

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-525141
(P2024-525141A)

(43)公表日 令和6年7月10日(2024.7.10)

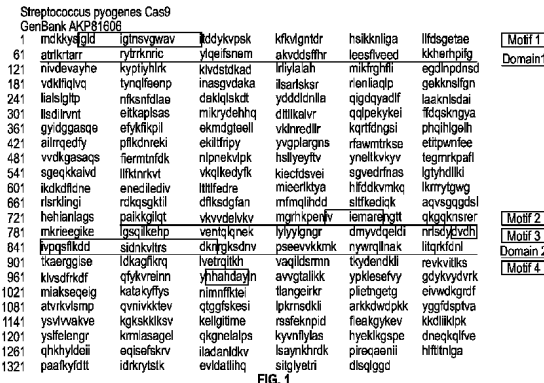
(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 0 8 G	69/48 (2006.01)	C 0 8 G	69/48	Z N A	4 C 0 7 6
C 0 8 G	69/10 (2006.01)	C 0 8 G	69/10		4 C 0 8 4
A 6 1 K	9/00 (2006.01)	A 6 1 K	9/00		4 C 0 8 6
A 6 1 K	47/42 (2017.01)	A 6 1 K	47/42		4 J 0 0 1
A 6 1 K	47/44 (2017.01)	A 6 1 K	47/44		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全175頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2023-575995(P2023-575995)	(71)出願人	520113376	最終頁に続く	
(86)(22)出願日	令和4年6月13日(2022.6.13)		ジーンエディット インコーポレイテッド		
(85)翻訳文提出日	令和6年2月7日(2024.2.7)		アメリカ合衆国、9 4 0 8 0 カリフォルニア州、サウス サン フランシスコ、ゲートウェイ ブールヴァード 6 8 1、スイート 3 1 1 / 3 1 3		
(86)国際出願番号	PCT/US2022/033302	(74)代理人	100136629		
(87)国際公開番号	WO2022/261561		弁理士 鎌田 光宣		
(87)国際公開日	令和4年12月15日(2022.12.15)	(74)代理人	100080791		
(31)優先権主張番号	63/209,919		弁理士 高島 一	最終頁に続く	
(32)優先日	令和3年6月11日(2021.6.11)	(74)代理人	100125070		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		弁理士 土井 京子		
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,最終頁に続く	(74)代理人	100121212		
			弁理士 田村 弥栄子		
		(74)代理人	100174296		

(54)【発明の名称】 ポリアミン基およびポリアルキレンオキシド基を有する側鎖を含む生分解性ポリマー

(57)【要約】

加水分解性ポリマー骨格を含むポリマーであって、該ポリマー骨格が(i)疎水性側鎖を含むモノマー単位;(ii)ポリアミン基およびポリアルキレンオキシド基を含む側鎖を含むモノマー単位;および必要に応じて(iii)ポリアミン基を含みポリアルキレンオキシド基を含まない側鎖を含むモノマー単位を含む、ポリマー、ならびに当該ポリマーの調製方法、および当該ポリマーを用いて核酸および/またはポリペプチドを細胞に送達する方法が提供される。

【選択図】 図 1



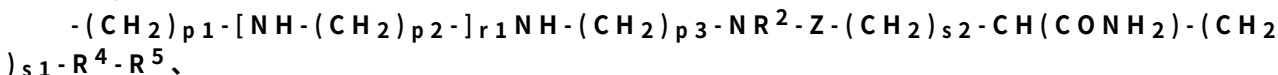
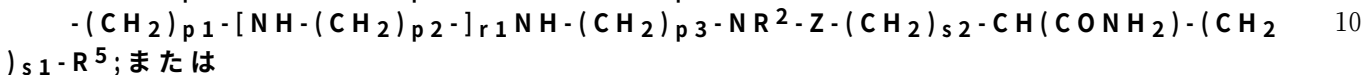
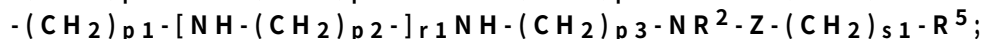
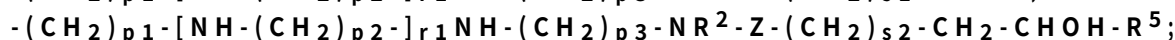
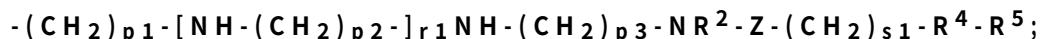
【特許請求の範囲】

【請求項 1】

加水分解性ポリマー骨格を含むポリマーであって、該ポリマー骨格が：

(i)疎水性側鎖を含むモノマー単位；

(ii)ポリアミン基およびポリアルキレンオキシド基を含む側鎖を含むモノマー単位であって、該ポリアミン基およびポリアルキレンオキシド基が一緒になって構造：



式中、 $p1 \sim p3$ のそれぞれは独立して1～5の整数であり；

$r1$ は0～5の整数であり；

$s1$ は0～5の整数であり；

$s2$ は0～5の整数であり；

各場合の R^2 は独立して水素あるいは $\text{C}_1\text{-C}_{12}$ アルキル基、 $\text{C}_2\text{-C}_{12}$ アルケニル基、 $\text{C}_3\text{-C}_{12}$ シクロアルキル基または $\text{C}_3\text{-C}_{12}$ シクロアルケニル基であり；

Z は存在していてもよく、そして存在する場合、 $-\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$ 、 $-\text{S}(\text{O})(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{NH})\text{NR}^2-$ 、 $-\text{C}(\text{S})\text{O}-$ 、 $-\text{C}(\text{S})\text{NR}^2-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^2-$ または置換されていてもよいアリー

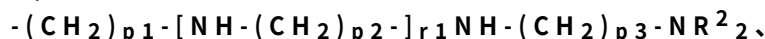
ルまたはヘテロアリールであり；
各場合の R^4 は独立して $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$ 、 $-\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{-O-C}(\text{O})\text{-O-CH}_2-$ 、 $-\text{O-C}(\text{O})\text{-O-}$ 、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}(\text{O})(\text{O})-$ または結合であり；および

R^5 はポリアルキレンオキシドを含む基である；

を有する、モノマー単位；

および、必要に応じて、

(iii)式：



式中、 $p1 \sim p3$ のそれぞれは独立して1～5の整数であり；

$r1$ は0～5の整数であり；

および各場合の R^2 は独立して水素あるいは $\text{C}_1\text{-C}_{12}$ アルキル基、 $\text{C}_2\text{-C}_{12}$ アルケニル基、 $\text{C}_3\text{-C}_{12}$ シクロアルキル基または $\text{C}_3\text{-C}_{12}$ シクロアルケニル基であるか、あるいは R^2 は第2の R^2 およびそれが結合する窒素と組み合わせさせて複素環基を形成する；

を有するポリアミン基を含みポリアルキレンオキシド基を含まない側鎖を含むモノマー単位

を含む、ポリマー。

【請求項 2】

疎水性基が脂肪族基またはアリール基、必要に応じてアルキル基、アルケニル基、シクロアルキル基、シクロアルケニル基、ヘテロアルキル基または複素環基を含む、請求項 1 のポリマー。

【請求項 3】

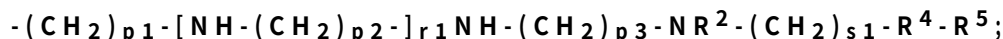
疎水性基が $\text{C}_3\text{-C}_{12}$ 直鎖または分岐アルキル基、必要に応じて $\text{C}_3\text{-C}_8$ または $\text{C}_3\text{-C}_6$ 直鎖または分岐アルキル基を含む、請求項 1 のポリマー。

【請求項 4】

ポリアルキレンオキシド基がポリエチレンオキシド基、ポリプロピレンオキシド基、またはそれらの組み合わせを含む、請求項 1～3 のいずれかのポリマー。

【請求項 5】

ポリアミン基およびポリアルキレンオキシド基を含む側鎖が式：



10

20

30

40

50

$-(CH_2)_{p1}-[NH-(CH_2)_{p2}]_{r1}NH-(CH_2)_{p3}-NR^2-CH_2-CHOH-R^5$;
 $-(CH_2)_{p1}-[NH-(CH_2)_{p2}]_{r1}NH-(CH_2)_{p3}-NR^2-(CH_2)_{s1}-R^5$;
 $-(CH_2)_{p1}-[NH-(CH_2)_{p2}]_{r1}NH-(CH_2)_{p3}-NR^2-CH(CONH_2)-(CH_2)_{s1}-R^5$; また

は

$-(CH_2)_{p1}-[NH-(CH_2)_{p2}]_{r1}NH-(CH_2)_{p3}-NR^2-CH(CONH_2)-(CH_2)_{s1}-R^4-R^5$ 、
 式中、 $p1 \sim p3$ のそれぞれは独立して1～5の整数であり；

$r1$ は0～5の整数であり；

$s1$ は0～5の整数であり；

各場合の R^2 は独立して水素あるいは C_1-C_6 アルキル基、 C_2-C_6 アルケニル基、 C_3-C_6 シクロアルキル基または C_3-C_6 シクロアルケニル基であり；

各場合の R^4 は独立して $-C(O)O-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)NH-$ 、 $-CH_2-O-C(O)-O-CH_2-$ 、 $-O-$ 、 $-S(O)(O)-$ または結合であり；および

R^5 はポリアルキレンオキシドを含む基である

を有する、請求項1～4のいずれかのポリマー。

【請求項6】

式：

$-(CH_2)_{p1}-[NH-(CH_2)_{p2}]_{r1}NH-(CH_2)_{p3}-NR^2_2$ 、

式中、 $p1 \sim p3$ のそれぞれは独立して1～5の整数であり；

$r1$ は0～5の整数であり；

および各場合の R^2 は独立して水素あるいは C_1-C_6 アルキル基、 C_2-C_6 アルケニル基、 C_3-C_6 シクロアルキル基または C_3-C_6 シクロアルケニル基であるか、あるいは R^2 は第2の R^2 およびそれが結合する窒素と組み合わせさせて複素環基を形成する

を有するポリアミン基を含みポリアルキレンオキシド基を含まない側鎖を含むモノマー単位を含む、請求項1～5のいずれかのポリマー。

【請求項7】

約1～約80モル%の疎水性側鎖を含むモノマー単位、約1～約50モル%のポリアミン基およびポリアルキレンオキシド基を含む側鎖を含むモノマー単位、および存在する場合、約1～約80モル%のポリアミン基を含みポリアルキレンオキシド基を含まない側鎖を含むモノマー単位を含む、請求項1～6のいずれかのポリマー。

【請求項8】

加水分解性ポリマー骨格がポリアミド、ポリ-N-アルキルアミド、ポリエステル、ポリカーボネート、ポリカルバメートまたはそれらの組み合わせを含む、請求項1～7のいずれかのポリマー。

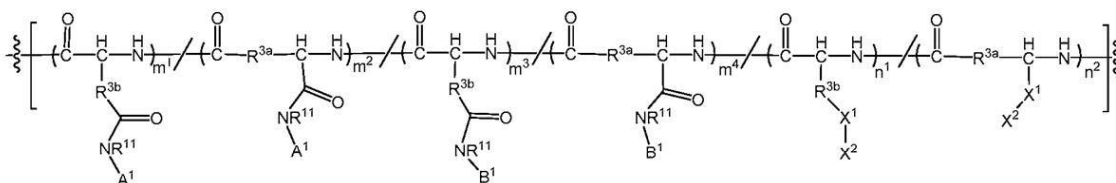
【請求項9】

加水分解性ポリマー骨格がポリアミドを含む、請求項8のポリマー。

【請求項10】

式1：

【化1】



式1

式中：

m^1 、 m^2 、 m^3 および m^4 のそれぞれは0～1000の整数であり、但し、 $m^1 + m^2 + m^3 + m^4$ の合計は2よりも大きく、および $m^3 + m^4$ の合計は少なくとも1であり；

n^1 および n^2 のそれぞれは0～1000の整数であり、但し、 $n^1 + n^2$ の合計は少なくと

も1であり、

記号「/」は、それによって分離された単位がランダムにまたは任意の順序で結合していることを示し、

各場合の R^{3a} は独立してメチレンまたはエチレン基であり、

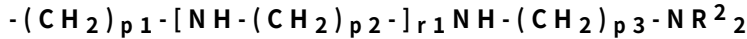
各場合の R^{3b} は独立してメチレンまたはエチレン基であり、

各場合の R^{11} は独立して水素あるいは C_1 - C_4 アルキル基または C_2 - C_4 アルケニル基であり、これらのいずれかは1個以上の置換基で置換されていてもよく、

各 X^1 は独立して $-C(O)O-$ 、 $-C(O)NR^{11}-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-S(O)(O)-$ または結合であり、

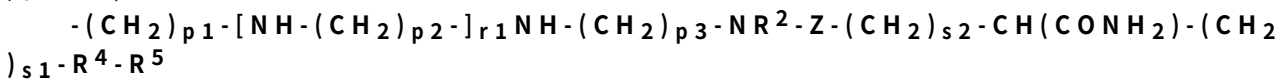
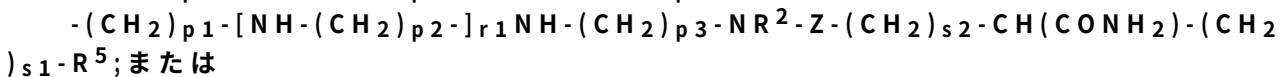
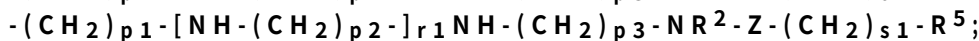
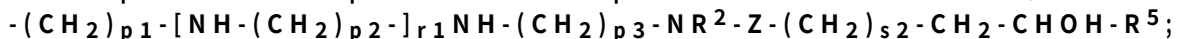
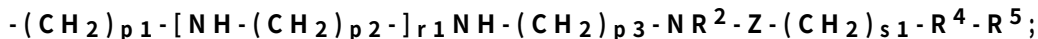
各場合の X^2 は疎水性側鎖であり、

各場合の A^1 は独立して:



であり、

各場合の B^1 は独立して:



であり、

式中、 $p1 \sim p3$ のそれぞれは独立して1~5の整数であり、

$r1$ は0~5の整数であり、

$s1$ は0~5の整数であり、

$s2$ は0~5の整数であり、

各場合の R^2 は独立して水素あるいは C_1 - C_{12} アルキル基、 C_2 - C_{12} アルケニル基、 C_3 - C_{12} シクロアルキル基または C_3 - C_{12} シクロアルケニル基であるか、あるいは R^2 は、該当する場合に、第2の R^2 およびそれらが結合する窒素と組み合わせさせて複素環基を形成し、

Z は存在していてもよく、そして存在する場合、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-S(O)(O)-$ 、 $-C(NH)NR^2-$ 、 $-C(S)O-$ 、 $-C(S)NR^2-$ 、 $-C(O)NR^2-$ または置換されていてもよいアリールまたはヘテロアリールであり、

各場合の R^4 は独立して $-C(O)O-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)NH-$ 、 $-CH_2-O-C(O)-O-CH_2-$ 、 $-O-C(O)-O-$ 、 $-O-$ 、 $-S(O)(O)-$ または結合であり;および

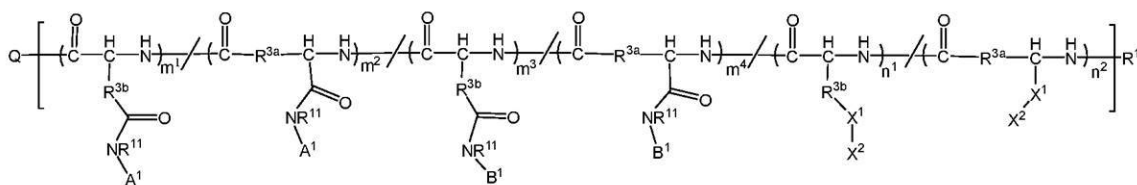
R^5 はポリアルキレンオキシドを含む基である

の構造を含む、請求項1のポリマー。

【請求項11】

式1A:

【化2】



式1A

式中:

Q は式:

10

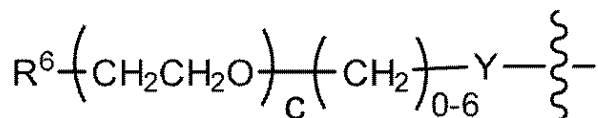
20

30

40

50

【化 3】



であり、

cは0～50の整数であり；

Yは存在していてもよく、そして開裂可能なリンカーであり；

R¹は水素、アリール基、複素環基、C₁-C₁₂アルキル基、C₂-C₁₂アルケニル基、C₃-C₁₂シクロアルキル基またはC₃-C₁₂シクロアルケニル基であり、これらのいずれかは1個以上の置換基で置換されていてもよく；および

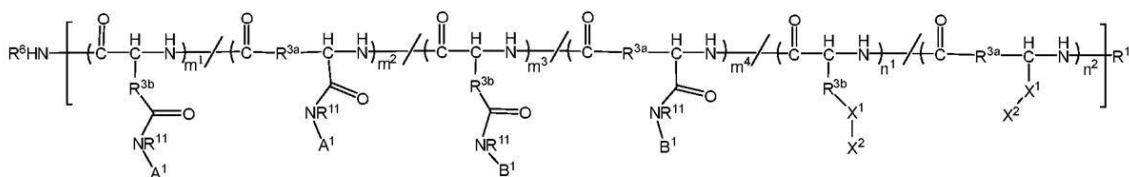
10

R⁶は水素、アミノ基、アリール基、複素環基、C₁-C₁₂アルキル基、C₁-C₁₂ヘテロアルキル基、C₂-C₁₂アルケニル基、C₃-C₁₂シクロアルキル基またはC₃-C₁₂シクロアルケニル基であり、これらのいずれかは1個以上の置換基あるいは組織特異的または細胞特異的標的化部位で置換されていてもよい

の構造を有する；

または式1B；

【化 4】



20

式1B

式中：

R¹は水素、アリール基、複素環基、C₁-C₁₂アルキル基、C₂-C₁₂アルケニル基、C₃-C₁₂シクロアルキル基またはC₃-C₁₂シクロアルケニル基であり、これらのいずれかは1個以上の置換基で置換されていてもよく；および

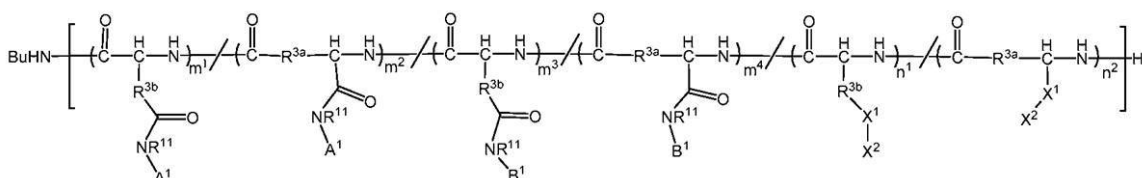
R⁶は水素、アミノ基、アリール基、複素環基、C₁-C₁₂アルキル基、C₁-C₁₂ヘテロアルキル基、C₂-C₁₂アルケニル基、C₃-C₁₂シクロアルキル基またはC₃-C₁₂シクロアルケニル基であり、これらのいずれかは1個以上の置換基あるいは組織特異的または細胞特異的標的化部位で置換されていてもよい

30

の構造を有する；

または式1C；

【化 5】



40

式1C

の構造を有する、請求項10のポリマー。

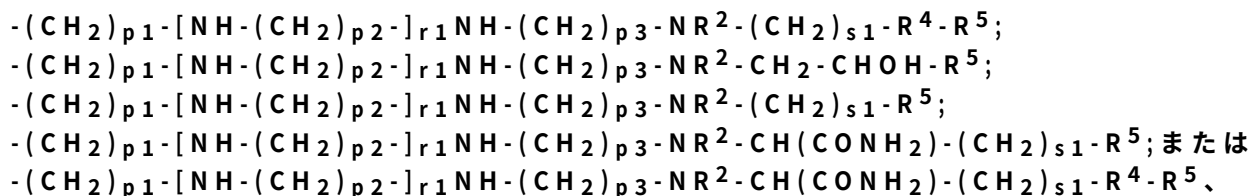
【請求項 12】

各場合のX²が独立してC₁-C₁₂アルキル基、シクロアルキル基、アルケニル基、シクロアルケニル基、アリール基、ヘテロアルキル基、複素環基、またはそれらの組み合わせであり；これらのいずれかが1個以上の置換基で置換され得る、請求項10または11のポリマー。

50

【請求項 13】

各場合の B^1 が：



式中、 $p1 \sim p3$ のそれぞれは独立して1～5の整数であり；

$r1$ は0～5の整数であり；

$s1$ は0～5の整数であり；

10

各場合の R^2 は独立して水素あるいは C_1 - C_6 アルキル基、 C_2 - C_6 アルケニル基、 C_3 - C_6 シクロアルキル基または C_3 - C_6 シクロアルケニル基であり；

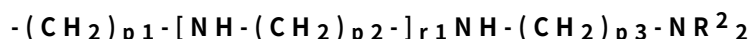
各場合の R^4 は独立して $-C(O)O-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)NH-$ 、 $-CH_2-O-C(O)-O-CH_2-$ 、 $-O-$ 、 $-S(O)(O)-$ または結合であり；および

R^5 はポリアルキレンオキシドを含む基である

である、請求項10～12のいずれかのポリマー。

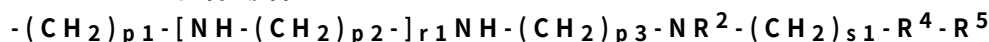
【請求項 14】

各場合の A^1 が



であり、および各場合の B^1 が：

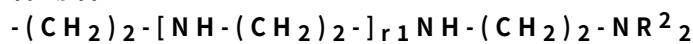
20



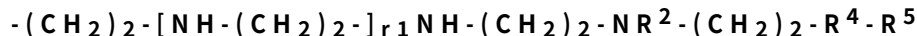
である、請求項10～12のいずれかのポリマー。

【請求項 15】

各場合の A^1 が



であり、および各場合の B^1 が：

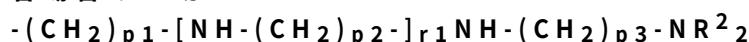


である、請求項10～12のいずれかのポリマー。

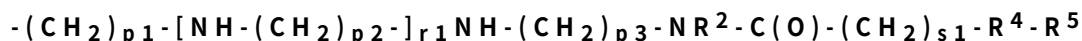
【請求項 16】

各場合の A^1 が

30



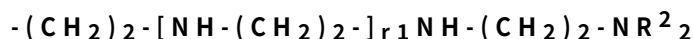
であり、および各場合の B^1 が：



である、請求項10～12のいずれかのポリマー。

【請求項 17】

各場合の A^1 が



であり、および各場合の B^1 が：



である、請求項10～12のいずれかのポリマー。

40

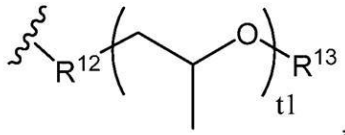
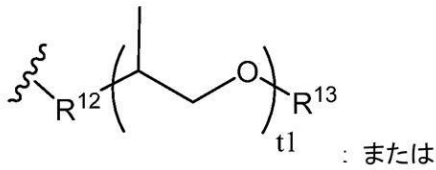
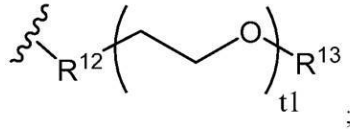
【請求項 18】

$(m^1+m^2+m^3+m^4)/(n^1+n^2)$ の比が約0.3～3である、請求項10～17のいずれかのポリマー。

【請求項 19】

各場合の R^5 が独立して式：

【化 6】



式中:

R^{12} は結合あるいはメチレン、エチレンまたはプロピレン基であり;

R^{13} は水素、アリール基、複素環基、 C_1 - C_{12} アルキル基、 C_2 - C_{12} アルケニル基、 C_3 - C_{12} シクロアルキル基または C_3 - C_{12} シクロアルケニル基であり、これらのいずれかは 1 個以上の置換基、必要に応じて水素または C_1 - C_3 アルキル基で置換されていてもよく;

および

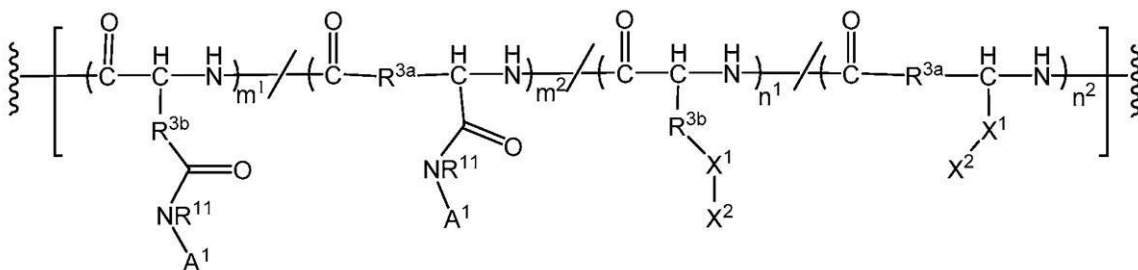
$t1$ は 2 ~ 200 の整数である

である、請求項 6 ~ 17 のいずれか 1 項のポリマー。

【請求項 20】

(a) 式 2:

【化 7】

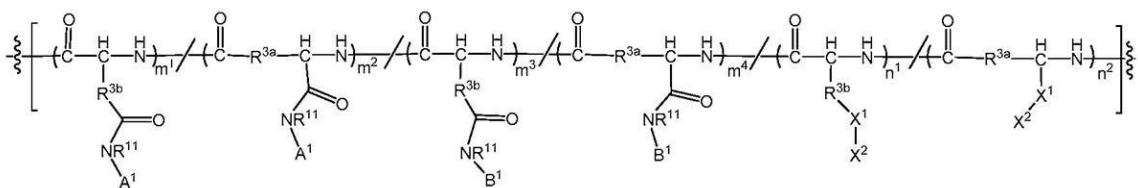


式 2

のポリマーを提供すること、および

(b) 式 2 のポリマーの基 A^1 の部分を修飾して式 1:

【化 8】



式 1

式中:

m^1 、 m^2 、 m^3 および m^4 のそれぞれは 0 ~ 1000 の整数であり、但し、 $m^1 + m^2 + m^3$

10

20

30

40

50

+ m^4 の合計は2よりも大きく、および $m^3 + m^4$ の合計は少なくとも1であり;
 n^1 および n^2 のそれぞれは0~1000の整数であり、但し、 $n^1 + n^2$ の合計は少なくとも1であり、

記号「/」は、それによって分離された単位がランダムにまたは任意の順序で結合していることを示し;

各場合の R^{3a} は独立してメチレンまたはエチレン基であり;

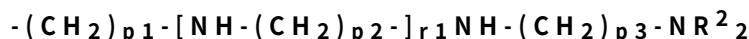
各場合の R^{3b} は独立してメチレンまたはエチレン基であり;

各場合の R^{11} は独立して水素あるいは C_1 - C_4 アルキル基またはアルケニル基であり、これらのいずれかは1個以上の置換基、必要に応じて水素または C_1 - C_3 アルキル基で置換されていてもよく;

各 X^1 は独立して $-C(O)O-$ 、 $-C(O)NR^{11}-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-S(O)(O)-$ または結合であり;

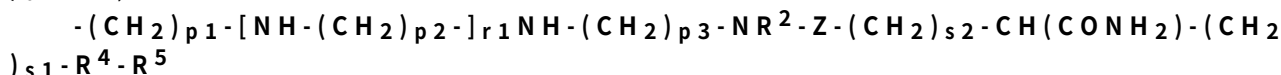
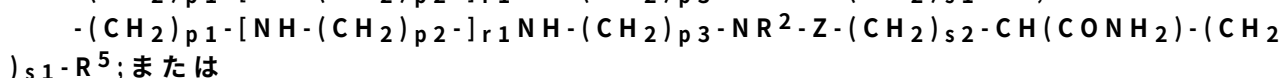
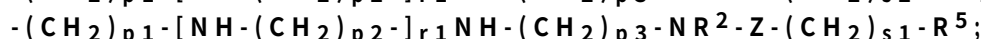
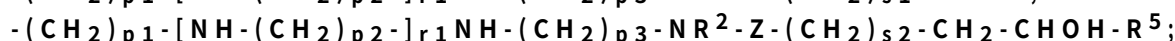
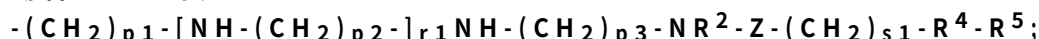
各場合の X^2 は疎水性側鎖であり;

各場合の A^1 は独立して:



であり、

各場合の B^1 は独立して:



であり、

式中、 $p1 \sim p3$ のそれぞれは独立して1~5の整数であり;

$r1$ は0~5の整数であり;

$s1$ は0~5の整数であり;

$s2$ は0~5の整数であり;

各場合の R^2 は独立して水素あるいは C_1 - C_{12} アルキル基、アルケニル基、シクロアルキル基またはシクロアルケニル基であるか、あるいは該当する場合に、 R^2 は、第2の R^2 と組み合わせさせて複素環基を形成し;

Z は存在していてもよく、そして存在する場合、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-S(O)(O)-$ 、 $-C(NH)NR^2-$ 、 $-C(S)O-$ 、 $-C(S)NR^2-$ 、 $-C(O)NR^2-$ または置換されていてもよいアリールまたはヘテロアリールであり;

各場合の R^4 は独立して $-C(O)O-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)NH-$ 、 $-CH_2-O-C(O)-O-CH_2-$ 、 $-O-C(O)-O-$ 、 $-O-$ 、 $-S(O)(O)-$ または結合であり; および

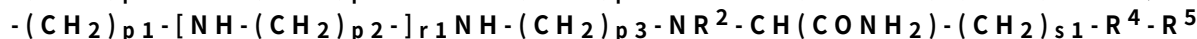
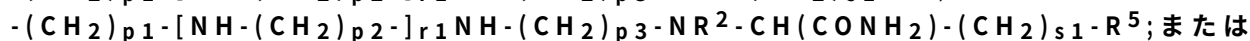
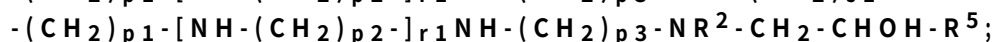
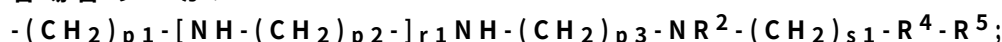
R^5 はポリアルキレンオキシドを含む基である

のポリマーを提供すること

を含む式1のポリマーの調製方法。

【請求項21】

各場合の B^1 が:



式中、 $p1 \sim p3$ のそれぞれは独立して1~5の整数であり;

$r1$ は0~5の整数であり;

$s1$ は0~5の整数であり;

各場合の R^2 は独立して水素あるいは C_1 - C_6 アルキル基、 C_2 - C_6 アルケニル基、 C_3 - C_6

シクロアルキル基または C_3 - C_6 シクロアルケニル基であり;

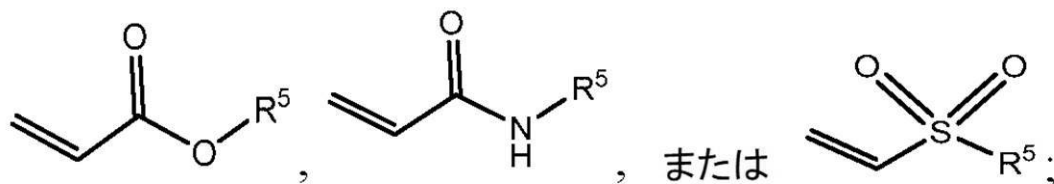
各場合の R^4 は独立して $-C(O)O-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)NH-$ 、 $-CH_2-O-C(O)-O-CH_2-$ 、 $-O-$ 、 $-S(O)(O)-$ または結合であり;および

R^5 はポリアルキレンオキシドを含む基である
である、請求項20の方法。

【請求項22】

式2のポリマーの基 A^1 の部分を修飾することが、 A^1 基の部分を構造:

【化9】



10

を有する化合物と反応させて式1のポリマーを提供すること
を含み;

ここで各場合の B^1 が:

$-(CH_2)_{p1}-[NH-(CH_2)_{p2}]_{r1}NH-(CH_2)_{p3}-NR^2-(CH_2)_{s1}-R^4-R^5$

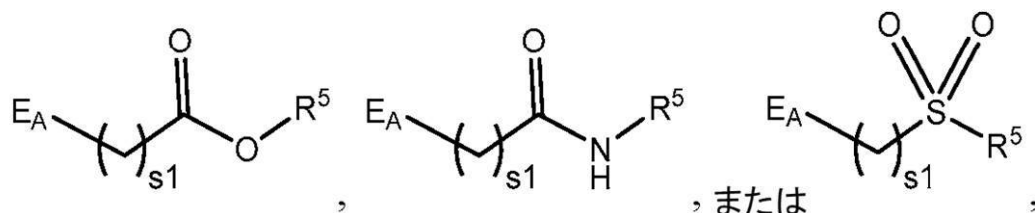
である、請求項20の方法。

20

【請求項23】

式2のポリマーの基 A^1 の部分を修飾することが、 A^1 基の部分を構造:

【化10】



30

式中、 E_A は活性化エステルである;

を有する化合物と反応させて式1のポリマーを提供すること
を含み;

ここで各場合の B^1 が:

$-(CH_2)_{p1}-[NH-(CH_2)_{p2}]_{r1}NH-(CH_2)_{p3}-NR^2-Z-(CH_2)_{s1}-R^4-R^5$

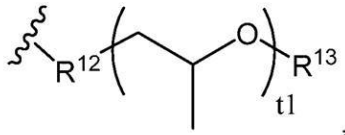
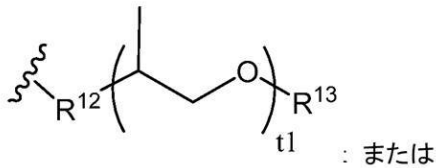
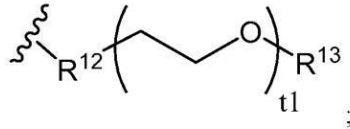
である、請求項20の方法。

【請求項24】

各場合の R^5 が独立して式:

40

【化 1 1】



10

式中:

R^{12} は結合あるいはメチレン、エチレンまたはプロピレン基であり;

R^{13} は水素、アリール基、複素環基、 C_1 - C_{12} アルキル基、アルケニル基、シクロアルキル基またはシクロアルケニル基であり、これらのいずれかは1個以上の置換基、必要に応じて水素または C_1 - C_3 アルキル基で置換されていてもよく;および

20

$t1$ は2~200の整数である

である、請求項20~23のいずれか1項のポリマー。

【請求項 2 5】

請求項1-19のいずれか1項のポリマーならびに核酸および/またはポリペプチドを含有する組成物。

【請求項 2 6】

ガイド核酸および/またはドナー核酸を含有する、請求項25の組成物。

【請求項 2 7】

エンドヌクレアーゼを含有する、請求項25または26の組成物。

30

【請求項 2 8】

RNA-誘導エンドヌクレアーゼまたはそれをコードする核酸を含有する、請求項27の組成物。

【請求項 2 9】

RNA-誘導エンドヌクレアーゼがCas9、Cpf1、またはそれらの組み合わせである、請求項28の組成物。

【請求項 3 0】

DNAリコンビナーゼを含有する、請求項25-29のいずれか1項の組成物。

【請求項 3 1】

DNAリコンビナーゼがCreリコンビナーゼである、請求項30の組成物。

40

【請求項 3 2】

ジンクフィンガーヌクレアーゼを含有する、請求項25-31のいずれか1項の組成物。

【請求項 3 3】

転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼを含有する、請求項25-32のいずれか1項の組成物。

【請求項 3 4】

請求項1-19のいずれかのポリマーならびに核酸またはポリペプチドを含有するナノ粒子を含有する、請求項25-33のいずれか1項の組成物。

【請求項 3 5】

(a)疎水性基を含む側鎖を有するモノマー単位、および(b)オリゴアミンまたはポリア

50

ミンを含む側鎖を有するモノマー単位を含む第2のポリマーを含み、ここで該ポリマーがポリアルキレンオキシド基を含まない、請求項25-34のいずれか1項の組成物。

【請求項36】

請求項25-35のいずれか1項の組成物を細胞に投与することを含む、核酸および/またはポリペプチドを細胞に送達する方法。

【請求項37】

細胞が被検体中にあり、および請求項23-32のいずれか1項の組成物が該被検体に投与される、請求項36の方法。

【請求項38】

核酸および/またはポリペプチドの肺組織、筋肉組織または中枢神経系組織への送達のためのものである、請求項36または37の方法。

10

【請求項39】

ポリマーが、腫瘍細胞に優先的に結合する標的化部位を含む、請求項35-36のいずれか1項の方法。

【請求項40】

組成物が、RNA誘導エンドヌクレアーゼまたはそれをコードする核酸、ガイド核酸、およびドナー核酸の1つ以上を含有し、および細胞中の標的遺伝子の編集を容易にする、請求項35-36のいずれかの方法。

【請求項41】

細胞が必要に応じてヒトである宿主中にあり、および組成物を該宿主に投与することによって組成物が該細胞に送達される、請求項35-36のいずれかの方法。

20

【請求項42】

核酸および/またはポリペプチドを、必要に応じて請求項35-41の方法に従って細胞に送達するための、請求項1-19のいずれかのポリマーまたは請求項25-34のいずれか1項の組成物。

【請求項43】

核酸および/またはポリペプチドを、必要に応じて請求項35-42の方法に従って細胞に送達するための医薬を調製するための、請求項1-19のいずれかのポリマーまたは請求項20-29のいずれか1項の組成物の使用。

【発明の詳細な説明】

30

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

この特許出願は、2021年6月11日に提出された米国仮特許出願第63/202,919号に対する優先権を主張し、その全体の開示は、本明細書に参考として援用される。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

ペプチド、たんぱく質、および核酸ベースの技術は、疾患を予防、治療および治療するための無数の用途を有する。しかし、大分子(例、ポリペプチドおよび核酸)のそれらの標的組織への安全かつ効率的な送達は、問題のあるままである。従って、治療分子の送達に有用な新たな組成物および方法の必要性が続いている。

40

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0003】

発明の簡単な要旨

本明細書中、加水分解性ポリマー骨格を含むポリマーであって、該ポリマー骨格が(i)疎水性側鎖を含むモノマー単位;(ii)ポリアミン基およびポリアルキレンオキシド基を含む側鎖を含むモノマー単位;および必要に応じて(iii)ポリアミン基を含みポリアルキレンオキシド基を含まない側鎖を含むモノマー単位を含む、ポリマーが提供される。また、当

50

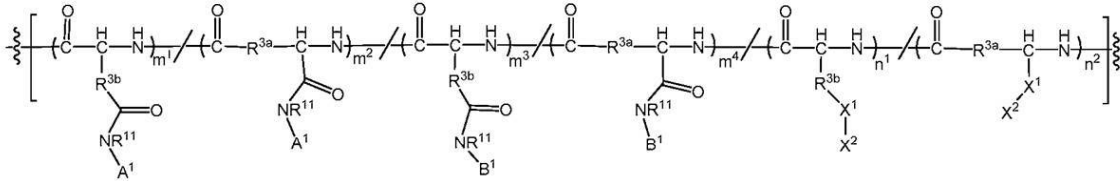
該ポリマーの調製方法、および当該ポリマーを用いて核酸および/またはポリペプチドを細胞に送達する方法が提供される。

【0004】

本明細書中、式1:

【0005】

【化1】



式1

10

【0006】

式中:

m^1 、 m^2 、 m^3 および m^4 のそれぞれは0~1000の整数であり、但し、 $m^1 + m^2 + m^3 + m^4$ の合計は2よりも大きく、および $m^3 + m^4$ の合計は少なくとも1であり;

n^1 および n^2 のそれぞれは0~1000の整数であり、但し、 $n^1 + n^2$ の合計は少なくとも1であり、

20

記号「/」は、それによって分離された単位がランダムにまたは任意の順序で結合していることを示し;

各場合の R^{3a} は独立してメチレンまたはエチレン基であり;

各場合の R^{3b} は独立してメチレンまたはエチレン基であり;

各場合の R^{11} は独立して水素あるいは C_1 - C_4 アルキル基または C_2 - C_4 アルケニル基であり、これらのいずれかは1個以上の置換基で置換されていてもよく;

各 X^1 は独立して $-C(O)O-$ 、 $-C(O)NR^{11}-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-S(O)(O)-$ または結合であり;

各場合の X^2 は疎水性側鎖であり;

各場合の A^1 は独立して:

$-(CH_2)_{p1}-[NH-(CH_2)_{p2}]_{r1}NH-(CH_2)_{p3}-NR^{22}$

30

であり、

各場合の B^1 は独立して:

$-(CH_2)_{p1}-[NH-(CH_2)_{p2}]_{r1}NH-(CH_2)_{p3}-NR^2-Z-(CH_2)_{s1}-R^4-R^5$;

$-(CH_2)_{p1}-[NH-(CH_2)_{p2}]_{r1}NH-(CH_2)_{p3}-NR^2-Z-(CH_2)_{s2}-CH_2-CHOH-R^5$;

$-(CH_2)_{p1}-[NH-(CH_2)_{p2}]_{r1}NH-(CH_2)_{p3}-NR^2-Z-(CH_2)_{s1}-R^5$;

$-(CH_2)_{p1}-[NH-(CH_2)_{p2}]_{r1}NH-(CH_2)_{p3}-NR^2-Z-(CH_2)_{s2}-CH(CONH_2)-(CH_2)_{s1}-R^5$;または

$-(CH_2)_{p1}-[NH-(CH_2)_{p2}]_{r1}NH-(CH_2)_{p3}-NR^2-Z-(CH_2)_{s2}-CH(CONH_2)-(CH_2)_{s1}-R^4-R^5$

40

であり、

式中、 $p1 \sim p3$ のそれぞれは独立して1~5の整数であり;

$r1$ は0~5の整数であり;

$s1$ は0~5の整数であり;

$s2$ は0~5の整数であり;

各場合の R^2 は独立して水素あるいは C_1 - C_{12} アルキル基、 C_2 - C_{12} アルケニル基、 C_3 - C_{12} シクロアルキル基または C_3 - C_{12} シクロアルケニル基であるか、あるいは R^2 は、該当する場合に、第2の R^2 と組み合わせさせて複素環基を形成し;

Z は存在していてもよく、そして存在する場合、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-S(O)(O)-$ 、 $-C(NH)NR^2-$ 、 $-C(S)O-$ 、 $-C(S)NR^2-$ 、 $-C(O)NR^2-$ または置換されていてもよいアリーールまたはヘテロアリーールであり;

50

各場合の R^4 は独立して $-C(O)O-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)NH-$ 、 $-CH_2-O-C(O)-O-CH_2-$ 、 $-O-C(O)-O-$ 、 $-O-$ 、 $-S(O)(O)-$ または結合であり;および

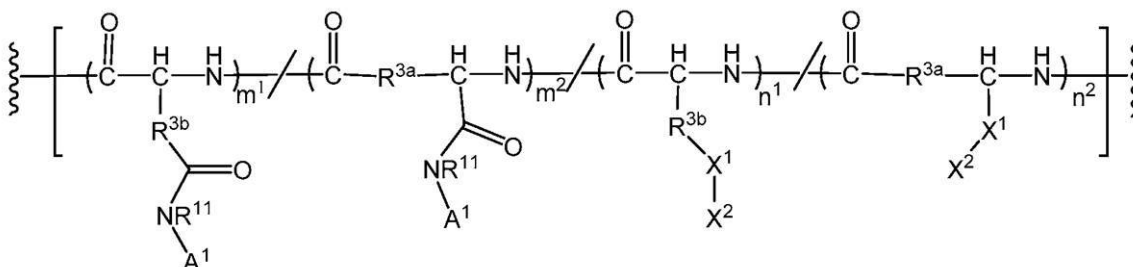
R^5 はポリアルキレンオキシドを含む基である
の構造を含むポリマーもまた提供される。

【0007】

前述の式1のポリマーは、式2:

【0008】

【化2】



10

式2

【0009】

式中、式2において、 m^1 および m^2 のそれぞれは0~1000の整数であり、但し、 $m^1 + m^2$ の合計は2よりも大きく;

20

n^1 および n^2 のそれぞれは0~1000の整数であり、但し、 $n^1 + n^2$ の合計は少なくとも1であり、

記号「/」は、それによって分離された単位がランダムにまたは任意の順序で結合していることを示し;

各場合の R^{3a} は独立してメチレンまたはエチレン基であり;

各場合の R^{3b} は独立してメチレンまたはエチレン基であり;

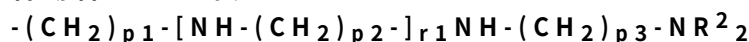
各場合の R^{11} は独立して水素あるいは C_1-C_4 アルキル基または C_2-C_4 アルケニル基であり、これらのいずれかは1個以上の置換基、必要に応じて水素または C_1-C_3 アルキル基で置換されていてもよく;

30

各 X^1 は独立して $-C(O)O-$ 、 $-C(O)NR^{11}-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-S(O)(O)-$ または結合であり;

各場合の X^2 は疎水性側鎖であり;

各場合の A^1 は独立して:



式中:

$p1 \sim p3$ のそれぞれは独立して1~5の整数であり;

$r1$ は0~5の整数であり;および

各場合の R^2 は独立して水素あるいは C_1-C_{12} アルキル基、 C_2-C_{12} アルケニル基、 C_3-C_{12} シクロアルキル基または C_3-C_{12} シクロアルケニル基であるか、あるいは該当する場合に、 R^2 は、第2の R^2 と組み合わせさせて複素環基を形成する;
のポリマーの基 A^1 の部分を修飾することによって容易に調製され得る。

40

【0010】

本開示はまた、式1の構造を含むポリマーならびに核酸および/またはポリペプチドを含有する組成物を提供する。さらなるポリマー、該ポリマーを含有する組成物、ならびに該ポリマーの調製および使用方法もまた、本明細書中で提供される。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】図1はStreptococcus pyogenes(配列番号1)からのCas9のアミノ酸配列を提供する。

【図2】図2はFrancisella tularensis subsp. Novicida U112(配列番号2)からの

50

Cpf1のアミノ酸配列を提供する。

【図3】図3はAsCpf1(配列番号19)の配列を提供する。

【図4】図4はLbCpf1(配列番号20)の配列を提供する。

【図5】図5はマウスai9レポーター構築物の模式図である。

【図6】図6はCre mRNAを含むポリマーナノ粒子で処理したルシフェラーゼ発現マウスの脳脊髄の生体外(エクスピボ)落射蛍光画像化を示す。

【図7】図7はCre mRNAを含むポリマーナノ粒子で処理したルシフェラーゼ発現マウスからの脳切片の生体外(エクスピボ)落射蛍光画像化を示す。右下画像は小脳を強調したマウス脳の矢状断面を示す。左下画像は前部(A)、後部(P)、背部(D)および腹側部(V)に関して断面の配向を示す。

【図8】図8は本明細書中で提供されるポリマーを用いた核酸カーゴの脳への送達を示す。

【図9】図9は本明細書中で提供されるポリマーを用いた核酸カーゴの脊髄への送達を示す。

【図10】図10は本明細書中で提供されるポリマーを用いた核酸カーゴの脳/脊柱への送達の比を示す。

【発明を実施するための形態】

【0012】

発明の詳細な説明

本明細書中、加水分解性ポリマー骨格を含むポリマーが提供され、該ポリマー骨格は(i)疎水性側鎖を含むモノマー単位;および(ii)ポリアミン基およびポリアルキレンオキシド基を含む側鎖を含むモノマー単位を含む。ポリマーは必要に応じて(iii)ポリアミン基を含みポリアルキレンオキシド基を含まない側鎖を含むモノマー単位をさらに含み得る。

【0013】

加水分解性ポリマー骨格は、生理学的条件(例えば、生理学的pH、生理学的温度、または血液、血清などの所定のインビボ組織中、天然に存在する因子(例えば、酵素)による)下で開裂を起こしやすい結合を有するポリマー骨格であり得る。一般に、加水分解性ポリマー骨格は、ポリアミド、ポリ-N-アルキルアミド、ポリエステル、ポリカーボネート、ポリカルバメート、またはそれらの組み合わせを含む。いくつかの実施態様において、加水分解性ポリマー骨格はポリアミドを含む。

【0014】

ポリマーは、疎水性基を含む側鎖を有するモノマー単位(例えば、疎水性側鎖)を含む。モノマーは、任意の疎水性基を含み得る。いくつかの実施態様において、疎水性基はアールまたは脂肪族基であり、環状、直鎖、または分枝脂肪族を含む。いくつかの実施態様において、疎水性基はC₁-C₁₂(例えば、C₁-C₁₀、C₁-C₈、C₁-C₆、C₁-C₃;C₂-C₁₂、C₂-C₁₀、C₂-C₈、C₂-C₆、C₃-C₁₂、C₃-C₁₀、C₃-C₈、C₃-C₆、C₄-C₁₂、C₄-C₁₀、C₄-C₈、C₄-C₆、C₆-C₁₂、C₆-C₁₀、C₆-C₈、C₈-C₁₂、またはC₈-C₁₀)アルキル基、C₂-C₁₂(例えば、C₂-C₁₀、C₂-C₈、C₂-C₆、C₃-C₁₂、C₃-C₁₀、C₃-C₈、C₃-C₆、C₄-C₁₂、C₄-C₁₀、C₄-C₈、C₄-C₆、C₆-C₁₂、C₆-C₁₀、C₆-C₈、C₈-C₁₂、C₈-C₁₀)アルケニル基、またはC₃-C₁₂(C₃-C₁₀、C₃-C₈、C₃-C₆、C₄-C₁₂、C₄-C₁₀、C₄-C₈、C₄-C₆、C₆-C₁₂、C₆-C₁₀、C₆-C₈、C₈-C₁₂、C₈-C₁₀)シクロアルキルまたはシクロアルケニル基である。いくつかの実施態様において、疎水性基はC₃-C₁₂アルキル、アルケニル、シクロアルキル、またはシクロアルケニル基を含む。いくつかの実施態様において、疎水性基は10個より少ない炭素または8個より少ない炭素を含む。例えば、疎水性基は、C₂-C₁₀、C₂-C₈、またはC₂-C₆(例えば、C₃-C₈またはC₃-C₆)アルキル基を含み得る。アルキルまたはアルケニル基は、分枝または直鎖であり得る。前述の実施態様のいずれかにおいて、疎水性基はポリマー骨格に直接、または例えば、エステル、アミド、またはエーテル基を含む結合を介して連結され得、必要に応じてアルキレンリンカー(例えば、メチレンまたはエチレンリンカー)をさらに含む。

【0015】

10

20

30

40

50

ポリマーは、ポリアミン基およびポリアルキレンオキシド基を含む側鎖を有するモノマー単位、および必要に応じてポリアミン基を含みポリアルキレンオキシド基を含まない側鎖を有するモノマー単位を含む。本明細書中で使用される用語「ポリアミン」は、2個または3個またはそれ以上のアミン基(例えば、オリゴアミン)を含む任意の化学部分あるいは4個以上(例えば、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16個、またはそれ以上)のアミン基を含むより大きなポリアミンを包含する。ポリアミンの例は、例えば、ポリアルキルアミンを含む。アミン基は、1級アミン基、2級アミン基、3級アミン基、またはそれらの任意の組み合わせであり得る。ポリアミンは、直鎖または分岐であり得る。いくつかの実施態様において、ポリアミンは直線状である。

【0016】

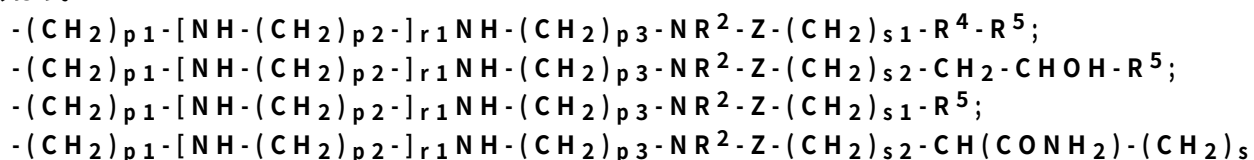
本明細書中で使用される用語「ポリアルキレンオキシド」は、2個または3個またはそれ以上のアルキレンオキシド基(例えば、オリゴアルキレンオキシド)を含む任意の化学部分あるいは4個以上(例えば、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、20、25、50、75、100個またはそれ以上)のアルキレンオキシド基を含むポリアルキレンオキシドを包含する。ポリアルキレンオキシド基の例は、ポリエチレンオキシド(PEG)、ポリプロピレンオキシド(PPG)、またはそれらの混合物(EO/PO)を含む。アルキレンオキシド基の数は異なる量のアルキレンオキシド基を有する種の範囲として存在し得、その結果アルキレンオキシド基の報告される数はこのような基の平均数であることが当業者に理解されるであろう。

【0017】

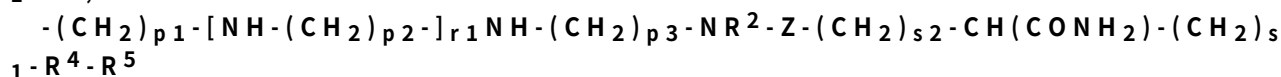
ポリアミンおよびポリアルキレンオキシドを含む側鎖において、ポリアルキレンオキシド基は、ポリアミンおよび/またはポリマー骨格に、任意の適切な方法、例えば直接または例えば、エステル、アミド、またはエーテル基を含む結合を介して連結され得、必要に応じてアルキレンリンカー(例えば、C₁-C₆またはC₂-C₄アルキレン基、例えばメチレンまたはエチレンリンカー)をさらに含む。いくつかの実施態様において、ポリアミン基およびポリアルキレンオキシド基を含む側鎖は、合計2~200個のエチレンオキシド単位(例えば、2~150単位、2~100単位、2~50単位、10~200単位、10~150単位、10~100単位、10~50単位、25~200単位、25~150単位、25~100単位、25~50単位、50~200単位、50~150単位、または50~100単位)を有する少なくとも1個のポリエチレングリコール基(別名ポリエチレンオキシド基)を含む。いくつかの実施態様において、ポリアミン基およびポリアルキレンオキシド基を含む側鎖は、合計2~200個のプロピレンオキシド単位(例えば、2~150単位、2~100単位、2~50単位、10~200単位、10~150単位、10~100単位、10~50単位、25~200単位、25~150単位、25~100単位、25~50単位、50~200単位、50~150単位、または50~100単位)を有する少なくとも1個のポリプロピレンオキシド基を含む。いくつかの実施態様において、ポリアミン基およびポリアルキレンオキシド基を含む側鎖は、合計2~200個のエチレングリコールおよび/またはプロピレンオキシド単位を有する少なくとも1個のポリエチレングリコール/ポリプロピレンオキシド基を含む。ポリアミン基およびポリアルキレンオキシド基を含む側鎖は、エチレングリコールおよびプロピレンオキシド単位を任意の適切な構造、例えば交互ポリマー、ランダムポリマー、ブロックポリマー、グラフトポリマー、線状ポリマー、分枝ポリマー、環状ポリマー、またはそれらの組み合わせを含み得る。例えば、モノマーの少なくともいくつかの側鎖は、Pluronic(登録商標)F65またはPluronic(登録商標)F127由来であり得る。

【0018】

いくつかの実施態様において、ポリアミン基およびポリアルキレンオキシド基を含む側鎖は式:



$1-R^5$; または



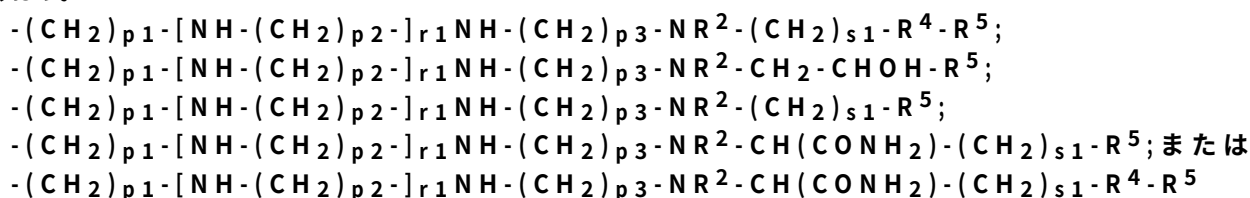
を有し、式中、 $p1 \sim p3$ のそれぞれは独立して1～5の整数(例えば、1、2、3、4、または5)であり; $r1$ は0～5の整数(例えば、0、1、2、3、4、または5)であり; $s1$ は0～5の整数(例えば、0、1、2、3、4、または5)であり; $s2$ は0～5の整数(例えば、0、1、2、3、4、または5)であり;各場合の R^2 は独立して C_1-C_{12} (例えば、 C_1-C_6 、 C_1-C_3 、 C_2 、または C_1)アルキル基、 C_2-C_{12} (例えば、 C_2-C_6 、または C_2-C_3)アルケニル基、 C_3-C_{12} (例えば、 C_3-C_8 または C_3-C_6)シクロアルキル基、または C_3-C_{12} (例えば、 C_3-C_8 または C_3-C_6)シクロアルケニル基であり; Z は存在していてもよく、存在する場合、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-S(O)(O)-$ 、 $-C(NH)NR^2-$ 、 $-C(S)O-$ 、 $-C(S)NR^2-$ 、 $-C(O)NR^2-$ 、または置換されていてもよいアリールまたはヘテロアリールであり;各場合の R^4 は独立して $-C(O)O-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)NH-$ 、 $-CH_2-O-C(O)-O-CH_2-$ 、 $-O-C(O)-O-$ 、 $-O-$ 、 $-S(O)(O)-$ 、または結合であり;および R^5 はポリアルキレンオキシドを含む基(例えば、ポリエチレンオキシド、ポリプロピレンオキシド、またはそれらの組み合わせ)である。いくつかの実施態様において、 $p1$ 、 $p3$ 、または両方は、 $p2$ よりも大きく;および/または $p1$ 、 $p3$ 、または両方は、3～5の整数(例えば、3、4、または5)であり、そして必要に応じて、 $p2$ は1または2の整数である。いくつかの実施態様において、 $p1$ 、 $p2$ 、および $p3$ は同一である。いくつかの実施態様において、 Z は存在し、そして $-C(O)-$ である。他の実施態様において、 Z は存在しない。

10

20

【0019】

いくつかの実施態様において、ポリアミン基およびポリアルキレンオキシド基を含む側鎖は式:



を有し、式中、 $p1 \sim p3$ のそれぞれは独立して1～5の整数であり;

$r1$ は0～5の整数であり;

$s1$ は1～5の整数であり;

各場合の R^2 は独立して水素あるいは C_1-C_6 アルキル基、 C_2-C_6 アルケニル基、 C_3-C_6 シクロアルキル基、または C_3-C_6 シクロアルケニル基であり;

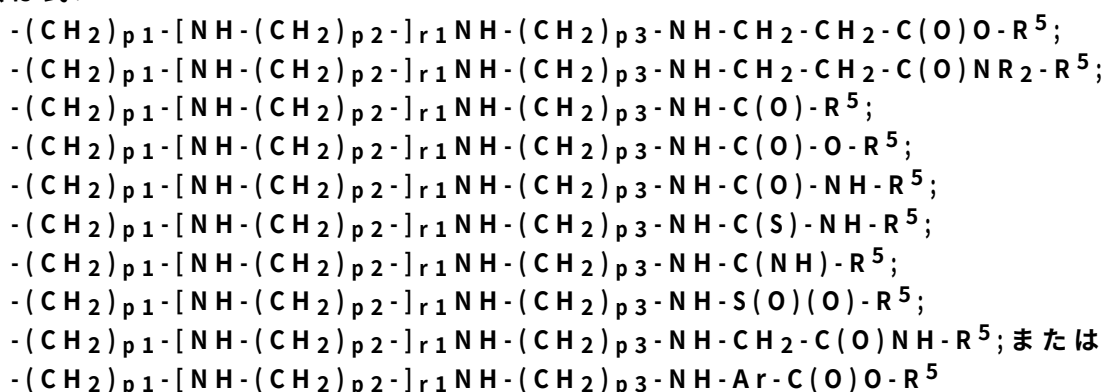
各場合の R^4 は独立して $-C(O)O-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)NH-$ 、 $-CH_2-O-C(O)-O-CH_2-$ 、 $-O-$ 、または $-S(O)(O)-$ であり;および

R^5 はポリアルキレンオキシドを含む基である。

30

【0020】

いくつかの実施態様において、ポリアミン基およびポリアルキレンオキシド基を含む側鎖は式:



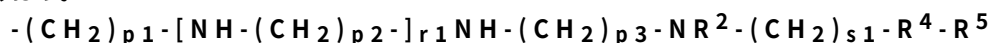
を有する。

40

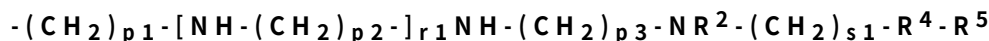
50

【0021】

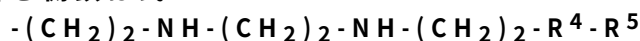
いくつかの実施態様において、ポリアミン基およびポリアルキレンオキシド基を含む側鎖は式：



を有し、必要に応じて、式中、 R^2 は水素である。いくつかの実施態様において、ポリアミン基およびポリアルキレンオキシド基を含む側鎖は式：



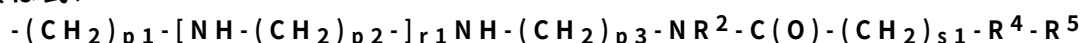
を有し、必要に応じて、式中、 R^2 は C_1 - C_6 アルキル基(例えば、メチルまたはエチル)基である。いくつかの実施態様において、ポリアミン基およびポリアルキレンオキシド基を含む側鎖は式：



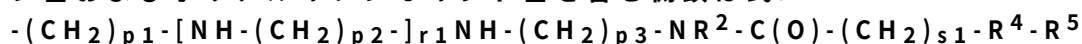
を有し、式中、 R^4 は $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$ 、 $-\text{C}(\text{O})-$ 、または $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-$ であり、および R^5 はポリアルキレンオキシドを含む基(例えば、ポリエチレンオキシド、ポリプロピレンオキシド、またはそれらの組み合わせ)である。

【0022】

いくつかの実施態様において、ポリアミン基およびポリアルキレンオキシド基を含む側鎖は式：



を有し、必要に応じて、式中、 R^2 は水素である。いくつかの実施態様において、ポリアミン基およびポリアルキレンオキシド基を含む側鎖は式：



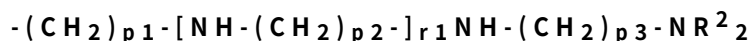
を有し、必要に応じて、式中、 R^2 は C_1 - C_6 アルキル基(例えば、メチルまたはエチル)基である。いくつかの実施態様において、ポリアミン基およびポリアルキレンオキシド基を含む側鎖は式：



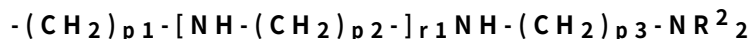
を有し、式中、 R^4 は $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$ 、 $-\text{C}(\text{O})-$ 、または $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-$ であり、および R^5 はポリアルキレンオキシドを含む基(例えば、ポリエチレンオキシド、ポリプロピレンオキシド、またはそれらの組み合わせ)である。

【0023】

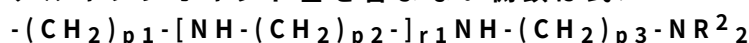
いくつかの実施態様において、ポリマーは、ポリアミン基を含みポリアルキレンオキシド基を含まない側鎖を含むモノマー単位をさらに含み。この基は式：



を有し、式中、 $p1 \sim p3$ のそれぞれは独立して1~5の整数(例えば、1、2、3、4、または5)であり； $r1$ は0~5の整数(例えば、0、1、2、3、4、または5)であり；および各場合の R^2 は独立して C_1 - C_{12} (例えば、 C_1 - C_6 、 C_1 - C_3 、 C_2 、または C_1)アルキル基、 C_2 - C_{12} (例えば、 C_2 - C_6 、または C_2 - C_3)アルケニル基、 C_3 - C_{12} (例えば、 C_3 - C_8 または C_3 - C_6)シクロアルキル基、または C_3 - C_{12} (例えば、 C_3 - C_8 または C_3 - C_6)シクロアルケニル基であり、あるいは R^2 は第2の R^2 と組み合わせさせて複素環基を形成する。いくつかの実施態様において、 $p1$ 、 $p3$ 、または両方は $p2$ よりも大きく；および/または $p1$ 、 $p3$ 、または両方は3~5の整数(例えば、3、4、または5)であり、そして必要に応じて、 $p2$ は1または2の整数である。いくつかの実施態様において、 $p1$ 、 $p2$ 、および $p3$ は同一である。いくつかの実施態様において、ポリアミン基を含みポリアルキレンオキシド基を含まない側鎖は式：



を有し、式中、 R^2 は水素である。いくつかの実施態様において、ポリアミン基を含みポリアルキレンオキシド基を含まない側鎖は式：



を有し、式中、一方または両方の場合の R^2 は C_1 - C_6 アルキル基(例えば、メチルまたはエチル)である。いくつかの実施態様において、ポリアミン基を含みポリアルキレンオキシド基を含まない側鎖は式：

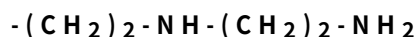
10

20

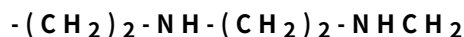
30

40

50



または



を有する。

【0024】

ポリマーは、任意の適切な数または量(例えば、重量または数パーセント組成)の疎水性側鎖を含むモノマー単位、ポリアミン基およびポリアルキレンオキシド基を含む側鎖を含むモノマー単位、および存在する場合、ポリアミン基を含みポリアルキレンオキシド基を含まない側鎖を含むモノマー単位を含み得る。いくつかの実施態様において、ポリマーは、約1～約80モル%(例えば、約5～約80モル%、約10～約80モル%、約20～約80モル%、約40～約80モル%、約1～約60モル%、約1～約40モル%、約1～約20モル%、または約1～約10モル%)の疎水性基を有するモノマー単位、約1～約50モル%(例えば、約5～約50モル%、約10～約50モル%、約20～約50モル%、約40～約50モル%、約1～約40モル%、約1～約20モル%、約1～約10モル%、または約1～約5モル%)のポリアミン基およびポリアルキレンオキシド基を含む側鎖を含むモノマー単位;および0～約80モル%(例えば、約5～約80モル%、約10～約80モル%、約20～約80モル%、約40～約80モル%、約1～約60モル%、約1～約40モル%、約1～約20モル%、または約1～約10モル%)のポリアミン基を含みポリアルキレンオキシド基を含まない側鎖を含むモノマー単位を含む。

