノナ－２－エン－１－イル）９－（（４－（ジメチルアミノ）ブタノイル）オキシ）ヘプタデカンジオエート（Ｌ３１９）、３－（ジドデシルアミノ）－Ｎ１，Ｎ１，４トリドデシル－１－ピペラジンエタンアミン（ＫＬ１０）、Ｎｌ－［２（ジドデシルアミノ）エチル］－Ｎ１，Ｎ４，Ｎ４－トリドデシル１，４－ピペラジンジエタンアミン（ＫＬ２２）、１４，２５－ジトリデシル－１５，１８，２１，２４－テトラアザ－オクタトリアコンタン（ＫＬ２５）、１，２－ジリノレイルオキシ－Ｎ，Ｎ－ジメチルアミノプロパン（ＤＬｉｎ－ＤＭＡ）、２，２－ジリノレイル－４－ジメチルアミノメチル－［１，３］－ジオキソラン（ＤＬｉｎ－Ｋ－ＤＭＡ）、ヘプタトリアコンタ－６，９，２８，３１－テトラエン－１９－イル－４－（ジメチルアミノ）ブタノエート（ＤＬｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡ）、２，２－ジリノレイル－４－（２ジメチルアミノエチル）－［１，３］－ジオキソラン（ＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡ）、１，２－ジオレイルオキシ－Ｎ，Ｎ－ジメチルアミノプロパン（ＤＯＤＭＡ）、２－（｛８－［（３β）－コレスタ－５－エン－３－イルオキシ］オクチル｝オキシ）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－［（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イルオキシ］プロパン－１－アミン（オクチル－ＣＬｉｎＤＭＡ）、（２Ｒ）－２－（｛８－［（３β）

－コレスター５－エン－３－イルオキシ］オクチル｝オキシ）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－［（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イルオキシ］プロパン－１－アミン（オクチル－ＣＬｉｎＤＭＡ（２Ｒ））、及び（２Ｓ）－２－（｛８－［（３β）－コレスター５－エン－３－イルオキシ］オクチル｝オキシ）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－［（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イルオキシ］プロパン－１－アミン（オクチル－ＣＬｉｎＤＭＡ（２Ｓ））、またはこれらの任意の組み合わせが挙げられる。

【０１０９】

いくつかの態様において、ＬＮＰ中の１種以上の脂質は、カチオン性脂質を含む。いくつかの態様において、本開示に有用なＬＮＰは、（ｉ）カチオン性脂質及び（ｉｉ）ペイロードをコードする核酸配列を含むＶＥＥレプリコンを含む。いくつかの態様において、ＬＮＰ（すなわち、カチオン性脂質及びＶＥＥレプリコンを含む）は、イオン化脂質を更に含む。

【０１１０】

「カチオン性脂質」は、本明細書で使用される場合、生理学的ｐＨなどの選択されたｐＨで正味正電荷を帯びる多数の脂質種のいずれかを指す。カチオン性脂質の非限定的な例としては、ｌ，２－ジオレオイル－３－トリメチルアンモニウム－プロパン（ＤＯＴＡＰ）、リポフェクタミン、Ｎ－［ｌ－（２，３－ジオレオイルオキシ）プロピル］－Ｎ，Ｎ，Ｎ－トリメチルアンモニウムクロリド（ＤＯＴＭＡ）、ｌ－［２－（オレオイルオキシ）エチル］－２－オレイル－３－（２－ヒドロキシエチル）イミダゾリウムクロリド（ＤＯＴＥＶＩ）、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－ｌ－プロパンアミニウムトリフルオロアセテート（ＤＯＳＰＡ）、Ｎ，Ｎ－ジステアリル－Ｎ，Ｎ－ジメチルアンモニウムブロミド（ＤＤＡＢ）、Ｎ－（ｌ，２－ジミリスチルオキシプロパ－３－イル）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－Ｎ－ヒドロキシエチルアンモニウムブロミド（ＤＭＲＩＥ）、Ｎ－（ｌ，２－ジオレオイルオキシプロパ－３－イル）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－Ｎ－ヒドロキシエチルアンモニウムブロミド（ＤＯＲＩＥ）、Ｎ，Ｎ－ジオレイル－Ｎ，Ｎ－ジメチルアンモニウムクロリド（ＤＯＤＡＣ）、ｌ，２－ジラウロイル－ｓｎ－グリセロ－３－エチルホスホコリン（ＤＬｅＰＣ）、ｌ，２－ジステアロイル－３－トリメチルアンモニウム－プロパン（ＤＳＴＡＰ）、ｌ，２－ジパルミトイル－３－トリメチルアンモニウム－プロパン（ＤＰＴＡＰ）、ｌ，２－ジリノレオイル－３－トリメチルアンモニウム－プロパン（ＤＬＴＡＰ）、ｌ，２－ジミリストイル－３－トリメチルアンモニウム－プロパン（ＤＭＴＡＰ）、１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－エチルホスホコリン（ＤＳｅＰＣ）、ｌ，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－エチルホスホコリン（ＤＰｅＰＣ）、１，２－ジミリストイル－ｓｎ－グリセロ－３－エチルホスホコリン（ＤＭｅＰＣ）、１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－エチルホスホコリン（ＤＯｅＰＣ）、ｌ，２－ジ－（９Ｚ－テトラデセノイル）－ｓｎ－グリセロ－３－エチルホスホコリン（１４：１　ＥＰＣ）、ｌ－パルミトイル－２－オレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－エチルホスホコリン（１６：０－１８：１　ＥＰＣ）、またはこれらの任意の組み合わせが挙げられる。追加の例は、本開示全体を通じて提供される。

【０１１１】

いくつかの態様において、ＬＮＰ中の１種以上の脂質は、リピドイドを含む。したがって、いくつかの態様において、本明細書に記載されるＬＮＰは、（ｉ）リピドイド及び（ｉｉ）ペイロードをコードする核酸配列を含むＶＥＥレプリコンを含む。いくつかの態様において、ＬＮＰ（すなわち、リピドイド及びＶＥＥレプリコンを含む）は、イオン化脂質、カチオン性脂質、またはその両方を更に含む。

【０１１２】

本明細書で使用される場合、「リピドイド」という用語は、脂質、例えば、合成カチオン性脂質の１つ以上の特徴を有する分子を指す。いくつかの態様において、リピドイドは、一連の２級及び３級アミンを有し得、これにより、ＬＮＰの正味正電荷が増加する。脂

質様物質及び／またはリピドイドの非限定的な例としては、１，１’－（（２－（４－（２－（（２－（ビス（２－ヒドロキシドデシル）アミノ）エチル）（２－ヒドロキシドデシル）アミノ）エチル）ピペラジン－１－イル）エチル）アザンジイル）ビス（ドデカン－２－オール）（Ｃ１２－２００）、３，６－ビス（４－（ビス（２－ヒドロキシドデシル）アミノ）ブチル）ピペラジン２，５－ジオン（ｃＫＫ－Ｅ１２）、テトラキス（８－メチルノニル）３，３’，３’’，３’’’－（（（メチルアザンジイル）ビス（プロパン－３，１ジイル））ビス（アザントリイル））テトラプロピオネート（３０６Ｏｉ１０）、Ｇ０－Ｃ１４、５Ａ２－ＳＣ８、３，６－ビス（４－（ビス（（９Ｚ，１２Ｚ）－２－ヒドロキシオクタデカ９，１２－ジエン－１－イル）アミノ）ブチル）ピペラジン－２，５－ジオン（ＯＦ－０２）、（（（３，６－ジオキソピペラジン－２，５－ジイル）ビス（ブタン－４，１－ジイル））ビス（アザントリイル））テトラキス（エタン２，１－ジイル）（９Ｚ，９’Ｚ，９’’Ｚ，９’’’Ｚ，１２Ｚ，１２’Ｚ，１２’’Ｚ，１２’’’Ｚ）－テトラス（オクタデカ－９，１２－ジエノエート）（ＯＦ－Ｄｅｇ－Ｌｉｎ）、（（（３，６－ジオキソピペラジン－２，５－ジイル）ビス（ブタン－４，１－ジイル））ビス（アザントリイル））テトラキス（ブタン－４，１－ジイル）（９Ｚ，９’Ｚ，９’’Ｚ，９’’’Ｚ，１２Ｚ，１２’Ｚ，１２’’Ｚ，１２’’’Ｚ）－テトラキス（オクタデカ－９，１２－ジエノエート）（ＯＦ－Ｃ４－Ｄｅｇ－Ｌｉｎ）、Ｎ１，Ｎ３，Ｎ５－トリス（３－（ジドデシルアミノ）プロピル）ベンゼン１，３，５－トリカルボキサミド（ＴＴ３）、ヘキサ（オクタン－３－イル）９，９’，９’’，９’’’，９’’’’，９’’’’’，９’’’’’’－（（（ベンゼン－５－トリカルボニル）リス（アザンジイル））トリス（プロパン－３，１－ジイル））トリス（アザントリイル））ヘキサノナノエート（ＦＴＴ５）、ＰＬ－１［Ｎａｔｕｒｅ Ｃｏｍｍｕｎｉｃａｔｉｏｎｓ，１２－７２６４（２０２１）に開示されており、参照により本明細書に援用される］、９８Ｎ１２－５［Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｔｈｅｒａｐｙ ｖｏｌ．１７ ｎｏ．５ Ｍａｙ ２００９に開示されており、参照により本明細書に援用される］、エチル５，５－ジ（（Ｚ）－ヘプタデカ－８－エン－１－イル）－１－（３－（ピロリジン－１－イル）プロピル）－２，５－ジヒドロ－１Ｈ－イミダゾール－２－カルボキシレート（Ａ２－Ｉｓｏ５－２ＤＣ１８（Ａ２））及びＡ１２－Ｉｓｏ５－２ＤＣ１８（Ａ１２）、またはこれらの任意の組み合わせが挙げられる。

【０１１３】

いくつかの態様において、脂質は、ステロールを含む。いくつかの態様において、本開示に有用なＬＮＰは、（ｉ）ステロール及び（ｉｉ）ペイロードをコードする核酸配列を含むＶＥＥレプリコンを含む。いくつかの態様において、ＬＮＰ（すなわち、ステロール及びＶＥＥレプリコンを含む）は、イオン化脂質、カチオン性脂質、リピドイド、またはこれらの任意の組み合わせを更に含む。

【０１１４】

本明細書で使用される場合、「ステロール」は、脂質膜のパッキングの隙間を埋め、構造的完全性を提供するために使用され得る、コレステロールまたはコレステロール類似体を指す。ステロールの非限定的な例としては、コレステロール、フェコステロール、シトステロール、エルゴステロール、カンペステロール、スチグマステロール、ブラシカステロール、トマチジン、トマチン、ウルソル酸、アルファ－トコフェロール、及びこれらの組み合わせが挙げられる。いくつかの態様において、ステロールは、コレステロールである。

【０１１５】

いくつかの態様において、脂質は、リン脂質を含む。いくつかの態様において、本開示に有用なＬＮＰは、（ｉ）リン脂質及び（ｉｉ）ペイロードをコードする核酸配列を含むＶＥＥレプリコンを含む。いくつかの態様において、ＬＮＰ（すなわち、リン脂質及びＶＥＥレプリコンを含む）は、イオン化脂質、カチオン性脂質、リピドイド、ステロール、またはこれらの任意の組み合わせを更に含む。

【０１１６】

リン脂質の非限定的な例としては、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－グリセロール－ホスホコリン（ＤＭＰＣ）、１，２－ジオレオイル－ｓｎグリセロール－３－ホスホコリン（ＤＯＰＣ）、１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＰＰＣ）、１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＳＰＣ）、１，２－ジウンデカノイル－ｓｎ－グリセロ－ホスホコリン（ＤＵＰＣ）、１－パルミトイル－２－オレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＰＯＰＣ）、１，２－ジ－Ｏ－オクタデセニル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（１８：０ジエーテルＰＣ）、１－オレオイル－２－コレステリルヘミスクシノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＯＣｈｅｍｓＰＣ）、１－ヘキサデシル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（Ｃ１６　Ｌｙｓｏ　ＰＣ）、１，２－ジリノレノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン、１，２－ジアラキドノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン、１，２－ジドコサヘキサエノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン、１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＯＰＥ）、１，２－ジフィタノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＭＥ　１６．０　ＰＥ）、１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン、１，２－ジリノレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン、１，２－ジリノレノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン、１，２－ジアラキドノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン、１，２－ジドコサヘキサエノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン、１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホ－ｒａｃ－（１－グリセロール）ナトリウム塩（ＤＯＰＧ）、スフィンゴミエリン、及び任意のこれらの組み合わせが挙げられる。いくつかの態様において、リン脂質は、１－ミリストイル－２－パルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（１４：０－１６：０　ＰＣ、ＭＰＰＣ）、１－ミリストイル－２ステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（１４：０－１８：０　ＰＣ、ＭＳＰＣ）、１－パルミトイル２－アセチル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（１６：０－０２：０　ＰＣ）、１－パルミトイル－２－ミリストイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（１６：０－１４：０　ＰＣ、ＰＭＰＣ）、１－パルミトイル－２－ステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（１６：０－１８：０　ＰＣ、ＰＳＰＣ）、１－パルミトイル－２－オレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（１６：０－１８：１　ＰＣ、ＰＯＰＣ）、１－パルミトイル－２－リノレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（１６：０－１８：２　ＰＣ、ＰＬＰＣ）、１－パルミトイル－２－アラキドノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（１６：０－２０：４　ＰＣ）、１－パルミトイル－２－ドコサヘキサエノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（１４：０－２２：６　ＰＣ）、１－ステアロイル－２－ミリストイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（１８：０－１４：０　ＰＣ、ＳＭＰＣ）、１－ステアロイル－２－パルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（１８：０－１６：０　ＰＣ、ＳＰＰＣ）、１－ステアロイル－２－オレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（１８：０－１８：１　ＰＣ、ＳＯＰＣ）、１－ステアロイル－２－リノレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（１８：０－１８：２　ＰＣ）、１－ステアロイル－２－アラキドノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（１８：０－２０：４　ＰＣ）、１－ステアロイル－２－ドコサヘキサエノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（１８：０－２２：６　ＰＣ）、１－オレオイル－２－ミリストイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（１８：１－１４：０　ＰＣ、ＯＭＰＣ）、１－オレオイル－２－パルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（１８：１－１６：０　ＰＣ、ＯＰＰＣ）、１－オレオイル－２－ステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（１８：１－１８：０　ＰＣ、ＯＳＰＣ）、１－パルミトイル－２－オレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（１６：０－１８：１　ＰＥ、ＰＯＰＥ）、１－パルミトイル－２－リノレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（１６：０－１８：２　ＰＥ）、１－パルミトイル－２－アラキドノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（１６：０－２０：４　ＰＥ）、１－パルミトイル－２－ドコサヘキサエノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（１６：０－２２：６　ＰＥ）、１－ステアロイル－２－オレオイル－ｓ

ｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（１８：０－１８：１　ＰＥ）、１－ステアロイル－２－リノレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（１８：０－１８：２　ＰＥ）、１－ステアロイル－２－アラキドノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（１８：０－２０：４　ＰＥ）、１－ステアロイル－２－ドコサヘキサエノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（１８：０－２２：６　ＰＥ）、１－オレオイル－２－コレステリルヘミスクシノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＯＣｈｅｍｓＰＣ）、及びこれらの任意の組み合わせからなる群から選択される。

【０１１７】

したがって、いくつかの態様において、本開示に有用なＬＮＰは、（ｉ）１つ以上の天然脂質（例えば、天然カチオン性脂質）及び（ｉｉ）ペイロードをコードする核酸配列を含むＶＥＥレプリコンを含む。いくつかの態様において、本開示に有用なＬＮＰは、（ｉ）１つ以上の合成脂質（例えば、リピドイド）及び（ｉｉ）ペイロードをコードする核酸配列を含むＶＥＥレプリコンを含む。いくつかの態様において、本開示に使用されるＬＮＰは、（ｉ）天然脂質（例えば、カチオン性脂質）と合成脂質（例えば、リピドイド）の両方、及び（ｉｉ）ペイロードをコードする核酸配列を含むＶＥＥレプリコンを含む。

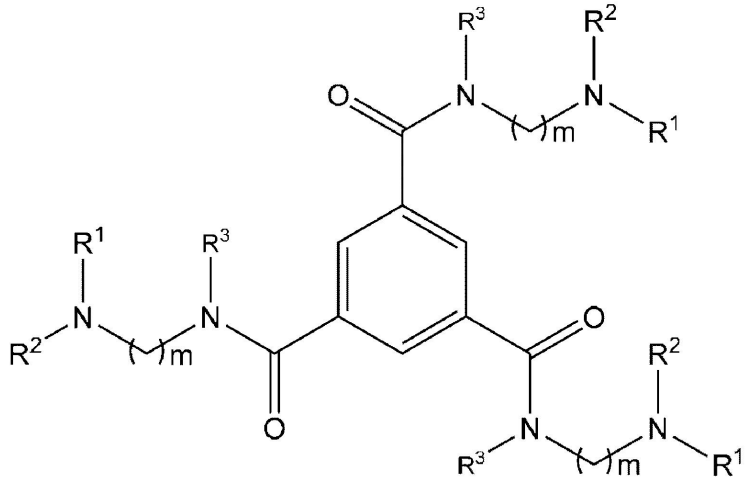
【０１１８】

本開示のＬＮＰと使用することができる脂質の例としては、Ｎ１，Ｎ３，Ｎ５－トリス（３－（ジドデシルアミノ）プロピル）ベンゼン－１，３，５－トリカルボキサミド（ＴＴ３）、Ｎ－（２，３－ジオレオイルオキシ）プロピル）－Ｎ，Ｎ，Ｎ－トリメチルアンモニウムクロリド（ＤＯＴＡＰ）；リポフェクタミン；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－ジリノレニルオキシ－Ｎ，Ｎ－ジメチルアミノプロパン（ＤＬｅｎＤＭＡ）；ジオクタデシルジメチルアンモニウム（ＤＯＤＭＡ）、ジステアリルジメチルアンモニウム（ＤＳＤＭＡ）、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－（２，３－ジオレイルオキシ）プロピル）－Ｎ，Ｎ，Ｎ－トリメチルアンモニウムクロリド（ＤＯＴＭＡ）；Ｎ－Ｎ－ジステアリル－Ｎ，Ｎ－ジメチルアンモニウムブロミド（ＤＤＡＢ）；３－（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）及びＮ－（１，２－ジミリスチルオキシプロパ－３－イル）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－Ｎ－ヒドロキシエチルアンモニウムブロミド（ＤＭＲＩＥ）が挙げられるが、これらに限定されない。

【０１１９】

いくつかの態様において、脂質は、式Ｉ：

【化１】



（式Ｉ）

及びその塩によって表され、式中、各Ｒ１は、独立して、非置換アルキルであり、各Ｒ^{2}は、独立して、非置換アルキルであり、各Ｒ^{3}は、独立して、水素または置換もしくは非置換アルキルであり、各ｍは、独立して、３、４、５、６、７、または８である。いくつかの態様において、各Ｒ^{1}は、独立して、非置換アルキルであり、各Ｒ^{2}は、独立して、非置換アルキルであり、Ｒ^{3}は、水素であり、各ｍは、３である。いくつかの態様において、少なくとも１つのＲ^{1}は、非置換Ｃ$_{1-24}$アルキルである。いくつかの態様において、少なくとも１つのＲ^{1}は、非置換Ｃ$_{1-18}$アルキルである。いくつかの態様において、少なくとも１つのＲ^{1}は、非置換Ｃ$_{1-12}$アルキルである。いくつかの態様において、少なくとも１つのＲ^{1}は、非置換Ｃ$_{6-18}$アルキルである。いくつかの態様において、少なくとも１つのＲ^{1}は、非置換Ｃ$_{6-12}$アルキルである。いくつかの態様において、少なくとも１つのＲ^{1}は、非置換Ｃ$_{8-12}$アルキルである。いくつかの態様において、少なくとも１つのＲ^{1}は、非置換Ｃ$_{10-12}$アルキルである。いくつかの態様において、少なくとも１つのＲ^{1}は、非置換Ｃ$_{11}$アルキルである。

【０１２０】

いくつかの態様において、少なくとも１つのＲ^{2}は、非置換Ｃ$_{1-24}$アルキルである。いくつかの態様において、少なくとも１つのＲ^{2}は、非置換Ｃ$_{1-18}$アルキルである。いくつかの態様において、少なくとも１つのＲ^{2}は、非置換Ｃ$_{1-12}$アルキルである。いくつかの態様において、少なくとも１つのＲ^{2}は、非置換Ｃ$_{6-18}$アルキルである。いくつかの態様において、少なくとも１つのＲ^{2}は、非置換Ｃ$_{6-12}$アルキルである。いくつかの態様において、少なくとも１つのＲ^{2}は、非置換Ｃ$_{8-12}$アルキルである。いくつかの態様において、少なくとも１つのＲ^{2}は、非置換Ｃ$_{10-12}$アルキルである。いくつかの態様において、少なくとも１つのＲ^{2}は、非置換Ｃ$_{11}$アルキルである。

【０１２１】

いくつかの態様において、少なくとも２つのＲ^{1}は、非置換Ｃ$_{1-24}$アルキルである。いくつかの態様において、少なくとも２つのＲ^{1}は、非置換Ｃ$_{1-18}$アルキルである。いくつかの態様において、少なくとも２つのＲ^{1}は、非置換Ｃ$_{1-12}$アルキルである。いくつかの態様において、少なくとも２つのＲ^{1}は、非置換Ｃ$_{6-18}$アルキルである。いくつかの態様において、少なくとも２つのＲ^{1}は、非置換Ｃ$_{6-12}$アルキルである。いくつかの態様において、少なくとも２つのＲ^{1}は、非置換Ｃ$_{8-12}$アルキルである。いくつかの態様において、少なくとも２つのＲ^{1}は、非置換Ｃ$_{10-12}$アルキルであ

る。いくつかの態様において、少なくとも２つのR^1は、非置換C_{11}アルキルである。
【０１２２】
いくつかの態様において、少なくとも２つのR^2は、非置換C_{1-24}アルキルである。いくつかの態様において、少なくとも２つのR^2は、非置換C_{1-18}アルキルである。いくつかの態様において、少なくとも２つのR^2は、非置換C_{1-12}アルキルである。いくつかの態様において、少なくとも２つのR^2は、非置換C_{6-18}アルキルである。いくつかの態様において、少なくとも２つのR^2は、非置換C_{6-12}アルキルである。いくつかの態様において、少なくとも２つのR^2は、非置換C_{8-12}アルキルである。いくつかの態様において、少なくとも２つのR^2は、非置換C_{10-12}アルキルである。いくつかの態様において、少なくとも２つのR^2は、非置換C_{11}アルキルである。
【０１２３】
いくつかの態様において、R^1は、全ての場合で、非置換C_{1-24}アルキルである。いくつかの態様において、R^1は、全ての場合で、非置換C_{1-18}アルキルである。いくつかの態様において、R^1は、全ての場合で、非置換C_{1-12}アルキルである。いくつかの態様において、R^1は、全ての場合で、非置換C_{6-18}アルキルである。いくつかの態様において、R^1は、全ての場合で、非置換C_{6-12}アルキルである。いくつかの態様において、R^1は、全ての場合で、非置換C_{8-12}アルキルである。いくつかの態様において、R^1は、全ての場合で、非置換C_{10-12}アルキルである。いくつかの態様において、R^1は、全ての場合で、非置換C_{11}アルキルである。
【０１２４】
いくつかの態様において、R^2は、全ての場合で、非置換C_{1-24}アルキルである。いくつかの態様において、R^2は、全ての場合で、非置換C_{1-18}アルキルである。いくつかの態様において、R^2は、全ての場合で、非置換C_{1-12}アルキルである。いくつかの態様において、R^2は、全ての場合で、非置換C_{6-18}アルキルである。いくつかの態様において、R^2は、全ての場合で、非置換C_{6-12}アルキルである。いくつかの態様において、R^2は、全ての場合で、非置換C_{8-12}アルキルである。いくつかの態様において、R^2は、全ての場合で、非置換C_{10-12}アルキルである。いくつかの態様において、R^2は、全ての場合で、非置換C_{11}アルキルである。
【０１２５】
いくつかの態様において、少なくとも１つのR^3は、水素である。いくつかの態様において、少なくとも１つのR^3は、置換または非置換アルキルである。いくつかの態様において、少なくとも１つのR^3は、置換または非置換C_{1-18}アルキルである。いくつかの態様において、少なくとも１つのR^3は、置換または非置換C_{1-12}アルキルである。いくつかの態様において、少なくとも１つのR^3は、置換または非置換C_{1-6}アルキルである。いくつかの態様において、少なくとも１つのR^3は、置換または非置換C_{1-4}アルキルである。いくつかの態様において、少なくとも１つのR^3は、置換または非置換C_{2-4}アルキルである。いくつかの態様において、少なくとも１つのR^3は、置換または非置換メチルである。
【０１２６】
いくつかの態様において、少なくとも１つのR^3は、置換アルキルであり、ここで、置換アルキルは、ハロゲンで置換される。いくつかの態様において、少なくとも１つのR^3は、置換アルキルであり、ここで、置換アルキルは、フッ素で置換される。いくつかの態様において、少なくとも１つのR^3は、置換アルキルであり、ここで、置換アルキルは、ハロゲン化アルキルで置換される。
【０１２７】
いくつかの態様において、少なくとも２つのR^3は、水素である。いくつかの態様において、少なくとも２つのR^3は、置換または非置換アルキルである。いくつかの態様において、少なくとも２つのR^3は、置換または非置換C_{1-18}アルキルである。いくつかの態様において、少なくとも２つのR^3は、置換または非置換C_{1-12}アルキルである。いくつかの態様において、少なくとも２つのR^3は、置換または非置換C_{1-6}アルキ

ルである。いくつかの態様において、少なくとも２つのR^3は、置換または非置換C_{1-4}アルキルである。いくつかの態様において、少なくとも２つのR^3は、置換または非置換C_{2-4}アルキルである。いくつかの態様において、少なくとも２つのR^3は、置換または非置換メチルである。

【０１２８】

いくつかの態様において、少なくとも２つのＲ３は、置換アルキルであり、ここで、置換アルキルは、ハロゲンで置換される。いくつかの態様において、少なくとも２つのＲ３は、置換アルキルであり、ここで、置換アルキルは、フッ素で置換される。いくつかの態様において、少なくとも２つのＲ３は、置換アルキルであり、ここで、置換アルキルは、ハロゲン化アルキルで置換される。

【０１２９】

いくつかの態様において、R^3は、全ての場合で、水素である。いくつかの態様において、R^3は、全ての場合で、置換または非置換アルキルである。いくつかの態様において、R^3は、全ての場合で、置換または非置換C_{1-18}アルキルである。いくつかの態様において、R^3は、全ての場合で、置換または非置換C_{1-12}アルキルである。いくつかの態様において、R^3は、全ての場合で、置換または非置換C_{1-6}アルキルである。いくつかの態様において、R^3は、全ての場合で、置換または非置換C_{1-4}アルキルである。いくつかの態様において、R^3は、全ての場合で、置換または非置換C_{2-4}アルキルである。いくつかの態様において、R^3は、全ての場合で、置換または非置換メチルである。

【０１３０】

いくつかの態様において、R^3は、全ての場合で、置換アルキルであり、ここで、置換アルキルは、ハロゲンで置換される。いくつかの態様において、R^3は、全ての場合で、置換アルキルであり、ここで、置換アルキルは、フッ素で置換される。いくつかの態様において、R^3は、全ての場合で、置換アルキルであり、ここで、置換アルキルは、ハロゲン化アルキルで置換される。

【０１３１】

いくつかの態様において、少なくとも１つのｍは、３である。いくつかの態様において、少なくとも１つのｍは、４である。いくつかの態様において、少なくとも１つのｍは、５である。いくつかの態様において、少なくとも１つのｍは、６である。いくつかの態様において、少なくとも１つのｍは、７である。いくつかの態様において、少なくとも１つのｍは、８である。いくつかの態様において、少なくとも２つのｍは、３である。いくつかの態様において、少なくとも２つのｍは、４である。いくつかの態様において、少なくとも２つのｍは、５である。いくつかの態様において、少なくとも２つのｍは、６である。いくつかの態様において、少なくとも２つのｍは、７である。いくつかの態様において、少なくとも２つのｍは、８である。

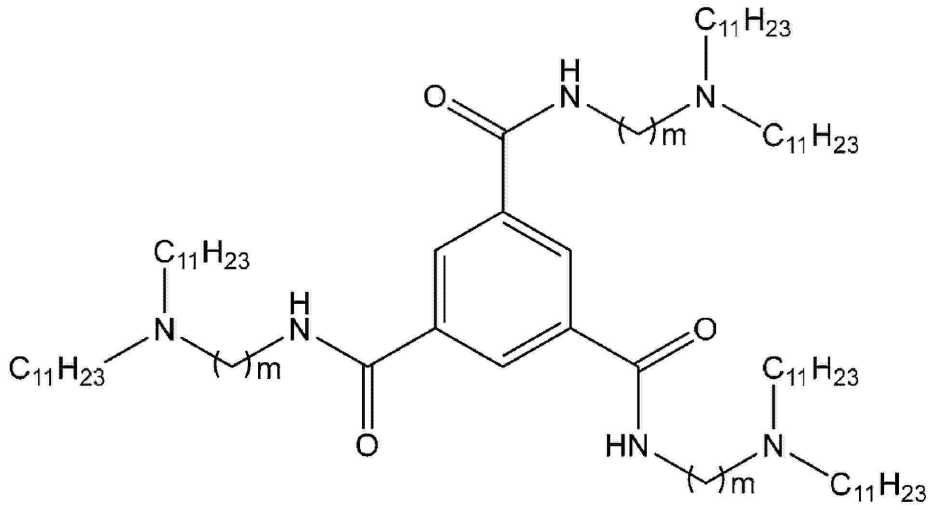
【０１３２】

いくつかの態様において、ｍは、全ての場合で、３である。いくつかの態様において、ｍは、全ての場合で、４である。いくつかの態様において、ｍは、全ての場合で、５である。いくつかの態様において、ｍは、全ての場合で、６である。いくつかの態様において、ｍは、全ての場合で、７である。いくつかの態様において、ｍは、全ての場合で、８である。

【０１３３】

本開示のいくつかの態様において、脂質は、以下によって表されるＴＴ３であり、

【化２】



【０１３４】
式中、ｍは、全ての場合で、３である。式Ｉ及びＴＴ３の組成、合成、及び使用は、ＷＯ２０１６１８７５３１Ａ１に記載されており、その全体が参照により本明細書に援用される。

【０１３５】
したがって、いくつかの態様において、本明細書に記載されるＬＮＰは、（ｉ）ＴＴ３及び（ｉｉ）ペイロードをコードする核酸配列を含むＶＥＥレプリコンを含む。本明細書で使用される「ＴＴ３」は、様々な生物学的活性剤（例えば、本明細書に記載されるペイロード）を細胞に送達するための脂質ナノ粒子を形成することが可能である。加えて、本開示はまた、未封入のＴＴ３－ＬＮＰが、ｉｎ ｖｉｖｏ及びｉｎ ｖｉｔｒｏで、がん細胞の免疫原性細胞死（ＩＣＤ）を誘導することができることを示す。免疫原性細胞死は、本明細書に記載される場合、樹状細胞（ＤＣ）の活性化と、その結果として生じる特異的Ｔ細胞応答の活性化を通じて、効果的な免疫応答を誘導することができる細胞死の形態を指す。いくつかの態様において、免疫原性細胞死を受ける細胞は、腫瘍細胞である。

【０１３６】
いくつかの態様において、脂質は、ＤＯＴＡＰである。したがって、いくつかの態様において、本開示のＬＮＰは、（ｉ）ＤＯＴＡＰ及び（ｉｉ）ペイロードをコードする核酸配列を含むＶＥＥレプリコンを含む。本明細書で使用される「ＤＯＴＡＰ」もまた、脂質ナノ粒子を形成することが可能である。ＤＯＴＡＰは、酵母人工染色体（ＹＡＣ）を含むＤＮＡを真核細胞に高効率でトランスフェクションし、一過性または安定した遺伝子発現をもたらすために使用することができ、負電荷を帯びた他の分子、例えば、ＲＮＡ、オリゴヌクレオチド、ヌクレオチド、リボ核タンパク質（ＲＮＰ）複合体、及びタンパク質を哺乳動物細胞の研究サンプルに効率的に導入するのにも好適である。

【０１３７】
本開示のいくつかの態様において、脂質は、リポフェクタミンである。いくつかの態様において、本明細書に記載されるＬＮＰは、（ｉ）リポフェクタミン及び（ｉｉ）ペイロードをコードする核酸配列を含むＶＥＥレプリコンを含む。本明細書で使用される「リポフェクタミン」は、分子生物学及び細胞生物学で使用されており、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎによって製造及び販売されている、一般的なトランスフェクション試薬である。リポフェクタミンは、リポフェクションによるｉｎ ｖｉｔｒｏ細胞培養物へのＲＮＡ（ｍＲＮＡ及びｓｉＲＮＡを含む）またはプラスミドＤＮＡのトランスフェクション効率を増加させるために使用される。リポフェクタミンは、脂質サブユニットを含有し、水性環境でリポソームまたは脂質ナノ粒子を形成し、トランスフェクションペイロードを封入することが

できる。中性の共脂質がリポソームと細胞膜の融合を媒介することで、ＲＮＡ含有リポソーム（その表面は正に帯電している）は、負に帯電した生細胞の形質膜と融合することができ、それにより、核酸カーゴ分子が細胞質に移行し、複製または発現される。

【０１３８】

いくつかの態様において、本明細書に記載されるＬＮＰは、１種類の脂質を含む（例えば、全てリピドイド、例えば、全てＴＴ３）。いくつかの態様において、本開示のＬＮＰは、複数種の脂質を含む。例えば、いくつかの態様において、ＬＮＰは、リピドイド（例えば、ＴＴ３）を他の脂質成分とともに含む。これらには、典型的に、限定するものではないが、ホファチジルコリン（ＰＣ）（例えば、１，ｓ－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホホコリン（ＤＳＰＣ）、及び１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホホエタノールアミン（ＤＯＰＥ）、ステロール（例えば、コレステロール）、及びポリエチレングリコール（ＰＥＧ）脂質コンジュゲート（例えば、１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン－Ｎ－［葉酸（ポリエチレングリコール）－２０００（ＤＳＰＥ－ＰＥＧ２０００）及び１，２－ジミリストイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン－Ｎ－［メトキシ（ポリエチレングリコール）－２０００（Ｃ１４－ＰＥＧ２０００））に属する他の脂質分子が含まれる。表１は、例示的なＬＮＰであるＴＴ３－ＬＮＰ及びＤＯＴＡＰ－ＬＮＰの配合を示す。

【表１】

表１.

DOTAP-LNP モル比	DOTAP 40	DSPC 10	コレステロール 48	DSPE-PEG2000 2
TT3-LNP モル比	TT3 20	DOPE 30	コレステロール 40	C14-PEG2000 0.75

【０１３９】

いくつかの態様において、ＬＮＰは、Ｃ１４－ＰＥＧ２０００を含む。したがって、いくつかの態様において、本開示に有用なＬＮＰは、（ｉ）Ｃ１４－ＰＥＧ２０００及び（ｉｉ）ペイロードをコードする核酸配列を含むＶＥＥレプリコンを含む。いくつかの態様において、Ｃ１４－ＰＥＧ２０００は、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）、１，２－ジミリストイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン－Ｎ－［メトキシ（ポリエチレングリコール）－２０００］（ＤＭＰＥ－ＰＥＧ２０００）、またはその両方を含む。いくつかの態様において、Ｃ１４－ＰＥＧ２０００（または本明細書で開示される他の脂質成分）は、ＶＥＥレプリコンの内包前に、ＬＮＰに埋め込むことができる。いくつかの態様において、Ｃ１４－ＰＥＧ２０００（または本明細書で開示される他の脂質成分）は、ＶＥＥレプリコンの内包後に、ＬＮＰに付加することができる。例えば、いくつかの態様において、ＶＥＥレプリコンをＬＮＰで内包し、次いで、例えば、ミセルを使用して、Ｃ１４－ＰＥＧ２０００（または本明細書で開示される他の脂質成分）をＬＮＰに結合させる。

【０１４０】

いくつかの態様において、本開示に有用なＬＮＰは、ポリマー材料を含む。したがって、いくつかの態様において、本明細書で提供されるＬＮＰは、（ｉ）ポリマー材料及び（ｉｉ）ペイロードをコードする核酸配列を含むＶＥＥレプリコンを含む。いくつかの態様において、ＬＮＰは、（ｉ）１種以上の脂質、（ｉｉ）ポリマー材料、及び（ｉｉｉ）ペイロードをコードする核酸配列を含むＶＥＥレプリコンを含む。いくつかの態様において

、１種以上の脂質は、イオン化脂質、カチオン性脂質、リピドイド、リン脂質、ステロール、またはこれらの組み合わせを含む。

【０１４１】

いくつかの態様において、ポリマー材料は、本明細書に記載されるものなどのカチオン性ポリマーまたは非カチオン性ポリマーを含む。ポリマー材料の非限定的な例は、Ｊｉａｎｇ ｅｔ ａｌ．Ｒｅｆｅｒｅｎｃｅ Ｍｏｄｕｌｅ ｉｎ Ｍａｔｅｒｉａｌｓ Ｓｃｉｅｎｃｅ ａｎｄ Ｍａｔｅｒｉａｌｓ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ．（２０２１）及びＢｙｕｎ ｅｔ ａｌ．ＢｉｏＣｈｉｐ Ｊ（２０２２）に開示されており、参照により本明細書に援用される。ポリマー材料の非限定的な例としては、ポリエチレンイミン（ＰＥＩ）、ポリ（アミドアミン）（ＰＡＭＡＭ）、ポリ（β－アミノエステル）（ＰＢＡＥ）、ポリ（２－Ｎ，Ｎ－ジメチルアミノエチルメタクリレート）（ＰＤＭＡＥＭＡ）、ポリ（アミノ酸）（ＰＡＡ）、キトサンデキストラン（Ｒａｅｍｄｏｎｃｋ ｅｔ ａｌ．，２００９）、シクロデキストリン（Ｓｉｎｇｈ ｅｔ ａｌ．，２０１９）、セルロース（Ｋｉｍ ｅｔ ａｌ．，２０２０）、ヒアルロン酸、ポリ乳酸（ＰＬＡ）、ポリ（乳酸－ｃｏ－グリコール酸）（ＰＬＧＡ）、及びポリカプロラクトン（ＰＣＬ）が挙げられる。

【０１４２】

少なくとも上の開示から明らかなように、いくつかの態様において、本開示に有用なＬＮＰは、ペイロードをコードする核酸配列を含むＶＥＥレプリコン、ならびに次の構成成分のうちの１つ以上：（ｉ）イオン化脂質、（ｉｉ）カチオン性脂質、（ｉｉｉ）脂質様物質（例えば、リピドイド）、（ｉｖ）リン脂質、（ｖ）ステロール、（ｖｉ）ペグ化脂質、及び（ｖｉｉ）ポリマー材料を含む。いくつかの態様において、本明細書に記載されるＬＮＰは、ペイロードをコードする核酸配列を含むＶＥＥレプリコン、ならびに次のうちの１つ以上：（ｉ）イオン化脂質、（ｉｉ）カチオン性脂質、（ｉｉｉ）リン脂質、（ｉｖ）ステロール、及び（ｖ）ペグ化脂質を含む。いくつかの態様において、本明細書に記載されるＬＮＰは、ペイロードをコードする核酸配列を含むＶＥＥレプリコン、ならびに次のうちの１つ以上：（ｉ）脂質様物質（例えば、リピドイド）、（ｉｉ）リン脂質、（ｉｉｉ）ステロール、及び（ｉｖ）ペグ化脂質を含む。いくつかの態様において、本明細書に記載されるＬＮＰは、ペイロードをコードする核酸配列を含むＶＥＥレプリコン、ならびに次のうちの１つ以上：（ｉ）ポリマー材料、（ｉｉ）リン脂質、（ｉｉｉ）ステロール、及び（ｉｖ）ペグ化脂質を含む。いくつかの態様において、本明細書に記載されるＬＮＰは、ペイロードをコードする核酸配列を含むＶＥＥレプリコン、ならびに次のうちの１つ以上：（ｉ）ポリマー材料、（ｉｉ）脂質、（ｉｉｉ）リン脂質、（ｉｖ）ステロール、及び（ｖ）ペグ化脂質を含む。

【０１４３】

脂質ナノ粒子の粒径は、薬物放出速度、生体内分布、粘膜付着、水の細胞内取り込み及びナノ粒子内部へのバッファー交換、ならびにタンパク質の拡散に影響を与え得る。本開示のいくつかの態様において、ＬＮＰの直径は、約３０～約５００ｎｍの範囲である。本開示のいくつかの態様において、ＬＮＰの直径は、約３０～約５００ｎｍ、約５０～約４００ｎｍ、約７０～約３００ｎｍ、約１００～約２００ｎｍ、約１００～約１７５ｎｍ、または約１００～約１６０ｎｍの範囲である。本開示のいくつかの態様において、ＬＮＰの直径は、１００～１６０ｎｍの範囲である。本開示のいくつかの態様において、ＬＮＰの直径は、約３０ｎｍ、約４０ｎｍ、約５０ｎｍ、約６０ｎｍ、約７０ｎｍ、約８０ｎｍ、約９０ｎｍ、約１００ｎｍ、約１０１ｎｍ、約１０２ｎｍ、約１０３ｎｍ、約１０４ｎｍ、約１０５ｎｍ、約１０６ｎｍ、約１０７ｎｍ、約１０８ｎｍ、約１０９ｎｍ、約１１０ｎｍ、約１１１ｎｍ、約１１２ｎｍ、約１１３ｎｍ、約１１４ｎｍ、約１１５ｎｍ、約１１６ｎｍ、約１１７ｎｍ、約１１８ｎｍ、約１１９ｎｍ、約１２０ｎｍ、約１３０ｎｍ、約１４０ｎｍ、約１５０ｎｍ、または約１６０ｎｍであり得る。いくつかの態様において、脂質ナノ粒子は、約１４０ｎｍの直径を有する。

【０１４４】

ゼータ電位は、脂質ナノ粒子表面の有効電荷の尺度である。ゼータ電位の大きさは、粒子の安定性に関する情報を提供する。いくつかの態様において、本明細書に記載されるナノ粒子のゼータ電位は、約－２０～約２０ｍｖの範囲である。本開示のいくつかの態様において、ＬＮＰのゼータ電位は、約３～約６ｍｖの範囲である。本開示のいくつかの態様において、ＬＮＰのゼータ電位は、約３ｍｖ、約３．１ｍｖ、約３．２ｍｖ、約３．３ｍｖ、約３．４ｍｖ、約３．５ｍｖ、約３．６ｍｖ、約３．７ｍｖ、約３．８ｍｖ、約３．９ｍｖ、約４ｍｖ、約４．１ｍｖ、約４．２ｍｖ、約４．３ｍｖ、約４．４ｍｖ、約４．５ｍｖ、約４．６ｍｖ、約４．７ｍｖ、約４．８ｍｖ、約４．９ｍｖ、約５ｍｖ、約５．１ｍｖ、約５．２ｍｖ、約５．３ｍｖ、約５．４ｍｖ、約５．５ｍｖ、約５．６ｍｖ、約５．７ｍｖ、約５．８ｍｖ、約５．９ｍｖ、または約６ｍｖであり得る。いくつかの態様において、本明細書に記載されるナノ粒子のゼータ電位は、約－６．０ｍｖ、約－５．９ｍｖ、約－５．８ｍｖ、約－５．７ｍｖ、約－５．６ｍｖ、約－５．５ｍｖ、約－５．４ｍｖ、約－５．３ｍｖ、約－５．２ｍｖ、約－５．１ｍｖ、約－５．０ｍｖ、約－４．９ｍｖ、約－４．８ｍｖ、約－４．７ｍｖ、約－４．６ｍｖ、約－４．５ｍｖ、約－４．４ｍｖ、約－４．３ｍｖ、約－４．２ｍｖ、約－４．１ｍｖ、約－４．０ｍｖ、約－３．９ｍｖ、約－３．８ｍｖ、約－３．７ｍｖ、約－３．６ｍｖ、約－３．５ｍｖ、約－３．４ｍｖ、約－３．３ｍｖ、約－３．２ｍｖ、約－３．１ｍｖ、約－３．０ｍｖ、約－２．９ｍｖ、約－２．８ｍｖ、約－２．７ｍｖ、約－２．６ｍｖ、約－２．５ｍｖ、約－２．４ｍｖ、約－２．３ｍｖ、約－２．２ｍｖ、約－２．１ｍｖ、約－２．０ｍｖ、約－１．９ｍｖ、約－１．８ｍｖ、約－１．７ｍｖ、約－１．６ｍｖ、約－１．５ｍｖ、約－１．４ｍｖ、約－１．３ｍｖ、約－１．２ｍｖ、約－１．１ｍｖ、約－１．０ｍｖ、約－０．９ｍｖ、約－０．８ｍｖ、約－０．７ｍｖ、約－０．６ｍｖ、約－０．５ｍｖ、約－０．４ｍｖ、約－０．３ｍｖ、約－０．２ｍｖ、約－０．１ｍｖ、約０．０ｍｖ、０．１約ｍｖ、約０．２ｍｖ、約０．３ｍｖ、約０．４ｍｖ、約０．５ｍｖ、約０．６ｍｖ、約０．７ｍｖ、約０．８ｍｖ、約０．９ｍｖ、約１．０ｍｖ、約１．１ｍｖ、約１．２ｍｖ、約１．３ｍｖ、約１．４ｍｖ、約１．５ｍｖ、約１．６ｍｖ、約１．７ｍｖ、約１．８ｍｖ、約１．９ｍｖ、約２．０ｍｖ、約２．１ｍｖ、約２．２ｍｖ、約２．３ｍｖ、約２．４ｍｖ、約２．５ｍｖ、約２．６ｍｖ、約２．７ｍｖ、約２．８ｍｖ、約２．９ｍｖ、約３．０ｍｖ、約３．１ｍｖ、約３．２ｍｖ、約３．３ｍｖ、約３．４ｍｖ、約３．５ｍｖ、約３．６ｍｖ、約３．７ｍｖ、約３．８ｍｖ、約３．９ｍｖ、約４．０ｍｖ、約４．１ｍｖ、約４．２ｍｖ、約４．３ｍｖ、約４．４ｍｖ、約４．５ｍｖ、約４．６ｍｖ、約４．７ｍｖ、約４．８ｍｖ、約４．９ｍｖ、約５．０ｍｖ、約５．１ｍｖ、約５．２ｍｖ、約５．３ｍｖ、約５．４ｍｖ、約５．５ｍｖ、約５．６ｍｖ、約５．７ｍｖ、約５．８ｍｖ、約５．９ｍｖ、または約６．０ｍｖであり得る。

【０１４５】

いくつかの態様において、本開示は、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）で内包されたポリヌクレオチド（例えば、ＶＥＥレプリコンｍＲＮＡ）に関する。本開示のいくつかの態様において、ＬＮＰの脂質とポリヌクレオチド（例えば、ＶＥＥレプリコンｍＲＮＡ）との間の質量比は、約１：２～約１５：１の範囲である。いくつかの態様において、脂質とポリヌクレオチド（例えば、ＶＥＥレプリコンｍＲＮＡ）との間の質量比は、約１：２、約１：１．９、約１：１．８、約１：１．７、約１：１．６、約１：１．５、約１：１．４、約１：１．３、約１：１．２、約１：１．１、約１：１、約１．１：１、約１．２：１、約１．３：１、約１．４：１、約１．５：１、約１．６：１、約１．７：１、約１．８：１、約１．９：１、約２：１、約２．５：１、約３：１、約３．５：１、約４：１、約４．５：１、約５：１、約５．５：１、約６：１、約６．５：１、約７：１、約７．５：１、約８：１、約８．５：１、約９：１、約９．５：１、約１０：１、約１０．５：１、約１１：１、約１１．５：１、約１２：１、約１２．５：１、約１３：１、約１３．５：１、約１４：１、約１４．５：１、または約１５：１であり得る。本開示のいくつかの態様において、脂質とポリヌクレオチド（例えば、ＶＥＥレプリコンｍＲＮＡ）との間の質量比は、約１０：１である。

【０１４６】
ＩＶ．ＶＥＥレプリコン
１種以上の脂質（例えば、上に記載されるもの）に加えて、本開示のＬＮＰは、ペイロードをコードする核酸配列を含むＶＥＥレプリコンを含む。本開示の他の箇所に更に記載されるように、本出願人は、ＶＥＥレプリコンと１つ以上の脂質（例えば、リピドイド、例えば、ＴＴ３）との間の相互作用が、本明細書に記載されるＬＮＰに組織特異的な向性などの特定の改善された特性を提供し、それにより、ＬＮＰは、肝臓を回避することができ、及び／または非肝臓組織（例えば、脾臓及び肺）と比較して肝臓内でのペイロードの発現が減少し得ることを特定した。
【０１４７】
ＶＥＥウイルスは、典型的に、蚊によって媒介され、主にウマ種においてＶＥＥまたは脳脊髄炎を引き起こす、ウイルス病原体である。しかしながら、ヒトもＶＥＥに感染する可能性があり、免疫系が低下している者は、ＶＥＥに感染した場合、重度の合併症を有するリスクが特に高くなる。ＶＥＥのビリオンは、球状であり、糖タンパク質の表面タンパク質が外表面に広がった脂質膜を有する。ＶＥＥは、５’末端キャップ及び３’末端ポリ（Ａ）領域を除くと、およそ１１．４５ｋｂのゲノムを有し、４つの非構造タンパク質（ｎｓＰ）及び５つの構造タンパク質を含む。非構造タンパク質は、ｎｓＰ１、ｎｓＰ２、ｎｓＰ３、及びｎｓＰ４を含み、構造領域は、タンパク質Ｃ、Ｅ３、Ｅ２、６Ｋ、及びＥ１をコードする。いくつかの態様において、自己増幅型レプリコンＲＮＡは、ＶＥＥに由来する野生型レプリコンＲＮＡである。野生型ＶＥＥウイルスレプリコンＲＮＡの配列は、配列番号１８６に記載される（表４参照）。
【０１４８】
いくつかの態様において、本開示に有用なＶＥＥレプリコンは、配列番号１８６に記載される配列またはその断片に対して、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９１％、少なくとも約９２％、少なくとも約９３％、少なくとも約９４％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、少なくとも約９９％、または約１００％の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。いくつかの態様において、本開示に有用なＶＥＥレプリコンは、配列番号１８７に記載される配列に対して、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９１％、少なくとも約９２％、少なくとも約９３％、少なくとも約９４％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、少なくとも約９９％、または約１００％の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。いくつかの態様において、ＶＥＥレプリコンは、配列番号１８７に記載される核酸配列を含む。いくつかの態様において、ＶＥＥレプリコンは、配列番号１８７に記載される核酸配列からなる。いくつかの態様において、ＶＥＥレプリコンは、配列番号１８７に記載される核酸配列から本質的になる。
【０１４９】
いくつかの態様において、本開示に有用なＶＥＥレプリコンは、当該技術分野において知られている任意のＶＥＥレプリコンを含む。いくつかの態様において、ＶＥＥレプリコンは、１つ以上の変異を含む。例えば、いくつかの態様において、ＶＥＥレプリコンは、非構造タンパク質ｎｓＰ２及びｎｓＰ３に変異を含み、この変異は、ヒト細胞におけるサブゲノム発現を促進する。いくつかの態様において、ＶＥＥレプリコンは、野生型ＶＥＥレプリコン（配列番号１８６）と比較して、コードされたペイロードのより多くの発現を可能にする変異を含む。いくつかの態様において、自己増幅型レプリコンＲＮＡは、配列番号１８６のＷＴレプリコンの核酸位置３９３６及び／または４７５８に少なくとも１つの点変異を含む。いくつかの態様において、自己増幅型レプリコンＲＮＡは、次の点変異のうちの少なくとも１つを含む：配列番号１８６のＷＴレプリコン配列の位置３９３６におけるグアニンからシトシンへの点変異（Ｇ３９３６Ｃ）及び位置４７５８におけるアデニンからグアニンへの点変異（Ａ４７５８Ｇ）。Ｇ３９３６Ｃ変異は、アミノ酸残基１３０９のグリシンからアルギニンへの変化をもたらすことになる（Ｇ１３０９Ｒ）。Ａ４７

５８Ｇ変異は、アミノ酸残基１５８３のセリンからグリシンへの変化をもたらすことになる（５１５８３Ｇ）。そのようなＶＥＥレプリコンに関する更なる開示は、例えば、ＵＳ２０２００２８１９９４Ａ１に提供されており、その全体が参照により本明細書に援用される。

【０１５０】

いかなる理論にも拘束されるものではないが、いくつかの態様において、ＶＥＥレプリコンと１つ以上の脂質（例えば、リピドイド、例えば、ＴＴ３）との間の相互作用により、肝臓を標的としないＬＮＰがもたらされる。また、ＬＮＰが肝臓を標的としないことから、いくつかの態様において、ペイロードは、肝臓で発現されない。いくつかの態様において、本明細書に記載されるＬＮＰ（例えば、ペイロードをコードする核酸配列を含むＶＥＥレプリコンを含む）は、肝臓を標的とすることが可能であるが、ペイロードの発現は、非肝臓組織における対応する発現と比較して減少する。

【０１５１】

いくつかの態様において、ＶＥＥレプリコンは、ｔｏｌｌ様受容体（ＴＬＲ）の活性化を誘導することが可能である。ＴＬＲのサブセットであるＴＬＲ３、ＴＬＲ７／８、及びＴＬＲ９は、Ｉ型インターフェロン（ＩＦＮ）などの抗ウイルスサイトカインの産生を誘発することによって、抗ウイルス応答に関与している。ＴＬＲ３は、多くのウイルスの複製中間体である二本鎖ＲＮＡに応答する。ＴＬＲ７／８は、ウイルス一本鎖ＲＮＡを認識するのに対し、ＴＬＲ９は、ウイルスＤＮＡ内の非メチル化ＣｐＧモチーフを認識する。ウイルス認識に関与するＴＬＲは、エンドソーム膜に発現し、アダプタータンパク質のＭｙＤ８８の必要性に応じて分けることができ、ＴＬＲ３活性がＭｙＤ８８非依存性であるのに対し、ＴＬＲ７／８／９はＭｙＤ８８依存性である。ＴＬＲ３の活性化は、Ｉ型インターフェロン（ＩＦＮ）の産生につながる。ＩＳＧＦ３（ＳＴＡＴ１／ＳＴＡＴ２／ＩＲＦ９）複合体を介したＩ型インターフェロンのシグナル伝達は、持続的なＲｉｐ３の活性化及びネクロプトーシスを必要とする。いかなる理論にも拘束されるものではないが、いくつかの態様において、Ｉ型インターフェロンの誘導により、肝臓内でのペイロードの発現が減少及び／または抑制され得る。

【０１５２】

ＩＶ．Ａ．ペイロード

本明細書に記載されるように、本開示に有用なＶＥＥレプリコンは、ペイロードを含む。本明細書で使用される場合、「ペイロード」という用語は、本明細書に記載されるＬＮＰと接触した標的（例えば、標的細胞）に作用することが可能な任意の作用物質を指す。いくつかの態様において、別途の記載がない限り、ペイロードという用語は、本明細書において、「生物学的活性分子」という用語と区別なく使用され得る。本開示に有用であるペイロードの非限定的な例としては、ヌクレオチド（例えば、検出可能な部分もしくは毒素を含むか、または転写を阻害するヌクレオチド）、核酸（例えば、酵素などのポリペプチドをコードするＤＮＡもしくはｍＲＮＡ分子、またはｍｉＲＮＡ、ｄｓＤＮＡ、ｌｎｃＲＮＡ、ｓｉＲＮＡ、アンチセンスオリゴヌクレオチド、ホスホロジアミデートモルホリノオリゴマー（ＰＭＯ）、ペプチド結合ホスホロジアミデートモルホリノオリゴマー（ＰＰＭＯ）、もしくはこれらの組み合わせなどの調節機能を有するＲＮＡ分子）、アミノ酸（例えば、検出可能な部分もしくは毒素を含むか、または翻訳を阻害するアミノ酸）、ポリペプチド（例えば、酵素）、脂質、炭水化物、及び低分子（例えば、低分子薬及び毒素）が挙げられる。

【０１５３】

いくつかの態様において、ペイロードは、タンパク質（例えば、異種タンパク質）をコードする核酸配列を含む。当業者には明らかなように、任意の好適なタンパク質をペイロードにコードすることができる。いくつかの態様において、タンパク質は、検出可能なタンパク質（例えば、蛍光タンパク質）を含む。そのような検出可能なタンパク質の非限定的な例としては、ルシフェラーゼ、ｗｔ－ＧＦＰ、緑色蛍光タンパク質（例えば、ＥＧＦＰ、Ｅｍｅｒａｌｄ、Ｓｕｐｅｒｆｏｌｄｅｒ　ＧＦＰ、Ａｚａｍｉ　Ｇｒｅｅｎ、ｍＷ

ａｓａｂｉ、ＴａｇＧＦＰ、ＴｕｒｂｏＧＦＰ、ＡｃＧＦＰ、ＺｓＧｒｅｅｎ、Ｔ－Ｓａｐｐｈｉｒｅなど）、青色蛍光タンパク質、（例えば、ＥＢＦＰ、ＥＢＦＰ２、Ａｚｕｒｉｔｅ、ｍＴａｇＢＦＰなど）、シアン蛍光タンパク質（例えば、ＥＣＦＰ、ｍＥＣＦＰ、Ｃｅｒｕｌｅａｎ、ｍＴｕｒｑｕｏｉｓｅ、ＣｙＰｅｔ、ＡｍＣｙａｎ１、Ｍｉｄｏｒｉ－Ｉｓｈｉ　Ｃｙａｎ、ＴａｇＣＦＰ、ｍＴＦＰ１（Ｔｅａｌ）など）、黄色蛍光タンパク質（例えば、ＥＹＦＰ、Ｔｏｐａｚ、Ｖｅｎｕｓ、ｍＣｉｔｒｉｎｅ、ＹＰｅｔ、ＴａｇＹＦＰ、ＰｈｉＹＦＰ、ＺｓＹｅｌｌｏｗ１、ｍＢａｎａｎａなど）、橙色蛍光タンパク質（例えば、Ｋｕｓａｂｉｒａ　Ｏｒａｎｇｅ、Ｋｕｓａｂｉｒａ　Ｏｒａｎｇｅ２、ｍＯｒａｎｇｅ、ｍＯｒａｎｇｅ２、ｄＴｏｍａｔｏ、ｄＴｏｍａｔｏ－Ｔａｎｄｅｍ、ＴａｇＲＦＰ、ＴａｇＲＦＰ－Ｔ、ＤｓＲｅｄ、ＤｓＲｅｄ２、ＤｓＲｅｄ－Ｅｘｐｒｅｓｓ（Ｔ１）、ＤｓＲｅｄ－Ｍｏｎｏｍｅｒ、ｍＴａｎｇｅｒｉｎｅなど）、または赤色蛍光タンパク質（例えば、ｍＲｕｂｙ、ｍＡｐｐｌｅ、ｍＳｔｒａｗｂｅｒｒｙ、ＡｓＲｅｄ２、ｍＲＦＰ１、ＪＲｅｄ、ｍＣｈｅｒｒｙ、ＨｃＲｅｄｌ、ｍＲａｓｐｂｅｒｒｙ、ｄＫｅｉｍａ－Ｔ及びｅｍ、ＨｃＲｅｄ－Ｔ及びｅｍ、ｍＰｌｕｍ、ＡＱ１４３など）が挙げられる。

【０１５４】

いくつかの態様において、ペイロードは、治療タンパク質をコードする核酸配列を含む。そのような治療タンパク質の非限定的な例は、サイトカインを含む。いくつかの態様において、サイトカインは、インターロイキン（ＩＬ）－１２分子を含む。いくつかの態様において、ＩＬ－１２分子は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１２サブユニット（例えば、ＩＬ－１２βサブユニットまたはＩＬ－１２αサブユニット）、または免疫調節機能を保持する変異体ＩＬ－１２分子を含む。いくつかの態様において、サイトカインは、ＩＬ－１２ではない。いくつかの態様において、サイトカインは、（ｉ）サイトカインの共通ガンマ鎖ファミリー、（ｉｉ）サイトカインのＩＬ－１ファミリー、（ｉｉｉ）造血サイトカイン、（ｉｖ）インターフェロン（例えば、Ｉ型、ＩＩ型、またはＩＩＩ型）、（ｖ）サイトカインのＴＮＦファミリー、（ｖｉ）サイトカインのＩＬ－１７ファミリー、（ｖｉｉ）ダメージ関連分子パターン（ＤＡＭＰ）、（ｖｉｉｉ）寛容原性サイトカイン、または（ｉｘ）これらの組み合わせから選択される。いくつかの態様において、サイトカインは、ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１、ＩＦＮ－γ、ＩＬ－１α、ＩＬ－１β、ＩＬ－１ｒａ、ＩＬ－１８、ＩＬ－３３、ＩＬ－３６α、ＩＬ－３６β、ＩＬ－３６γ、ＩＬ－３６ｒａ、ＩＬ－３７、ＩＬ－３８、ＩＬ－３、ＩＬ－５、ＩＬ－６、ＩＬ－１１、ＩＬ－１３、ＩＬ－２３、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）、顆粒球コロニー刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ）、白血病抑制因子（ＬＩＦ）、幹細胞因子（ＳＣＦ）、トロンボポエチン（ＴＰＯ）、マクロファージコロニー刺激因子（Ｍ－ＣＳＦ）、エリスロポエチン（ＥＰＯ）、Ｆｌｔ－３、ＩＦＮ－α、ＩＦＮ－β、ＩＦＮ－γ、ＩＬ－１９、ＩＬ－２０、ＩＬ－２２、ＩＬ－２４、ＴＮＦ－α、ＴＮＦ－β、ＢＡＦＦ、ＡＰＲＩＬ、リンホトキシンβ（ＴＮＦ－γ）、ＩＬ－１７Ａ、ＩＬ－１７Ｂ、ＩＬ－１７Ｃ、ＩＬ－１７Ｄ、ＩＬ－１７Ｅ、ＩＬ－１７Ｆ、ＩＬ－２５、ＴＳＬＰ、ＩＬ－３５、ＩＬ－２７、ＴＧＦ－β、またはこれらの組み合わせを含む。コードすることができる他のタンパク質の追加の例は、以下に更に提供される。

【０１５５】

ペイロードが、ＩＬ－１２タンパク質をコードする核酸配列を含む場合、いくつかの態様において、ＩＬ－１２タンパク質（例えば、本明細書に記載される核酸分子によってコードされる）は、配列番号１８２に対して、少なくとも約７０％、少なくとも約７５％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９１％、少なくとも約９２％、少なくとも約９３％、少なくとも約９４％少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、少なくとも約９９％、または約１００％同一であるアミノ酸配列を含む。

【０１５６】

いくつかの態様において、ＩＬ－１２分子は、ＩＬ－１２αサブユニット及び／または

ＩＬ－１２βサブユニットを含む。いくつかの態様において、ＩＬ－１２αサブユニットは、配列番号１８３に対して、少なくとも約７０％、少なくとも約７５％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９１％、少なくとも約９２％、少なくとも約９３％、少なくとも約９４％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、少なくとも約９９％、または約１００％同一であるアミノ酸配列を含む。