10

【0025】

個々のポリマー側鎖は、任意の適切なpKaプロファイルを有し得る。例えば、ポリマー側鎖は、-2よりも大きく14よりも小さいpKa(水中25℃で)を有する1個以上のプロトン性水素を有し得る。例えば、本明細書中に記載の個々のポリマー側鎖は、12未満のpKa、10未満のpKa、7未満のpKa、5未満のpKa、3未満のpKa、または1未満のpKaを有する1個以上のプロトン性水素を有し得る。あるいは、またはさらに、本明細書中に記載の個々のポリマー側鎖は、-2よりも大きいpKa、-1よりも大きいpKa、0よりも大きいpKa、1よりも大きいpKa、2よりも大きいpKa、3よりも大きいpKa、4よりも大きいpKa、5よりも大きいpKa、または6よりも大きいpKaを有する1個以上のプロトン性水素を有し得る。従って、本明細書中に記載の個々のポリマー側鎖は、-2～14のpKa、例えば、-1～12のpKa、0～12のpKa、1～12のpKa、2～12のpKa、3～12のpKa、4～12のpKa、5～12のpKa、6～12のpKa、-1～10のpKa、0～10のpKa、1～10のpKa、2～10のpKa、3～10のpKa、4～10のpKa、5～10のpKa、6～10のpKa、-1～7のpKa、0～7のpKa、1～7のpKa、2～7のpKa、3～7のpKa、4～7のpKa、5～7のpKa、または6～7のpKaを有する1個以上のプロトン性水素を有し得る。

20

30

【0026】

いくつかの実施態様において、ポリマーは約10未満または約7未満の全体pKa(水中25℃で)を有する。例えば、本明細書中に記載のポリマーは、6未満のpKa、5未満のpKa、4未満のpKa、3未満のpKa、2未満のpKa、または1未満のpKaを有し得る。あるいは、またはさらに、本明細書中に記載のポリマーは、-2よりも大きいpKa、-1よりも大きいpKa、0よりも大きいpKa、1よりも大きいpKa、2よりも大きいpKa、3よりも大きいpKa、4よりも大きいpKa、5よりも大きいpKa、または6よりも大きいpKaを有し得る。あるいは、本明細書中に記載のポリマーは、-2～7のpKa、例えば、-1～7のpKa、0～7のpKa、1～7のpKa、2～7のpKa、3～7のpKa、4～7のpKa、5～7のpKa、6～7のpKa、0～6のpKa、2～6のpKa、4～6のpKa、0～5のpKa、2～5のpKa、または4～5のpKaを有し得る。

40

【0027】

本明細書中で使用される「アルキル」または「アルキレン」は、置換または無置換炭化水素鎖をいう。アルキル基は任意の数の炭素原子を有し得る(例えば、C₁-C₁₀₀アルキル、C₁-C₅₀アルキル、C₁-C₁₂アルキル、C₁-C₈アルキル、C₁-C₆アルキル、C₁-C₄アルキル、C₁-C₂アルキルなど)。アルキルまたはアルキレンは、飽和であり得、または不飽

50

和であり得(例えば、アルケニルまたはアルキニルを提供するため)、そして線状、分枝、直鎖、環状(例えば、シクロアルキルまたはシクロアルケニル)、またはそれらの組み合わせであり得る。環状基は、単環式であり得、縮合して二環式または三環式基を形成し得、結合によって連結され得、またはスピロ環式であり得る。いくつかの実施態様において、アルキル置換基は、1個以上のヘテロ原子(例えば、酸素、窒素、および硫黄)によって中断され得、それによってヘテロアルキル、ヘテロアルキレン、またはヘテロシクリル(すなわち、複素環基)を提供する。いくつかの実施態様において、アルキルは1個以上の置換基で置換される。

【0028】

用語「アリール」は、任意の適切な数の環原子および任意の適切な数の環を有する芳香族環系をいう。アリール基は、例えば6、7、8、9、10、11、12、13、14、15または16個の環原子、ならびに6~10、6~12、または6~14環員を含み得る。アリール基は、単環式であり得、縮合して二環式または三環式基を形成し得、または結合によって連結してビアリール基を形成し得る。代表的なアリール基は、フェニル、ナフチルおよびビフェニルを含む。いくつかの実施態様において、アリール基は、アルキレン連結基を含み、その結果アリールアルキル基(例、ベンジル基)を形成する。いくつかのアリール基は、6~12環員を有し、例えば、フェニル、ナフチルまたはビフェニルである。他のアリール基は、6~10環員を有し、例えば、フェニルまたはナフチルである。いくつかの実施態様において、アリール置換基は、1個以上のヘテロ原子(例えば、酸素、窒素、および硫黄)によって中断され得、それによってヘテロシクリル(すなわち、複素環式基またはヘテロアリール基)を提供する。いくつかの実施態様において、アリールは1個以上の置換基で置換される。

【0029】

用語「ヘテロシクリル」または「複素環基」は、環状基、例えば、芳香族(例えば、ヘテロアリール)または非芳香族をいい、ここで環状基は1個以上のヘテロ原子(例えば、酸素、窒素、および硫黄)を有する。いくつかの実施態様において、ヘテロシクリルまたは複素環基(すなわち、環状基、例えば、芳香族(例えば、ヘテロアリール)または非芳香族、ここで環状基は1個以上のヘテロ原子を有する)は、1個以上の置換基で置換される。

【0030】

本明細書中で使用される用語「置換された」は、指定された原子又は基上の1個以上の水素(例、置換されたアルキル基)が、指定された原子の通常の原子価を超えないという条件で別の基で置き換えられることを意味し得る。例えば、置換基がオキソ(すなわち、=O)である場合、原子上の2個の水素が置き換えられる。置換基は、1個以上のヒドロキシル、アミノ(例えば、1級、2級、または3級)、アルデヒド、カルボン酸、エステル、アミド、ケトン、ニトロ、尿素、グアニジン、シアノ、フルオロアルキル(例、トリフルオロメタン)、ハロ(例、フルオロ)、アリール(例、フェニル)、ヘテロシクリルまたは複素環基(すなわち、環状基、例えば、芳香族(例えば、ヘテロアリール)または非芳香族、ここで環状基は1個以上のヘテロ原子を有する)、オキソ、またはそれらの組み合わせを含み得る。置換基および/または変数の組み合わせは、置換基が化合物の合成または使用に対して著しく悪影響を与えないという条件で許容される。

【0031】

いくつかの実施態様において、本明細書中で提供されるポリマーは、式1:

【0032】

10

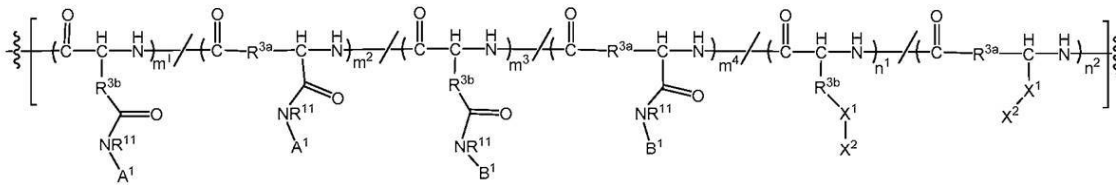
20

30

40

50

【化 3】



式1

【0033】

10

式中：

m^1 、 m^2 、 m^3 および m^4 のそれぞれは0～1000の整数であり、但し、 $m^1 + m^2 + m^3 + m^4$ の合計は2よりも大きく、および $m^3 + m^4$ の合計は少なくとも1であり；

n^1 および n^2 のそれぞれは0～1000の整数であり、但し、 $n^1 + n^2$ の合計は少なくとも1であり、

記号「/」は、それによって分離された単位がランダムにまたは任意の順序で結合していることを示し；

各場合の R^{3a} は独立してメチレンまたはエチレン基であり；

各場合の R^{3b} は独立してメチレンまたはエチレン基であり；

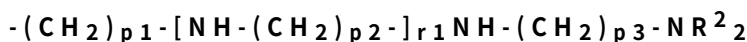
各場合の R^{11} は独立して水素あるいは C_1 - C_4 アルキル基または C_2 - C_4 アルケニル基であり、これらのいずれかは1個以上の置換基で置換されていてもよく；

20

各 X^1 は独立して $-C(O)O-$ 、 $-C(O)NR^{11}-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-S(O)(O)-$ または結合であり；

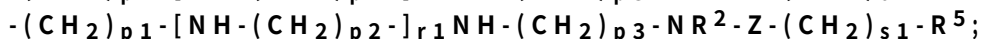
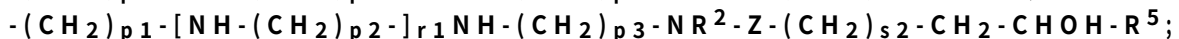
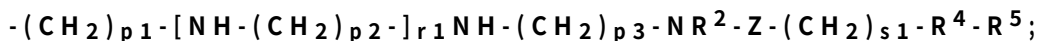
各場合の X^2 は疎水性側鎖であり；

各場合の A^1 は独立して：

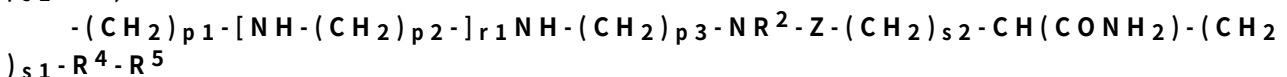
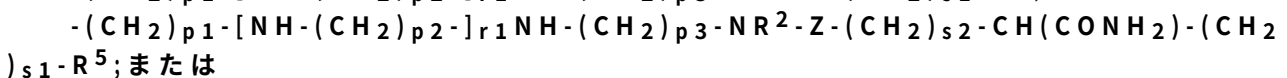


であり、

各場合の B^1 は独立して：



30



であり、

式中、

$p1 \sim p3$ のそれぞれは独立して1～5の整数であり；

$r1$ は0～5の整数であり；

$s1$ は0～5の整数であり；

$s2$ は0～5の整数であり；

40

各場合の R^2 は独立して水素あるいは C_1 - C_{12} アルキル基、 C_2 - C_{12} アルケニル基、 C_3 - C_{12} シクロアルキル基または C_3 - C_{12} シクロアルケニル基であるか、あるいは R^2 は、該当する場合に、第2の R^2 と組み合わせさせて複素環基を形成し；

Z は存在していてもよく、そして存在する場合、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-S(O)(O)-$ 、 $-C(NH)NR^2-$ 、 $-C(S)O-$ 、 $-C(S)NR^2-$ 、 $-C(O)NR^2-$ または置換されていてもよいアリールまたはヘテロアリールであり；

各場合の R^4 は独立して $-C(O)O-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)NH-$ 、 $-CH_2-O-C(O)-O-CH_2-$ 、 $-O-C(O)-O-$ 、 $-O-$ 、 $-S(O)(O)-$ または結合であり；および

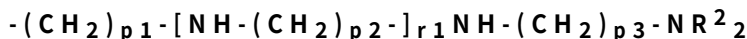
R^5 はポリアルキレンオキシドを含む基である

の構造を含むポリマーである。

50

【0034】

いくつかの実施態様において、各場合の A^1 は独立して式：



の基であり、式中、

$p1 \sim p3$ のそれぞれは独立して1～5の整数(例えば、1、2、3、4、または5)であり；

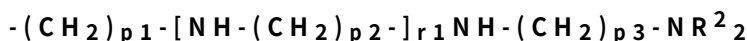
$r1$ は0～5の整数(例えば、0、1、2、3、4、または5)であり；および

各場合の R^2 は独立して水素、 C_1-C_{12} (例えば、 C_1-C_8 、 C_1-C_6 、または C_1-C_3)アルキル基、 C_2-C_{12} (例えば、 C_2-C_8 、 C_2-C_6 、または C_2-C_3)アルケニル基、 C_3-C_{12} (例えば、 C_3-C_8 、 C_3-C_6 、または C_3-C_5)シクロアルキル基、 C_3-C_{12} (例えば、 C_3-C_8 、 C_3-C_6 、または C_3-C_5)シクロアルケニル基である。いくつかの実施態様において、 $p1$ 、 $p3$ 、または両方は $p2$ よりも大きく；および/または $p1$ 、 $p3$ 、または両方は3～5の整数(例えば、3、4、または5)であり、そして必要に応じて、 $p2$ は1または2の整数である。いくつかの実施態様において、 $p1$ 、 $p2$ 、および $p3$ は同一である。

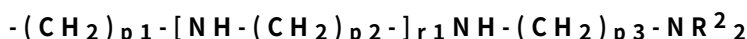
10

【0035】

いくつかの実施態様において、各場合の A^1 は独立して式：



式中、 R^2 は水素である、の基である。いくつかの実施態様において、各場合の A^1 は独立して式：

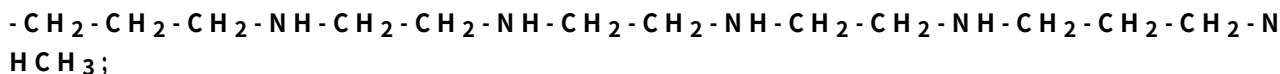
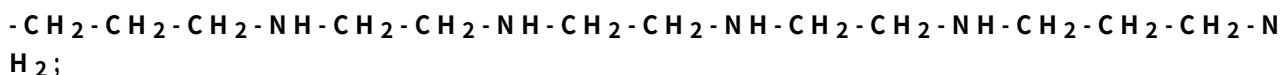


式中、一方または両方の場合の R^2 は C_1-C_6 アルキル基(例えば、メチルまたはエチル)である、の基である。

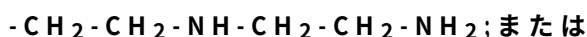
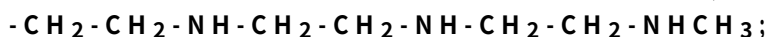
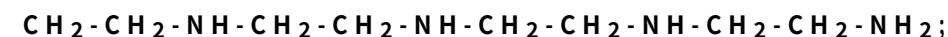
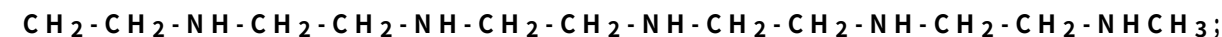
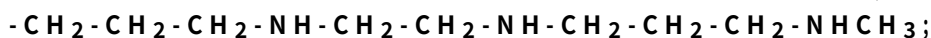
20

【0036】

A^1 基の具体的な非限定例は、例えば：



30



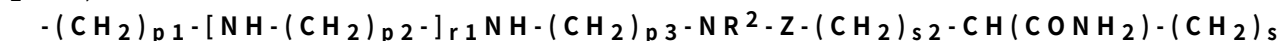
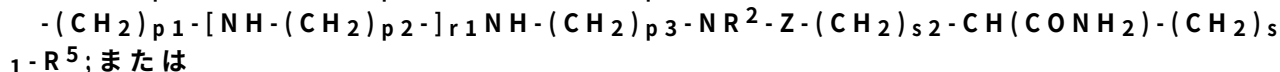
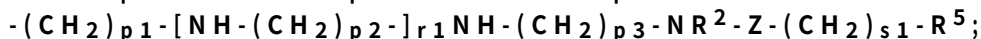
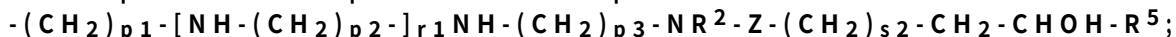
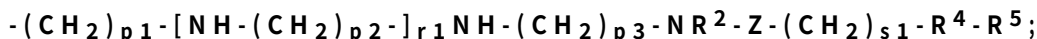
40



を含む。

【0037】

各場合の B^1 は独立して式：



50

$1-R^4-R^5$

の基であり、式中：

$p1 \sim p3$ のそれぞれは独立して1～5の整数(例えば、1、2、3、4、または5)であり；

$r1$ は0～5の整数(例えば、0、1、2、3、4、または5)であり；

$s1$ は0～5の整数(例えば、0、1、2、3、4、または5)であり；

$s2$ は0～5の整数(例えば、0、1、2、3、4、または5)であり；

各場合の R^2 は独立して C_1-C_{12} (例えば、 C_1-C_6 、 C_1-C_3 、 C_2 、または C_1)アルキル基、 C_2-C_{12} (例えば、 C_2-C_6 、または C_2-C_3)アルケニル基、 C_3-C_{12} (例えば、 C_3-C_8 または C_3-C_6)シクロアルキル基、または C_3-C_{12} (例えば、 C_3-C_8 または C_3-C_6)シクロアルケニル基であり；

Z は存在していてもよく、そして存在する場合、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-S(O)(O)-$ 、 $-C(NH)NR^2-$ 、 $-C(S)O-$ 、 $-C(S)NR^2-$ 、 $-C(O)NR^2-$ 、または置換されていてもよいアリールまたはヘテロアリールであり；

各場合の R^4 は独立して $-C(O)O-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)NH-$ 、 $-CH_2-O-C(O)-O-CH_2-$ 、 $-O-C(O)-O-$ 、 $-O-$ 、 $-S(O)(O)-$ 、または結合であり；および

R^5 はポリアルキレンオキシドを含む基(例えば、ポリエチレンオキシド、ポリプロピレンオキシド、またはそれらの組み合わせ)である。いくつかの実施態様において、 $p1$ 、 $p3$ 、または両方は $p2$ よりも大きく；および/または $p1$ 、 $p3$ 、または両方は3～5の整数(例えば、3、4、または5)であり、そして必要に応じて、 $p2$ は1または2の整数である。いくつかの実施態様において、 $p1$ 、 $p2$ 、および $p3$ は同一である。いくつかの実施態様において、 Z は存在し、そして $-C(O)-$ である。他の実施態様において、 Z は存在しない。

【0038】

いくつかの実施態様において、各 B^1 は：

$-(CH_2)_{p1}-[NH-(CH_2)_{p2}]_{r1}NH-(CH_2)_{p3}-NR^2-(CH_2)_{s1}-R^4-R^5$ ；

$-(CH_2)_{p1}-[NH-(CH_2)_{p2}]_{r1}NH-(CH_2)_{p3}-NR^2-CH_2-CHOH-R^5$ ；

$-(CH_2)_{p1}-[NH-(CH_2)_{p2}]_{r1}NH-(CH_2)_{p3}-NR^2-(CH_2)_{s1}-R^5$ ；

$-(CH_2)_{p1}-[NH-(CH_2)_{p2}]_{r1}NH-(CH_2)_{p3}-NR^2-CH(CONH_2)-(CH_2)_{s1}-R^5$ ；または

$-(CH_2)_{p1}-[NH-(CH_2)_{p2}]_{r1}NH-(CH_2)_{p3}-NR^2-CH(CONH_2)-(CH_2)_{s1}-R^4-R^5$

であり、式中、 $p1 \sim p3$ のそれぞれは独立して1～5の整数であり；

$r1$ は0～5の整数であり；

$s1$ は0～5の整数であり；

各場合の R^2 は独立して水素あるいは C_1-C_6 アルキル基、 C_2-C_6 アルケニル基、 C_3-C_6 シクロアルキル基、または C_3-C_6 シクロアルケニル基であり；

各場合の R^4 は独立して $-C(O)O-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)NH-$ 、 $-CH_2-O-C(O)-O-CH_2-$ 、 $-O-C(O)-O-$ 、 $-O-$ 、 $-S(O)(O)-$ 、または結合であり；および

R^5 はポリアルキレンオキシドを含む基である。

【0039】

いくつかの実施態様において、各場合の B^1 は独立して式；

$-(CH_2)_{p1}-[NH-(CH_2)_{p2}]_{r1}NH-(CH_2)_{p3}-NH-CH_2-CH_2-C(O)O-R^5$ ；

$-(CH_2)_{p1}-[NH-(CH_2)_{p2}]_{r1}NH-(CH_2)_{p3}-NH-CH_2-CH_2-C(O)NR^2-R^5$ ；

$-(CH_2)_{p1}-[NH-(CH_2)_{p2}]_{r1}NH-(CH_2)_{p3}-NH-C(O)-R^5$ ；

$-(CH_2)_{p1}-[NH-(CH_2)_{p2}]_{r1}NH-(CH_2)_{p3}-NH-C(O)-O-R^5$ ；

$-(CH_2)_{p1}-[NH-(CH_2)_{p2}]_{r1}NH-(CH_2)_{p3}-NH-C(O)-NH-R^5$ ；

$-(CH_2)_{p1}-[NH-(CH_2)_{p2}]_{r1}NH-(CH_2)_{p3}-NH-C(S)-NH-R^5$ ；

$-(CH_2)_{p1}-[NH-(CH_2)_{p2}]_{r1}NH-(CH_2)_{p3}-NH-C(NH)-R^5$ ；

$-(CH_2)_{p1}-[NH-(CH_2)_{p2}]_{r1}NH-(CH_2)_{p3}-NH-S(O)(O)-R^5$ ；

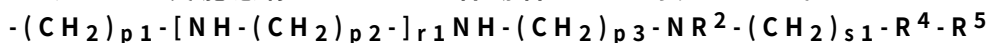
$-(CH_2)_{p1}-[NH-(CH_2)_{p2}]_{r1}NH-(CH_2)_{p3}-NH-CH_2-C(O)NH-R^5$ ；または

$-(CH_2)_{p1}-[NH-(CH_2)_{p2}]_{r1}NH-(CH_2)_{p3}-NH-Ar-C(O)O-R^5$

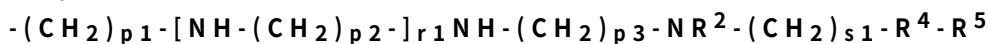
の基である。

【0040】

いくつかの実施態様において、各場合の B^1 は独立して式：



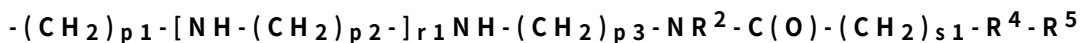
式中、 R^2 は水素である、の基である。いくつかの実施態様において、各場合の B^1 は独立して式：



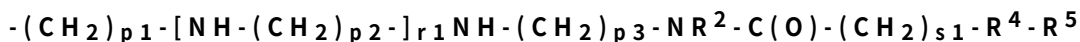
式中、 R^2 は C_1 - C_6 アルキル基(例えば、メチルまたはエチル)基である、の基である。

【0041】

いくつかの実施態様において、各場合の B^1 は独立して式：



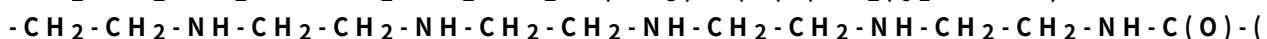
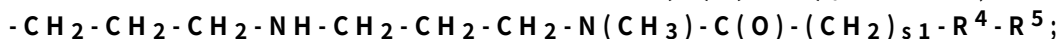
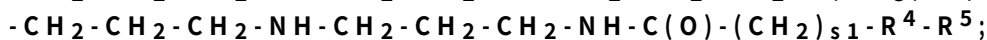
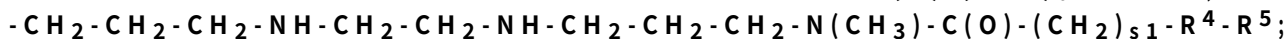
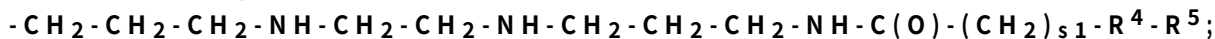
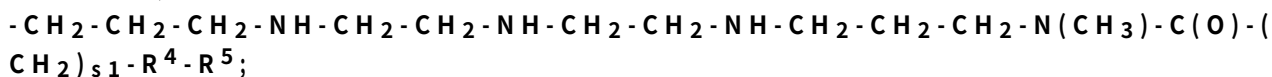
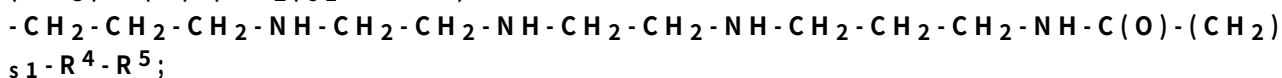
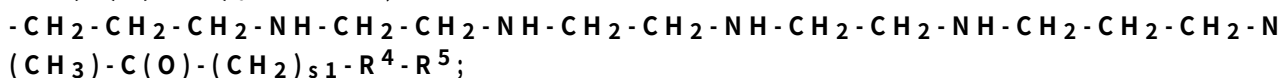
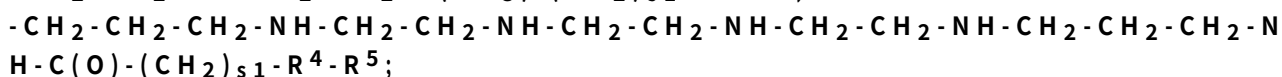
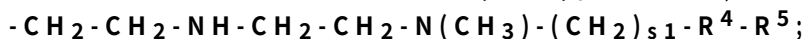
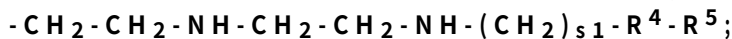
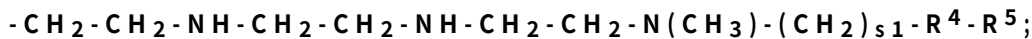
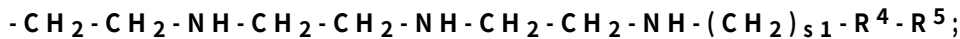
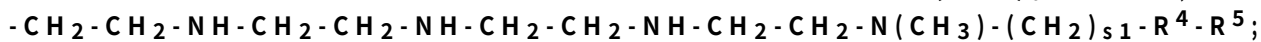
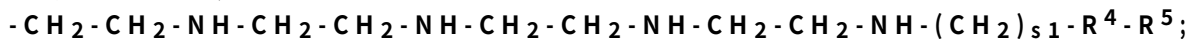
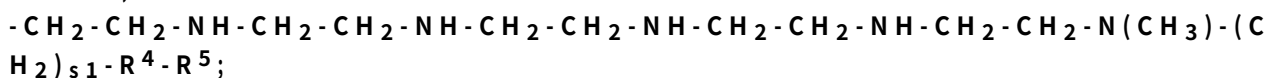
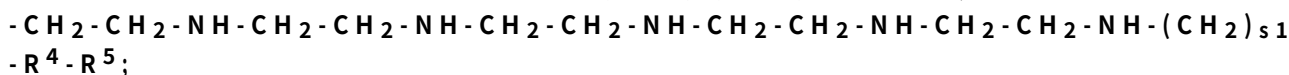
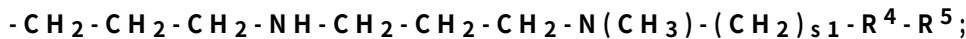
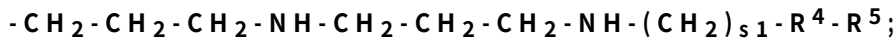
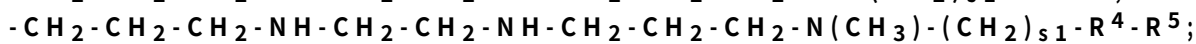
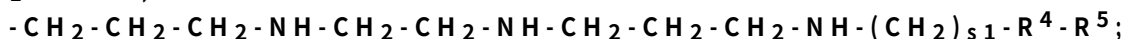
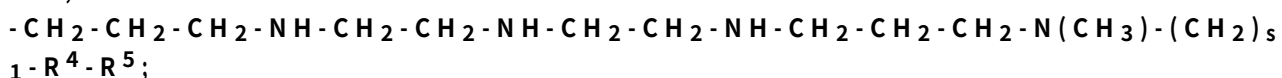
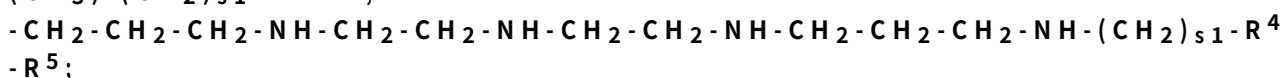
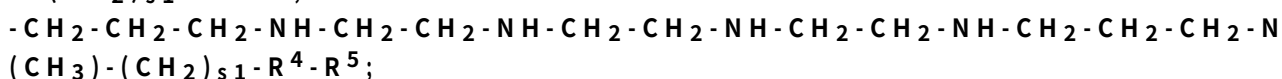
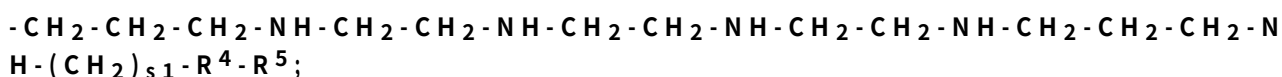
式中、 R^2 は水素である、の基である。いくつかの実施態様において、各場合の B^1 は独立して式：



式中、 R^2 は C_1 - C_6 アルキル基(例えば、メチルまたはエチル)基である、の基である。

【0042】

B^1 基の具体的な非限定例は、例えば：



10

20

30

40

50

$(CH_2)_{s1}-R^4-R^5$;
 $-CH_2-CH_2-NH-CH_2-CH_2-NH-CH_2-CH_2-NH-CH_2-CH_2-NH-CH_2-CH_2-N(CH_3)-C(O)-(CH_2)_{s1}-R^4-R^5$;
 $-CH_2-CH_2-NH-CH_2-CH_2-NH-CH_2-CH_2-NH-CH_2-CH_2-NH-C(O)-(CH_2)_{s1}-R^4-R^5$;
 $-CH_2-CH_2-NH-CH_2-CH_2-NH-CH_2-CH_2-NH-CH_2-CH_2-N(CH_3)-C(O)-(CH_2)_{s1}-R^4-R^5$;
 $-CH_2-CH_2-NH-CH_2-CH_2-NH-CH_2-CH_2-NH-C(O)-(CH_2)_{s1}-R^4-R^5$;
 $-CH_2-CH_2-NH-CH_2-CH_2-NH-CH_2-CH_2-N(CH_3)-C(O)-(CH_2)_{s1}-R^4-R^5$;
 $-CH_2-CH_2-NH-CH_2-CH_2-NH-C(O)-(CH_2)_{s1}-R^4-R^5$;または
 $-CH_2-CH_2-NH-CH_2-CH_2-N(CH_3)-C(O)-(CH_2)_{s1}-R^4-R^5$;
 式中、 $s1$ は0-5、1-5、または1-3の整数である
 を含む。

10

【0043】

いくつかの実施態様において、各場合の A^1 は独立して:

$-(CH_2)_{p1}-[NH-(CH_2)_{p2}]_{r1}NH-(CH_2)_{p3}-NR^2_2$

であり、そして各場合の B^1 は:

$-(CH_2)_{p1}-[NH-(CH_2)_{p2}]_{r1}NH-(CH_2)_{p3}-NR^2-(CH_2)_{s1}-R^4-R^5$

である。

【0044】

他の実施態様において、各場合の A^1 は独立して:

$-(CH_2)_2-[NH-(CH_2)_2]_{r1}NH-(CH_2)_2-NR^2_2$

であり、そして各場合の B^1 は:

$-(CH_2)_2-[NH-(CH_2)_2]_{r1}NH-(CH_2)_2-NR^2-(CH_2)_2-R^4-R^5$

である。

【0045】

いくつかの実施態様において、各場合の A^1 は独立して:

$-(CH_2)_{p1}-[NH-(CH_2)_{p2}]_{r1}NH-(CH_2)_{p3}-NR^2_2$

であり、そして各場合の B^1 は:

$-(CH_2)_{p1}-[NH-(CH_2)_{p2}]_{r1}NH-(CH_2)_{p3}-NR^2-C(O)-(CH_2)_{s1}-R^4-R^5$

である。

30

【0046】

他の実施態様において、各場合の A^1 は独立して:

$-(CH_2)_2-[NH-(CH_2)_2]_{r1}NH-(CH_2)_2-NR^2_2$

であり、そして各場合の B^1 は:

$-(CH_2)_2-[NH-(CH_2)_2]_{r1}NH-(CH_2)_2-NR^2-C(O)-(CH_2)_2-R^4-R^5$

である。

【0047】

基 A^1 および B^1 の前述の実施態様のいずれかにおいて、変数 $p1 \sim p3$ (すなわち、 $p1$ 、 $p2$ 、および $p3$)は、それぞれ独立して1~5の整数(例えば、1、2、3、4、または5)である。いくつかの実施態様において、 $p1$ 、 $p3$ 、または両方は $p2$ の整数よりも大きい整数である。さらに、またはあるいは、 $p1$ または $p3$ 、または両方は3~5の整数(例えば、3、4、または5)である。いくらかの実施態様において、 $p1$ および $p3$ の両方は $p2$ よりも大きい整数であり、または両方は3~5の整数(例えば、3、4、または5)である。さらに他の実施態様において、 $p1$ 、 $p2$ (存在する場合)、および $p3$ は同一である。

40

【0048】

基 A^1 および B^1 の前述の実施態様のいずれかにおいて、変数 $r1$ は0~5の整数(例えば、0、1、2、3、4、または5)である。いくつかの実施態様において、 $r1$ は0であり;他の実施態様において、変数 $r1$ は1~5の整数(例えば、1、2、3、4、または5)である。

【0049】

基 A^1 および B^1 の前述の実施態様のいずれかにおいて、変数 $s1$ は0~5の整数(例えば、

50

0、1、2、3、4、または5)である。いくつかの実施態様において、変数 s_1 は1～5の整数(例えば、1、2、3、4、または5)である。いくつかの実施態様において、変数 s_1 は1～3の整数(例えば、1、2、または3)である。いくつかの実施態様において、変数 s_1 は2である。いくつかの実施態様において、 r_1 および s_1 はそれぞれ独立して1～3の整数(例えば、1、2、または3)である。

【0050】

基 B^1 の前述の実施態様のいずれかにおいて、変数 s_2 は0～5の整数(例えば、0、1、2、3、4、または5)である。いくつかの実施態様において、変数 s_2 は0～3の整数(例えば、0、1、2、または3)である。いくつかの実施態様において、変数 s_2 は0である。いくつかの実施態様において、変数 s_2 は2である。

10

【0051】

前述の実施態様のいずれかにおいて、各場合の R^2 は水素あるいは C_1-C_{12} (例えば、 C_1-C_6 、 C_1-C_4 、または C_1-C_3)アルキル基、 C_2-C_{12} (例えば、 C_2-C_5 、 C_2-C_4 、または C_2-C_3)アルケニル基、 C_3-C_{12} (例えば、 C_3-C_5 または C_3-C_4)シクロアルキル基、または C_3-C_{12} (例えば、 C_3-C_5 または C_3-C_4)シクロアルケニル基であり得、あるいは該当する場合、 R^2 は第2の R^2 およびそれらが結合する窒素と組み合わせさせて複素環基を形成し得る。いくつかの実施態様において、各場合の R^2 は水素である。いくつかの実施態様において、1個以上の(または全ての)場合の R^2 はエチルまたはメチル基などの C_1-C_6 (例えば、 C_1-C_6 、 C_1-C_4 、または C_1-C_3)アルキル基である。

【0052】

前述の実施態様のいずれかに従って、各場合の Z は、存在する場合、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-S(O)(O)-$ 、 $-C(NH)NR^2-$ 、 $-C(S)O-$ 、 $-C(S)NR^2-$ 、 $-C(O)NR^2-$ 、または置換されていてもよいアリアルまたはヘテロアリアルである。いくつかの実施態様において、 Z は存在し、そして $-C(O)-$ である。他の実施態様において、 Z は存在しない(すなわち、結合)。

20

【0053】

前述の実施態様のいずれかに従って、各場合の R^4 は独立して $-C(O)O-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)NH-$ 、 $-CH_2-O-C(O)-O-CH_2-$ 、 $-C-O-C(O)-O-$ 、 $-O-$ 、 $-S(O)(O)-$ 、または結合である。いくつかの実施態様において、各場合の R^4 は独立して $-C(O)O-$ 、 $-C(O)-$ 、または $-C(O)NH-$ である。いくつかの実施態様において、各場合の R^4 は $-C(O)O-$ である。いくつかの実施態様において、各場合の R^4 は $-C(O)NH-$ である。

30

【0054】

前述の実施態様のいずれかに従って、各場合の R^5 はポリアルキレンオキシドを含む基であり、必要に応じて連結基を含む。従って、各場合の R^5 は2個または3個あるいはそれ以上のアルキレンオキシド基(例えば、オリゴアルキレンオキシド)または4個以上(例えば、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、20、25、50、75、100個またはそれ以上)のアルキレンオキシド基を含むより大きなポリアルキレンオキシドを含む基である。ポリアルキレンオキシド基の例は、ポリエチレンオキシド(PEG)、ポリプロピレンオキシド(PPG)、またはそれらの混合物(EO/PO)を含む。

【0055】

いくつかの実施態様において、 R^5 は合計2～200個のエチレンオキシド単位(例えば、2～150単位、2～100単位、2～50単位、10～200単位、10～150単位、10～100単位、10～50単位、25～200単位、25～150単位、25～100単位、25～50単位、50～200単位、50～150単位、または50～100単位)を有する少なくとも1個のポリエチレングリコール基(別名ポリエチレンオキシド基)を含む。いくつかの実施態様において、 R^5 は合計2～200個のプロピレンオキシド単位(例えば、2～150単位、2～100単位、2～50単位、10～200単位、10～150単位、10～100単位、10～50単位、25～200単位、25～150単位、25～100単位、25～50単位、50～200単位、50～150単位、または50～100単位)を有する少なくとも1個のポリプロピレンオキシド基を含む。 R^5 が合計2～200個(例えば、2～150単位、2～100単位、2～50単位、10～200単位

40

50

、10～150単位、10～100単位、10～50単位、25～200単位、25～150単位、25～100単位、25～50単位、50～200単位、50～150単位、または50～100単位)のエチレングリコールおよびプロピレンオキシド単位を有する少なくとも1個のポリエチレングリコール/ポリプロピレンオキシド基を含む実施態様において。R⁵は任意の適切な構造タイプとして存在し得る。例えば、R⁵はエチレングリコールおよび/またはプロピレンオキシド単位を交互ポリマー、ランダムポリマー、ブロックポリマー、グラフトポリマー、線状ポリマー、分枝ポリマー、環状ポリマー、またはそれらの組み合わせとして含み得る。例えば、モノマーの少なくともいくつかのR⁵は、Pluronic (登録商標) F65またはPluronic (登録商標) F127由来であり得る。アルキレンオキシド基の数は異なる量のアルキレンオキシド基を有する種の範囲として存在し得、その結果アルキレンオキシド基の報告される数は平均であることが当業者に理解されるであろう。

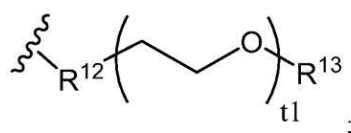
10

【0056】

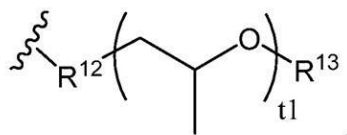
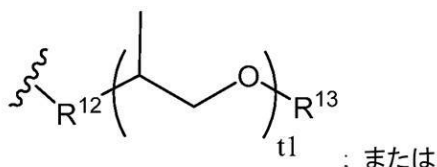
いくつかの実施態様において、各場合のR⁵は独立して式:

【0057】

【化4】



20



30

【0058】

であり、式中:

R¹²は結合あるいはメチレン、エチレンまたはプロピレン基であり; R¹³は水素、アリール基(例えば、C₆-C₁₂アルキル基)、複素環基(例えば、C₂-C₁₂複素環基)、アルキル基(例えば、C₁-C₁₂アルキル基)、アルケニル基(例えば、C₂-C₁₂アルケニル基)、シクロアルキル基(例えば、C₃-C₁₂シクロアルキル基)、またはシクロアルケニル基(例えば、C₃-C₁₂シクロアルケニル基)であり、これらのいずれかは1個以上の置換基、必要に応じて水素またはC₁-C₃アルキル基で置換されていてもよく; およびt1は2～200(例えば、2～150、2～100、2～50、10～200、10～150、10～100、10～50、25～200、25～150、25～100、25～50、50～200、50～150、または50～100)の整数である。

40

【0059】

前述の実施態様のいずれかにおいて、R^{3a}およびR^{3b}はそれぞれ独立してメチレンまたはエチレン基である。いくつかの実施態様において、R^{3a}はエチレン基であり、そしてR^{3b}はメチレン基である; またはR^{3a}はメチレン基であり、そしてR^{3b}はエチレン基である。いくらかの実施態様において、R^{3a}およびR^{3b}は両方ともエチレン基である。いくつかの実施態様において、R^{3a}およびR^{3b}は両方ともメチレン基である。

【0060】

前述の実施態様のいずれかにおいて、式1の各X¹基は独立して-C(O)O-、-C(O)NR¹¹-、-C(O)-、-S(O)(O)-、または結合である。各X¹基は互いに同一であっても異なって

50

いてもよい。いくつかの実施態様において、 X^1 は $-C(O)NR^{11}$ -である。いくつかの実施態様において、 X^1 は $-C(O)O-$ である。

【0061】

前述の実施態様のいずれかにおいて、各場合の R^{11} は独立して水素あるいは C_1-C_4 (例えば、 C_1-C_3 または C_1-C_2)アルキル基または C_2-C_4 (例えば、 C_2 、 C_3 、または C_4)アルケニル基であり、これらのいずれかは1個以上の置換基で置換され得る。いくつかの実施態様において、各 R^{11} は独立して C_1-C_4 アルキル基または C_2-C_4 アルケニル基である。いくつかの実施態様において、 R^{11} はメチルである;他の実施態様において、 R^{11} は水素である。各 R^{11} は独立して選択され、そして同一であっても異なってもよい;しかし、いくつかの実施態様において、各 R^{11} は同一である(例えば、全てメチルまたは全て水素)。

10

【0062】

前述の実施態様のいずれかにおいて、各場合の X^2 は疎水性側鎖である。 X^2 は、アリールまたは環状、直鎖、または分枝脂肪族基を含む脂肪族基などの任意の疎水性側鎖であり得る。例えば、各場合の X^2 は独立して C_1-C_{12} (例えば、 C_1-C_{10} 、 C_1-C_8 、 C_1-C_6 、 C_1-C_3 ; C_2-C_{12} 、 C_2-C_{10} 、 C_2-C_8 、 C_2-C_6 、 C_3-C_{12} 、 C_3-C_{10} 、 C_3-C_8 、 C_3-C_6 、 C_4-C_{12} 、 C_4-C_{10} 、 C_4-C_8 、 C_4-C_6 、 C_6-C_{12} 、 C_6-C_{10} 、 C_6-C_8 、 C_8-C_{12} 、または C_8-C_{10})アルキル基、 C_2-C_{12} (例えば、 C_2-C_{10} 、 C_2-C_8 、 C_2-C_6 、 C_3-C_{12} 、 C_3-C_{10} 、 C_3-C_8 、 C_3-C_6 、 C_4-C_{12} 、 C_4-C_{10} 、 C_4-C_8 、 C_4-C_6 、 C_6-C_{12} 、 C_6-C_{10} 、 C_6-C_8 、 C_8-C_{12} 、 C_8-C_{10} ;)アルケニル基、または C_3-C_{12} (C_3-C_{10} 、 C_3-C_8 、 C_3-C_6 、 C_4-C_{12} 、 C_4-C_{10} 、 C_4-C_8 、 C_4-C_6 、 C_6-C_{12} 、 C_6-C_{10} 、 C_6-C_8 、 C_8-C_{12} 、 C_8-C_{10})シクロアルキルまたはシクロアルケニル基であり得る。前述のいずれかは、1個以上のヘテロ原子をさらに含んでヘテロアルキル、ヘテロアルケニル、または複素環基を提供し得る。前述のいずれかは、1個以上の置換基で置換され得る。いくつかの実施態様において、 X^2 は脂肪族基である。いくつかの実施態様において、1個以上の(または全ての) X^2 基は、 C_2-C_{12} (例えば、 C_3-C_{12} 、 C_3-C_8 、 C_3-C_6 、 C_4-C_{12} 、 C_4-C_6 、 C_6-C_{12} 、または C_8-C_{12})アルキル基またはアルケニル基、あるいは C_3-C_{12} (例えば、 C_3-C_8 、 C_3-C_6 、 C_4-C_{12} 、 C_4-C_6 、 C_6-C_{12} 、または C_8-C_{12})シクロアルキル基またはシクロアルケニル基である。他の実施態様において、1個以上の(または全ての) X^2 基は、 C_1-C_8 (例えば、 C_1-C_6 、 C_1-C_4 、 C_1-C_3 、 C_2-C_8 、または C_2-C_6)アルキル基である。前述のアルキルまたはアルケニル基のいずれかは、直鎖または分岐であり得る。各 X^2 は独立して選択され、そしてそれゆえ、互いに同一であっても異なってもよい;いくつかの実施態様において、全ての場合の X_2 は同一である。

20

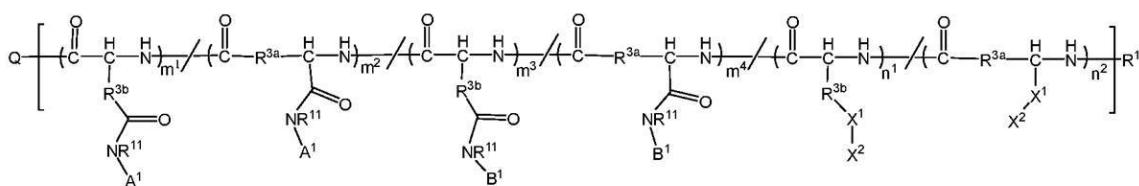
30

【0063】

本明細書中で説明されるポリマーは、任意の適切な末端基を有し得る。いくつかの実施態様において、ポリマーは式1A:

【0064】

【化5】



40

式1A

【0065】

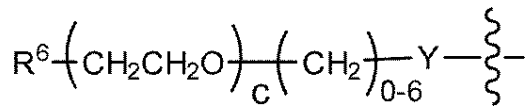
式中

Qは式:

【0066】

50

【化6】



【0067】

であり、

cは0～50の整数であり；

Yは存在していてもよく、そして開裂可能なリンカーであり；

R^1 は水素、アリール基、複素環基、 C_1 - C_{12} アルキル基、 C_2 - C_{12} アルケニル基、 C_3 - C_{12} シクロアルキル基または C_3 - C_{12} シクロアルケニル基であり、これらのいずれかは1個以上の置換基で置換されていてもよく；および

R^6 は水素、アミノ基、アリール基、複素環基、 C_1 - C_{12} アルキル基、 C_1 - C_{12} ヘテロアルキル基、 C_2 - C_{12} アルケニル基、 C_3 - C_{12} シクロアルキル基または C_3 - C_{12} シクロアルケニル基であり、これらのいずれかは1個以上の置換基あるいは組織特異的または細胞特異的標的化部位で置換されていてもよい

の構造を有する。

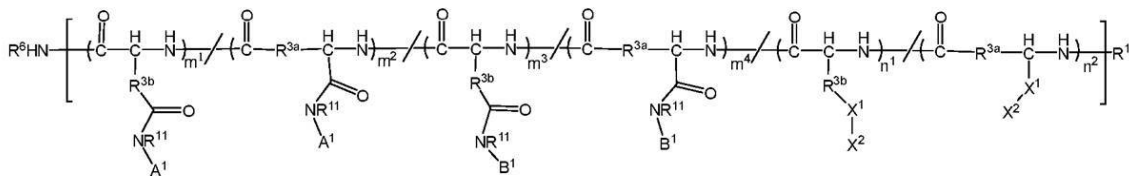
式1Aの全ての他の局面は、上記で式1に関して記載した通りであり、その任意のおよび全ての実施態様を含む。

【0068】

いくつかの実施態様において、ポリマーは式1B：

【0069】

【化7】



式1B

【0070】

式中

R^1 は水素、アリール基、複素環基、 C_1 - C_{12} (例えば、 C_1 - C_{10} 、 C_1 - C_8 、 C_1 - C_6 、 C_1 - C_3 ； C_2 - C_{12} 、 C_2 - C_{10} 、 C_2 - C_8 、 C_2 - C_6 、 C_3 - C_{12} 、 C_3 - C_{10} 、 C_3 - C_8 、 C_3 - C_6 、 C_4 - C_{12} 、 C_4 - C_{10} 、 C_4 - C_8 、 C_4 - C_6 、 C_6 - C_{12} 、 C_6 - C_{10} 、 C_6 - C_8 、 C_8 - C_{12} 、または C_8 - C_{10})アルキルまたはヘテロアルキル基、 C_2 - C_{12} (例えば、 C_2 - C_{10} 、 C_2 - C_8 、 C_2 - C_6 、 C_3 - C_{12} 、 C_3 - C_{10} 、 C_3 - C_8 、 C_3 - C_6 、 C_4 - C_{12} 、 C_4 - C_{10} 、 C_4 - C_8 、 C_4 - C_6 、 C_6 - C_{12} 、 C_6 - C_{10} 、 C_6 - C_8 、 C_8 - C_{12} 、 C_8 - C_{10})アルケニルまたはヘテロアルケニル基、または C_3 - C_{12} (C_3 - C_{10} 、 C_3 - C_8 、 C_3 - C_6 、 C_4 - C_{12} 、 C_4 - C_{10} 、 C_4 - C_8 、 C_4 - C_6 、 C_6 - C_{12} 、 C_6 - C_{10} 、 C_6 - C_8 、 C_8 - C_{12} 、 C_8 - C_{10})シクロアルキル、ヘテロシクロアルキル、シクロアルケニル、またはヘテロシクロアルケニル基であり、これらのいずれかは1個以上の置換基で置換されていてもよく；および

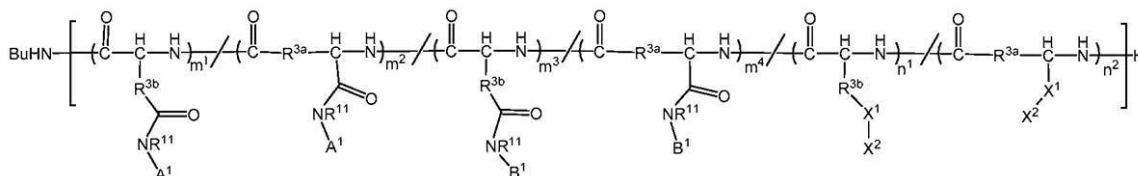
R^6 は水素、アミノ基、アリール基、複素環基、 C_1 - C_{12} (例えば、 C_1 - C_{10} 、 C_1 - C_8 、 C_1 - C_6 、 C_1 - C_3 ； C_2 - C_{12} 、 C_2 - C_{10} 、 C_2 - C_8 、 C_2 - C_6 、 C_3 - C_{12} 、 C_3 - C_{10} 、 C_3 - C_8 、 C_3 - C_6 、 C_4 - C_{12} 、 C_4 - C_{10} 、 C_4 - C_8 、 C_4 - C_6 、 C_6 - C_{12} 、 C_6 - C_{10} 、 C_6 - C_8 、 C_8 - C_{12} 、または C_8 - C_{10})アルキルまたはヘテロアルキル基、 C_2 - C_{12} (例えば、 C_2 - C_{10} 、 C_2 - C_8 、 C_2 - C_6 、 C_3 - C_{12} 、 C_3 - C_{10} 、 C_3 - C_8 、 C_3 - C_6 、 C_4 - C_{12} 、 C_4 - C_{10} 、 C_4 - C_8 、 C_4 - C_6 、 C_6 - C_{12} 、 C_6 - C_{10} 、 C_6 - C_8 、 C_8 - C_{12} 、 C_8 - C_{10})アルケニルまたはヘテロアルケニル基、または C_3 - C_{12} (C_3 - C_{10} 、 C_3 - C_8 、 C_3 - C_6 、 C_4 - C_{12} 、 C_4 - C_{10} 、 C_4 - C_8 、 C_4 - C_6 、 C_6 - C_{12} 、 C_6 - C_{10} 、 C_6 - C_8 、 C_8 - C_{12} 、 C_8 - C_{10})シクロアルキル、ヘテロシクロアルキル、シ

【 0 0 7 1 】

【 0 0 7 2 】

【 0 0 7 3 】

【化 8】



式1C

【 0 0 7 4 】

【 0 0 7 5 】

【 0 0 7 6 】

【 0 0 7 7 】

言い換えれば、ポリマーは、基 B^1 を含む少なくともいくつかのモノマー単位を含み、および必要に応じて基 A^1 を含むいくつかのモノマー単位を含み、本明細書中、それぞれ集合的に「Aモノマー」および「Bモノマー」と呼ぶ。いくつかの実施態様において、ポリマーは少なくともいくつかのAモノマーおよびBモノマーを含む。同様に、ポリマーは基 X^1 および/または X^2 を含む少なくともいくつかのモノマー単位を含み、本明細書中、

集合的に「Xモノマー」と呼ぶ。いくつかの実施態様において、 m^1 および m^2 はゼロであり、その結果ポリマーは A^1 基を含まない。

【0078】

式1(または式1A-1C)に従うポリマーは、任意の適切な重合度(例えば、 $m^1 + m^2 + m^3 + m^4 + n^1 + n^2$ の合計)を有し得る。ある場合、ポリマーは約10以上、または約20以上(例えば、約20~約1000、または約20~約100、または約20~約65、または約20~64)の重合度を有する。ある場合、ポリマーは約50以上(例えば、約50~約1000、または約50~約500、または66~約200)の重合度を有する。いくつかの実施態様において、重合度は約20-100(例えば、約20-80、または約20-75、または約20-50)である。いくつかの実施態様において、重合度は約40-100(例えば、約40-80、約40-75、または約50-75)である。

10

【0079】

ポリマーは、Xモノマーに対するAおよびBモノマーの任意の適切な比を含み得る。いくつかの実施態様において、ポリマーは、約25以下(例えば、約10以下、約5以下、約3以下、または約2以下)および必要に応じて、約0.1以上または0.2以上(例えば、約0.3以上、0.4以上、0.5以上、0.6以上、0.7以上、または約1以上)のXモノマーに対するAおよびBモノマーの比(例えば、 $(m^1+m^2+m^3+m^4)/(n^1+n^2)$ の比)を含む。例えば、Xモノマーに対するAおよびBモノマーの比は、約0.3~約25、約0.3~約20、約0.3~約10、約0.3~約5、約0.3~約3、約0.3~約2であり得る。いくつかの実施態様において、 $(m^1+m^2+m^3+m^4)/(n^1+n^2)$ の比は約0.5-2または約1-2である。

20

【0080】

ポリマーがAモノマーおよびBモノマーの両方を含む実施態様において、ポリマーはBモノマーに対するAモノマーの任意の適切な比を含み得る。いくつかの実施態様において、Bモノマーに対するAモノマーの比(例えば、 $(m^1+m^2)/(m^3+m^4)$)は、約20以下(例えば、約10以下、約5以下、約2以下、またはさらに約1以下、例えば約0.5以下または0.2以下)であり得る。いくつかの実施態様において、 $(m^1+m^2)/(m^3+m^4)$ の比は約0.1以上、または約0.2以上、例えば約0.5以上である。いくつかの実施態様において、Bモノマーに対するAモノマーの比はより高く、例えば約5以上(例えば、約5、6、7、8、9、または10以上)である。いくつかの実施態様において、 $(m^1+m^2)/(m^3+m^4)$ の比は約0.5~5、例えば約0.5-3または約1-4である。

30

【0081】

前述のポリマーのいずれかに関して言及する組織特異的または細胞特異的標的化部位は、所定の標的組織または細胞(例、特定のリガンド、レセプター、あるいは標的化部位が標的組織または細胞と他の非標的組織または細胞とを区別するのを可能とする他のタンパク質または分子に特異的に結合する)を認識する(例、特異的に結合する)ことができる、任意の小分子、タンパク質(例、抗体または抗原)、アミノ酸配列、糖、オリゴヌクレオチド、金属ベースのナノ粒子、またはそれらの組み合わせであり得る。いくつかの実施態様において、組織特異的または細胞特異的標的化部位は、小分子(例えば、約900ダルトン未満または約500ダルトン未満の、および/または約100個よりも少ない原子、例えば約10-100または約20-100個の原子を有する小分子薬物または他の小分子部分)である。他の実施態様において、組織特異的または細胞特異的標的化部位はリガンドのためのレセプターまたはレセプターのためのリガンドである。

40

【0082】

組織特異的または細胞特異的標的化部位は、任意の所望の組織または細胞型を標的化するために使用され得る。いくつかの実施態様において、組織特異的または細胞特異的標的化部位は、ポリマーを被検体の末梢神経系、中枢神経系、肝臓、筋肉(例、心筋)、肺、骨(例、造血細胞)、または眼の組織へと局在化させる。いくつかの実施態様において、組織特異的または細胞特異的標的化部位は、ポリマーを腫瘍細胞へと局在化させる。特定の実施態様において、組織特異的または細胞特異的標的化部位は肺組織を標的化する。例えば、組織特異的または細胞特異的標的化部位は、特定の組織または細胞上のレセプターに結

50

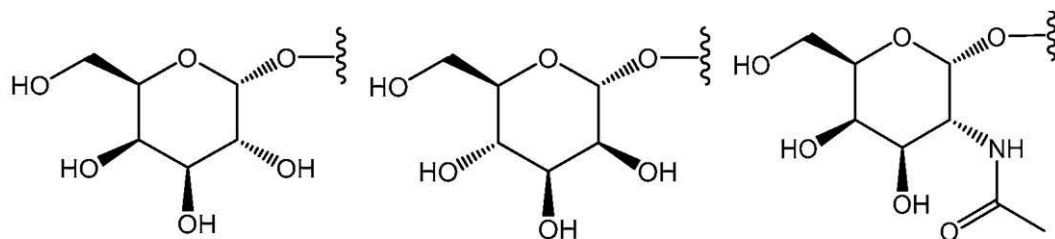
合する糖であり得る。

【0083】

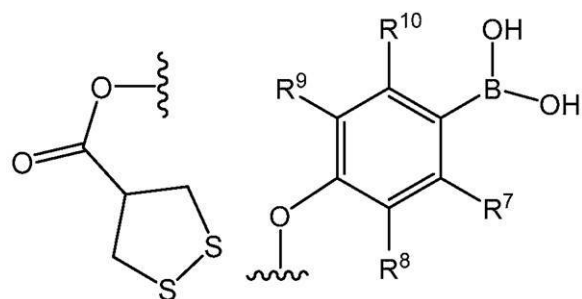
実例として、組織特異的または細胞特異的標的化部位の非限定例は：

【0084】

【化9】

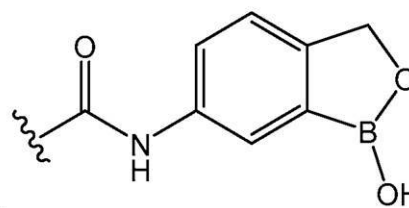


アルファ-d-ガラクトース ; アルファ-d-マンノース ; N-アセチルガラクトサミン ;

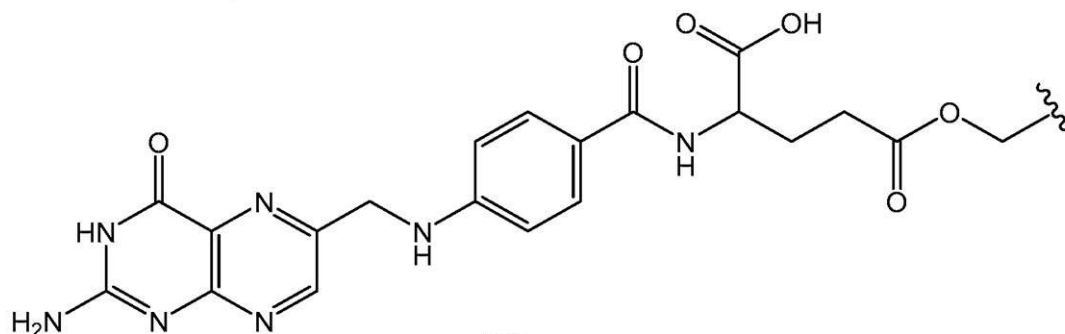


アスパラガス酸 ;

フェニルボロン酸 ;



OH ; または



葉酸

【0085】

式中、 R^7 、 R^8 、 R^9 、および R^{10} のそれぞれは独立して水素、ハロゲン、1個以上のアミノ基で置換されていてもよい、 C_1 - C_4 アルキル、または C_1 - C_4 アルコキシである、を含む。特定の組織-特異的または細胞-特異的標的化部位は、ポリマーを本明細書中で記載した組織に局在化させるよう選ばれ得る。例えば、アルファ-d-マンノースはポリマーを末梢神経系、中枢神経系、または免疫細胞に局在化させるよう用いられ得、アルファ-d-ガラクトースおよびN-アセチルガラクトサミンはポリマーを肝細胞に局在化させるよう用いられ得、そして葉酸はポリマーを腫瘍細胞に局在化させるよう用いられ得る。

【0086】

本明細書中に記載のポリマー(例えば、式1および1A-1C)は、任意の適切な構造タイプとして存在し得る。例えば、ポリマーは、交互ポリマー、ランダムポリマー、ブロックポリマー、グラフトポリマー、線状ポリマー、分枝ポリマー、環状ポリマー、またはそれらの組み合わせとして存在し得る。いくつかの実施態様において、ポリマーはランダムポリマー、ブロックポリマー、グラフトポリマー、またはそれらの組み合わせである。

【0087】

従って、式1(または式1A-1C)の構造において、モノマー(それらのそれぞれの側鎖 A^1

、 B^1 、および $X(X^1$ および/または $X^2)$ によって言及され得る)は、ランダムにまたは任意の順序で配置され得る。整数 m^1 、 m^2 、 m^3 、 m^4 、 n^1 、および n^2 (該当する場合)は、鎖全体中に現れるそれぞれのモノマーの数を単に示すのみであり、そして、所定のモノマーのブロックまたは伸長がいくつかの実施態様において存在するかもしれないが、これらのモノマーの任意の特定の順序またはブロックを必ずしも意味または表すものではない。例えば、式1の構造は、 $-A^1-A^1-B^1-B^1-$ 、 $-B^1-A^1-B^1-A^1-$ 、 $-A^1-B^1-B^1-B^1-$ などの順序でモノマーを含み得る。さらに、ポリマーはAおよび/またはBポリマーのブロック(例えば、 $[A\text{モノマー}]_{m1+m2}-[B\text{モノマー}]_{m3+m4}$)を任意の順序で含み得る。ポリマーはAおよびBモノマーが点在する個々のXモノマー(例えば、 $-A-X-B-$ 、 $-A-B-X-$ 、 $-B-X-A$ など)を含み得、またはポリマーは、ポリマーの一端または両端で1個以上のXモノマー(例えば、Xモノマーのブロック)で「キャップされ」得る。同様に、ポリマーがAおよび/またはBモノマーのブロックを含む場合、ポリマーはAおよび/またはBモノマーのブロック間に点在したXモノマーのブロックを含み得、またはポリマーは、ポリマーの一端または両端で1個以上のXモノマー(例えば、Xモノマーのブロック)で「キャップされ」得る。いくつかの実施態様において、ポリペプチド(例えば、ポリアスパルタミド)骨格はアルファ/ベータ配置で配置され、その結果「 m_1 -様」または「 m_3 -様」および「 m_2 -様」または「 m_4 -様」モノマーが交互になり、ここでポリマーはXモノマーでキャップされ、またはXモノマーは至る所に点在する。しかし、「A」および「B」側鎖(例えば、 A^1 および B^1)はポリマー骨格の至る所にランダムに分散され得る。

10

20

【0088】

各 A^1 基(存在する場合)は独立して選択され、そしてそれゆえ互いに同一であっても異なってもよい。同様に、各 B^1 基は独立して選択され、そして互いに同一であっても異なってもよく、そして各 X^1 および/または X^2 基は独立して選択され、そして互いに同一であっても異なってもよい。しかし、いくつかの実施態様において、全ての A^1 基は同一であり、全ての B^1 基は同一であり、および/または全ての X^1 および/または X^2 基は同一である。

【0089】

ポリマーは、ポリマーが前述のポリマー構造を含むという条件で、任意の適切なポリマーであり得る。いくつかの実施態様において、ポリマーは、式1の構造を有するポリマーブロックおよび1個以上の他のポリマーブロックを含むブロックコポリマーであり、これは任意の適切な末端基を含み得る。いくつかの実施態様において、ポリマーは、組織特異的または細胞特異的標的化部位を含む置換基をさらに含み得る。