【０１５７】

いくつかの態様において、ＩＬ－１２βサブユニットは、配列番号１８４に対して、少なくとも約７０％、少なくとも約７５％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９１％、少なくとも約９２％、少なくとも約９３％、少なくとも約９４％少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、少なくとも約９９％、または約１００％同一であるアミノ酸配列を含む。

【０１５８】

いくつかの態様において、本明細書に記載されるＶＥＥレプリコンは、コドン最適化された核酸配列を含む。したがって、いくつかの態様において、本明細書で開示されるＩＬ－１２タンパク質（例えば、ＩＬ－１２　ｐ３５サブユニット、ＩＬ－１２　ｐ４０サブユニット、またはヘテロ二量体ＩＬ－１２　ｐ７０）をコードするヌクレオチド配列は、野生型ヌクレオチド配列（例えば、配列番号１８５）と異なる。

【０１５９】

いくつかの態様において、ＶＥＥレプリコンは、ＩＬ－１２βサブユニットをコードする核酸配列を含み、ここで、核酸配列は、配列番号５１、配列番号５２、配列番号５３、配列番号５４、配列番号５５、配列番号５６、配列番号５７、配列番号５８、配列番号５９、配列番号６０、配列番号６１、配列番号６２、配列番号６３、配列番号６４、配列番号６５、配列番号６６、配列番号６７、配列番号６８、配列番号６９、配列番号７０、配列番号７１、配列番号７２、配列番号７３、配列番号７４、または配列番号７５のいずれか１つに記載される配列に対して、少なくとも約７５％、少なくとも約７６％、少なくとも約７７％、少なくとも約７８％、少なくとも約７９％、少なくとも約８０％、少なくとも約８１％、少なくとも約８２％、少なくとも約８３％、少なくとも約８４％、少なくとも約８５％、少なくとも約８６％、少なくとも約８７％、少なくとも約８８％、少なくとも約８９％、少なくとも約９０％、少なくとも約９１％、少なくとも約９２％、少なくとも約９３％、少なくとも約９４％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、少なくとも約９９％、または約１００％の配列同一性を有する。

【０１６０】

いくつかの態様において、本開示に有用なＶＥＥレプリコンは、ＩＬ－１２βサブユニットをコードする核酸配列を含み、ここで、核酸配列は、（ｉ）配列番号５１に記載される配列に対して、少なくとも７６％、少なくとも７７％、少なくとも７８％、少なくとも７９％、少なくとも８０％、少なくとも８１％、少なくとも８２％、少なくとも８３％、少なくとも８４％、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、もしくは１００％の配列同一性、（ｉｉ）配列番号５２に記載される配列に対して、少なくとも７８％、少なくとも７９％、少なくとも８０％、少なくとも８１％、少なくとも８２％、少なくとも８３％、少なくとも８４％、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、もしくは１００％の配列同一性、（ｉｉｉ）配列番号５３に記載される配列に対して、少なくとも７７％、少なくとも７８％、少なく

とも７９％、少なくとも８０％、少なくとも８１％、少なくとも８２％、少なくとも８３％、少なくとも８４％、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、もしくは１００％の配列同一性、（ｉｖ）配列番号５４に記載される配列に対して、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、もしくは１００％の配列同一性、（ｖ）配列番号５５に記載される配列に対して、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、もしくは１００％の配列同一性、（ｖｉ）配列番号５６に記載される配列に対して、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、もしくは１００％の配列同一性、（ｖｉｉ）配列番号５７に記載される配列に対して、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、もしくは１００％の配列同一性、（ｖｉｉｉ）配列番号５８に記載される配列に対して、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、もしくは１００％の配列同一性、（ｉｘ）配列番号５９に記載される配列に対して、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、もしくは１００％の配列同一性、（ｘ）配列番号６５、６９、もしくは７４に記載される配列に対して、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、もしくは１００％の配列同一性、（ｘｉ）配列番号６６、７０、もしくは７５に記載される配列に対して、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、もしくは１００％の配列同一性、（ｘｉｉ）配列番号６２に記載される配列に対して、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、もしくは１００％の配列同一性、（ｘｉｉｉ）配列番号６３に記載される配列に対して、少なくとも９９％もしくは１００％の配列同一性、または（ｘｉｖ）配列番号６４に記載される配列に対して、少なくとも９８％、少なくとも９９％、もしくは１００％の配列同一性を有する。

【０１６１】

いくつかの態様において、ＩＬ－１２βサブユニットをコードする核酸分子は、配列番号５１に記載される配列を含む。いくつかの態様において、ＩＬ－１２βサブユニットをコードする核酸分子は、配列番号５２に記載される配列を含む。いくつかの態様において、ＩＬ－１２βサブユニットをコードする核酸分子は、配列番号５３に記載される配列を含む。いくつかの態様において、ＩＬ－１２βサブユニットをコードする核酸分子は、配列番号５４に記載される配列を含む。いくつかの態様において、ＩＬ－１２βサブユニットをコードする核酸分子は、配列番号５５に記載される配列を含む。いくつかの態様において、ＩＬ－１２βサブユニットをコードする核酸分子は、配列番号５６に記載される配列を含む。いくつかの態様において、ＩＬ－１２βサブユニットをコードする核酸分子は、配列番号５７に記載される配列を含む。いくつかの態様において、ＩＬ－１２βサブユニットをコードする核酸分子は、配列番号５８に記載される配列を含む。いくつかの態様において、ＩＬ－１２βサブユニットをコードする核酸分子は、配列番号５９に記載される配列を含む。いくつかの態様において、ＩＬ－１２βサブユニットをコードする核酸分

子は、配列番号６５に記載される配列を含む。いくつかの態様において、ＩＬ－１２βサブユニットをコードする核酸分子は、配列番号６６に記載される配列を含む。いくつかの態様において、ＩＬ－１２βサブユニットをコードする核酸分子は、配列番号６７に記載される配列を含む。いくつかの態様において、ＩＬ－１２βサブユニットをコードする核酸分子は、配列番号６８に記載される配列を含む。いくつかの態様において、ＩＬ－１２βサブユニットをコードする核酸分子は、配列番号６９に記載される配列を含む。いくつかの態様において、ＩＬ－１２βサブユニットをコードする核酸分子は、配列番号７０に記載される配列を含む。いくつかの態様において、ＩＬ－１２βサブユニットをコードする核酸分子は、配列番号７１に記載される配列を含む。いくつかの態様において、ＩＬ－１２βサブユニットをコードする核酸分子は、配列番号７２に記載される配列を含む。いくつかの態様において、ＩＬ－１２βサブユニットをコードする核酸分子は、配列番号７３に記載される配列を含む。いくつかの態様において、ＩＬ－１２βサブユニットをコードする核酸分子は、配列番号７４に記載される配列を含む。いくつかの態様において、ＩＬ－１２βサブユニットをコードする核酸分子は、配列番号７５に記載される配列を含む。いくつかの態様において、ＩＬ－１２βサブユニットをコードする核酸分子は、配列番号６２に記載される配列を含む。いくつかの態様において、ＩＬ－１２βサブユニットをコードする核酸分子は、配列番号６３に記載される配列を含む。いくつかの態様において、ＩＬ－１２βサブユニットをコードする核酸分子は、配列番号６４に記載される配列を含む。いくつかの態様において、ＩＬ－１２βサブユニットをコードする核酸分子は、配列番号６０に記載される配列を含む。いくつかの態様において、ＩＬ－１２βサブユニットをコードする核酸分子は、配列番号６１に記載される配列を含む。

【０１６２】

いくつかの態様において、ＶＥＥレプリコンは、ＩＬ－１２　ｐ３５サブユニット（本明細書において、ＩＬ－１２αサブユニットとも称される）をコードする核酸配列を含み、ここで、核酸配列は、配列番号１０１、配列番号１０２、配列番号１０３、配列番号１０４、配列番号１０５、配列番号１０６、配列番号１０７、配列番号１０８、配列番号１０９、配列番号１１０、配列番号１１１、配列番号１１２、配列番号１１３、配列番号１１４、配列番号１１５、配列番号１１６、配列番号１１７、配列番号１１８、配列番号１１９、配列番号１２０、配列番号１２１、配列番号１２２、配列番号１２３、配列番号１２４、または配列番号１２５のいずれか１つに記載される配列に対して、少なくとも約７７％、少なくとも約７８％、少なくとも約７９％、少なくとも約８０％、少なくとも約８１％、少なくとも約８２％、少なくとも約８３％、少なくとも約８４％、少なくとも約８５％、少なくとも約８６％、少なくとも約８７％、少なくとも約８８％、少なくとも約８９％、少なくとも約９０％、少なくとも約９１％、少なくとも約９２％、少なくとも約９３％、少なくとも約９４％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、少なくとも約９９％、または約１００％の配列同一性を有する。

【０１６３】

いくつかの態様において、本開示に有用なＶＥＥレプリコンは、ＩＬ－１２　ｐ３５サブユニットをコードする核酸配列を含み、ここで、核酸配列は、（ｉ）配列番号１０１に記載される配列に対して、少なくとも７９％、少なくとも８０％、少なくとも８１％、少なくとも８２％、少なくとも８３％、少なくとも８４％、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、もしくは１００％の配列同一性、（ｉｉ）配列番号１０２に記載される配列に対して、少なくとも７８％、少なくとも７９％、少なくとも８０％、少なくとも８１％、少なくとも８２％、少なくとも８３％、少なくとも８４％、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５

％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、もしくは１００％の配列同一性、（ｉｉｉ）配列番号１０３に記載される配列に対して、少なくとも７７％、少なくとも７８％、少なくとも７９％、少なくとも８０％、少なくとも８１％、少なくとも８２％、少なくとも８３％、少なくとも８４％、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、もしくは１００％の配列同一性、（ｉｖ）配列番号１０４に記載される配列に対して、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、もしくは１００％の配列同一性、（ｖ）配列番号１０５に記載される配列に対して、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、もしくは１００％の配列同一性、（ｖｉ）配列番号１０６に記載される配列に対して、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、もしくは１００％の配列同一性、（ｖｉｉ）配列番号１０７に記載される配列に対して、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、もしくは１００％の配列同一性、（ｖｉｉｉ）配列番号１０８に記載される配列に対して、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、もしくは１００％の配列同一性、（ｉｘ）配列番号１０９に記載される配列に対して、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、もしくは１００％の配列同一性、（ｘ）配列番号１１５、１１９、もしくは１２４に記載される配列に対して、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、もしくは１００％の配列同一性、（ｘｉ）配列番号１１６、１２０、もしくは１２５に記載される配列に対して、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、もしくは１００％の配列同一性、（ｘｉｉ）配列番号１１２に記載される配列に対して、少なくとも９８％、少なくとも９９％、もしくは１００％の配列同一性、（ｘｉｉｉ）配列番号１１３に記載される配列に対して、少なくとも９８％、少なくとも９９％、もしくは１００％の配列同一性、または（ｘｉｖ）配列番号１１４に記載される配列に対して、少なくとも９８％、少なくとも９９％、もしくは１００％の配列同一性を有する。

【０１６４】

いくつかの態様において、ＩＬ－１２αサブユニットをコードする核酸分子は、配列番号１０１に記載される配列を含む。いくつかの態様において、ＩＬ－１２αサブユニットをコードする核酸分子は、配列番号１０２に記載される配列を含む。いくつかの態様において、ＩＬ－１２αサブユニットをコードする核酸分子は、配列番号１０３に記載される配列を含む。いくつかの態様において、ＩＬ－１２αサブユニットをコードする核酸分子は、配列番号１０４に記載される配列を含む。いくつかの態様において、ＩＬ－１２αサブユニットをコードする核酸分子は、配列番号１０５に記載される配列を含む。いくつかの態様において、ＩＬ－１２αサブユニットをコードする核酸分子は、配列番号１０６に記載される配列を含む。いくつかの態様において、ＩＬ－１２αサブユニットをコードする核酸分子は、配列番号１０７に記載される配列を含む。いくつかの態様において、ＩＬ

－１２αサブユニットをコードする核酸分子は、配列番号１０８に記載される配列を含む。いくつかの態様において、ＩＬ－１２αサブユニットをコードする核酸分子は、配列番号１０９に記載される配列を含む。いくつかの態様において、ＩＬ－１２αサブユニットをコードする核酸分子は、配列番号１１５に記載される配列を含む。いくつかの態様において、ＩＬ－１２αサブユニットをコードする核酸分子は、配列番号１１６に記載される配列を含む。いくつかの態様において、ＩＬ－１２βサブユニットをコードする核酸分子は、配列番号１１７に記載される配列を含む。いくつかの態様において、ＩＬ－１２βサブユニットをコードする核酸分子は、配列番号１１８に記載される配列を含む。いくつかの態様において、ＩＬ－１２βサブユニットをコードする核酸分子は、配列番号１１９に記載される配列を含む。いくつかの態様において、ＩＬ－１２βサブユニットをコードする核酸分子は、配列番号１２０に記載される配列を含む。いくつかの態様において、ＩＬ－１２βサブユニットをコードする核酸分子は、配列番号１２１に記載される配列を含む。いくつかの態様において、ＩＬ－１２βサブユニットをコードする核酸分子は、配列番号１２２に記載される配列を含む。いくつかの態様において、ＩＬ－１２βサブユニットをコードする核酸分子は、配列番号１２３に記載される配列を含む。いくつかの態様において、ＩＬ－１２βサブユニットをコードする核酸分子は、配列番号１２４に記載される配列を含む。いくつかの態様において、ＩＬ－１２βサブユニットをコードする核酸分子は、配列番号１２５に記載される配列を含む。いくつかの態様において、ＩＬ－１２αサブユニットをコードする核酸分子は、配列番号１１２に記載される配列を含む。いくつかの態様において、ＩＬ－１２αサブユニットをコードする核酸分子は、配列番号１１３に記載される配列を含む。いくつかの態様において、ＩＬ－１２αサブユニットをコードする核酸分子は、配列番号１１４に記載される配列を含む。いくつかの態様において、ＩＬ－１２βサブユニットをコードする核酸分子は、配列番号１１０に記載される配列を含む。いくつかの態様において、ＩＬ－１２βサブユニットをコードする核酸分子は、配列番号１１１に記載される配列を含む。

【０１６５】

いくつかの態様において、ＩＬ－１２　ｐ４０サブユニットをコードする核酸分子及びＩＬ－１２　ｐ３５サブユニットをコードする核酸分子は、互いにコンジュゲートすることができる。例えば、いくつかの態様において、本開示は、第１の核酸及び第２の核酸を含む単離ポリヌクレオチドを提供し、ここで、第１の核酸は、ＩＬ－１２　ｐ４０サブユニットをコードし、第２の核酸は、ＩＬ－１２　ｐ３５サブユニットをコードする。いくつかの態様において、ＩＬ－１２αサブユニット及びＩＬ－１２βサブユニットは、リンカーによって連結される。いくつかの態様において、リンカーは、少なくとも約２、少なくとも約５、少なくとも約６、少なくとも約７、少なくとも約８、少なくとも約９、少なくとも約１０、少なくとも約１１、少なくとも約１２、少なくとも約１３、少なくとも約１４、少なくとも約１５、少なくとも約１６、少なくとも約１７、少なくとも約１８、少なくとも約１９、または少なくとも約２０アミノ酸のアミノ酸リンカーを含む。いくつかの態様において、リンカーは、（ＧＳ）リンカーを含む。いくつかの態様において、ＧＳリンカーは、（Ｇｌｙ３Ｓｅｒ）ｎまたは（Ｇｌｙ３Ｓｅｒ）ｎの式を有し、式中、ｎは、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、または１００からなる群から選択される正の整数である。いくつかの態様において、（Ｇｌｙ３Ｓｅｒ）ｎリンカーは、（Ｇｌｙ３Ｓｅｒ）３または（Ｇｌｙ３Ｓｅｒ）４である。

【０１６６】

いくつかの態様において、ＶＥＥレプリコンは、ケモカインをコードする核酸配列を含む。ケモカインの非限定的な例としては、ＣＣＬ１４、ＣＣＬ１９、ＣＣＬ２０、ＣＣＬ２１、ＣＣＬ２５、ＣＣＬ２７、ＣＸＣＬ１２、ＣＸＣＬ１３、ＣＸＣＬ－８、ＣＣＬ２、ＣＣＬ３、ＣＣＬ４、ＣＣＬ５、ＣＣＬ１１、及びＣＸＣＬ１０が挙げられる。いくつかの態様において、ＶＥＥレプリコンは、成長因子をコードする核酸配列を含む。本明細書で使用される場合、「成長因子」という用語は、細胞間でシグナルを伝達し、細胞成長

を刺激することができる天然に存在する物質を指す。サイトカインは、成長因子であり得るが、ある種のサイトカインは、細胞成長に対する抑制作用も有するため、２つの用語は区別されている。成長因子の非限定的な例としては、アドレノメデュリン（ＡＭ）、アンジオポエチン（Ａｎｇ）、自己分泌型運動因子、骨形成タンパク質（ＢＭＰ）、毛様体神経栄養因子（ＣＮＴＦ）、白血病抑制因子（ＬＩＦ）、インターロイキン－６（ＩＬ－６）、マクロファージコロニー刺激因子（ｍ－ＣＳＦ）、顆粒球コロニー刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）、上皮成長因子（ＥＧＦ）、エフリンＡ１、エフリンＡ２、エフリンＡ３、エフリンＡ４、エフリンＡ５、エフリンＢ１、エフリンＢ２、エフリンＢ３、エリスロポエチン（ＥＰＯ）、線維芽細胞増殖因子１（ＦＧＦ１）、線維芽細胞増殖因子２（ＦＧＦ２）、線維芽細胞増殖因子３（ＦＧＦ３）、線維芽細胞増殖因子４（ＦＧＦ４）、線維芽細胞増殖因子５（ＦＧＦ５）、線維芽細胞増殖因子６（ＦＧＦ６）、線維芽細胞増殖因子７（ＦＧＦ７）、線維芽細胞増殖因子８（ＦＧＦ８）、線維芽細胞増殖因子９（ＦＧＦ９）、線維芽細胞増殖因子１０（ＦＧＦ１０）、線維芽細胞増殖因子１１（ＦＧＦ１１）、線維芽細胞増殖因子１２（ＦＧＦ１２）、線維芽細胞増殖因子１３（ＦＧＦ１３）、線維芽細胞増殖因子１４（ＦＧＦ１４）、線維芽細胞増殖因子１５（ＦＧＦ１５）、線維芽細胞増殖因子１６（ＦＧＦ１６）、線維芽細胞増殖因子１７（ＦＧＦ１７）、線維芽細胞増殖因子１８（ＦＧＦ１８）、線維芽細胞増殖因子１９（ＦＧＦ１９）、線維芽細胞増殖因子２０（ＦＧＦ２０）、線維芽細胞増殖因子２１（ＦＧＦ２１）、線維芽細胞増殖因子２２（ＦＧＦ２２）、線維芽細胞増殖因子２３（ＦＧＦ２３）、ウシ胎児血清（ＦＢＳ）、グリア細胞株由来神経栄養因子（ＧＤＮＦ）、ニュールツリン、パーセフィン、アルテミン、成長分化因子９（ＧＤＦ９）、肝細胞増殖因子（ＨＧＦ）、肝細胞癌由来増殖因子（ＨＤＧＦ）、インスリン、インスリン様成長因子－１（ＩＧＦ－１）、インスリン様成長因子２（ＩＧＦ－２）、インターロイキン－１（ＩＬ－１）、ＩＬ－２、ＩＬ－３、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－６、ＩＬ－７、ケラチノサイト増殖因子（ＫＧＦ）、移動刺激因子（ＭＳＦ）、マクロファージ刺激タンパク質（ＭＳＰ）、ミオスタチン（ＧＤＦ－８）、ニューレグリン１（ＮＲＧ１）、ニューレグリン２（ＮＲＧ２）、ニューレグリン３（ＮＲＧ３）、ニューレグリン４（ＮＲＧ４）、脳由来神経栄養因子（ＢＤＮＦ）、神経成長因子（ＮＧＦ）、ニューロトロフィン－３（ＮＴ－３）、ニューロトロフィン－４（ＮＴ－４）、胎盤成長因子（ＰＧＦ）、血小板由来成長因子（ＰＤＧＦ）、レナラーゼ（ＲＮＬＳ）、Ｔ細胞成長因子（ＴＣＧＦ）、トロンボポエチン（ＴＰＯ）、トランスフォーミング増殖因子アルファ（ＴＧＦ－α）、トランスフォーミング増殖因子β（ＴＧＦ－β）、腫瘍壊死因子アルファ（ＴＮＦ－α）、及び血管内皮細胞増殖因子（ＶＥＧＦ）が挙げられる。

【０１６７】

いくつかの態様において、本開示に有用なＶＥＥレプリコンは、リガンド結合タンパク質をコードする核酸配列を含む。リガンド結合タンパク質の非限定的な例としては、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）、キメラ抗体－Ｔ細胞受容体（ｃａＴＣＲ）、キメラシグナル伝達受容体（ＣＳＲ）、Ｔ細胞受容体ミミック（ＴＣＲミミック）、及びこれらの組み合わせが挙げられる。

【０１６８】

いくつかの態様において、ＶＥＥレプリコンは、ＣＡＲをコードする核酸配列を含む。いくつかの態様において、ＣＡＲは、標準的なＣＡＲとして設計される。「標準的なＣＡＲ」では、異なる構成要素（例えば、細胞外標的ドメイン、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）が単一の融合タンパク質として直鎖状に構築される。いくつかの態様において、ＣＡＲは、第一世代ＣＡＲとして設計される。「第一世代」ＣＡＲは、細胞外結合ドメイン、ヒンジ領域、膜貫通ドメイン、及び１つ以上の細胞内シグナル伝達ドメインから構成される。第一世代ＣＡＲは全て、細胞内シグナル伝達ドメインとして、ＣＤ３ζ鎖ドメインを含有する。いくつかの態様において、ＣＡＲは、第二世代ＣＡＲとして設計される。「第二世代」ＣＡＲは、共刺激ドメイン（例えば、ＣＤ２８または４－１ＢＢ）を更に含有する。いくつかの態様において、ＣＡＲは、第三世代ＣＡＲと

して設計される。「第三世代」ＣＡＲは、複数の共刺激ドメイン（例えば、ＣＤ２８－４－１ＢＢまたはＣＤ２８－ＯＸ４０）を含有していることを除き、第二世代ＣＡＲと類似している。いくつかの態様において、ＣＡＲは、第四世代ＣＡＲとして設計される。「第四世代」ＣＡＲ（ＴＲＵＣＫまたは強化型ＣＡＲとしても知られる）は、機能を更に向上することができる追加の因子を更に含有する。例えば、いくつかの態様において、第四世代ＣＡＲは、標的とする腫瘍組織内でＣＡＲシグナル伝達がなされると放出され得るサイトカインを更に含有する。いくつかの態様において、第四世代ＣＡＲは、ＣＡＲの活性を更に制御するのに役立ち得る、ホーミング遺伝子及び自殺遺伝子などの１つ以上の追加要素を含む。いくつかの態様において、ＣＡＲは、スプリットＣＡＲとして設計される。「スプリットＣＡＲ」系では、ＣＡＲの１つ以上の構成要素（例えば、細胞外標的ドメイン、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）が、完全な機能的受容体のアセンブリを促進する複数の入力に依存するように、２つ以上の部分に分けられている。いくつかの態様において、ＣＡＲは、切り替え可能なＣＡＲとして設計される。「切り替え可能なＣＡＲ」では、ＣＡＲを刺激の存在下でオン（スイッチオンＣＡＲ）またはオフ（スイッチオフＣＡＲ）に切り替えることができる（例えば、一過性）。本開示とともに使用することができるＣＡＲの追加の例は、例えば、ＵＳ２０２０／０１７２８７９Ａ１及びＵＳ２０１９／０１８３９３２Ａ１に記載されており、そのそれぞれは、その全体が参照により本明細書に援用される。

【０１６９】

いくつかの態様において、本明細書に記載されるＶＥＥレプリコンは、抗体またはその抗原結合断片（本明細書において「抗体」と総称される）をコードする核酸配列を含む。抗体は、天然源に由来するものであってもよいし、部分または全体が合成的に産生されたものであってもよい。いくつかの態様において、抗体は、モノクローナル抗体である。いくつかの態様において、モノクローナル抗体は、ＩｇＧ抗体である。いくつかの態様において、モノクローナル抗体は、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、またはＩｇＧ４である。いくつかの態様において、抗体は、ポリクローナル抗体である。いくつかの態様において、抗原結合断片は、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、及びＦ（ａｂ’）$_2$、Ｆ（ａｂ１）$_2$、Ｆｖ、ｄＡｂ、及びＦｄ断片から選択される。いくつかの態様において、抗原結合断片は、ｓｃＦｖまたは（ｓｃＦｖ）$_2$断片である。いくつかの態様において、抗体または抗原結合断片は、ＮＡＮＯＢＯＤＹ（登録商標）（単一ドメイン抗体）である。いくつかの態様において、抗体または抗原結合断片は、二重特異性抗体または多重特異性抗体である。

【０１７０】

ＩＶ．Ｂ．追加の構成成分

いくつかの態様において、本開示に有用なＶＥＥレプリコンは、以下の追加の構成成分のうちの１つ以上を含む核酸配列を含む。

【０１７１】

末端構造修飾：ＵＴＲ

遺伝子の非翻訳領域（ＵＴＲ）は、転写されるが、翻訳はされない。５’ＵＴＲは、転写開始部位から始まり、開始コドンまで続くが、開始コドンは含まない。一方、３’ＵＴＲは、終止コドンの直後から始まり、転写終結シグナルまで続く。核酸分子の安定性及び翻訳に関してＵＴＲが果たす調節的な役割について、多くの証拠が示されている。ＵＴＲの調節機能を本開示のＲＮＡに組み込むことで、分子の安定性を高めることができる。また、望ましくない器官部位に誤って誘導された場合に備えて、転写物の調節された下方制御を保証するための特定の機能を組み込むこともできる。

【０１７２】

５’ＵＴＲ及び翻訳開始

天然の５’ＵＴＲは、翻訳開始の役割を果たす機能を持つ。これらは、リボソームによって開始される多くの遺伝子の翻訳プロセスに関与することが一般的に知られているＫｏｚａｋ配列のようなシグネチャーを有する。Ｋｏｚａｋ配列は、共通のＣＣＲ（Ａ／Ｇ）ＣＣＡＵＧＧを有し、ここで、Ｒは、別の「Ｇ」が後に続く開始コドン（ＡＵＧ）の３塩

基上流にあるプリン（アデニンまたはグアニン）である。５’ＵＴＲはまた、伸長因子の結合に関与する二次構造を形成することが知られている。

【０１７３】

伸長因子の結合に関与する５’ＵＴＲ二次構造は、５’ＵＴＲまたは３’ＵＴＲ中の他のＲＮＡ結合分子と相互作用して遺伝子発現を制御することができる。例えば、マイクロＲＮＡを介した抑制には、伸長因子ＥＩＦ４Ａ２が５’ＵＴＲの二次構造化された要素に結合することが必要である（Ｍｅｉｊｅｒ　Ｈ　Ａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ，２０１３，３４０，８２－８５、その全体が参照により本明細書に援用される）。５’ＵＴＲの異なる二次構造をフランキング領域に組み込み、特定の組織または細胞においてｍＲＮＡを安定化させたり、選択的に不安定化することが可能である。

【０１７４】

特定の標的器官で豊富に発現される遺伝子に典型的に見られる特徴を操作することによって、本開示の核酸またはｍＲＮＡの安定性及びタンパク質産生を高めることができる。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ＶＩＩＩ因子などの肝臓発現ｍＲＮＡの５’ＵＴＲを導入することは、肝細胞株または肝臓におけるｍＲＮＡなどの核酸分子の発現を増強するために使用され得る。同様に、他の組織特異的ｍＲＮＡの５’ＵＴＲを使用することにより、筋肉（ＭｙｏＤ、ミオシン、ミオグロビン、ミオゲニン、ヘルクリン）、内皮細胞（Ｔｉｅ－１、ＣＤ３６）、骨髄細胞（Ｃ／ＥＢＰ、ＡＭＬ１、Ｇ－ＣＳＦ、ＧＭ－ＣＳＦ、ＣＤ１１ｂ、ＭＳＲ、Ｆｒ－１、ｉ－ＮＯＳ）、白血球（ＣＤ４５、ＣＤ１８）、脂肪組織（ＣＤ３６、ＧＬＵＴ４、ＡＣＲＰ３０、アディポネクチン）及び肺上皮細胞（ＳＰ－Ａ／Ｂ／Ｃ／Ｄ）についても、その組織における発現を改善することが可能である。

【０１７５】

他の非ＵＴＲ配列を５’（または３’ＵＴＲ）ＵＴＲに組み込むこともできる。例えば、イントロン配列のイントロンまたは一部を本開示の核酸またはｍＲＮＡのフランキング領域に組み込むことができる。イントロン配列を組み込むことで、タンパク質産生及びｍＲＮＡレベルを増加させることができる。

【０１７６】

本開示のいくつかの態様において、ＧＴＸ遺伝子に由来するＩＲＥＳ配列の少なくとも１つの断片を５’ＵＴＲに含めることができる。非限定的な例として、断片は、ＧＴＸ遺伝子のＩＲＥＳに由来する１８ヌクレオチド配列であり得る。他の非限定的な例として、ＧＴＸ遺伝子のＩＲＥＳ配列に由来する１８ヌクレオチド配列断片は、本明細書に記載されるポリヌクレオチドの５’ＵＴＲ中、タンデムで繰り返されてもよい。１８ヌクレオチド配列は、５’ＵＴＲ中、少なくとも１回、少なくとも２回、少なくとも３回、少なくとも４回、少なくとも５回、少なくとも６回、少なくとも７回、少なくとも８回、少なくとも９回または１０回以上繰り返され得る。

【０１７７】

５’（または３’）ＵＴＲのヌクレオチドは、変異、置換及び／または除去されてもよい。例えば、開始コドンの上流の１つ以上のヌクレオチドを他のヌクレオチドに置き換えることができる。置き換えられるヌクレオチド（複数可）は、開始コドンの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、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０または６０ヌクレオチド以上上流にある。別の例として、開始コドンの上流の１つ以上のヌクレオチドをＵＴＲから除去することができる。

【０１７８】

５’ＵＴＲ、３’ＵＴＲ及び翻訳エンハンサーエレメント（ＴＥＥ）

いくつかの態様において、ＩＬ－１２をコードするヌクレオチド配列の５’ＵＴＲは、少なくとも１つの翻訳エンハンサーポリヌクレオチド、翻訳エンハンサーエレメント、翻訳のエンハンサーエレメント（「ＴＥＥ」と総称される）を含む。いくつかの態様におい

て、ＴＥＥは、転写プロモーターと開始コドンとの間に位置する。いくつかの態様において、５’ＵＴＲに少なくとも１つのＴＥＥを含むＲＮＡは、５’ＵＴＲにキャップを含む。いくつかの態様において、少なくとも１つのＴＥＥは、キャップ依存性またはキャップ非依存性翻訳を受けるＩＬ－１２をコードするヌクレオチド配列の５’ＵＴＲに位置し得る。

【０１７９】

「翻訳のエンハンサーエレメント」または「翻訳エンハンサーエレメント」（本明細書において「ＴＥＥ」と総称される）という用語は、ｍＲＮＡから生成されるポリペプチドまたはタンパク質の量を増加させる配列を指す。

【０１８０】

一態様において、ＴＥＥは、限定するものではないが、キャップ依存性またはキャップ非依存性翻訳などの核酸の翻訳活性を促進することができるＵＴＲの保存的エレメントである。これらの配列の保存は、これまでに、Ｐａｎｅｋ　ｅｔ　ａｌ（Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ，２０１３，１－１０；その全体が参照により本明細書に援用される）によって、ヒトを含む１４の生物種にわたって示されている。