30

【0090】

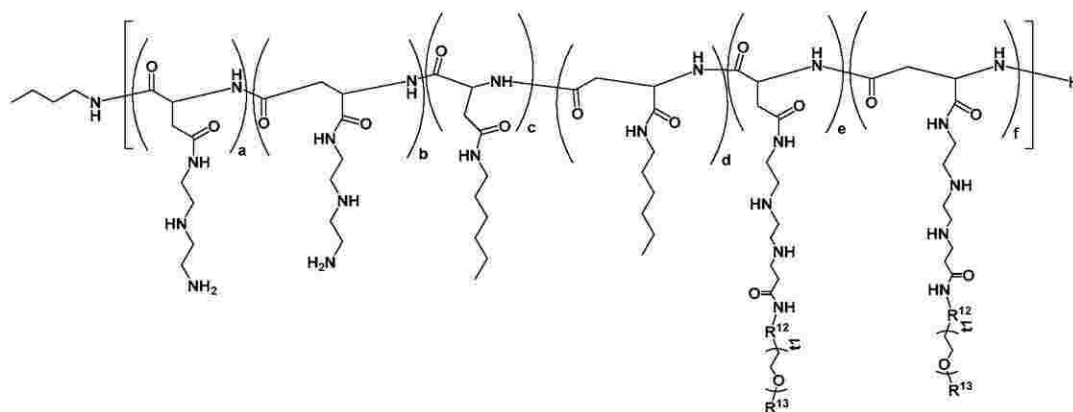
本明細書中で提供されるポリマーの非限定例は、例えば：

【0091】

40

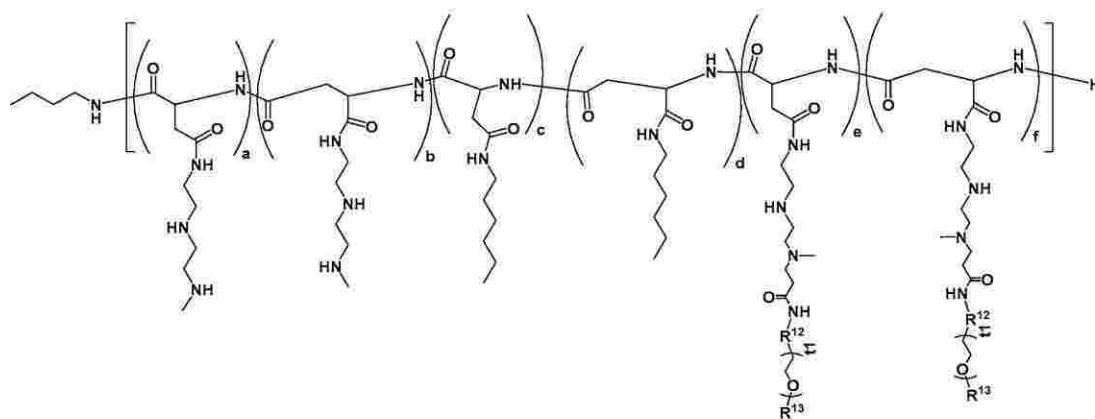
50

【化 1 0】



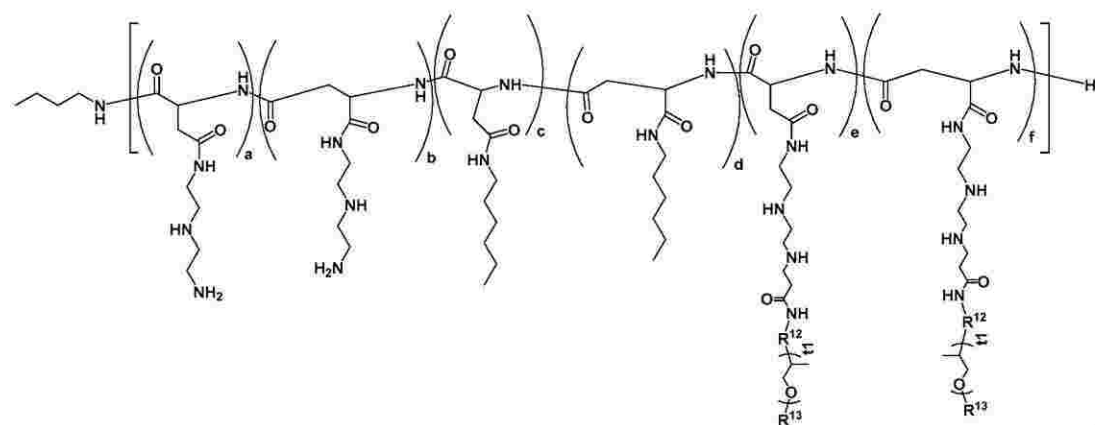
10

ポリマー 1



20

ポリマー 2



30

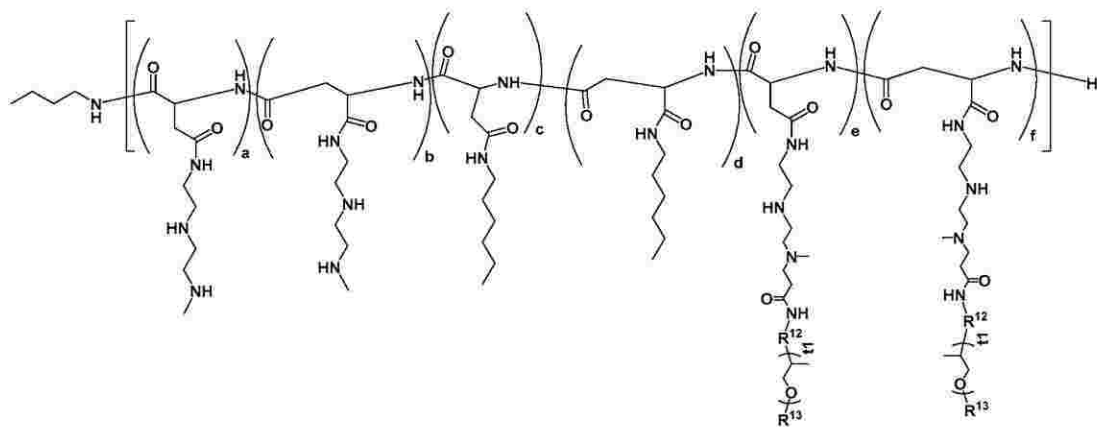
ポリマー 3

40

【 0 0 9 2 】

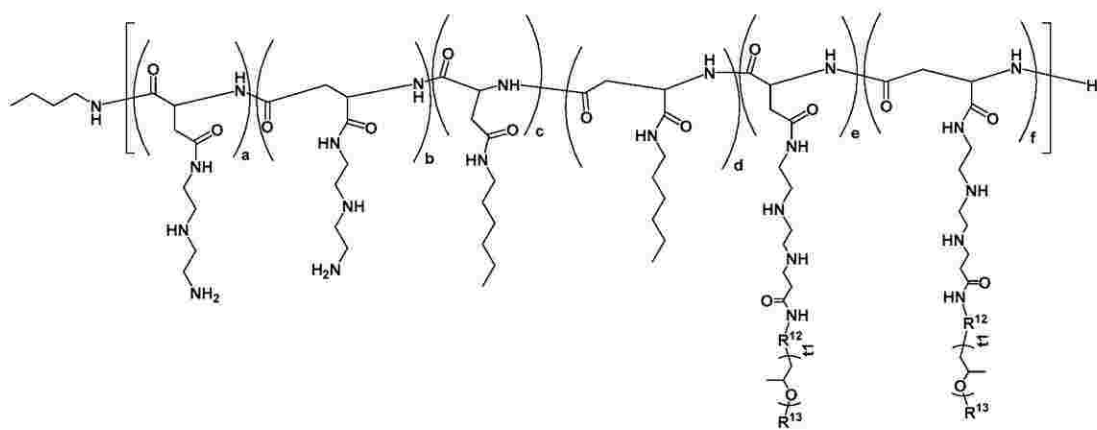
50

【化 1 1】



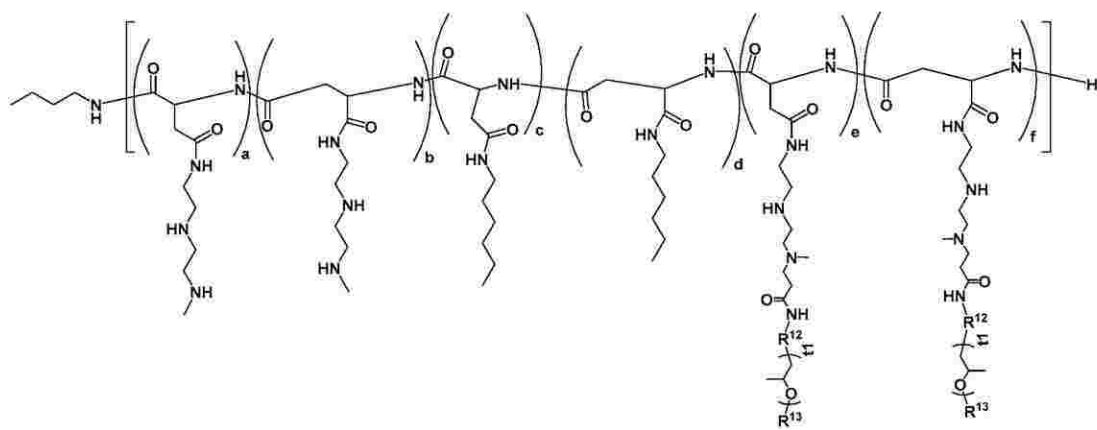
10

ポリマー 4



20

ポリマー 5



30

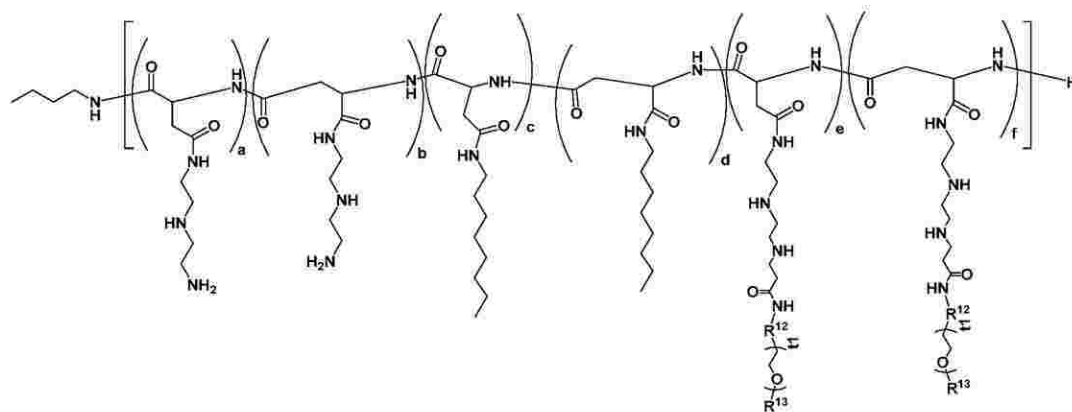
ポリマー 6

40

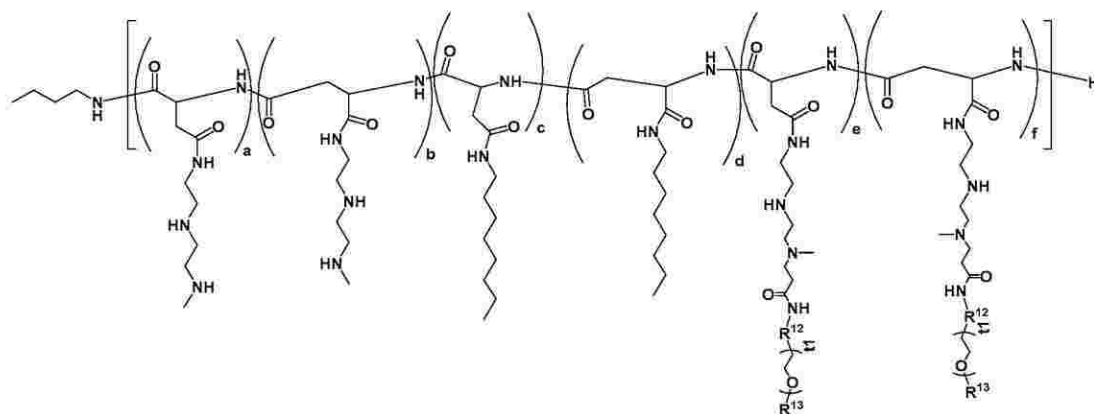
【0093】

50

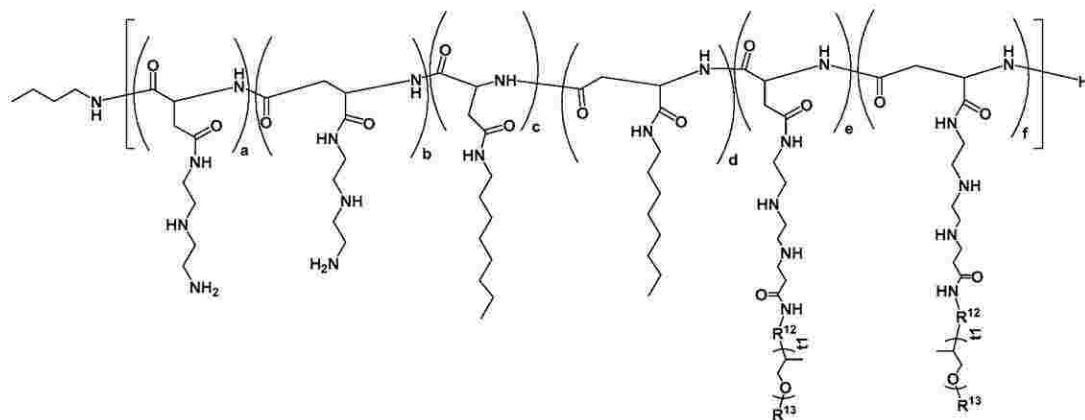
【化 1 2】



ポリマー 7



ポリマー 8



ポリマー 9

【 0 0 9 4】

10

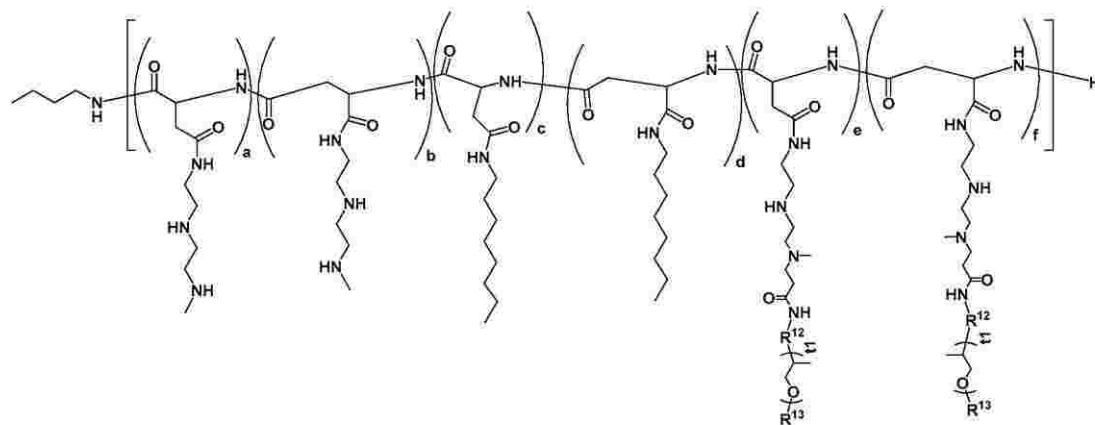
20

30

40

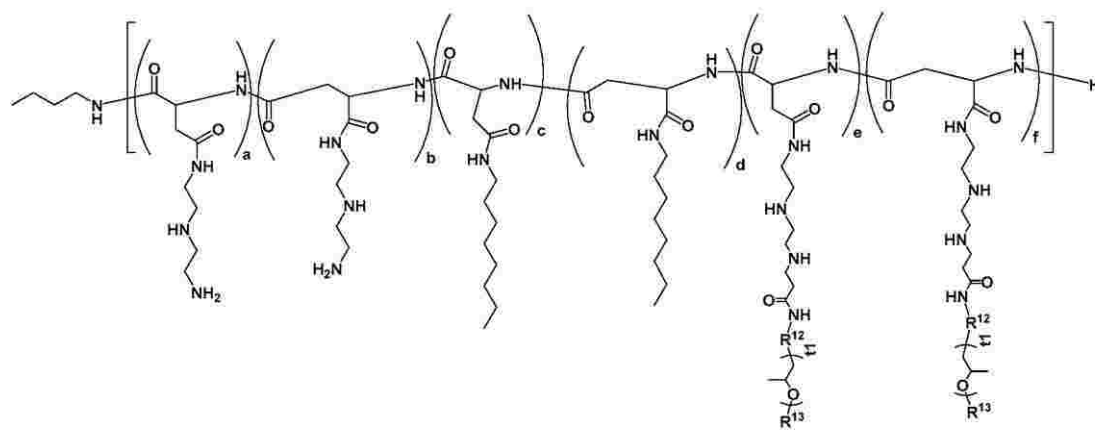
50

【化 1 3】



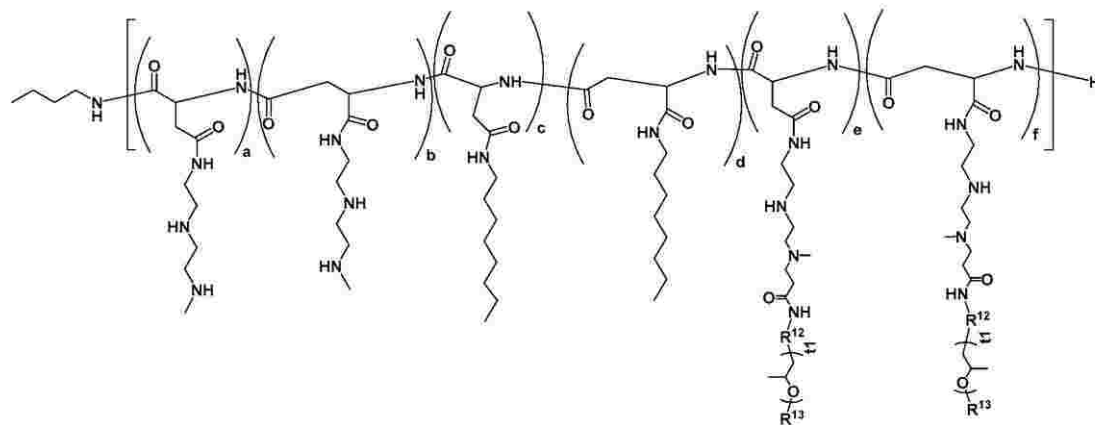
10

ポリマー 10



20

ポリマー 11



30

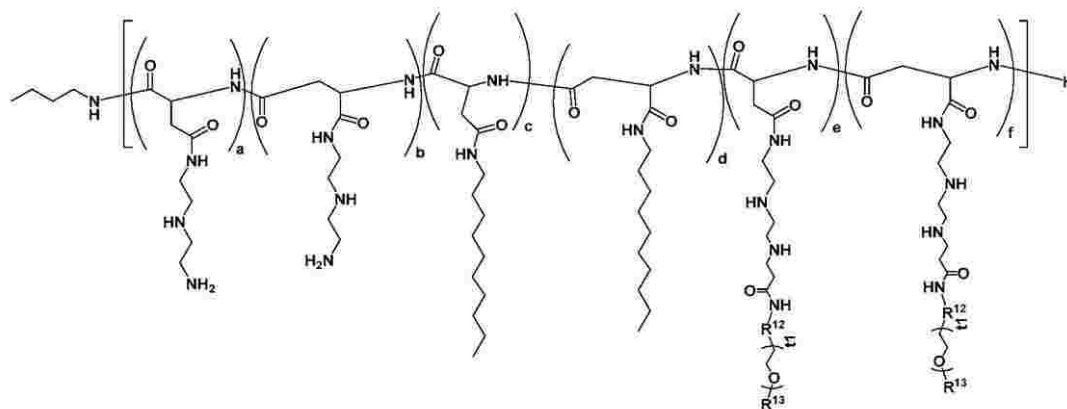
ポリマー 12

40

【 0 0 9 5】

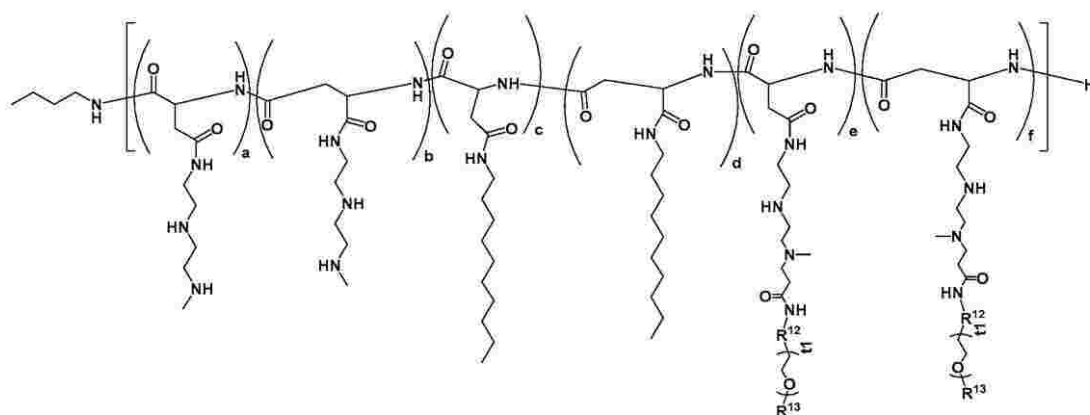
50

【化 1 4】



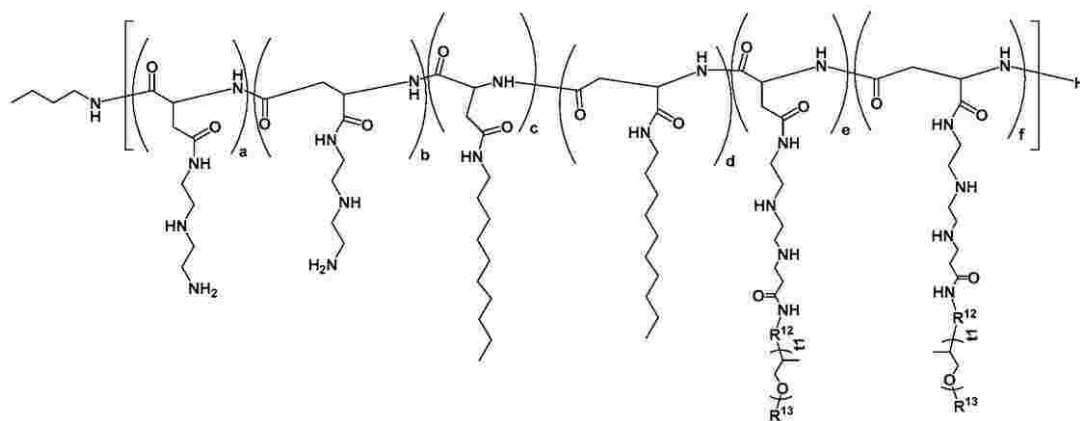
10

ポリマー 13



20

ポリマー 14



30

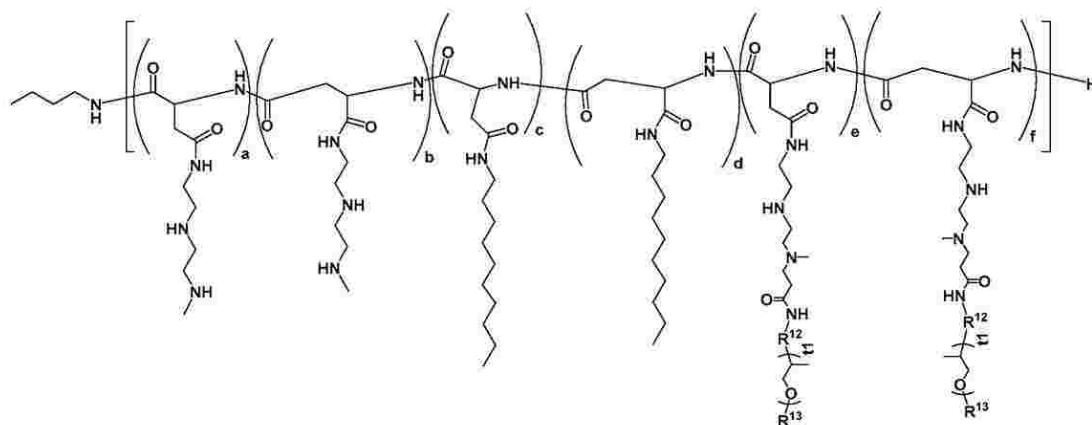
ポリマー 15

【 0 0 9 6】

40

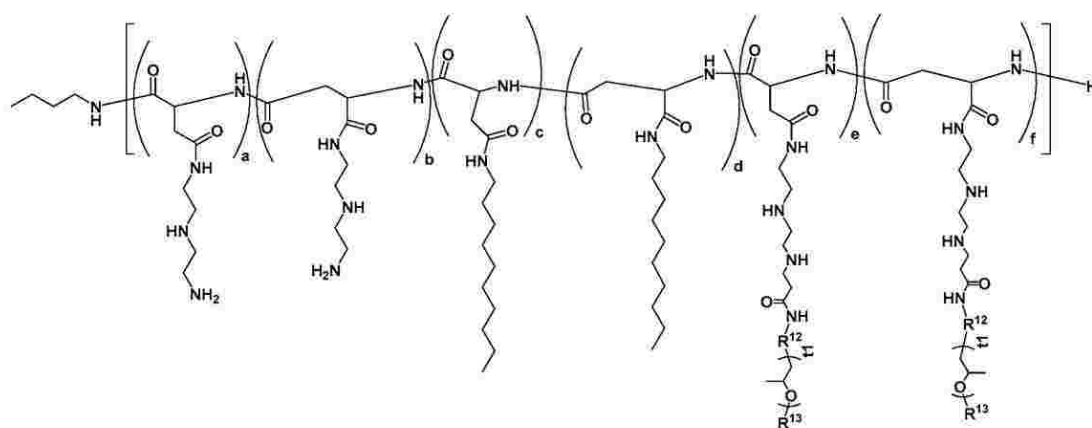
50

【化 1 5】



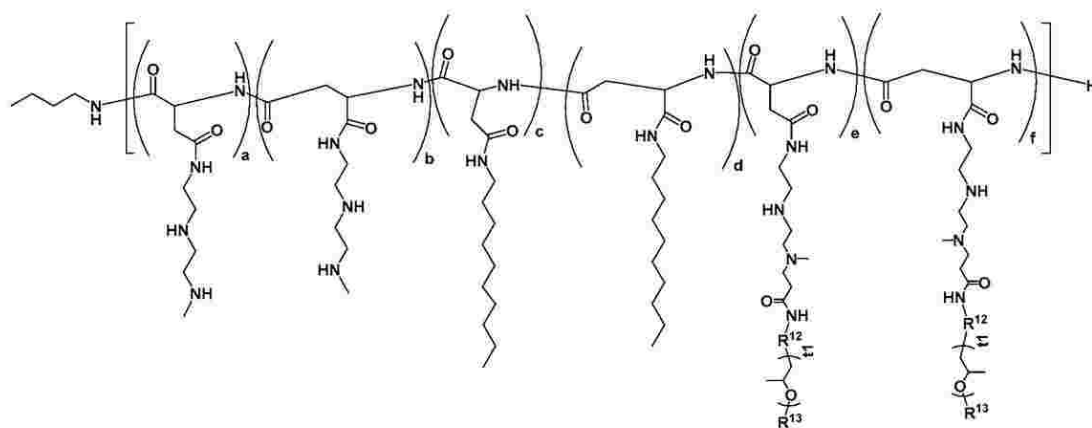
10

ポリマー 16



20

ポリマー 17



30

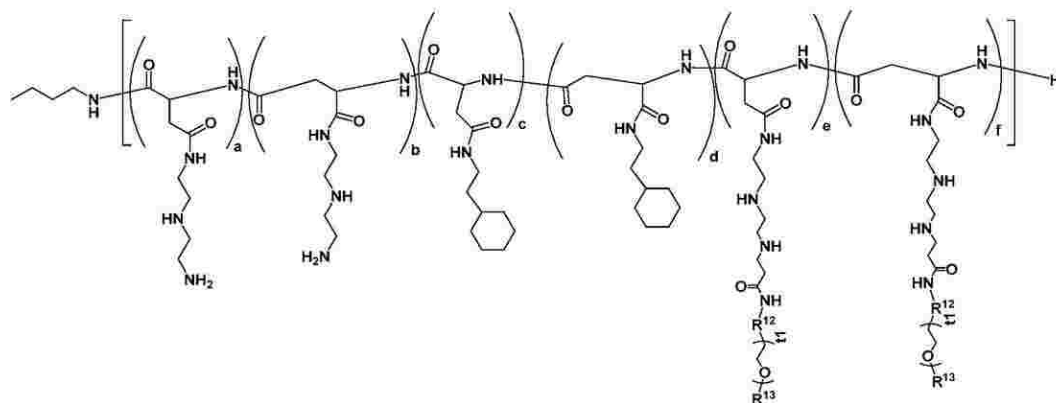
ポリマー 18

40

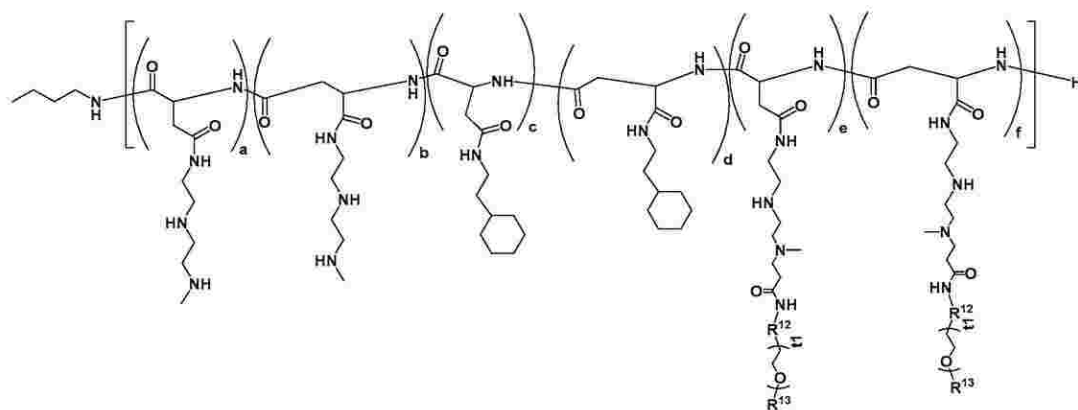
【 0 0 9 7 】

50

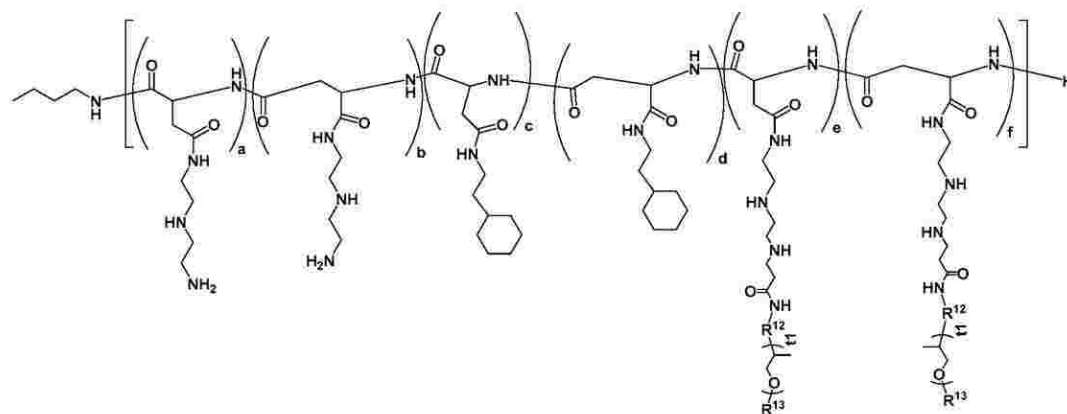
【化 1 6】



ポリマー 19



ポリマー 20



ポリマー 21

【 0 0 9 8】

10

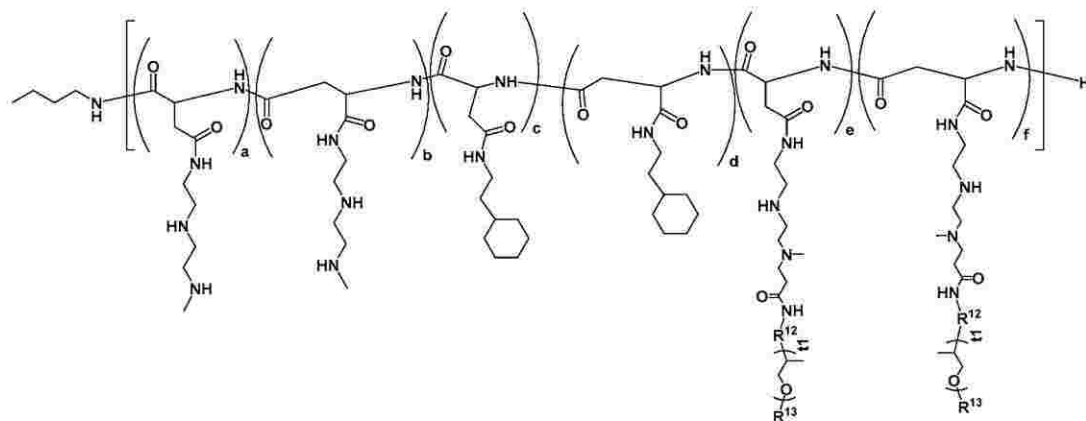
20

30

40

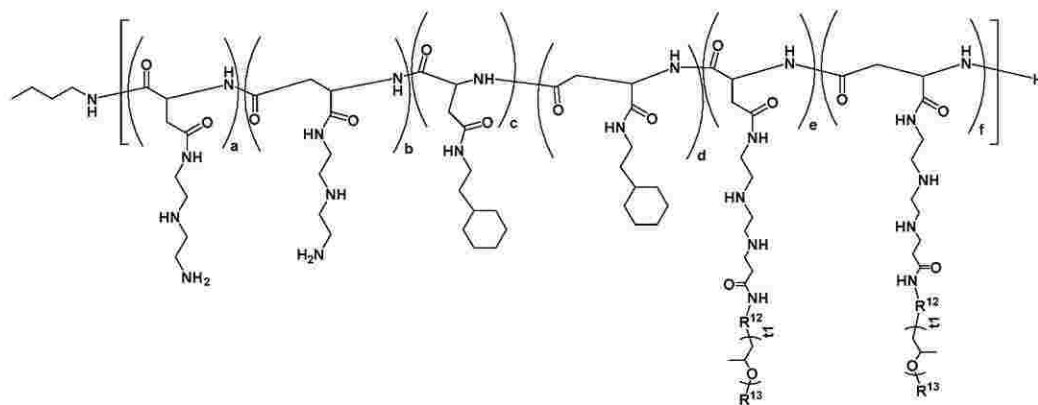
50

【化 1 7】



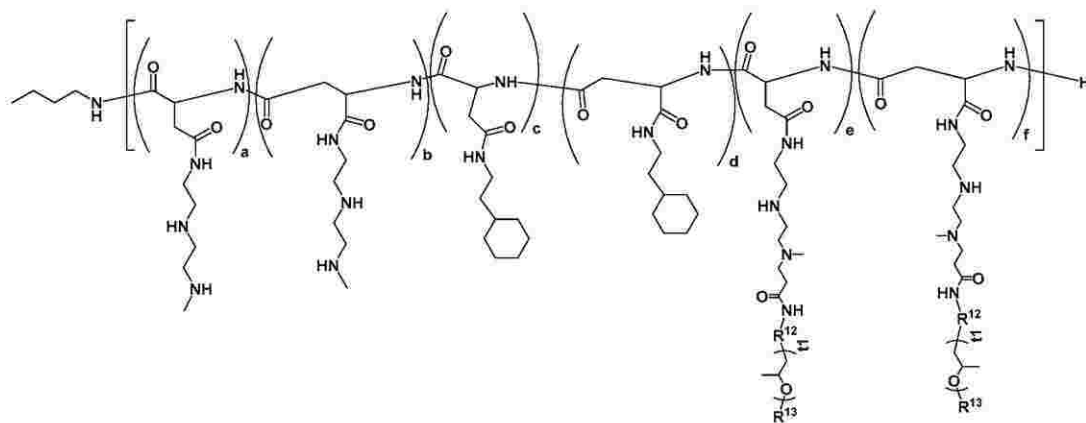
10

ポリマー 22



20

ポリマー 23



30

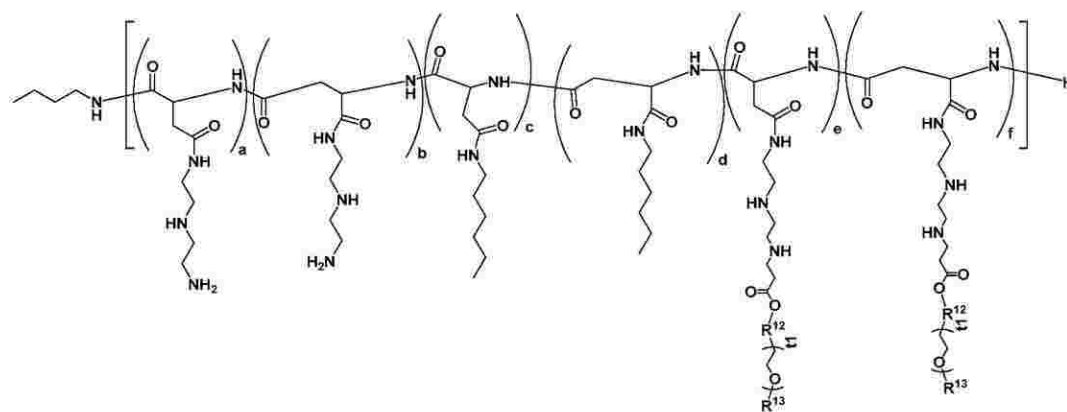
ポリマー 24

40

【 0 0 9 9 】

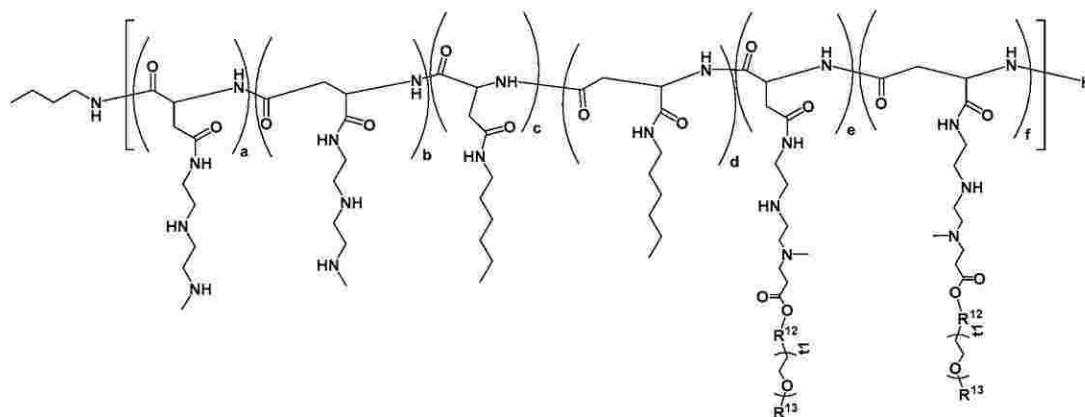
50

【化 1 8】



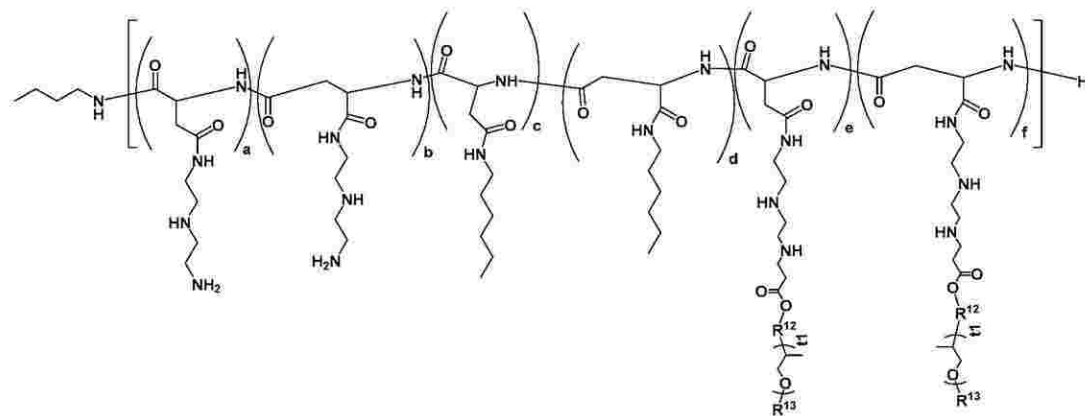
10

ポリマー 25



20

ポリマー 26



30

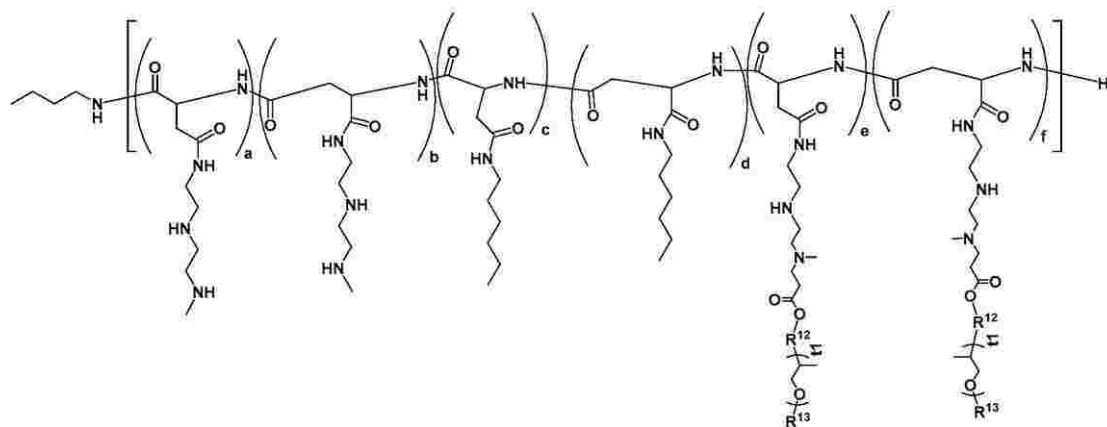
ポリマー 27

40

【 0 1 0 0】

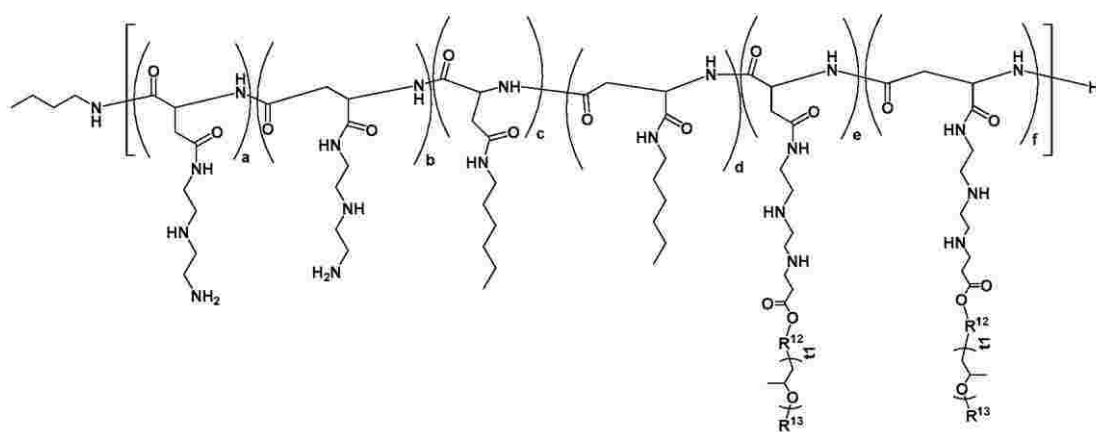
50

【化 1 9】



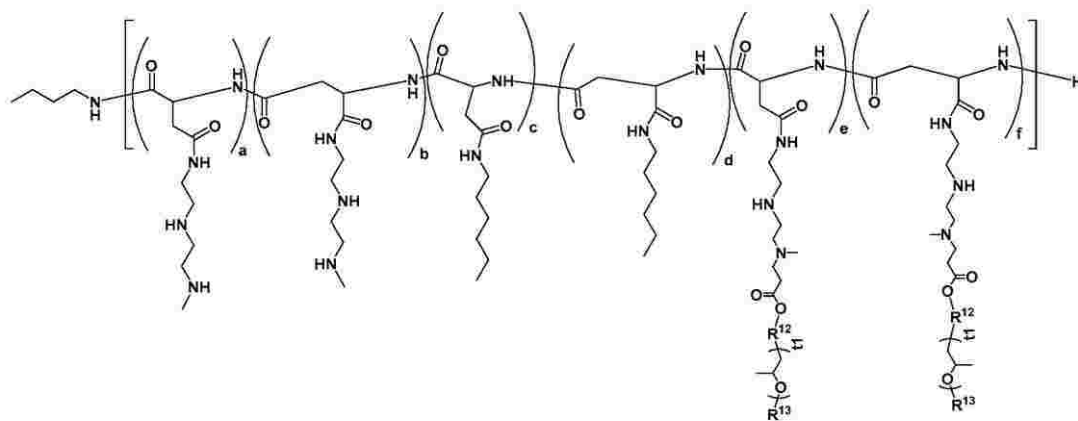
10

ポリマー 28



20

ポリマー 29



30

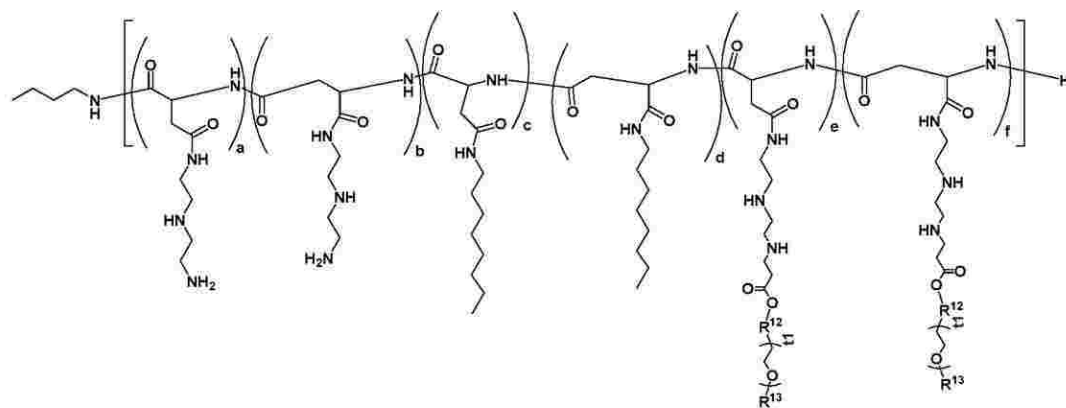
ポリマー 30

40

【 0 1 0 1】

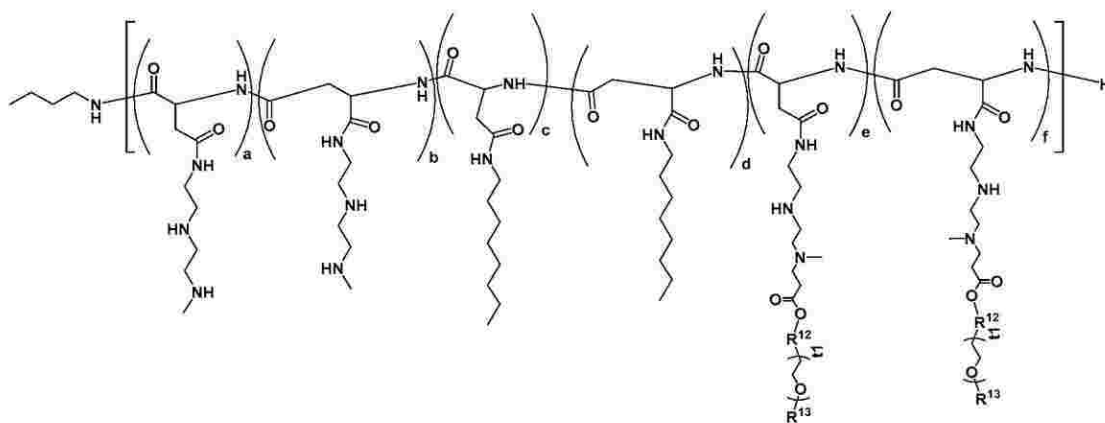
50

【化 2 0】



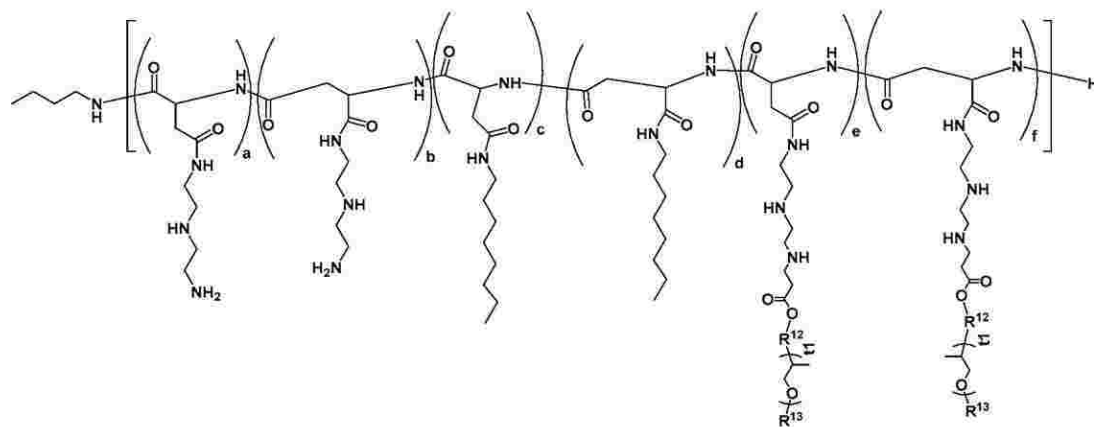
10

ポリマー 31



20

ポリマー 32



30

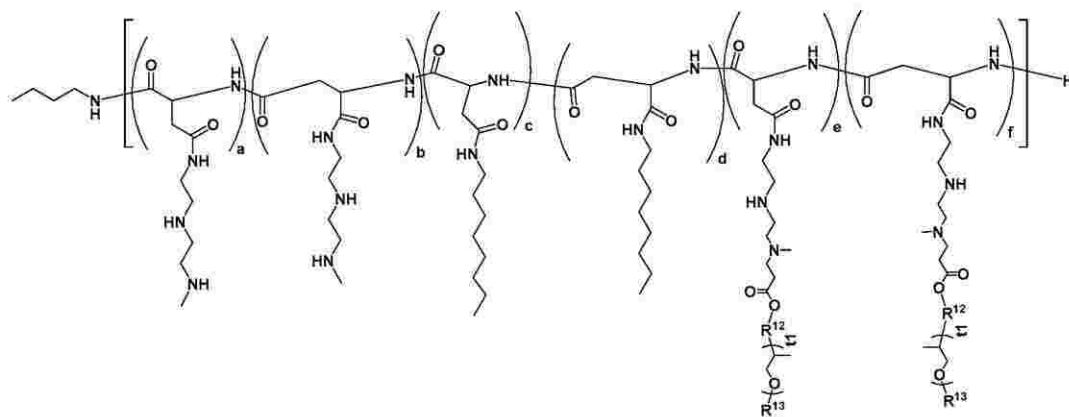
ポリマー 33

40

【 0 1 0 2】

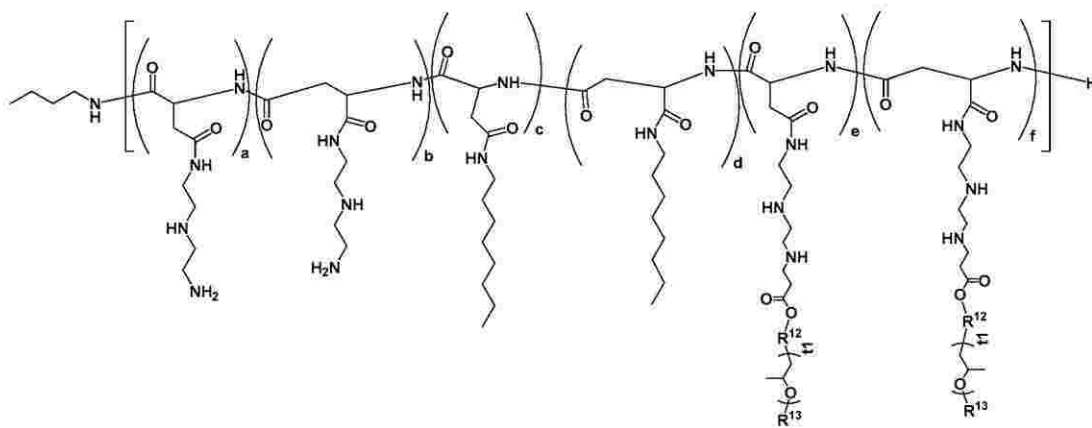
50

【化 2 1】



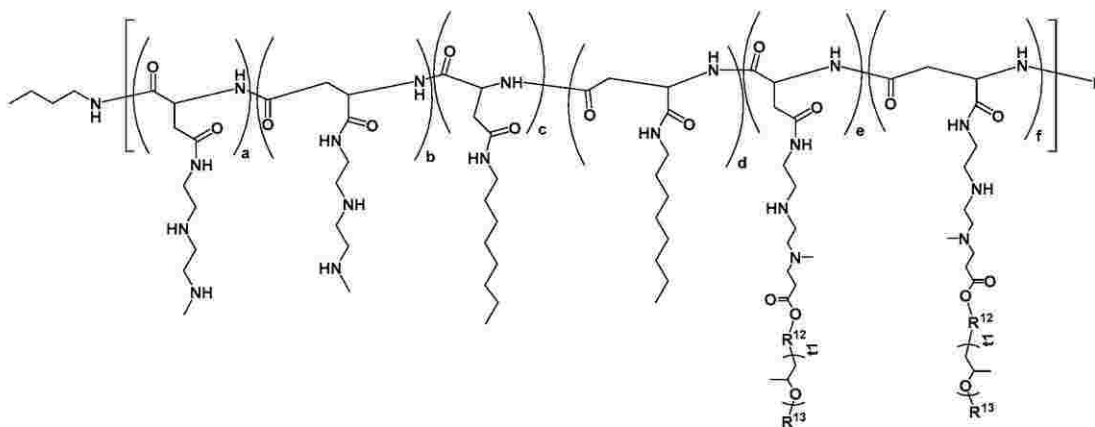
10

ポリマー 34



20

ポリマー 35



30

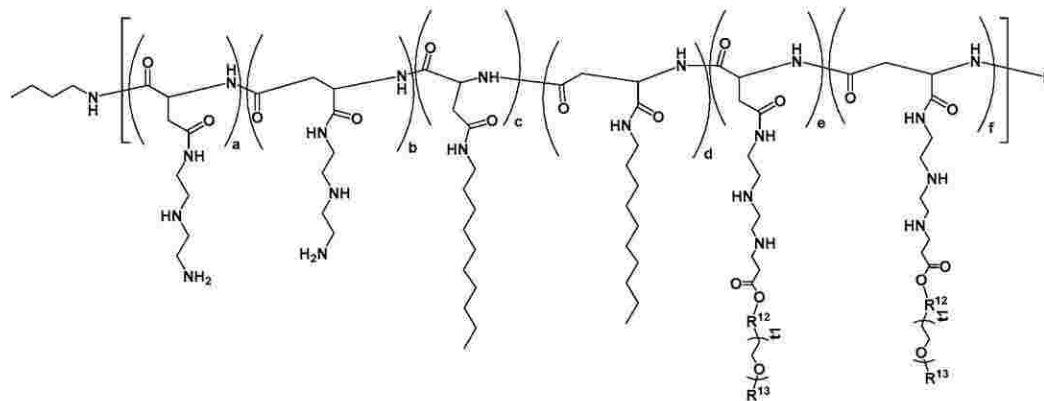
ポリマー 36

40

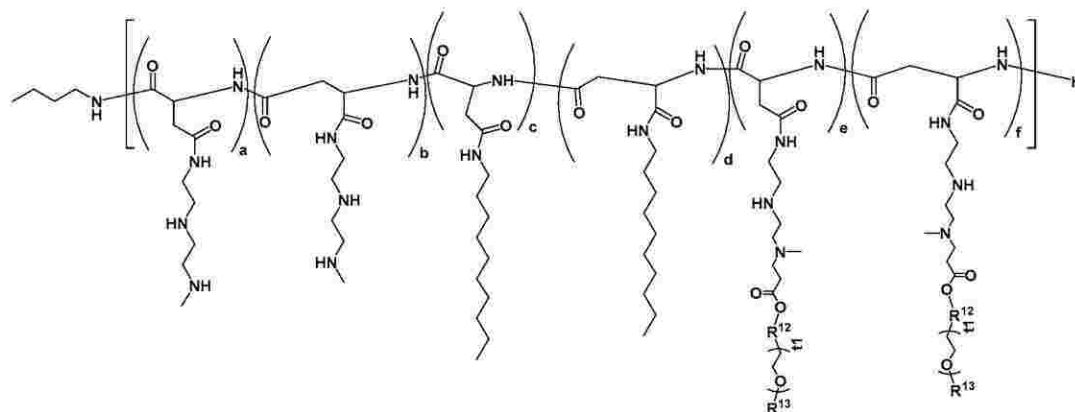
【 0 1 0 3】

50

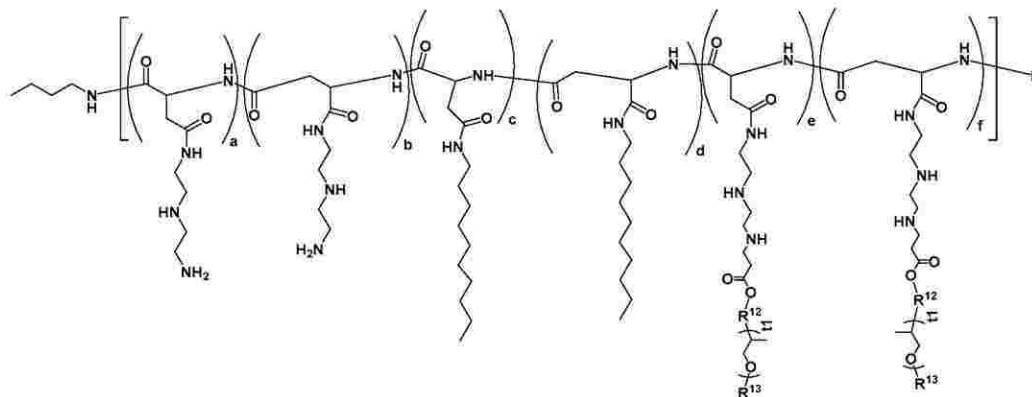
【化 2 2】



ポリマー 37



ポリマー 38



ポリマー 39

【 0 1 0 4】

10

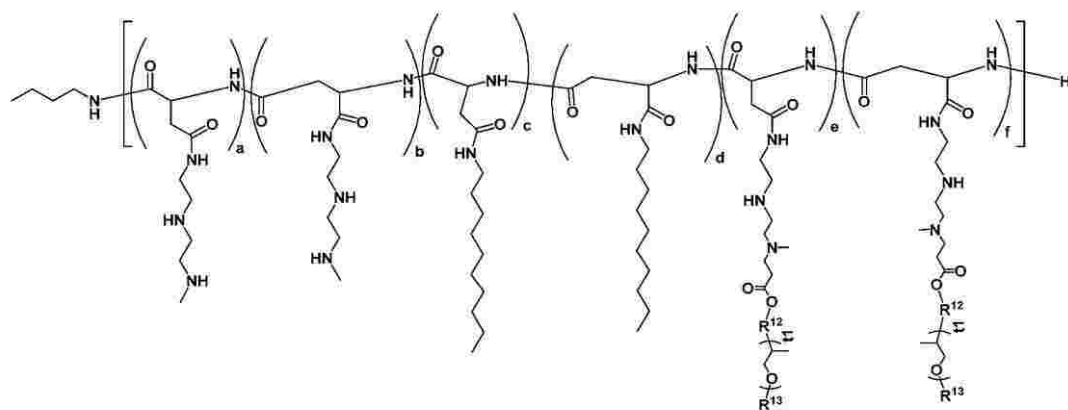
20

30

40

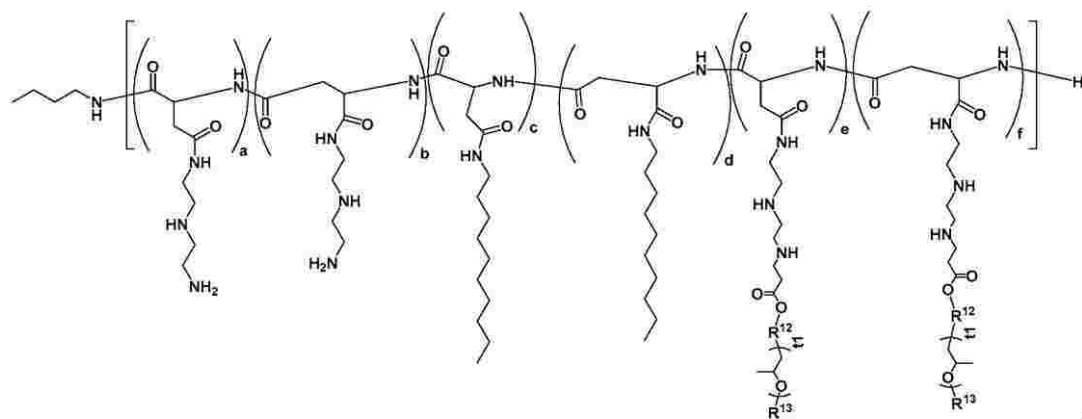
50

【化 2 3】



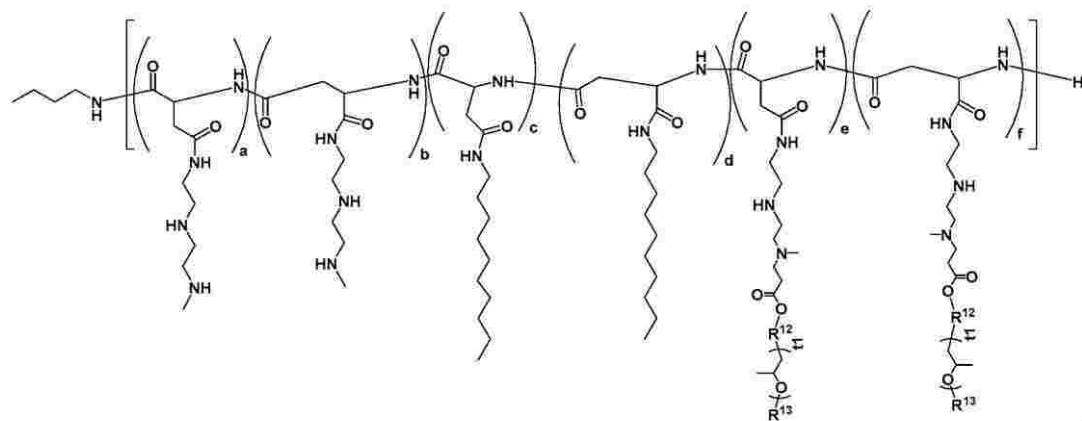
10

ポリマー 40



20

ポリマー 41



30

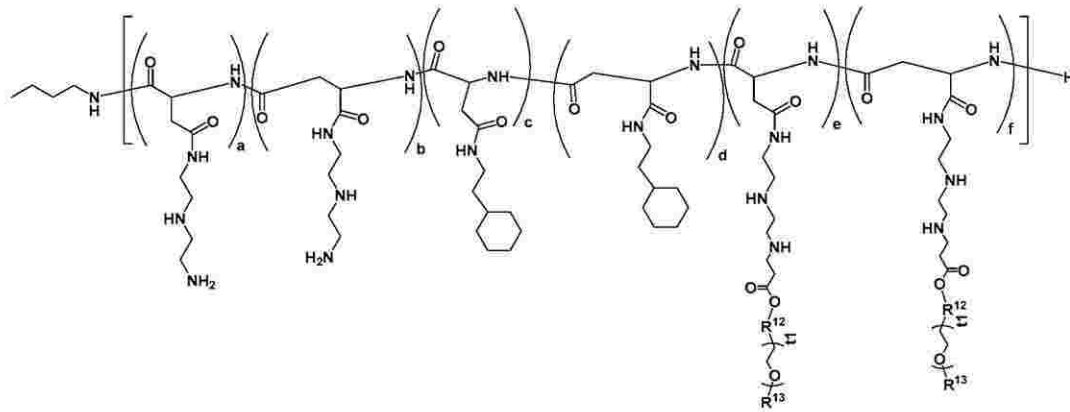
ポリマー 42

40

【 0 1 0 5】

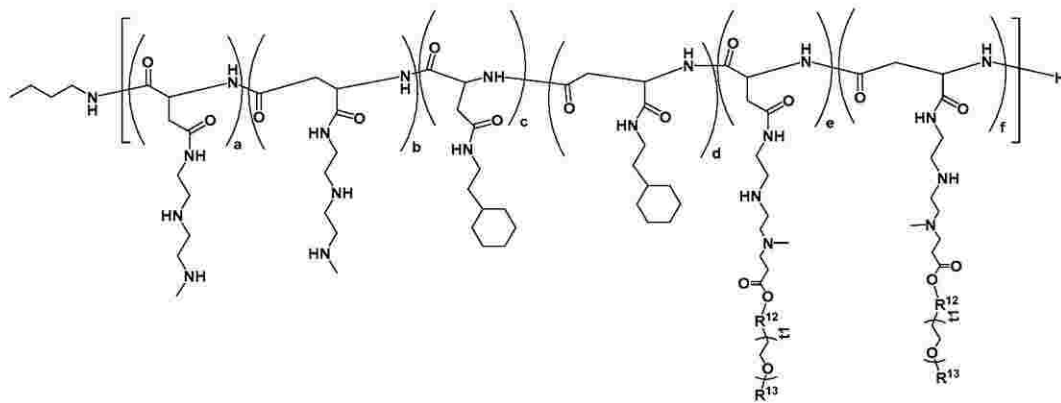
50

【化 2 4】



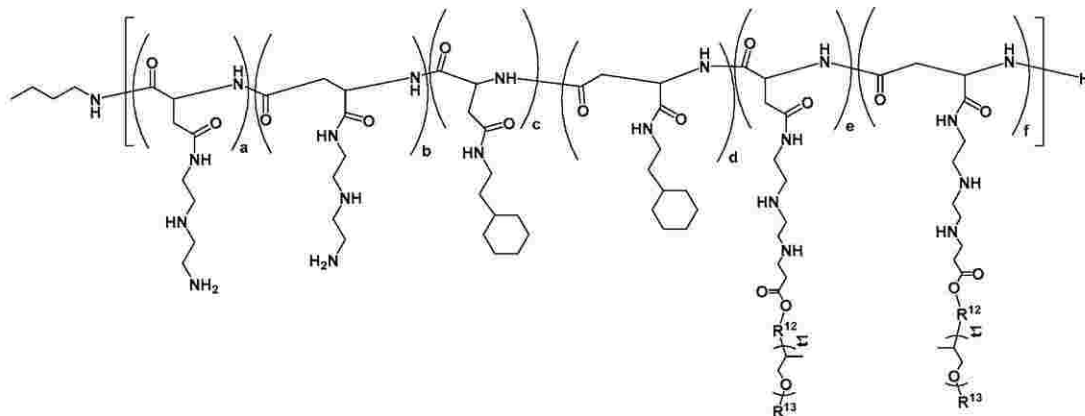
10

ポリマー 43



20

ポリマー 44



30

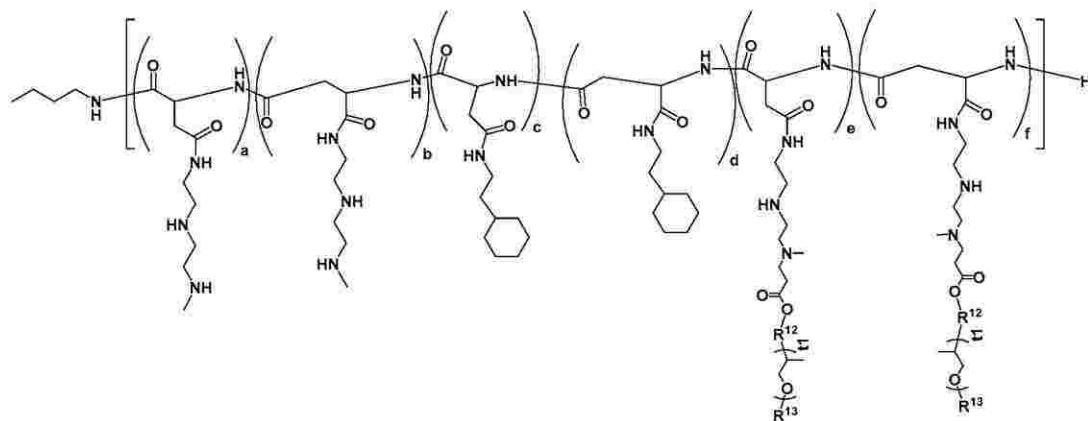
ポリマー 45

【 0 1 0 6】

40

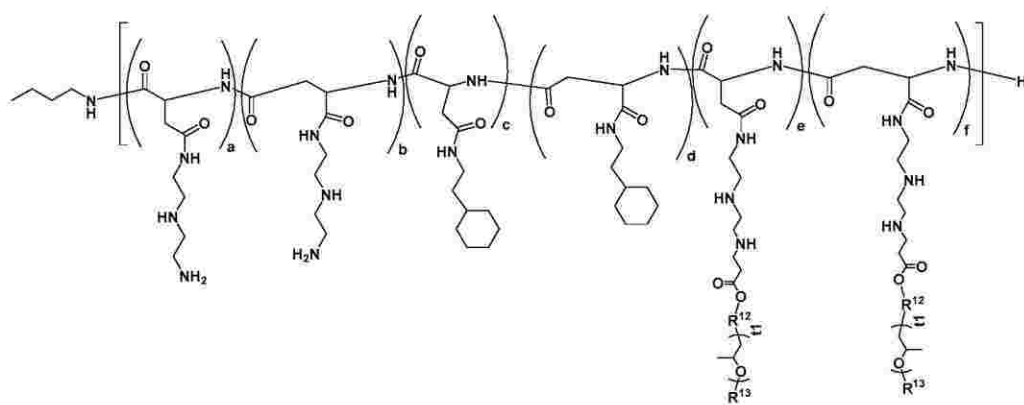
50

【化 2 5】



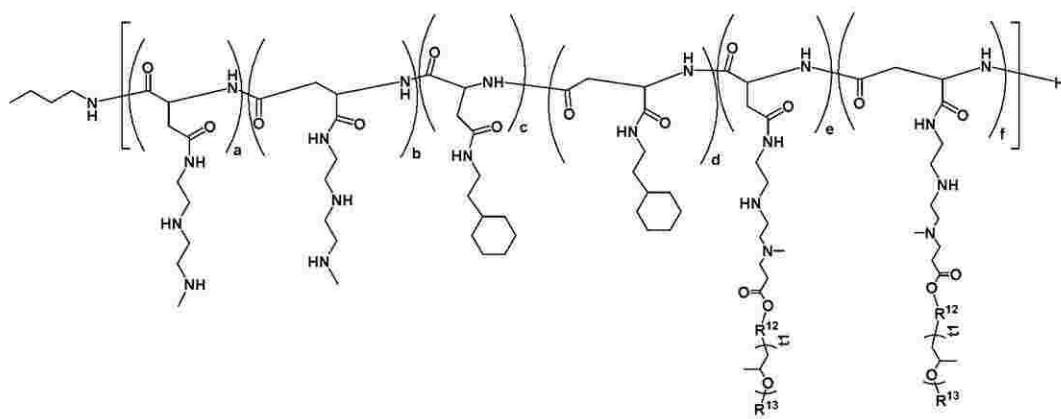
10

ポリマー 46



20

ポリマー 47



30

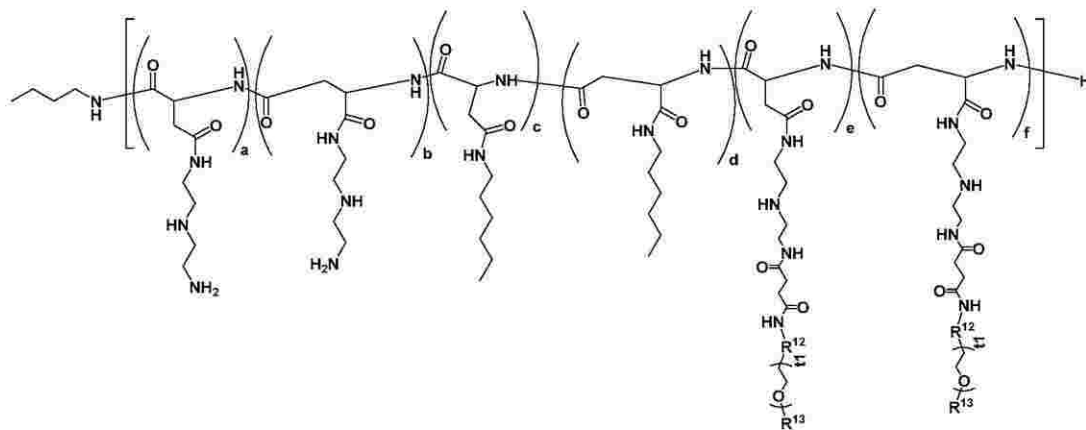
ポリマー 48

40

【 0 1 0 7 】

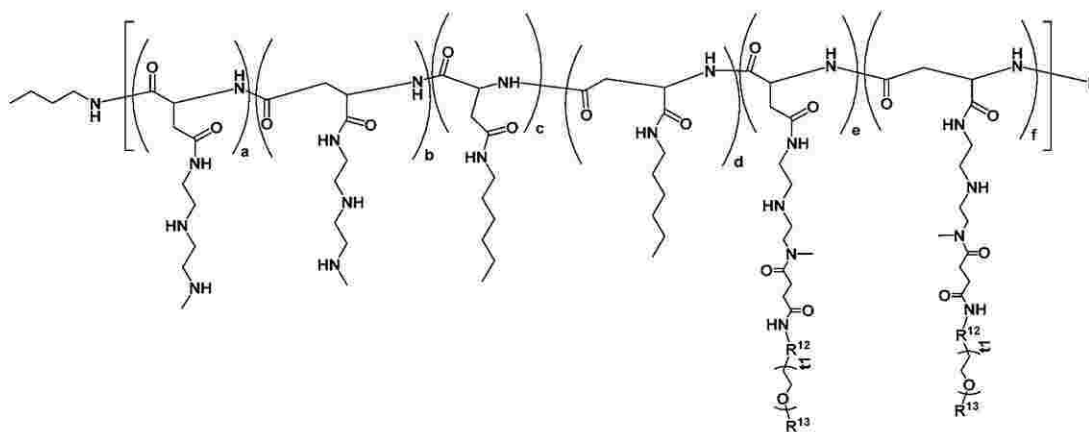
50

【化 2 6】



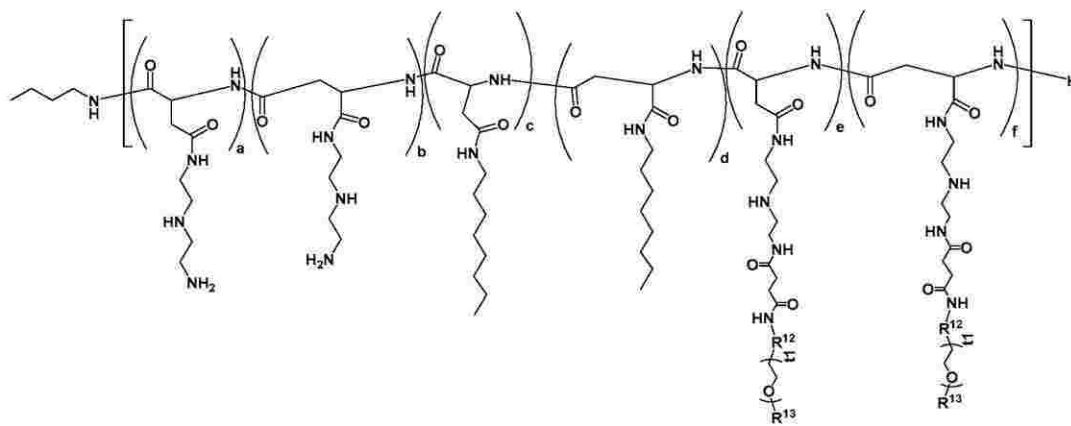
10

ポリマー 49



20

ポリマー 50



30

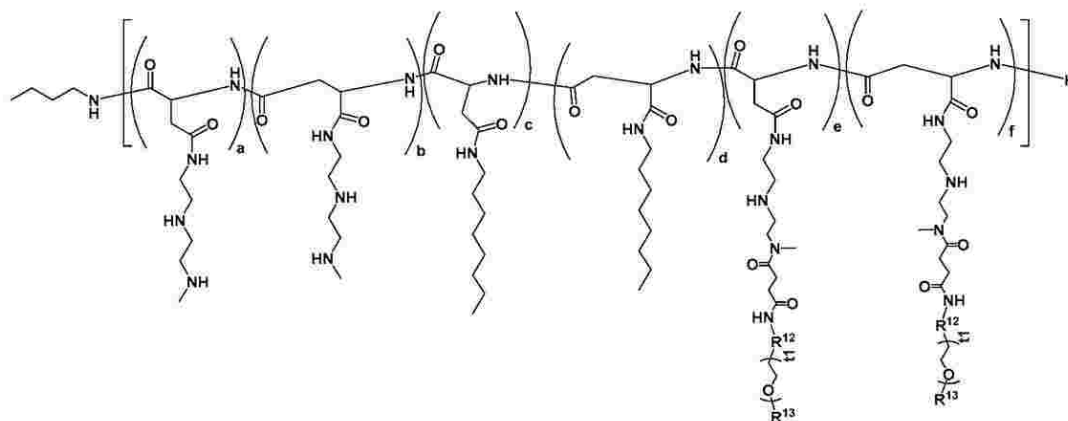
ポリマー 51

40

【 0 1 0 8】

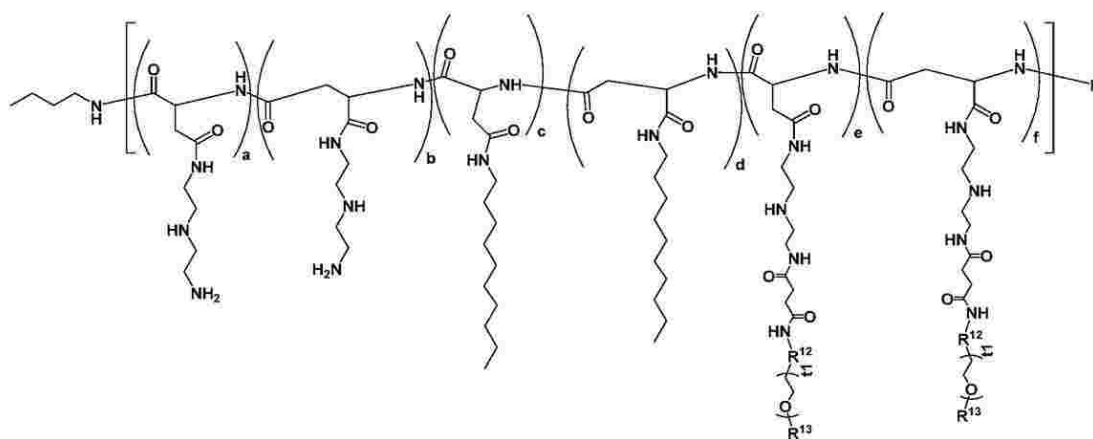
50

【化 2 7】



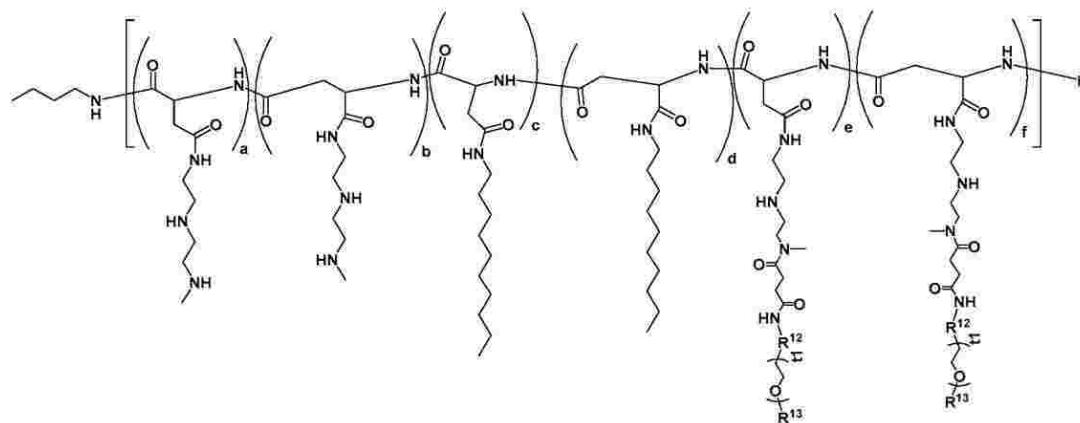
10

ポリマー 52



20

ポリマー 53



30

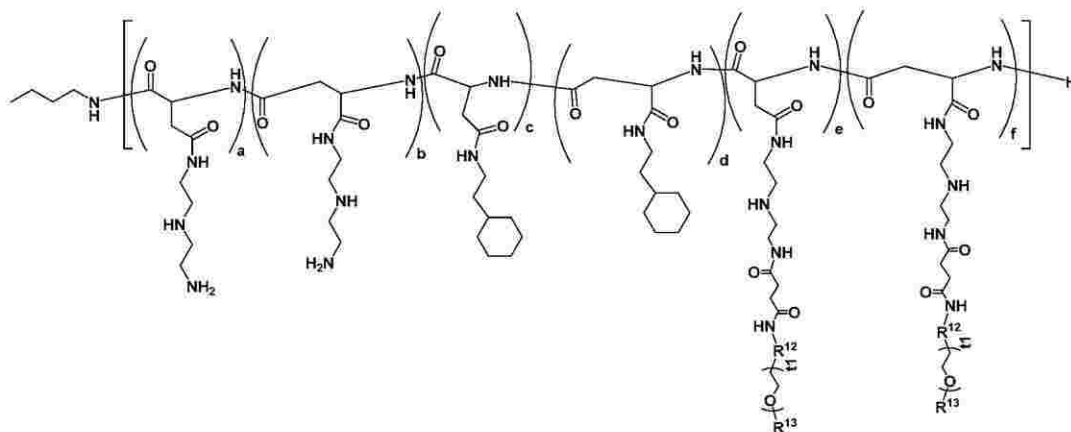
ポリマー 54

40

【 0 1 0 9 】

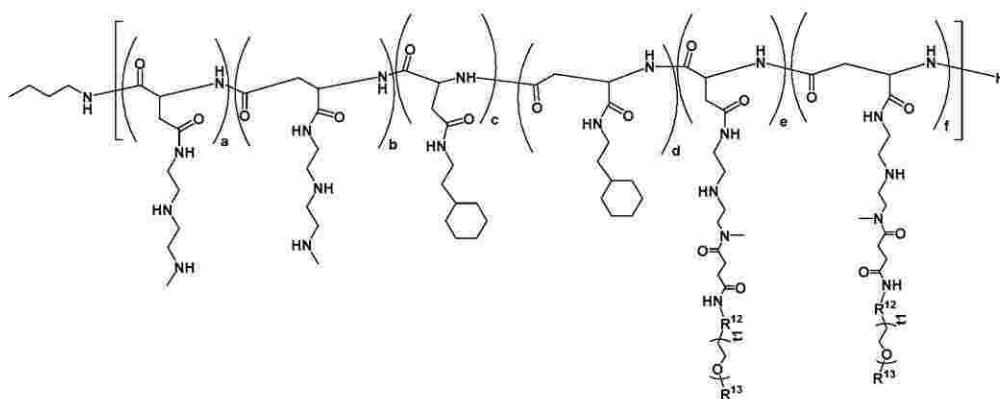
50

【化 2 8】



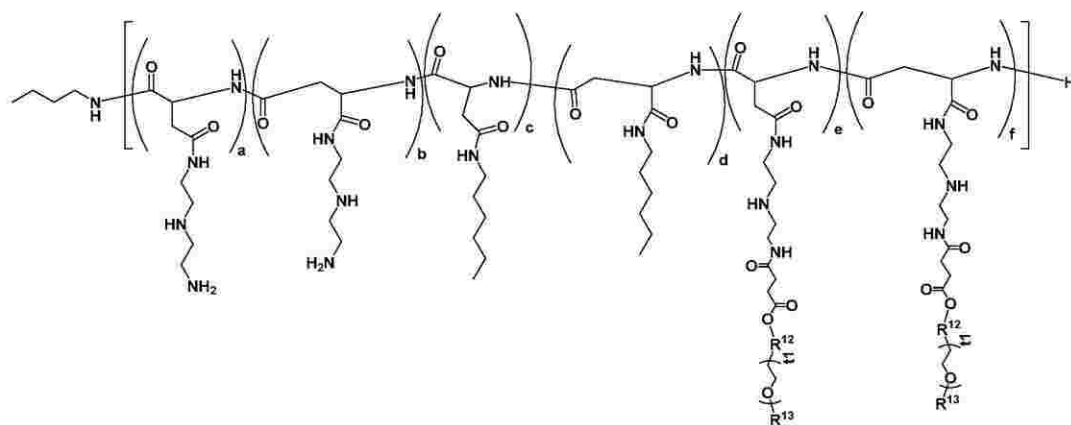
10

ポリマー 55



20

ポリマー 56



30

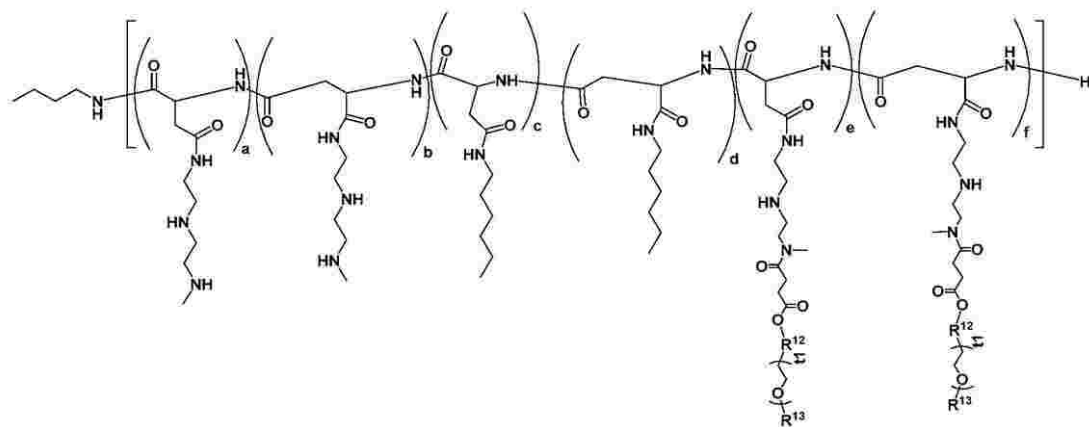
ポリマー 57

40

【 0 1 1 0 】

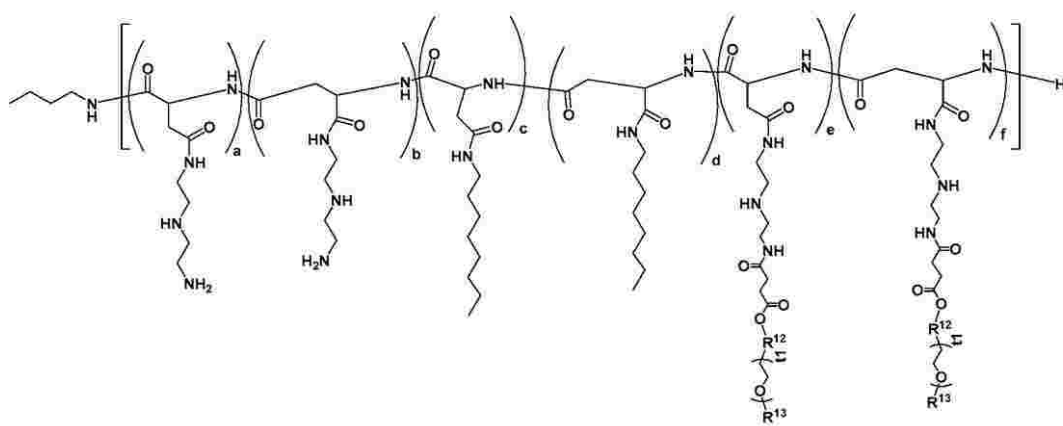
50

【化 2 9】



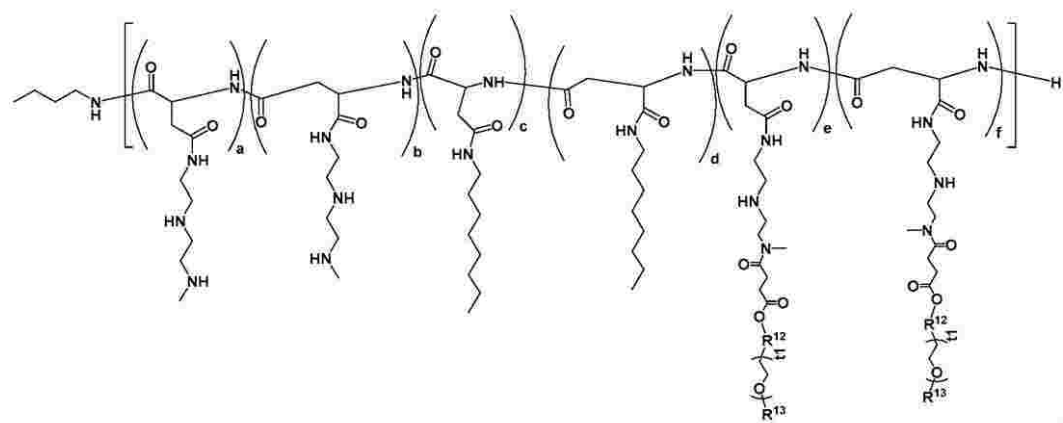
10

ポリマー 58



20

ポリマー 59



30

ポリマー 60

40

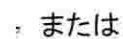
【 0 1 1 1 】

50

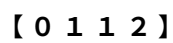
10



30



40

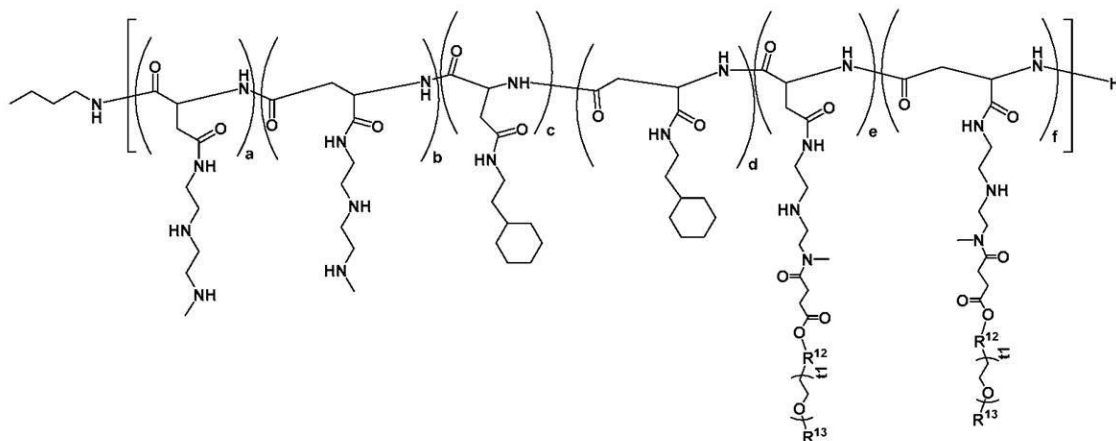


・ または

ポリマー-63

[0 1 1 2]

【化 3 1】



ポリマー 64

【0113】

式中、 R^{12} は結合あるいはメチレン、エチレンまたはプロピレン基(例えば、エチレン)であり; R^{13} は水素、アリール基(例えば、 C_6-C_{12} アルキル基)、複素環基(例えば、 C_2-C_{12} 複素環基)、アルキル基(例えば、 C_1-C_{12} アルキル基)、アルケニル基(例えば、 C_2-C_{12} アルケニル基)、シクロアルキル基(例えば、 C_3-C_{12} シクロアルキル基)、またはシクロアルケニル基(例えば、 C_3-C_{12} シクロアルケニル基)であり、これらのいずれかは1個以上の置換基、必要に応じて水素または C_1-C_3 アルキル基で置換されていてもよく;および t_1 は2~200(例えば、2~150、2~100、2~50、10~200、10~150、10~100、10~50、25~200、25~150、25~100、25~50、50~200、50~150、または50~100)の整数である、を含む。いくつかの実施態様において、 R^{12} はエチレン基などの C_1-C_3 アルキルである。いくつかの実施態様において、 R^{13} はメチルである。いくつかの実施態様において、 t_1 は20-80(例えば、30-60または25-50)である。

【0114】

これらの例示ポリマー中の単位の数の表示(「a」、「b」、「c」、「d」、「e」、および「f」)は、ブロックコポリマー構造を意味せず;むしろ、これらの数は特定のモノマー単位全体の数を示し、この単位は任意の順序で配置され得、モノマーのブロックまたはポリマー全体にランダムに配置されたモノマーを含む。ある場合、全てではないが、これは式中の「/」記号によってさらに示され;しかし、「/」の不在はポリマーが特定の順序で結合されていると解釈されるべきではない。前述のポリマー1-64のいくつかの実施態様において、括弧および整数(「a」、「b」、「c」、「d」、「e」、または「f」)で指定されるモノマーは、ポリマー全体にわたってランダムに配置されるかまたは分散される。

【0115】

前述の例示ポリマーにおいて、式1および1A-1C中、「a」、「b」、「e」、および「f」はそれぞれ m_1 、 m_2 、 m_3 、および m_4 について定義した通りであり;そして「c」および「d」はそれぞれ n_1 、および n_2 について定義した通りである。従って、a、b、e、およびfのそれぞれは0~1000(例えば、0~500、0~200、0~100、または0~50)の整数であり、但し $a + b + e + f$ の合計は2よりも大きく、例えば2-5000、2-2000、2-1000、2-500、2-100、または2-50であり、そして $c + d$ の合計は少なくとも1(例えば、1-2000、1-1000、1-500、1-200、1-100、1-50、1-25、2-2000、2-1000、2-500、2-200、2-100、2-50、または2-25)である。いくつかの実施態様において、 $a + b + e + f$ の合計は5よりも大きい(例えば、5-5000、5-2000、5-1000、5-500、5-100、または5-50;または10-5000、10-2000

、10-1000、10-500、10-100、または10-50)。いくつかの実施態様において、 $a + b + e + f$ は約10-50または20-40である。さらに、 c および d のそれぞれは0~1000(例えば、0~500、0~200、0~100、0~50、または0~25)の整数であり、但し $c + d$ の合計は少なくとも1(例えば、1-2000、1-1000、1-500、1-200、1-100、1-50、1-25、2-2000、2-1000、2-500、2-200、2-100、2-50、または2-25)である。いくつかの実施態様において、 $c + d$ の合計は5よりも大きいかまたは10よりも大きい(例えば、5-2000、5-1000、5-500、5-200、5-100、5-50、または5-25;または10-2000、10-1000、10-500、10-200、10-100、10-50、または10-25)。いくつかの実施態様において、 $c+d$ の合計は約20-50または20-40である。特定の実施態様において、 $a + b + e + f$ は約20-50または20-40であり、そして $c+d$ の合計は約10-50または20-40である。

10

【0116】

ポリマーは、式1および1A-1Cに関して先に記載した任意の適切な重合度(例えば、 $m_1 + m_2 + m_3 + m_4 + n_1 + n_2$ の合計、または該当する場合、 $a+b+c+d+e+f$ の合計)を有し得る。ある場合、ポリマーは約10以上、または約20以上(例えば、約20~約1000、または約20~約100、または約20~約65、または約20~64)の重合度($a+b+c+d+e+f$)を有する。ある場合、ポリマーは約50以上(例えば、約50~約1000、または約50~約500、または66~約200)の重合度を有する。いくつかの実施態様において、($a+b+c+d+e+f$)は約10-500、例えば約10-400、約10-200、または約10-100(例えば、約25-100または約50-75)である。

20

【0117】

いくつかの実施態様において、($a+b+e+f$)は5よりも大きいかまたは10よりも大きい(例えば、5-5000、5-2000、5-1000、5-500、5-100、または5-50;または10-5000、10-2000、10-1000、10-500、10-100、または10-50)である。いくつかの実施態様において、($a+b+e+f$)は約10-50、10-30、または20-40である。

【0118】

いくつかの実施態様において、($c+d$)は少なくとも1(例えば、1-2000、1-1000、1-500、1-200、1-100、1-50、1-25、2-2000、2-1000、2-500、2-200、2-100、2-50、または2-25)である。いくつかの実施態様において、($c+d$)は5よりも大きいかまたは10よりも大きい(例えば、5-2000、5-1000、5-500、5-200、5-100、5-50、または5-25;または10-2000、10-1000、10-500、10-200、10-100、10-50、または10-25)である。いくつかの実施態様において、($c+d$)は約20-50または20-40である。

30

【0119】

いくつかの実施態様において、($a+b+e+f$)は約5~約65(例えば、約5~約50、約5~約40、約5~約30、約5~約20、または約5~約10)であり、そして($c+d$)は約2~約60(例えば、約2~約50、約2~約40、約2~約30、約2~約20、または約2~約10)である。いくつかの実施態様において、($a+b+e+f$)は約15-30、例えば約15-20または20-30であり、そして($c+d$)は約30-60、例えば約30-50または35-50)である。いくつかの実施態様において、($a+b+e+f$)は約55であり、そして($c+d$)は約10である。他の実施態様において、($a+b+e+f$)は約45であり、そして($c+d$)は約20である。

40

【0120】

ポリマーは任意の適切な割合の($a+b$)、($e+f$)、および($c+d$)を含み得る。いくつかの実施態様において、($a+b+e+f$)はポリマー単位($a+b+c+d+e+f$)の総数の10-95%(例えば、10-75%、10-65%、10-50%、20-95%、20-75%、20-65%、20-50%、30-95%、30-75%、30-65%、または30-50%)の範囲に及ぶ。他の実施態様において、($c+d$)はポリマー単位($a+b+c+d+e+f$)の総数の5-90%(例えば、5-75%、5-65%、5-50%、5-40%、5-30%、10-90%、10-75%、10-65%、10-50%、10-40%、または10-30%)の範囲に及ぶ。

【0121】

50

いくつかの実施態様において、 $(a+b+e+f):(c+d)$ の比は約25以下(例えば、約10以下、約5以下、約3以下、または約2以下)、および必要に応じて、約0.1以上、または約0.2以上(例えば、約0.3以上、0.4以上、0.5以上、0.6以上、0.7以上、または約1以上)であり得る。例えば、いくつかの実施態様において、 $(a+b+e+f):(c+d)$ の比は約0.1～約1、約0.1～約0.5、または約0.5～約1であり得る。他の実施態様において、 $(a+b+e+f):(c+d)$ の比は約0.3～約25、約0.3～約20、約0.3～約10、約0.3～約5、約0.3～約3、約0.3～約2であり得る。さらに他の実施態様において、 $(a+b+e+f):(c+d)$ の比は約1～約25、約1～約20、約1～約10、約1～約5、約5～約25、約10～約25、または約15～約25であり得る。特定の実施態様において、 $(a+b+e+f):(c+d)$ の比は約0.5-2または約1-2である。

10

【0122】

前述のポリマー配置のいずれかと共に、ポリマーは $(a+b):(e+f)$ の任意の適切な比を有し得る。いくつかの実施態様において、 $(a+b):(e+f)$ の比は約0.1以上、または約0.2以上、例えば約0.5以上、またはさらに1以上(例えば、1.5以上、2以上、2.5以上、3以上、3.5以上、4以上、または5以上)である。いくつかの実施態様において、 $(a+b):(e+f)$ の比は約20以下(例えば、約10以下、約5以下、約2以下、またはさらに約1以下、例えば約0.5以下または0.2以下)である。他の実施態様において、 $(a+b):(e+f)$ の比は1未満(例えば、0.75以下、0.5以下、または0.25以下)である。特定の実施態様において、 $(a+b):(e+f)$ の比は約0.5～5、例えば約0.5-3または約1-4である。

【0123】

PEG-含有側鎖 $(e+f)$ の量はまた、モノマーの総数の百分率 $((e+f)/(a+b+c+d+e+f) \times 100)$ として表され得る。いくつかの実施態様において、 $(e+f)$ はモノマーの総数の約5%以上(例えば、約10%以上、または約15%以上)である。いくつかの実施態様において、 $(e+f)$ はモノマーの総数の約50%以下(例えば、約40%以下、または30%以下)である。いくつかの実施態様において、 $(e+f)$ は約5-50%、5-40%、5-30%、5-20%、10-50%、10-40%、10-30%、10-20%、15-50%、15-40%、または15-30%である。重合度は上記の通りであり得るが、いくつかの実施態様において、重合度は約25-100、例えば約25-50(例えば、約20-45)または約50-100(例えば、約55-75)である。他のモノマーの相対量は上記の通りであり得る。

20

【0124】

本開示によって提供されるポリマーの上記特定例のいくつかは、特定の末端基(例えば、アルキルアミノまたは水素)を持って表現される;しかし、前述の特定構造のいずれかは異なる末端基を含み得る。例えば、前述の構造のいずれかは、本明細書中に記載の R^1 、 R^6 、または Q の基をポリマー骨格のいずれかの末端または両末端に含み得る。従って、本明細書中、ポリマー1-64のいずれかの構造を含むポリマーが提供され、ここで末端水素は式1A-1Cのいずれかに関して定義した R^1 で置換され、および/または末端アルキルアミノは式1Aの基 Q または式1Bの基-NHR⁶で置換される。

30

【0125】

いくつかの実施態様において、ポリマーはカチオン性(すなわち、pH 7および23℃で正に帯電)である。本明細書中で使用される「カチオン性」ポリマーは、ポリマーがカチオン性モノマー単位のみまたはカチオン性モノマー単位と非イオン性またはアニオン性モノマー単位との組み合わせを含むかどうかにかかわらず、全体として正味の正電荷を有するポリマーをいう。

40

【0126】

いくらかの実施態様において、ポリマーは約5 kDa～約2,000 kDaの重量平均分子量を有する。ポリマーは約2,000 kDa以下、例えば、約1,800 kDa以下、約1,600 kDa以下、約1,400 kDa以下、約1,200 kDa以下、約1,000 kDa以下、約900 kDa以下、約800 kDa以下、約700 kDa以下、約600 kDa以下、約500 kDa以下、約100 kDa以下、または約50 kDa以下の重量平均分子量を有し得る。あるいは、またはさらに、ポリマーは約10 kDa以上、例えば、約50 kDa以上、約100 kDa以上、約200 kDa以

50

上、約300 kDa以上、または約400 kDa以上の重量平均分子量を有し得る。従って、ポリマーは前述の端点の任意の2つによって囲まれる重量平均分子量を有し得る。例えば、ポリマーは約10 kDa～約50 kDa、約10 kDa～約100 kDa、約10 kDa～約500 kDa、約50 kDa～約500 kDa、約100 kDa～約500 kDa、約200 kDa～約500 kDa、約300 kDa～約500 kDa、約400 kDa～約500 kDa、約400 kDa～約600 kDa、約400 kDa～約700 kDa、約400 kDa～約800 kDa、約400 kDa～約900 kDa、約400 kDa～約1,000 kDa、約400 kDa～約1,200 kDa、約400 kDa～約1,400 kDa、約400 kDa～約1,600 kDa、約400 kDa～約1,800 kDa、約400 kDa～約2,000 kDa、約200 kDa～約2,000 kDa、約500 kDa～約2,000 kDa、または約800 kDa～約2,000 kDaの重量平均分子量を有し得る。

10

【0127】

重量平均分子量は任意の適切な技術によって決定され得る。一般に、重量平均分子量は、TSKgel Guard、GMPW、GMPW、G1000PW、およびWaters 2414(Waters Corporation、Milford、Massachusetts)屈折率検出器から選ばれる、カラムを備えたサイズ排除クロマトグラフィーを用いて決定される。さらに、重量平均分子量は150-875,000ダルトンの範囲に及ぶポリエチレンオキシド/ポリエチレングリコール標準を用いた校正から決定される。

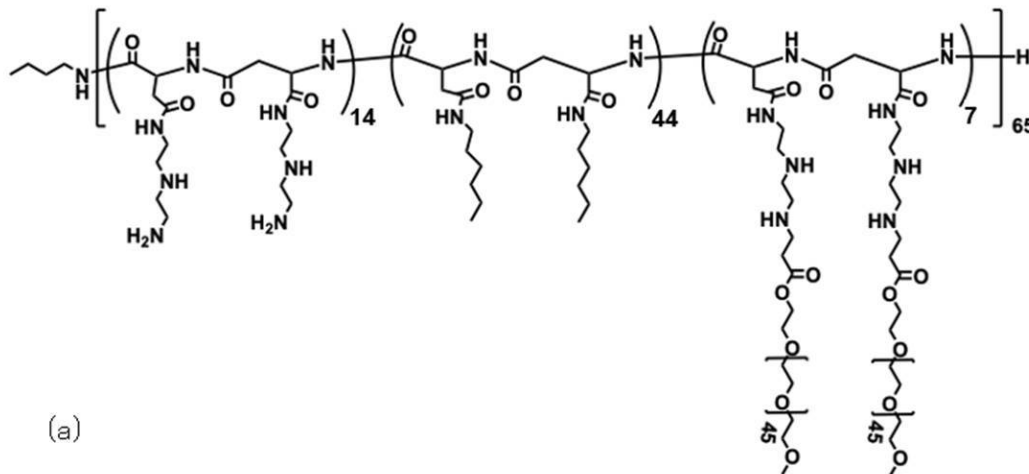
【0128】

ある特定の局面において、本明細書中で提供されるポリマーは、ポリマー(a)-(t)の式を有する：

20

【0129】

【化32】



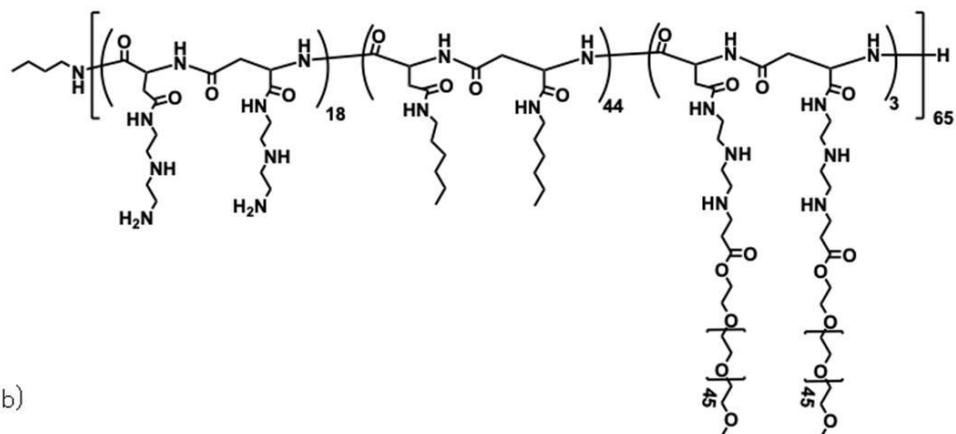
30

【0130】

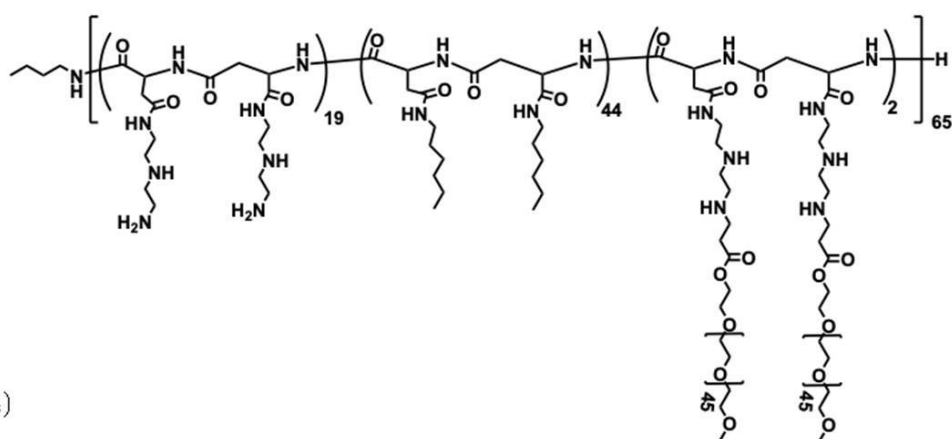
40

50

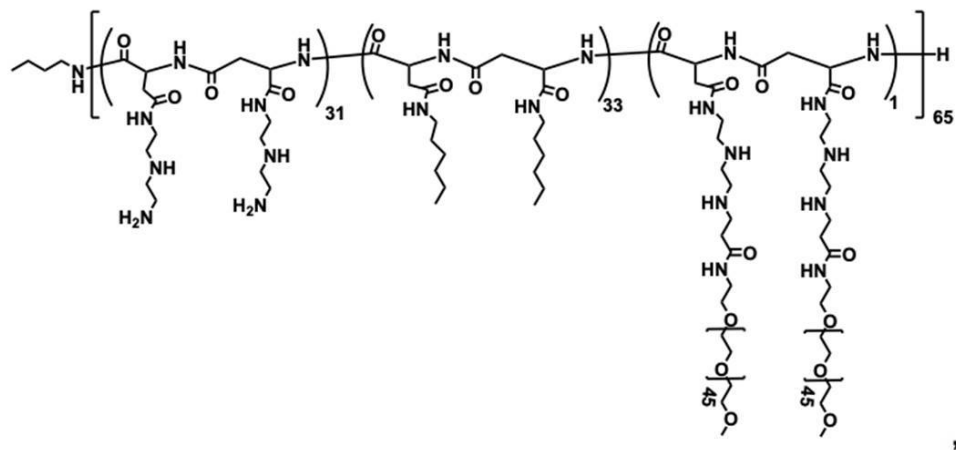
【化 3 3】



10



20



30

40

【 0 1 3 1】

50

[illegible]

2

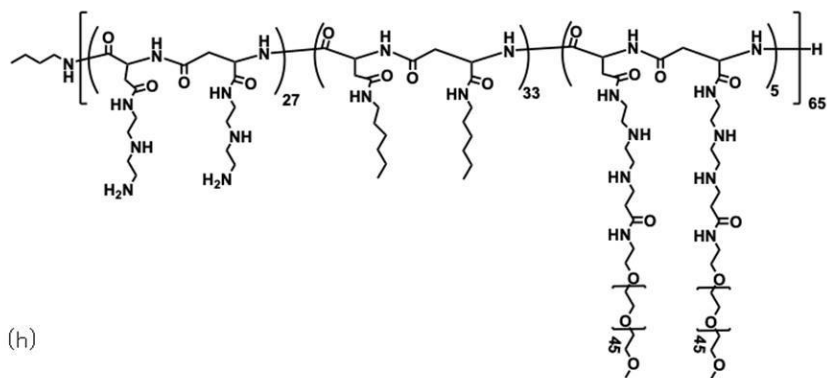
$$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N} \left[\left(\text{NH} \left(\text{CH}_2 \right)_4 \text{NH} \right) \text{CO} \left(\text{CH}_2 \right)_4 \text{CO} \right]_{30} \left(\text{NH} \left(\text{CH}_2 \right)_4 \text{NH} \right) \text{CO} \left(\text{CH}_2 \right)_4 \text{CO} \left[\left(\text{NH} \left(\text{CH}_2 \right)_4 \text{NH} \right) \text{CO} \left(\text{CH}_2 \right)_4 \text{CO} \right]_{33} \left(\text{NH} \left(\text{CH}_2 \right)_4 \text{NH} \right) \text{CO} \left(\text{CH}_2 \right)_4 \text{CO} \left[\left(\text{NH} \left(\text{CH}_2 \right)_4 \text{NH} \right) \text{CO} \left(\text{CH}_2 \right)_4 \text{CO} \right]_2 \text{H} \quad 65$$

1

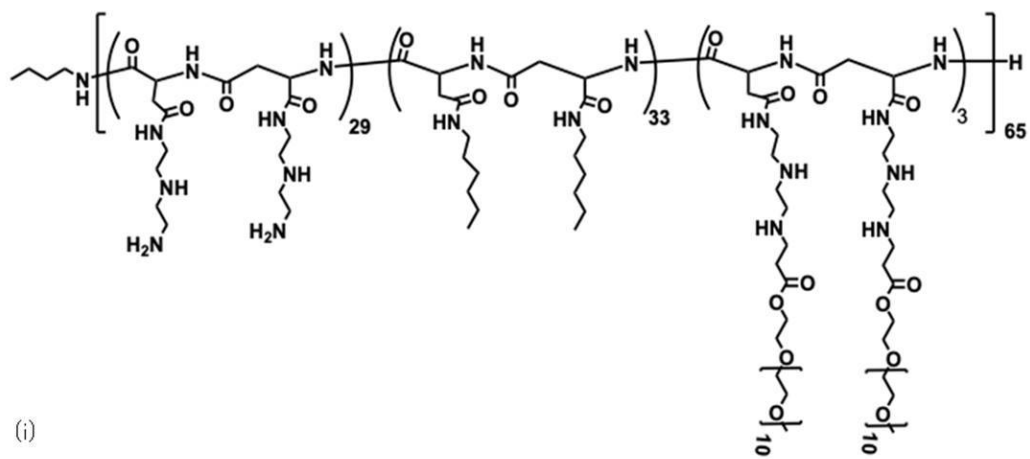
[illegible]

50

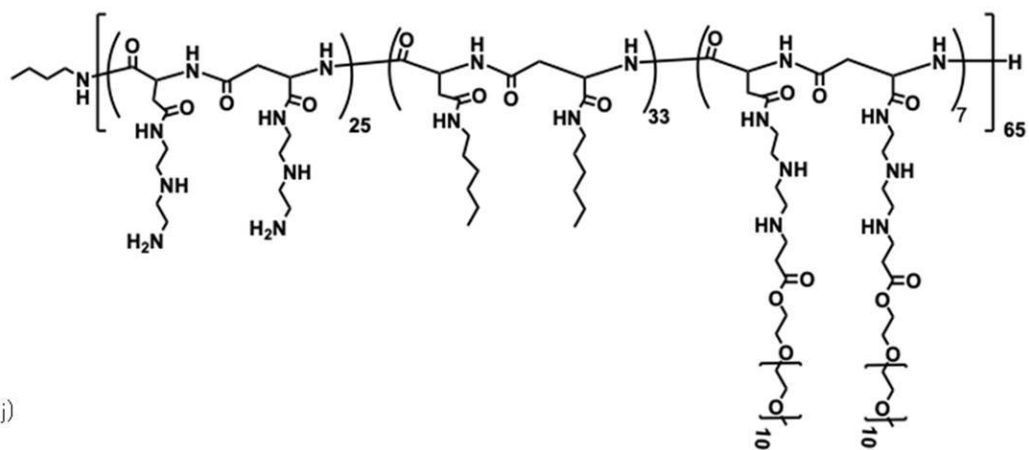
【化 3 5】



10



20



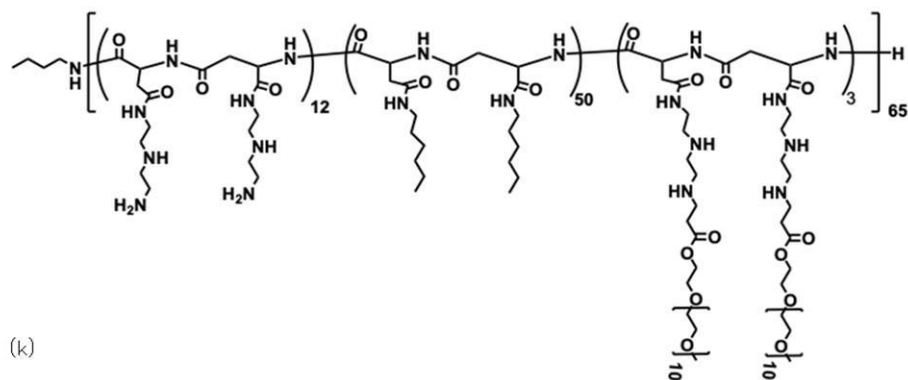
30

40

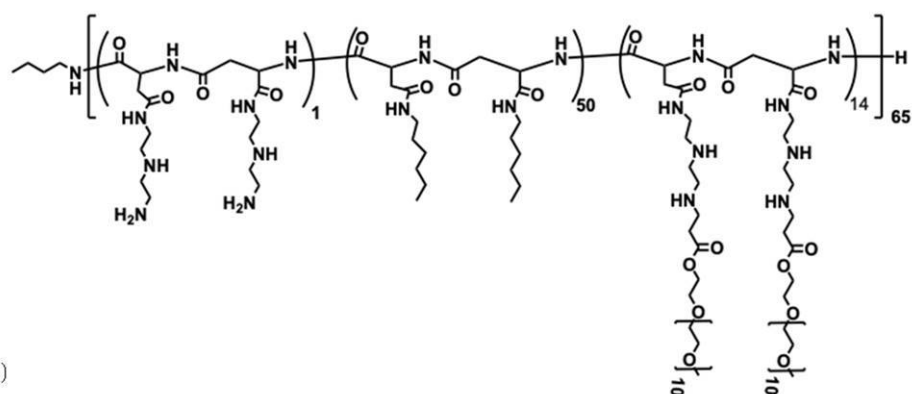
【 0 1 3 3 】

50

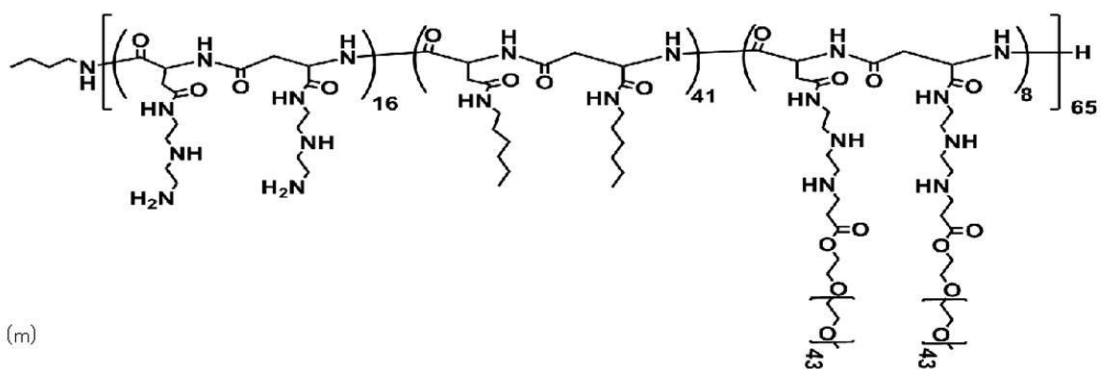
【化 3 6】



10



20



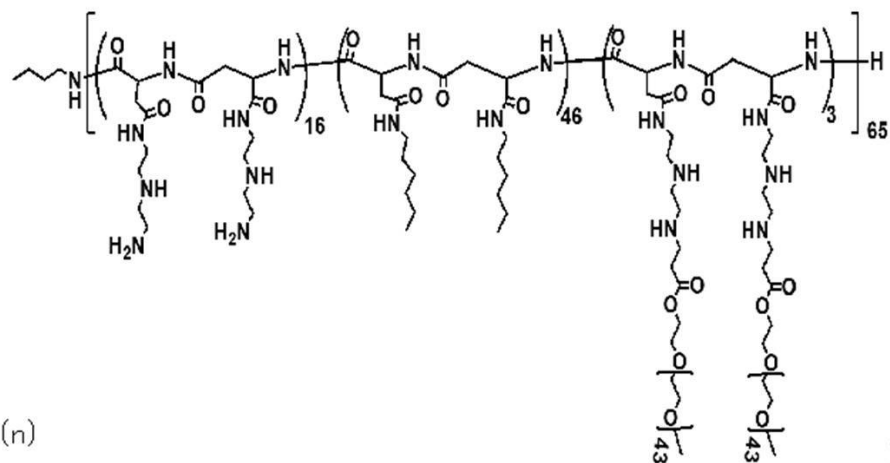
30

【 0 1 3 4 】

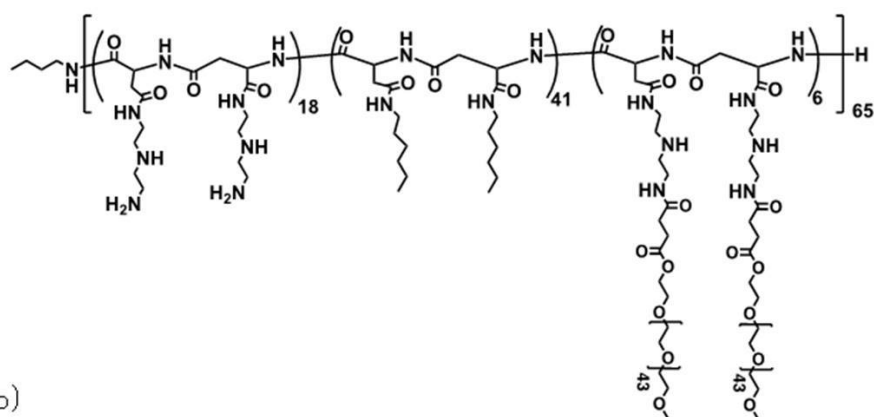
40

50

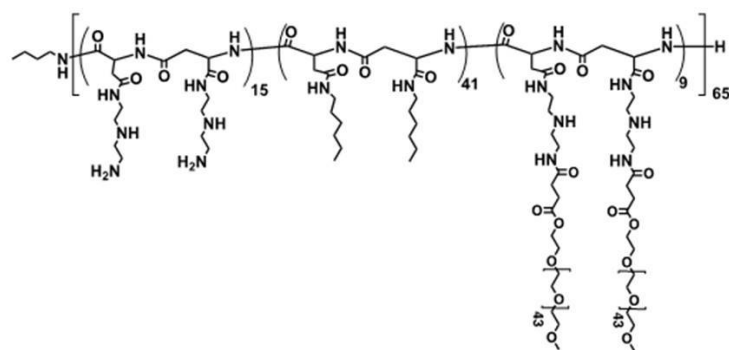
【化 3 7】



(n)



(o)



(p)

【 0 1 3 5】

10

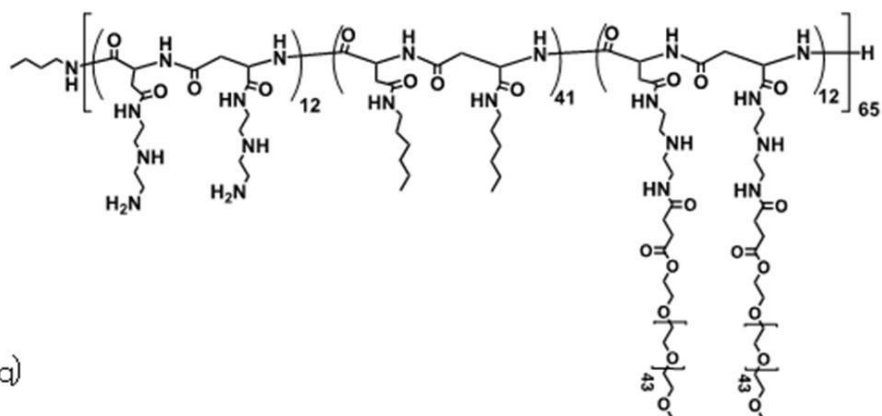
20

30

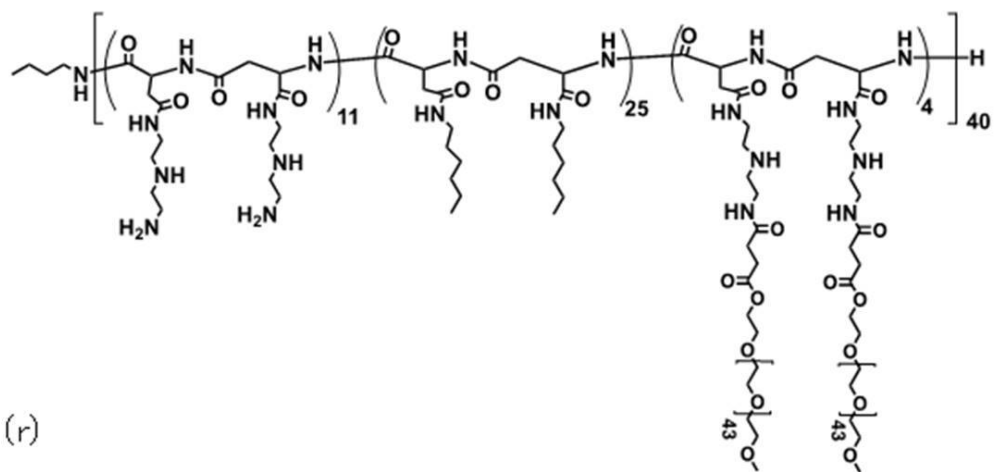
40

50

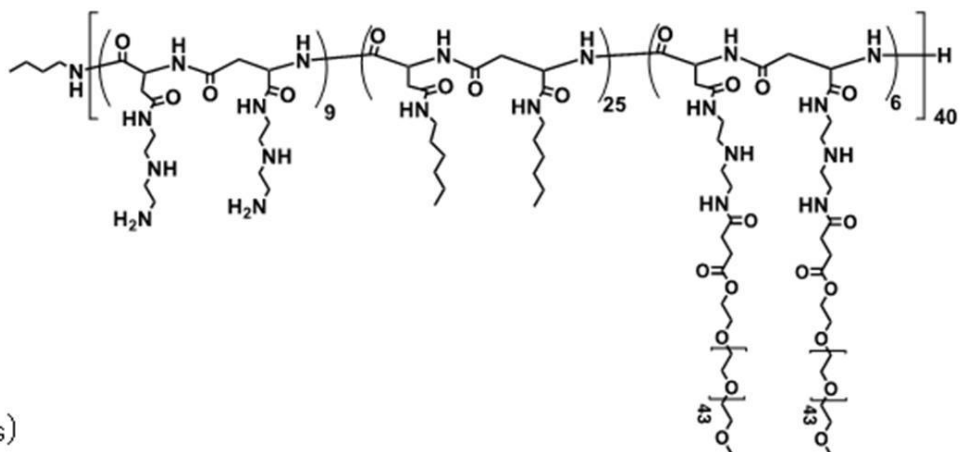
【化 3 8】



(q)



(r)



(s)

【 0 1 3 6】

10

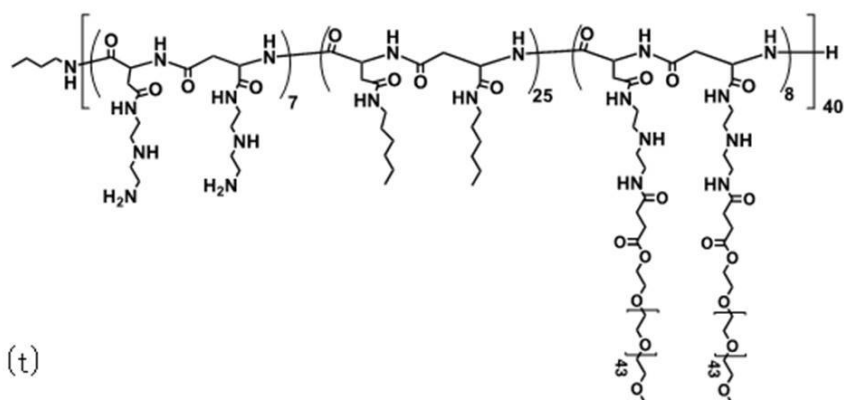
20

30

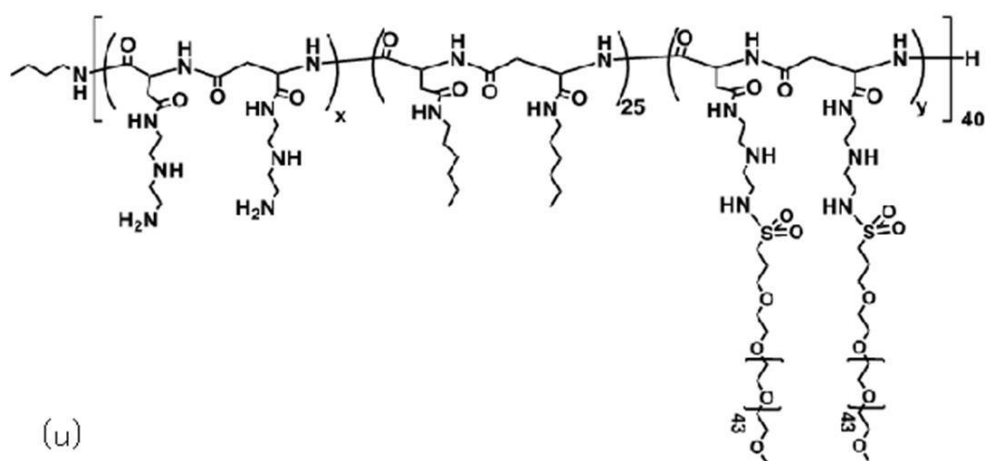
40

50

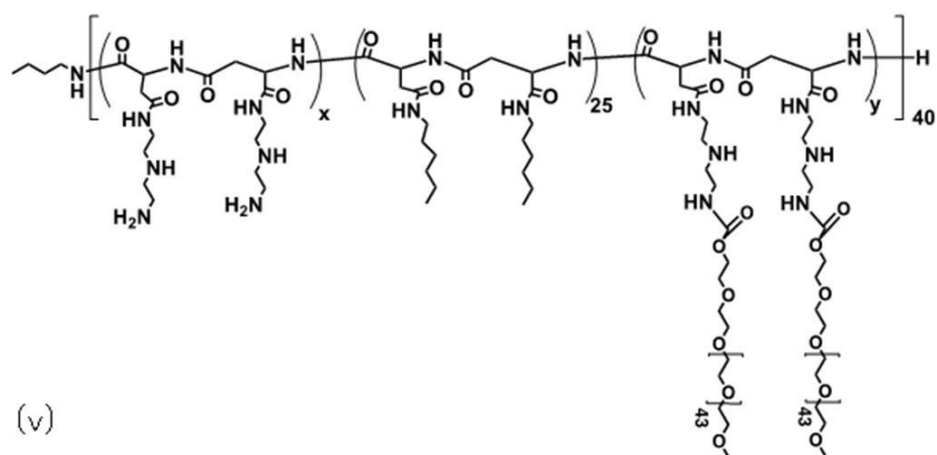
【化 3 9】



10



20



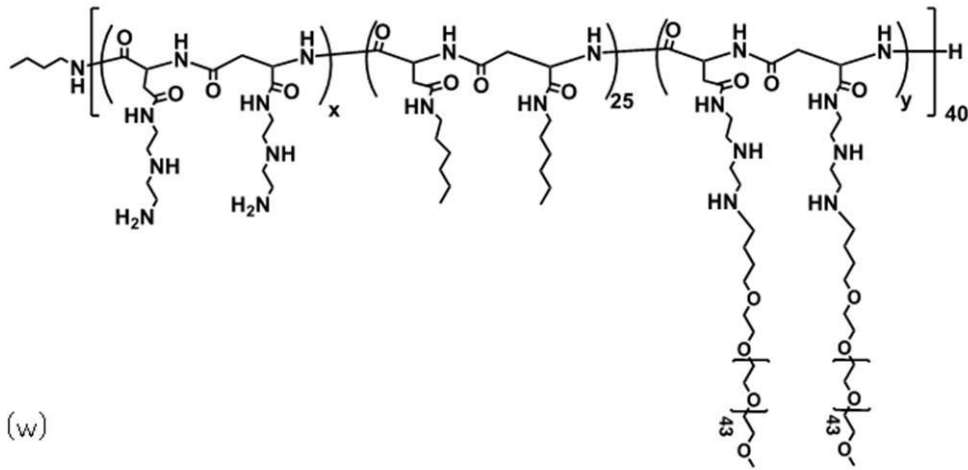
30

40

【 0 1 3 7】

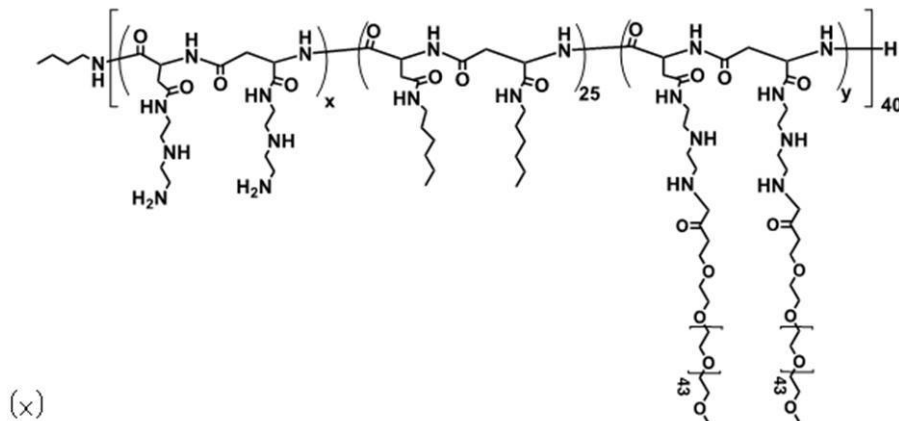
50

【化 4 0】



10

,または



20

【 0 1 3 8】

式中、 x および y は、それぞれ $(a+b)$ および $(e+f)$ について以前に定義した任意の量および任意の適切な比で存在し得る。

30

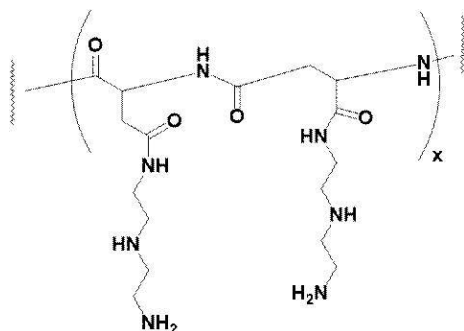
【 0 1 3 9】

これらの例示ポリマー中の単位の数表示は、ブロックコポリマー構造を意味せず;むしろ、これらの数は全体の単位の数を示し、この単位は任意の順序で配置され得、モノマーのブロックまたはポリマー全体にランダムに配置されたモノマーを含む。さらに、単位の総数の単一の記号を有する上記式中の類似の側鎖を有するモノマーのグループ分けは、両方の単位が存在すること、またはそれらが任意の特定の順序で存在することを意味しない。例えば、表現:

【 0 1 4 0】

【化 4 1】

40



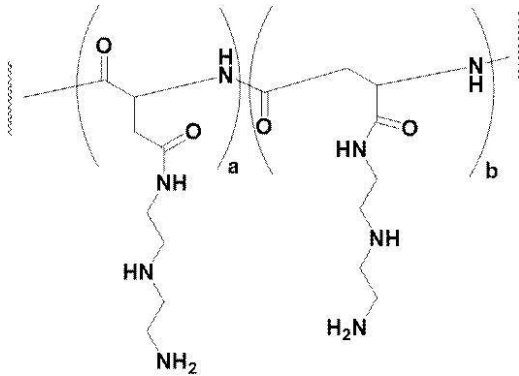
50

【0141】

は、表現：

【0142】

【化42】



10

【0143】

と等価であることが意図され、式中、「x」はa+bの合計と等しく、aまたはbのいずれかがゼロであり得ること、および「a」および「b」に対応する単位がポリマー骨格全体にわたって任意の順序で配置され得るかまたはランダムに分散され得ることが理解される。上記式中に示される疎水性側鎖を含む単位の数(c+dと等価)およびポリアルキレンオキシド-含有側鎖を含む単位の数(e+fと等価)に関しても同様である。

20

【0144】

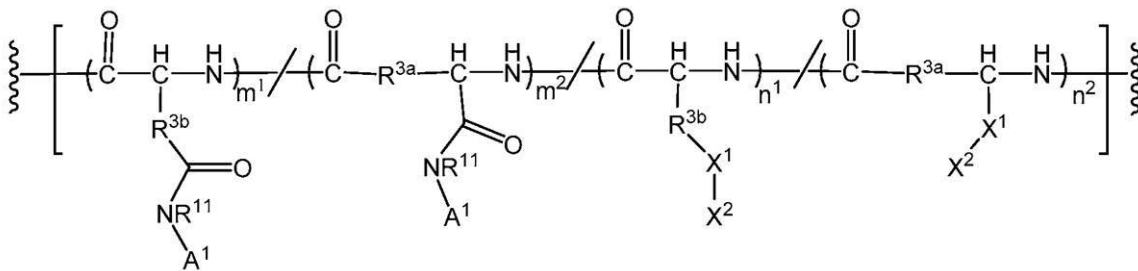
調製方法

本発明はまた、本明細書中に記載のポリマーの調製方法を提供する。いくつかの実施態様において、本方法は、式1のポリマーを調製することを含み、本方法は：

(a)式2：

【0145】

【化43】



30

式2

【0146】

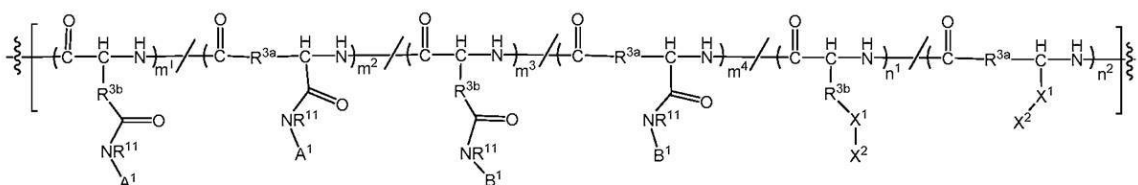
のポリマーを提供すること、および

40

(b)式2のポリマーの基A¹の部分を修飾して式1：

【0147】

【化44】



式1

50

【0148】

のポリマーを提供することを含む。式1および2のポリマーの全ての局面は、本明細書中に先に開示した通りである。従って、例えば：

m^1 、 m^2 、 m^3 および m^4 のそれぞれは0～1000の整数であり、但し、 $m^1 + m^2 + m^3 + m^4$ の合計は2よりも大きく、および $m^3 + m^4$ の合計は少なくとも1であり；

n^1 および n^2 のそれぞれは0～1000の整数であり、但し、 $n^1 + n^2$ の合計は少なくとも1であり、

記号「/」は、それによって分離された単位がランダムにまたは任意の順序で結合していることを示し；

各場合の R^{3a} は独立してメチレンまたはエチレン基であり；

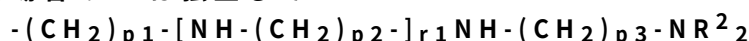
各場合の R^{3b} は独立してメチレンまたはエチレン基であり；

各場合の R^{11} は独立して水素あるいは C_1 - C_4 アルキル基またはアルケニル基であり、これらのいずれかは1個以上の置換基、必要に応じて水素または C_1 - C_3 アルキル基で置換されていてもよく；

各 X^1 は独立して $-C(O)O-$ 、 $-C(O)NR^{11}-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-S(O)(O)-$ または結合であり；

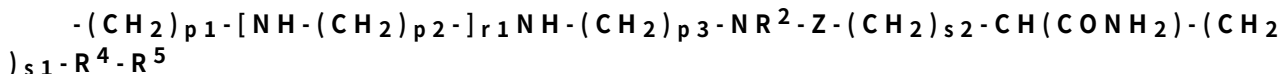
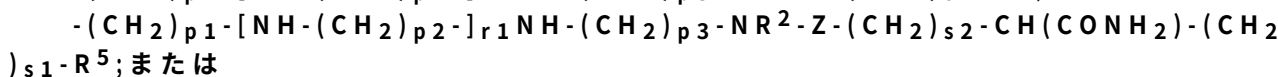
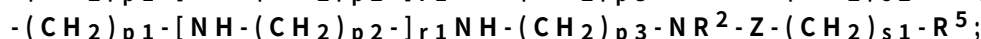
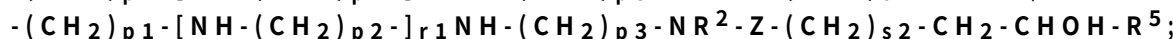
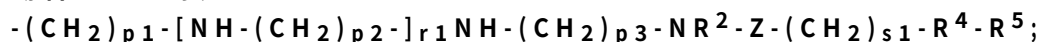
各場合の X^2 は疎水性側鎖であり；

各場合の A^1 は独立して：



であり、

各場合の B^1 は独立して：



であり、

式中、 $p1 \sim p3$ のそれぞれは独立して1～5の整数(例えば、1、2、3、4、または5)であり； $r1$ は0～5の整数(例えば、1、2、3、4、または5)であり； $s1$ は0～5の整数(例えば、0、1、2、3、4、または5)であり； $s2$ は0～5の整数(例えば、0、1、2、3、4、または5)であり；各場合の R^2 は独立して C_1 - C_{12} (例えば、 C_1 - C_6 、 C_1 - C_3 、 C_2 、または C_1)アルキル基、 C_2 - C_{12} (例えば、 C_2 - C_6 、または C_2 - C_3)アルケニル基、 C_3 - C_{12} (例えば、 C_3 - C_8 または C_3 - C_6)シクロアルキル基、または C_3 - C_{12} (例えば、 C_3 - C_8 または C_3 - C_6)シクロアルケニル基であり； Z は存在していてもよく、そして存在する場合、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-S(O)(O)-$ 、 $-C(NH)NR^2-$ 、 $-C(S)O-$ 、 $-C(S)NR^2-$ 、 $-C(O)NR^2-$ または置換されていてもよいアリアルまたはヘテロアリアルであり；各場合の R^4 は独立して $-C(O)O-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)NH-$ 、 $-CH_2-O-C(O)-O-CH_2-$ 、 $-O-C(O)-O-$ 、 $-O-$ 、 $-S(O)(O)-$ または結合であり；および R^5 はポリアルキレンオキシドを含む基(例えば、ポリエチレンオキシド、ポリプロピレンオキシド、またはそれらの組み合わせ)である。いくつかの実施態様において、 $p1$ 、 $p3$ 、または両方は $p2$ よりも大きく、および/または $p1$ 、 $p3$ 、または両方は3～5の整数(例えば、3、4、または5)であり、そして必要に応じて、 $p2$ は1または2の整数である。いくつかの実施態様において、 Z は存在し、そして $-C(O)-$ である。他の実施態様において、 Z は存在しない。式1および2の全ての局面は、そうでなければ本発明のポリマーに関して本明細書中に記載した通りであり、本明細書中に記載の式1および1A-1Cの構造の任意のおよび全ての実施態様を含む。

【0149】

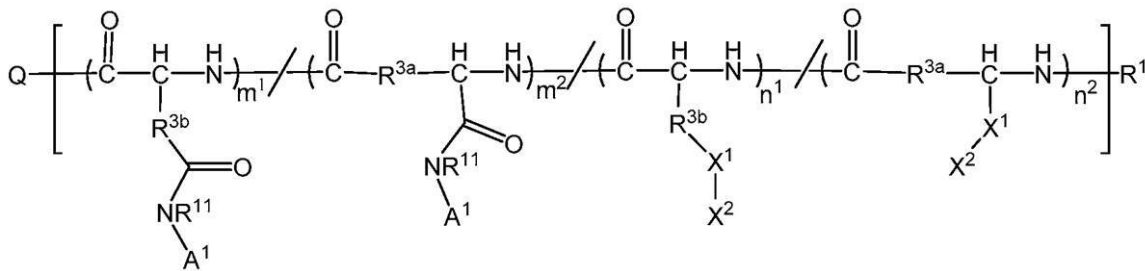
式1の構造を含むポリマーは、本明細書中に記載の任意のポリマーであり得、式1A、1B、および1C、ならびに本発明のポリマーに関して記載のそれらの任意のおよび全ての実施態様を含む。

【0150】

式2の構造を含むポリマーは、本明細書中に記載の任意のポリマーであり得、式2A、2B、2Cを含む：

【0151】

【化45】



10

式 2A

【0152】

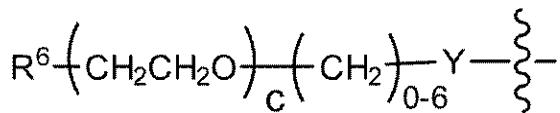
式中、

Qは式：

【0153】

【化46】

20



【0154】

であり、

cは0～50の整数であり；

Yは存在していてもよく、そして開裂可能なリンカーであり；

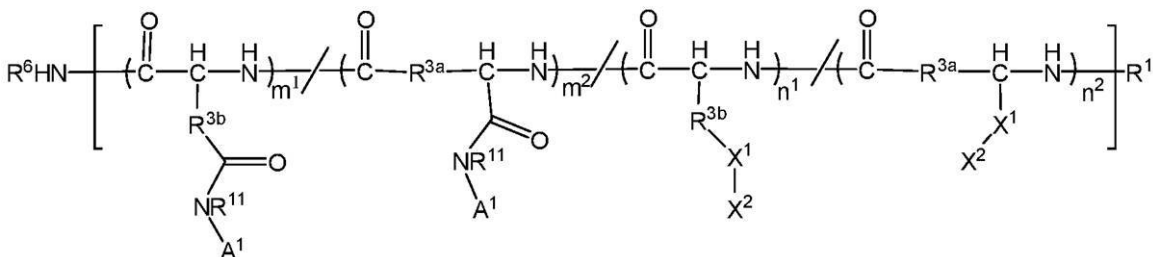
R¹は水素、アリール基、複素環基、C₁-C₁₂アルキル基、C₂-C₁₂アルケニル基、C₃-C₁₂シクロアルキル基またはC₃-C₁₂シクロアルケニル基であり、これらのいずれかは1個以上の置換基で置換されていてもよい；および

30

R⁶は水素、アミノ基、アリール基、複素環基、C₁-C₁₂アルキル基、C₁-C₁₂ヘテロアルキル基、C₂-C₁₂アルケニル基、C₃-C₁₂シクロアルキル基またはC₃-C₁₂シクロアルケニル基であり、これらのいずれかは1個以上の置換基あるいは組織特異的または細胞特異的標的化部位で置換されていてもよい；

【0155】

【化47】



40

式 2B

【0156】

式中、

R¹は水素、アリール基、複素環基、C₁-C₁₂アルキル基、C₂-C₁₂アルケニル基、C₃-C₁₂シクロアルキル基またはC₃-C₁₂シクロアルケニル基であり、これらのいずれかは1個以上の置換基あるいは組織特異的または細胞特異的標的化部位で置換されていてもよい；

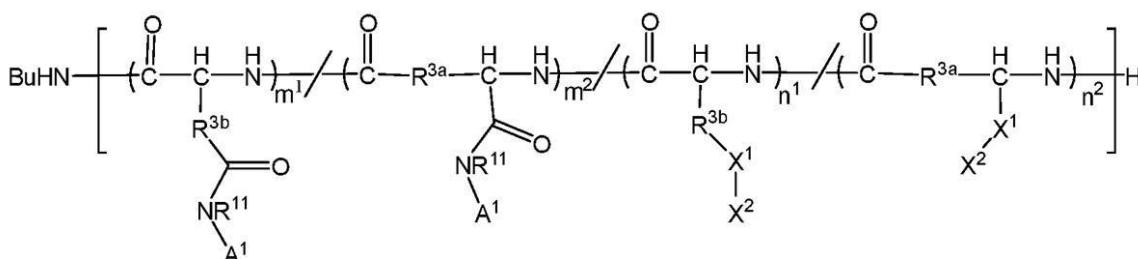
50

$_{12}$ シクロアルキル基または C_3 - C_{12} シクロアルケニル基であり、これらのいずれかは1個以上の置換基で置換されていてもよく；および

R^6 は水素、アミノ基、アリール基、複素環基、 C_1 - C_{12} アルキル基、 C_1 - C_{12} ヘテロアルキル基、 C_2 - C_{12} アルケニル基、 C_3 - C_{12} シクロアルキル基または C_3 - C_{12} シクロアルケニル基であり、これらのいずれかは1個以上の置換基あるいは組織特異的または細胞特異的標的化部位で置換されていてもよい；および

【0157】

【化48】



式 2C

10

【0158】

ここで式2A、2B、および2Cの全ての他の局面は、式1および1A-1Cに関して記載した通りであり、それらの任意のおよび全ての実施態様、ならびに本発明のポリマーに関して記載のそれらの任意のおよび全ての実施態様を含む。

20

【0159】

式2のポリマーの A^1 と指定される基は、任意の適切な手段によって修飾されて式1のポリマーの B^1 と指定される基を生成し得る。例えば、 A^1 と指定される基は、Michael付加反応、エポキシド開環、エステル(例えば、活性化エステル)を用いたアミド形成、窒素-ハロゲン交換反応、活性化カーボネートまたはカルバメート反応、尿素形成、チオ尿素形成、グアニジン形成、スルホンアミド形成、還元的アミノ化、求核アルキル化、芳香族求核置換、または置換反応によって修飾され得る。いくつかの実施態様において、 A^1 と指定される基は、活性化エステルを用いたアミド形成によって修飾される。好適な実施態様において、 A^1 と指定される基は、Michael付加反応によって修飾される。

30

【0160】

1つの実施態様において、式2の構造を含むポリマーの A^1 基は、式2の構造を含むポリマーと α, β -不飽和カルボニル化合物との間のMichael付加反応によって修飾される。本明細書中で使用される用語「Michael付加」は、ポリマーの求核剤(例えば、カルボアニオン、酸素アニオン、窒素アニオン、酸素原子、窒素原子、またはそれらの組み合わせ)の α, β -不飽和カルボニル化合物への求核付加をいう。従って、Michael付加反応は、式2の構造を含むポリマーと α, β -不飽和カルボニル化合物との間である。いくつかの実施態様において、ポリマーの求核剤は、窒素アニオン、窒素原子、またはそれらの組み合わせである。

40

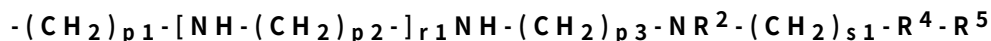
【0161】

α, β -不飽和カルボニル化合物は、求核剤からのMichael付加を受けることができる任意の α, β -不飽和カルボニル化合物であり得る。いくつかの実施態様において、 α, β -不飽和カルボニル化合物は、アクリレート、アクリルアミド、ビニルスルホン、またはそれらの組み合わせである。従って、Michael付加反応は、式2の構造を含むポリマーとアクリレート、アクリルアミド、ビニルスルホン、またはそれらの組み合わせとの間であり得る。従って、いくつかの実施態様において、本方法は、式2の構造を含むポリマーとアクリレートとを接触させること；式2の構造を含むポリマーとアクリルアミドとを接触させること；または式2の構造を含むポリマーとビニルスルホンとを接触させることを含む。

【0162】

50

A¹と指定される基がMichael付加反応によって修飾される実施態様において、それらは式:



のB¹と指定される基を生成し;

式中、p₁~p₃のそれぞれは独立して1~5の整数(例えば、1、2、3、4、または5)であり;r₁は0~5の整数(例えば、1、2、3、4、または5)であり;s₁は0~5の整数(例えば、0、1、2、3、4、または5)であり;各場合のR²は独立してC₁-C₁₂(例えば、C₁-C₆、C₁-C₃、C₂、またはC₁)アルキル基、C₂-C₁₂(例えば、C₂-C₆、またはC₂-C₃)アルケニル基、C₃-C₁₂(例えば、C₃-C₈またはC₃-C₆)シクロアルキル基、またはC₃-C₁₂(例えば、C₃-C₈またはC₃-C₆)シクロアルケニル基であり;各場合のR⁴は独立して-C(O)O-、-C(O)-、-C(O)NH-、-O-、または-S(O)(O)-であり;およびR⁵はポリアルキレンオキシドを含む基(例えば、ポリエチレンオキシド、ポリプロピレンオキシド、またはそれらの組み合わせ)である。

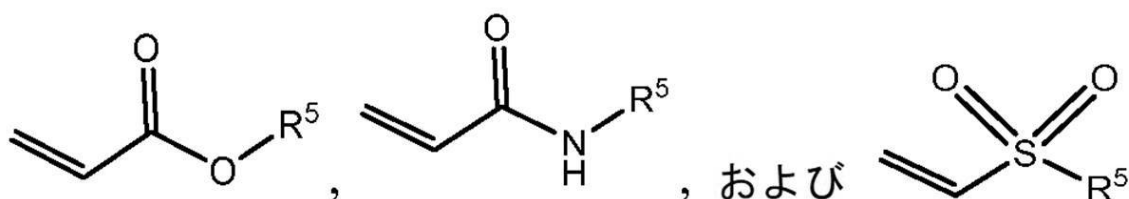
10

【0163】

使用に適切なアクリレート、アクリルアミド、およびビニルスルホンの例は、式:

【0164】

【化49】



20

【0165】

式中、R⁵は式1および1A-1Cのいずれかに関して記載した通りであるのアクリレートを含む。

【0166】

いくつかの実施態様において、Michael付加反応は酸および/または塩基によって促進される。酸および/または塩基は、任意の適切なpKaを有する任意の適切な酸および/または塩基であり得る。酸および/または塩基は、有機酸(例、p-トルエンスルホン酸)、有機塩基(例、トリエチルアミン)、無機酸(例、四塩化チタン)、無機塩基(例、炭酸カリウム)、またはそれらの組み合わせであり得る。

30

【0167】

いくつかの実施態様において、Michael付加反応は酸によって促進される。酸は、ブロンステッド酸またはルイス酸であり得る。酸がブロンステッド酸である実施態様において、酸は弱酸(すなわち、約4~約7のpKa)または強酸(すなわち、約-2~約4のpKa)であり得る。典型的には、酸は弱酸である。いくつかの実施態様において、酸はルイス酸である。例えば、酸はビス(トリフルオロメタンスルホン)イミドまたはp-トルエンスルホン酸であり得る。

40

【0168】

いくつかの実施態様において、Michael付加反応は塩基によって促進される。塩基は、弱塩基(すなわち、約7~約12のpKa)または強塩基(すなわち、約12~約50のpKa)であり得る。典型的には、塩基は弱塩基である。例えば、塩基はトリエチルアミン、ジイソプロピルエチルアミン、ピリジン、N-メチルモルホリン、またはN,N-ジメチル-ピペラジン、あるいはそれらの誘導体であり得る。

【0169】

いくつかの実施態様において、Michael付加反応は溶媒中で行われる。溶媒は、反応させるポリマーおよびα,β-不飽和カルボニル化合物を可溶化することができる任意の適切な溶媒、または溶媒の混合物であり得る。例えば、溶媒は、水、プロトン性有機溶媒、

50

および/または非プロトン性有機溶媒を含み得る。溶媒の例示的なリストは、水、ジクロロメタン、ジエチルエーテル、ジメチルスルホキシド、アセトニトリル、メタノール、およびエタノールを含む。

【0170】

いくつかの実施態様において、式2の構造を含むポリマーのA¹基は、式2の構造を含むポリマーとエステル(例えば、活性化エステル)との間のアミド形成によって修飾される。本明細書中で使用される用語「活性化エステル」は、アミド結合形成に適切な任意の電子不足エステルをいい、これらの多くは当該分野で公知である。例えば、活性化エステルは、N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)エステルまたはフルオロフェノールエステル(例えば、テトラフルオロフェノールエステルまたはペンタフルオロフェノールエステル)であり得る。いくつかの実施態様において、アミド形成は、式2の構造を含むポリマーの窒素アニオン、窒素原子、またはそれらの組み合わせと活性化エステルとの間である。

10

【0171】

A¹と指定される基がエステル(例えば、活性化エステル)を用いたアミド形成によって修飾される実施態様において、それらは式:

$$-(CH_2)_{p1} \cdot [NH \cdot (CH_2)_{p2}]_{r1} NH \cdot (CH_2)_{p3} \cdot NR^2 \cdot C(O) \cdot (CH_2)_{s1} \cdot R^4 \cdot R^5;$$

$$-(CH_2)_{p1} \cdot [NH \cdot (CH_2)_{p2}]_{r1} NH \cdot (CH_2)_{p3} \cdot NR^2 \cdot C(O) \cdot (CH_2)_{s2} \cdot CH_2 \cdot CHOH \cdot R^5;$$

$$-(CH_2)_{p1} \cdot [NH \cdot (CH_2)_{p2}]_{r1} NH \cdot (CH_2)_{p3} \cdot NR^2 \cdot C(O) \cdot (CH_2)_{s1} \cdot R^5;$$

$$-(CH_2)_{p1} \cdot [NH \cdot (CH_2)_{p2}]_{r1} NH \cdot (CH_2)_{p3} \cdot NR^2 \cdot C(O) \cdot (CH_2)_{s2} \cdot CH(CONH_2) \cdot (CH_2)_{s1} \cdot R^5;$$
 または
$$-(CH_2)_{p1} \cdot [NH \cdot (CH_2)_{p2}]_{r1} NH \cdot (CH_2)_{p3} \cdot NR^2 \cdot C(O) \cdot (CH_2)_{s2} \cdot CH(CONH_2) \cdot (CH_2)_{s1} \cdot R^4 \cdot R^5$$

20

のB¹と指定される基を生成し、

式中、p₁~p₃のそれぞれは独立して1~5の整数(例えば、1、2、3、4、または5)であり;r₁は0~5の整数(例えば、0、1、2、3、4、または5)であり;s₁は0~5の整数(例えば、0、1、2、3、4、または5)であり;s₂は0~5の整数(例えば、0、1、2、3、4、または5)であり;各場合のR²は独立してC₁-C₁₂(例えば、C₁-C₆、C₁-C₃、C₂、またはC₁)アルキル基、C₂-C₁₂(例えば、C₂-C₆、またはC₂-C₃)アルケニル基、C₃-C₁₂(例えば、C₃-C₈またはC₃-C₆)シクロアルキル基、またはC₃-C₁₂(例えば、C₃-C₈またはC₃-C₆)シクロアルケニル基であり;各場合のR⁴は独立して-C(O)O-、-C(O)-、-C(O)NH-、-CH₂-O-C(O)-O-CH₂-、-O-C(O)-O-、-O-、または-S(O)(O)-であり;およびR⁵はポリアルキレンオキシドを含む基(例えば、ポリエチレンオキシド、ポリプロピレンオキシド、またはそれらの組み合わせ)である。

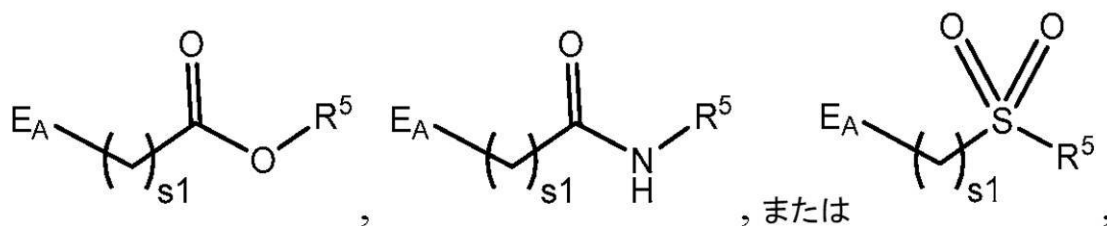
30

【0172】

使用に適切な活性化エステルの例は、式:

【0173】

【化50】



40

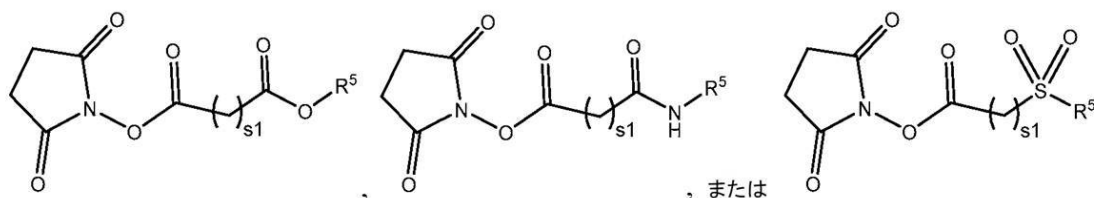
【0174】

式中、E_Aは活性化エステルであり、およびs₁およびR⁵は式1および1A-1Cのいずれかに関して記載した通りである、のエステルを含む。例えば、使用のための活性化エステルは、式:

【0175】

50

【化51】

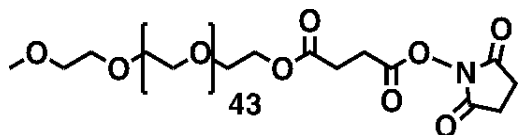


【0176】

式中、 $s1$ および R^5 は式1および1A-1Cのいずれかに関して記載した通りである、のNHSエステルを含み得る。いくつかの実施態様において、使用のための活性エステルは、式：

【0177】

【化52】



【0178】

である。

【0179】

いくつかの実施態様において、アミド形成反応は酸および/または塩基によって促進される。酸および/または塩基は、任意の適切な pK_a を有する任意の適切な酸および/または塩基であり得る。酸および/または塩基は、有機酸(例、 p -トルエンスルホン酸)、有機塩基(例、トリエチルアミン)、無機酸(例、四塩化チタン)、無機塩基(例、炭酸カリウム)、またはそれらの組み合わせであり得る。

【0180】

いくつかの実施態様において、アミド形成反応は酸によって促進される。酸は、ブロンステッド酸またはルイス酸であり得る。酸がブロンステッド酸である実施態様において、酸は弱酸(すなわち、約4~約7の pK_a)または強酸(すなわち、約-2~約4の pK_a)であり得る。典型的には、酸は弱酸である。いくつかの実施態様において、酸はルイス酸である。例えば、酸はビス(トリフルオロメタンスルホン)イミドまたは p -トルエンスルホン酸であり得る。

【0181】

いくつかの実施態様において、アミド形成反応は塩基によって促進される。塩基は、弱塩基(すなわち、約7~約12の pK_a)または強塩基(すなわち、約12~約50の pK_a)であり得る。典型的には、塩基は弱塩基である。例えば、塩基はトリエチルアミン、ジイソプロピルエチルアミン、ピリジン、 N -メチルモルホリン、または N,N -ジメチル-ピペラジン、あるいはそれらの誘導体であり得る。

【0182】

いくつかの実施態様において、アミド形成反応は溶媒中で行われる。溶媒は、反応させるポリマーおよびエステル(例えば、活性化エステル)化合物を可溶化することができる任意の適切な溶媒、または溶媒の混合物であり得る。例えば、溶媒は、水、プロトン性有機溶媒、および/または非プロトン性有機溶媒を含み得る。溶媒の例示的なリストは、水、ジクロロメタン、ジエチルエーテル、ジメチルスルホキシド、アセトニトリル、メタノール、およびエタノールを含む。

【0183】

1つの実施態様において、式2の構造を含むポリマーの A^1 基は、ポリマーとエポキシド化合物との間のエポキシド開環反応によって修飾される。本明細書中で使用される用語「エポキシド開環」は、ポリマーの求核剤(例、カルボアニオン、酸素アニオン、窒素アニオン、酸素原子、窒素原子、またはそれらの組み合わせ)のエポキシド化合物への求核

10

20

30

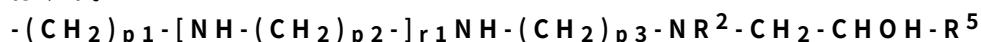
40

50

付加をいい、それによってエポキシドを開環する。従って、エポキシド開環反応は、ポリマーとエポキシド化合物との間である。いくつかの実施態様において、ポリマーの求核剤は、窒素アニオン、窒素原子、またはそれらの組み合わせである。

【0184】

A¹と指定される基がエポキシド開環反応によって修飾される実施態様において、それらは、式：



のB¹と指定される基を生成し；

式中、p₁～p₃のそれぞれは独立して1～5の整数(例えば、1、2、3、4、または5)であり；r₁は0～5の整数(例えば、0、1、2、3、4、または5)であり；各場合のR²は独立してC₁-C₁₂(例えば、C₁-C₆、C₁-C₃、C₂、またはC₁)アルキル基、C₂-C₁₂(例えば、C₂-C₆、またはC₂-C₃)アルケニル基、C₃-C₁₂(例えば、C₃-C₈またはC₃-C₆)シクロアルキル基、またはC₃-C₁₂(例えば、C₃-C₈またはC₃-C₆)シクロアルケニル基であり；およびR⁵はポリアルキレンオキシドを含む基(例えば、ポリエチレンオキシド、ポリプロピレンオキシド、またはそれらの組み合わせ)である。

【0185】

使用に適切なエポキシドの例は、以下の式：

【0186】

【化53】



【0187】

式中、R⁵は式1および1A-1Cのいずれかに関して記載した通りである、のエポキシドを含む。

【0188】

いくつかの実施態様において、エポキシド開環反応は、酸および/または塩基によって促進される。酸および/または塩基は、任意の適切なpK_aを有する任意の適切な酸および/または塩基であり得る。酸および/または塩基は、有機酸(例、p-トルエンスルホン酸)、有機塩基(例、トリエチルアミン)、無機酸(例、四塩化チタン)、無機塩基(例、炭酸カリウム)、またはそれらの組み合わせであり得る。

【0189】

いくつかの実施態様において、エポキシド開環反応は酸によって促進される。酸は、ブロンステッド酸またはルイス酸であり得る。酸がブロンステッド酸である実施態様において、酸は弱酸(すなわち、約4～約7のpK_a)または強酸(すなわち、約-2～約4のpK_a)であり得る。典型的には、酸は弱酸である。いくつかの実施態様において、酸はルイス酸である。例えば、酸はビス(トリフルオロメタンスルホン)イミドまたはp-トルエンスルホン酸であり得る。

【0190】

いくつかの実施態様において、エポキシド開環反応は塩基によって促進される。塩基は、弱塩基(すなわち、約7～約12のpK_a)または強塩基(すなわち、約12～約50のpK_a)であり得る。典型的には、塩基は弱塩基である。例えば、塩基はトリエチルアミン、ジイソプロピルエチルアミン、ピリジン、N-メチルモルホリン、またはN,N-ジメチル-ピペラジン、あるいはそれらの誘導体であり得る。

【0191】

いくつかの実施態様において、エポキシド開環反応は溶媒中で行われる。溶媒は、反応させるポリマーおよびエポキシド化合物を可溶化することができる任意の適切な溶媒、ま

たは溶媒の混合物であり得る。例えば、溶媒は、水、プロトン性有機溶媒、および/または非プロトン性有機溶媒を含み得る。溶媒の例示的なリストは、水、ジクロロメタン、ジエチルエーテル、ジメチルスルホキシド、アセトニトリル、メタノール、およびエタノールを含む。

【0192】

1つの実施態様において、式2の構造を含むポリマーのA¹基は、ポリマーと脱離基(例、塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子、トシレート、トリフレート、メシレートなど)を含む化合物との間の置換反応によって修飾される。本明細書中で使用される用語「置換」は、ポリマーの求核剤(例、カルボアニオン、酸素アニオン、窒素アニオン、酸素原子、窒素原子、またはそれらの組み合わせ)の脱離基を含む化合物への求核付加をいう。従って、置換反応は、ポリマーと脱離基を含む化合物との間である。いくつかの実施態様において、ポリマーの求核剤は、窒素アニオン、窒素原子、またはそれらの組み合わせである。

10

【0193】

A¹と指定される基が置換反応によって修飾される実施態様において、それらは、式:



のB¹と指定される基を生成し;

式中、p1~p3のそれぞれは独立して1~5の整数(例えば、1、2、3、4、または5)であり;r1は0~5の整数(例えば、0、1、2、3、4、または5)であり;s1は0~5の整数(例えば、0、1、2、3、4、または5)であり;各場合のR²は独立してC₁-C₁₂(例えば、C₁-C₆、C₁-C₃、C₂、またはC₁)アルキル基、C₂-C₁₂(例えば、C₂-C₆、またはC₂-C₃)アルケニル基、C₃-C₁₂(例えば、C₃-C₈またはC₃-C₆)シクロアルキル基、またはC₃-C₁₂(例えば、C₃-C₈またはC₃-C₆)シクロアルケニル基であり;およびR⁵はポリアルキレンオキシドを含む基(例えば、ポリエチレンオキシド、ポリプロピレンオキシド、またはそれらの組み合わせ)である。

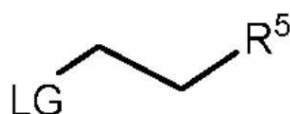
20

【0194】

使用に適切な脱離基を含む化合物の例は、以下の式:

【0195】

【化54】



30

【0196】

式中、LGは脱離基(例、塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子、トシレート、トリフレート、メシレートなど)であり、およびR⁵は式1および1A-1Cのいずれかに関して記載した通りである、の化合物を含む。

【0197】

いくつかの実施態様において、置換反応は、酸および/または塩基によって促進される。酸および/または塩基は、任意の適切なpKaを有する任意の適切な酸および/または塩基であり得る。酸および/または塩基は、有機酸(例、p-トルエンスルホン酸)、有機塩基(例、トリエチルアミン)、無機酸(例、四塩化チタン)、無機塩基(例、炭酸カリウム)、またはそれらの組み合わせであり得る。

40

【0198】

いくつかの実施態様において、置換反応は、酸によって促進される。酸は、ブロンステッド酸またはルイス酸であり得る。酸がブロンステッド酸である実施態様において、酸は弱酸(すなわち、約4~約7のpKa)または強酸(すなわち、約-2~約4のpKa)であり得る。典型的には、酸は弱酸である。いくつかの実施態様において、酸はルイス酸である。例えば、酸はビス(トリフルオロメタンスルホン)イミドまたはp-トルエンスルホン酸であ

50

り得る。

【0199】

いくつかの実施態様において、置換反応は、塩基によって促進される。塩基は、弱塩基(すなわち、約7～約12のpKa)または強塩基(すなわち、約12～約50のpKa)であり得る。典型的には、塩基は弱塩基である。例えば、塩基はトリエチルアミン、ジイソプロピルエチルアミン、ピリジン、N-メチルモルホリン、またはN,N-ジメチル-ピペラジン、あるいはそれらの誘導体であり得る。

【0200】

いくつかの実施態様において、置換反応は溶媒中で行われる。溶媒は、反応させるポリマーおよび脱離基を含む化合物を可溶化することができる任意の適切な溶媒、または溶媒の混合物であり得る。例えば、溶媒は、水、プロトン性有機溶媒、および/または非プロトン性有機溶媒を含み得る。溶媒の例示的なリストは、水、ジクロロメタン、ジエチルエーテル、ジメチルスルホキシド、アセトニトリル、メタノール、およびエタノールを含む。

10

【0201】

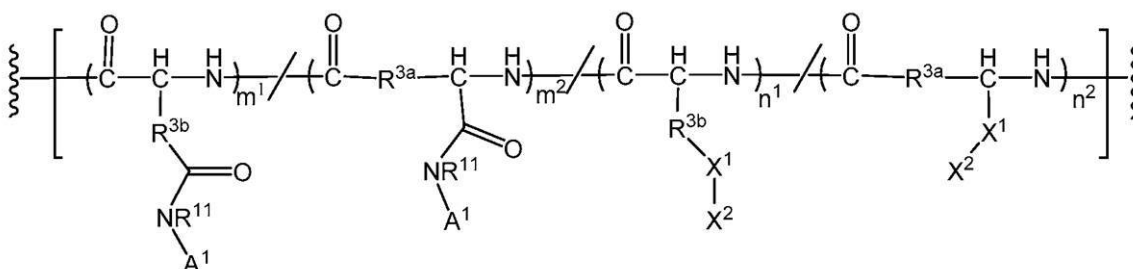
いくつかの実施態様において、本方法はさらに、式1の構造を含むポリマーを単離することを含む。式1の構造を含むポリマーは、任意の適切な方法によって単離され得る。例えば、式1の構造を含むポリマーは、抽出、結晶化、再結晶、カラムクロマトグラフィー、濾過、またはそれらの任意の組み合わせによって単離され得る。

【0202】

式2の構造を含むポリマーは、任意の適切な方法によって作製され得る。例えば、式2:

【0203】

【化55】



30

式 2

【0204】

の構造を含むポリマーは:

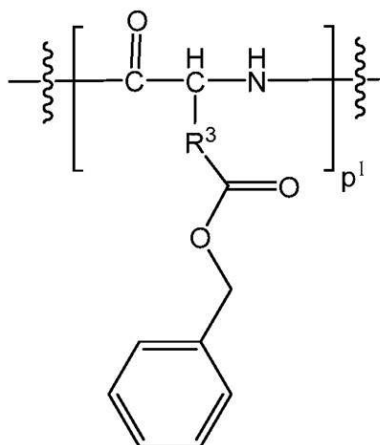
(I) 式3:

【0205】

40

50

【化 5 6】



式 3

10

【0206】

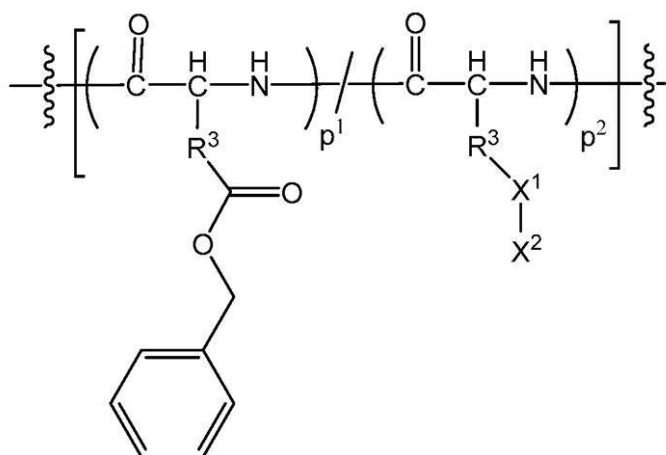
のポリマーを(a)式 $\text{HNR}^{11}\text{A}^1$ の化合物;および(b)式 H_2NX^2 または HOX^2 の化合物と同時にまたは任意の順番で反応させること;または

(II)式4

【0207】

20

【化 5 7】



式 4

30

【0208】

のポリマーを式 $\text{HNR}^{11}\text{A}^1$ の化合物と反応させること;
を含む方法によって調製され得、
式中、

p^1 は1~2000(例えば、1~1000、1~500、1~200、1~100、5~2000、5~1000、5~500、5~200、または5~100)の整数であり;

40

p^2 は1~2000(例えば、1~1000、1~500、1~200、1~100、2~2000、2~1000、2~500、2~200、または2~100)の整数であり;

各 R^3 は独立してメチレンまたはエチレン基であり;および

m^1 、 m^2 、 n^1 、 n^2 、 R^{3a} 、 R^{3b} 、 R^{11} 、 X^1 、 X^2 、および A^1 は式1および1A-1Cに関して先に記載した通りである。

【0209】

本方法は、式3または式4の構造を式 $\text{HNR}^{11}\text{A}^1$ の化合物、および必要に応じて式 H_2NX^2 または HOX^2 の化合物と化合することを含み得る。より具体的には、式3の構造は、(a)式 $\text{HNR}^{11}\text{A}^1$ の化合物、および(b)式 H_2NX^2 または HOX^2 の化合物と同時にまたは任意の

50

順番で化合（反応）させて式2の化合物を提供し得る。同様に、 X^2 基を既に含む式4の化合物は、式 $HNR^{11}A^1$ の化合物と化合（反応）させて式2の化合物を提供し得る。

【0210】

式3および4の全ての他の置換基および局面は、本発明のポリマー(例えば、式1および1A-1C)に関して本明細書中で記載した通りであり、その任意のおよび全ての実施態様を含む。

【0211】

$HNR^{11}A^1$ および式 H_2NX^2 または HOX^2 の化合物は、所望の置換度に応じて式3または4の化合物に任意の適切な方法および量で添加され得る。いくつかの実施態様において、約1-400当量(例えば、約1-350、1-300、1-250、1-200、1-150、1-100、1-50、10-400、10-350、10-300、10-250、10-200、10-150、10-100、10-50、20-400、20-350、20-300、20-250、20-200、20-150、20-100、20-50、30-400、30-350、30-300、30-250、30-200、30-150、30-100、30-50、40-400、40-350、40-300、40-250、40-200、40-150、40-100、40-50、50-400、50-350、50-300、50-250、50-200、50-150、または50-100当量)の式 H_2NX^2 または HOX^2 の化合物が式3のポリマーに添加される。また、いくつかの実施態様において、約1-400当量(例えば、約1-350、1-300、1-250、1-200、1-150、1-100、1-50、10-400、10-350、10-300、10-250、10-200、10-150、10-100、10-50、20-400、20-350、20-300、20-250、20-200、20-150、20-100、20-50、30-400、30-350、30-300、30-250、30-200、30-150、30-100、30-50、40-400、40-350、40-300、40-250、40-200、40-150、40-100、40-50、50-400、50-350、50-300、50-250、50-200、50-150、または50-100当量)の式 $HNR^{11}A^1$ の化合物が式3または式4のポリマーに添加される。

【0212】

本方法が式 $HNR^{11}A^1$ の化合物および式 H_2NX^2 または HOX^2 の化合物を式3のポリマーに添加することを含む実施態様において、式 $HNR^{11}A^1$ の化合物および式 H_2NX^2 または HOX^2 の化合物は、任意の適切な比で反応混合物中に存在し得る。例えば、式 $HNR^{11}A^1$ の化合物および式 H_2NX^2 または HOX^2 の化合物は、約150:1～約1:150のモル比で存在し得る。いくつかの実施態様において、約150:1～約1:1、例えば約50:1～約1:1(例えば、約25:1～約1:1、約10:1～約1:1、約5:1～約1:1、または約2.5:1～約1:1)の比が用いられる。他の実施態様において、比は約1:150～約1:1、例えば約1:50～約1:1(例えば、約1:25～約1:1、約1:10～約1:1、約1:5～約1:1、または約1:2.5～約1:1)である。さらに他の実施態様において、比は約1:10～約1:150、約1:40～約1:150、または約1:80～約1:150である。

【0213】

いくつかの実施態様において、式3または式4の構造を含むポリマーは、それぞれ式3Aまたは式4A:

【0214】

10

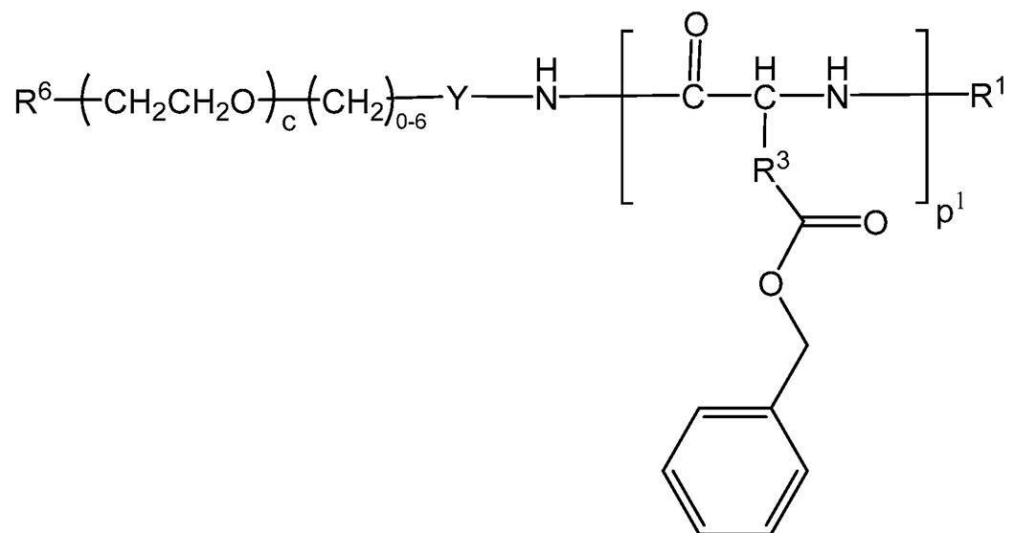
20

30

40

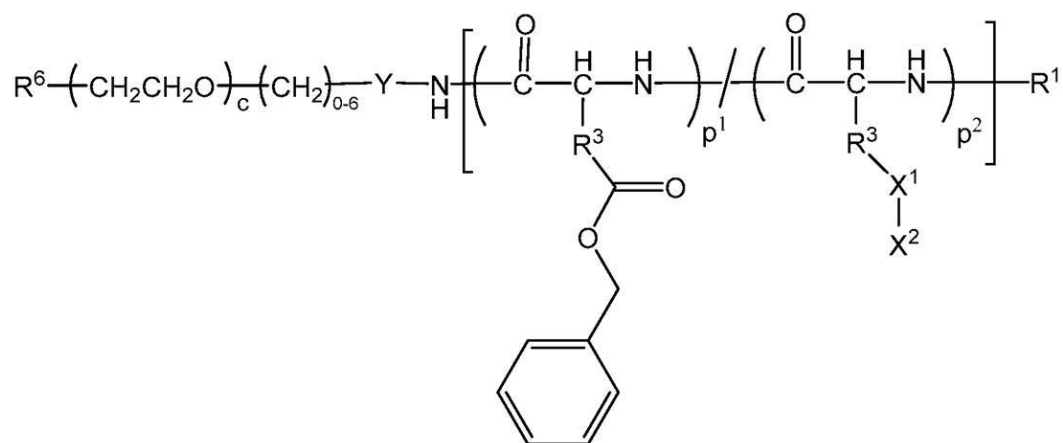
50

【化 5 8】



式 3A

または



式 4A

【0215】

のポリマーであり；式中、 c 、 Y 、 R^1 、および R^6 は、式1Aおよび2Aのポリマーに関して先に記載した通りであり、その任意のおよび全ての実施態様を含み；および p^1 、 p^2 、 R^3 、 X^1 、および X^2 は式3および4に関して上記の通りである。

【0216】

いくらかの実施態様において、式3または式4の構造を含むポリマーは、それぞれ式3Bまたは式4B：

【0217】

10

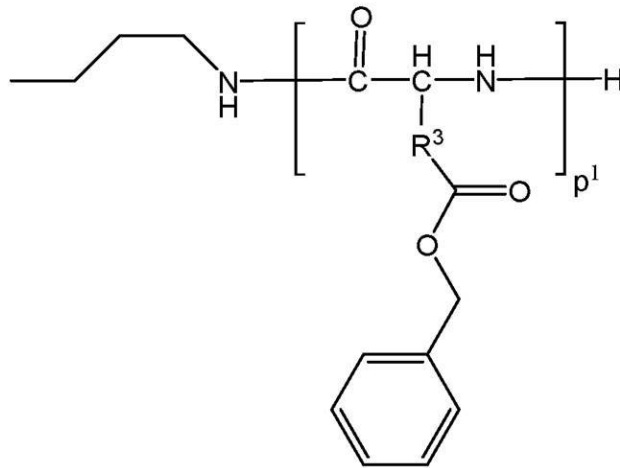
20

30

40

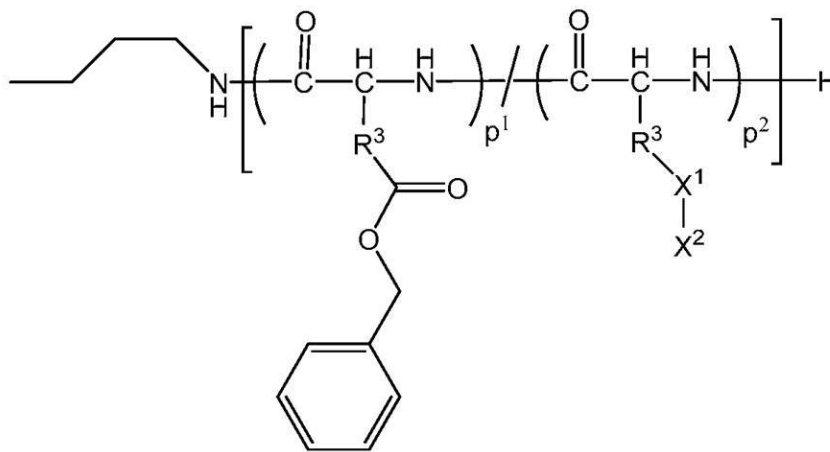
50

【化 5 9】



式 3B

または



式 4B

【0218】

のポリマーであり；式中、 p^1 、 p^2 、 R^3 、 X^1 、および X^2 は式3および4に関して上記の通りである。

【0219】

組成物

本明細書中で提供されるポリマーは、任意の用途について使用され得る。しかし、ポリマーは核酸および/またはポリペプチド(例、タンパク質)を細胞に送達するために特に有用であると考えられる。本明細書中で提供されるポリマーは、ナノ粒子の形態のこのような送達ビヒクルを提供し得る。任意の特定の理論または作用機序に束縛されることを望まないが、本明細書中に記載のポリマーは、いくつかの実施態様において、特に生理学的環境中、例えば体液(例えば、血液、血清、またはcsf)中で改善された安定性を有するナノ粒子を提供し得ると考えられる。安定性は、経時の粒子サイズの変化の因子として測定され得、ここで所定の期間にわたる粒子サイズのより大きい変化は、所定の期間にわたる粒子サイズのより小さい変化よりも安定性が低いことを示す。

【0220】

従って、本明細書中に記載のポリマーならびに核酸および/またはポリペプチド(例えば、タンパク質)を含む組成物が本明細書中で提供される。いくつかの実施態様において、組成物は核酸を含有する。任意の核酸が使用され得る。核酸の例示的なリストは、CRISPR系のガイドおよび/またはドナー核酸、siRNA、microRNA、干渉RNAまたはRNAi

、dsRNA、mRNA、DNAベクター、リボザイム、アンチセンスポリヌクレオチド、およびsiRNA、microRNA、dsRNA、リボザイムまたはアンチセンス核酸をコードするDNA発現カセットを含む。siRNAは、典型的には15-50塩基対および好ましくは19-25塩基対を含み、そして細胞内で発現された標的遺伝子またはRNAと同一またはほぼ同一のヌクレオチド配列を有する二本鎖構造を含む。siRNAは、2つのアニールされたポリヌクレオチドまたはヘアピン構造を形成する1つのポリヌクレオチドからなり得る。MicroRNA(miRNA)は、それらのmRNA標的の破壊または翻訳抑制を命令する小さい非コードポリヌクレオチド、約22ヌクレオチド長である。アンチセンスポリヌクレオチドは、遺伝子またはmRNAを優遇する配列を含む。アンチセンスポリヌクレオチドは:モルフォリノ、2'-O-メチルポリヌクレオチド、DNA、RNAなどを含むが、これらに限定されない。ポリヌクレオチド-ベースの発現阻害剤は、インビトロで重合され得、組み換え、キメラ配列、またはこれらの基の誘導体を含み得る。ポリヌクレオチド-ベースの発現阻害剤は、リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド、合成ヌクレオチド、または標的RNAおよび/または遺伝子が阻害されるような任意の適切な組み合わせを含み得る。

10

20

30

40

50

【0221】

組成物はまた、核酸に加えてまたはその代わりに、送達のための任意のタンパク質を含有し得る。ポリペプチドは任意の適切なポリペプチドであり得る。例えば、ポリペプチドはジungkフィンガーヌクレアーゼ、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ(「TALEN」)、リコンビナーゼ、デアミナーゼ、エンドヌクレアーゼ、またはそれらの組み合わせであり得る。いくつかの実施態様において、ポリペプチドはRNA-誘導エンドヌクレアーゼ(例、Cas9ポリペプチド、Cpf1ポリペプチド、またはそれらの変異体)またはDNAリコンビナーゼ(例、Creポリペプチド)である。

【0222】

本明細書中で提供されるポリマーは、CRISPR系の1つ以上の成分を送達するために特に有用であると考えられる。従って、いくつかの実施態様において、組成物はガイドRNA、RNA-誘導エンドヌクレアーゼまたはこれをコードする核酸、および/またはドナー核酸を含有する。組成物は、本明細書中で記載したポリマーと一緒に1つ、2つ、または全ての3つの成分を含有し得る。さらに、組成物は多数のガイドRNAs、RNA-誘導エンドヌクレアーゼまたはこれをコードする核酸、および/またはドナー核酸を含有し得る。例えば、必要に応じて複数の異なるドナー核酸およびさらには複数の異なるRNA誘導エンドヌクレアーゼまたはこれをコードする核酸とともに、異なる標的部位のための複数の異なるガイドRNAが含まれ得る。

【0223】

さらに、CRISPR系の成分は、任意の特定の様式または順序で互いに(複数の成分が存在する場合)およびポリマーと組み合わせられ得る。いくつかの実施態様において、ガイドRNAは、ポリマーと合わせる前にRNAエンドヌクレアーゼと複合体化される。さらに、または代わりに、ガイドRNAは、ポリマーと合わせる前にドナー核酸に(共有結合的にまたは非共有結合的に)連結され得る。

【0224】

組成物は、任意の特定のCRISPR系(すなわち、任意の特定のガイドRNA、RNA-誘導エンドヌクレアーゼ、またはドナー核酸)、これらの多くは公知である、に関して限定されない。にもかかわらず、さらなる説明のために、いくつかのこのような系の成分は以下に記載される。

【0225】

本明細書中で提供されるポリマーは、追加のポリマーとともに使用され得る。ポリマーは、任意の適切な方法(例えば、混合)で合わせられてポリマーナノ粒子を提供し得る。組成物は、任意の適切な量の第1ポリマー(本明細書中で提供される)および第2ポリマーを含み得る。例えば、組成物は、約1:99~99:1の第2ポリマーに対する第1ポリマーの比(重量)を含み得る。いくつかの実施態様において、組成物は、約1:1~約1:20(例えば、約1:1~約1:15、または約1:1~約1:10)の第2ポリマーに対する第1ポリマーの重量

比を含む。相対量もまた重量パーセント組成物として表され得る。いくつかの実施態様において、組成物は、合わせた第1および第2ポリマーの合計重量に基づいて約1 wt.%以上(例えば、約5 wt.%以上、約10 wt.%以上、約20 wt.%以上、約30 wt.%以上、または約40 wt.%以上)の第1ポリマーを含む。また、いくつかの実施態様において、組成物は、合わせた第1および第2ポリマーの合計重量に基づいて約60 wt.%以下(例えば、約50 wt.%以下)の第1ポリマーを含む。前述のパーセント組成物はまた、範囲として述べられ得る。従って、例えば、いくつかの実施態様において、組成物は、第1および第2ポリマーの合計重量に基づいて約1 wt.%～約60 wt.%(例えば、約5 wt.%～約60 wt.%、約10 wt.%～約60 wt.%、約20 wt.%～約60 wt.%、約30 wt.%～約60 wt.%、約5 wt.%～約50 wt.%、約10 wt.%～約50 wt.%、約20 wt.%～約50 wt.%,など)の第1ポリマーを含む。

10

【0226】

第1および必要に応じて第2ポリマーを含む組成物は、細胞または宿主、例えば哺乳動物またはヒトへの投与に適切な任意の担体、典型的には水性担体をさらに含み得る。担体中のポリマー(単数または複数)は、存在する場合、送達される化合物を部分的または完全にカプセル化するナノ粒子を形成する。

【0227】

第2ポリマー、核酸、およびポリペプチド化合物の例を含むポリマー組成物の種々の成分は、以下により詳細に記載される。

【0228】

追加ポリマー

1つの実施態様において、第1ポリマーおよび第2ポリマーを含む組成物が提供される。第1ポリマーは本明細書中で記載した通りであり、例えば、(i)疎水性側鎖を含むモノマー単位;(ii)ポリアミン基およびポリアルキレンオキシド基を含む側鎖を含むモノマー単位;および必要に応じて(iii)ポリアミン基を含みポリアルキレンオキシド基を含まない側鎖を含むモノマー単位を含むポリマーである。組成物の第1ポリマーの全ての局面および実施態様は、上記の通りである。

20

【0229】

第2ポリマーは、核酸またはポリペプチド送達のためのナノ粒子を形成するのに適切な任意のポリマーであり得る。いくつかの実施態様において、第2ポリマーは、(a)疎水性基を含む側鎖を有するモノマー単位、および(b)オリゴアミンまたはポリアミンを含む側鎖を有するモノマー単位を含む。いくつかの実施態様において、第2ポリマーはまた、イオン性基、必要に応じて7未満のpKaを有する、を含む側鎖を有するモノマー単位などの他のモノマーを含む。いくつかの実施態様において、第2ポリマーは、ポリアミド、ポリ-N-アルキルアミド、ポリエステル、ポリカーボネート、ポリカルバメート、またはそれらの組み合わせなどの加水分解性ポリマー骨格を含む。いくらかの実施態様において、加水分解性ポリマー骨格はポリアミドを含む。いくつかの実施態様において、第2ポリマーはポリアルキレンオキシド部分を含まない。いくつかの実施態様において、第2ポリマーはW02021/217082、W02020219776、W02020086910A1、W02020243370またはW02019210326A2のいずれかのポリマーである。

30

40

【0230】

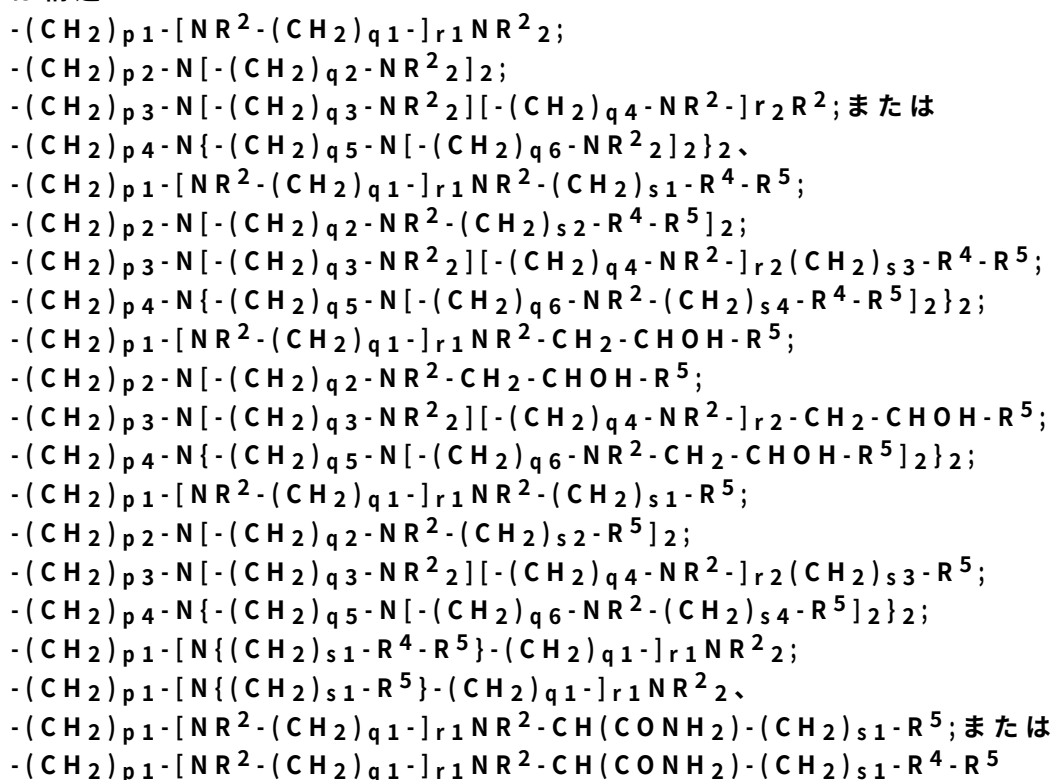
疎水性基を含む側鎖を有するモノマー単位は、任意の疎水性基を含み得る。疎水性基の例は、例えば、C₁-C₁₂(例えば、C₂-C₁₂、C₂-C₁₀、C₂-C₈、C₂-C₆、C₃-C₁₂、C₃-C₁₀、C₃-C₈、C₃-C₆、C₄-C₁₂、C₄-C₁₀、C₄-C₈、C₄-C₆、C₆-C₁₂、C₆-C₈、C₈-C₁₂、C₈-C₁₀、)アルキル基、C₂-C₁₂(例えば、C₂-C₆、C₃-C₁₂、C₃-C₁₀、C₃-C₈、C₃-C₆、C₄-C₁₂、C₄-C₁₀、C₄-C₈、C₄-C₆、C₆-C₁₂、C₆-C₈、C₈-C₁₂、C₈-C₁₀)アルケニル基、またはC₃-C₁₂(C₃-C₁₀、C₃-C₈、C₃-C₆、C₄-C₁₂、C₄-C₁₀、C₄-C₈、C₄-C₆、C₆-C₁₂、C₆-C₈、C₈-C₁₂、C₈-C₁₀)シクロアルキル基またはシクロアルケニル基を含む。いくらかの実施態様において、疎水性基はC₄-C₁₂アルキル基、アルケニル基、シクロアルキル基、またはシクロアルケニル基を含む。疎水性基はまた、ヘテロ原子(

50

例えば、ヘテロアルキル、ヘテロアルケニル、またはヘテロシクリル基)、またはアリアル基を含み得る。いくつかの実施態様において、疎水性基は8個より少ない炭素または6個より少ない炭素を含む。例えば、疎水性基は C_2-C_8 または C_2-C_6 (例えば、 C_3-C_8 または C_3-C_6)アルキル基を含み得る。アルキルまたはアルケニル基は分枝または直鎖であり得る。前述の実施態様のいずれかにおいて、疎水性基は、ポリマー骨格に直接または例えば、エステル、アミド、またはエーテル基を含み、必要に応じてアルキレンリンカー(例えば、メチレンまたはエチレンリンカー)をさらに含む連結を介して連結され得る。