【０１８１】

いくつかの態様において、ＩＬ－１２をコードするヌクレオチド配列は、米国出願第２０１４／０１４７４５４号（その全体が参照により本明細書に援用される）に開示されているものと少なくとも約５０％、少なくとも約５５％、少なくとも約６０％、少なくとも約６５％、少なくとも約７０％、少なくとも約７５％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％または少なくとも約９９％の同一性を有する少なくとも１つのＴＥＥを有する。いくつかの態様において、ＲＮＡは、米国特許公開第ＵＳ２００９０２２６４７０号、同第ＵＳ２００７００４８７７６号、同第ＵＳ２０１３０１７７５８１号及び同第ＵＳ２０１１０１２４１００号、国際特許公開第ＷＯ１９９９０２４５９５号、同第ＷＯ２０１２００９６４４号、同第ＷＯ２００９０７５８８６号及び同第ＷＯ２００７０２５００８号、欧州特許公開第ＥＰ２６１０３４１Ａ１号及び同第ＥＰ２６１０３４０Ａ１号、米国特許第６，３１０，１９７号、米国特許第６，８４９，４０５号、米国特許第７，４５６，２７３号、米国特許第７，１８３，３９５号（そのそれぞれは、その全体が参照により本明細書に援用される）に記載されているＴＥＥと少なくとも約５０％、少なくとも約５５％、少なくとも約６０％、少なくとも約６５％、少なくとも約７０％、少なくとも約７５％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％または少なくとも約９９％の同一性を有する少なくとも１つのＴＥＥを含む。

【０１８２】

いくつかの態様において、ＩＬ－１２をコードするヌクレオチド配列の５’ＵＴＲは、少なくとも１、少なくとも２、少なくとも３、少なくとも４、少なくとも５、少なくとも６、少なくとも７、少なくとも８、少なくとも９、少なくとも１０、少なくとも１１、少なくとも１２、少なくとも１３、少なくとも１４、少なくとも１５、少なくとも１６、少なくとも１７、少なくとも１８、少なくとも１９、少なくとも２０、少なくとも２１、少なくとも２２、少なくとも２３、少なくとも２４、少なくとも２５、少なくとも３０、少なくとも３５、少なくとも４０、少なくとも４５、少なくとも５０、少なくとも５５または６０を超えるＴＥＥ配列を含み得る。いくつかの態様において、ＲＮＡの５’ＵＴＲ中のＴＥＥ配列は、同じまたは異なるＴＥＥ配列である。いくつかの態様において、ＴＥＥ配列は、１回、２回または３回以上繰り返される、ＡＢＡＢＡＢもしくはＡＡＢＢＡＡＢＢＡＡＢＢもしくはＡＢＣＡＢＣＡＢＣまたはその変形などのパターンである。これらのパターンにおいて、Ａ、Ｂ、またはＣの各文字は、ヌクレオチドレベルで異なるＴＥＥ配列を表す。

【０１８３】

いくつかの態様において、２つのＴＥＥ配列を隔てるスペーサーは、ＲＮＡの翻訳を制御する当該技術分野において知られている他の配列、例えば、限定するものではないが、本明細書に記載されるｍｉＲ配列（例えば、ｍｉＲ結合部位及びｍｉＲシード）を含む。

いくつかの態様において、２つのＴＥＥ配列を隔てるために使用される各スペーサーは、異なるｍｉＲ配列またはｍｉＲ配列の構成要素（例えば、ｍｉＲシード配列）を含む。

【０１８４】

いくつかの態様において、本開示のＩＬ－１２をコードするヌクレオチド配列の５’ＵＴＲ中に使用されるＴＥＥは、ＩＲＥＳ配列であり、限定するものではないが、米国特許第７，４６８，２７５号及び国際特許公開第ＷＯ２００１０５５３６９号に記載されているものなどがあり、そのそれぞれは、その全体が参照により本明細書に援用される。

【０１８５】

いくつかの態様において、本明細書に記載されるＴＥＥは、ＩＬ－１２をコードするヌクレオチド配列の５’ＵＴＲ及び／または３’ＵＴＲに位置する。いくつかの態様において、３’ＵＴＲに位置するＴＥＥは、５’ＵＴＲに位置するＴＥＥ及び／または５’ＵＴＲに組み込むことが記載されたＴＥＥと同じであり、及び／または異なる。

【０１８６】

いくつかの態様において、ＩＬ－１２をコードするヌクレオチド配列の３’ＵＴＲは、少なくとも１、少なくとも２、少なくとも３、少なくとも４、少なくとも５、少なくとも６、少なくとも７、少なくとも８、少なくとも９、少なくとも１０、少なくとも１１、少なくとも１２、少なくとも１３、少なくとも１４、少なくとも１５、少なくとも１６、少なくとも１７、少なくとも１８、少なくとも１９、少なくとも２０、少なくとも２１、少なくとも２２、少なくとも２３、少なくとも２４、少なくとも２５、少なくとも３０、少なくとも３５、少なくとも４０、少なくとも４５、少なくとも５０、少なくとも５５または６０を超えるＴＥＥ配列を含み得る。いくつかの態様において、本開示のＩＬ－１２をコードするヌクレオチド配列の３’ＵＴＲ中のＴＥＥ配列は、同じまたは異なるＴＥＥ配列である。ＴＥＥ配列は、１回、２回または３回以上繰り返される、ＡＢＡＢＡＢもしくはＡＡＢＢＡＡＢＢＡＡＢＢもしくはＡＢＣＡＢＣＡＢＣまたはその変形などのパターンである。これらのパターンにおいて、Ａ、Ｂ、またはＣの各文字は、ヌクレオチドレベルで異なるＴＥＥ配列を表す。

【０１８７】

いくつかの態様において、３’ＵＴＲは、２つのＴＥＥ配列を隔てるスペーサーを含む。いくつかの態様において、スペーサーは、１５ヌクレオチドスペーサー及び／または当該技術分野において知られている他のスペーサーである。いくつかの態様において、３’ＵＴＲは、３’ＵＴＲ中で少なくとも１回、少なくとも２回、少なくとも３回、少なくとも４回、少なくとも５回、少なくとも６回、少なくとも７回、少なくとも８回及び少なくとも９回または９回以上繰り返されるＴＥＥ配列－スペーサーモジュールを含み得る。

【０１８８】

いくつかの態様において、２つのＴＥＥ配列を隔てるスペーサーは、ＩＬ－１２をコードするヌクレオチド配列の翻訳を制御する当該技術分野において知られている他の配列、例えば、限定するものではないが、本明細書に記載されるｍｉＲ配列（例えば、ｍｉＲ結合部位及びｍｉＲシード）を含む。いくつかの態様において、２つのＴＥＥ配列を隔てるために使用される各スペーサーは、異なるｍｉＲ配列またはｍｉＲ配列の構成要素（例えば、ｍｉＲシード配列）を含む。

【０１８９】

マイクロＲＮＡ結合部位の組み込み

いくつかの態様において、ＩＬ－１２をコードするヌクレオチド配列は、センサー配列を更に含む。センサー配列としては、例えば、マイクロＲＮＡ結合部位、転写因子結合部位、構造化ｍＲＮＡ配列及び／またはモチーフ、内因性核酸結合分子の類似受容体として作用するように設計された人工結合部位が挙げられる。少なくとも１つのセンサー配列を含むポリヌクレオチドの非限定的な例としては、米国出願第２０１４／０１４７４５４号に記載されており、その全体が参照により本明細書に援用される。

【０１９０】

いくつかの態様において、標的細胞または組織のマイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）プロフ

ァイリングを行って、細胞または組織中におけるｍｉＲＮＡの有無を決定することができる。

【０１９１】

マイクロＲＮＡ（またはｍｉＲＮＡ）は、１９～２５ヌクレオチド長のノンコーディングＲＮＡであり、核酸分子の３’ＵＴＲに結合し、核酸分子の安定性を低下させるか、または翻訳を阻害することのいずれかによって、遺伝子発現を下方制御する。いくつかの態様において、ＲＮＡ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シードを含む。そのような配列は、米国公開ＵＳ２００５／０２６１２１８及び米国公開ＵＳ２００５／００５９００５（その内容は、その全体が参照により本明細書に援用される）で教示されているものなどの任意の知られているマイクロＲＮＡに対応し得る。非限定的な例として、ヒトゲノムにおける既知のマイクロＲＮＡ、その配列及びシード配列は、米国出願第２０１４／０１４７４５４号に記載されており、その全体が参照により本明細書に援用される。

【０１９２】

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の領域中の配列を含み、この配列は、ｍｉＲＮＡ標的配列に対して完全なワトソン・クリック相補性を有する。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を含む。いくつかの態様において、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、対応するｍｉＲＮＡ標的のシード相補部位は、マイクロＲＮＡの位置１に対向するアデニン（Ａ）が隣接している。いくつかの態様において、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、対応するｍｉＲＮＡ標的のシード相補部位は、マイクロＲＮＡの位置１に対向するアデニン（Ａ）が隣接している。例えば、Ｇｒｉｍｓｏｎ Ａ，Ｆａｒｈ Ｋ，Ｊｏｈｎｓｔｏｎ Ｗ Ｋ，Ｇａｒｒｅｔｔ－Ｅｎｇｅｌｅ Ｐ，Ｌｉｍ Ｌ Ｐ，Ｂａｒｔｅｌ Ｄ Ｐ；Ｍｏｌ Ｃｅｌｌ．２００７ Ｊｕｌ．６；２７（１）：９１－１０５を参照されたい。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。本開示の核酸またはｍＲＮＡの３’ＵＴＲにマイクロＲＮＡ標的配列を操作することによって、当該マイクロＲＮＡが利用可能であれば、その分子を分解または翻訳低減の標的とすることができる。このプロセスにより、核酸分子送達におけるオフターゲットの危険性が減少する。マイクロＲＮＡ、マイクロＲＮＡの標的領域、及びその発現パターンならびに生物学における役割の特定は、報告されている（Ｂｏｎａｕｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｃｕｒｒ Ｄｒｕｇ Ｔａｒｇｅｔｓ ２０１０ １１：９４３－９４９；Ａｎａｎｄ ａｎｄ Ｃｈｅｒｅｓｈ Ｃｕｒｒ Ｏｐｉｎ Ｈｅｍａｔｏｌ ２０１１ １８：１７１－１７６；Ｃｏｎｔｒｅｒａｓ ａｎｄ Ｒａｏ Ｌｅｕｋｅｍｉａ ２０１２ ２６：４０４－４１３（２０１１ Ｄｅｃ．２０．ｄｏｉ：１０．１０３８／ｌｅｕ．２０１１．３５６）；Ｂａｒｔｅｌ Ｃｅｌｌ ２００９ １３６：２１５－２３３；Ｌａｎｄｇｒａｆ ｅｔ ａｌ，Ｃｅｌｌ，２００７ １２９：１４０１－１４１４；Ｇｅｎｔｎｅｒ ａｎｄ Ｎａｌｄｉｎｉ，Ｔｉｓｓｕｅ Ａｎｔｉｇｅｎｓ．２０１２ ８０：３９３－４０３及びその中の全ての参照文献；そのそれぞれは、その全体が参照により本明細書に援用される）。

【０１９３】

例えば、ｍＲＮＡが肝臓への送達を意図していないにもかかわらず、肝臓に到達してしまった場合、ｍｉＲ－１２２の１つまたは複数の標的部位が修飾核酸、強化修飾ＲＮＡまたはリボ核酸の３’ＵＴＲに操作されていれば、肝臓内に豊富に存在するマイクロＲＮＡであるｍｉＲ－１２２により、目的遺伝子の発現が阻害され得る。異なるマイクロＲＮＡに対する１つまたは複数の結合部位を導入することで、修飾核酸、強化修飾ＲＮＡまたはリボ核酸の寿命、安定性、及びタンパク質翻訳を更に減少させるように操作することができる。本明細書で使用される場合、「マイクロＲＮＡ部位」という用語は、マイクロＲＮＡ標的部位またはマイクロＲＮＡ認識部位、またはマイクロＲＮＡが結合もしく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うこともあれば、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マイクロＲＮＡの任意の安定した会合を反映することもあることを理解されたい。

【０１９４】

逆に、本開示のＩＬ－１２をコードするヌクレオチド配列の目的のために、天然に存在する配列からマイクロＲＮＡ結合部位を操作して外す（すなわち、除去する）ことで、特定の組織におけるタンパク質発現を増加させることができる。例えば、ｍｉＲ－１２２結合部位を除去して、肝臓におけるタンパク質発現を改善することができる。

【０１９５】

いくつかの態様において、ＩＬ－１２をコードするヌクレオチド配列は、特定の細胞、例えば、限定するものではないが、正常細胞及び／またはがん性細胞（例えば、ＨＥＰ３ＢまたはＳＮＵ４４９）に、細胞傷害性または細胞保護性ｍＲＮＡ治療薬を誘導するために、３’ＵＴＲに少なくとも１つのｍｉＲＮＡ結合部位を含む。

【０１９６】

マイクロＲＮＡがｍＲＮＡを制御することにより、タンパク質の発現が制御されることが知られている組織の例としては、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）が挙げられるが、これらに限定されない。

【０１９７】

具体的には、マイクロＲＮＡは、抗原提示細胞（ＡＰＣ）（例えば、樹状細胞及びマクロファージ）、マクロファージ、単球、Ｂリンパ球、Ｔリンパ球、顆粒球、ナチュラルキラー細胞などの免疫細胞（造血細胞とも呼ばれる）において差次的に発現することが知られている。免疫細胞特異的マイクロＲＮＡは、免疫原性、自己免疫、感染症に対する免疫応答、炎症、ならびに遺伝子療法及び組織／臓器移植後の望ましくない免疫応答に関与している。免疫細胞特異的マイクロＲＮＡはまた、造血細胞（免疫細胞）の発生、増殖、分化及びアポトーシスの多くの側面を制御している。例えば、ｍｉＲ－１４２及びｍｉＲ－１４６は、免疫細胞にのみ発現し、特に骨髄系樹状細胞に豊富である。送達される遺伝子コンストラクトの３’ＵＴＲにｍｉＲ－１４２結合部位を付加することによって、外因性核酸分子に対する免疫応答が遮断され、組織及び細胞におけるより安定な遺伝子導入が可能であることが当該技術分野において示されている。ｍｉＲ－１４２は、抗原提示細胞において外因性ｍＲＮＡを効率的に分解し、形質導入細胞の細胞傷害による排除を抑制する（Ａｎｎｏｎｉ Ａ ｅｔ ａｌ．，ｂｌｏｏｄ，２００９，１１４，５１５２－５１６１；Ｂｒｏｗｎ Ｂ Ｄ，ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ ｍｅｄ．２００６，１２（５），５８５－５９１；Ｂｒｏｗｎ Ｂ Ｄ，ｅｔ ａｌ．，ｂｌｏｏｄ，２００７，１１０（１３）：４１４４－４１５２、そのそれぞれは、その全体が参照により本明細書に援用される）。

【０１９８】

様々ながん細胞／組織及び他の疾患におけるマイクロＲＮＡの差次的発現をプロファイリングするために、当該技術分野では、多くのマイクロＲＮＡ発現研究が実施されている。マイクロＲＮＡは、ある特定のがん細胞で異常に過剰発現するものもあれば、過小発現するものもある。例えば、マイクロＲＮＡは、がん細胞で差次的に発現している（ＷＯ２００８／１５４０９８、ＵＳ２０１３／００５９０１５、ＵＳ２０１３／００４２３３３、ＷＯ２０１１／１５７２９４）；がん幹細胞（ＵＳ２０１２／００５３２２４）；膵癌及び膵臓疾患（ＵＳ２００９／０１３１３４８、ＵＳ２０１１／０１７１６４６、ＵＳ２０１０／０２８６２３２、米国特許第８，３８９，２１０号）；喘息及び炎症（米国特許第８，４１５，０９６号）；前立腺癌（ＵＳ２０１３／００５３２６４）；肝細胞癌（Ｗ

Ｏ２０１２／１５１２１２、ＵＳ２０１２／０３２９６７２、ＷＯ２００８／０５４８２８、米国特許第８，２５２，５３８号）；肺癌細胞（ＷＯ２０１１／０７６１４３、ＷＯ２０１３／０３３６４０、ＷＯ２００９／０７０６５３、ＵＳ２０１０／０３２３３５７）；皮膚Ｔ細胞リンパ腫（ＷＯ２０１３／０１１３７８）；大腸癌細胞（ＷＯ２０１１／０２８１７５６、ＷＯ２０１１／０７６１４２）；がん陽性リンパ節（ＷＯ２００９／１００４３０、ＵＳ２００９／０２６３８０３）；鼻咽腔癌（ＥＰ２１１２２３５）；慢性閉塞性肺疾患（ＵＳ２０１２／０２６４６２６、ＵＳ２０１３／００５３２６３）；甲状腺癌（ＷＯ２０１３／０６６６７８）；卵巣癌細胞（ＵＳ２０１２／０３０９６４５、ＷＯ２０１１／０９５６２３）；乳癌細胞（ＷＯ２００８／１５４０９８、ＷＯ２００７／０８１７４０、ＵＳ２０１２／０２１４６９９）、白血病及びリンパ腫（ＷＯ２００８／０７３９１５、ＵＳ２００９／００９２９７４、ＵＳ２０１２／０３１６０８１、ＵＳ２０１２／０２８３３１０、ＷＯ２０１０／０１８５６３、それぞれの内容は、その全体が参照により本明細書に援用される）。

【０１９９】

少なくとも１つのマイクロＲＮＡ部位が、ＩＬ－１２をコードするヌクレオチド配列の３’ＵＴＲに操作され得る。いくつかの態様において、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またはそれ以上のマイクロＲＮＡ部位が、ＩＬ－１２をコードするヌクレオチド配列の３’ＵＴＲに操作され得る。いくつかの態様において、ＩＬ－１２をコードするヌクレオチド配列中に組み込まれるマイクロＲＮＡ部位は、同じまたは異なるマイクロＲＮＡ部位である。いくつかの態様において、ＩＬ－１２をコードするヌクレオチド配列中に組み込まれるマイクロＲＮＡ部位は、体内の同じまたは異なる組織を標的とする。非限定的な例として、ｍＲＮＡの３’ＵＴＲに組織、細胞種、または疾患に特異的なマイクロＲＮＡ結合部位を導入することにより、特定の細胞種（例えば、肝細胞、骨髄細胞、内皮細胞、がん細胞など）における発現の程度を減少させることができる。

【０２００】

いくつかの態様において、マイクロＲＮＡ部位は、３’ＵＴＲの５’末端付近、３’ＵＴＲの５’末端と３’末端のほぼ中間及び／または３’ＵＴＲの３’末端付近に操作される。いくつかの態様において、マイクロＲＮＡ部位は、３’ＵＴＲの５’末端付近及び３’ＵＴＲの５’末端と３’末端のほぼ中間に操作される。いくつかの態様において、マイクロＲＮＡ部位は、３’ＵＴＲの３’末端付近及び３’ＵＴＲの５’末端と３’末端のほぼ中間に操作される。いくつかの態様において、マイクロＲＮＡ部位は、３’ＵＴＲの５’末端付近及び３’ＵＴＲの３’末端付近に操作される。

【０２０１】

いくつかの態様において、ｍＲＮＡは、既知のシード配列に対して１００％の同一性を有するか、またはシード配列に対して１００％未満の同一性を有するかのいずれかのマイクロＲＮＡ結合領域部位を含む。シード配列は、マイクロＲＮＡの結合親和性が低下するように部分的に変異させてもよく、その結果、そのｍＲＮＡ転写物の下方調節が減少する。本質的に、標的ｍＲＮＡとマイクロＲＮＡシードとの間のマッチまたはミスマッチの程度は、マイクロＲＮＡがタンパク質発現を調節する能力をより微細に調整するためのレオスタットとして作用し得る。加えて、マイクロＲＮＡ結合部位の非シード領域における変異もまた、マイクロＲＮＡがタンパク質発現を調節する能力に影響し得る。

【０２０２】

ＲＮＡ結合タンパク質（ＲＢＰ）のＲＮＡモチーフ

ＲＮＡ結合タンパク質（ＲＢＰ）は、同時転写及び転写後の遺伝子発現の多数の側面、例えば、限定するものではないが、ＲＮＡスプライシング、局在化、翻訳、ターンオーバー、ポリアデニル化、キャッピング、修飾、輸出及び局在化を制御し得る。ＲＮＡ結合ドメイン（ＲＢＤ）、例えば、限定するものではないが、ＲＮＡ認識モチーフ（ＲＲ）及びｈｎＲＮＰ　Ｋホモロジー（ＫＨ）ドメインは、典型的に、ＲＢＰとそのＲＮＡ標的との間の配列会合を制御する（Ｒａｙ　ｅｔ　ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ　２０１３．４９９：１７

２－１７７；その全体が参照により本明細書に援用される）。いくつかの態様において、標準的なＲＢＤは、短いＲＮＡ配列に結合する。いくつかの態様において、標準的なＲＢＤは、ＲＮＡ構造を認識する。

【０２０３】

ＲＮＡ結合タンパク質ならびに関連する核酸及びタンパク質配列の非限定的な例は、米国出願第２０１４／０１４７４５４号に記載されており、その全体が参照により本明細書に援用される。

【０２０４】

いくつかの態様において、目的のｍＲＮＡの安定性を高めるために、ＨｕＲをコードするｍＲＮＡが、目的のｍＲＮＡとともに細胞または組織にコトランスフェクトまたは同時注入される。これらのタンパク質はまた、ｉｎ　ｖｉｔｒｏで目的のｍＲＮＡにつないで、次いで、一緒に細胞に投与することもできる。ポリＡテール結合タンパク質のＰＡＢＰは、真核生物の翻訳開始因子ｅＩＦ４Ｇと相互作用して、翻訳開始を刺激する。これらのＲＢＰをコードするｍＲＮＡをｍＲＮＡ薬とともに共投与すること、及び／またはこれらのタンパク質をｉｎ　ｖｉｔｒｏでｍＲＮＡ薬につなぎ、タンパク質が結合したｍＲＮＡを細胞に投与することで、ｍＲＮＡの翻訳効率を高めることができる。同概念は、ＲＮＡ安定性及び／または翻訳効率に影響を与えるために、様々な翻訳因子及び促進因子をコードするｍＲＮＡならびにタンパク質そのものとともにｍＲＮＡを共投与することに拡張することができる。

【０２０５】

いくつかの態様において、ＩＬ－１２をコードするヌクレオチド配列は、限定するものではないが、ＲＮＡ結合ドメイン（ＲＢＤ）などの少なくとも１つのＲＮＡ結合モチーフを含む。

【０２０６】

いくつかの態様において、連結ヌクレオシドの第１の領域及び／または少なくとも１つのフランキング領域は、少なくとも１つのＲＢＤを含む。いくつかの態様において、連結ヌクレオシドの第１の領域は、スプライシング因子に関連するＲＢＤを含み、少なくとも１つのフランキング領域は、安定性及び／または翻訳因子に関するＲＢＤを含む。

【０２０７】

３’ＵＴＲの他の調節エレメント

マイクロＲＮＡ結合部位に加えて、異なる組織及び細胞におけるｍＲＮＡ安定性及び翻訳を制御する天然ｍＲＮＡの３’－ＵＴＲ中の他の調節配列を除去したり、またはＲＮＡに導入してもよい。そのようなシス調節エレメントには、Ｃｉｓ－ＲＮＰ（リボ核タンパク質）／ＲＢＰ（ＲＮＡ結合タンパク質）調節エレメント、ＡＵリッチエレメント（ＡＵＥ）、構造化ステムループ、構成的崩壊エレメント（ＣＤＥ）、ＧＣリッチ及び他の構造化ｍＲＮＡモチーフ（Ｐａｒｋｅｒ　Ｂ　Ｊ　ｅｔ　ａｌ．，Ｇｅｎｏｍｅ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ，２０１１，２１，１９２９－１９４３、その全体が参照により本明細書に援用される）が含まれるが、これらに限定されない。例えば、ＣＤＥは、Ｒｏｑｕｉｎタンパク質との相互作用によりｍＲＮＡ分解を媒介する調節モチーフの一種である。特に、ＣＤＥは、発生及び炎症の調節因子をコードする多くのｍＲＮＡに見出され、マクロファージにおけるサイトカイン産生を制限する（Ｌｅｐｐｅｋ　Ｋ　ｅｔ　ａｌ．，２０１３，Ｃｅｌｌ，１５３，８６９－８８１、その全体が参照により本明細書に援用される）。

【０２０８】

いくつかの態様において、ＲＮＡは、栄養要求性である。本明細書で使用される場合、「栄養要求性」という用語は、タンパク質発現が実質的に阻止または減少するように、空間的または時間的合図に応答して、ｍＲＮＡの分解または不活性化を誘発、促進、または誘導する少なくとも１つの特徴を含むｍＲＮＡを指す。そのような空間的または時間的合図には、翻訳されるｍＲＮＡの場所、例えば、特定の組織もしくは器官または細胞環境が含まれる。温度、ｐＨ、イオン強度、含水量などに関する合図も企図される。

【０２０９】

３’ＵＴＲ及びＡＵリッチエレメント

３’ＵＴＲは、アデノシン及びウリジンのストレッチが埋め込まれていることが知られている。これらのＡＵに富むシグネチャーは、ターンオーバー率の高い遺伝子に特に多く見られる。配列の特徴及び機能特性に基づいて、ＡＵリッチエレメント（ＡＲＥ）は、３つのクラスに分けることができる（Ｃｈｅｎ　ｅｔ　ａｌ，１９９５）。クラスＩのＡＲＥは、Ｕリッチ領域内にＡＵＵＵＡモチーフのいくつかのコピーを分散して含有する。Ｃ－Ｍｙｃ及びＭｙｏＤは、クラスＩのＡＲＥを含有する。クラスＩＩのＡＲＥは、２つ以上の重複するＵＵＡＵＵＵＡ（Ｕ／Ａ）（Ｕ／Ａ）九量体を有する。このタイプのＡＲＥを含有する分子には、ＧＭ－ＣＳＦ及びＴＮＦ－ａが含まれる。クラスＩＩＩのＡＲＥＳは、あまり定義されていない。これらのＵリッチ領域は、ＡＵＵＵＡモチーフを含有しない。ｃ－Ｊｕｎ及びミオゲニンは、このクラスのなかでも十分に研究された２つの例である。ＡＲＥに結合するタンパク質の大部分は、メッセンジャーを不安定化させることが知られているが、ＥＬＡＶファミリーのメンバー、特にＨｕＲは、ｍＲＮＡの安定性を高めることが示されている。ＨｕＲは、３つのクラス全てのＡＲＥに結合する。核酸分子の３’ＵＴＲにＨｕＲ特異的結合部位を操作すると、ＨｕＲ結合が生じ、これにより、ｉｎｖｉｖｏでメッセンジャーが安定化する。

【０２１０】

３’ＵＴＲ　ＡＵリッチエレメント（ＡＲＥ）の導入、除去または修飾は、本開示の核酸またはｍＲＮＡの安定性を調節するために使用することができる。特定の核酸またはｍＲＮＡを操作する場合、ＡＲＥの１つ以上のコピーを導入して、本開示の核酸またはｍＲＮＡの安定性を低下させ、それにより、翻訳を減らし、結果として生じるタンパク質の産生を減少させることができる。同様に、細胞内安定性を高めるために、ＡＲＥを同定して、除去または変異させ、それにより、翻訳を増加させ、結果として生じるタンパク質の産生を増加させることができる。本開示の核酸またはｍＲＮＡを使用して、関連する細胞株でトランスフェクション実験を実施し、トランスフェクション後の様々な時点でタンパク質産生をアッセイすることができる。例えば、異なるＡＲＥ操作分子を細胞にトランスフェクトし、関連するタンパク質に対するＥＬＩＳＡキットを使用し、トランスフェクションから約６時間、約１２時間、約２４時間、約４８時間、及び／または約７日後に産生されるタンパク質をアッセイすることができる。

【０２１１】

３’ＵＴＲ及びトリプルヘリックス

いくつかの態様において、ＩＬ－１２をコードするヌクレオチド配列は、核酸、ＩＬ－１２をコードする強化ヌクレオチド配列またはリボ核酸の３’末端にトリプルヘリックスを含む。いくつかの態様において、ＩＬ－１２をコードするヌクレオチド配列の３’末端は、トリプルヘリックスを単独でまたはポリＡテールと組み合わせて含む。

【０２１２】

いくつかの態様において、ＩＬ－１２をコードするヌクレオチド配列は、少なくとも第１及び第２のＵリッチ領域、第１と第２の領域の間の保存ステムループ領域ならびにＡリッチ領域を含む。いくつかの態様において、第１及び第２のＵリッチ領域とＡリッチ領域は、会合して、核酸の３’末端のトリプルヘリックスを形成する。このトリプルヘリックスは、核酸を安定化させ、核酸の翻訳効率を高め、及び／または３’末端を分解から保護することができる。例示的なトリプルヘリックスとしては、転移関連肺腺癌転写物１（ＭＡＬＡＴ１）、ＭＥＮ－β及びポリアデニル化核（ＰＡＮ）ＲＮＡのトリプルヘリックス配列が挙げられるが、これらに限定されない（Ｗｉｌｕｓｚ　ｅｔ　ａｌ．，Ｇｅｎｅｓ　＆　Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ　２０１２　２６：２３９２－２４０７を参照されたく、その全体が参照により本明細書に援用される）。

【０２１３】

ステムループ

いくつかの態様において、ＩＬ－１２をコードするヌクレオチド配列は、限定するものではないが、ヒストンステムループなどのステムループを含む。いくつかの態様において

、ステムループは、約２５または約２６ヌクレオチド長のヌクレオチド配列であり、限定するものではないが、国際特許公開第ＷＯ２０１３１０３６５９号に記載される配列番号７～１７などがあり、その全体が参照により本明細書に援用される。ヒストンステムループは、コーディング領域に対して３’側（例えば、コーディング領域の３’末端）に位置し得る。非限定的な例として、ステムループは、本明細書に記載される核酸の３’末端に位置し得る。

【０２１４】

いくつかの態様において、ヒストンステムループを含むＩＬ－１２をコードするヌクレオチド配列は、少なくとも１つの鎖終結ヌクレオシドの付加によって安定化され得る。理論に拘束されることを望むものではないが、少なくとも１つの鎖終結ヌクレオシドを付加すると、核酸の分解を遅らせることができ、したがって、核酸の半減期を延ばすことができる。

【０２１５】

いくつかの態様において、鎖終結ヌクレオシドは、国際特許公開第ＷＯ２０１３１０３６５９号に記載されているものであり、その全体が参照により本明細書に援用される。いくつかの態様において、鎖終結ヌクレオシドは、３’－デオキシアデノシン（コルジセピン）、３’－デオキシウリジン、３’－デオキシシトシン、３’－デオキシグアノシン、３’－デオキシチミン、２’，３’－ジデオキシヌクレオシド、例えば、２’，３’－ジデオキシアデノシン、２’，３’－ジデオキシウリジン、２’，３’－ジデオキシシトシン、２’，３’－ジデオキシグアノシン、２’，３’－ジデオキシチミン、２’－デオキシヌクレオシド、または－Ｏ－メチルヌクレオシドである。

【０２１６】

いくつかの態様において、ＩＬ－１２をコードするヌクレオチド配列は、ヒストンステムループ、ポリＡテール配列及び／または５’キャップ構造を含む。いくつかの態様において、ヒストンステムループは、ポリＡテール配列の前及び／または後にある。ヒストンステムループ及びａポリＡテール配列を含む核酸は、本明細書に記載される鎖終結ヌクレオシドを含み得る。

【０２１７】

いくつかの態様において、ＩＬ－１２をコードするヌクレオチド配列は、ヒストンステムループ及び５’キャップ構造を含む。５’キャップ構造には、本明細書に記載されるもの及び／または当該技術分野において知られているものが含まれるが、これらに限定されない。

【０２１８】

５’キャッピング

ｍＲＮＡの５’キャップ構造は、核外輸送に関与し、ｍＲＮＡ安定性を高め、ｍＲＮＡキャップ結合タンパク質（ＣＢＰ）に結合する。ＣＢＰは、ポリ（Ａ）結合タンパク質と会合し、成熟環式ｍＲＮＡ種を形成することにより、細胞内でのｍＲＮＡ安定性及び翻訳能力を担っている。キャップは、更に、ｍＲＮＡスプライシング中に、５’隣接イントロンの除去の除去を助ける。