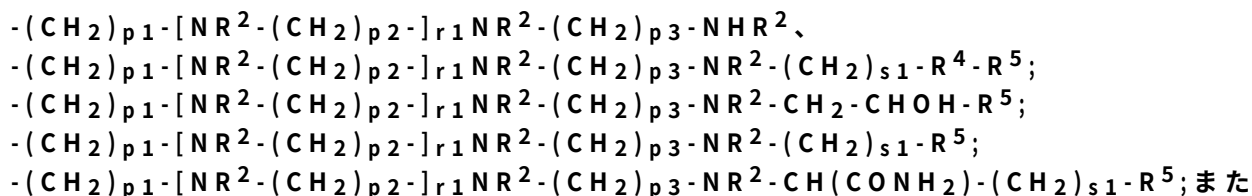
【0231】

第2ポリマーはまた、オリゴアミンまたはポリアミンを含む側鎖を有するモノマー単位を含む。本明細書中で使用される用語「オリゴアミン」は、2個または3個のアミン基を有する任意の化学部分をいい、そして用語「ポリアミン」は4個以上(例えば、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16個など)のアミン基を有する任意の化学部分をいう。アミン基は1級アミン基、2級アミン基、3級アミン基、またはそれらの任意の組み合わせであり得る。いくつかの実施態様において、オリゴアミンまたはポリアミンは構造:



であり、

式中、 $p1 \sim p4$ 、 $q1 \sim q6$ 、 $r1$ および $r2$ 、ならびに $s1 \sim s4$ はそれぞれ独立して1~5の整数であり;各場合の R^2 は独立して水素あるいは C_1-C_{12} アルキル基、アルケニル基、シクロアルキル基、またはシクロアルケニル基であるか、または R^2 は第2の R^2 と組み合わせさせて複素環基を形成し;各場合の R^4 は独立して $-C(O)O-$ 、 $-C(O)NH-$ 、 $-CH_2-O-C(O)-O-CH_2-$ 、 $-O-$ 、または $-S(O)(O)-$ であり;および各場合の R^5 は独立して、必要に応じて2~8個の3級アミンを含む、アルキル基、シクロアルキル基、アルケニル基、シクロアルケニル基、アリアル基、ヘテロアルキル基、複素環基、またはそれらの組み合わせ、あるいは組織特異的または細胞特異的標的化部位を含む置換基である。いくつかの実施態様において、オリゴアミンまたはポリアミンは構造:



は

$-(\text{CH}_2)_{p1}-[\text{NR}^2-(\text{CH}_2)_{p2}]_{r1}\text{NR}^2-(\text{CH}_2)_{p3}-\text{NR}^2-\text{CH}(\text{CONH}_2)-(\text{CH}_2)_{s1}-\text{R}^4-\text{R}^5$
であり、

式中、 $p1 \sim p3$ のそれぞれは独立して1～5の整数であり； $r1$ は0～5の整数であり； $s1$ は1～5の整数であり；各場合の R^2 は独立して水素あるいは $\text{C}_1\text{-C}_{12}$ アルキル基、アルケニル基、シクロアルキル基、またはシクロアルケニル基であるか、または R^2 は第2の R^2 と組み合わせさせて複素環基を形成し；各場合の R^4 は独立して $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-$ 、 $-\text{CH}_2\text{-O}-\text{C}(\text{O})\text{-O-CH}_2-$ 、 $-\text{O}-$ 、または $-\text{S}(\text{O})(\text{O})-$ であり；および各場合の R^5 は独立して、必要に応じて2～8個の3級アミンを含む、アルキル基、シクロアルキル基、アルケニル基、シクロアルケニル基、アリール基、ヘテロアルキル基、複素環基、またはそれらの組み合わせ、あるいは組織特異的または細胞特異的標的化部位を含む置換基である。

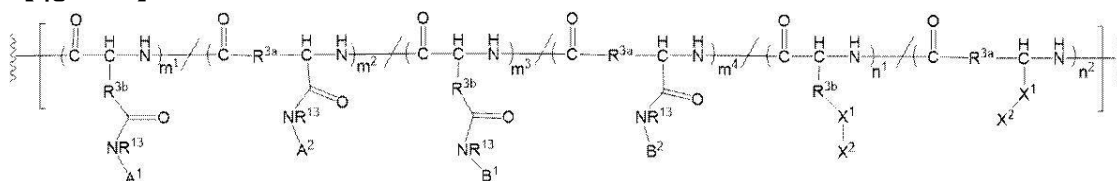
10

【0232】

例えば、いくつかの実施態様において、組成物は式5：

【0233】

【化60】



20

【0234】

のポリマーをさらに含み、

式中：

m^1 、 m^2 、 m^3 および m^4 のそれぞれは0～1000の整数であり、但し、 $m^1 + m^2 + m^3 + m^4$ の合計は5よりも大きく；

n^1 および n^2 のそれぞれは0～1000の整数であり、但し、 $n^1 + n^2$ の合計は2よりも大きく；

記号「/」は、それによって分離された単位がランダムにまたは任意の順序で結合していることを示し；

30

各場合の R^{3a} は独立してメチレンまたはエチレン基であり；

各場合の R^{3b} は独立してメチレンまたはエチレン基であり；

各 X^1 は独立して $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^{13}-$ 、 $-\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{S}(\text{O})(\text{O})-$ 、または結合であり；

各場合の R^{13} は独立して水素、アリール基、複素環基、 $\text{C}_1\text{-C}_{12}$ アルキル基、アルケニル基、シクロアルキル基、またはシクロアルケニル基であり、これらのいずれかは1個以上の置換基で置換されていてもよく；

各場合の X^2 は独立して、必要に応じて1個以上の1級、2級、または3級アミンを含む、 $\text{C}_1\text{-C}_{12}$ アルキル基、シクロアルキル基、アルケニル基、シクロアルケニル基、アリール基、ヘテロアルキル基、複素環基、またはそれらの組み合わせであり；これらのいずれかは1個以上の置換基で置換され得；

40

A^1 および A^2 はそれぞれ独立して式

$-(\text{CH}_2)_{p1}-[\text{NR}^2-(\text{CH}_2)_{q1}]_{r1}\text{NR}^2_2$ ；

$-(\text{CH}_2)_{p2}-\text{N}[-(\text{CH}_2)_{q2}-\text{NR}^2_2]_2$ ；

$-(\text{CH}_2)_{p3}-\text{N}[-(\text{CH}_2)_{q3}-\text{NR}^2_2][-(\text{CH}_2)_{q4}-\text{NR}^2_2]_{r2}\text{R}^2$ ；または

$-(\text{CH}_2)_{p4}-\text{N}\{-(\text{CH}_2)_{q5}-\text{N}[-(\text{CH}_2)_{q6}-\text{NR}^2_2]_2\}_2$

の基であり、

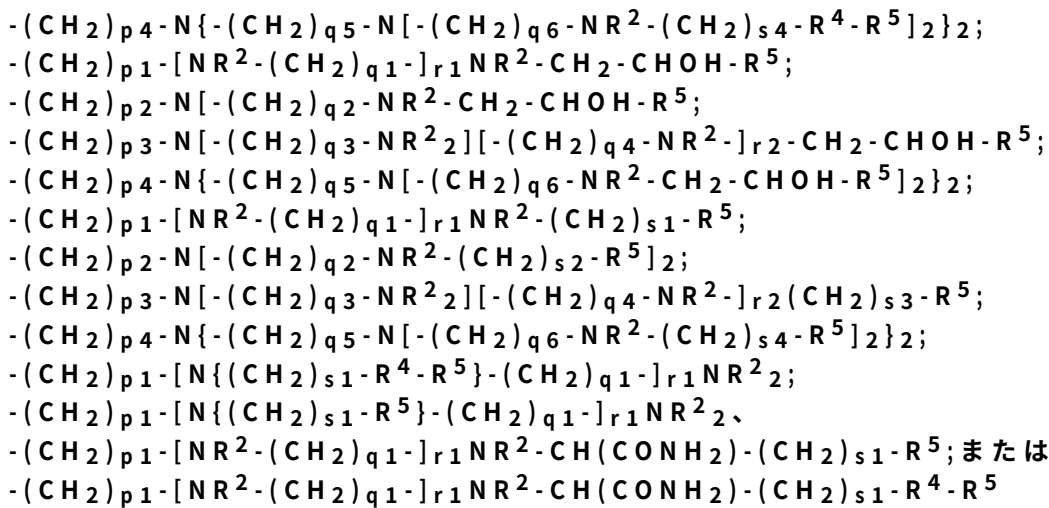
B^1 および B^2 はそれぞれ独立して

$-(\text{CH}_2)_{p1}-[\text{NR}^2-(\text{CH}_2)_{q1}]_{r1}\text{NR}^2-(\text{CH}_2)_{s1}-\text{R}^4-\text{R}^5$ ；

$-(\text{CH}_2)_{p2}-\text{N}[-(\text{CH}_2)_{q2}-\text{NR}^2-(\text{CH}_2)_{s2}-\text{R}^4-\text{R}^5]_2$ ；

$-(\text{CH}_2)_{p3}-\text{N}[-(\text{CH}_2)_{q3}-\text{NR}^2_2][-(\text{CH}_2)_{q4}-\text{NR}^2_2]_{r2}(\text{CH}_2)_{s3}-\text{R}^4-\text{R}^5$ ；

50



10

であり、

式中、 $p1 \sim p4$ 、 $q1 \sim q6$ 、 $r1$ および $r2$ 、ならびに $s1 \sim s4$ はそれぞれ独立して1～5の整数であり；各場合の R^2 は独立して水素あるいは C_1 - C_{12} アルキル基、アルケニル基、シクロアルキル基、またはシクロアルケニル基であるか、または R^2 は第2の R^2 と組み合わさって複素環基を形成し；各場合の R^4 は独立して $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}(\text{O})-\text{O}-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{O}-$ 、または $-\text{S}(\text{O})(\text{O})-$ であり；および各場合の R^5 は独立して、必要に応じて2～8個の3級アミンを含む、アルキル基、シクロアルキル基、アルケニル基、シクロアルケニル基、アリール基、ヘテロアルキル基、複素環基、またはそれらの組み合わせ、あるいは組織特異的または細胞特異的標的化部位を含む置換基である。

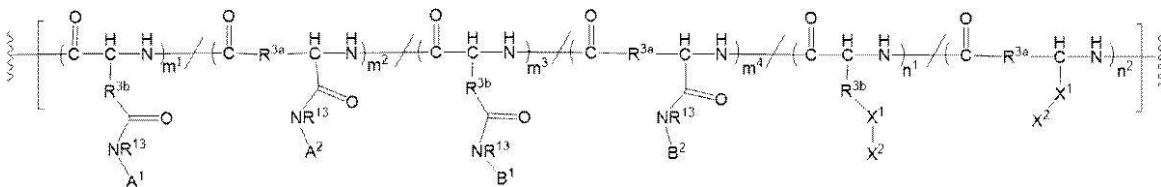
20

【0235】

あるいは、またはさらに、いくつかの実施態様において、組成物は式5'：

【0236】

【化61】



30

【0237】

のポリマーをさらに含み、

式中：

m^1 、 m^2 、 m^3 および m^4 のそれぞれは0～1000の整数であり、但し、 $m^1 + m^2 + m^3 + m^4$ の合計は5よりも大きく；

n^1 および n^2 のそれぞれは0～1000の整数であり、但し、 $n^1 + n^2$ の合計は2よりも大きく；

記号「/」は、それによって分離された単位がランダムにまたは任意の順序で結合していることを示し；

40

各場合の R^{3a} は独立してメチレンまたはエチレン基であり；

各場合の R^{3b} は独立してメチレンまたはエチレン基であり；

各 X^1 は独立して $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^{13}-$ 、 $-\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{S}(\text{O})(\text{O})-$ 、または結合であり；

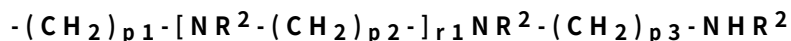
各場合の R^{13} は独立して水素、アリール基、複素環基、 C_1 - C_{12} アルキル基、アルケニル基、シクロアルキル基、またはシクロアルケニル基であり、これらのいずれかは1個以上の置換基で置換されていてもよく；

各場合の X^2 は独立して、必要に応じて1個以上の1級、2級、または3級アミンを含む、 C_1 - C_{12} アルキル基、シクロアルキル基、アルケニル基、シクロアルケニル基、アリール基、ヘテロアルキル基、複素環基、またはそれらの組み合わせであり；これらのいず

50

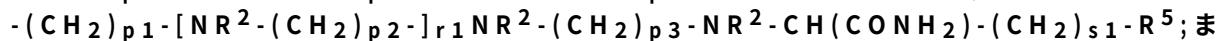
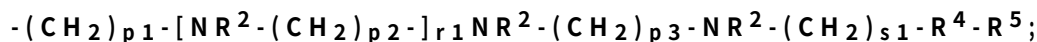
れかは1個以上の置換基で置換され得;

A¹およびA²はそれぞれ独立して式

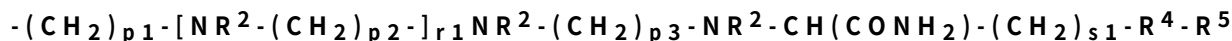


の基であり、

B¹およびB²はそれぞれ独立して



または



であり、

式中、p₁~p₃のそれぞれは独立して1~5の整数であり;r₁は0~5の整数であり;s₁は1~5の整数であり;各場合のR²は独立して水素あるいはC₁-C₁₂アルキル基、アルケニル基、シクロアルキル基、またはシクロアルケニル基であるか、またはR²は第2のR²と組み合わせさせて複素環基を形成し;各場合のR⁴は独立して-C(O)O-、-C(O)NH-、-CH₂-O-C(O)-O-CH₂-、-O-、または-S(O)(O)-であり;および各場合のR⁵は独立して、必要に応じて2~8個の3級アミンを含む、アルキル基、シクロアルキル基、アルケニル基、シクロアルケニル基、アリール基、ヘテロアルキル基、複素環基、またはそれらの組み合わせ、あるいは組織特異的または細胞特異的標的化部位を含む置換基である。

【0238】

式5または5'に従って、m¹、m²、m³およびm⁴のそれぞれは0~1000(例えば、0~500、0~200、0~100、または0~50)の整数であり、但し、m¹+m²+m³+m⁴の合計は5よりも大きく、例えば5-5000、5-2000、5-1000、5-500、5-100、または5-50である。いくつかの実施態様において、m¹+m²+m³+m⁴の合計は10よりも大きく、または20よりも大きい(例えば、10-5000、10-2000、10-1000、10-500、10-100、または10-50;または20-5000、20-2000、20-1000、20-500、20-100、または20-50)。さらに、n¹およびn²のそれぞれは0~1000(例えば、0~500、0~200、0~100、0~50、または0~25)の整数であり、但し、n¹+n²の合計は2よりも大きい(例えば、2-2000、2-1000、2-500、2-200、2-100、2-50、または2-25)。いくつかの実施態様において、n¹+n²の合計は5よりも大きく、または10よりも大きい(例えば、5-2000、5-1000、5-500、5-200、5-100、5-50、または5-25;または10-2000、10-1000、10-500、10-200、10-100、10-50、または10-25)。言い換えれば、第2ポリマーは基A¹、A²、B¹および/またはB²を含む少なくともいくつかのモノマー単位を含み、本明細書中、それぞれ集合的に「Aモノマー」および「Bモノマー」と呼ぶ。同様に、第2ポリマーは基X¹および/またはX²を含む少なくともいくつかのモノマー単位を含み、本明細書中、集合的に、「Xモノマー」と呼ぶ。いくつかの実施態様において、m¹およびm²はゼロであり、その結果第2ポリマーはA¹またはA²基を含まない。いくつかの実施態様において、m³およびm⁴はゼロであり、その結果第2ポリマーはB¹またはB²基を含まない。

【0239】

第2ポリマーはXモノマーに対するAおよびBモノマーの任意の適切な比を含み得る。いくつかの実施態様において、第2ポリマーは約25以下、および必要に応じて約1以上のXモノマーに対するAおよびBモノマーの比(例えば、(m¹+m²+m³+m⁴)/(n¹+n²)の比)を含む。例えば、Xモノマーに対するAおよびBモノマーの比は、約1~約25、約1~約20、約1~約10、約1~約5、約5~約25、約10~約25、または約15~約25であり得る。

【0240】

第2ポリマーがAモノマーおよびBモノマーの両方を含む実施態様において、第2ポリマーはBモノマーに対するAモノマーの任意の適切な比を含み得る。いくつかの実施態様

において、Bモノマーに対するAモノマーの比(例えば、 $(m^1+m^2)/(m^3+m^4)$)は、約20以下(例えば、約10以下、約5以下、約2以下、またはさらに約1以下)であり得る。いくつかの実施態様において、 $(m^1+m^2)/(m^3+m^4)$ の比は約0.2以上、例えば約0.5以上である。

【0241】

第2ポリマーは、任意の適切な構造タイプとして存在し得る。例えば、第2ポリマーは、交互ポリマー、ランダムポリマー、ブロックポリマー、グラフトポリマー、線状ポリマー、分枝ポリマー、環状ポリマー、またはそれらの組み合わせとして存在し得る。いくつかの実施態様において、第2ポリマーはランダムポリマー、ブロックポリマー、グラフトポリマー、またはそれらの組み合わせである。

10

【0242】

従って、式5および5'の構造において、モノマー(それらのそれぞれの側鎖 A^1 、 A^2 、 B^1 、 B^2 、 X^1 、および X^2 によって言及され得る)は、ランダムにまたは任意の順序で配置され得る。整数 m^1 、 m^2 、 m^3 、 m^4 、 n^1 、および n^2 は、鎖全体中に現れるそれぞれのモノマーの数を単に示すのみであり、そして、所定のモノマーのブロックまたは伸長がいくつかの実施態様において存在するかもしれないが、これらのモノマーの任意の特定の順序またはブロックを必ずしも意味または表すものではない。例えば、式5または5'の構造は、 $-A^1-A^2-B^1-B^2-$ 、 $-A^2-A^1-B^2-B^1-$ 、 $-A^1-B^1-A^2-B^2-$ などの順序でモノマーを含み得る。さらに、第2ポリマーは、Aおよび/またはBポリマーのブロック(例えば、 $[A\text{モノマー}]_{m^1+m^2} \cdot [B\text{モノマー}]_{m^3+m^4}$)を任意の順序で含み得る。第2ポリマーはAおよびBモノマーが点在する個々のXモノマー(例えば、 $-A-X-B-$ 、 $-A-B-X-$ 、 $-B-X-A$ など)を含み得、または第2ポリマーは、ポリマーの一端または両端で1個以上のXモノマー(例えば、Xモノマーのブロック)で「キャップされ」得る。同様に、第2ポリマーがAおよび/またはBモノマーのブロックを含む場合、第2ポリマーはAおよび/またはBモノマーのブロック間に点在したXモノマーのブロックを含み得、または第2ポリマーは、ポリマーの一端または両端で1個以上のXモノマー(例えば、Xモノマーのブロック)で「キャップされ」得る。いくつかの実施態様において、ポリペプチド(例えば、ポリアスパルタミド)骨格はアルファ/ベータ配置で配置され、その結果「1」および「2」モノマーは交互になり(例えば、 $-A^1-A^2-B^1-B^2-$ 、 $-A^2-A^1-B^2-B^1-$ 、 $-A^1-B^2-B^1-A^2-$ 、 $-A^2-B^1-B^2-A^1-$ 、 $-B^1-A^2-B^1-A^2-$ など)、ここで第2ポリマーはXモノマーでキャップされ、またはXモノマーは至る所に点在する。しかし、「A」および「B」側鎖(例えば、 A^1/A^2 および B^1/B^2)はポリマー骨格の至る所にランダムに分散され得る。

20

30

【0243】

ポリマー構造において、 R^{3a} および R^{3b} はそれぞれ独立してメチレンまたはエチレン基である。いくつかの実施態様において、 R^{3a} はエチレン基であり、そして R^{3b} はメチレン基であり;または R^{3a} はメチレン基であり、そして R^{3b} はエチレン基である。いくつかの実施態様において、 R^{3a} および R^{3b} はそれぞれエチレン基である。いくつかの実施態様において、 R^{3a} および R^{3b} はそれぞれメチレン基である。

【0244】

本明細書中に記載のポリマーにおいて、各 X^1 基は独立して $-C(O)O-$ 、 $-C(O)NR^{13}-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-S(O)(O)-$ 、または結合である。各 X^1 基は互いに同一であっても異なってもよい。いくつかの実施態様において、 X^1 は $-C(O)NR^{13}-$ である。いくつかの実施態様において、 X^1 は $-C(O)O-$ である。

40

【0245】

各場合の R^{13} は独立して水素あるいは C_1-C_{12} (例えば、 C_1-C_8 、 C_1-C_6 、または C_1-C_3)アルキル基、 C_2-C_{12} (例えば、 C_2-C_8 、 C_2-C_6 、または C_2-C_3)アルケニル基、 C_3-C_{12} (例えば、 C_3-C_8 、 C_3-C_6 、または C_3-C_5)シクロアルキル基、 C_3-C_{12} (例えば、 C_3-C_8 、 C_3-C_6 、または C_3-C_5)シクロアルケニル基、アリール基、または複素環基(例えば、1個、2個または3個のヘテロ原子を含む3-12、3-10、3-8、または3-6員複素環基)であり、これらのいずれかは1個以上の置換基で置換され得る。いくつかの実施態様にお

50

いて、 R^{13} は、直鎖または分岐であり得る、 C_1-C_{12} アルキル基(例えば、 C_1-C_{10} アルキル基; C_1-C_8 アルキル基; C_1-C_6 アルキル基; C_1-C_4 アルキル基、 C_1-C_3 アルキル基、あるいは C_1 または C_2 アルキル基)である。いくつかの実施態様において、各 R^{13} はメチルまたは水素である。いくつかの実施態様において、 R^{13} はメチルである;他の実施態様において、 R^{13} は水素である。各 R^{13} は独立して選ばれ、そして同一であっても異なってもよい;しかし、いくつかの実施態様において、各 R^{13} は同一である(例えば、全てメチルまたは全て水素)。

【0246】

各場合の X^2 は独立して C_1-C_{12} (例えば、 C_1-C_8 、 C_1-C_6 、または C_1-C_3)アルキル基、 C_2-C_{12} (例えば、 C_2-C_8 、 C_2-C_6 、または C_2-C_3)アルケニル基、 C_3-C_{12} (例えば、 C_3-C_8 、 C_3-C_6 、または C_3-C_5)シクロアルキル基、 C_3-C_{12} (例えば、 C_3-C_8 、 C_3-C_6 、または C_3-C_5)シクロアルケニル基、アリール基、または複素環基(例えば、1個、2個または3個のヘテロ原子を含む3-12、3-10、3-8、または3-6員複素環基)、またはそれらの組み合わせであり、これらのいずれかは1個以上の置換基で置換され得る。いくつかの実施態様において、 X^2 は必要に応じて1個以上の1級、2級、または3級アミンを含み得る。従って、各 X^2 は独立して選ばれ、そしてそれゆえ互いに同一であっても異なってもよい。いくつかの実施態様において、各場合の X^2 は独立して、必要に応じて1個以上の1級、2級、または3級アミンを含む、 C_1-C_{12} (例えば、 C_1-C_8 、 C_1-C_6 、または C_1-C_3)アルキル基、 C_2-C_{12} (例えば、 C_2-C_8 、 C_2-C_6 、または C_2-C_3)アルケニル基、 C_3-C_{12} (例えば、 C_3-C_8 、 C_3-C_6 、または C_3-C_5)シクロアルキル基、 C_3-C_{12} (例えば、 C_3-C_8 、 C_3-C_6 、または C_3-C_5)シクロアルケニル基、またはそれらの組み合わせである。いくつかの実施態様において、1個以上の(または全ての) X^2 基は独立して、 C_2-C_{12} (例えば、 C_3-C_{12} 、 C_3-C_8 、 C_3-C_6 、 C_4-C_{12} 、 C_4-C_6 、 C_6-C_{12} 、または C_8-C_{12})アルキル基またはアルケニル基、または C_3-C_{12} (例えば、 C_3-C_8 、 C_3-C_6 、 C_4-C_{12} 、 C_4-C_6 、 C_6-C_{12} 、または C_8-C_{12})シクロアルケニル基であり得る。他の実施態様において、1個以上の(または全ての) X^2 基は独立して、 C_1-C_8 (例えば、 C_1-C_6 、 C_1-C_4 、 C_1-C_3 、 C_2-C_8 、または C_2-C_6)アルキル基であり得る。前述のアルキルまたはアルケニル基のいずれかは直鎖または分岐であり得る。

【0247】

基 A^1 および A^2 は独立して選ばれ、そしてそれゆえ互いに同一であっても異なってもよい。同様に、基 B^1 および B^2 は独立して選ばれ、そしてそれゆえ互いに同一であっても異なってもよい。しかし、いくつかの実施態様において、 A^1 および A^2 は同一であり、および/または B^1 および B^2 は同一である。

【0248】

基 A^1 、 A^2 、 B^1 、および B^2 において、整数 $p_1 \sim p_4$ (すなわち、 p_1 、 p_2 、 p_3 、および p_4)、 $q_1 \sim q_6$ (すなわち、 q_1 、 q_2 、 q_3 、 q_4 、 q_5 、および q_6)、 r_1 、 r_2 、および $s_1 \sim s_4$ (すなわち、 s_1 、 s_2 、 s_3 、および s_4)は、それぞれ独立して1~5の整数(例えば、1、2、3、4、または5)である。しかし、いくつかの実施態様において、 r_1 は0~5の整数(例えば、0、1、2、3、4、または5)であり得る。いくつかの実施態様において、 $p_1 \sim p_4$ (すなわち、 p_1 、 p_2 、 p_3 、および p_4)、 $q_1 \sim q_6$ (すなわち、 q_1 、 q_2 、 q_3 、 q_4 、 q_5 、および q_6)、 r_1 、 r_2 および/または $s_1 \sim s_4$ は、それぞれ独立して1~3の整数(例えば、1、2、または3)である。いくつかの実施態様において、 $p_1 \sim p_4$ (すなわち、 p_1 、 p_2 、 p_3 、および p_4)、 $q_1 \sim q_6$ (すなわち、 q_1 、 q_2 、 q_3 、 q_4 、 q_5 、および q_6)、および/または $s_1 \sim s_4$ (すなわち、 s_1 、 s_2 、 s_3 、および s_4)はそれぞれ2である。いくつかの実施態様において、 $p_1 \sim p_4$ (すなわち、 p_1 、 p_2 、 p_3 、および p_4)および/または $q_1 \sim q_6$ (すなわち、 q_1 、 q_2 、 q_3 、 q_4 、 q_5 、および q_6)はそれぞれ2であり、そして r_1 、 r_2 、および $s_1 \sim s_4$ (すなわち、 s_1 、 s_2 、 s_3 、および s_4)はそれぞれ1である。

【0249】

各場合の R^2 は水素あるいは C_1-C_{12} (例えば、 C_1-C_8 、 C_1-C_6 、または C_1-C_3)アルキル基、 C_2-C_{12} (例えば、 C_2-C_8 、 C_2-C_6 、または C_2-C_3)アルケニル基、 C_3-C_{12} (例え

ば、 C_3-C_8 、 C_3-C_6 、または C_3-C_5)シクロアルキル基、 C_3-C_{12} (例えば、 C_3-C_8 、 C_3-C_6 、または C_3-C_5)シクロアルケニル基であり得るか、または R^2 は第2の R^2 と組み合わせさせて複素環基を形成する。いくつかの実施態様において、 R^2 は水素あるいは直鎖または分岐であり得る C_1-C_{12} アルキル(例えば、 C_1-C_{10} アルキル基; C_1-C_8 アルキル基; C_1-C_6 アルキル基; C_1-C_4 アルキル基、 C_1-C_3 アルキル基、または C_1 または C_2 アルキル基)である。いくつかの実施態様において、 R^2 はメチルである。他の実施態様において、 R^2 は水素であり得る。各 R^2 は独立しては独立して選ばれ、そして同一であっても異なってもよい。いくつかの実施態様において、各 R^2 は同一である(例えば、全てメチルまたは全て水素)。

【0250】

各場合の R^4 は独立して $-C(O)O-$ 、 $-C(O)NH-$ 、または $-S(O)(O)-$ である。いくつかの実施態様において、各場合の R^4 は独立して $-C(O)O-$ または $-C(O)NH-$ である。いくつかの実施態様において、各場合の R^4 は $-C(O)O-$ である。いくつかの実施態様において、各場合の R^4 は $-C(O)NH-$ である。

【0251】

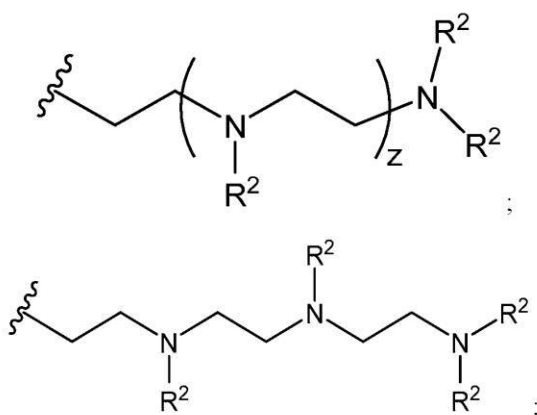
各場合の R^5 は独立して、必要に応じて2~8個の3級アミンを含む、アルキル基、シクロアルキル基、アルケニル基、シクロアルケニル基、アリール基、ヘテロアルキル基、複素環基、またはそれらの組み合わせ、あるいは組織特異的または細胞特異的標的化部位を含む置換基である。 R^5 は約2~約50個の炭素原子(例えば、約2~約40個の炭素原子、約2~約30個の炭素原子、約2~約20個の炭素原子、約2~約16個の炭素原子、約2~約12個の炭素原子、約2~約10個の炭素原子、または約2~約8個の炭素原子)を含み得る。いくつかの実施態様において、 R^5 は2~8個(すなわち、2、3、4、5、6、7、または8個)の3級アミンを含むヘテロアルキル基である。3級アミンはヘテロアルキル骨格の一部(すなわち、ヘテロアルキル基中の原子の最長連続鎖、またはペンダント置換基であり得る。従って、例えば、3級アミンを含むヘテロアルキル基は、2~8個の3級アミンを含む、アルキルアミノ基、アミノアルキル基、アルキルアミノアルキル基、アミノアルキルアミノ基などを提供し得る。

【0252】

いくつかの実施態様において、各 R^5 は独立して:

【0253】

【化62】



【0254】

10

20

30

40

50

10

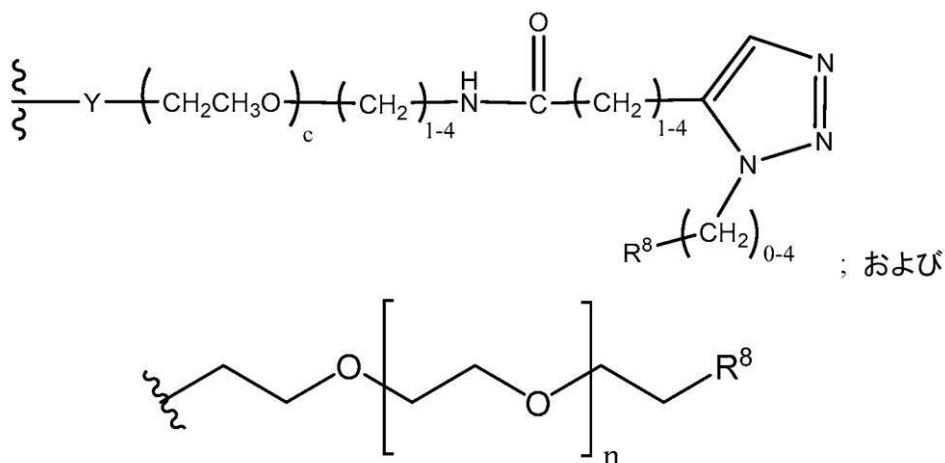


30

40

【 0 2 5 5 】

【化 6 4】



10

【0256】

から選ばれ、

式中、

各場合の R^2 は上記の通りであり；

R^7 は、1個以上のアミンで置換されていてもよい、 C_1-C_{50} アルキル基、アルケニル基、シクロアルキル基、またはシクロアルケニル基であり；

20

 z は1～5の整数であり； c は0～50の整数であり； Y は存在していてもよく、そして開裂可能なリンカーであり； N は0～50の整数であり；および

R^8 は組織特異的または細胞特異的標的化部位、 C_1-C_{12} アルキル基、アルケニル基、シクロアルキル基、またはシクロアルケニル基である。

【0257】

R^7 は、1個以上のアミンで置換されていてもよい、 C_1-C_{50} (例えば、 C_1-C_{40} 、 C_1-C_{30} 、 C_1-C_{20} 、 C_1-C_{10} 、 C_4-C_{12} 、または C_6-C_8)アルキル基、アルケニル基、シクロアルキル基、またはシクロアルケニル基であり得る。いくつかの実施態様において、 R^7 は、1個以上のアミンで置換されていてもよい、 C_4-C_{12} 、例えば C_6-C_8 、アルキル基、アルケニル基、シクロアルキル基、またはシクロアルケニル基である。いくつかの実施態様において、 R^7 は1個以上のアミンで置換されている。いくつかの実施態様において、 R^7 は2～8個(すなわち、2、3、4、5、6、7、または8個)の3級アミンで置換されている。3級アミンは、アルキル基の一部(すなわち、アルキル基骨格中に含まれる)またはペンドント置換基であり得る。

30

【0258】

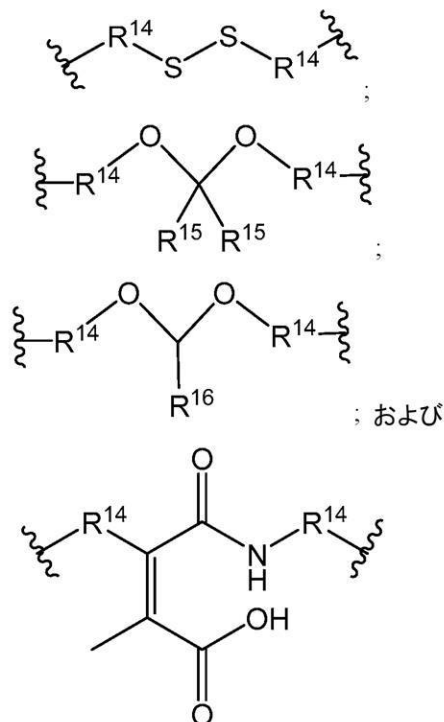
各場合の Y は必要に応じて存在する。本明細書中で使用される表現「必要に応じて存在する」は、必要に応じて存在すると指定された置換基が存在していてもしていなくてもよいこと、およびその置換基が存在しない場合、隣接する置換基が互いに直接結合していることを意味する。 Y が存在する場合、 Y は開裂可能なリンカーである。本明細書中で使用される表現「開裂可能なリンカー」は、開裂して2つの種を分離し得る2つの種を接続する任意の化学成分をいう。例えば、開裂可能なリンカーは、加水分解プロセス、光化学プロセス、ラジカルプロセス、酵素プロセス、電気化学プロセス、またはそれらの組み合わせによって開裂され得る。例示的な開裂可能なリンカーは：

40

【0259】

50

【化 6 5】



10

20

【0 2 6 0】

を含むが、これらに限定されず、式中、各場合の R^{14} は独立して C_1 - C_4 アルキル基であり、各場合の R^{15} は独立して水素、アリール基、複素環基(例えば、芳香族または非芳香族)、 C_1 - C_{12} アルキル基、アルケニル基、シクロアルキル基、またはシクロアルケニル基であり、および R^{16} は、1個以上の $-OCH_3$ 、 $-NHCH_3$ 、 $-N(CH_3)_2$ 、 $-SCH_3$ 、 $-OH$ 、またはそれらの組み合わせで置換されていてもよい6員芳香族またはヘテロ芳香族基である。

【0 2 6 1】

いくつかの実施態様において、 A^1 および A^2 のそれぞれは独立して式 $-(CH_2)_{p1}-[NH-(CH_2)_{q1}]_{r1}NH_2$ または $-(CH_2)_{p1}-[NH-(CH_2)_{q1}]_{r1}NHCH_3$ の基、または基 $-(CH_2)_2-NH-(CH_2)_2-NH_2$ または $-(CH_2)_2-NH-(CH_2)_2-NHCH_3$ または $-(CH_2)_2-NH-(CH_2)_2-NH_2$ である。いくつかの実施態様において、 A^1 および A^2 のそれぞれは独立して式 $-(CH_2)_{p1}-[N(R^2)]-(CH_2)_{q1}]_{r1}N(R^2)_2$ または $-(CH_2)_{p1}-[N(R^2)-(CH_2)_{q1}]_{r1}NH(R^2)$ 、式中、 R^2 はメチルまたはエチルである、の基;または基 $-(CH_2)_2-N(CH_3)-(CH_2)_2-NH_2$ または $-(CH_2)_2-N(CH_3)-(CH_2)_2-NHCH_3$ または $-(CH_2)_2-N(CH_3)-(CH_2)_2-N(CH_3)_2$ である。

30

【0 2 6 2】

さらに、またはあるいは、 B^1 および B^2 のそれぞれは式 $-(CH_2)_{p1}-[NH-(CH_2)_{q1}]_{r1}NH-(CH_2)_2-R^4-R^5$ の基、例えば基 $-(CH_2)_2-NH-(CH_2)_2-NH-(CH_2)_2-R^4-R^5$ または基 $-(CH_2)_2-NH-(CH_2)_2-NH-(CH_2)_2-C(O)-O-R^5$ 、式中、 R^4 および R^5 は上記の通りである、である。

40

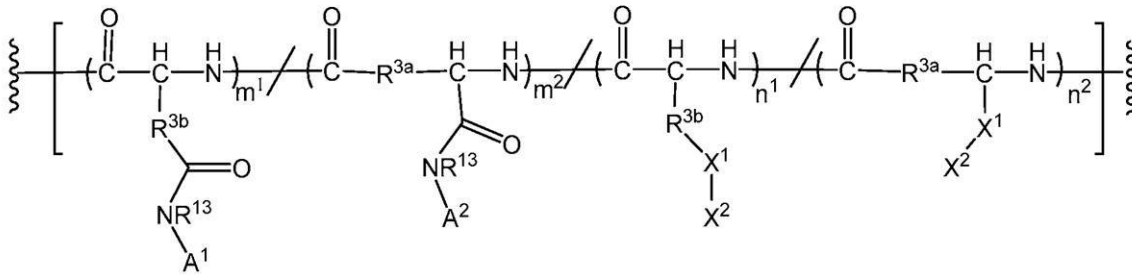
【0 2 6 3】

いくつかの実施態様において、式5または5'の構造を含むポリマーは、いかなるBモノマーも有しない(例えば、 m^3 および m^4 は両方とも0)。従って、第2ポリマーは式6:

【0 2 6 4】

50

【化 6 6】



式 4

10

【0 2 6 5】

の構造を含み得、

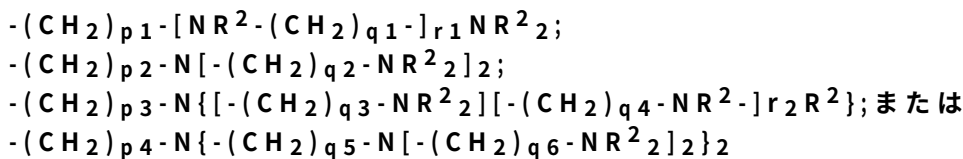
式中：

m^1 および m^2 のそれぞれは0～1000(例えば、0～500、0～200、0～100、または0～50)の整数であり、但し、 $m^1 + m^2$ の合計は5よりも大きい(例えば、5-2000、5-1000、5-500、5-100、または5-50)。いくつかの実施態様において、 $m^1 + m^2$ の合計は10よりも大きく、または20よりも大きい(例えば、10-5000、10-2000、10-1000、10-500、10-100、または10-50;または20-5000、20-2000、20-1000、20-500、20-100、または20-50)。さらに、 n^1 および n^2 のそれぞれは0～1000(例えば、0～500、0～200、0～100、0～50、または0-25)の整数であり、但し、 $n^1 + n^2$ の合計は2よりも大きい(例えば、2-2000、2-1000、2-500、2-200、2-100、2-50、または2-25)。いくつかの実施態様において、 $n^1 + n^2$ の合計は5よりも大きく、または10よりも大きい(例えば、5-2000、5-1000、5-500、5-200、5-100、5-50、または5-25;または10-2000、10-1000、10-500、10-200、10-100、10-50、または10-25)。

20

【0 2 6 6】

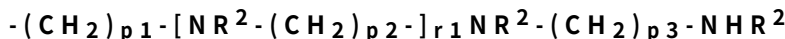
式6の構造を含むポリマーのいくつかの実施態様において、 A^1 および A^2 はそれぞれ独立して式



30

の基であり、式中、 $p1 \sim p4$ 、 $q1 \sim q6$ 、ならびに $r1$ および $r2$ はそれぞれ独立して1～5の整数(例えば、1-3の整数)であり;および各場合の R^2 は独立して水素あるいは C_1-C_{12} (例えば、 C_1-C_8 、 C_1-C_6 、または C_1-C_3)アルキル基、 C_2-C_{12} (例えば、 C_2-C_8 、 C_2-C_6 、または C_2-C_3)アルケニル基、 C_3-C_{12} (例えば、 C_3-C_8 、 C_3-C_6 、または C_3-C_5)シクロアルキル基、 C_3-C_{12} (例えば、 C_3-C_8 、 C_3-C_6 、または C_3-C_5)シクロアルケニル基である。式6の構造を含むポリマーのいくつかの実施態様において、 A^1 および A^2 はそれぞれ独立して式

40



の基であり、式中、 $p1 \sim p3$ のそれぞれは独立して1～5の整数(例えば、1、2、3、4、または5)であり; $r1$ は0～5の整数(例えば、0、1、2、3、4、または5)であり; $s1$ は1～5の整数(例えば、1、2、3、4、または5)であり;および各場合の R^2 は独立して水素あるいは C_1-C_{12} (例えば、 C_1-C_8 、 C_1-C_6 、または C_1-C_3)アルキル基、 C_2-C_{12} (例えば、 C_2-C_8 、 C_2-C_6 、または C_2-C_3)アルケニル基、 C_3-C_{12} (例えば、 C_3-C_8 、 C_3-C_6 、または C_3-C_5)シクロアルキル基、 C_3-C_{12} (例えば、 C_3-C_8 、 C_3-C_6 、または C_3-C_5)シクロアルケニル基である。いくつかの実施態様において、 R^2 置換基を含む基 A^1 および A^2 中の各窒素は、3級アミンであり、末端アミンが1級、2級、または3級アミン、あるいは、いくつかの実施態様において、2級または3級アミンであり得ることを除く。さらなる説

50

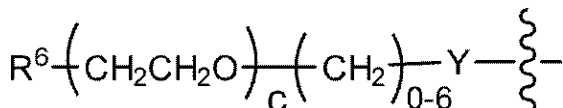
10

20

30

40

50



であり、

c は 0 ～ 50 の整数であり;

Yは存在していてもよく、そして開裂可能なリンカーであり;

m^1 、 m^2 、 m^3 および m^4 のそれぞれは0～1000の整数であり、但し、 $m^1 + m^2 + m^3 + m^4$ の合計は5よりも大きく；

n^1 および n^2 のそれぞれは $0 \sim 1000$ の整数であり、但し、 $n^1 + n^2$ の合計は 2 よりも大きく；

50

記号「/」は、それによって分離された単位がランダムにまたは任意の順序で結合していることを示し;

R^1 は水素、1個以上の置換基で置換されていてもよい、アリール基、複素環基、 C_1-C_{12} (例えば、 C_1-C_8 、 C_1-C_6 、または C_1-C_3)アルキルまたはヘテロアルキル基、 C_2-C_{12} (例えば、 C_2-C_8 、 C_2-C_6 、または C_2-C_3)アルケニル基、 C_3-C_{12} (例えば、 C_3-C_8 、 C_3-C_6 、または C_3-C_5)シクロアルキル基、または C_3-C_{12} (例えば、 C_3-C_8 、 C_3-C_6 、または C_3-C_5)シクロアルケニル基であり;および

R^6 は水素、1個以上のアミンで置換されていてもよい、アミノ基、アリール基、複素環基、 C_1-C_{12} (例えば、 C_1-C_8 、 C_1-C_6 、または C_1-C_3)アルキルまたはヘテロアルキル基、 C_2-C_{12} (例えば、 C_2-C_8 、 C_2-C_6 、または C_2-C_3)アルケニル基、 C_3-C_{12} (例えば、 C_3-C_8 、 C_3-C_6 、または C_3-C_5)シクロアルキル基、または C_3-C_{12} (例えば、 C_3-C_8 、 C_3-C_6 、または C_3-C_5)シクロアルケニル基;あるいは組織特異的または細胞特異的標的化部位である。式5Aの全ての他の局面は、上記式5および5'に関して記載の通りであり、それらの任意のおよび全ての実施態様を含む。

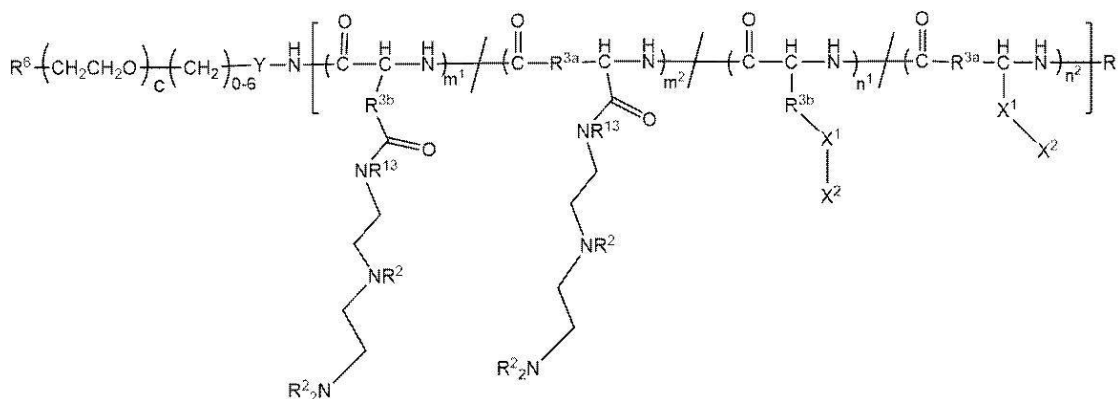
10

【0274】

いくつかの実施態様において、第2ポリマーは式5B:

【0275】

【化69】



20

【0276】

の構造を有し、

式中、

c は0~50の整数であり;

Y は存在していてもよく、そして開裂可能なリンカーであり;

m^1 および m^2 のそれぞれは0~1000の整数であり、但し、 $m^1 + m^2$ の合計は5よりも大きく;

n^1 および n^2 のそれぞれは0~1000の整数であり、但し、 $n^1 + n^2$ の合計は2よりも大きく;

記号「/」は、それによって分離された単位がランダムにまたは任意の順序で結合していることを示し;

40

R^1 は水素、1個以上の置換基で置換されていてもよい、アリール基、複素環基、 C_1-C_{12} (例えば、 C_1-C_8 、 C_1-C_6 、または C_1-C_3)アルキルまたはヘテロアルキル基、 C_2-C_{12} (例えば、 C_2-C_8 、 C_2-C_6 、または C_2-C_3)アルケニル基、 C_3-C_{12} (例えば、 C_3-C_8 、 C_3-C_6 、または C_3-C_5)シクロアルキル基、または C_3-C_{12} (例えば、 C_3-C_8 、 C_3-C_6 、または C_3-C_5)シクロアルケニル基であり;および

R^6 は水素、1個以上のアミンで置換されていてもよい、アミノ基、アリール基、複素環基、 C_1-C_{12} (例えば、 C_1-C_8 、 C_1-C_6 、または C_1-C_3)アルキルまたはヘテロアルキル基、 C_2-C_{12} (例えば、 C_2-C_8 、 C_2-C_6 、または C_2-C_3)アルケニル基、 C_3-C_{12} (例えば、 C_3-C_8 、 C_3-C_6 、または C_3-C_5)シクロアルキル基、または C_3-C_{12} (例えば、 C_3-C_8 、 C_3-C_6 、または C_3-C_5)シクロアルケニル基;あるいは組織特異的または細胞特異的標的化

50

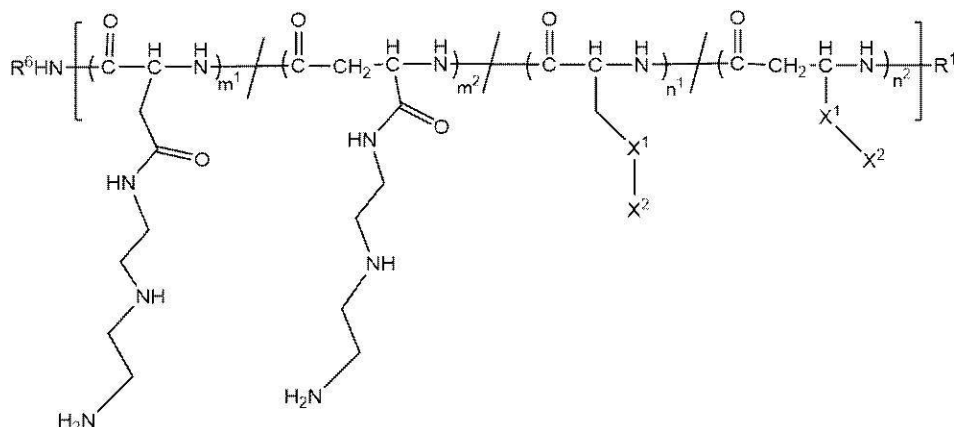
部位である。式5Bの全ての他の局面は、上記式5、式5' および式6に関して記載の通りであり、それらの任意のおよび全ての実施態様を含む。

【0277】

いくつかの実施態様において、第2ポリマーは式5C:

【0278】

【化70】



10

【0279】

の構造を有し、

20

式中、

m^1 および m^2 のそれぞれは0~1000の整数であり、但し、 $m^1 + m^2$ の合計は5よりも大きく;

n^1 および n^2 のそれぞれは0~1000の整数であり、但し、 $n^1 + n^2$ の合計は2よりも大きく;

記号「/」は、それによって分離された単位がランダムにまたは任意の順序で結合していることを示し;

R^1 は水素、1個以上の置換基で置換されていてもよい、アリール基、複素環基、 C_1-C_{12} (例えば、 C_1-C_8 、 C_1-C_6 、または C_1-C_3) アルキルまたはヘテロアルキル基、 C_2-C_{12} (例えば、 C_2-C_8 、 C_2-C_6 、または C_2-C_3) アルケニル基、 C_3-C_{12} (例えば、 C_3-C_8 、 C_3-C_6 、または C_3-C_5) シクロアルキル基、または C_3-C_{12} (例えば、 C_3-C_8 、 C_3-C_6 、または C_3-C_5) シクロアルケニル基であり; および

30

R^6 は水素、1個以上のアミンで置換されていてもよい、アミノ基、アリール基、複素環基、 C_1-C_{12} (例えば、 C_1-C_8 、 C_1-C_6 、または C_1-C_3) アルキルまたはヘテロアルキル基、 C_2-C_{12} (例えば、 C_2-C_8 、 C_2-C_6 、または C_2-C_3) アルケニル基、 C_3-C_{12} (例えば、 C_3-C_8 、 C_3-C_6 、または C_3-C_5) シクロアルキル基、または C_3-C_{12} (例えば、 C_3-C_8 、 C_3-C_6 、または C_3-C_5) シクロアルケニル基; あるいは組織特異的または細胞特異的標的化部位である。式5Cの全ての他の局面は、式5、式5' および式6に関して記載の通りであり、それらの任意のおよび全ての実施態様を含む。

【0280】

40

いくつかの実施態様において、 R^1 および/または R^6 は C_1-C_{12} アルキル (例えば、 C_1-C_{10} アルキル基; C_1-C_8 アルキル基; C_1-C_6 アルキル基; C_1-C_4 アルキル基、 C_1-C_3 アルキル基、または C_1 または C_2 アルキル基) であり、これらは直鎖または分岐であり得、1個以上の置換基で置換されていてもよい。いくつかの実施態様において、ヘテロアルキルまたはアルキル基は、1個以上のアミン、例えば、2~8個 (すなわち、2、3、4、5、6、7、または8個) の3級アミンを含むか、またはこれらで置換されている。3級アミンは、ヘテロアルキル骨格鎖の一部またはペンダント置換基であり得る。

【0281】

第2ポリマーは任意の適切なポリマーであり得、但しポリマーは前述のポリマー構造を含む。いくつかの実施態様において、第2ポリマーは、式5または5' の構造を有するポリ

50

マーブロックおよびポリアルキレンオキシド、ポリ乳酸、またはポリグリコール酸ブロックなどの1個以上の他のポリマーブロックを含むブロックコポリマーである。しかし、組成物の第2ポリマーはこのような追加のポリマーブロックを必ずしも含む必要はない。いくつかの実施態様において、第2ポリマーは、ポリマーの側鎖中にポリアルキレンオキシド、ポリ乳酸、またはポリグリコール酸を含まない。いくつかの実施態様において、第2ポリマーは、ポリマーの骨格中またはいずれかの末端にポリアルキレンオキシド、ポリ乳酸、またはポリグリコール酸を含まない。いくつかの実施態様において、第2ポリマーは、ポリアルキレンオキシド、ポリ乳酸、またはポリグリコール酸を全く含まない。さらに他の実施態様において、第2ポリマーは、式5または5'の構造中に示される以外のいかなる追加のポリマー単位も含まず、任意の適切な末端基を含み得る。いくつかの実施態様において、ポリマーは、組織特異的または細胞特異的標的化部位を含む置換基をさらに含む。

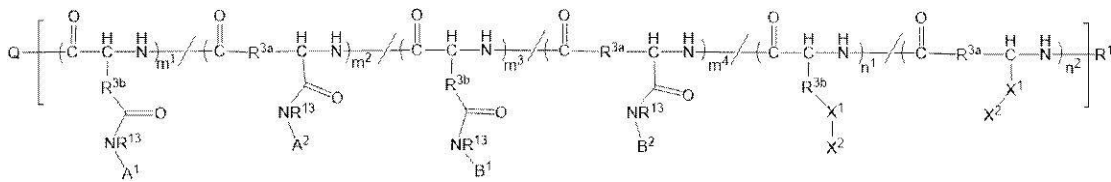
10

【0282】

いくつかの実施態様において、第2ポリマーは式5A'：

【0283】

【化71】



20

【0284】

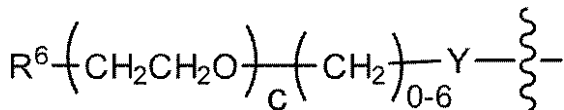
の構造を有し、

式中、

Qは式：

【0285】

【化72】



30

【0286】

であり、

cは2~200(例えば、2~150、2~100、2~50、10~200、10~150、10~100、10~50、25~200、25~150、25~100、25~50、50~200、50~150、または50~100)の整数であり；

Yは存在していてもよく、そして開裂可能なリンカーであり；

および全ての他の置換基は、式5、5'、および6に関して記載の通りであり、それらの任意のおよび全ての実施態様を含む。

40

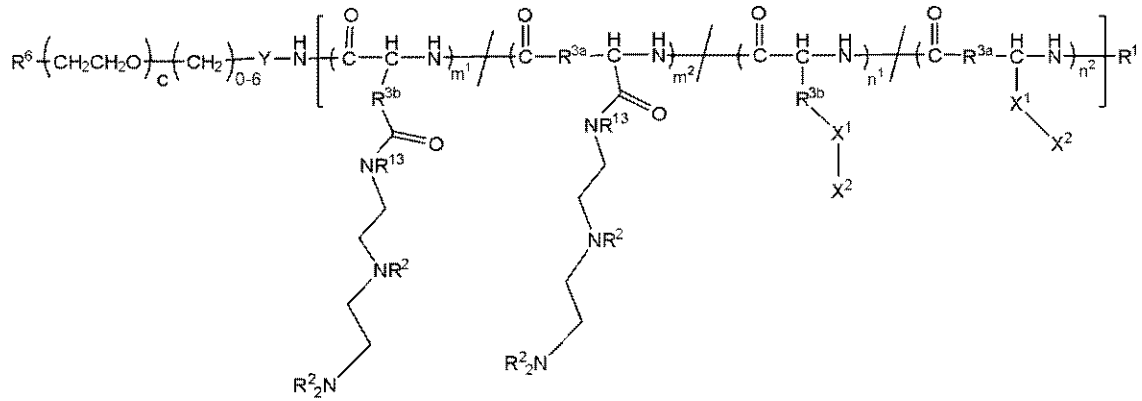
【0287】

いくつかの実施態様において、第2ポリマーは式5B'：

【0288】

50

【化 7 3】



10

【0289】

の構造を有し、
式中、

cは2～200(例えば、2～150、2～100、2～50、10～200、10～150、10～100、10～50、25～200、25～150、25～100、25～50、50～200、50～150、または50～100)の整数であり；