【０２１９】

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

【０２２０】

本開示のＲＮＡに対する修飾は、キャッピング除去を防ぐことにより、ｍＲＮＡ半減期を増加させる非加水分解性キャップ構造を生成してもよい。キャップ構造の加水分解には

、５’－ｐｐｐ－５’ホスホロジエステル結合の切断を必要とするので、修飾ヌクレオチドをキャッピング反応中に使用することができる。例えば、Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ（Ｉｐｓｗｉｃｈ，Ｍａｓｓ．）のワクシニアキャッピング酵素をα－チオ－グアノシンヌクレオチドとともに製造者の説明書に従って使用することで、５’－ｐｐｐ－５’キャップ中にホスホロチオエート結合を生成することができる。α－メチル－ホスホン酸及びセレノ－リン酸ヌクレオチドなどの追加の修飾グアノシンヌクレオチドを使用することもできる。

【０２２１】

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

【０２２２】

本明細書において、合成キャップ類似体、化学的キャップ、化学的キャップ類似体、または構造的もしくは機能的キャップ類似体とも称されるキャップ類似体は、天然（すなわち、内因性、野生型または生理学的）５’－キャップとは化学構造が異なるが、キャップ機能は保持している。キャップ類似体は、化学的（すなわち、非酵素的）または酵素的に合成され、及び／核酸分子に結合することができる。

【０２２３】

例えば、アンチリバースキャップ類似体（ＡＲＣＡ）キャップは、５’－５’－三リン酸基によって連結された２つのグアニンを含有し、ここで、１つのグアニンは、Ｎ７メチル基及び３’－Ｏ－メチル基を含有する（すなわち、Ｎ７，３’－Ｏ－ジメチル－グアノシン－５’－三リン酸－５’－グアノシン（ｍ７Ｇ－３’ｍｐｐｐ－Ｇ；これは同等に３’Ｏ－Ｍｅ－ｍ７Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）Ｇと示すこともできる）。他方の非修飾グアニンの３’－Ｏ原子は、キャップされた核酸分子（例えば、ｍＲＮＡまたはｍｍＲＮＡ）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またはｍｍＲＮＡ）の末端部分を提供する。

【０２２４】

他の例示的なキャップは、ｍＣＡＰであり、これは、ＡＲＣＡに類似するが、グアノシン上に２’－β－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’－三リン酸－５’－グアノシン、ｍ７Ｇｍ－ｐｐｐ－Ｇ）。

【０２２５】

いくつかの態様において、キャップは、ジヌクレオチドキャップ類似体である。いくつかの態様において、ジヌクレオチドキャップ類似体は、米国特許第８，５１９，１１０号（当該内容は、その全体が参照により本明細書に援用される）に記載されているジヌクレオチドキャップ類似体のように、異なるリン酸位置がボラノリン酸基またはホホロセレノ酸基で修飾される。

【０２２６】

いくつかの態様において、キャップは、キャップ類似体であり、当該技術分野において知られている及び／または本明細書に記載されるキャップ類似体のＮ７－（４－クロロフェノキシエチル）置換ジククレオチド形態である。キャップ類似体Ｎ７－（４－クロロフェノキシエチル）置換ジヌクレオチド形態の非限定的な例としては、Ｎ７－（４－クロロフェノキシエチル）－Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）Ｇ及びＮ７－（４－クロロフェノキシエチル）－ｍ３’－ＯＧ（５’）ｐｐｐ（５’）Ｇキャップ類似体が挙げられる（例えば、Ｋｏｒｅ　ｅｔ　ａｌ．Ｂｉｏｏｒｇａｎｉｃ　＆　Ｍｅｄｉｃｉｎａｌ　Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　２０１３　２１：４５７０－４５７４に記載されている様々なキャップ類似体及びキャップ類似体を合成する方法を参照されたい；当該内容は、その全体が参照により本明細書に援用される）。いくつかの態様において、本開示のキャップ類似体は、４－クロロ／ブロモフェノキシエチル類似体である。

【０２２７】

キャップ類似体は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ転写反応において、核酸分子を同時にキャッピングすることが可能であるが、転写物の最大２０％は、キャップされないままである。これは、キャップ類似体の構造が内因性細胞転写機構によって生成される核酸の内因性５’キャップ構造とは異なることに加え、翻訳能力の低下及び細胞安定性の低下につながり得る。したがって、いくつかの態様において、本明細書で提供される方法（例えば、実施例１～３参照）は、本明細書に記載される産生されるＩＬ－１２発現ヌクレオチドのキャッピング効率を高めることが可能である。いくつかの態様において、本明細書で提供される方法により、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５５％、少なくとも約６０％、少なくとも約６５％、少なくとも約７０％、少なくとも約７５％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、約１００％のポリヌクレオチドがキャップされる。いくつかの態様において、本明細書で提供される方法により、少なくとも約５０％のポリヌクレオチドがキャップされる。いくつかの態様において、少なくとも約６０％のポリヌクレオチドがキャップされる。いくつかの態様において、少なくとも約７０％のポリヌクレオチドがキャップされる。いくつかの態様において、少なくとも約８０％のポリヌクレオチドがキャップされる。いくつかの態様において、少なくとも約８５％のポリヌクレオチドがキャップされる。いくつかの態様において、少なくとも約９０％のポリヌクレオチドがキャップされる。いくつかの態様において、少なくとも約９５％のポリヌクレオチドがキャップされる。いくつかの態様において、約１００％のポリヌクレオチドがキャップされる。いくつかの態様において、少なくとも約８０％～約１００％のポリヌクレオチドがキャップされる。

【０２２８】

いくつかの態様において、５’－キャップまたは５’－キャップ類似体を含むＲＮＡの提供は、当該５’－キャップまたは５’－キャップ類似体の存在下で、ＤＮＡ鋳型をｉｎ　ｖｉｔｒｏ転写することによって達成され、ここで、当該５’－キャップは、生成されたＲＮＡ鎖に同時転写的に組み込まれる。

【０２２９】

いくつかの態様において、ＲＮＡは、例えば、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ転写により生成され得、５’キャップは、キャッピング酵素、例えば、ワクシニアウイルスのキャッピング酵素を使用して、転写後にＲＮＡに結合され得る。いくつかの態様において、ＩＬ－１２をコードするヌクレオチド配列は、より真正な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る。本明細書で使用される場合、「より真正な」という表現は、内因性または野生型の特徴を構造的または機能的のいずれかで厳密に反映または模倣する特徴を指す。すなわち、「より真正な」特徴は、従来技術の合成的特徴または類似体などと比較して、内因性、野生型、天然または生理学的な細胞機能及び／または構造を良好に表すものであり、あるいは、対応する内因性、野生型、天然または生理学的な特徴を１つ以上の点で上回るものである。本開示のより真正な５’キャップ構造の非限定的な例は、とりわけ、当該技術分野において知られている合成５’キャップ構造（または野生型、天然もしくは生理学的な５’キャップ構造）と比較して、キャップ結合タンパク質の結合を増強するもの、半減期を延ばすもの、５’エンドヌクレアーゼに対する感受性を低下させるもの及び／または５’キャッピング除去を減少させるものである。例えば、組み換えワクシニアウイルスキャッピング酵素及び組み換え２’－Ｏ－メチル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’－三リン酸連結を生成することができ、ここで、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。このキャップは、例えば、当該技術分野において知られている他の５’キャップ類似体構造と比較して、より高い翻訳能力及び細胞安定性、ならびに細胞炎症促進性サイトカインの活性化の減少をもたらす。キャップ構造には、７ｍＧ（５’）ｐｐｐ（５’）Ｎ，ｐＮ２ｐ、７ｍＧ（５’）ｐｐｐ（５’）ＮｌｍｐＮｐ、７ｍＧ（５’）－ｐｐｐ（５’）Ｎｌｍ

ｐＮ２ｍｐ及びｍ（７）Ｇｐｐｐｍ（３）（６，６，２’）Ａｐｍ（２’）Ａｐｍ（２’）Ｃｐｍ（２）（３，２’）Ｕｐが含まれる。

【０２３０】

いくつかの態様において、５’末端キャップは、内因性キャップまたはキャップ類似体を含む。いくつかの態様において、５’末端キャップは、グアニン類似体を含む。有用なグアニン類似体には、イノシン、Ｎ１－メチル－グアノシン、２’フルオロ－グアノシン、７－デアザ－グアノシン、８－オキソ－グアノシン、２－アミノ－グアノシン、ＬＮＡ－グアノシン、及び２－アジド－グアノシンが含まれる。

【０２３１】

いくつかの態様において、５’キャップは、５’－５’三リン酸連結を含む。いくつかの態様において、５’キャップは、チオリン酸修飾を含む５’－５’三リン酸連結を含む。いくつかの態様において、５’キャップは、２´－Ｏまたは３´－Ｏ－リボース－メチル化ヌクレオチドを含む。いくつかの態様において、５’キャップは、修飾グアノシンヌクレオチドまたは修飾アデノシンヌクレオチドを含む。いくつかの態様において、５’キャップは、７－メチルグアニル酸を含む。例示的なキャップ構造としては、ｍ７Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）Ｇ、ｍ７，２`Ｏ－ｍＧ（５’）ｐｐＳｐ（５’）Ｇ、ｍ７Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）２`Ｏ－ｍＧ、及びｍ７，３`Ｏ－ｍＧ（５’）ｐｐｐ（５’）２`Ｏ－ｍＡが挙げられる。

【０２３２】

いくつかの態様において、ＩＬ－１２をコードするヌクレオチド配列は、修飾５’キャップを含む。５’キャップ上の修飾は、ｍＲＮＡの安定性を高め、ｍＲＮＡの半減期を増加させることができ、ｍＲＮＡ翻訳効率を高め得る。いくつかの態様において、修飾５’キャップは、次の修飾のうちの１つ以上を含む：キャップされたグアノシン三リン酸（ＧＴＰ）の２’位及び／もしくは３’位における修飾、糖環酸素（炭素環を形成しているもの）のメチレン部分（ＣＨ２）での置換、キャップ構造の三リン酸架橋部分における修飾、または核酸塩基（Ｇ）部分における修飾。

【０２３３】

修飾され得る５’キャップ構造には、米国出願第２０１４／０１４７４５４号及びＷＯ２０１８／１６０５４０（その全体が参照により本明細書に援用される）に記載されているキャップが含まれるが、これらに限定されない。

【０２３４】

ＩＲＥＳ配列

いくつかの態様において、ＩＬ－１２をコードするヌクレオチド配列は、配列内リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ）を含む。最初にピコルナウイルスＲＮＡの特徴として同定されたＩＲＥＳは、５’キャップ構造がない場合におけるタンパク質合成の開始に重要な役割を果たす。ＩＲＥＳは、ｍＲＮＡのリボソーム結合部位として単独で機能することもできれば、複数のリボソーム結合部位の１つとして機能することもできる。複数の機能的リボソーム結合部位を含有する核酸または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することができる（「マルチシストロン性核酸分子」）。核酸またはｍＲＮＡがＩＲＥＳを備える場合、任意選択により、第２の翻訳可能領域が更に提供される。本開示に従って使用することができるＩＲＥＳ配列の例としては、限定するものではないが、ピコルナウイルス（例えば、ＦＭＤＶ）、ペストウイルス（ＣＦＦＶ）、ポリオウイルス（ＰＶ）、脳心筋炎ウイルス（ＥＣＭＶ）、口蹄疫ウイルス（ＦＭＤＶ）、Ｃ型肝炎ウイルス（ＨＣＶ）、ブタコレラウイルス（ＣＳＦＶ）、マウス白血病ウイルス（ＭＬＶ）、サル免疫不全ウイルス（ＳＩＶ）またはコオロギ麻痺ウイルス（ＣｒＰＶ）に由来するものが挙げられる。

【０２３５】

末端構造修飾：ポリＡテール

メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）分子には、通常、ＲＮＡプロセシングの際に、分子の安定性を高めるためにアデニンヌクレオチド（ポリＡテール）の長鎖が付加される。転

写直後に、転写物の３’末端が切断され、３’ヒドロキシル基が遊離する。次いで、ポリＡポリメラーゼがアデニンヌクレオチド鎖をＲＮＡに付加する。ポリアデニル化と呼ばれるプロセスは、１００～２５０残基長のポリＡテールを付加する。

【０２３６】

いくつかの態様において、３’テールの長さは、約３０ヌクレオチド長よりも長い。いくつかの態様において、ポリＡテールは、約３５ヌクレオチド長よりも長い。いくつかの態様において、長さは、少なくとも約４０ヌクレオチドである。いくつかの態様において、長さは、少なくとも約４５ヌクレオチドである。いくつかの態様において、長さは、少なくとも約５５ヌクレオチドである。いくつかの態様において、長さは、少なくとも約６０ヌクレオチドである。いくつかの態様において、長さは、少なくとも約７０ヌクレオチドである。いくつかの態様において、長さは、少なくとも約８０ヌクレオチドである。いくつかの態様において、長さは、少なくとも約９０ヌクレオチドである。いくつかの態様において、長さは、少なくとも約１００ヌクレオチドである。いくつかの態様において、長さは、少なくとも約１２０ヌクレオチドである。いくつかの態様において、長さは、少なくとも約１４０ヌクレオチドである。いくつかの態様において、長さは、少なくとも約１６０ヌクレオチドである。いくつかの態様において、長さは、少なくとも約１８０ヌクレオチドである。いくつかの態様において、長さは、少なくとも約２００ヌクレオチドである。いくつかの態様において、長さは、少なくとも約２５０ヌクレオチドである。いくつかの態様において、長さは、少なくとも約３００ヌクレオチドである。いくつかの態様において、長さは、少なくとも約３５０ヌクレオチドである。いくつかの態様において、長さは、少なくとも約４００ヌクレオチドである。いくつかの態様において、長さは、少なくとも約４５０ヌクレオチドである。いくつかの態様において、長さは、少なくとも約５００ヌクレオチドである。いくつかの態様において、長さは、少なくとも約６００ヌクレオチドである。いくつかの態様において、長さは、少なくとも約７００ヌクレオチドである。いくつかの態様において、長さは、少なくとも約８００ヌクレオチドである。いくつかの態様において、長さは、少なくとも約９００ヌクレオチドである。いくつかの態様において、長さは、少なくとも約１０００ヌクレオチドである。いくつかの態様において、長さは、少なくとも約１１００ヌクレオチドである。いくつかの態様において、長さは、少なくとも約１２００ヌクレオチドである。いくつかの態様において、長さは、少なくとも約１３００ヌクレオチドである。いくつかの態様において、長さは、少なくとも約１４００ヌクレオチドである。いくつかの態様において、長さは、少なくとも約１５００ヌクレオチドである。いくつかの態様において、長さは、少なくとも約１６００ヌクレオチドである。いくつかの態様において、長さは、少なくとも約１７００ヌクレオチドである。いくつかの態様において、長さは、少なくとも約１８００ヌクレオチドである。いくつかの態様において、長さは、少なくとも約１９００ヌクレオチドである。いくつかの態様において、長さは、少なくとも約２０００ヌクレオチドである。いくつかの態様において、長さは、少なくとも約２５００ヌクレオチドである。いくつかの態様において、長さは、少なくとも約３０００ヌクレオチドである。

【０２３７】

いくつかの態様において、ＩＬ－１２をコードするヌクレオチド配列は、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、４つのグアニンヌクレオチドが環状に水素結合した配列であり、ＤＮＡとＲＮＡの両方において、Ｇリッチ配列によって形成され得る。この態様において、Ｇカルテットは、ポリＡテールの末端に組み込まれる。得られた核酸またはｍＲＮＡは、安定性、タンパク質産生及び様々な時点における半減期を含む他のパラメーターについてアッセイすることができる。ポリＡ－Ｇカルテットは、１２０ヌクレオチドのポリＡテールを単独で使用した場合に見られるタンパク質産生の少なくとも７５％に相当するタンパク質産生をもたらすことが見出されている。

【０２３８】

いくつかの態様において、ＩＬ－１２をコードするヌクレオチド配列は、ポリＡテールを含み、鎖終結ヌクレオシドの付加によって安定化される。いくつかの態様において、ポ

リＡテールを含むＩＬ－１２をコードするヌクレオチド配列は、５’キャップ構造を更に含む。

【０２３９】

いくつかの態様において、ＩＬ－１２をコードするヌクレオチド配列は、ポリＡ－Ｇカルテットを含む。いくつかの態様において、ポリＡ－Ｇカルテットを含むＩＬ－１２をコードするヌクレオチド配列は、５’キャップ構造を更に含む。

【０２４０】

いくつかの態様において、ポリＡテールまたはポリＡ－Ｇカルテットを含むＩＬ－１２をコードするヌクレオチド配列は、３’－デオキシヌクレオシド、２’，３’－ジデオキシヌクレオシド３’－０－メチルヌクレオシド、３’－０－エチルヌクレオシド、３’－アラビノシド、ならびに当該技術分野において知られている及び／または本明細書に記載される他の修飾ヌクレオシドで終結するオリゴヌクレオチドの付加によって安定化される。

【０２４１】

修飾ヌクレオシド

いくつかの態様において、ＩＬ－１２をコードするヌクレオチド配列は、１つ以上の修飾ヌクレオシドを含む。いくつかの態様において、１つ以上の修飾ヌクレオシドは、６－アザ－シチジン、２－チオ－シチジン、α－チオ－シチジン、シュード－イソ－シチジン、５－アミノアリル－ウリジン、５－ヨード－ウリジン、Ｎ１－メチル－シュードウリジン、５，６－ジヒドロウリジン、α－チオ－ウリジン、４－チオ－ウリジン、６－アザ－ウリジン、５－ヒドロキシ－ウリジン、デオキシ－チミジン、シュード－ウリジン、イノシン、α－チオ－グアノシン、８－オキソ－グアノシン、Ｏ６－メチル－グアノシン、７－デアザ－グアノシン、Ｎ１－メチルアデノシン、２－アミノ－６－クロロ－プリン、Ｎ６－メチル－２－アミノ－プリン、６－クロロ－プリン、Ｎ６－メチル－アデノシン、α－チオ－アデノシン、８－アジド－アデノシン、７－デアザ－アデノシン、ピロロ－シチジン、５－メチル－シチジン、Ｎ４－アセチル－シチジン、５－メチル－ウリジン、５－ヨード－シチジン、及びこれらの組み合わせを含む。

【０２４２】

いくつかの態様において、ＩＬ－１２をコードするヌクレオチド配列中の１つ以上のウリジンは、修飾ヌクレオシドによって置き換えられる。いくつかの態様において、ウリジンを置き換える修飾ヌクレオシドは、シュードウリジン（ψ）、Ｎ１－メチル－シュードウリジン（ｍ１ψ）または５－メチル－ウリジン（ｍ５Ｕ）である。

【０２４３】

いくつかの態様において、ＩＬ－１２をコードするヌクレオチド配列は、米国出願第２０１４／０１４７４５４号、国際出願ＷＯ２０１８１６０５４０、国際出願ＷＯ２０１５／１９６１１８、または国際出願ＷＯ２０１５／０８９５１１に記載されているＩＬ－１２をコードするヌクレオチド配列を含み、その全体が参照により本明細書に援用される。

【０２４４】

細胞傷害性ヌクレオシド

いくつかの態様において、ＩＬ－１２をコードするヌクレオチド配列は、１つ以上の細胞傷害性ヌクレオシドを含む。例えば、細胞傷害性ヌクレオシドは、ＩＬ－１２をコードする二官能性ヌクレオチド配列またはｍＲＮＡなどのポリヌクレオチドに組み込むことができる。細胞傷害性ヌクレオシド抗がん剤には、アデノシンアラビノシド、シタラビン、シトシンアラビノシド、５－フルオロウラシル、フルダラビン、フロクスウリジン、ＦＴＯＲＡＦＵＲ（登録商標）（テガフールとウラシルの組み合わせ）、テガフール（（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）、及び６－メルカプトプリンが含まれるが、これらに限定されない。

【０２４５】

多くの細胞傷害性ヌクレオシド類似体が臨床使用されているか、または抗がん剤として臨床試験の対象となっている。そのような類似体の例としては、シタラビン、ゲムシタビン、トロキサシタビン、デシタビン、テザシタビン、２’－デオキシ－２’－メチリデンシ

チジン（ＤＭＤＣ）、クラドリビン、クロファラビン、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及び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）－シトシンが挙げられるが、これらに限定されない。そのような化合物の別の例は、フルダラビンリン酸エステルである。これらの化合物は、全身投与することができ、細胞傷害薬に典型的な副作用、限定するものではないが、増殖する正常細胞よりも腫瘍細胞に対する特異性がほとんどないか、またはまったくないなどの副作用を有し得る。

【０２４６】

細胞傷害性ヌクレオシド類似体のプロドラッグも当該技術分野において多数報告されている。例としては、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）が挙げられるが、これらに限定されない。一般に、これらのプロドラッグは、主に肝臓及び体循環で活性薬物に循環され得、腫瘍組織における活性薬物の選択的放出は、ほとんどないかまたはまったく示されない。例えば、５’－デオキシ－５－フルオロシチジン（及び最終的には５－フルオロウラシル）のプロドラッグであるカペシタビンは、肝臓と腫瘍組織の両方で代謝される。「生理学的条件下で容易に加水分解可能なラジカル」を含有する一連のカペシタビン類似体は、Ｆｕｊｉｕ　ｅｔ　ａｌ．（米国特許第４，９６６，８９１号）によって特許請求されており、参照により本明細書に援用される。Ｆｕｊｉｕによって記載されている一連のものには、５’－デオキシ－５－フルオロシチジンのＮ４アルキル及びアラルキルカルバメートが含まれ、これらの化合物は、通常の生理学的条件下における加水分解によって活性化され、５’－デオキシ－５－フルオロシチジンをもたらすことが示唆されている。

【０２４７】

一連のシタラビンＮ４－カルバメートは、Ｆａｄｌ　ｅｔ　ａｌ（Ｐｈａｒｍａｚｉｅ．１９９５，５０，３８２－７、その全体が参照により本明細書に援用される）によって報告されており、化合物は、肝臓及び血漿中でシタラビンに変換するように設計されている。ＷＯ２００４／０４１２０３（その全体が参照により本明細書に援用される）は、ゲムシタビンのプロドラッグを開示しており、プロドラッグの一部は、Ｎ４－カルバメートである。これらの化合物は、ゲムシタビンの消化管毒性を克服するように設計されており、インタクトなプロドラッグが消化管から吸収された後に、肝臓及び血漿中における加水分解での放出によってゲムシタビンをもたらすように意図されている。Ｎｏｍｕｒａ　ｅｔ　ａｌ（Ｂｉｏｏｒｇ　Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．２００３，１１，２４５３－６１、その全体が参照により本明細書に援用される）は、１－（３－Ｃ－エチニル－β－Ｄ－リボ－ペントファラノシル）シトシンのアセタール誘導体について記載しており、これは、生体内還元により、酸性条件下での加水分解を更に必要とする中間体を生成することで、細胞傷害性ヌクレオシド化合物をもたらしている。

【０２４８】

化学療法剤であり得る細胞傷害性ヌクレオチドには、ピラゾロ［３，４－Ｄ］－ピリミジン、アロプリノール、アザチオプリン、カペシタビン、シトシンアラビノシド、フルオロウラシル、メルカプトプリン、６－チオグアニン、アシクロビル、ａｒａ－アデノシン、リバビリン、７－デアザ－アデノシン、７－デアザ－グアノシン、６－アザ－ウラシル、６－アザ－シチジン、チミジンリボヌクレオチド、５－ブロモデオキシウリジン、２－クロロ－プリン、及びイノシン、またはこれらの組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。

【０２４９】

Ｖ．医薬組成物

いくつかの態様において、本開示は、本明細書に記載されるポリヌクレオチド、ベクター、及び／または脂質ナノ粒子を含む、医薬組成物に関する。本開示のいくつかの態様に

おいて、医薬組成物は、薬学的に許容される担体（賦形剤）を更に含む。「許容される」とは、本明細書で使用される場合、担体が組成物の活性成分と適合しなければならず、治療される対象に対して有害であってはならないことを意味する。いくつかの態様において、担体は、活性成分を安定化することが可能である。薬学的に許容される賦形剤（担体）には、緩衝液が含まれ、これは、当該技術分野においてよく知られている。例えば、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ：Ｔｈｅ Ｓｃｉｅｎｃｅ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｙ ２０ｔｈ Ｅｄ．（２０００）Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ Ｗｉｌｌｉａｍｓ ａｎｄ Ｗｉｌｋｏｉｎｓ，Ｅｄ．Ｋ．Ｅ．Ｈｏｏｖｅｒを参照されたい。

【０２５０】

ｉｎ ｖｉｖｏ投与に使用される医薬組成物は、無菌でなければならない。これは、例えば、無菌濾過膜による濾過によって容易に達成される。脂質ナノ粒子は、滅菌アクセスポートを有する容器内、例えば、皮下注射針で刺すことができる栓を有する静注液バッグまたはバイアルに入れることができる。

【０２５１】

本開示のいくつかの態様において、医薬組成物は、腫瘍内、髄腔内、筋肉内、静脈内、皮下、吸入、皮内、リンパ管内、眼内、腹腔内、胸膜内、脊髄内、脈管内、経鼻、経皮（ｐｅｒｃｕｔａｎｅｏｕｓ）、舌下、粘膜下、経皮（ｔｒａｎｓｄｅｒｍａｌ）、または経粘膜投与用に製剤化することができる。本開示のいくつかの態様において、医薬組成物は、腫瘍内注射用に製剤化することができる。腫瘍内注射は、本明細書で使用される場合、腫瘍への直接注射を指す。少量の薬物を使用しながら、高濃度の組成物をｉｎ ｓｉｔｕで得ることができる。免疫療法の局所送達は、著しい全身曝露及びオフターゲット毒性を回避しながら、複数の併用療法を可能にする。

【０２５２】

本開示のいくつかの態様において、医薬組成物は、筋肉内注射、静脈内注射、または皮下注射用に製剤化することができる。

【０２５３】

本開示のいくつかの態様において、医薬組成物は、凍結乾燥された製剤または水溶液の形態で、薬学的に許容される担体、緩衝剤、賦形剤、塩、または安定剤を含む。例えば、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ：Ｔｈｅ Ｓｃｉｅｎｃｅ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｙ ２０^{ｔｈ} Ｅｄ．（２０００）Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ Ｗｉｌｌｉａｍｓ ａｎｄ Ｗｉｌｋｉｎｓ，Ｅｄ．Ｋ．Ｅ．Ｈｏｏｖｅｒを参照されたい。許容される担体及び賦形剤または安定剤は、使用される用量及び濃度でレシピエントに対して非毒性であり、リン酸、クエン酸、及び他の有機酸などの緩衝液；アスコルビン酸及びメチオニンを含む抗酸化剤；保存剤（オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド；塩化ヘキサメトニウム；塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム；フェノール、ブチル、またはベンジルアルコール；メチルパラベンまたはプロピルパラベンなどのアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；３－ペンタノール；及びｍ－クレゾールなど）；低分子量（約１０残基未満の）ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、もしくは免疫グロブリンなどのタンパク質；ポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、もしくはリジンなどのアミノ酸；単糖、二糖、及びグルコース、マンノース、もしくはデキストランを含む他の炭水化物；ＥＤＴＡなどのキレート剤；スクロース、マンニトール、トレハロースもしくはソルビトールなどの糖；ナトリウムなどの塩形成対イオン；金属錯体（例えば、Ｚｎ－タンパク質錯体）；ならびに／またはＴＷＥＥＮ（商標）、ＰＬＵＲＯＮＩＣＳ（商標）、もしくはポリエチレングリコール（ＰＥＧ）などの非イオン性界面活性剤を含む。

【０２５４】

いくつかの態様において、本明細書に記載される医薬組成物は、当該技術分野において知られている方法、例えば、Ｅｐｓｔｅｉｎ，ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８２：３６８８（１９８５）；Ｈｗａｎｇ，ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ７７：４０３０（１９８０）；ならびに米

国出願第４，４８５，０４５号及び第４，５４４，５４５号に記載されている方法によって調製することができる脂質ナノ粒子を含み、その全体が参照により本明細書に援用される。循環時間が向上されたリポソームは、米国特許第５，０１３，５５６号に開示されており、その全体が参照により本明細書に援用される。いくつかの態様において、リポソームは、ホスファチジルコリン、コレステロール、及びＰＥＧ誘導体化ホスファチジルエタノールアミン（ＰＥＧ－ＰＥ）を含む脂質組成物を用いる逆相蒸発法によって作製することができる。リポソームは、所定の孔径のフィルターを通して押し出すことで、所望の直径を持つリポソームが得られる。

【０２５５】

本開示のいくつかの態様において、医薬組成物は、徐放形態に製剤化される。徐放性調製物の好適な例としては、脂質ナノ粒子を含有する固体疎水性ポリマーの半透性マトリックスが挙げられ、このマトリックスは、成形品、例えば、フィルムまたはマイクロカプセルの形態である。徐放性マトリックスの例としては、ポリエステル、ヒドロゲル（例えば、ポリ（２－ヒドロキシエチル－メタクリレート）、またはポリ（ビニルアルコール））、ポリラクチド（米国特許第３，７７３，９１９号）、Ｌ－グルタミン酸と７エチル－Ｌ－グルタミン酸のコポリマー、非分解性エチレン－ビニルアセテート、ＬＵＰＲＯＭ　ＤＥＰＯＴ（商標）（乳酸－グリコール酸コポリマー及び酢酸ロイプロリドからなる注射用ミクロスフェア）などの分解性乳酸－グリコール酸コポリマー、イソ酪酸酢酸スクロース、及びポリ－Ｄ－（－）－３－ヒドロキシ酪酸が挙げられるが、これらに限定されない。

【０２５６】

いくつかの態様において、好適な界面活性剤には、非イオン性剤、例えば、ポリオキシエチレンソルビタン（例えば、ＴＷＥＥＮ（商標）２０、４０、６０、８０または８５）及び他のソルビタン（例えば、ＳＰＡＮ（商標）２０、３０、６０、８０、または８５）が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの態様において、界面活性剤を含む組成物は、０．０５～５％の界面活性剤を含む。いくつかの態様において、組成物は、０．１～２．５％を含む。必要であれば、他の成分、例えば、マンニトールまたは他の薬学的に許容されるビヒクルが添加され得ることは理解されよう。

【０２５７】

いくつかの態様において、医薬組成物は、経口、非経口、もしくは経直腸投与、または吸入もしくは吹送による投与のための錠剤、丸剤、カプセル剤、粉末剤、顆粒剤、液剤もしくは懸濁剤、または坐剤などの単位剤形である。

【０２５８】

錠剤などの固体組成物を調製するために、主要活性成分を、薬学的担体、例えば、トウモロコシデンプン、ラクトース、スクロース、ソルビトール、タルク、ステアリン酸、ステアリン酸マグネシウム、リン酸二カルシウムまたはガムなどの従来の錠剤用成分、及び他の薬学的希釈剤、例えば、水と混合して、本開示の化合物、またはその薬学的に許容される非毒性の塩の均一な混合物を含有する固体製剤前組成物を形成することができる。これらの製剤前組成物を均一と称する場合、活性成分が組成物全体に均一に分散しており、それにより、組成物を、錠剤、丸剤、及びカプセル剤などの等しく有効な単位剤形に容易に細分することができることを意味する。次いで、この固体製剤前組成物は、約０．１～約５００ｍｇの本開示の活性成分を含有する上記の種類の単位剤形に細分される。新規組成物の錠剤または丸剤は、持続的な作用という利点をもたらす剤形を提供するために、コーティングされるか、または別様に調合され得る。例えば、錠剤または丸剤は、内側の投与構成成分及び外側の投与構成成分を含むことができ、後者は前者を覆う外被の形態である。２つの構成成分は、腸溶層によって分離され得、これは、胃での崩壊に耐えるように機能し、内側構成成分がそのまま十二指腸まで通過することまたは遅延放出されることを可能にする。そのような腸溶層またはコーティングには、様々な材料を使用することができ、そのような材料には、いくつかのポリマー酸、ならびにポリマー酸とセラック、セチルアルコール及び酢酸セルロースなどの材料の混合物が含まれる。

【０２５９】

好適な乳剤は、市販の脂肪乳剤、例えば、ＩＮＴＲＡＬＩＰＩＤ（商標）、ＬＩＰＯＳＹＮ（商標）、ＩＮＦＯＮＵＴＲＯＬ（商標）、ＬＩＰＯＦＵＮＤＩＮ（商標）、及びＬＩＰＩＰＨＹＳＡＮ（商標）を使用して調製することができる。活性成分を、予め混合した乳剤組成物中に溶解するか、または油（例えば、ダイズ油、サフラワー油、綿実油、ゴマ油、トウモロコシ油、またはアーモンド油）中に溶解し、リン脂質（例えば、卵リン脂質、大豆リン脂質、または大豆レシチン）及び水と混合することで、乳剤を形成することができる。乳剤の張性を調整するために、他の成分、例えば、グリセロールまたはグルコースが添加され得ることは理解されよう。好適な乳剤は、典型的に、最大約２０％、例えば、約５～約２０％の油を含有する。脂肪乳剤は、好適なサイズを有する脂肪液滴を含み得、約５．５～約８．０の範囲のｐＨを有し得る。

【０２６０】

吸入または吹送のための医薬組成物は、薬学的に許容される水性溶媒もしくは有機溶媒、またはその混合物中の液剤及び懸濁剤、及び粉末剤を含む。液体または固体組成物は、上記のような好適な薬学的に許容される賦形剤を含有し得る。いくつかの態様において、組成物は、局所または全身的な効果のために、経口または経鼻による呼吸器経路によって投与される。

【０２６１】

薬学的に許容される溶媒中の組成物は、不活性ガスの使用により噴霧することができる。噴霧された溶液は、噴霧デバイスから直接吸入されてもよいし、噴霧デバイスを顔面マスク、テント、または間欠的陽圧呼吸装置に取り付けてもよい。溶液、懸濁液、または粉末組成物は、適切な様式で製剤を送達するデバイスから投与することができる。

【０２６２】

ＶＩ．治療法に使用するためのキット

本開示はまた、がん（例えば、黒色腫、肺癌、大腸癌、または腎細胞癌）などの疾患もしくは障害に対する免疫療法、及び／または疾患もしくは障害（例えば、がん）の治療もしくはそのリスクの低減に使用するためのキットを提供する。いくつかの態様において、キットは、本明細書に記載される組成物を含む１つ以上の容器を含む。

【０２６３】

いくつかの態様において、キットは、本明細書に記載される方法のいずれかに従って使用するための指示を含む。例えば、含まれる指示には、標的の疾患を治療し、発現を遅延させ、または緩和するための本明細書に記載される医薬組成物の投与に関する説明が含まれ得る。いくつかの態様において、指示には、標的の疾患／障害（例えば、がん）のリスクがある対象に本明細書に記載される組成物を投与するための説明が含まれる。

【０２６４】

いくつかの態様において、指示には、用量の情報、投与スケジュール、及び投与経路が含まれる。いくつかの態様において、容器は、単位用量、バルクパッケージ（例えば、マルチドーズパッケージ）または分割単位用量である。いくつかの態様において、指示は、ラベルまたは添付文書（例えば、キットに含まれる紙シート）上に書かれた指示である。いくつかの態様において、指示は、機械で読み取ることのできる指示（例えば、磁気または光学記憶ディスクに保持された指示）である。

【０２６５】

いくつかの態様において、ラベルまたは添付文書は、本明細書で開示される組成物が、本明細書に記載されるものなどのがんに関連する疾患または障害を治療し、発現を遅延させ、及び／または緩和するために使用されることを示す。指示は、本明細書に記載される方法のいずれかを実施するために提供され得る。

【０２６６】

いくつかの態様において、本明細書に記載されるキットは、好適な包装に収められる。いくつかの態様において、好適な包装は、バイアル、瓶、広口瓶、可撓性包装（例えば、密封Ｍｙｌａｒまたはプラスチックバッグ）、またはこれらの組み合わせを含む。いくつかの態様において、包装は、特定のデバイス、例えば、吸入器、経鼻投与デバイス（例え

ば、アトマイザー）、またはミニポンプなどの注入デバイスと組み合わせて使用するためのパッケージを含む。いくつかの態様において、キットは、滅菌アクセスポートを含む（例えば、容器は、皮下注射針で刺すことができる栓を有する静注液バッグまたはバイアルであってもよい）。いくつかの態様において、容器も、滅菌アクセスポートを有し得る（例えば、容器は、皮下注射針で刺すことができる栓を有する静注液バッグまたはバイアルであってもよい）。いくつかの態様において、少なくとも１つの活性剤は、本明細書に記載される組成物である。

【０２６７】

いくつかの態様において、キットは、緩衝液などの追加の構成要素及び説明情報を更に含む。いくつかの態様において、キットは、容器と、容器上または容器に付随するラベルまたは添付文書（複数可）を含む。いくつかの態様において、本開示は、本明細書に記載されるキットの内容物を含む製品を提供する。

【０２６８】

一般的技術

本開示の実施は、別途の記載がない限り、当業者の技術範囲内である分子生物学（組み換え技術を含む）、微生物学、細胞生物学、生化学及び免疫学の従来技術を用いる。Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，ｓｅｃｏｎｄ ｅｄｉｔｉｏｎ（Ｓａｍｂｒｏｏｋ，ｅｔ ａｌ．，１９８９）Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｐｒｅｓｓ；Ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ（Ｍ．Ｊ．Ｇａｉｔ，ｅｄ．，１９８４）；Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｈｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓ；Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌｏｇｙ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｎｏｔｅｂｏｏｋ（Ｊ．Ｅ．Ｃｅｌｌｉｓ，ｅｄ．，１９９８）Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ；Ａｎｉｍａｌ Ｃｅｌｌ Ｃｕｌｔｕｒｅ（Ｒ．Ｉ．Ｆｒｅｓｈｎｅｙ，ｅｄ．１９８７）；Ｉｎｔｒｏｄｕｃｔｉｏｎ ｔｏ Ｃｅｌｌ ａｎｄ Ｔｉｓｓｕｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ（Ｊ．Ｐ．Ｍａｔｈｅｒ ａｎｄ Ｐ．Ｅ．Ｒｏｂｅｒｔｓ，１９９８）Ｐｌｅｎｕｍ Ｐｒｅｓｓ；Ｃｅｌｌ ａｎｄ Ｔｉｓｓｕｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ：Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｏｃｅｄｕｒｅｓ（Ａ．Ｄｏｙｌｅ，Ｊ．Ｂ．Ｇｉｆｆｉｔｈｓ，ａｎｄ Ｄ．Ｇ．Ｎｅｗｅｌｌ，ｅｄｓ．，１９９３－８）Ｊ．Ｗｉｌｅｙ ａｎｄ Ｓｏｎｓ；Ｍｅｔｈｏｄ ｏｆ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ（Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｉｎｃ．）；Ｈａｎｄｂｏｏｋ ｏｆ Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ（Ｄ．Ｍ．Ｗｅｉｒ ａｎｄ Ｃ．Ｃ．Ｂｌａｃｋｗｅｌｌ，ｅｄｓ．）；Ｇｅｎｅ Ｔｒａｎｓｆｅｒ Ｖｅｃｔｏｒｓ ｆｏｒ Ｍａｍｍａｌｉａｎ Ｃｅｌｌｓ（Ｊ．Ｍ．Ｍｉｌｌｅｒ ａｎｄ Ｍ．Ｐ．Ｃａｌｏｓ，ｅｄｓ．，１９８７）；Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ（Ｆ．Ｍ．Ａｕｓｕｂｅｌ，ｅｔ ａｌ．，ｅｄｓ．，１９８７）：ＰＣＲ：Ｔｈｅ Ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ Ｃｈａｉｎ Ｒｅａｃｔｉｏｎ，（Ｍｕｌｌｉｓ，ｅｔ ａｌ．，ｅｄｓ．，１９９４）；Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ（Ｊ．Ｅ．Ｃｏｌｉｇａｎ ｅｔ ａｌ．，ｅｄｓ．，１９９１）；Ｓｈｏｒｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ（Ｗｉｌｅｙ ａｎｄ Ｓｏｎｓ，１９９９）；Ｉｍｍｕｎｏｂｉｏｌｏｇｙ（Ｃ．Ａ．Ｊａｎｅｗａｙ ａｎｄ Ｐ．Ｔｒａｖｅｒｓ，１９９７）；Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ（Ｐ．Ｆｉｎｃｈ，１９９７）；Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：ａ ｐｒａｃｔｉｃａｌ ａｐｐｒｏａｃｈ（Ｄ．Ｃａｔｔｙ，ｅｄ．，ＩＲＬ Ｐｒｅｓｓ，１９８８－１９８９）；Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：ａ ｐｒａｃｔｉｃａｌ ａｐｐｒｏａｃｈ（Ｐ．Ｓｈｅｐｈｅｒｄ ａｎｄ Ｃ．Ｄｅａｎ，ｅｄｓ．，Ｏｘｆｏｒｄ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒｅｓｓ，２０００）；Ｕｓｉｎｇ ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：ａ ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ ｍａｎｕａｌ（Ｅ．Ｈａｒｌｏｗ ａｎｄ Ｄ．Ｌａｎｅ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，１９９９）；Ｔｈｅ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ（Ｍ．Ｚａｎｅｔｔｅ ａｎｄ Ｊ．Ｄ．Ｃａｐｒａ，ｅｄｓ．，Ｈａｒｗｏｏｄ Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ，１９９５）。更に説明しなくても、当業者であれば、上

記の説明に基づいて、本開示を最大限に利用できると考えられる。本明細書で列挙される全ての公開物（上記及び本開示の他の箇所で列挙されるものを含む）は、その全体が参照により援用される。

【実施例】

【０２６９】

実施例１：ＶＥＥレプリコンを含むＬＮＰの構築

本明細書に記載されるＬＮＰを構築するために、以下の材料及び方法を使用した。

【０２７０】

鋳型の調製

ＢｓｐＱＩ制限酵素を使用して鋳型ＤＮＡを線状化した。線状化した後、ＤＮＡを６ダイアボリュームでフィルターによりバッファー交換した。次いで、このＤＮＡを、Ｔ７ＲＮＡポリメラーゼ及びＮＴＰを使用してＩＶＴを行った。ＩＶＴ後、ＤＮａｓｅＩを使用して、残ったＤＮＡを消化した。次いで、ｍＲＮＡをバッファー交換した後、液体クロマトグラフィーを行った。この後、ｍＲＮＡを再びバッファー交換し、次いで、品質管理のためにアッセイした。

【０２７１】

Ｔ字合流による従来のＢＬ－１　ＬＮＰ製剤の調製

脂質材料をそれぞれ秤量し、エタノール中に溶解した。エタノール相は、以下のフォームの組成比に従って、全ての脂質材料を混合することによって、調製した。水相は、ＲＮＡ分子（例えば、ＶＥＥレプリコンを含むｍＲＮＡまたはいかなるＶＥＥも含まない対照ｍＲＮＡ）を２０ｍＭクエン酸緩衝液（ｐＨ４．０）、３００ｍＭ　ＮａＣｌ及び水で希釈することによって調製した。ＬＮＰのエタノール相と水相をＴ字合流混合により３：１（水相：エタノール相）の流量比で混合し、続いて、ＴＢＳ緩衝液（ｐＨ４．０）とのインライン希釈をＴ字合流混合により１：１（ＬＮＰ相：ＰＥＧ相）の流量比で直ちに行うことによって、ＬＮＰを得た。以下の表２は、ＬＮＰ組成物に含まれる各成分の相対量を提供する。

【表２】

表２．ＢＬ－１　ＬＮＰの組成

構成成分	例示的な量	重量比
mRNA	1.0 mg	1.0
BL-1	12.7 mg	12.7
DSPC	2.8 mg	2.8
コレステロール	2.8 mg	2.8
β-シトステロール	2.8 mg	2.8
DMG-PEG-2k	1.5 mg	1.5

【０２７２】

Ｔ字合流によるＰＥＧミセル化ＴＴ３　ＬＮＰ製剤の調製

脂質材料をそれぞれ秤量し、エタノール中に溶解した。エタノール相は、以下のフォームの組成比に従って、ＤＭＧ－ＰＥＧ－２Ｋを除く全ての脂質材料を混合することによって、調製した。水相は、ＲＮＡ分子（例えば、ＶＥＥレプリコンを含むｍＲＮＡまたはいかなるＶＥＥレプリコンも含まない対照ｍＲＮＡ）を２０ｍＭクエン酸緩衝液（ｐＨ４．０）、３００ｍＭ　ＮａＣｌ及び水で希釈することによって調製した。ＰＥＧミセル相は、対応する量のＤＭＧ－ＰＥＧ－２ＫをＴＢＳ緩衝液に加え、ボルテックスにより十分に

混合することによって調製した。最後に、まず、ＬＮＰのエタノール相と水相をＴ字合流混合により３：１（水相：エタノール相）の流量比で混合し、続いて、ＰＥＧミセル相とのインライン希釈をＴ字合流混合により１：１（ＬＮＰ相：ＰＥＧ相）の流量比で直ちに行うことによって、ＰＥＧミセル化ＴＴ３　ＬＮＰを得た。以下の表３は、ＬＮＰ組成物に含まれる各成分の相対量（例示的な量と重量比の両方）を提供する。

【表３－１】

表３．ＴＴ３　ＬＮＰの組成

構成成分	例示的な量	重量比
mRNA	1.0 mg	1.0
TT3	10 mg	10.0
DOPE	8.0 mg	8.0
コレステロール	5.6 mg	5.6
DMG-PEG-2k	4.1 mg	4.1

【表３－２】

表３Ａ.

TT3 LNPの組成成分	重量比
mRNA	1.0
TT3	10.0
DOPE	8.0
コレステロール	5.6
PEG-DMG-2kミセル	重量比
DMG-PEG-2k	4.1（上記mRNAとの相対値、 ミセルの一部ではない）

【０２７３】

ＢＬ－１／ＴＴ３　ＬＮＰのバッファー交換及び凍結／解凍

得られたＢＬ－１／ＴＴ３　ＬＮＰをバッファー交換し、タンジェンシャルフロー濾過により濃縮した。その後、４０％スクロース（Ｗ／Ｖ）を含むＴＢＳストック溶液を、調製した全てのＢＬ－１／ＴＴ３　ＬＮＰに加え、ＬＮＰを１０％スクロースの最終溶液にした。ＬＮＰの最終ＲＮＡ濃度は、ＬＮＰを２％ＴＥ＋Ｔｒｉｔｏｎで解離することによって測定し、Ｑｕａｎｔ－ｉｔ　ＲｉｂｏＧｒｅｅｎアッセイで更に検出した。ＬＮＰを５０μｇ／チューブのアリコートの分注し、－８０℃で凍結した。ＬＮＰの投与前に、ＬＮＰを室温で解凍した。

【０２７４】

実施例２：肝臓発現の分析

実施例１で構築されたＬＮＰが肝臓を標的とする能力を評価するために、生体内分布をマウスで実施した。簡潔に述べると、動物に以下の投与を行い、生物発光アッセイを使用してタンパク質発現を評価した：（１）ＰＢＳ（陰性対照）、（２）いかなるＶＥＥレプリコンも含まない対照ｍＲＮＡ（ＲＮＡ－ＶＥＥなし）を封入したＬＮＰ、または（３）ＶＥＥレプリコンを含むｍＲＮＡ（ＲＮＡ－ＶＥＥ）を封入したＬＮＰ。

【０２７５】

図１に示されるように、ＲＮＡ－ＶＥＥなしを投与した動物では、肝臓内で有意なタンパク質発現があった。対照的に、ＲＮＡ－ＶＥＥを投与した動物では、肝臓で観察された検出可能なタンパク質の発現はほとんどなかった。他の組織（例えば、脾臓及び肺）におけるタンパク質発現は、ＲＮＡ－ＶＥＥなし群とＲＮＡ－ＶＥＥ群の動物間で同等であり、これは、肝臓で観察された効果の特異性を示している。

【０２７６】

上の結果は、本明細書に記載されるＬＮＰが肝臓における発現を選択的に回避及び／または減少させ得ることを示しており、このＬＮＰにより、より高い忍容性（例えば、肝毒性の低減）が可能になり得ることが示唆される。

【０２７７】

実施例３：肝毒性の評価

ｉｎ　ｖｉｖｏ効果を更に評価するために、本開示のＬＮＰを実施例２に記載される動物（例えば、マウス）に投与する。次いで、動物における肝毒性を様々な方法で評価する。例えば、いくつかの態様において、例えば、動物の血液中の肝臓酵素（ＡＬＴ／ＡＳＴ）レベルが測定される。いくつかの態様において、動物の全般的な毒性が評価される（例えば、活量、食物摂取量、身体スコア指数、水分補給状態、またはこれらの組み合わせ）。いくつかの態様において、肝臓への任意のＬＮＰ関連影響を検出するために、肝臓の顕微鏡評価が実施される。

【０２７８】

実施例４：追加の脂質ナノ粒子の構築

本明細書に記載されるＶＥＥレプリコンを更に評価するために、本明細書に記載される異なる脂質（例えば、イオン化脂質、カチオン性脂質、または脂質様物質、例えば、リピドイド）を含む追加のＬＮＰを実施例１に記載されるように構築した。合計で、９つの異なるＬＮＰを構築し（本明細書においてＬＮＰ１～ＬＮＰ９と称される）、これを使用して、ＶＥＥレプリコン（本明細書に記載されるもの）を含むｍＲＮＡまたはいかなるＶＥＥレプリコンも含まない対照ｍＲＮＡを内包させた。これらのＬＮＰがペイロード発現を誘導する能力を、以下の実施例に記載されるように評価した。

【０２７９】

実施例５：ＶＥＥレプリコンを含むＲＮＡを封入した脂質ナノ粒子による肝臓発現の分析

本明細書に記載されるＶＥＥレプリコンが肝臓における発現を選択的に回避及び／または減少させる能力を更に評価するために、Ｂ６．Ｃｇ　Ｇｔ（ＲＯＳＡ）２６Ｓｏｒｔｍ１４（ＣＡＧ－ｔｄＴｏｍａｔｏ）Ｈｚｅ／Ｊ（Ａｉレポーター）マウスにＬＮＰ１またはＬＮＰ２を単回静脈内投与した。ＬＮＰ１とＬＮＰ２の両方には、核局在化シグナル（ＮＬＳ）－Ｃｒｅをコードする核酸配列を含むＶＥＥレプリコンを２０μｇ封入した。対照動物には、リン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）を投与した。Ｃｒｅ遺伝子は、部位特異的ＤＮＡリコンビナーゼであるＣｒｅタンパク質をコードしており、ＤＮＡ分子中の特定の部位間でのＤＮＡの組み換えを触媒することができる。これらの部位は、ｌｏｘＰ配列として知られ、組み換えが生じ得る方向性コア配列を囲むＣｒｅに対する特異的な結合部位を含有する。Ｃｒｅは、肝臓組織におけるＣｒｅ媒介性組み換えを示すｔｄＴｏｍａｔｏ蛍光を誘導する。ＬＮＰ投与から約７２時間後、蛍光ＩＶＩＳイメージングを使用して、マウスの肝臓内でのｔｄＴｏｍａｔｏ蛍光発現を測定した。

【０２８０】

図２Ａ及び２Ｂに示されるように、ＬＮＰ１及びＬＮＰ２のいずれかを投与したマウス

の肝臓で観察された蛍光シグナルは、対照動物で観察されたものと有意差がなかった。更に、ＬＮＰ１を投与した動物とＬＮＰ２を投与した動物との間にも、肝臓における蛍光発現に明らかな差はなかった。これらの結果は、本明細書に記載されるＶＥＥレプリコンが肝臓における発現を選択的に回避及び／または減少させる能力を強く示している。この結果は、更に、ＶＥＥレプリコンの肝臓回避特性が、少なくともＬＮＰ１とＬＮＰ２のいかなる違いとも無関係であることを示唆している。

【０２８１】

実施例６：ＶＥＥレプリコンを含まないＲＮＡを封入した脂質ナノ粒子による肝臓発現の分析

本明細書に記載されるＬＮＰが実際に肝臓を標的とすることができることを確認するために、Ｂ６．Ｃｇ　Ｇｔ（ＲＯＳＡ）２６Ｓｏｒｔｍ１４（ＣＡＧ－ｔｄＴｏｍａｔｏ）Ｈｚｅ／Ｊ（Ａｉレポーター）マウスにＬＮＰ３、ＬＮＰ４、ＬＮＰ５、またはＬＮＰ６を単回静脈内投与した。ＬＮＰのそれぞれには、いかなるＶＥＥレプリコンも含まない、核局在化シグナル（ＮＬＳ）－ＣｒｅをコードするｍＲＮＡ（ＲＮＡ－ＶＥＥなし）を２０μｇ封入した。対照動物には、ＰＢＳが投与された。ＬＮＰ投与から約７２時間後、蛍光ＩＶＩＳイメージングを使用して、マウスの肝臓内でのｔｄＴｏｍａｔｏ蛍光発現を再び測定した。実施例４に記載されるように、肝臓内でのｔｄ－Ｔｏｍａｔｏ蛍光発現は、当該組織内でのＣｒｅ媒介性組み換えを示すことが予想された。

【０２８２】

図３Ａ及び３Ｂに示されるように、対照動物において、対照群のマウスの肝臓で観察された検出可能な蛍光シグナルはなかった。対照的に、試験したＬＮＰ（それぞれＲＮＡ－ＶＥＥなしを封入したもの）のうちの１つを投与したマウスの肝臓では、強い蛍光シグナルが観察された。

【０２８３】

更に分析するために、ＬＮＰ７（同様にいかなるＶＥＥレプリコンを含まないｍＲＮＡを封入したもの、ｍＲＮＡはＮＬＳ－Ｃｒｅをコードする；ＲＮＡ－ＶＥＥ）をｔｄＴｏｍａｔｏレポーターマウスに静脈内投与した。比較のために、一部の動物には、上で使用したＬＮＰ３（すなわち、いかなるＶＥＥレプリコンも含まない、ＮＬＳ－ＣｒｅをコードするｍＲＮＡを封入したもの）を投与した。対照動物には、ＰＢＳのみ投与した。再度、ＬＮＰ投与から約７２時間後、蛍光ＩＶＩＳイメージングを使用して、ｔｄ－Ｔｏｍａｔｏ蛍光を定量した。

【０２８４】

図４Ａ及び４Ｂに示されるように、対照動物と比較して、ＬＮＰ７を投与した動物の肝臓で有意な蛍光シグナルが観察された。蛍光シグナルは、ＬＮＰ３を投与したマウスで観察されたものと同等であった。

【０２８５】

この実施例で提供された結果は、本明細書に記載されるＬＮＰが実際に肝臓を標的とすることができることを相対的に示しており、先の実施例で観察された肝臓回避及び／または肝臓発現の減少がＶＥＥレプリコンそのものに限定されたものであることを示唆している。

【０２８６】

実施例７：ＶＥＥレプリコンを含むＲＮＡまたはいかなるＶＥＥレプリコンも含まないＲＮＡを封入した脂質ナノ粒子の投与後における肝臓中のホタルルシフェラーゼ発現の分析

上記の結果を異なる蛍光モデルで確認するために、Ｃ５７ＢＬ／６Ｊマウスに次のＬＮＰのうちの１つを単回投与した：ＬＮＰ８、ＬＮＰ９、及びＬＮＰ２。ＬＮＰ９及びＬＮＰ２は、動物に静脈内投与された。動物にＬＮＰ８を静脈内または腫瘍内投与した。ＬＮＰのそれぞれ（すなわち、ＬＮＰ８、ＬＮＰ９、及びＬＮＰ２）には、ＶＥＥレプリコンを含み、ホタルルシフェラーゼ遺伝子ＦＬｕｃをコードするｍＲＮＡを４０μｇ封入した。当該遺伝子は、ｄ－ルシフェリンからオキシルシフェリンへの酸素化を触媒する酵素を

コードし、この反応は可視光（５３０ｎｍ～６４０ｎｍ）を発生する。対照動物には、ＰＢＳが投与された。投与から約２４時間後、生物発光ＩＶＩＳイメージングを使用して、肝臓におけるルシフェラーゼ発現を測定した。

【０２８７】

先にｔｄ－Ｔｏｍａｔｏレポーターマウスで観察されたように、ＬＮＰ２を投与したＣ５７ＢＬ／６Ｊマウスの肝臓におけるルシフェラーゼ発現には、対照動物と比較して、有意差はなかった。同様の結果がＬＮＰ８またはＬＮＰ９のいずれかを投与したＣ５７ＢＬ／６Ｊマウスでも観察された。更に、ＬＮＰ８を静脈内または腫瘍内投与した動物では、ルシフェラーゼ発現に有意差が観察されなかったことから、投与経路（少なくとも静脈内投与と腫瘍内投与）はいかなる影響も与えないようであった。

【０２８８】

再度、脂質ナノ粒子自体が実際に肝臓を標的とすることができることを確認するために、ＬＮＰ２、ＬＮＰ８、及びＬＮＰ９に、いかなるＶＥＥレプリコンも含まない、ホタルルシフェラーゼをコードするｍＲＮＡを今回は１０μｇ封入した。次いで、ＬＮＰの単回用量をＣ５７ＢＬ／６Ｊマウスに静脈内投与し、約２４時間後、生物発光ＩＶＩＳイメージングを使用して、肝臓におけるルシフェラーゼ発現を測定した。

【０２８９】

図６Ａ及び６Ｂに示されるように、ＬＮＰ８、ＬＮＰ９、及びＬＮＰ２を含むＬＮＰ群の肝臓における生物発光シグナルは、対照よりも有意に高く、試験した各ＬＮＰの肝臓におけるＦＬｕｃ－ｍｏｄ　ＲＮＡの特異的発現を示している。

【０２９０】

以上の結果から、本明細書に記載されるＬＮＰが肝臓を標的とすることが可能であることが確認された。上記の結果はまた、本明細書に記載されるＶＥＥレプリコンの肝臓回避特性の確認にも役立つ。

【０２９１】

実施例８：ＶＥＥレプリコンを含むＲＮＡまたはいかなるＶＥＥレプリコンも含まないＲＮＡのいずれかを封入した脂質ナノ粒子の肝臓特異的送達の比較

肝臓特異性に関して、いかなるＶＥＥレプリコンも含まないｍＲＮＡ（ＲＮＡ－ＶＥＥなし）とＶＥＥレプリコンを含むｍＲＮＡ（ＲＮＡ－ＶＥＥ）との間の直接比較を提供するために、Ｃ５７ＢＬ／６Ｊマウスに、（１）ホタルルシフェラーゼをコードするＲＮＡ－ＶＥＥなしまたは（２）ホタルルシフェラーゼをコードするＲＮＡ－ＶＥＥのいずれかを２ｍｇ／ｋｇ封入したＬＮＰ８を単回静脈内投与した。次いで、投与から約４８時間後、生物発光ＩＶＩＳイメージングを使用して、動物の肝臓におけるルシフェラーゼ発現を測定した。

【０２９２】

図７Ａ及び７Ｂに示されるように、ＲＮＡ－ＶＥＥなし群の肝臓における生物発光シグナルは、ＲＮＡ－ＶＥＥレプリコン群よりも有意に高かった。この結果は、ＲＮＡ－ＶＥＥなしでは、肝臓における発現が可能であるのに対し、ＲＮＡ－ＶＥＥは、肝臓における発現を防ぐことを更に裏付けるものである。更に、この結果は、本明細書に記載されるＶＥＥレプリコンの肝臓回避特性が、使用される脂質ナノ粒子に依存しないことも更に示している。

【０２９３】

実施例９：ＶＥＥレプリコンを含むＲＮＡ及びイオン化脂質を含む脂質ナノ粒子

本明細書に記載されるＶＥＥレプリコンの肝臓回避特性を評価するために、イオン化脂質を含む脂質ナノ粒子を構築して脂質ナノ粒子を作製し、次いで、これを使用して、ＶＥＥレプリコンを含み、ペイロードをコードするｍＲＮＡ（ＲＮＡ－ＶＥＥ）を内包させる。イオン化脂質は、次から選択される：（（４－ヒドロキシブチル）アザンジイル）ビス（ヘキサン－６，１－ジイル）ビス（２－ヘキシルデカノエート）（ＡＬＣ－０３１５）、ヘプタデカン－９－イル８－（（２－ヒドロキシエチル）（６－オキソ－６－（ウンデシルオキシ）ヘキシル）アミノ）オクタノエート（ＳＭ－１０２）、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（脂質５）、ジ（（Ｚ）－ノナ－２－エン－１－イル）９－（（４－（ジメチルアミノ）ブタノイル）オキシ）ヘプタデカンジオエート（Ｌ３１９）、３－（ジドデシルアミノ）－Ｎ１，Ｎ１，４トリドデシル－１－ピペラジンエタンアミン（ＫＬ１０）、Ｎｌ－［２（ジドデシルアミノ）エチル］－Ｎ１，Ｎ４，Ｎ４－トリドデシル１，４－ピペラジンジエタンアミン（ＫＬ２２）、１４，２５－ジトリデシル－１５，１８，２１，２４－テトラアザ－オクタトリアコンタン（ＫＬ２５）、１，２－ジリノレイルオキシ－Ｎ，Ｎ－ジメチルアミノプロパン（ＤＬｉｎ－ＤＭＡ）、２，２－ジリノレイル－４－ジメチルアミノメチル－［１，３］－ジオキソラン（ＤＬｉｎ－Ｋ－ＤＭＡ）、ヘプタトリアコンタ－６，９，２８，３１－テトラエン－１９－イル－４－（ジメチルアミノ）ブタノエート（ＤＬｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡ）、２，２－ジリノレイル－４－（２ジメチルアミノエチル）－［１，３］－ジオキソラン（ＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡ）、１，２－ジオレイルオキシ－Ｎ，Ｎ－ジメチルアミノプロパン（ＤＯＤＭＡ）、２－（｛８－［（３β）－コレスタ－５－エン－３－イルオキシ］オクチル｝オキシ）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－［（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イルオキシ］プロパン－１－アミン（オクチル－ＣＬｉｎＤＭＡ）、（２Ｒ）－２－（｛８－［（３β）－コレスタ－５－エン－３－イルオキシ］オクチル｝オキシ）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－［（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イルオキシ］プロパン－１－アミン（オクチル－ＣＬｉｎＤＭＡ（２Ｒ））、及び（２Ｓ）－２－（｛８－［（３β）－コレスタ－５－エン－３－イルオキシ］オクチル｝オキシ）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－［（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イルオキシ］プロパン－１－アミン（オクチル－ＣＬｉｎＤＭＡ（２Ｓ））、またはこれらの任意の組み合わせ。

【０２９４】

上記ＬＮＰ（すなわち、イオン化脂質及びＲＮＡ－ＶＥＥを含む）がｉｎ　ｖｉｖｏ投与され、次いで、肝臓におけるコードされたペイロードの発現が評価される（例えば、実施例４～７に記載のとおり）。いくつかの態様において、動物における肝毒性も評価される（例えば、実施例３に記載のとおり）。

【０２９５】

実施例１０：ＶＥＥレプリコンを含むＲＮＡ及びカチオン性脂質を含む脂質ナノ粒子

本明細書に記載されるＶＥＥレプリコンの肝臓回避特性を評価するために、カチオン性脂質を含む脂質ナノ粒子を構築して脂質ナノ粒子を作製し、次いで、これを使用して、ＶＥＥレプリコンを含み、ペイロードをコードするｍＲＮＡ（ＲＮＡ－ＶＥＥ）を内包させる。カチオン性脂質は、次から選択される：ｌ，２－ジオレオイル－３－トリメチルアンモニウム－プロパン（ＤＯＴＡＰ）、リポフェクタミン、Ｎ－［ｌ－（２，３－ジオレオイルオキシ）プロピル］－Ｎ，Ｎ，Ｎ－トリメチルアンモニウムクロリド（ＤＯＴＭＡ）、ｌ－［２－（オレオイルオキシ）エチル］－２－オレイル－３－（２－ヒドロキシエチル）イミダゾリウムクロリド（ＤＯＴＥＶＩ）、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－ｌ－プロパンアミニウムトリフルオロアセテート（ＤＯＳＰＡ）、Ｎ，Ｎ－ジステアリル－Ｎ，Ｎ－ジメチルアンモニウムブロミド（ＤＤＡＢ）、Ｎ－（ｌ，２－ジミリスチルオキシプロパ－３－イル）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－Ｎ－ヒドロキシエチルアンモニウムブロミド（ＤＭＲＩＥ）、Ｎ－（ｌ，２－ジオレオイルオキシプロパ－３－イル）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－Ｎ－ヒドロキシエチルアンモニウムブロミド（ＤＯＲＩＥ）、Ｎ，Ｎ－ジオレイル－Ｎ，Ｎ－ジメチルアンモニウムクロリド（ＤＯＤＡＣ）、ｌ，２－ジラウロイル－ｓｎ－グリセロ－３－エチルホスホコリン（ＤＬｅＰＣ）、ｌ，２－ジステアロイル－３－トリメチルアンモニウム－プロパン（ＤＳＴＡＰ）、ｌ，２－ジパルミトイル－３－トリメチルアンモニウム－プロパン（ＤＰＴＡＰ）、ｌ，２－ジリノレオイル－３－トリメチルアンモニウム－プロパン（ＤＬＴＡＰ）、ｌ，２－ジミリストイル－３－トリメチルアンモニウム－プロパン（ＤＭＴＡＰ）、１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－エチルホスホコリン（ＤＳｅＰＣ）、ｌ，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－エチルホスホコリン（ＤＰｅＰ

Ｃ）、１，２－ジミリストイル－ｓｎ－グリセロ－３－エチルホスホコリン（ＤＭｅＰＣ）、１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－エチルホスホコリン（ＤＯｅＰＣ）、ｌ，２－ジ－（９Ｚ－テトラデセノイル）－ｓｎ－グリセロ－３－エチルホスホコリン（１４：１　ＥＰＣ）、ｌ－パルミトイル－２－オレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－エチルホスホコリン（１６：０－１８：１　ＥＰＣ）、またはこれらの任意の組み合わせ。

【０２９６】

上記ＬＮＰ（すなわち、カチオン性脂質及びＲＮＡ－ＶＥＥを含む）がｉｎ　ｖｉｖｏ投与され、次いで、肝臓におけるコードされたペイロードの発現が評価される（例えば、実施例４～７に記載のとおり）。いくつかの態様において、動物における肝毒性も評価される（例えば、実施例３に記載のとおり）。

【０２９７】

実施例１０：ＶＥＥレプリコンを含むＲＮＡ及び脂質様物質を含む脂質ナノ粒子

本明細書に記載されるＶＥＥレプリコンの肝臓回避特性を評価するために、脂質様物質を含む脂質ナノ粒子を構築して脂質様ナノ粒子（ＬＬＮ）を作製し、次いで、これを使用して、ＶＥＥレプリコンを含み、ペイロードをコードするｍＲＮＡ（ＲＮＡ－ＶＥＥ）を内包させる。脂質様物質は、次から選択される：１，１’－（（２－（４－（２－（（２－（ビス（２－ヒドロキシドデシル）アミノ）エチル）（２－ヒドロキシドデシル）アミノ）エチル）ピペラジン－１－イル）エチル）アザンジイル）ビス（ドデカン－２－オール）（Ｃ１２－２００）、３，６－ビス（４－（ビス（２－ヒドロキシドデシル）アミノ）ブチル）ピペラジン２，５－ジオン（ｃＫＫ－Ｅ１２）、テトラキス（８－メチルノニル）３，３’，３’’，３’’’－（（（メチルアザンジイル）ビス（プロパン－３，１ジイル））ビス（アザントリイル））テトラプロピオネート（３０６Ｏｉ１０）、Ｇ０－Ｃ１４、５Ａ２－ＳＣ８、３，６－ビス（４－（ビス（（９Ｚ，１２Ｚ）－２－ヒドロキシオクタデカ９，１２－ジエン－１－イル）アミノ）ブチル）ピペラジン－２，５－ジオン（ＯＦ－０２）、（（（３，６－ジオキソピペラジン－２，５－ジイル）ビス（ブタン－４，１－ジイル））ビス（アザントリイル））テトラキス（エタン２，１－ジイル）（９Ｚ，９’Ｚ，９’’Ｚ，９’’’Ｚ，１２Ｚ，１２’Ｚ，１２’’Ｚ，１２’’’Ｚ）－テトラキス（オデカ－９，１２－ジエノエート）（ＯＦ－Ｄｅｇ－Ｌｉｎ）、（（（３，６－ジオキソピペラジン－２，５－ジイル）ビス（ブタン－４，１－ジイル））ビス（アザントリイル））テトラキス（ブタン－４，１－ジイル）（９Ｚ，９’Ｚ，９’’Ｚ，９’’’Ｚ，１２Ｚ，１２’Ｚ，１２’’Ｚ，１２’’’Ｚ）－テトラキス（オクタデカ－９，１２－ジエノエート）（ＯＦ－Ｃ４－Ｄｅｇ－Ｌｉｎ）、Ｎ１，Ｎ３，Ｎ５－トリス（３－（ジドデシルアミノ）プロピル）ベンゼン１，３，５－トリカルボキサミド（ＴＴ３）、ヘキサ（オクタン－３－イル）９，９’，９’’，９’’’，９’’’’，９’’’’’，９’’’’’’－（（（（ベンゼン－１，３，５ルボニル）リス（アザンジイル））トリス（プロパン－３，１－ジイル））トリス（アザントリイル））ヘキサノナノエート（ＦＴＴ５）、ＰＬ－１［Ｎａｔｕｒｅ　Ｃｏｍｍｕｎｉｃａｔｉｏｎｓ，１２－７２６４（２０２１）に開示されており、参照により本明細書に援用される］、９８Ｎ１２－５［Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｔｈｅｒａｐｙ　ｖｏｌ．１７　ｎｏ．５　Ｍａｙ　２００９に開示されており、参照により本明細書に援用される］、エチル５，５－ジ（（Ｚ）－ヘプタデカ－８－エン－１－イル）－１－（３－（ピロリジン－１－イル）プロピル）－２，５－ジヒドロ－１Ｈ－イミダゾール－２－カルボキシレート（Ａ２－Ｉｓｏ５－２ＤＣ１８（Ａ２））及びＡ１２－Ｉｓｏ５－２ＤＣ１８（Ａ１２）、またはこれらの任意の組み合わせ。

【０２９８】

上記ＬＬＰ（すなわち、脂質様物質及びＲＮＡ－ＶＥＥを含む）がｉｎ　ｖｉｖｏ投与され、次いで、肝臓におけるコードされたペイロードの発現が評価される（例えば、実施例４～７に記載のとおり）。いくつかの態様において、動物における肝毒性も評価される（例えば、実施例３に記載のとおり）。

【０２９９】

実施例１２：ＶＥＥレプリコンを含むＲＮＡ及びポリマー材料を含む脂質ナノ粒子

本明細書に記載されるＶＥＥレプリコンの肝臓回避特性を評価するために、ポリマー材料を含む脂質ナノ粒子を構築してポリマーナノ粒子（ＰＮＰ）を作製し、次いで、これを使用して、ＶＥＥレプリコンを含み、ペイロードをコードするｍＲＮＡ（ＲＮＡ－ＶＥＥ）を内包させる。ポリマー材料は、次から選択される：ポリエチレンイミン（ＰＥＩ）、ポリ（アミドアミン）（（ＰＡＭＡＭ）、ポリ（β－アミノエステル）（ＰＢＡＥ）、ポリ（２－Ｎ，Ｎ－ジメチルアミノエチルメタクリレート）（ＰＤＭＡＥＭＡ）、ポリ（アミノ酸）（ＰＡＡ）、キトサンデキストラン、シクロデキストリン、セルロース、ヒアルロン酸、ポリ乳酸（ＰＬＡ）、ポリ（乳酸－ｃｏ－グリコール酸）（ＰＬＧＡ）、及びポリカプロラクトン（ＰＣＬ）。

【０３００】

上記ＰＮＰ（すなわち、ポリマー材料及びＲＮＡ　ＶＥＥを含む）がｉｎ　ｖｉｖｏ投与され、次いで、肝臓におけるコードされたペイロードの発現が評価される（例えば、実施例４～７に記載のとおり）。いくつかの態様において、動物における肝毒性も評価される（例えば、実施例３に記載のとおり）。

【表４－１】

表４．例示的なＶＥＥレプリコン配列

野生型ＶＥＥレプリコン配列（配列番号１８６）	ATGGGCGGCGCATGAGAGAAGCCCAGACCAATTACCTACCCAAAATGGA GAAAGTTCACGTTGACATCGAGGAAGACAGCCCATTCCTCAGAGCTTTG CAGCGGAGCTTCCCGCAGTTTGAGGTAGAAGCCAAGCAGGTCACTGATA ATGACCATGCTAATGCCAGAGCGTTTTCGCATCTGGCTTCAAAACTGAT CGAAACGGAGGTGGACCCATCCGACACGATCCTTGACATTGGAAGTGCG CCCGCCCGCAGAATGTATTCTAAGCACAAGTATCATTGTATCTGTCCGA TGAGATGTGCGGAAGATCCGGACAGATTGTATAAGTATGCAACTAAGCT GAAGAAAAACTGTAAGGAAATAACTGATAAGGAATTGGACAAGAAAATG AAGGAGCTGGCCGCCGTCATGAGCGACCCTGACCTGGAAACTGAGACTA TGTGCCTCCACGACGACGAGTCGTGTCGCTACGAAGGGCAAGTCGCTGT TTACCAGGATGTATACGCGGTTGACGGACCGACAAGTCTCTATCACCAA GCCAATAAGGGAGTTAGAGTCGCCTACTGGATAGGCTTTGACACCACCC CTTTTATGTTTAAGAACTTGGCTGGAGCATATCCATCATACTCTACCAA CTGGGCCGACGAAACCGTGTTAACGGCTCGTAACATAGGCCTATGCAGC TCTGACGTTATGGAGCGGTCACGTAGAGGGATGTCCATTCTTAGAAAGA AGTATTTGAAACCATCCAACAATGTTCTATTCTCTGTTGGCTCGACCAT CTACCACGAGAAGAGGGACTTACTGAGGAGCTGGCACCTGCCGTCTGTA TTTCACTTACGTGGCAAGCAAAATTACACATGTCGGTGTGAGACTATAG TTAGTTGCGACGGGTACGTCGTTAAAAGAATAGCTATCAGTCCAGGCCT GTATGGGAAGCCTTCAGGCTATGCTGCTACGATGCACCGCGAGGGATTC TTGTGCTGCAAAGTGACAGACACATTGAACGGGGAGAGGGTCTCTTTTC CCGTGTGCACGTATGTGCCAGCTACATTGTGTGACCAAATGACTGGCAT ACTGGCAACAGATGTCAGTGCGGACGACGCGCAAAAACTGCTGGTTGGG CTCAACCAGCGTATAGTCGTCAACGGTCGCACCCAGAGAAACACCAATA CCATGAAAAATTACCTTTTGCCCGTAGTGGCCCAGGCATTTGCTAGGTG GGCAAAGGAATATAAGGAAGATCAAGAAGATGAAAGGCCACTAGGACTA CGAGATAGACAGTTAGTCATGGGGGTGTTGTTGGGCTTTTAGAAGGCACA AGATAACATCTATTTATAAGCGCCCGGATACCCAAACCATCATCAAAGT GAACAGCGATTTCCACTCATTCGTGCTGCCCAGGATAGGCAGTAACACA

【表４－２】

	TTGGAGATCGGGCTGAGAACAAGAATCAGGAAAATGTTAGAGGAGCACA
	AGGAGCCGTCACCTCTCATTACCGCCGAGGACGTACAAGAAGCTAAGTG
	CGCAGCCGATGAGGCTAAGGAGGTGCGTGAAGCCGAGGAGTTGCGCGCA
	GCTCTACCACCTTTGGCAGCTGATGTTGAGGAGCCCACTCTGGAGGCAG
	ACGTCGACTTGATGTTACAAGAGGCTGGGGCCGGCTCAGTGGAGACACC
	TCGTGGCTTGATAAAGGTTACCAGCTACGATGGCGAGGACAAGATCGGC
	TCTTACGCTGTGCTTTCTCCGCAGGCTGTACTCAAGAGTGAAAAATTAT
	CTTGCATCCACCCTCTCGCTGAACAAGTCATAGTGATAACACACTCTGG
	CCGAAAAGGGCGTTATGCCGTGGAACCATACCATGGTAAAGTAGTGGTG
	CCAGAGGGACATGCAATACCCGTCCAGGACTTTCAAGCTCTGAGTGAAA
	GTGCCACCATTGTGTACAACGAACGTGAGTTCGTAAACAGGTACCTGCA
	CCATATTGCCACACATGGAGGAGCGCTGAACACTGATGAAGAATATTAC
	AAAACTGTCAAGCCCAGCGAGCACGACGGCGAATACCTGTACGACATCG
	ACAGGAAACAGTGCGTCAAGAAAGAACTAGTCACTGGGCTAGGGCTCAC
	AGGCGAGCTGGTGGATCCTCCCTTCCATGAATTCGCCTACGAGAGTCTG
	AGAACACGACCAGCCGCTCCTTACCAAGTACCAACCATAGGGGTGTATG
	GCGTGCCAGGATCAGGCAAGTCTGGCATCATTAAAAGCGCAGTCACCAA
	AAAAGATCTAGTGGTGAGCGCCAAGAAAGAAAACTGTGCAGAAATTATA
	AGGGACGTCAAGAAAATGAAAGGGCTGGACGTCAATGCCAGAACTGTGG
	ACTCAGTGCTCTTGAATGGATGCAAACACCCCGTAGAGACCCTGTATAT
	TGACGAAGCTTTTGCTTGTCATGCAGGTACTCTCAGAGCGCTCATAGCC
	ATTATAAGACCTAAAAAGGCAGTGCTCTGCGGGGATCCCAAACAGTGCG
	GTTTTTTTAACATGATGTGCCTGAAAGTGCATTTTAACCACGAGATTTG
	CACACAAGTCTTCCACAAAAGCATCTCTCGCCGTTGCACTAAATCTGTG
	ACTTCGGTCGTCTCAACCTTGTTTTACGACAAAAAAATGAGAACGACGA
	ATCCGAAAGAGACTAAGATTGTGATTGACACTACCGGCAGTACCAAACC
	TAAGCAGGACGATCTCATTCTCACTTGTTTCAGAGGGTGGGTGAAGCAG
	TTGCAAATAGATTACAAAGGCAACGAAATAATGACGGCAGCTGCCTCTC
	AAGGGCTGACCCGTAAAGGTGTGTATGCCGTTCGGTACAAGGTGAATGA
	AAATCCTCTGTACGCACCCACCTCAGAACATGTGAACGTCCTACTGACC
	CGCACGGAGGACCGCATCGTGTGGAAAACACTAGCCGGCGACCCATGGA
	TAAAAACACTGACTGCCAAGTACCCTGGGAATTTCACTGCCACGATAGA
	GGAGTGGCAAGCAGAGCATGATGCCATCATGAGGCACATCTTGGAGAGA

【表４－３】

	CCGGACCCTACCGACGTCTTCCAGAATAAGGCAAACGTGTGTTGGGCCA
	AGGCTTTAGTGCCGGTGCTGAAGACCGCTGGCATAGACATGACCACTGA
	ACAATGGAACACTGTGGATTATTTTGAAACGGACAAAGCTCACTCAGCA
	GAGATAGTATTGAACCAACTATGCGTGAGGTTCTTTGGACTCGATCTGG
	ACTCCGGTCTATTTTCTGCACCCACTGTTCCGTTATCCATTAGGAATAA
	TCACTGGGATAACTCCCCGTCGCCTAACATGTACGGGCTGAATAAAGAA
	GTGGTCCGTCAGCTCTCTCGCAGGTACCCACAACTGCCTCGGGCAGTTG
	CCACTGGAAGAGTCTATGACATGAACACTGGTACACTGCGCAATTATGA
	TCCGCGCATAAACCTAGTACCTGTAAACAGAAGACTGCCTCATGCTTTA
	GTCCTCCACCATAATGAACACCCACAGAGTGACTTTTCTTCATTCGTCA
	GCAAATTGAAGGGCAGAACTGTCCTGGTGGTCGGGGAAAAGTTGTCCGT
	CCCAGGCAAAATGGTTGACTGGTTGTCAGACCGGCCTGAGGCTACCTTC
	AGAGCTCGGCTGGATTTAGGCATCCCAGGTGATGTGCCCAAATATGACA
	TAATATTTGTTAATGTGAGGACCCCATATAAATACCATCACTATCAGCA
	GTGTGAAGACCATGCCATTAAGCTTAGCATGTTGACCAAGAAAGCTTGT
	CTGCATCTGAATCCCGGCGGAACCTGTGTCAGCATAGGTTATGGTTACG
	CTGACAGGGCCAGCGAAAGCATCATTGGTGCTATAGCGCGGCAGTTCAA
	GTTTTCCCGGGTATGCAAACCGAAATCCTCACTTGAAGAGACGGAAGTT
	CTGTTTGTATTCATTGGGTACGATCGCAAGGCCCGTACGCACAATTCTT
	ACAAGCTTTCATCAACCTTGACCAACATTTATACAGGTTCCAGACTCCA
	CGAAGCCGGATGTGCACCCTCATATCATGTGGTGCGAGGGGATATTGCC
	ACGGCCACCGAAGGAGTGATTATAAATGCTGCTAACAGCAAAGGACAAC
	CTGGCGGAGGGGTGTGCGGAGCGCTGTATAAGAAATTCCCGGAAAGCTT
	CGATTTACAGCCGATCGAAGTAGGAAAAGCGCGACTGGTCAAAGGTGCA
	GCTAAACATATCATTCATGCCGTAGGACCAAACTTCAACAAAGTTTCGG
	AGGTTGAAGGTGACAAACAGTTGGCAGAGGCTTATGAGTCCATCGCTAA
	GATTGTCAACGATAACAATTACAAGTCAGTAGCGATTCCACTGTTGTCC
	ACCGGCATCTTTTCCGGGAACAAAGATCGACTAACCCAATCATTGAACC
	ATTTGCTGACAGCTTTAGACACCACTGATGCAGATGTAGCCATATACTG
	CAGGGACAAGAAATGGGAAATGACTCTCAAGGAAGCAGTGGCTAGGAGA
	GAAGCAGTGGAGGAGATATGCATATCCGACGACTCTTCAGTGACAGAAC
	CTGATGCAGAGCTGGTGAGGGTGCATCCGAAGAGTTCTTTGGCTGGAAG
	GAAGGGCTACAGCACAAGCGATGGCAAAACTTTCTCATATTTGGAAGGG

【表４－４】

	ACCAAGTTTCACCAGGCGGCCAAGGATATAGCAGAAATTAATGCCATGT
	GGCCCGTTGCAACGGAGGCCAATGAGCAGGTATGCATGTATATCCTCGG
	AGAAAGCATGAGCAGTATTAGGTCGAAATGCCCCGTCGAAGAGTCGGAA
	GCCTCCACACCACCTAGCACGCTGCCTTGCTTGTGCATCCATGCCATGA
	CTCCAGAAAGAGTACAGCGCCTAAAAGCCTCACGTCCAGAACAAATTAC
	TGTGTGCTCATCCTTTCCATTGCCGAAGTATAGAATCACTGGTGTGCAG
	AAGATCCAATGCTCCCAGCCTATATTGTTCTCACCGAAAGTGCCTGCGT
	ATATTCATCCAAGGAAGTATCTCGTGGAAACACCACCGGTAGACGAGAC
	TCCGGAGCCATCGGCAGAGAACCAATCCACAGAGGGGACACCTGAACAA
	CCACCACTTATAACCGAGGATGAGACCAGGACTAGAACGCCTGAGCCGA
	TCATCATCGAAGAGGAAGAAGAGGATAGCATAAGTTTGCTGTCAGATGG
	CCCGACCCACCAGGTGCTGCAAGTCGAGGCAGACATTCACGGGCCGCCC
	TCTGTATCTAGCTCATCCTGGTCCATTCCTCATGCATCCGACTTTGATG
	TGGACAGTTTATCCATACTTGACACCCTGGAGGGAGCTAGCGTGACCAG
	CGGGGCAACGTCAGCCGAGACTAACTCTTACTTCGCAAAGAGTATGGAG
	TTTCTGGCGCGACCGGTGCCTGCGCCTCGAACAGTATTCAGGAACCCTC
	CACATCCCGCTCCGCGCACAAGAACACCGTCACTTGCACCCAGCAGGGC
	CTGCTCGAGAACCAGCCTAGTTTCCACCCCGCCAGGCGTGAATAGGGTG
	ATCACTAGAGAGGAGCTCGAGGCGCTTACCCCGTCACGCACTCCTAGCA
	GGTCGGTCTCGAGAACCAGCCTGGTCTCCAACCCGCCAGGCGTAAATAG
	GGTGATTACAAGAGAGGAGTTTGAGGCGTTCGTAGCACAACAACAATGA
	CGGTTTGATGCGGGTGCATACATCTTTTCCTCCGACACCGGTCAAGGGC
	ATTTACAACAAAAATCAGTAAGGCAAACGGTGCTATCCGAAGTGGTGTT
	GGAGAGGACCGAATTGGAGATTTCGTATGCCCCGCGCCTCGACCAAGAA
	AAAGAAGAATTACTACGCAAGAAATTACAGTTAAATCCCACACCTGCTA
	ACAGAAGCAGATACCAGTCCAGGAAGGTGGAGAACATGAAAGCCATAAC
	AGCTAGACGTATTCTGCAAGGCCTAGGGCATTATTTGAAGGCAGAAGGA
	AAAGTGGAGTGCTACCGAACCCTGCATCCTGTTCCTTTGTATTCATCTA
	GTGTGAACCGTGCCTTTTCAAGCCCCAAGGTCGCAGTGGAAGCCTGTAA
	CGCCATGTTGAAAGAGAACTTTCCGACTGTGGCTTCTTACTGTATTATT
	CCAGAGTACGATGCCTATTTGGACATGGTTGACGGAGCTTCATGCTGCT
	TAGACACTGCCAGTTTTTGCCCTGCAAAGCTGCGCAGCTTTCCAAAGAA
	ACACTCCTATTTGGAACCCACAATACGATCGGCAGTGCCTTCAGCGATC

【表４－５】

	CAGAACACGCTCCAGAACGTCCTGGCAGCTGCCACAAAAAGAAATTGCA
	ATGTCACGCAAATGAGAGAATTGCCCGTATTGGATTCGGCGGCCTTTAA
	TGTGGAATGCTTCAAGAAATATGCGTGTAATAATGAATATTGGGAAACG
	TTTAAAGAAAACCCCATCAGGCTTACTGAAGAAAACGTGGTAAATTACA
	TTACCAAATTAAAAGGACCAAAAGCTGCTGCTCTTTTTGCGAAGACACA
	TAATTTGAATATGTTGCAGGACATACCAATGGACAGGTTTGTAATGGAC
	TTAAAGAGAGACGTGAAAGTGACTCCAGGAACAAAACATACTGAAGAAC
	GGCCCAAGGTACAGGTGATCCAGGCTGCCGATCCGCTAGCAACAGCGTA
	TCTGTGCGGAATCCACCGAGAGCTGGTTAGGAGATTAAATGCGGTCCTG
	CTTCCGAACATTCATACACTGTTTGATATGTCGGCTGAAGACTTTGACG
	CTATTATAGCCGAGCACTTCCAGCCTGGGGATTGTGTTCTGGAAACTGA
	CATCGCGTCGTTTGATAAAAGTGAGGACGACGCCATGGCTCTGACCGCG
	TTAATGATTCTGGAAGACTTAGGTGTGGACGCAGAGCTGTTGACGCTGA
	TTGAGGCGGCTTTCGGCGAAATTTCATCAATACATTTGCCCACTAAAAC
	TAAATTTAAATTCGGAGCCATGATGAAATCTGGAATGTTCCTCACACTG
	TTTGTGAACACAGTCATTAACATTGTAATCGCAAGCAGAGTGTTGAGAG
	AACGGCTAACCGGATCACCATGTGCAGCATTCATTGGAGATGACAATAT
	CGTGAAAGGAGTCAAATCGGACAAATTAATGGCAGACAGGTGCGCCACC
	TGGTTGAATATGGAAGTCAAGATTATAGATGCTGTGGTGGGCGAGAAAG
	CGCCTTATTTCTGTGGAGGGTTTATTTTGTGTGACTCCGTGACCGGCAC
	AGCGTGCCGTGTGGCAGACCCCCTAAAAAGGCTGTTTAAGCTTGGCAAA
	CCTCTGGCAGCAGACGATGAACATGATGATGACAGGAGAAGGGCATTGC
	ATGAAGAGTCAACACGCTGGAACCGAGTGGGTATTCTTTCAGAGCTGTG
	CAAGGCAGTAGAATCAAGGTATGAAACCGTAGGAACTTCCATCATAGTT
	ATGGCCATGACTACTCTAGCTAGCAGTGTTAAATCATTCAGCTACCTGA
	GAGGGGCCCCTATAACTCTCTACGGCTAACCTGAATGGACTACGACATA
	GTCTAGTCCGCCAAGTCTAGCATATGGGCGCGCCCTCAGCATCGATTGA
	ATTGGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGGATAACATGGCCATCATC
	AAGGAGTTCATGCGCTTCAAGGTGCACATGGAGGGCTCCGTGAACGGCC
	ACGAGTTCGAGATCGAGGGCGAGGGCGAGGGCCGCCCCTACGAGGGCAC
	CCAGACCGCCAAGCTGAAGGTGACCAAGGGTGGCCCCCTGCCCTTCGCC
	TGGGACATCCTGTCCCCTCAGTTCATGTACGGCTCCAAGGCCTACGTGA
	AGCACCCCGCCGACATCCCCGACTACTTGAAGCTGTCCTTCCCCGAGGG

【表４－６】

	CTTCAAGTGGGAGCGCGTGATGAACTTCGAGGACGGCGGCGTGGTGACC GTGACCCAGGACTCCTCCCTGCAGGACGGCGAGTTCATCTACAAGGTGA AGCTGCGCGGCACCAACTTCCCCTCCGACGGCCCCGTAATGCAGAAGAA GACCATGGGCTGGGAGGCCTCCTCCGAGCGGATGTACCCCGAGGACGGC GCCCTGAAGGGCGAGATCAAGCAGAGGCTGAAGCTGAAGGACGGCGGCC ACTACGACGCTGAGGTCAAGACCACCTACAAGGCCAAGAAGCCCGTGCA GCTGCCCGGCGCCTACAACGTCAACATCAAGTTGGACATCACCTCCCAC AACGAGGACTACACCATCGTGGAACAGTACGAACGCGCCGAGGGCCGCC ACTCCACCGGCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAGGAATTGGCAAGCTG CTTACATAGAACTCGCGGCGATTGGCATGCCGCCTTAAAATTTTTATTT TATTTTTCTTTTCTTTTCCGAATCGGATTTTGTTTTTAATATTTCAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACGCGTCGAGGGGAATTAATTCTTGAAG ACGAAAGGGCCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTA TTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACA ATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGT ATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCC TTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGA AGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGC GGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGA GCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTGTTGACGC CGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTG GTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAG TAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGC CAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTT TTGCACAACATGGGGGATCATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGG AGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGT AGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAACTGGCGAACTACTTACT CTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTG CAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGA TAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTG GGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGA GTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGC CTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATA

【表４－７】

	CTTTAGATTGATTTAAAACTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGA AGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTC GTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGA GATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACCAC CGCTACCAGCGGTGGTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTT TCCGAAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCCTT CTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGC CTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGG CGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGAT AAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCT TGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCATTG AGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTA AGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAA ACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGA GCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAAC GCCAGCAACGCGAGCTCTAATACGACTCACTATAG
ＶＥＥレプリコン配列（配列番号１８７）	gctcttctaagTAATACGACTCACTATAATGGGCGGCGCATGAGAGAAG CCCAGACCAATTACCTACCCAAAATGGAGAAAGTTCACGTTGACATCGA GGAAGACAGCCCATTCCTCAGAGCTTTGCAGCGGAGCTTCCCGCAGTTT GAGGTAGAAGCCAAGCAGGTCACTGATAATGACCATGCTAATGCCAGAG CGTTTTCGCATCTGGCTTCAAAACTGATCGAAACGGAGGTGGACCCATC CGACACGATCCTTGACATTGGAAGTGCGCCCGCCCGCAGAATGTATTCT AAGCACAAGTATCATTGTATCTGTCCGATGAGATGTGCGGAAGATCCGG ACAGATTGTATAAGTATGCAACTAAGCTGAAGAAAAACTGTAAGGAAAT AACTGATAAGGAATTGGACAAGAAAATGAAGGAGCTCGCCGCCGTCATG AGCGACCCTGACCTGGAAACTGAGACTATGTGCCTCCACGACGACGAGT CGTGTCGCTACGAAGGGCAAGTCGCTGTTTACCAGGATGTATACGCGGT TGACGGACCGACAAGTCTCTATCACCAAGCCAATAAGGGAGTTAGAGTC GCCTACTGGATAGGCTTTGACACCACCCCTTTTATGTTTAAGAACTTGG CTGGAGCATATCCATCATACTCTACCAACTGGGCCGACGAAACCGTGTT AACGGCTCGTAACATAGGCCTATGCAGCTCTGACGTTATGGAGCGGTCA CGTAGAGGGATGTCCATTCTTAGAAAGAAGTATTTGAAACCATCCAACA ATGTTCTATTCTCTGTTGGCTCGACCATCTACCACGAGAAGAGGGACTT

【表４－８】

	ACTGAGGAGCTGGCACCTGCCGTCTGTATTTCACTTACGTGGCAAGCAA
	AATTACACATGTCGGTGTGAGACTATAGTTAGTTGCGACGGGTACGTCG
	TTAAAAGAATAGCTATCAGTCCAGGCCTGTATGGGAAGCCTTCAGGCTA
	TGCTGCTACGATGCACCGCGAGGGATTCTTGTGCTGCAAAGTGACAGAC
	ACATTGAACGGGGAGAGGGTCTCTTTTCCCGTGTGCACGTATGTGCCAG
	CTACATTGTGTGACCAAATGACTGGCATACTGGCAACAGATGTCAGTGC
	GGACGACGCGCAAAAACTGCTGGTTGGGCTCAACCAGCGTATAGTCGTC
	AACGGTCGCACCCAGAGAAACACCAATACCATGAAAAATTACCTTTTGC
	CCGTAGTGGCCCAGGCATTTGCTAGGTGGGCAAAGGAATATAAGGAAGA
	TCAAGAAGATGAAAGGCCACTAGGACTACGAGATAGACAGTTAGTCATG
	GGGTGTTGTTGGGCTTTTAGAAGGCACAAGATAACATCTATTTATAAGC
	GCCCGGATACCCAAACCATCATCAAAGTGAACAGCGATTTCCACTCATT
	CGTGCTGCCCAGGATAGGCAGTAACACATTGGAGATCGGGCTGAGAACA
	AGAATCAGGAAAATGTTAGAGGAGCACAAGGAGCCGTCACCTCTCATTA
	CCGCCGAGGACGTACAAGAAGCTAAGTGCGCAGCCGATGAGGCTAAGGA
	GGTGCGTGAAGCCGAGGAGTTGCGCGCAGCTCTACCACCTTTGGCAGCT
	GATGTTGAGGAGCCCACTCTGGAAGCCGATGTCGACTTGATGTTACAAG
	AGGCTGGGGCCGGCTCAGTGGAGACACCTCGTGGCTTGATAAAGGTTAC
	CAGCTACGATGGCGAGGACAAGATCGGCTCTTACGCTGTGCTTTCTCCG
	CAGGCTGTACTCAAGAGTGAAAAATTATCTTGCATCCACCCTCTCGCTG
	AACAAGTCATAGTGATAACACACTCTGGCCGAAAAGGGCGTTATGCCGT
	GGAACCATACCATGGTAAAGTAGTGGTGCCAGAGGGACATGCAATACCC
	GTCCAGGACTTTCAAGCTCTGAGTGAAAGTGCCACCATTGTGTACAACG
	AACGTGAGTTCGTAAACAGGTACCTGCACCATATTGCCACACATGGAGG
	AGCGCTGAACACTGATGAAGAATATTACAAAACTGTCAAGCCCAGCGAG
	CACGACGGCGAATACCTGTACGACATCGACAGGAAACAGTGCGTCAAGA
	AAGAACTAGTCACTGGGCTAGGGCTCACAGGCGAGCTGGTGGATCCTCC
	CTTCCATGAATTCGCCTACGAGAGTCTGAGAACACGACCAGCCGCTCCT
	TACCAAGTACCAACCATAGGGGTGTATGGCGTGCCAGGATCAGGCAAGT
	CTGGCATCATTAAAAGCGCAGTCACCAAAAAAGATCTAGTGGTGAGCGC
	CAAGAAAGAAAACTGTGCAGAAATTATAAGGGACGTCAAGAAAATGAAA
	GGGCTGGACGTCAATGCCAGAACTGTGGACTCAGTGCTCTTGAATGGAT
	GCAAACACCCCGTAGAGACCCTGTATATTGACGAAGCTTTTGCTTGTCA

【表４－９】

	TGCAGGTACTCTCAGAGCGCTCATAGCCATTATAAGACCTAAAAAGGCA
	GTGCTCTGCGGGGATCCCAAACAGTGCGGTTTTTTTAACATGATGTGCC
	TGAAAGTGCATTTTAACCACGAGATTTGCACACAAGTCTTCCACAAAAG
	CATCTCTCGCCGTTGCACTAAATCTGTGACTTCGGTCGTCTCAACCTTG
	TTTTACGACAAAAAAATGAGAACGACGAATCCGAAAGAGACTAAGATTG
	TGATTGACACTACCGGCAGTACCAAACCTAAGCAGGACGATCTCATTCT
	CACTTGTTTCAGAGGGTGGGTGAAGCAGTTGCAAATAGATTACAAAGGC
	AACGAAATAATGACGGCAGCTGCCTCTCAAGGGCTGACCCGTAAAGGTG
	TGTATGCCGTTCGGTACAAGGTGAATGAAAATCCTCTGTACGCACCCAC
	CTCAGAACATGTGAACGTCCTACTGACCCGCACGGAGGACCGCATCGTG
	TGGAAAACACTAGCCGGCGACCCATGGATAAAAACACTGACTGCCAAGT
	ACCCTGGGAATTTCACTGCCACGATAGAGGAGTGGCAAGCAGAGCATGA
	TGCCATCATGAGGCACATCTTGGAGAGACCGGACCCTACCGACGTCTTC
	CAGAATAAGGCAAACGTGTGTTGGGCCAAGGCTTTAGTGCCGGTGCTGA
	AGACCGCTGGCATAGACATGACCACTGAACAATGGAACACTGTGGATTA
	TTTTGAAACGGACAAAGCTCACTCAGCAGAGATAGTATTGAACCAACTA
	TGCGTGAGGTTCTTTGGACTCGATCTGGACTCCGGTCTATTTTCTGCAC
	CCACTGTTCCGTTATCCATTAGGAATAATCACTGGGATAACTCCCCGTC
	GCCTAACATGTACGGGCTGAATAAAGAAGTGGTCCGTCAGCTCTCTCGC
	AGGTACCCACAACTGCCTCGGGCAGTTGCCACTGGAAGAGTCTATGACA
	TGAACACTGGTACACTGCGCAATTATGATCCGCGCATAAACCTAGTACC
	TGTAAACAGAAGACTGCCTCATGCTTTAGTCCTCCACCATAATGAACAC
	CCACAGAGTGACTTTTCTTCATTCGTCAGCAAATTGAAGGGCAGAACTG
	TCCTGGTGGTCGGGGAAAAGTTGTCCGTCCCAGGCAAAATGGTTGACTG
	GTTGTCAGACCGGCCTGAGGCTACCTTCAGAGCTCGGCTGGATTTAGGC
	ATCCCAGGTGATGTGCCCAAATATGACATAATATTTGTTAATGTGAGGA
	CCCCATATAAATACCATCACTATCAGCAGTGTGAAGACCATGCCATTAA
	GCTTAGCATGTTGACCAAGAAAGCTTGTCTGCATCTGAATCCCGGCGGA
	ACCTGTGTCAGCATAGGTTATGGTTACGCTGACAGGGCCAGCGAAAGCA
	TCATTGGTGCTATAGCGCGGCAGTTCAAGTTTTCCCGGGTATGCAAACC
	GAAATCCTCACTTGAAGAGACGGAAGTTCTGTTTGTATTCATTGGGTAC
	GATCGCAAGGCCCGTACGCACAATCCTTACAAGCTTTCATCAACCTTGA
	CCAACATTTATACAGGTTCCAGACTCCACGAAGCCGGATGTGCACCCTC

【表４－１０】

	ATATCATGTGGTGCGAGGGGATATTGCCACGGCCACCGAAGGAGTGATT
	ATAAATGCTGCTAACAGCAAAGGACAACCTGGCGGAGGGGTGTGCGGAG
	CGCTGTATAAGAAATTCCCGGAAAGCTTCGATTTACAGCCGATCGAAGT
	AGGAAAAGCGCGACTGGTCAAAGGTGCAGCTAAACATATCATTCATGCC
	GTAGGACCAAACTTCAACAAAGTTTCGGAGGTTGAAGGTGACAAACAGT
	TGGCAGAGGCTTATGAGTCCATCGCTAAGATTGTCAACGATAACAATTA
	CAAGTCAGTAGCGATTCCACTGTTGTCCACCGGCATCTTTTCCGGGAAC
	AAAGATCGACTAACCCAATCATTGAACCATTTGCTGACAGCTTTAGACA
	CCACTGATGCAGATGTAGCCATATACTGCAGGGACAAGAAATGGGAAAT
	GACTCTCAAGGAAGCAGTGGCTAGGAGAGAAGCAGTGGAGGAGATATGC
	ATATCCGACGACTCTTCAGTGACAGAACCTGATGCAGAGCTGGTGAGGG
	TGCATCCGAAGAGTTCTTTGGCTGGAAGGAAGGGCTACAGCACAAGCGA
	TGGCAAAACTTTCTCATATTTGGAAGGGACCAAGTTTCACCAGGCGGCC
	AAGGATATAGCAGAAATTAATGCCATGTGGCCCGTTGCAACGGAGGCCA
	ATGAGCAGGTATGCATGTATATCCTCGGAGAAAGCATGAGCAGTATTAG
	GTCGAAATGCCCCGTCGAAGAGTCGGAAGCCTCCACACCACCTAGCACG
	CTGCCTTGCTTGTGCATCCATGCCATGACTCCAGAAAGAGTACAGCGCC
	TAAAAGCCTCACGTCCAGAACAAATTACTGTGTGCTCATCCTTTCCATT
	GCCGAAGTATAGAATCACTGGTGTGCAGAAGATCCAATGCTCCCAGCCT
	ATATTGTTCTCACCGAAAGTGCCTGCGTATATTCATCCAAGGAAGTATC
	TCGTGGAAACACCACCGGTAGACGAGACTCCGGAGCCATCGGCAGAGAA
	CCAATCCACAGAGGGGACACCTGAACAACCACCACTTATAACCGAGGAT
	GAGACCAGGACTAGAACGCCTGAGCCGATCATCATCGAAGAGGAAGAAG
	AGGATAGCATAAGTTTGCTGTCAGATGGCCCGACCCACCAGGTGCTGCA
	AGTCGAGGCAGACATTCACGGGCCGCCCTCTGTATCTAGCTCATCCTGG
	TCCATTCCTCATGCATCCGACTTTGATGTGGACAGTTTATCCATACTTG
	ACACCCTGGAGGGAGCTAGCGTGACCAGCGGGGCAACGTCAGCCGAGAC
	TAACTCTTACTTCGCAAAGAGTATGGAGTTTCTGGCGCGACCGGTGCCT
	GCGCCTCGAACAGTATTCAGGAACCCTCCACATCCCGCTCCGCGCACAA
	GAACACCGTCACTTGCACCCAGCAGGGCCTGCTCGAGAACCAGCCTAGT
	TTCCACCCCGCCAGGCGTGAATAGGGTGATCACTAGAGAGGAGCTCGAG
	GCGCTTACCCCGTCACGCACTCCTAGCAGGTCGGTCTCGAGAACCAGCC
	TGGTCTCCAACCCGCCAGGCGTAAATAGGGTGATTACAAGAGAGGAGTT

【表４－１１】

	TGAGGCGTTCGTAGCACAACAACAATGACGGTTTGATGCGGGTGCATAC
	ATCTTTTCCTCCGACACCGGTCAAGGGCATTTACAACAAAAATCAGTAA
	GGCAAACGGTGCTATCCGAAGTGGTGTTGGAGAGGACCGAATTGGAGAT
	TTCGTATGCCCCGCGCCTCGACCAAGAAAAAGAAGAATTACTACGCAAG
	AAATTACAGTTAAATCCCACACCTGCTAACAGAAGCAGATACCAGTCCA
	GGAAGGTGGAGAACATGAAAGCCATAACAGCTAGACGTATTCTGCAAGG
	CCTAGGGCATTATTTGAAGGCAGAAGGAAAAGTGGAGTGCTACCGAACC
	CTGCATCCTGTTCCTTTGTATTCATCTAGTGTGAACCGTGCCTTTTCAA
	GCCCCAAGGTCGCAGTGGAAGCCTGTAACGCCATGTTGAAAGAGAACTT
	TCCGACTGTGGCTTCTTACTGTATTATTCCAGAGTACGATGCCTATTTG
	GACATGGTTGACGGAGCTTCATGCTGCTTAGACACTGCCAGTTTTTGCC
	CTGCAAAGCTGCGCAGCTTTCCAAAGAAACACTCCTATTTGGAACCCAC
	AATACGATCGGCAGTGCCTTCAGCGATCCAGAACACGCTCCAGAACGTC
	CTGGCAGCTGCCACAAAAAGAAATTGCAATGTCACGCAAATGAGAGAAT
	TGCCCGTATTGGATTCGGCGGCCTTTAATGTGGAATGCTTCAAGAAATA
	TGCGTGTAATAATGAATATTGGGAAACGTTTAAAGAAAACCCCATCAGG
	CTTACTGAAGAAAACGTGGTAAATTACATTACCAAATTAAAAGGACCAA
	AAGCTGCTGCTCTTTTTGCGAAGACACATAATTTGAATATGTTGCAGGA
	CATACCAATGGACAGGTTTGTAATGGACTTAAAGAGAGACGTGAAAGTG
	ACTCCAGGAACAAAACATACTGAAGAACGGCCCAAGGTACAGGTGATCC
	AGGCTGCCGATCCGCTAGCAACAGCGTATCTGTGCGGAATCCACCGAGA
	GCTGGTTAGGAGATTAAATGCGGTCCTGCTTCCGAACATTCATACACTG
	TTTGATATGTCGGCTGAAGACTTTGACGCTATTATAGCCGAGCACTTCC
	AGCCTGGGGATTGTGTTCTGGAAACTGACATCGCGTCGTTTGATAAAAG
	TGAGGACGACGCCATGGCTCTGACCGCGTTAATGATTCTGGAAGACTTA
	GGTGTGGACGCAGAGCTGTTGACGCTGATTGAGGCGGCTTTCGGCGAAA
	TTTCATCAATACATTTGCCCACTAAAACTAAATTTAAATTCGGAGCCAT
	GATGAAATCTGGAATGTTCCTCACACTGTTTGTGAACACAGTCATTAAC
	ATTGTAATCGCAAGCAGAGTGTTGAGAGAACGGCTAACCGGATCACCAT
	GTGCAGCATTCATTGGAGATGACAATATCGTGAAAGGAGTCAAATCGGA
	CAAATTAATGGCAGACAGGTGCGCCACCTGGTTGAATATGGAAGTCAAG
	ATTATAGATGCTGTGGTGGGCGAGAAAGCGCCTTATTTCTGTGGAGGGT
	TTATTTTGTGTGACTCCGTGACCGGCACAGCGTGCCGTGTGGCAGACCC

【表４－１２】

	CCTAAAAAGGCTGTTTAAGCTTGGCAAACCTCTGGCAGCAGACGATGAA
	CATGATGATGACAGGAGAAGGGCATTGCATGAAGAGTCAACACGCTGGA
	ACCGAGTGGGTATTCTTTCAGAGCTGTGCAAGGCAGTAGAATCAAGGTA
	TGAAACCGTAGGAACTTCCATCATAGTTATGGCCATGACTACTCTAGCT
	AGCAGTGTTAAATCATTCAGCTACCTGAGAGGGGCCCCTATAACTCTCT
	ACGGCTAACCTGAATGGACTACGACATAGTCTAGTCCGCCAAGGCCACC
	GATATCTATGTTACGTGCAAAGGTGATTGTCACCCCCCGAAAGACCATA
	TTGTGACACACCCTCAGTATCACGCCCAAACATTTACAGCCGCGGTGTC
	AAAAACCGCGTGGACGTGGTTAACATCCCTGCTGGGAGGATCAGCCGTA
	ATTATTATAATTGGCTTGGTGCTGGCTACTATTGTGGCCATGTACGTGC
	TGACCAACCAGAAACATAATTGAATACAGCAGCAATTGGCAAGCTGCTT
	ACATAGAACTCGCGGCGATTGGCATGCCGCCTTAAAATTTTTATTTTAT
	TTTTCTTTTCTTTTCCGAATCGGATTTTGTTTTTAATATTTCAAAAAAA
	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAaaagaagagcGCAGC
	TCTGGCCCGTGTCTCAAAATCTCTGATGTTACATTGCACAAGATAAAAA
	TATATCATCATGAACAATAAAACTGTCTGCTTACATAAACAGTAATACA
	AGGGGTGTTATGAGCCATATTCAACGGGAAACGTCGAGGCCGCGATTAA
	ATTCCAACATGGATGCTGATTTATATGGGTATAAATGGGCTCGCGATAA
	TGTCGGGCAATCAGGTGCGACAATCTATCGCTTGTATGGGAAGCCCGAT
	GCGCCAGAGTTGTTTCTGAAACATGGCAAAGGTAGCGTTGCCAATGATG
	TTACAGATGAGATGGTCAGACTAAACTGGCTGACGGAATTTATGCCTCT
	TCCGACCATCAAGCATTTTATCCGTACTCCTGATGATGCATGGTTACTC
	ACCACTGCGATCCCCGGAAAAACAGCATTCCAGGTATTAGAAGAATATC
	CTGATTCAGGTGAAAATATTGTTGATGCGCTGGCAGTGTTCCTGCGCCG
	GTTGCATTCGATTCCTGTTTGTAATTGTCCTTTTAACAGCGATCGCGTA
	TTTCGTCTCGCTCAGGCGCAATCACGAATGAATAACGGTTTGGTTGATG
	CGAGTGATTTTGATGACGAGCGTAATGGCTGGCCTGTTGAACAAGTCTG
	GAAAGAAATGCATAAACTTTTGCCATTCTCACCGGATTCAGTCGTCACT
	CATGGTGATTTCTCACTTGATAACCTTATTTTTGACGAGGGGAAATTAA
	TAGGTTGTATTGATGTTGGACGAGTCGGAATCGCAGACCGATACCAGGA
	TCTTGCCATCCTATGGAACTGCCTCGGTGAGTTTTCTCCTTCATTACAG
	AAACGGCTTTTTCAAAAATATGGTATTGATAATCCTGATATGAATAAAT
	TGCAGTTTCATTTGATGCTCGATGAGTTTTTCTAATCAGAATTGGTTAA

【表４－１３】

	TTGGTTGTAACACTGGCAGAGCATTACGCTGACTTGACGGGACGGCGCA AGCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTACGCGTCGTTCCACTGAG CGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTT TCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCG GTGGTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAA CTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTTCTTCTAGTGTAGCC GTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTC GCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGT GTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCG GTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACG ACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCA CGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGT CGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTAT CTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTT TGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGC GGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACAT

【０３０１】

特許請求の範囲の解釈には、発明の概要及び要約書のセクションではなく、発明を実施するための形態のセクションが使用されることが意図されることを理解されたい。発明の概要及び要約書のセクションは、本発明者（複数可）によって企図される本開示の１つ以上の例示的な態様を示すことができるが、全てではないため、本開示及び添付の特許請求の範囲を限定することは決して意図されない。

【０３０２】

本開示について、特定の機能の実施及びその関係を例示する機能上の基礎的要素を用いて、上に記載してきた。これらの機能上の基礎的要素の境界は、説明の便宜上、本明細書において任意に定義されたものである。特定の機能及びその関係が適切に実施される限り、別の境界を定義することもできる。

【０３０３】

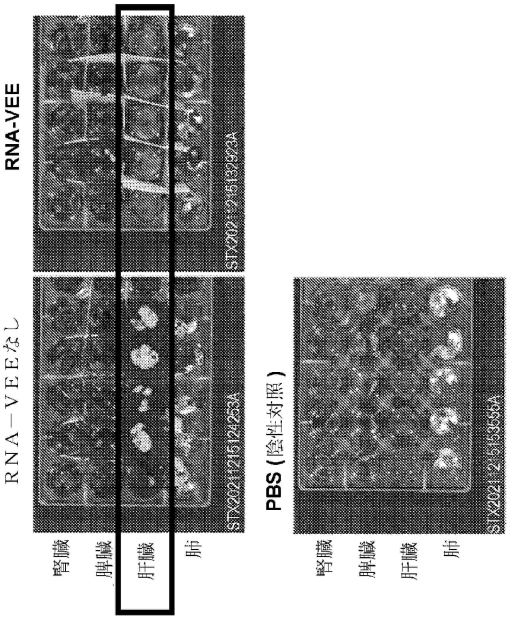
特定の態様の前述の説明は、本開示の全般的な性質を十分に明らかにしたものであるので、当業者の知識を適用することによって、過度な実験をすることなく、本開示の一般概要から逸脱せずに、そのような特定の態様を容易に改変したり、及び／または様々な用途に適合させることができる。したがって、そのような適合及び改変は、本明細書に示される教示及び指針に基づき、本開示の態様の等価物の意味及び範囲内にあることが意図される。本明細書の表現法または用語は、限定するためではなく、説明を目的にするものであり、本明細書の用語または表現法は、本教示及び指針に照らして、当業者によって解釈されるものであることを理解されたい。

【０３０４】

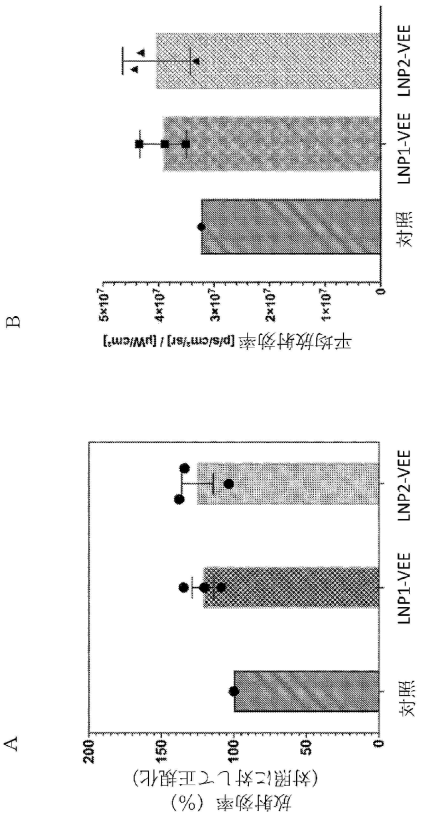
本開示の広さ及び範囲は、上記の例示的な態様のいずれかによって限定されるものではなく、以下の特許請求の範囲及びその等価物によってのみ定義されるものである。

【図面】

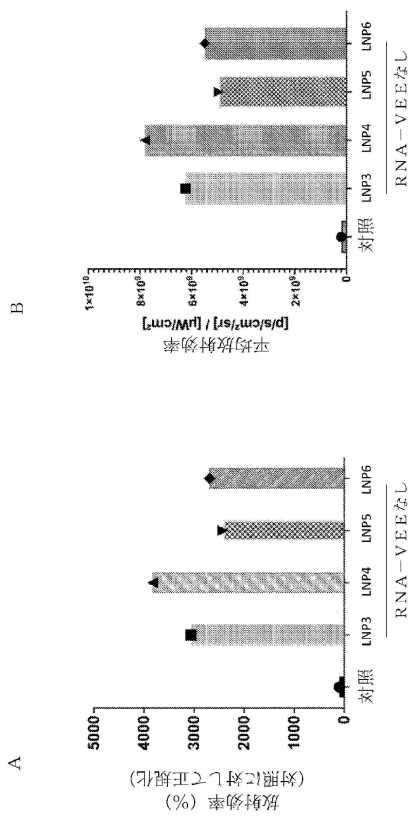
【図１】


RNA-VEE
RNA－VEEなし
PBS（陰性対照）
腎臓
脾臓
肝臓
肺

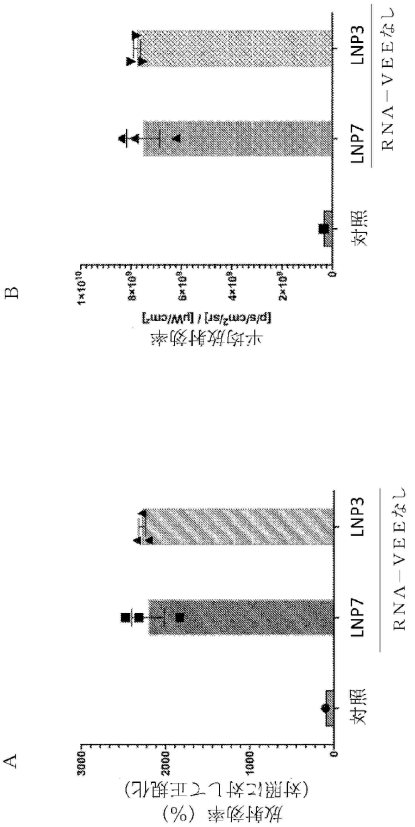
【図２】


A
B
放射効率（%）
（対照に対して正規化）
平均放射効率 [p/s/cm²/sr] / [μW/cm²]
対照
LNP1-VEE
LNP2-VEE

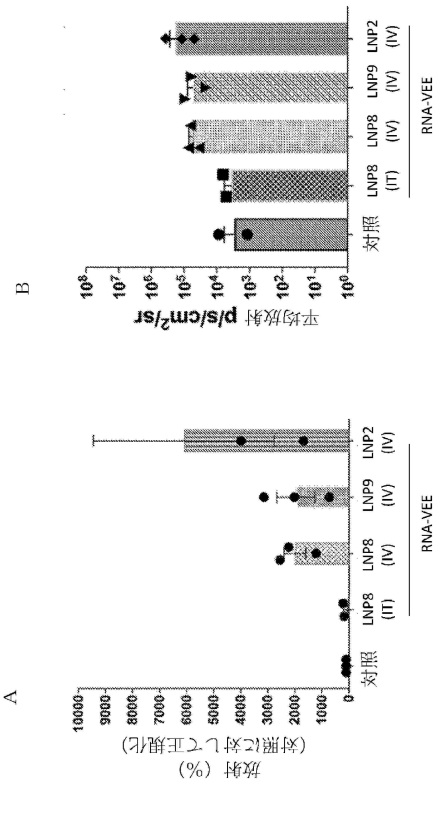
【図３】


A
B
放射効率（%）
（対照に対して正規化）
平均放射効率 [p/s/cm²/sr] / [μW/cm²]
対照
LNP3
LNP4
LNP5
LNP6
RNA－VEEなし

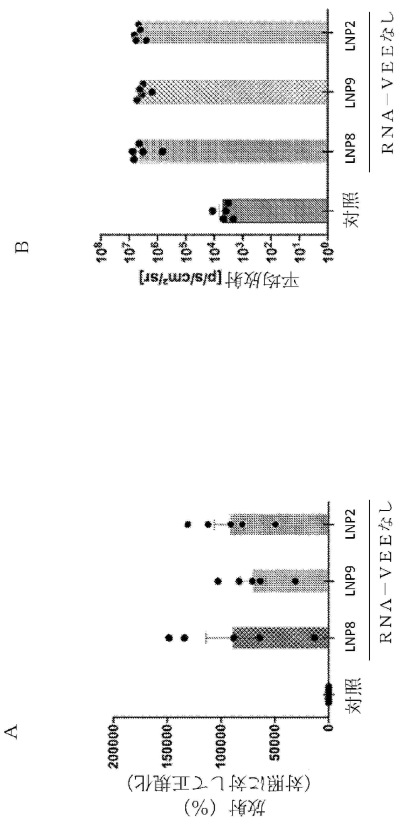
【図４】


A
B
放射効率（%）
（対照に対して正規化）
平均放射効率 [p/s/cm²/sr] / [μW/cm²]
対照
LNP7
LNP3
RNA－VEEなし

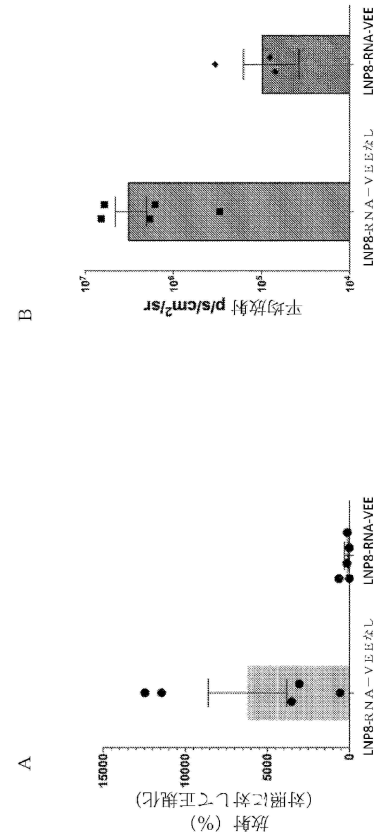
【図５】


A
放射（%）
（対照に対して正規化）
対照
LNP8 (IT)
LNP8 (IV)
LNP9 (IV)
LNP2 (IV)
RNA-VEE
B
平均放射 p/s/cm²/sr
対照
LNP8 (IT)
LNP8 (IV)
LNP9 (IV)
LNP2 (IV)
RNA-VEE

【図６】


A
放射（%）
（対照に対して正規化）
対照
LNP8
LNP9
LNP2
RNA－VEEなし
B
平均放射 [p/s/cm²/sr]
対照
LNP8
LNP9
LNP2
RNA－VEEなし

【図７】


A
放射（%）
（対照に対して正規化）
LNP8-RNA－VEEなし
LNP8-RNA-VEE
B
平均放射 p/s/cm²/sr
LNP8-RNA－VEEなし
LNP8-RNA-VEE

【配列表】
20255162260000001.xml

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2023/066266

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K9/51 A61K31/00 A61K31/70
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)
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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 11 026 894 B2 (MASSACHUSETTS INST TECHNOLOGY [US]) 8 June 2021 (2021-06-08) column 8, lines 26-28 column 8, paragraph 43-53 column 9, lines 43-65 column 5, lines 65-67 claims 21,16,15,14,10,7 figure 1d example 2 abstract the whole document	1-59
X	WO 2022/020811 A1 (STRAND THERAPEUTICS INC [US]) 27 January 2022 (2022-01-27) claims 1,2,9,28-30,31-32,50 paragraphs [0242], [0226], [0221] - [0224] abstract the whole document	1-59

☐ 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	Date of mailing of the international search report
9 August 2023	23/08/2023

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Helliot, Bertrand

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2023/066266

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. [X] forming part of the international application as filed.

   b. [ ] furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.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:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2023/066266

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 11026894 B2	08-06-2021	US 2020222332 A1	16-07-2020
		WO 2020146700 A1	16-07-2020
WO 2022020811 A1	27-01-2022	EP 4185274 A1	31-05-2023
		WO 2022020811 A1	27-01-2022

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI		テーマコード（参考）
A61P 29/00	*(2006.01)*	A61P	29/00	
A61P 25/00	*(2006.01)*	A61P	25/00	
A61P 25/18	*(2006.01)*	A61P	25/18	
A61K 31/7088	*(2006.01)*	A61K	31/7088	
A61K 35/76	*(2015.01)*	A61K	35/76	
A61K 9/127	*(2025.01)*	A61K	9/127	
A61K 47/44	*(2017.01)*	A61K	47/44	
A61K 47/28	*(2006.01)*	A61K	47/28	
A61K 47/24	*(2006.01)*	A61K	47/24	
A61K 47/10	*(2017.01)*	A61K	47/10	
A61K 39/395	*(2006.01)*	A61K	39/395	D
A61K 45/00	*(2006.01)*	A61K	39/395	N
A61K 31/7115	*(2006.01)*	A61K	45/00	
C12N 15/13	*(2006.01)*	A61K	39/395	U
A61K 38/19	*(2006.01)*	A61K	31/7115	
A61K 38/20	*(2006.01)*	C12N	15/13	
		A61K	38/19	
		A61K	38/20	

,MC,ME,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,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MU,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

（特許庁注：以下のものは登録商標）

１．ＴＲＩＴＯＮ

リート２０、スウィート・エイ、ストランド・セラピューティクス・インコーポレイテッド内
(72)発明者　ブートハロー，リオ
アメリカ合衆国０２２１５マサチューセッツ州ボストン、オーバーランド・ストリート２０、スウィート・エイ、ストランド・セラピューティクス・インコーポレイテッド内
(72)発明者　アブラハム、ウーベト
アメリカ合衆国０２２１５マサチューセッツ州ボストン、オーバーランド・ストリート２０、スウィート・エイ、ストランド・セラピューティクス・インコーポレイテッド内
(72)発明者　ジャオ，ウェイユー
アメリカ合衆国０２２１５マサチューセッツ州ボストン、オーバーランド・ストリート２０、スウィート・エイ、ストランド・セラピューティクス・インコーポレイテッド内
(72)発明者　メノン，ナンディタ
アメリカ合衆国０２２１５マサチューセッツ州ボストン、オーバーランド・ストリート２０、スウィート・エイ、ストランド・セラピューティクス・インコーポレイテッド内
(72)発明者　シャー，アーロック
アメリカ合衆国０２２１５マサチューセッツ州ボストン、オーバーランド・ストリート２０、スウィート・エイ、ストランド・セラピューティクス・インコーポレイテッド内
(72)発明者　ナムビアール，プラシャーント
アメリカ合衆国０２２１５マサチューセッツ州ボストン、オーバーランド・ストリート２０、スウィート・エイ、ストランド・セラピューティクス・インコーポレイテッド内
(72)発明者　北田 輔
アメリカ合衆国０２２１５マサチューセッツ州ボストン、オーバーランド・ストリート２０、スウィート・エイ、ストランド・セラピューティクス・インコーポレイテッド内

Ｆターム（参考）　4C076　AA19 BB02 BB11 BB13 BB15 BB16 BB21 BB22 BB24 BB25

Fターム（参考）
BB31 CC01 CC04 CC27 DD63 DD70 EE23 EE51 FF70
4C084 AA13 AA19 DA01 DA12 MA24 MA56 MA57 MA58 MA59 MA63 MA65 MA66 NA07 NA14 ZA02 ZA18 ZB11 ZB26
4C085 AA13 AA14 BB31 CC22 CC23 EE01 GG01 GG02 GG03 GG04 GG05 GG06 GG10
4C086 AA01 AA02 EA16 MA02 MA05 MA24 MA56 MA57 MA58 MA59 MA63 MA65 MA66 NA07 NA14 ZA02 ZA18 ZB11 ZB26
4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 MA24 MA56 MA57 MA58 MA59 MA63 MA65 MA66 NA07 NA14 ZA02 ZA18 ZB11 ZB26