Yは存在していてもよく、そして開裂可能なリンカーであり；

および全ての他の置換基は、式5、5'、および6に関して記載の通りであり、それらの任意のおよび全ての実施態様を含む。

20

【0290】

本明細書中で提供される第2ポリマーの非限定例は、例えば：

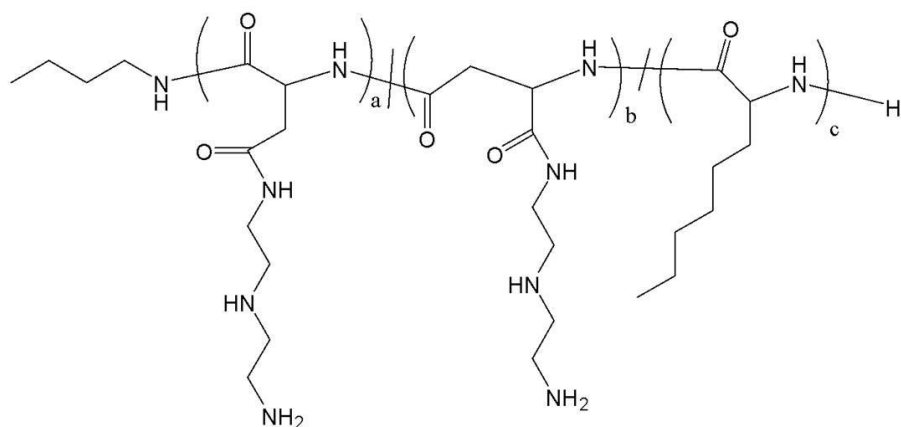
【0291】

30

40

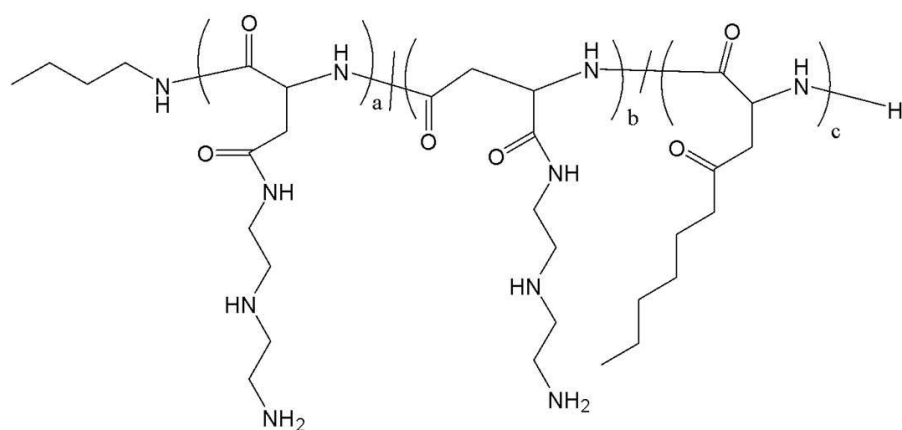
50

【化 7 4】



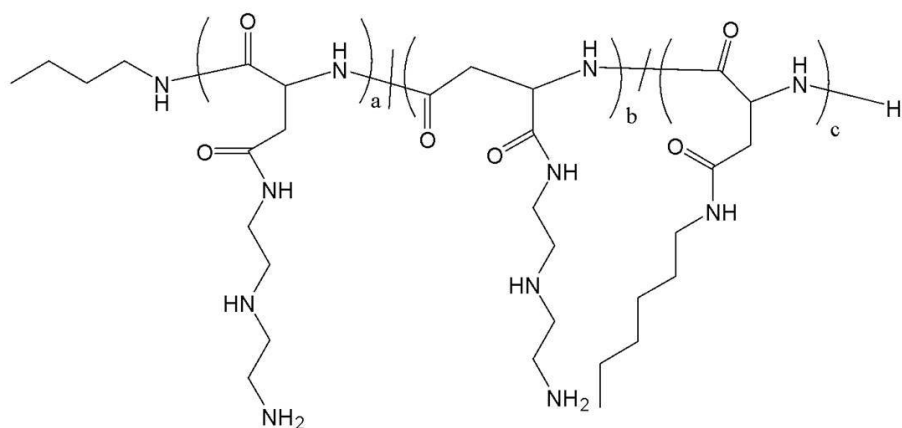
ポリマー 1

10



ポリマー 2

20



ポリマー 3

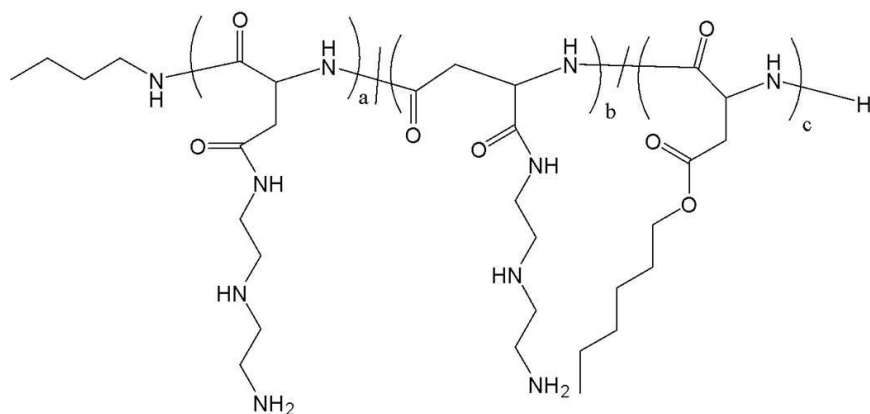
30

40

【 0 2 9 2】

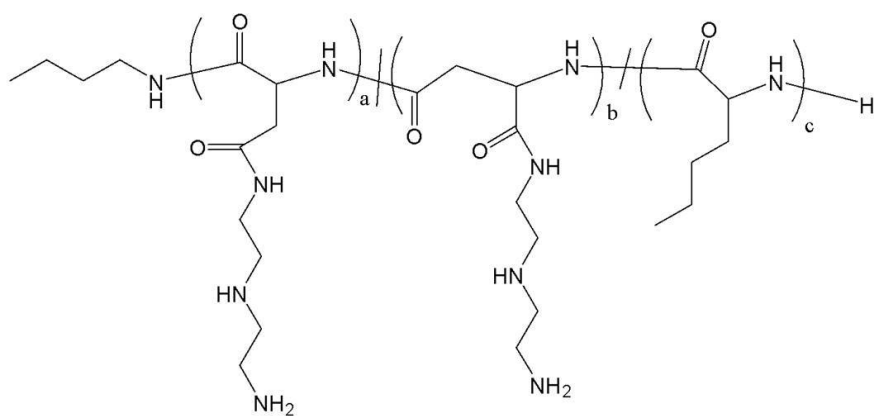
50

【化 7 5】



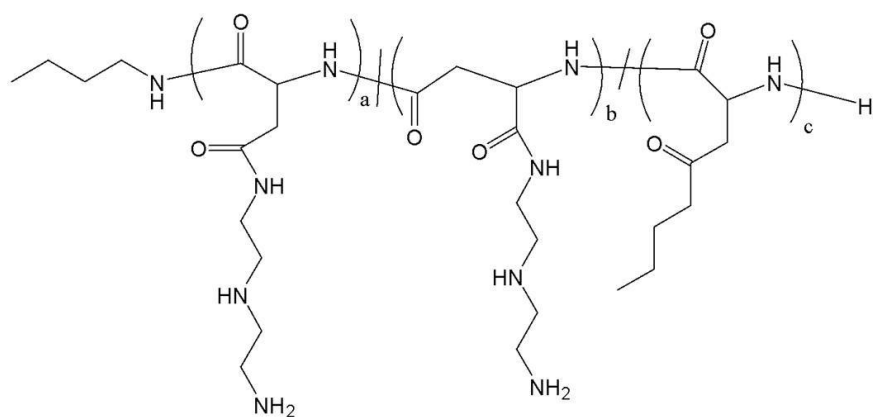
ポリマー 4

10



ポリマー 5

20



ポリマー 6

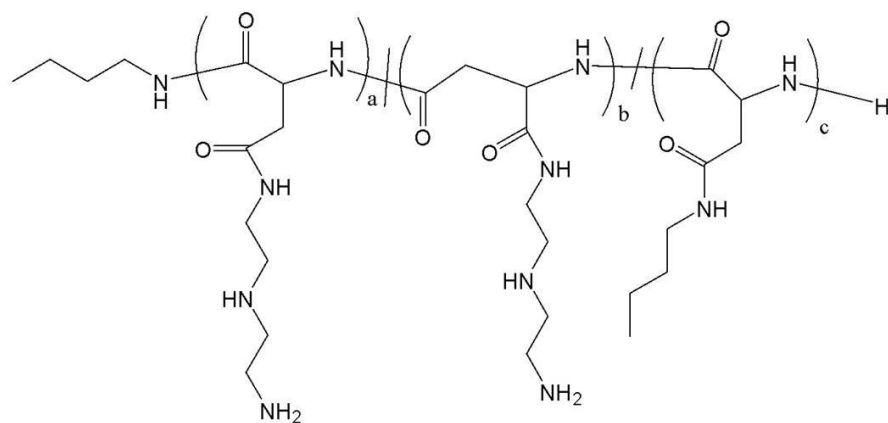
30

40

【 0 2 9 3】

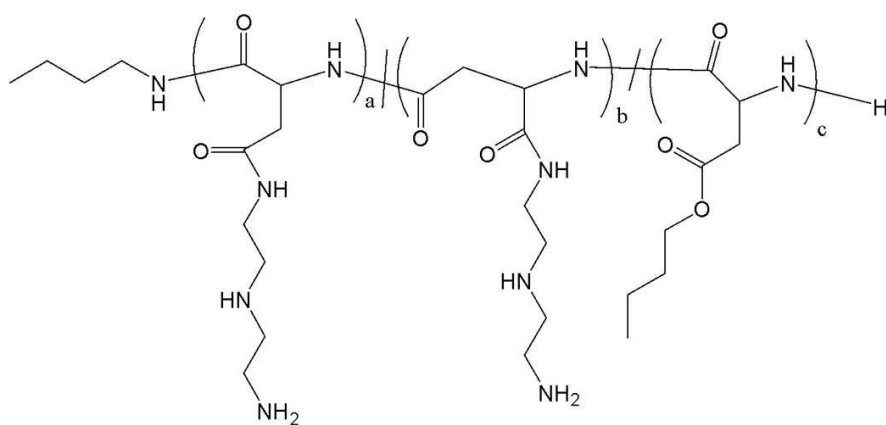
50

【化 7 6】



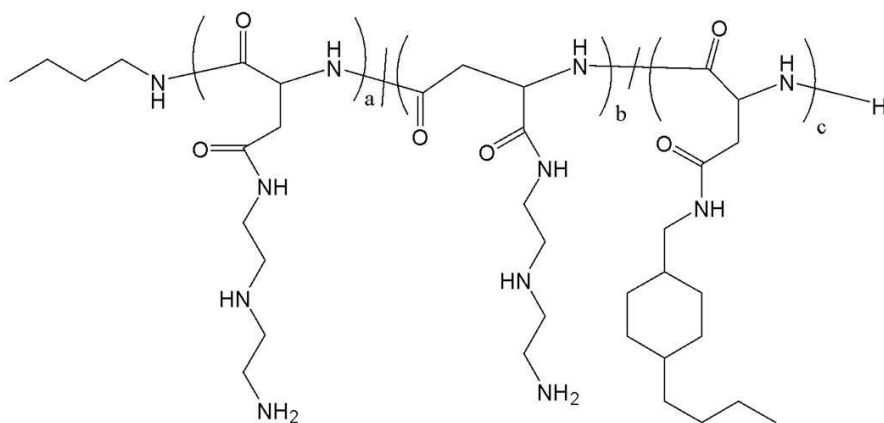
ポリマー 7

10



ポリマー 8

20



ポリマー 9

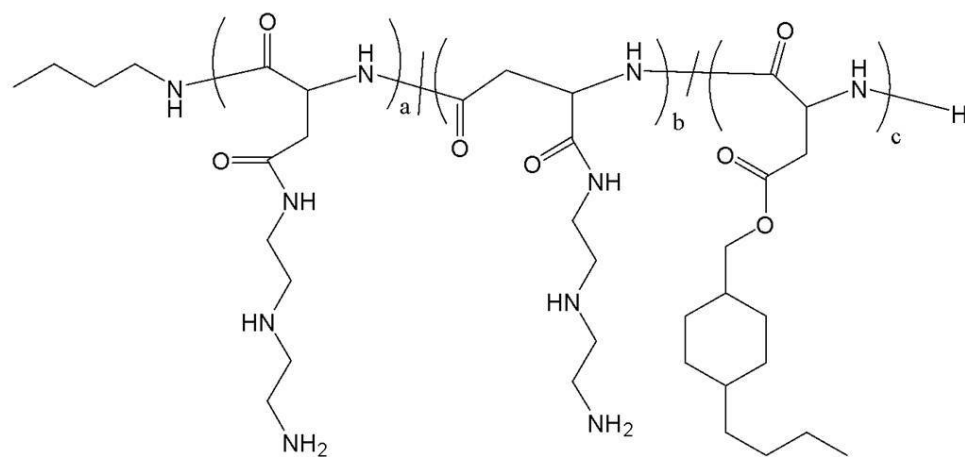
30

40

【 0 2 9 4】

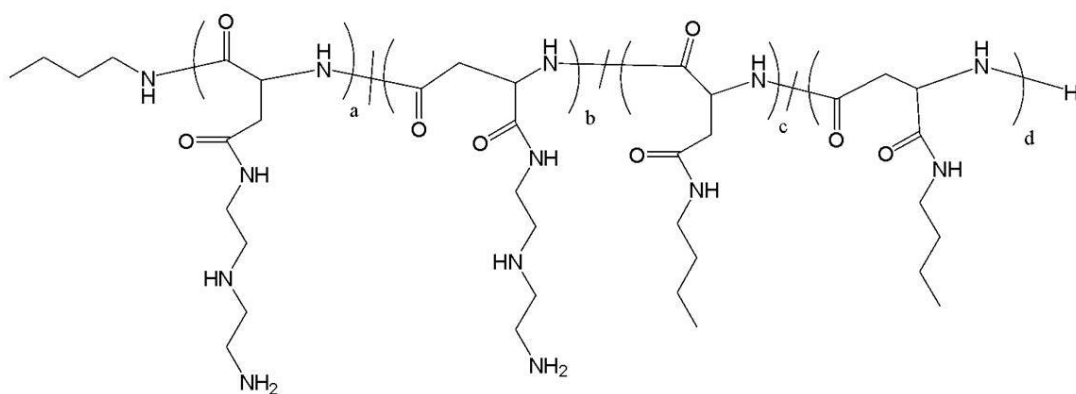
50

【化 7 7】



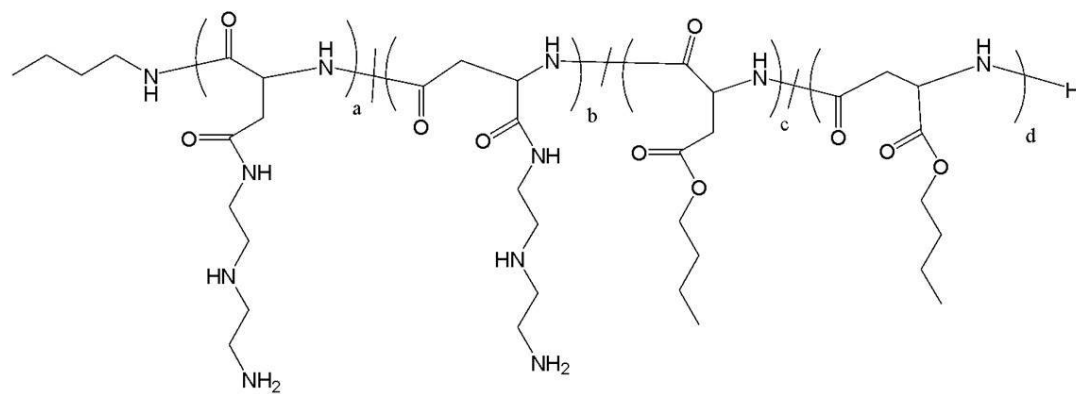
ポリマー 10

10



ポリマー 11

20



ポリマー 12

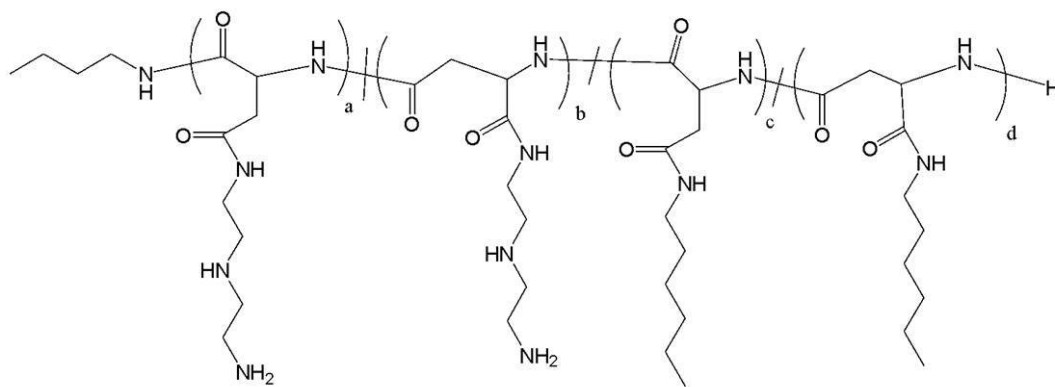
30

40

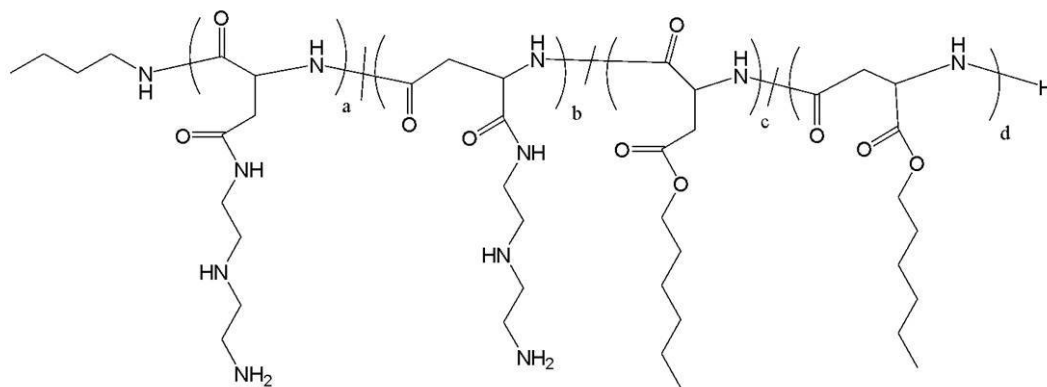
【 0 2 9 5】

50

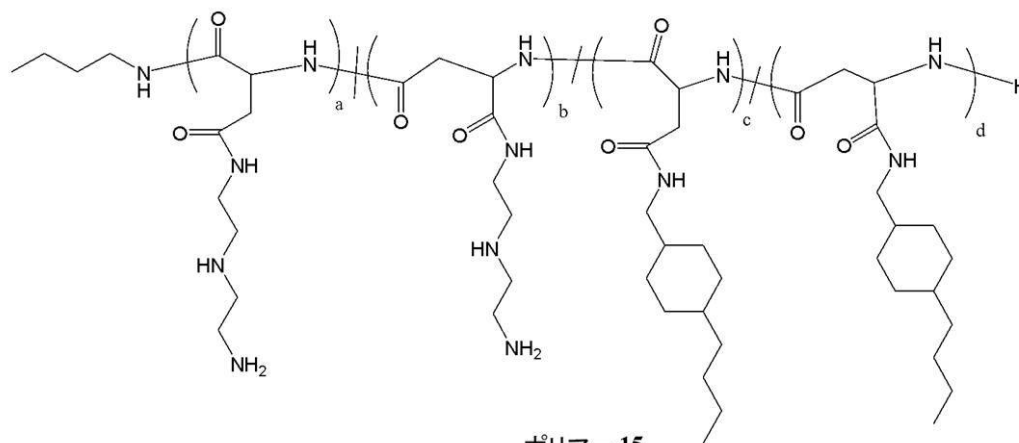
【化 7 8】



ポリマー 13



ポリマー 14



ポリマー 15

【 0 2 9 6】

10

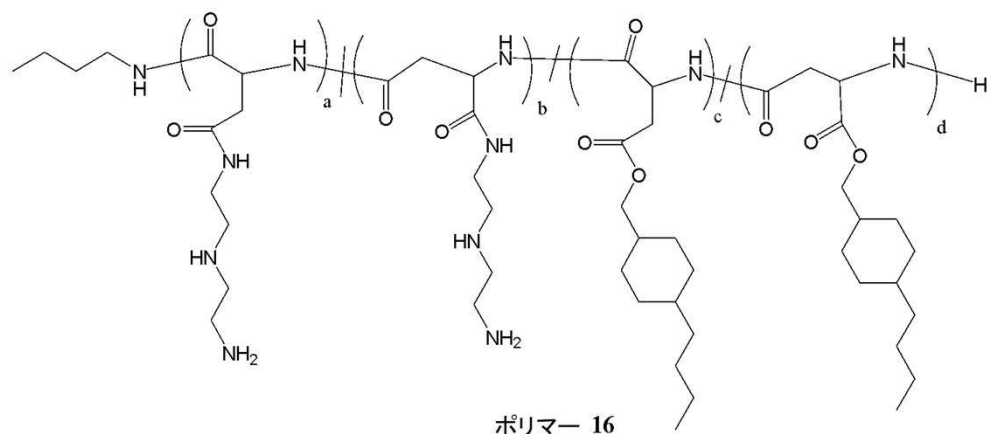
20

30

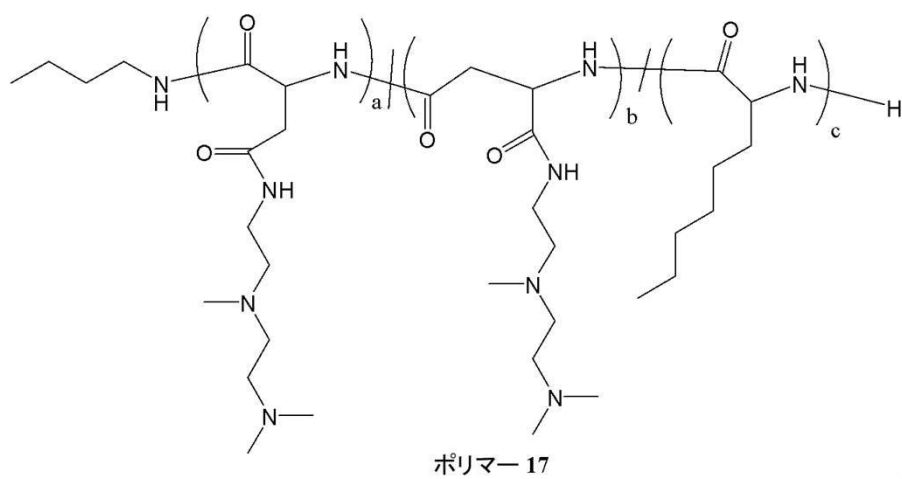
40

50

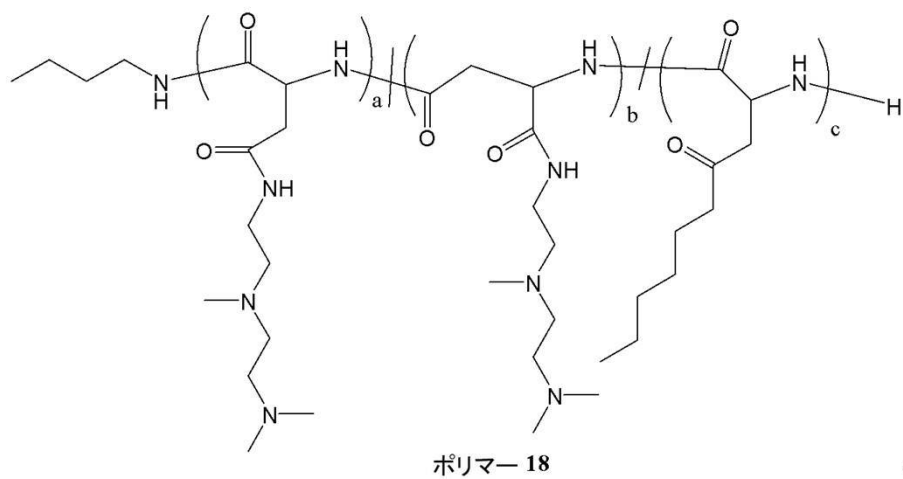
【化 7 9】



10



20



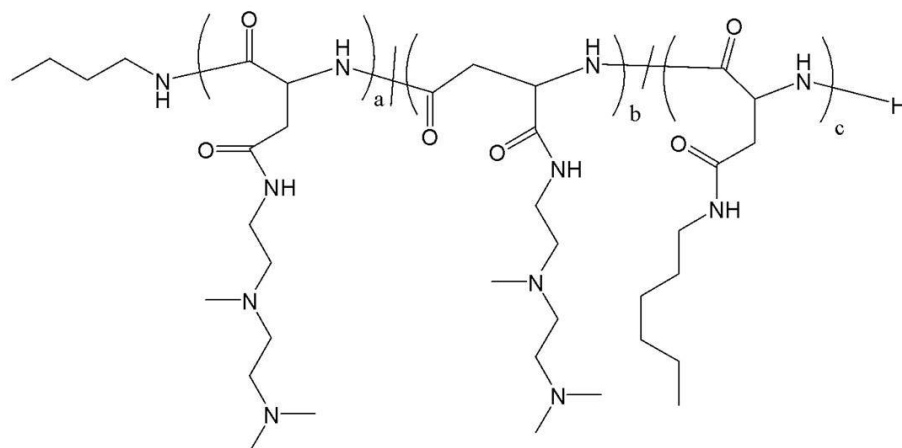
30

40

【 0 2 9 7】

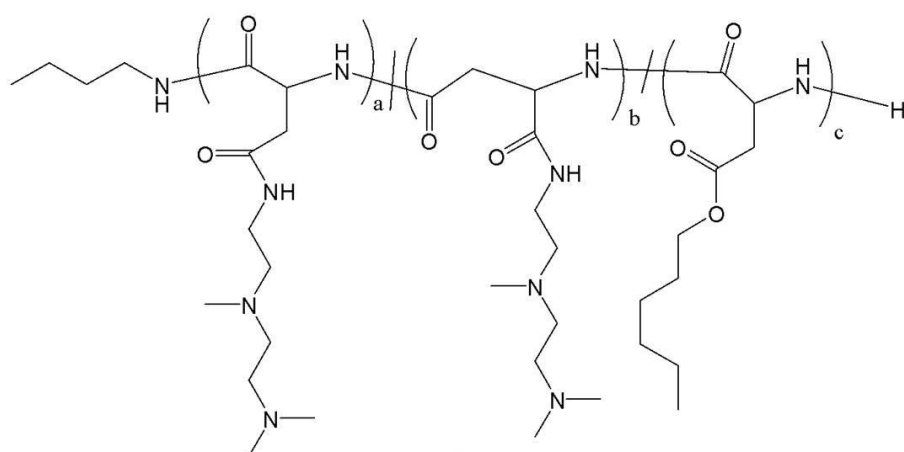
50

【化 8 0】



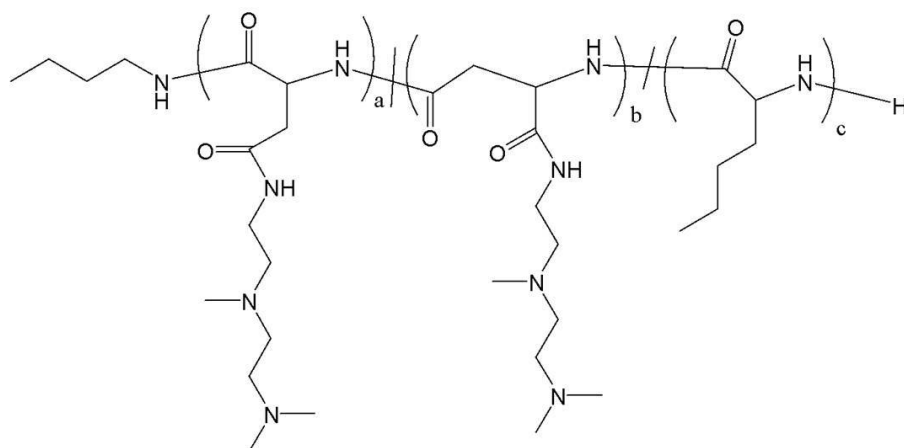
ポリマー 19

10



ポリマー 20

20



ポリマー 21

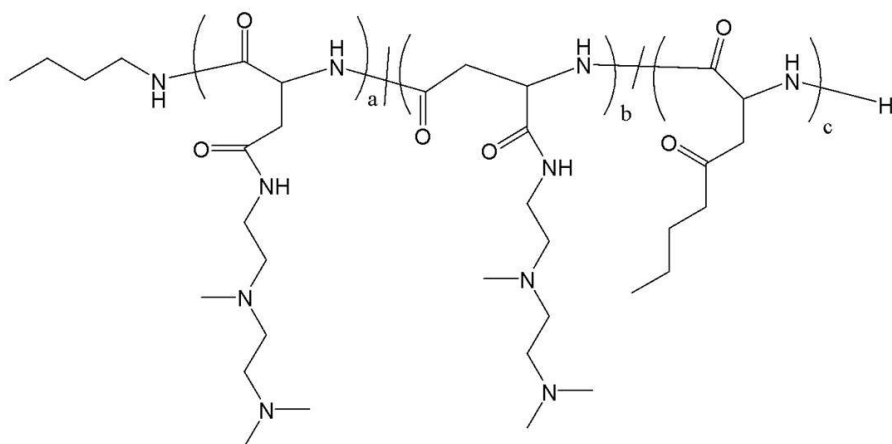
30

40

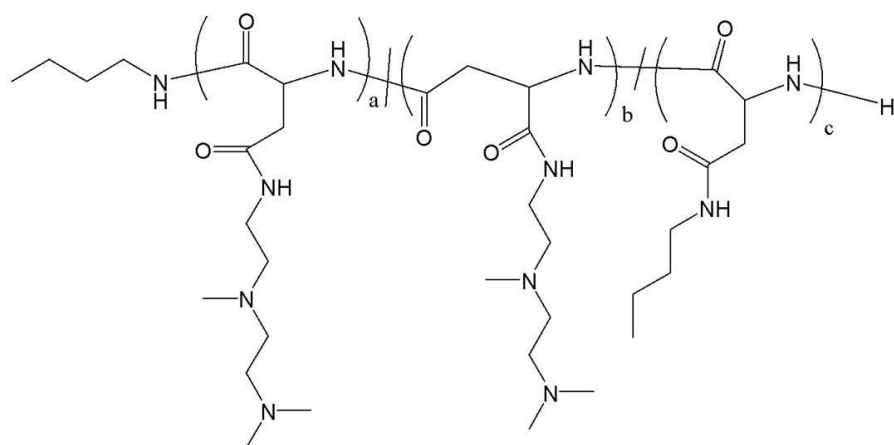
【 0 2 9 8】

50

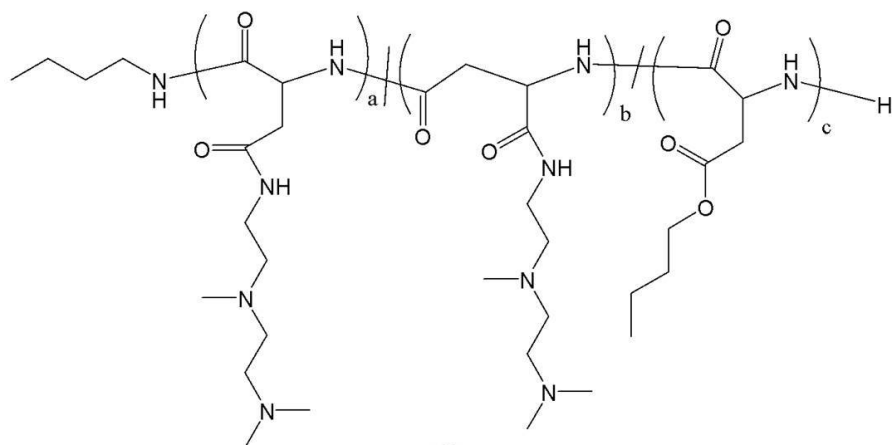
【化 8 1】



ポリマー 22



ポリマー 23



ポリマー 24

【 0 2 9 9 】

10

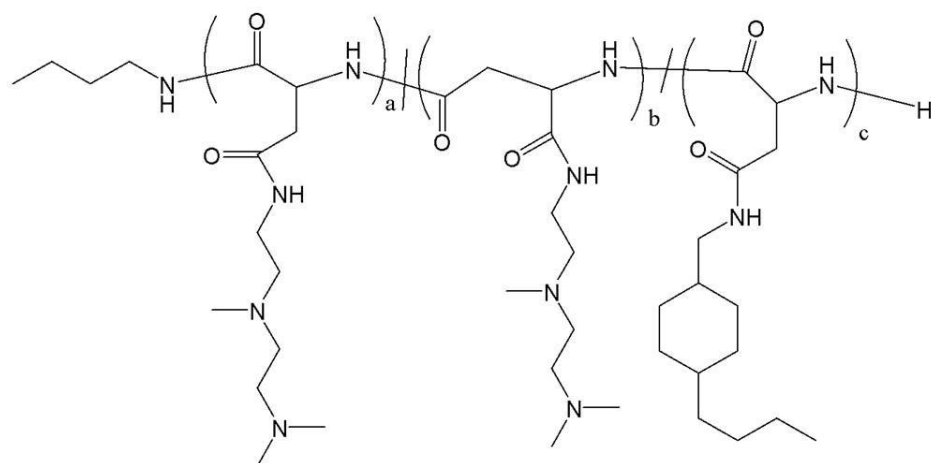
20

30

40

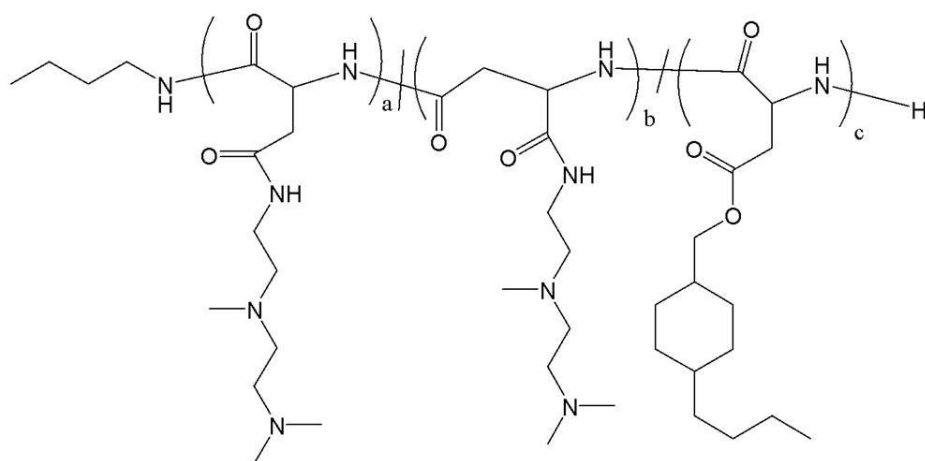
50

【化 8 2】



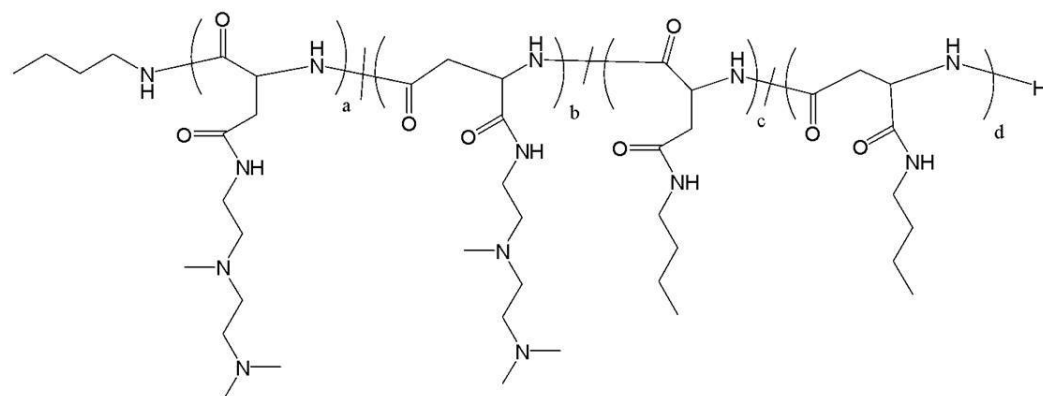
ポリマー 25

10



ポリマー 26

20



ポリマー 27

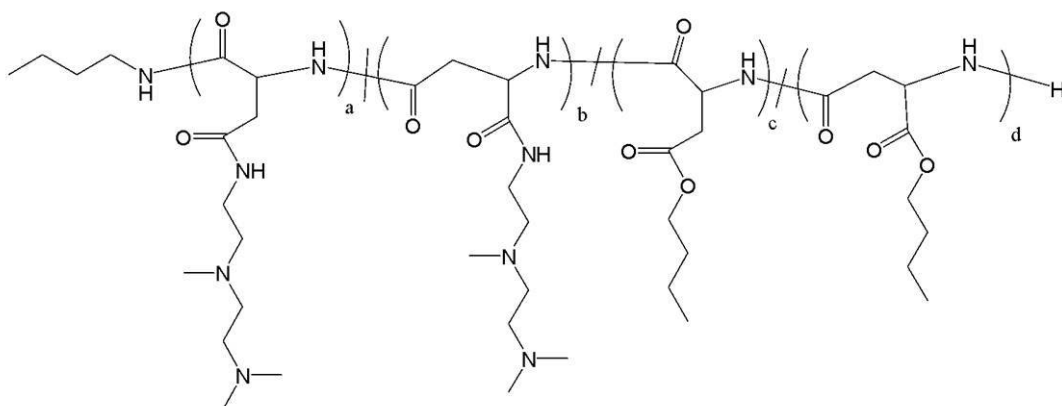
30

40

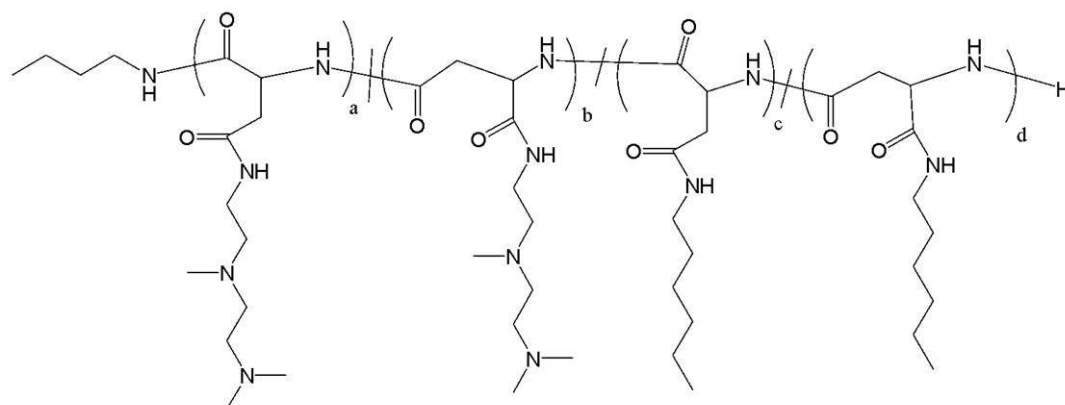
【 0 3 0 0】

50

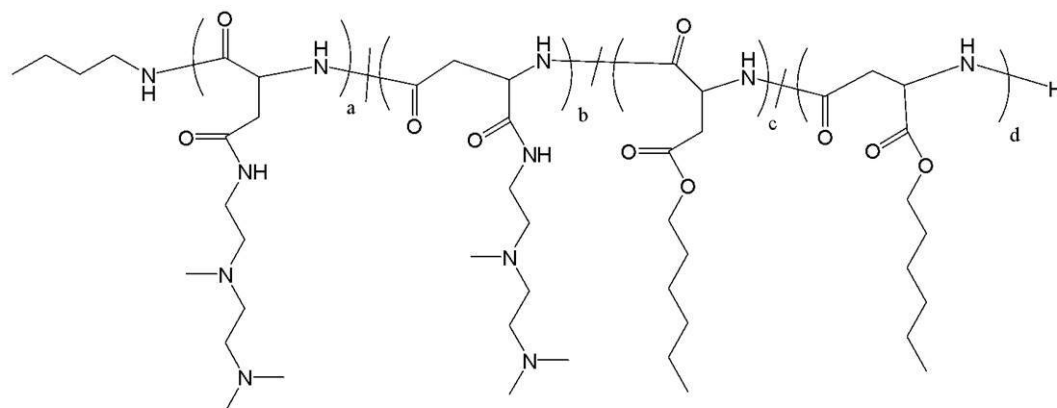
【化 8 3】



ポリマー 28



ポリマー 29



ポリマー 30

【 0 3 0 1】

10

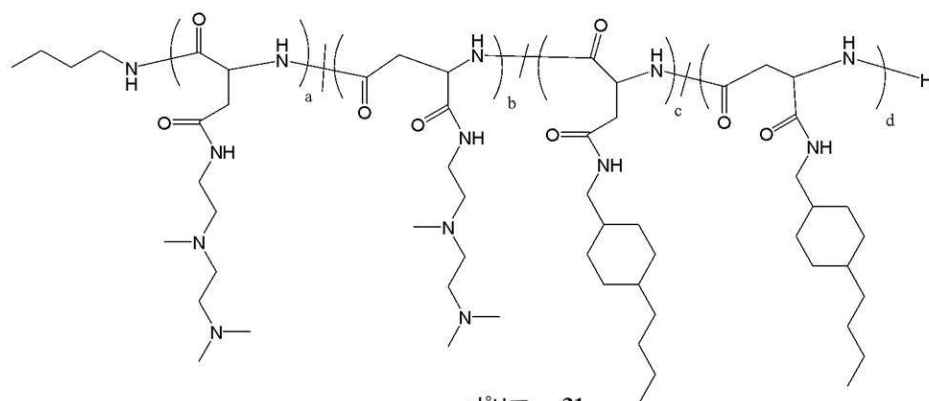
20

30

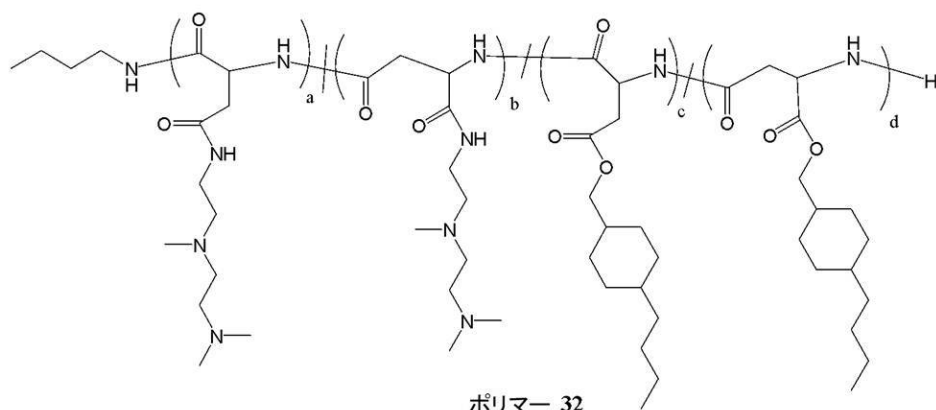
40

50

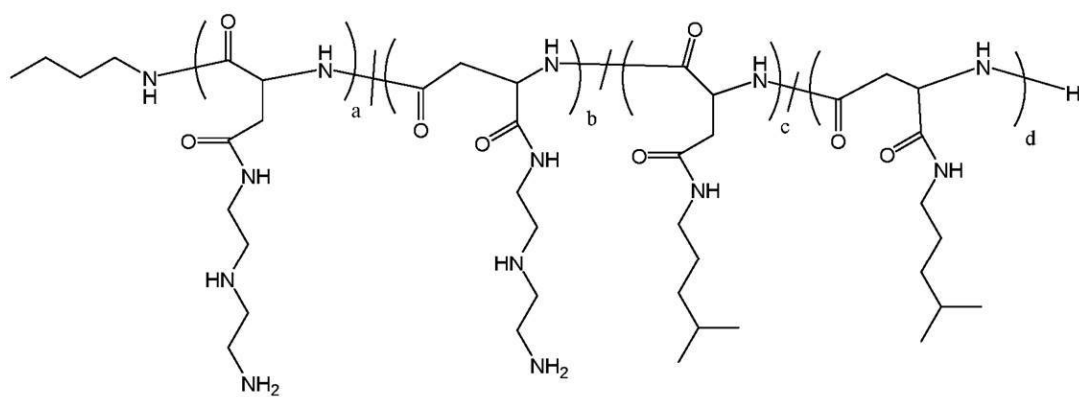
【化 8 4】



ポリマー 31



ポリマー 32



ポリマー 33

【 0 3 0 2】

10

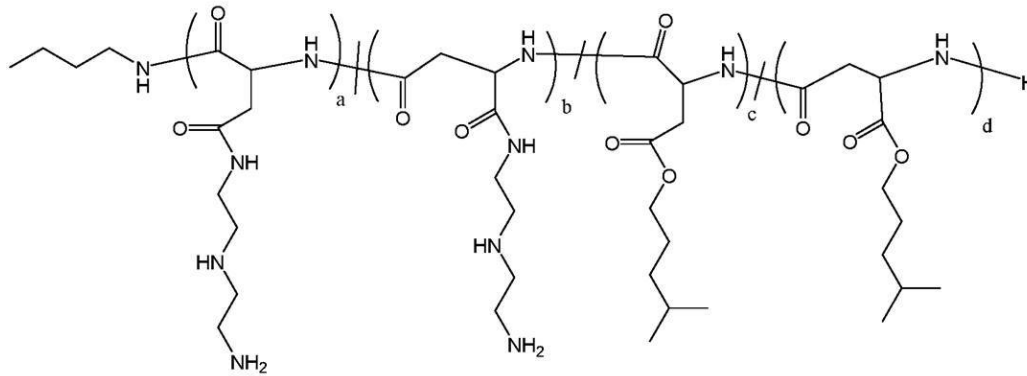
20

30

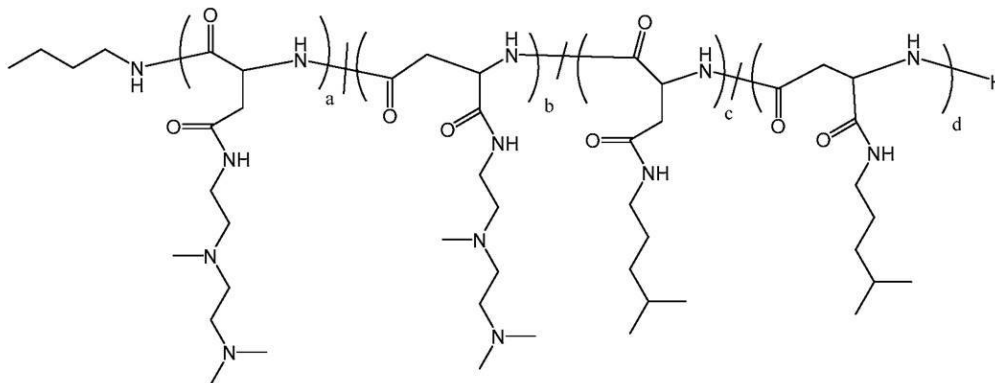
40

50

【化 8 5】

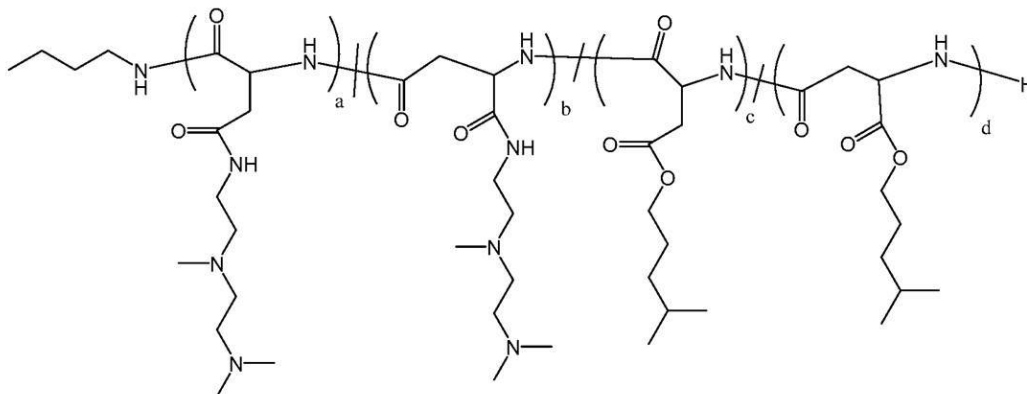


ポリマー 34



ポリマー 35

, または



ポリマー 36

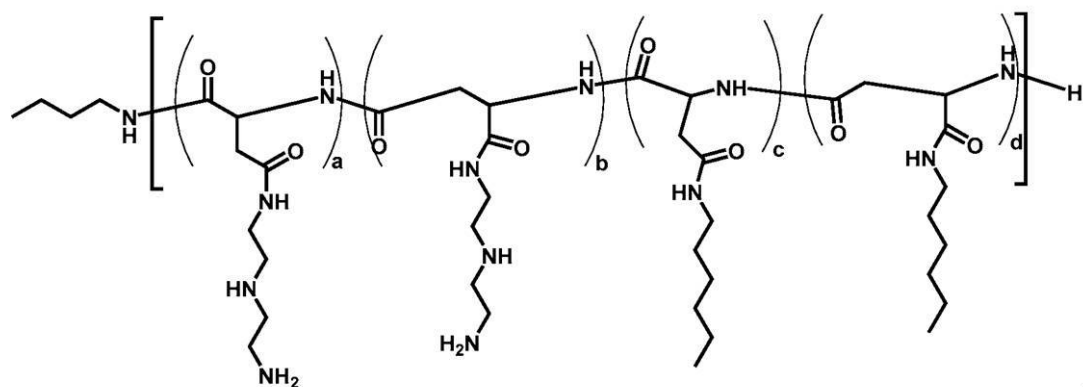
【0303】

を含み、式中、 $(a+b)$ は約5～約65(例えば、約5～約50、約5～約40、約5～約30、約5～約20、約5～約15、約5～約10、約10-50、約10-40、約10-30、または約10-20)であり、および $(c+d)$ は約2～約60(例えば、約2～約50、約2～約40、約2～約30、約2～約20、約2～約10)、または約10-60(例えば、約10～約50、約10～約40、約10～約30、約10～約20)である。いくつかの実施態様において、 $(a+b)$ は約10-50または10-30であり、そして $(c+d)$ は約20-50または20-40である。他の実施態様において、 $(a+b)$ は約45であり、そして $(c+d)$ は約20である。再度、これらの例示ポリマー中の単位の数表示(「a」、「b」、「c」、および「d」)は、ブロックコポリマー構造を意味せず;むしろ、これらの数は単位全体の数を示し、この単位は式中の「/」記号によって示されるようにランダムに配置され得る。

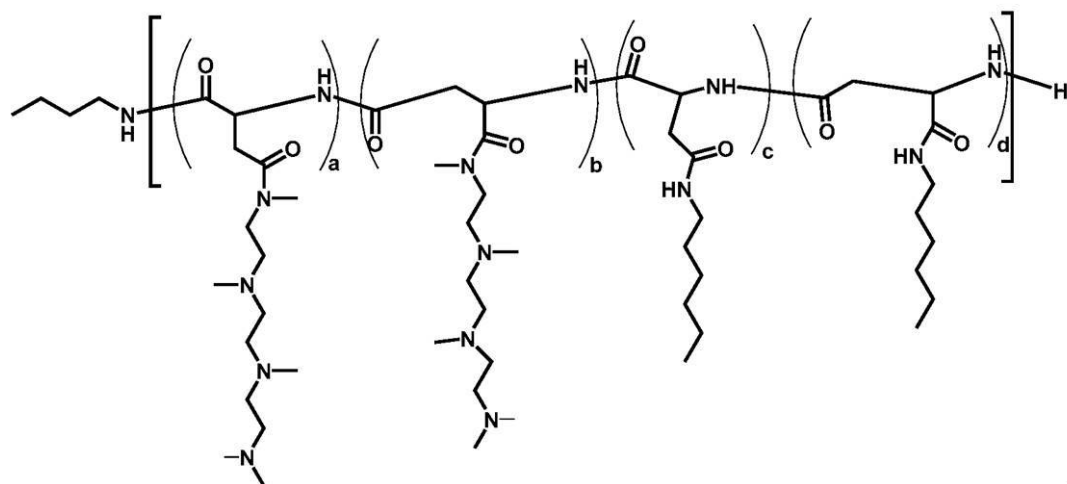
【0304】

本開示によって提供される第2ポリマーのさらなる具体例は、以下:

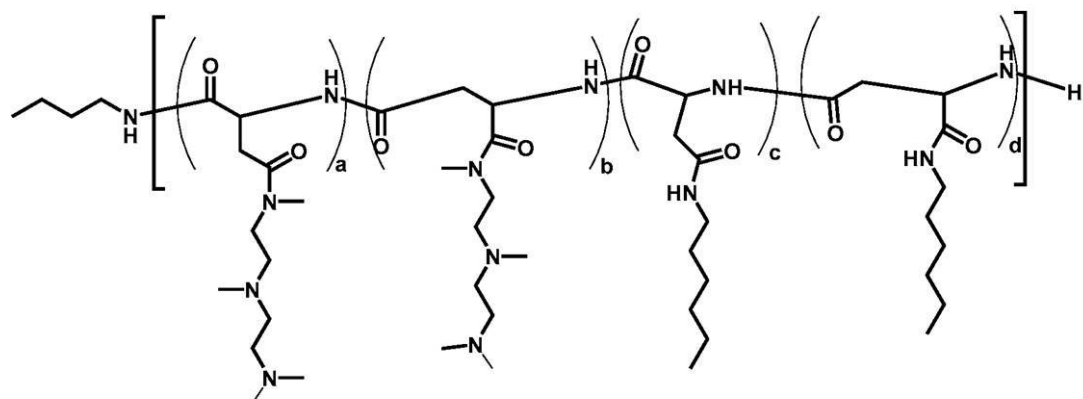
【化 8 6】



ポリマー 37



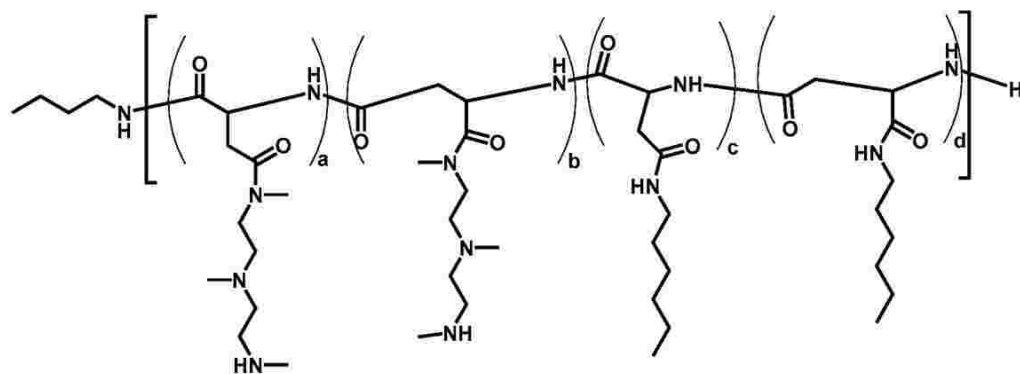
ポリマー 38



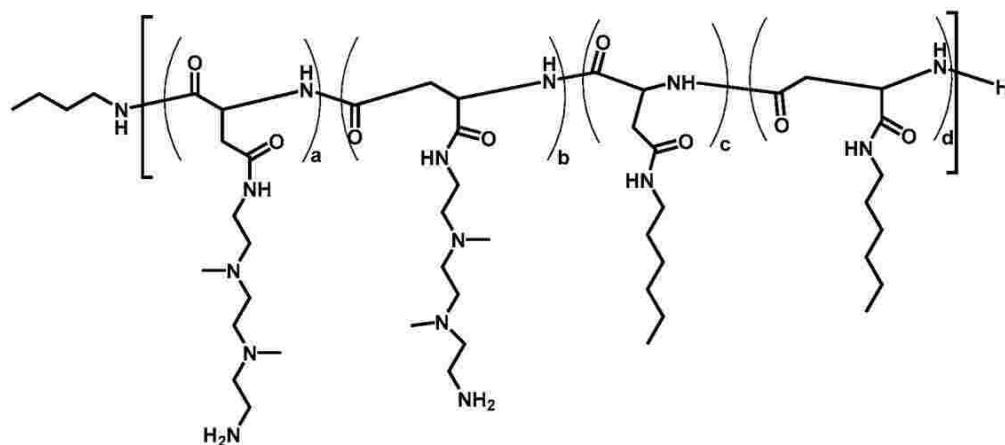
ポリマー 39

【 0 3 0 6 】

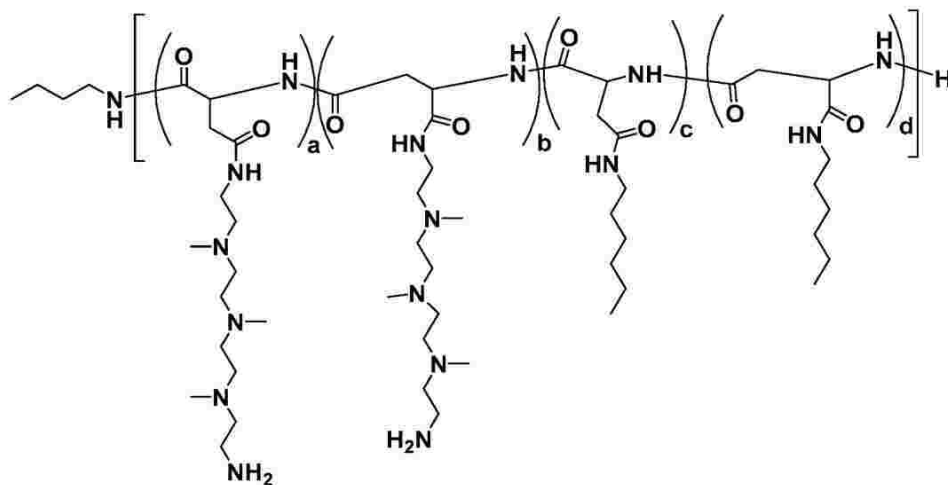
【化 8 7】



ポリマー 40



ポリマー 41



ポリマー 42

【 0 3 0 7 】

10

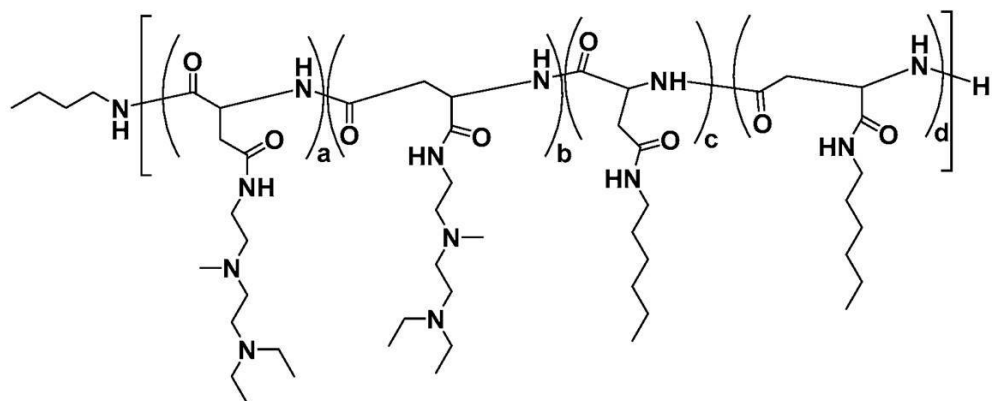
20

30

40

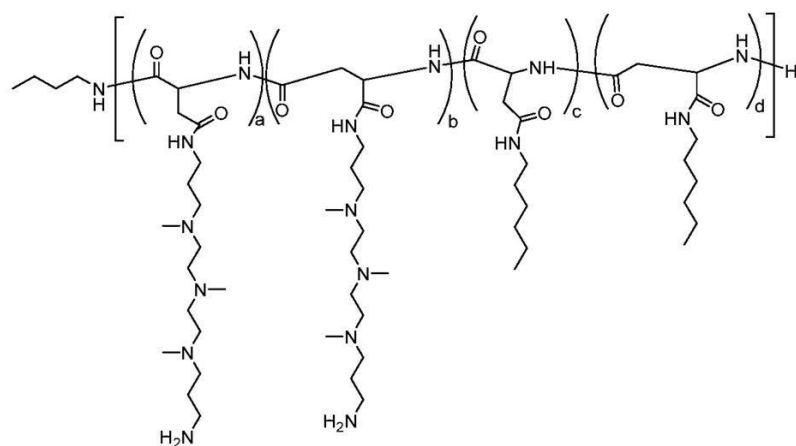
50

【化 8 8】



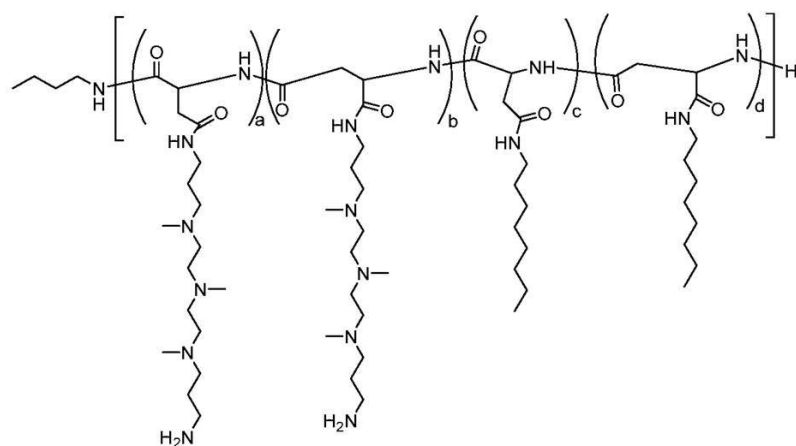
10

ポリマー 43



20

ポリマー 44



30

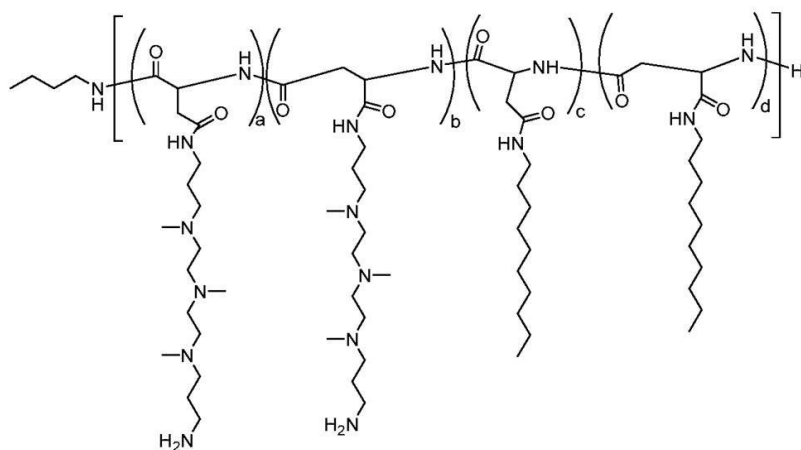
ポリマー 45

40

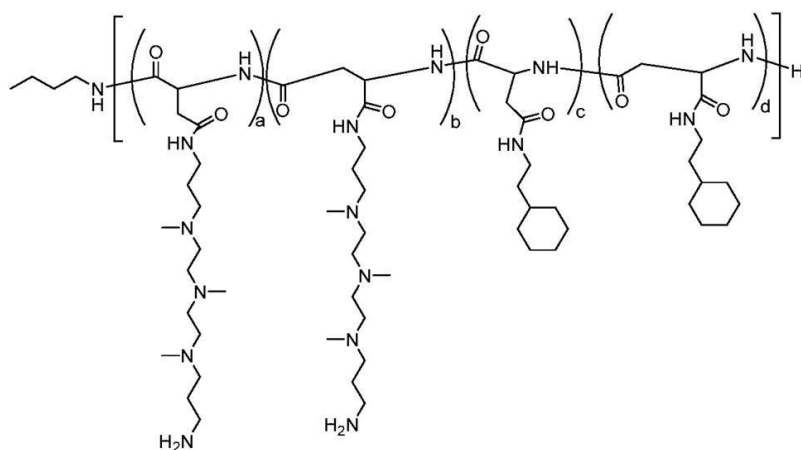
【 0 3 0 8】

50

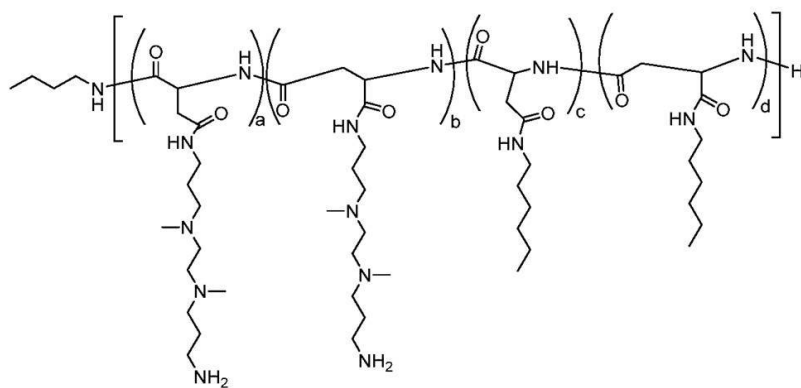
【化 8 9】



ポリマー 46



ポリマー 47



ポリマー 48

【 0 3 0 9】

10

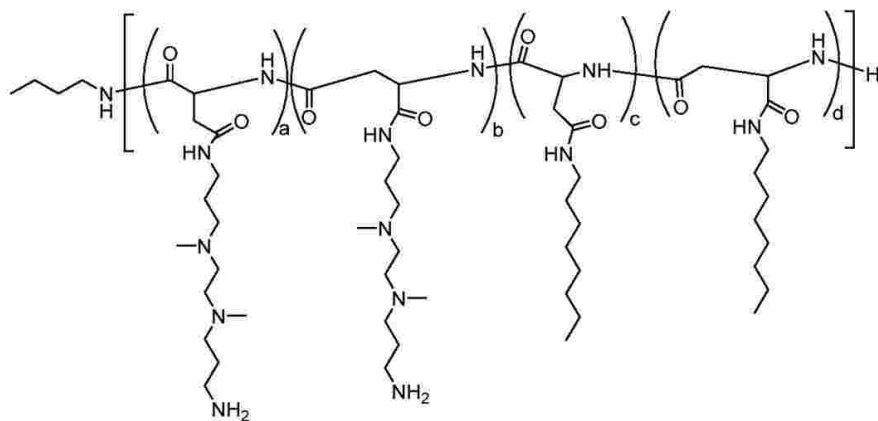
20

30

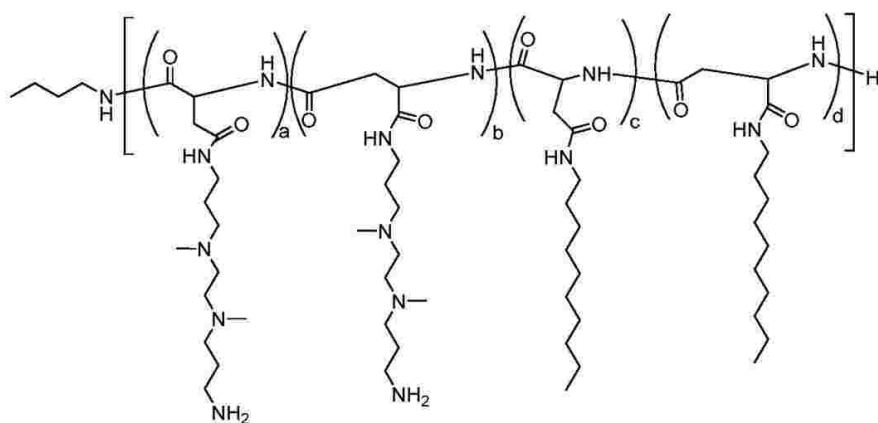
40

50

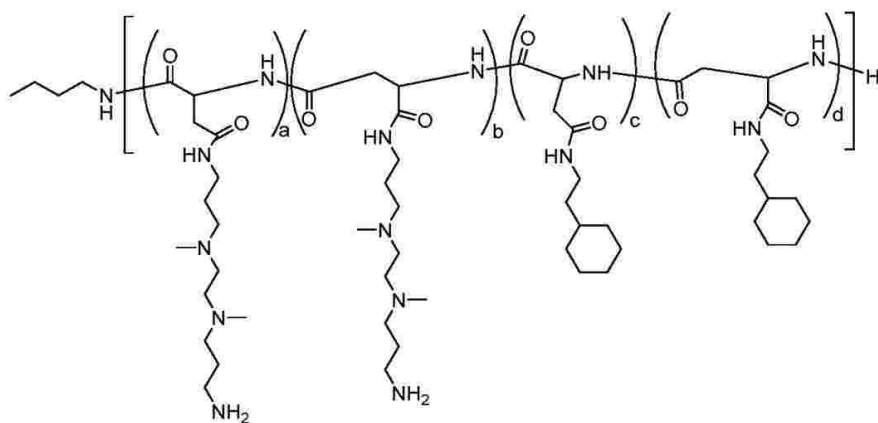
【化 9 0】



ポリマー 49



ポリマー 50



ポリマー 51

【 0 3 1 0 】

10

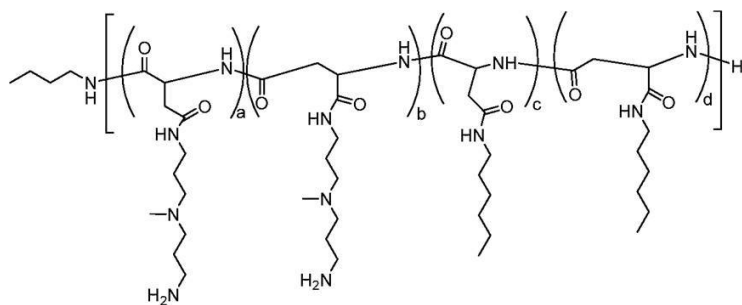
20

30

40

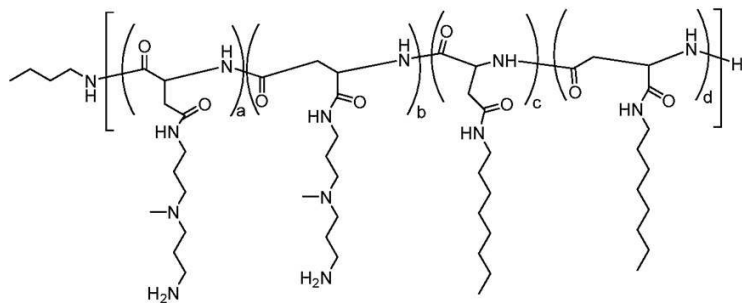
50

【化 9 1】



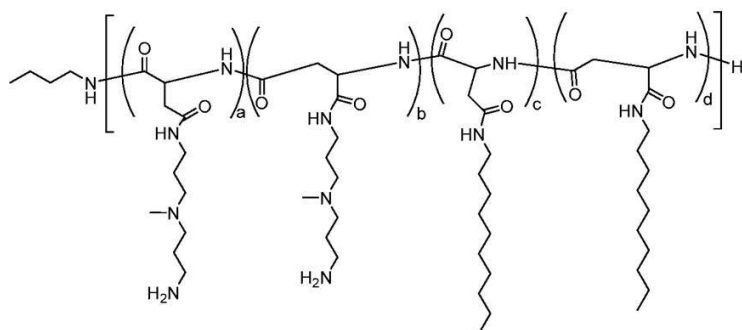
ポリマー 52

10



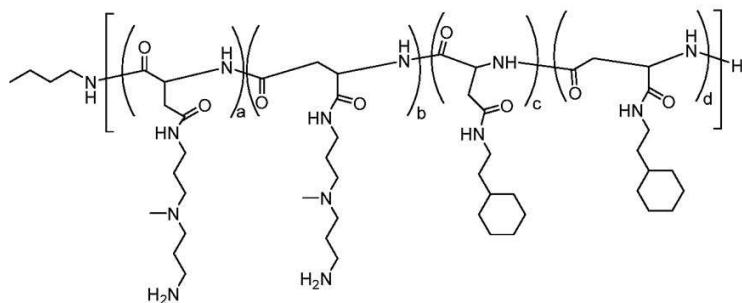
ポリマー 53

20



ポリマー 54

30



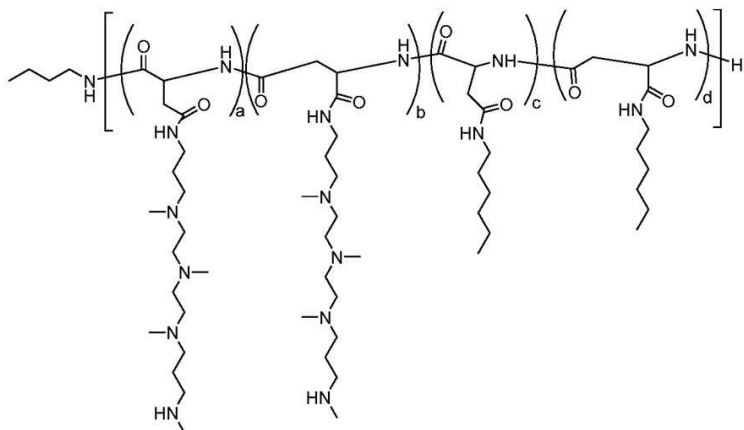
ポリマー 55

40

【 0 3 1 1】

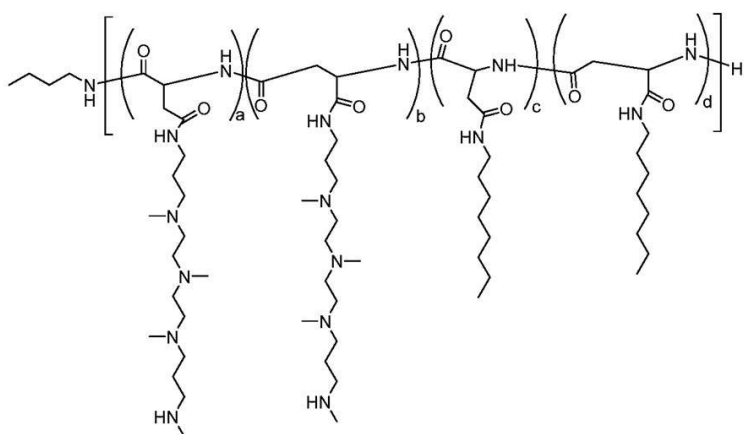
50

【化 9 2】



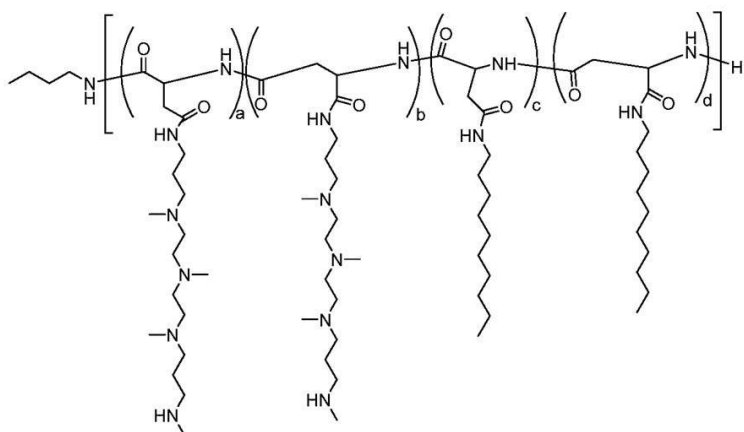
10

ポリマー 56



20

ポリマー 57



30

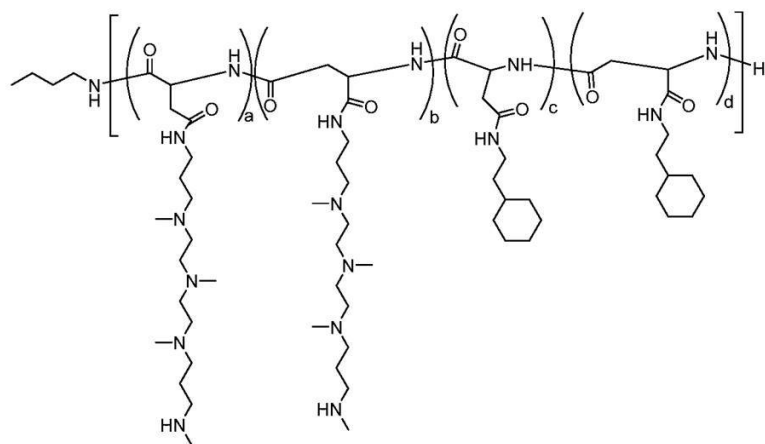
ポリマー 58

40

【 0 3 1 2 】

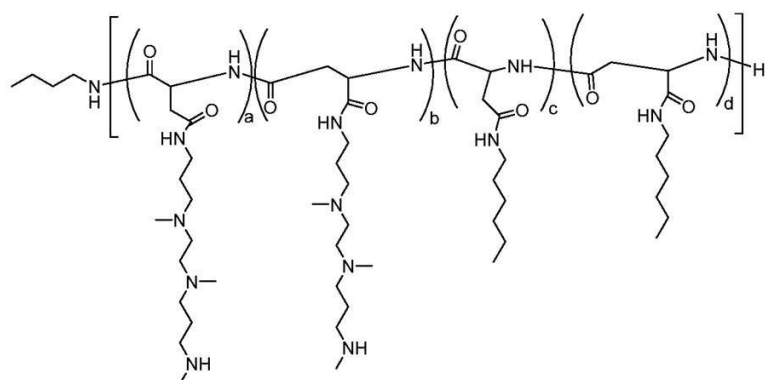
50

【化 9 3】



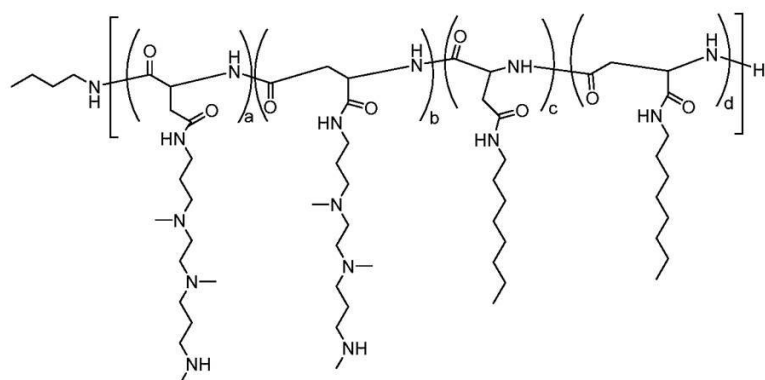
ポリマー 59

10



ポリマー 60

20



ポリマー 61

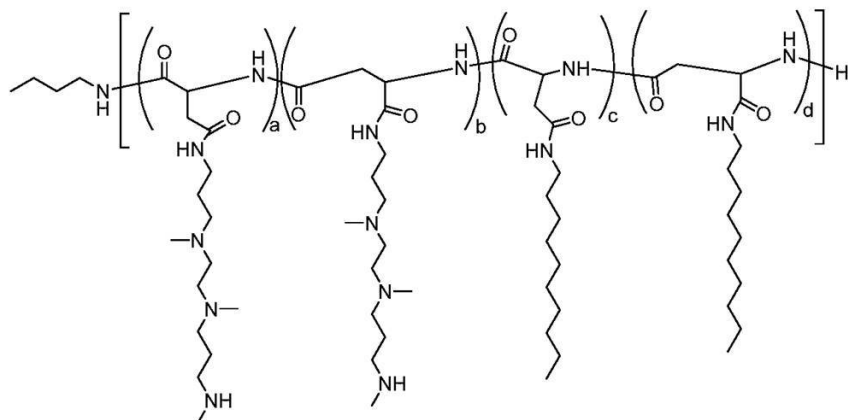
30

40

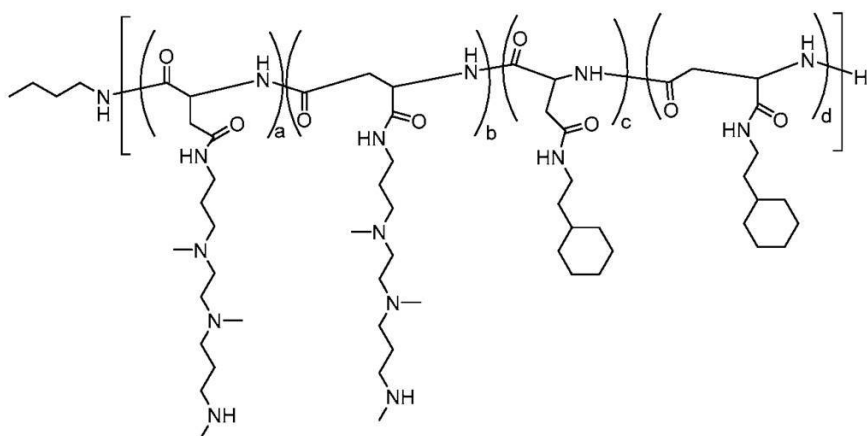
【 0 3 1 3 】

50

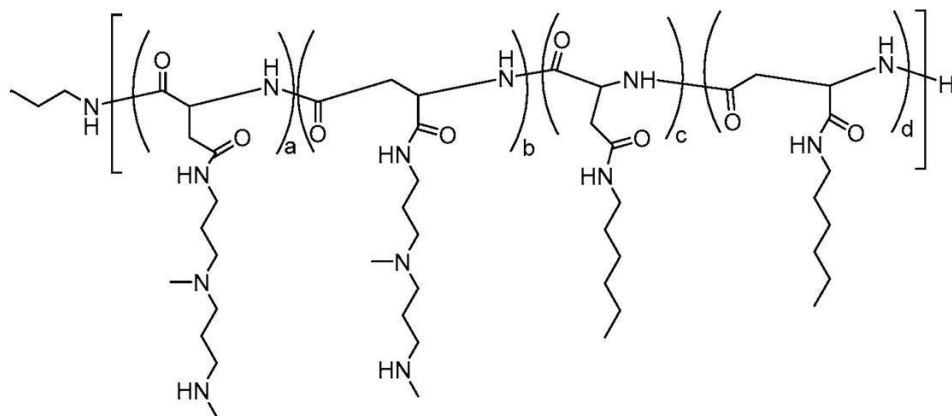
【化 9 4】



ポリマー 62



ポリマー 63



ポリマー 64

【 0 3 1 4 】

10

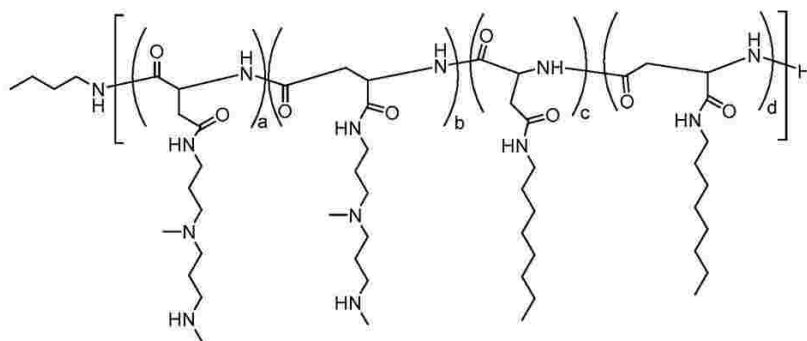
20

30

40

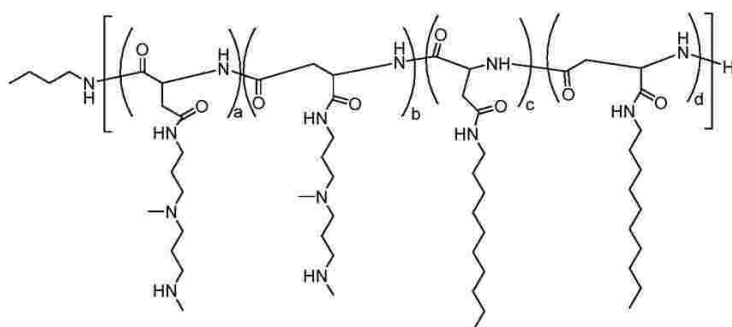
50

【化 9 5】



ポリマー 65

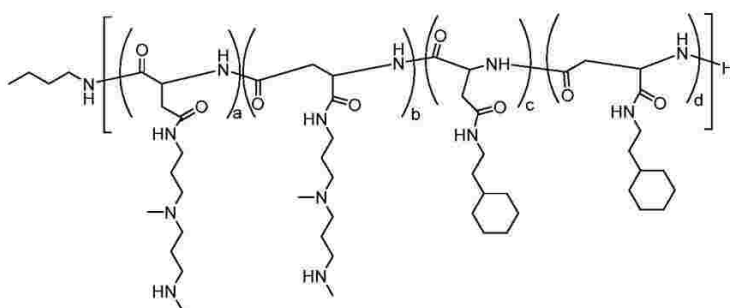
10



ポリマー 66

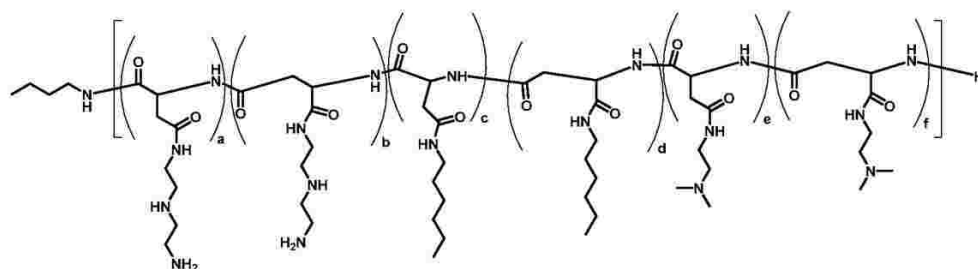
，または

20



ポリマー 67

30

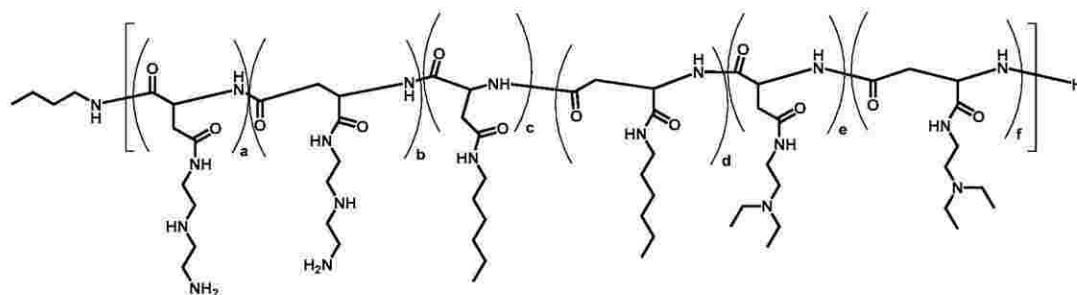


ポリマー 68

40

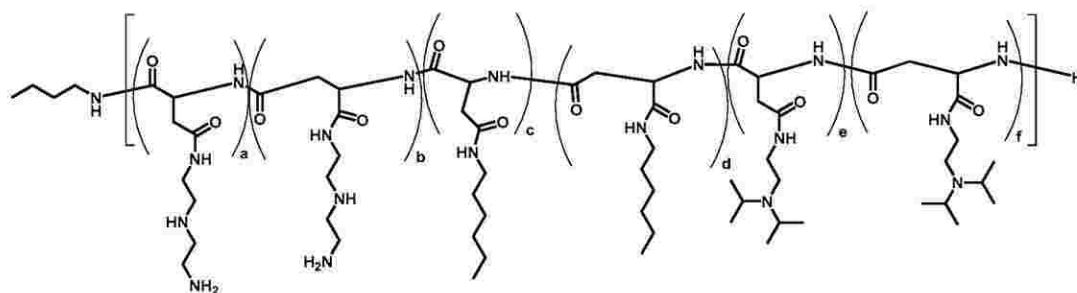
【 0 3 1 5 】

【化 9 6】



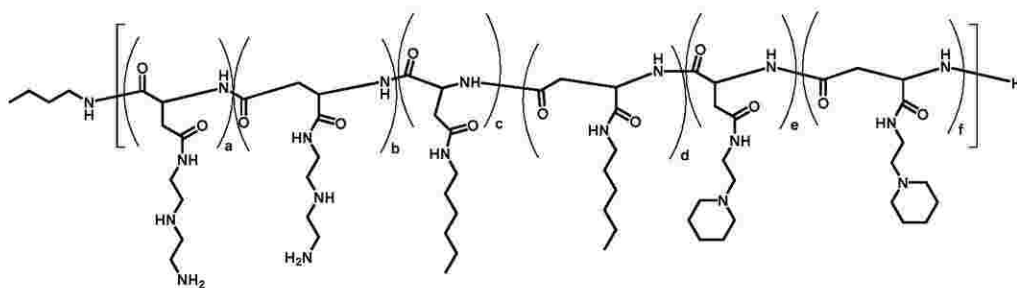
ポリマー 69

10



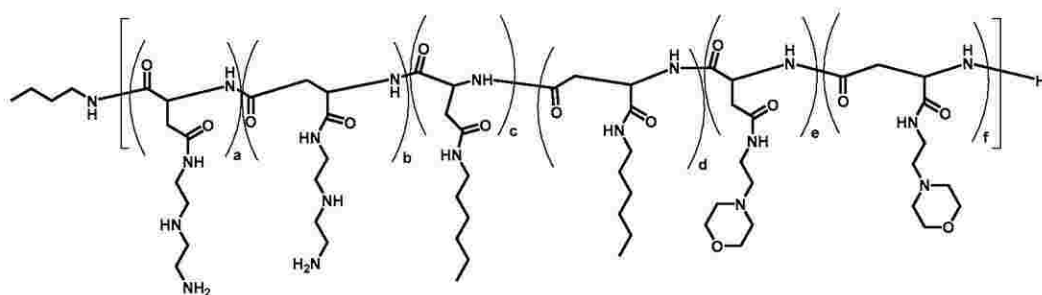
ポリマー 70

20



ポリマー 71

30



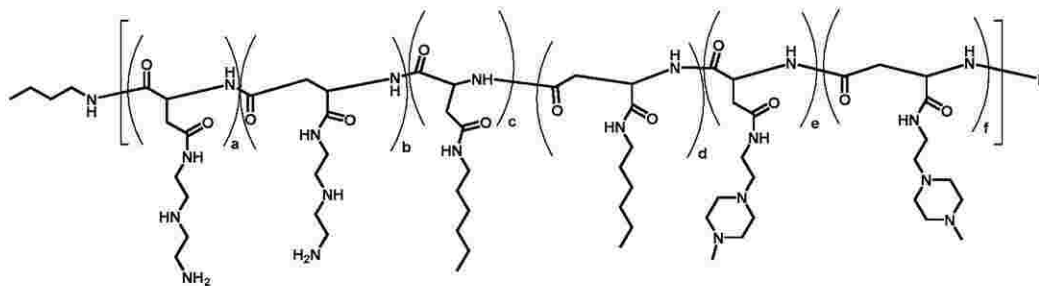
ポリマー 72

40

【 0 3 1 6 】

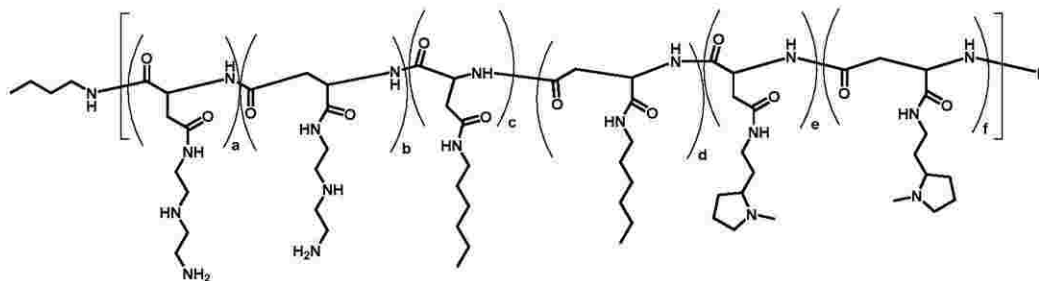
50

【化 9 7】



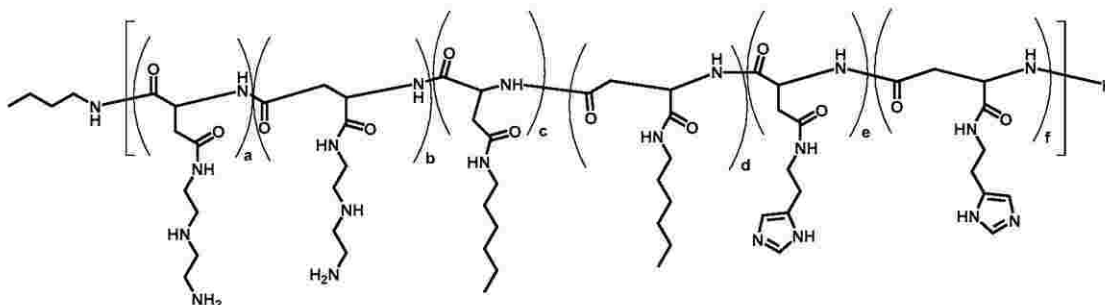
ポリマー 73

10



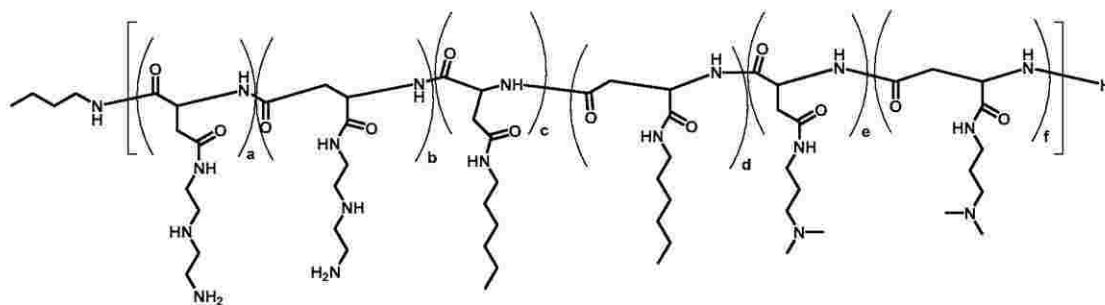
ポリマー 74

20



ポリマー 75

30



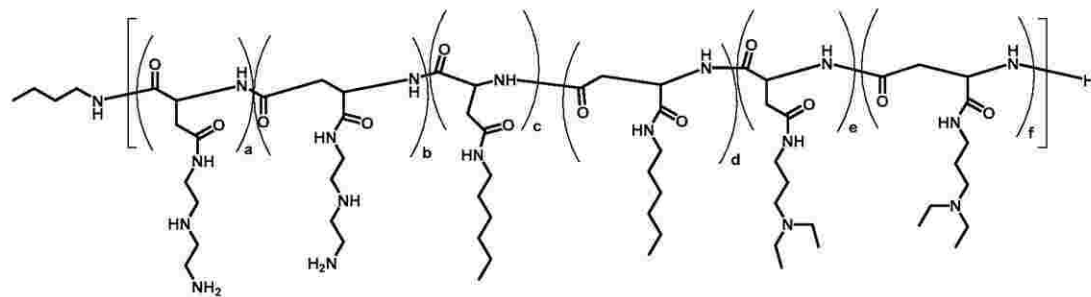
ポリマー 76

40

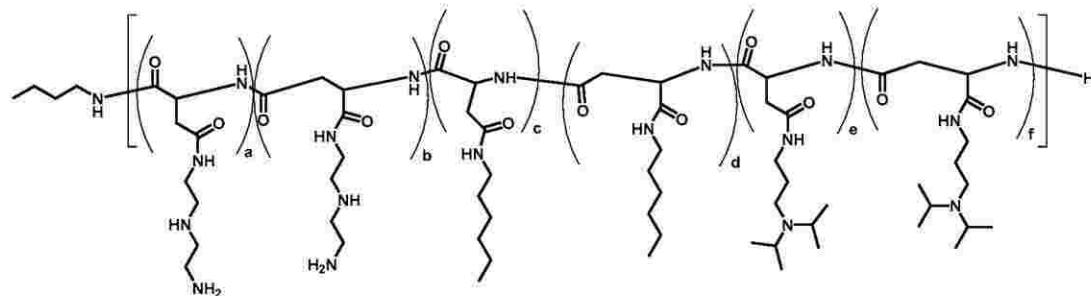
【 0 3 1 7 】

50

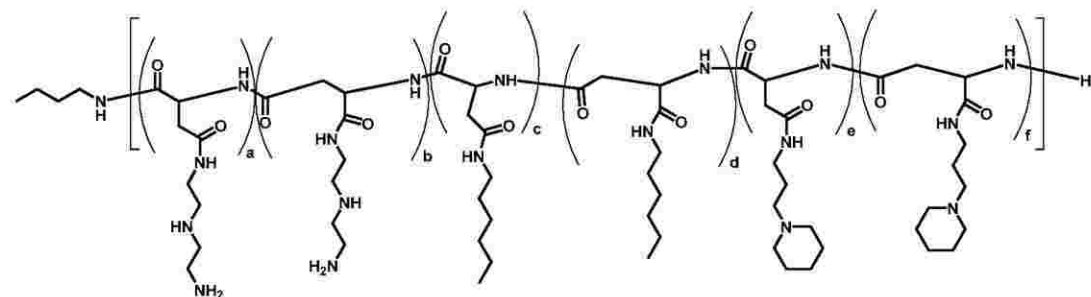
【化 9 8】



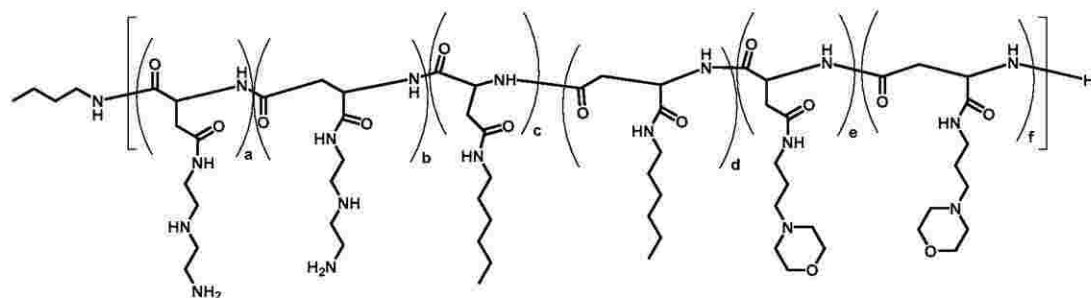
ポリマー 77



ポリマー 78



ポリマー 79



ポリマー 80

【 0 3 1 8 】

10

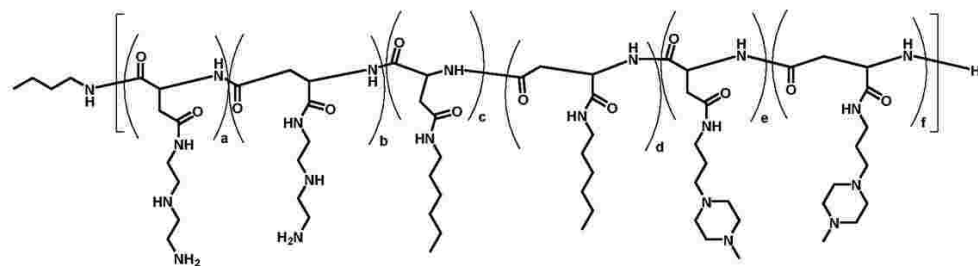
20

30

40

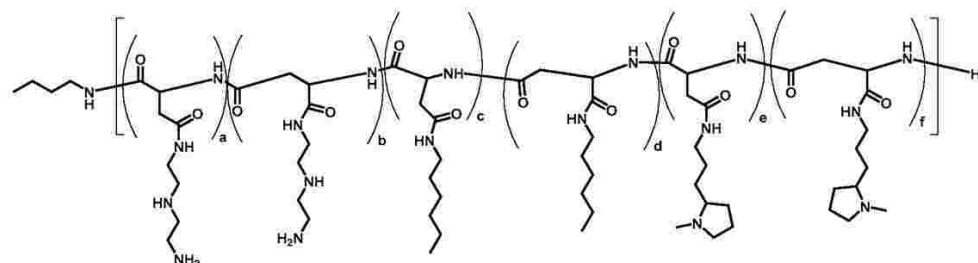
50

【化 9 9】



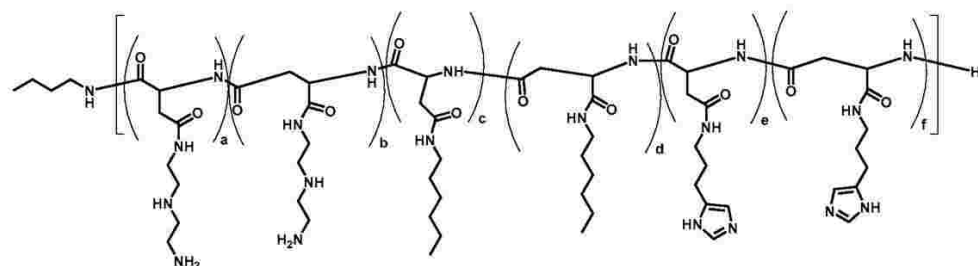
ポリマー 81

10



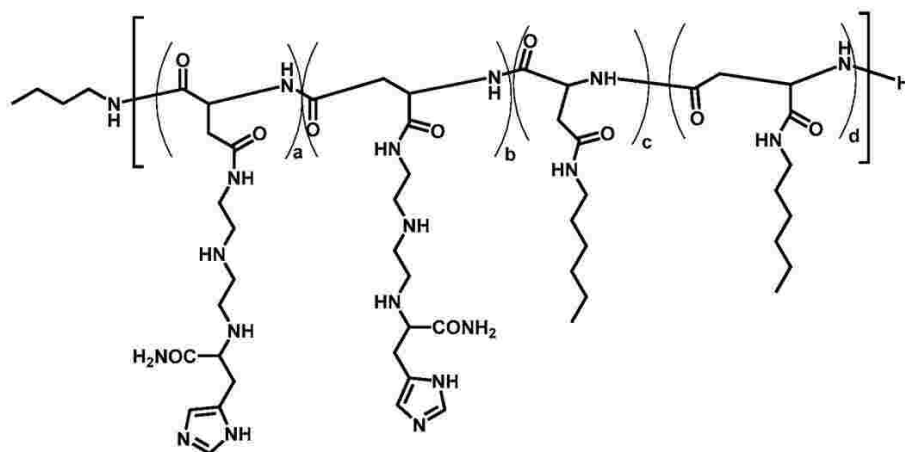
ポリマー 82

20



ポリマー 83

30



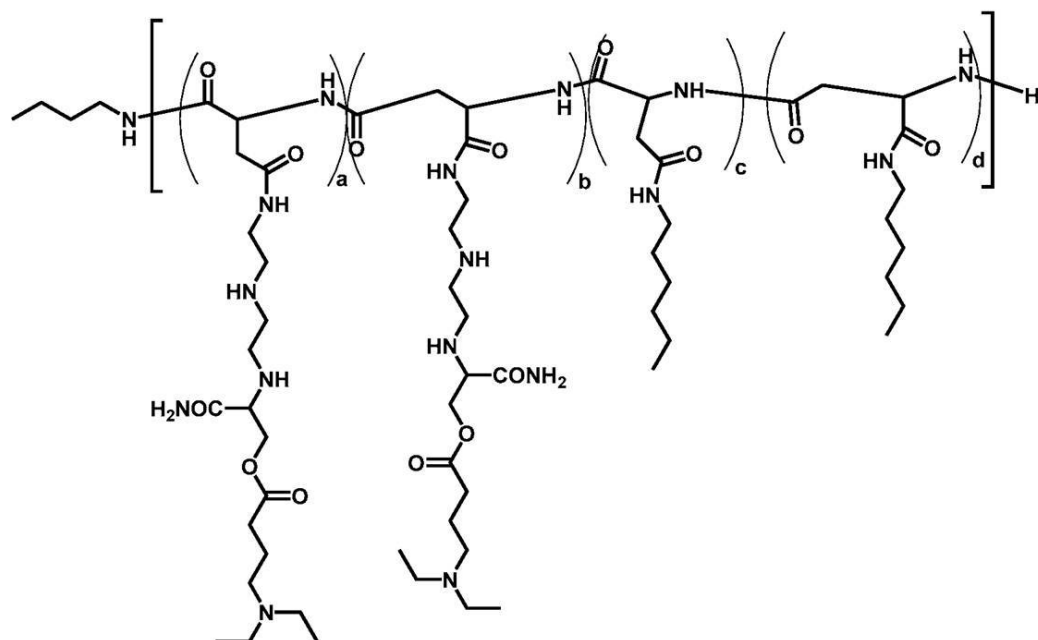
ポリマー 84

40

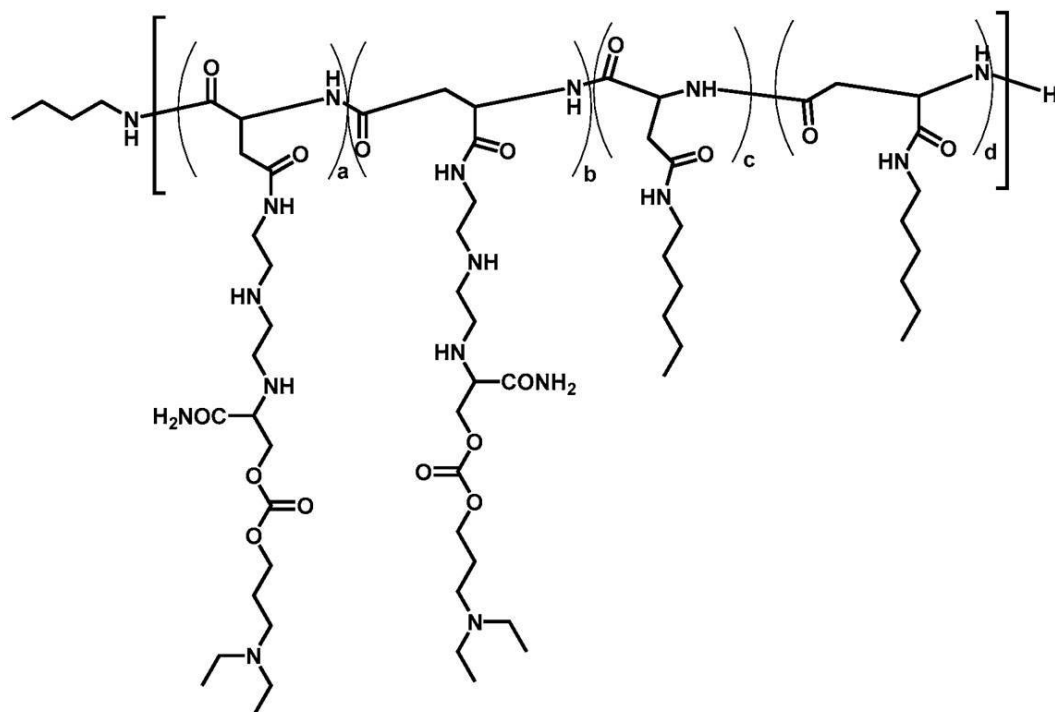
【 0 3 1 9】

50

【化 1 0 0】



ポリマー 85



ポリマー 86

【 0 3 2 0】

10

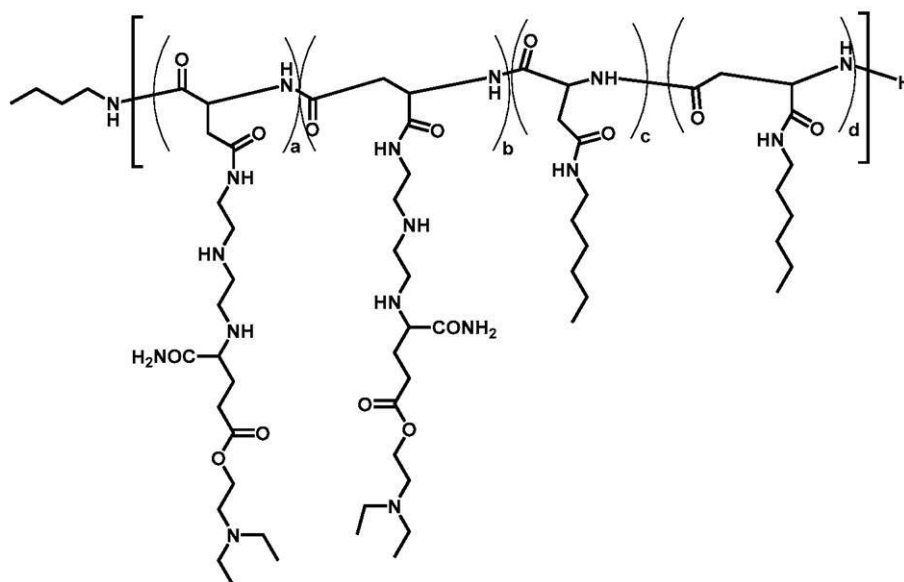
20

30

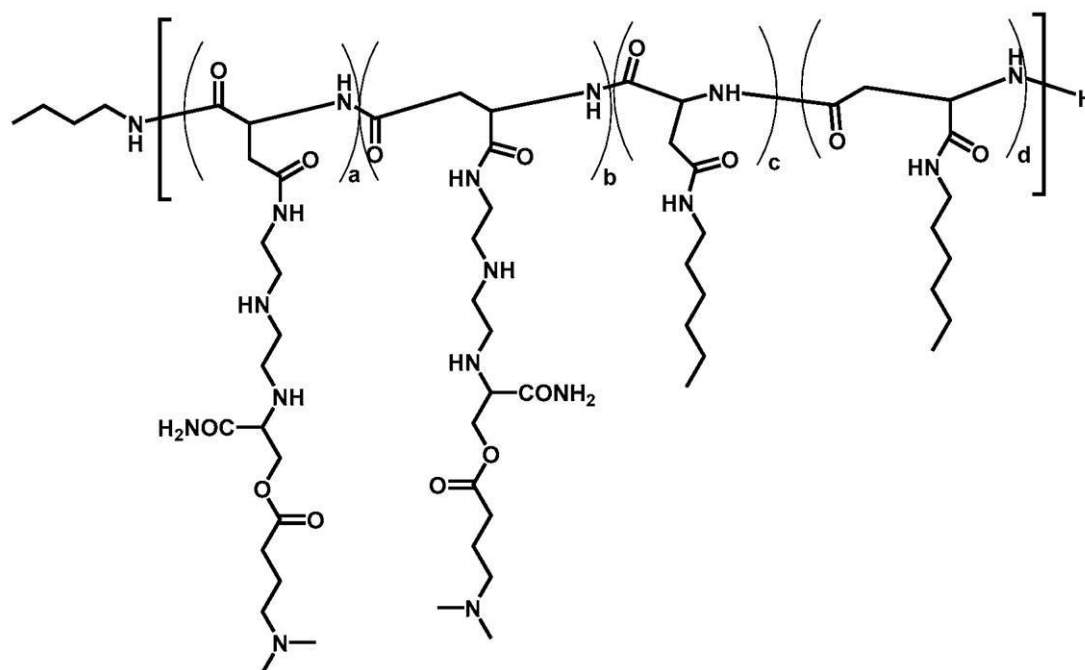
40

50

10



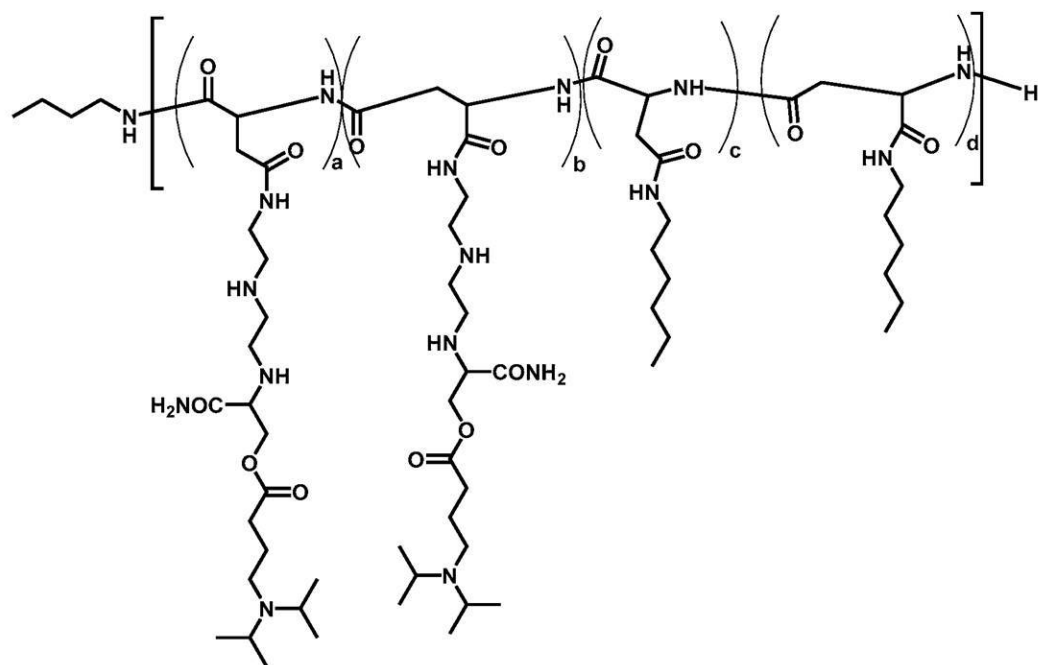
ポリマー 87



ポリマー 88

40

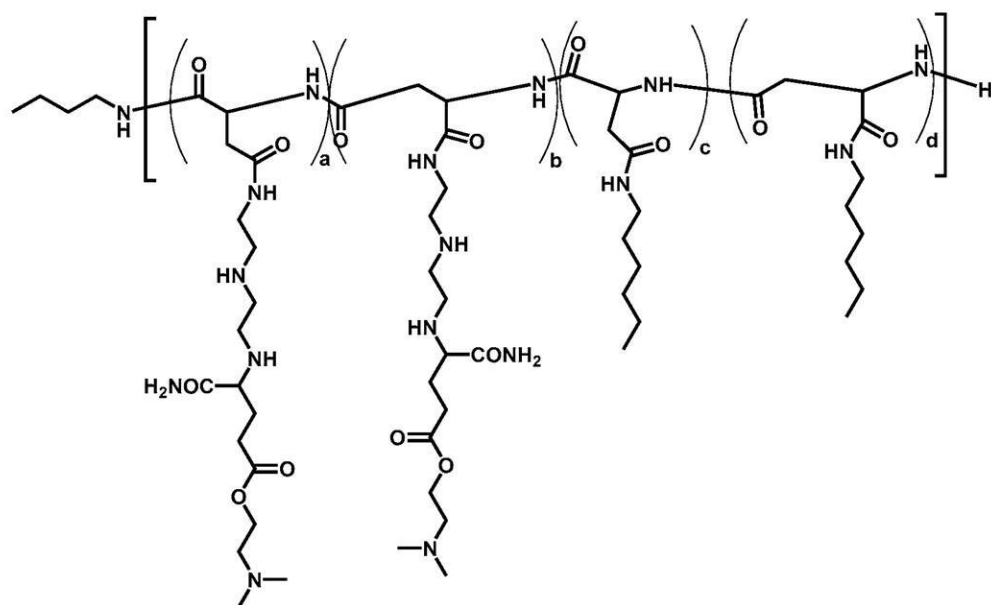
【化 1 0 2】



10

ポリマー 89

20



30

、または

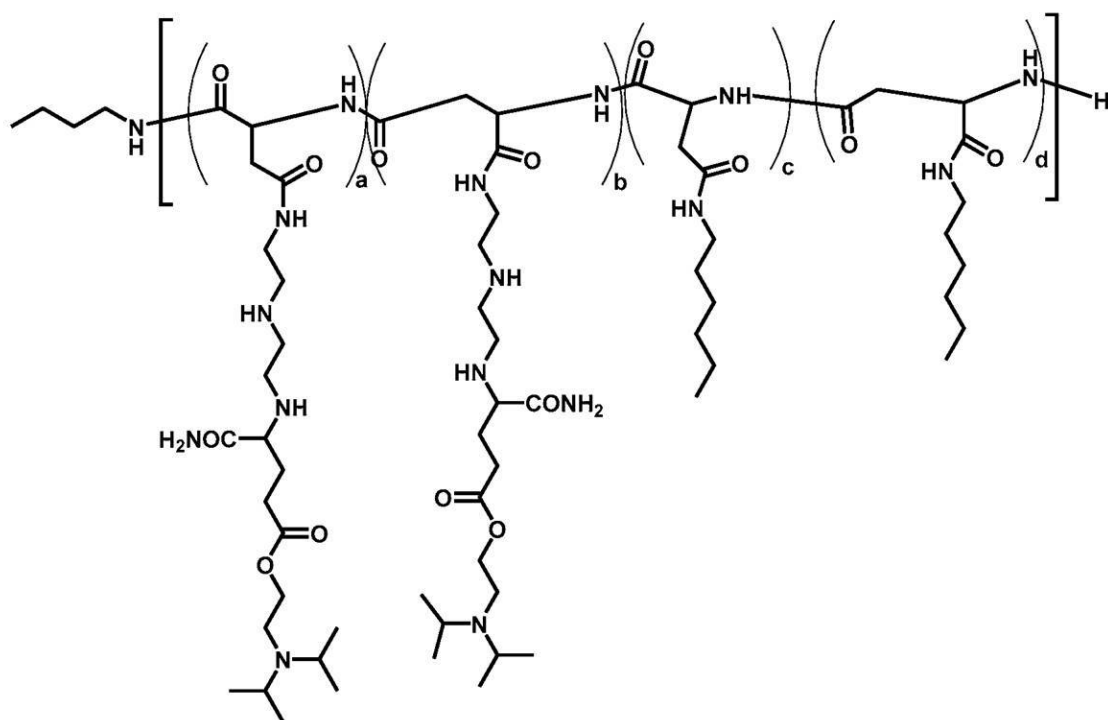
ポリマー 90

【 0 3 2 2】

40

50

【化 1 0 3】



10

20

ポリマー 91

【 0 3 2 3】

を含む。

【 0 3 2 4】

本明細書中で提供される、PEG末端基を含むポリマーのさらなる例は、以下の通りである：

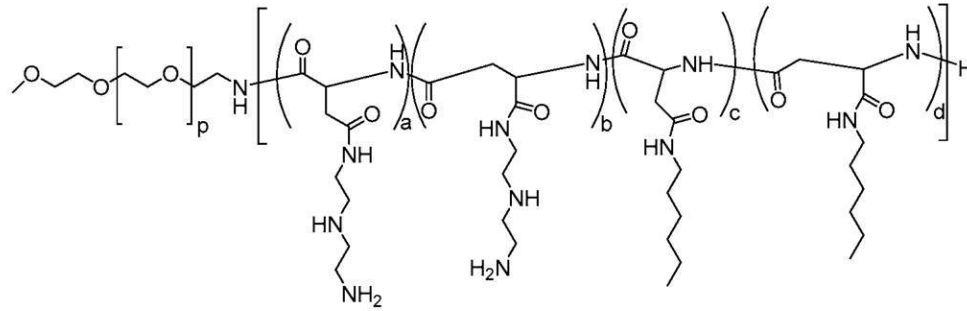
【 0 3 2 5】

30

40

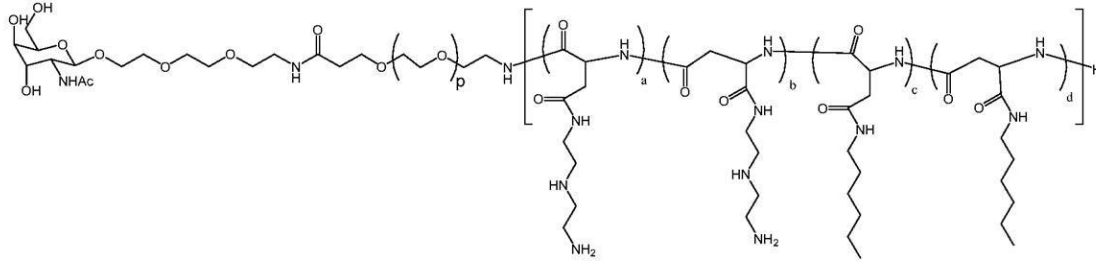
50

【化 1 0 4】



ポリマー 92

10

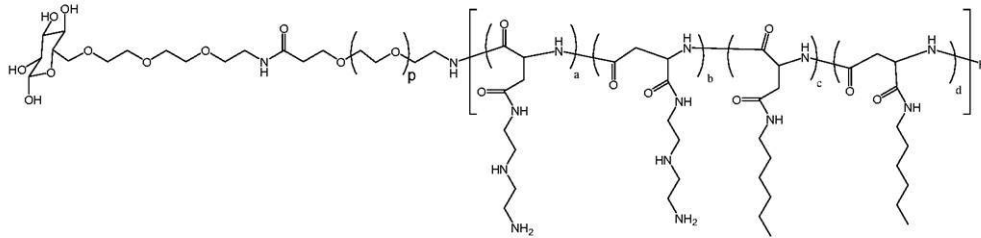


ポリマー 93

20

【 0 3 2 6】

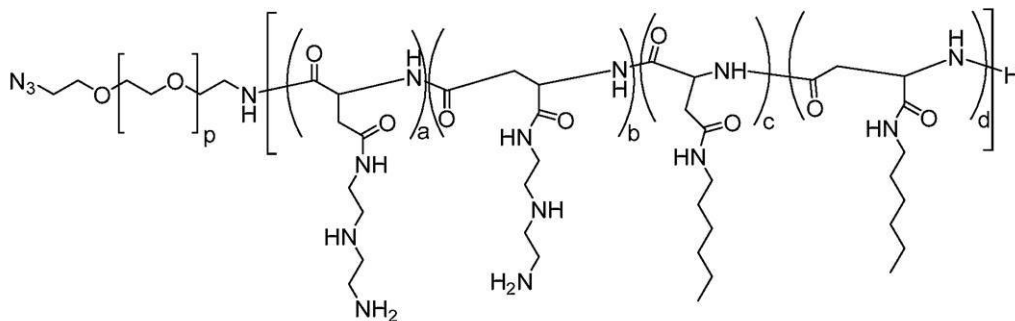
【化 1 0 5】



ポリマー 94

, または

30



ポリマー 95

40

【 0 3 2 7】

これらの例示ポリマー中の単位の数の表示(「a」、「b」、「c」、および「d」)は、ブロックコポリマー構造を意味せず;むしろ、これらの数は特定のモノマー単位全体の数を示し、この単位は任意の順序で配置され得、モノマーのブロックまたはポリマー全体にランダムに配置されたモノマーを含む。ある場合、全てではないが、これは式中の「/」記号によってさらに示され;しかし、「/」の不在はポリマーが特定の順序で結合されていると解釈されるべきではない。前述のポリマー1-95のいくつかの実施態様において、括

50

弧および整数(「a」、「b」、「c」、または「d」)で指定されるモノマーは、ポリマー全体にわたってランダムに配置されるかまたは分散される。

【0328】

前述の第2ポリマーのいずれかにおいて、(a+b)は約5～約65(例えば、約5～約50、約5～約40、約5～約30、約5～約20、または約5～約10)であり、そして(c+d)は約2～約60(例えば、約2～約50、約2～約40、約2～約30、約2～約20、または約2～約10)である。いくつかの実施態様において、(a+b)は約55であり、そして(c+d)は約10である。他の実施態様において、(a+b)は約45であり、そして(c+d)は約20である。いくつかの実施態様において、(a+b+c+d)は約10-500、例えば約10-400、約10-200、または約10-100(例えば、約25-100または約50-75)である。

10

【0329】

第2ポリマーは、(c+d)に対する(a+b)の任意の適切な割合を含み得る。他の実施態様において、(a+b)は、ポリマー単位(a+b+c+d)の合計数の10-95%(例えば、10-75%、10-65%、10-50%、20-95%、20-75%、20-65%、20-50%、30-95%、30-75%、30-65%、または30-50%)の範囲におよぶ。他の実施態様において、(c+d)は、ポリマー単位(a+b+c+d)の合計数の5-90%(例えば、5-75%、5-65%、5-50%、5-40%、5-30%、10-90%、10-75%、10-65%、10-50%、10-40%、または10-30%)の範囲におよぶ。さらに他の実施態様において、(a+b):(c+d)の比は、約1～約25、約1～約20、約1～約10、約1～約5、約5～約25、約10～約25、または約15～約25であり得る。

20

【0330】

上記第2ポリマーのいくつかは、イオン性側鎖「e」および「f」を有するモノマーを含み、この場合a、b、c、およびdは上記の通りであり、そして(e+f)は約2～約60(例えば、約2～約50、約2～約40、約2～約30、約2～約20、または約2～約10)である。さらに、各場合のpは独立して2～200(例えば、2～150、2～100、2～50、6～36、6～30、6～24、6～18、10～200、10～150、10～100、10～50、25～200、25～150、25～100、25～50、50～200、50～150、または50～100)の整数である。さらに、(a+b+c+d+e+f)は約10-500、例えば約10-400、約10-200、または約10-100(例えば、約25-100または約50-75)である。再度、これらの例示第2ポリマー中の単位の数の表示(「a」、「b」、「c」、「d」、「e」、および「f」)は、ブロックコポリマー構造を意味せず;むしろ、これらの数は単位全体の数を示し、この単位はランダムに配置され得る。いくつかの実施態様において、第2ポリマーは、上記ポリマー29、30、35、36、37、39、または40の構造を有し、ここでa、b、c、およびdは本明細書中に記載の通りである。いくつかの実施態様において、第2ポリマーはポリマー29、30、35、36、37、39、または40であり、ここで(a+b)は約10-50または10-30であり、そして(c+d)は約20-50または20-40である。

30

【0331】

本開示によって提供される第2ポリマーの上記特定例のいくつかは、特定の末端基(例えば、アルキルアミノ、水素、またはPEG)を持って表現される;しかし、前述の特定構造のいずれかは異なる末端基を含み得る。例えば、前述の構造のいずれかは、本明細書中に記載のR¹、R⁶、またはQの基をポリマー骨格のいずれかの末端または両末端に含む。

40

【0332】

典型的に、第2ポリマーはカチオン性(すなわち、pH 7および23℃で正に帯電)である。本明細書中で使用される「カチオン性」ポリマーは、ポリマーポリマーがカチオン性モノマー単位のみまたはカチオン性モノマー単位と非イオン性またはアニオン性モノマー単位との組み合わせを含むかどうかにかかわらず、全体として正味の正電荷を有するポリマーをいう。

【0333】

いくつかの実施態様において、第2ポリマーは約5 kDa～約2,000 kDaの重量平均分子量を有する。第2ポリマーは約2,000 kDa以下、例えば、約1,800 kDa以下、約1,6

50

00 kDa以下、約1,400 kDa以下、約1,200 kDa以下、約1,000 kDa以下、約900 kDa以下、約800 kDa以下、約700 kDa以下、約600 kDa以下、約500 kDa以下、約100 kDa以下、または約50 kDa以下の重量平均分子量を有し得る。あるいは、またはさらに、第2ポリマーは約10 kDa以上、例えば、約50 kDa以上、約100 kDa以上、約200 kDa以上、約300 kDa以上、または約400 kDa以上の重量平均分子量を有し得る。従って、第2ポリマーは前述の端点の任意の2つによって囲まれる重量平均分子量を有し得る。例えば、第2ポリマーは約10 kDa～約50 kDa、約10 kDa～約100 kDa、約10 kDa～約500 kDa、約50 kDa～約500 kDa、約100 kDa～約500 kDa、約200 kDa～約500 kDa、約300 kDa～約500 kDa、約400 kDa～約500 kDa、約400 kDa～約600 kDa、約400 kDa～約700 kDa、約400 kDa～約800 kDa、約400 kDa～約900 kDa、約400 kDa～約1,000 kDa、約400 kDa～約1,200 kDa、約400 kDa～約1,400 kDa、約400 kDa～約1,600 kDa、約400 kDa～約1,800 kDa、約400 kDa～約2,000 kDa、約200 kDa～約2,000 kDa、約500 kDa～約2,000 kDa、または約800 kDa～約2,000 kDaの重量平均分子量を有し得る。重量平均分子量は任意の適切な技術によって決定され得る。一般に、重量平均分子量は、TSKgel Guard、GMPW、GMPW、G1000PW、およびWaters 2414(Waters Corporation、Milford、Massachusetts)屈折率検出器から選ばれる、カラムを備えたサイズ排除クロマトグラフィーを用いて決定される。さらに、重量平均分子量は150-875,000ダルトンの範囲に及ぶポリエチレンオキシド/ポリエチレングリコール標準を用いた校正から決定される。

10

20

【0334】

任意の特定の理論または作用機序に束縛されることを望まないが、本明細書中に記載の第1および第2ポリマーを含む組成物は、特に生理学的環境中、例えば体液(例えば、血液、血清、またはcsf)中で、第2ポリマーのみを含むポリマーナノ粒子よりも安定であるナノ粒子を提供し得ると考えられる。安定性は、経時の粒子サイズの因子として測定され得、ここで所定の期間にわたる粒子サイズのより大きい変化は、所定の期間にわたる粒子サイズのより小さい変化よりも安定性が低いことを示す。

【0335】

ドナー核酸

ドナー核酸(あるいは「ドナー配列」または「ドナーポリヌクレオチド」または「ドナーDNA」)は、RNA-依存性エンドヌクレアーゼ(例、Cas9ポリペプチドまたはCpf1ポリペプチド)によって誘起される開裂部位で挿入されるべき核酸配列である。ドナーポリヌクレオチドは、開裂部位で標的ゲノム配列に対して十分な相溶性、例えば70%、80%、85%、90%、95%、または100%の、例えば開裂部位の約50塩基以下、例えば約30塩基、約15塩基、約10塩基、約5塩基内で開裂部位をフランキングするかまたは開裂部位を直ちにフランキングしてそれと相溶性を有するゲノム配列との間の相同組換え修復を支持するヌクレオチド配列との相溶性を含む。ドナーとゲノム配列(あるいは10と200との間の任意の整数値、あるいはそれ以上のヌクレオチド)との間の配列相溶性の約25、50、100、または200のヌクレオチド、あるいは200を超えるヌクレオチドは、相同組換え修復を支持する。ドナー配列は、例えば10ヌクレオチド以上、50ヌクレオチド以上、100ヌクレオチド以上、250ヌクレオチド以上、500ヌクレオチド以上、1000ヌクレオチド以上、5000ヌクレオチド以上などの任意の長さであり得る。

30

40

【0336】

ドナー配列は典型的には、それが置き換わるゲノム配列とは同一ではない。むしろ、ドナー配列は、十分な相溶性が存在して相同組換え修復を支持する限り、ゲノム配列に関して1つ以上の単一塩基変化、挿入、欠失、反転または再配列を含み得る。いくつかの実施態様において、ドナー配列は、相溶性の2つの領域によってフランキングされる非相溶性配列を含み、その結果、標的DNA領域と2つのフランキング配列との間の相同組換え修復は標的領域で非相溶性配列の挿入を生じる。ドナー配列はまた、目的のDNA領域と相溶性でなく、そして目的のDNA領域への挿入を意図しない配列を含むベクター骨格を含み得

50

る。一般に、ドナー配列の相同性の領域は、組み換えが所望されるゲノム配列に対して少なくとも50%配列同一性を有する。いくつかの実施態様において、60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%、または99.9%配列同一性が存在する。ドナーポリヌクレオチドの長さに依存して、1%配列同一性と100%配列同一性との間の任意の値が存在し得る。
【0337】

ドナー配列は、ゲノム配列、例えば制限部位、ヌクレオチド多形、選択可能なマーカー(例、薬剤耐性遺伝子、蛍光タンパク質、酵素など)などと比較してある配列の相違を含み得、これは開裂部位でのドナー配列の成功する挿入を評価するために使用され得る、またはいくつかの実施態様において他の目的(例、標的化ゲノム遺伝子座での発現を示すため)に使用され得る。いくつかの実施態様において、コード領域に位置する場合、このようなヌクレオチド配列の相違はアミノ酸配列を変化させず、またはサイレントアミノ酸変化(すなわち、タンパク質の構造または機能に影響を与えない変化)を作る。あるいは、これらの配列の相違は、マーカー配列の除去のためにその後活性化され得るFLP、loxP配列などのフランキング組み換え配列を含み得る。

10

【0338】

ドナー配列は、一本鎖DNA、一本鎖RNA、二本鎖DNA、または二本鎖RNAとして細胞に提供され得る。それは、線状または環状形態で細胞に導入され得る。線状形態で導入される場合、ドナー配列の端部は、当業者に公知の方法によって(例えば、核外分解性劣化から)保護され得る。例えば、1個以上のジデオキシヌクレオチド残基は、線状分子の3'末端に付加され、および/または自己相補的なオリゴヌクレオチドは一方または両方の端部に結合される。例えば、Chang et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:4959-4963; Nehls et al. (1996) Science 272:886-889を参照。ローリングサークル増幅などの増幅手順はまた、本明細書中で例示されるように、有利に使用され得る。外因性ポリヌクレオチドを分解から保護するためのさらなる方法は、末端アミノ基の付加および例えばホスホロチオエート、ホスホロアミデート、およびO-メチルリボースまたはデオキシリボース残基などの修飾ヌクレオチド間連結の使用を含むが、これらに限定されない。

20

【0339】

線状ドナー配列の末端を保護する代わりとして、組み換えに影響を与えることなく分解され得る追加の長さの配列が、相同性の領域の外側に含まれ得る。ドナー配列は、例えば、複製起点、プロモーターおよび抗生物質耐性をコードする遺伝子などの追加の配列を有するベクター分子の一部として細胞に導入され得る。さらに、ドナー配列は、Cas9ガイドRNAおよび/またはCas9融合ポリペプチドおよび/またはドナーポリヌクレオチドをコードする核酸について本明細書中で記載したように、裸核酸として、リボソームまたはポリマーなどの剤と複合体化した核酸として導入され得、または、ウイルス(例、アデノウイルス、AAV)によって送達され得る。

30

【0340】

ガイド核酸

いくつかの実施態様において、組成物はガイド核酸を含有する。本開示の組成物に含めるのに適切なガイド核酸は、一分子ガイドRNA(「シングル-ガイドRNA」/「sgRNA」)および二分子ガイド核酸(「デュアル-ガイドRNA」/「dgRNA」)を含む。

40

【0341】

本開示の複合体に含めるのに適切なガイド核酸(例、ガイドRNA)は、RNA-誘導エンドヌクレアーゼ(例、Cas9またはCpf1ポリペプチド)の標的核酸内の特異的標的配列に対する活性を指示する。ガイド核酸(例、ガイドRNA)は:第1の断片(本明細書中、「核酸標的化断片」または単に「標的化断片」ともいう);および第2の断片(本明細書中、「タンパク質-結合断片」ともいう)を含む。用語「第1の」および「第2の」は、断片がガイドRNAに現れる順序を意味しない。互いに対する要素の順序は、使用される特定のRNA-誘導ポリペプチドに依存する。例えば、Cas9のためのガイドRNAは、典型的には標的化断片の3'に位置したタンパク質-結合断片を有し、一方、Cpf1のためのガイドRNAは、

50

典型的には標的化断片の5'に位置したタンパク質-結合断片を有する。

【0342】

ガイドRNAは、線状または環状形態で細胞に導入され得る。線状形態で導入される場合、ガイドRNAの端部は、当業者に公知の方法によって(例えば、核外分解性劣化から)保護され得る。ローリングサークル増幅などの増幅手順はまた、本明細書中で例示されるように、有利に使用され得る。

【0343】

第1の断片:標的化断片

ガイド核酸(例、ガイドRNA)の第1の断片は、標的核酸における配列(標的部位)に相補的であるヌクレオチド配列を含む。言い換えると、ガイド核酸(例、ガイドRNA)の標的化断片は、ハイブリダイゼーション(すなわち、塩基対合)を介して配列-特異的様式で標的核酸(例、RNA、DNA、二本鎖DNA)と相互作用し得る。そのため、標的化断片のヌクレオチド配列は変化し得、そしてガイド核酸(例、ガイドRNA)および標的核酸が相互作用するであろう標的核酸内の位置を決定し得る。ガイド核酸(例、ガイドRNA)の標的化断片は、(例えば、遺伝子工学によって)修飾され、標的核酸内の任意の所望の配列(標的部位)にハイブリダイズし得る。

【0344】

標的化断片は、12ヌクレオチド~100ヌクレオチドの長さを有し得る。標的核酸のヌクレオチド配列(標的部位)に相補的である標的化断片のヌクレオチド配列(標的化配列、ガイド配列ともいう)は、12 nt以上の長さを有し得る。例えば、標的核酸の標的部位に相補的である標的化断片の標的化配列は、12 nt以上、15 nt以上、17 nt以上、18 nt以上、19 nt以上、20 nt以上、25 nt以上、30 nt以上、35 nt以上または40 ntの長さを有し得る。

【0345】

標的化断片の標的化配列(すなわち、ガイド配列)と標的核酸の標的部位との間のパーセント相補性は、60%以上(例、65%以上、70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、97%以上、98%以上、99%以上、または100%)であり得る。いくつかの実施態様において、標的化断片の標的化配列と標的核酸の標的部位との間のパーセント相補性は、標的核酸の標的部位の7つの隣接する5'-最大ヌクレオチドに対して100%である。いくつかの実施態様において、標的化断片の標的化配列と標的核酸の標的部位との間のパーセント相補性は、20の隣接するヌクレオチドに対して60%以上である。いくつかの実施態様において、標的化断片の標的化配列と標的核酸の標的部位との間のパーセント相補性は、標的核酸の標的部位の17、18、19または20の隣接する5'-最大ヌクレオチドに対して100%であり、そして残りに対して0%以上の低さである。このような場合、標的化配列は、それぞれ長さ17、18、19または20のヌクレオチドであると考えられ得る。

【0346】

第2断片:タンパク質-結合断片

ガイド核酸(例、ガイドRNA)のタンパク質-結合断片は、RNA-誘導エンドヌクレアーゼと相互作用(結合)する。ガイド核酸(例、ガイドRNA)は、上述の標的化断片/標的化配列/ガイド配列を介して、結合したエンドヌクレアーゼを標的核酸(標的部位)内の特定のヌクレオチド配列に誘導する。ガイド核酸(例、ガイドRNA)のタンパク質-結合断片は、ヌクレオチドの互いに相補的である2つの伸長を含む。タンパク質-結合断片の相補的ヌクレオチドは、ハイブリダイズして二本鎖RNA二本鎖(dsRNA)を形成する。

【0347】

シングルおよびデュアルガイド核酸

デュアルガイド核酸(例、ガイドRNA)は、2つの別個の核酸分子を含む。被検体デュアルガイド核酸(例、ガイドRNA)の2つの分子のそれぞれは、互いに相補的であるヌクレオチドの伸長を含み、その結果、2つの分子の相補的ヌクレオチドはハイブリダイズしてタンパク質-結合断片の二本鎖RNA二本鎖を形成する。

【0348】

いくつかの実施態様において、アクチベーターの二本鎖-形成断片は、8以上の隣接するヌクレオチド(例、8以上の隣接するヌクレオチド、10以上の隣接するヌクレオチド、12以上の隣接するヌクレオチド、15以上の隣接するヌクレオチド、または20以上の隣接するヌクレオチド)の伸長に対して、国際特許出願番号PCT/US2016/052690およびPCT/US2017/062617に記載のアクチベーター(tracrRNA)の1つ、またはそれらの相補体と60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%以上同一または100%同一である。

【0349】

いくつかの実施態様において、標的物の二本鎖-形成断片は、8以上の隣接するヌクレオチド(例、8以上の隣接するヌクレオチド、10以上の隣接するヌクレオチド、12以上の隣接するヌクレオチド、15以上の隣接するヌクレオチド、または20以上の隣接するヌクレオチド)の伸長に対して、国際特許出願番号PCT/US2016/052690およびPCT/US2017/062617に記載の標的物(crRNA)配列の1つ、またはそれらの相補体と60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%以上同一または100%同一である。

【0350】

デュアルガイド核酸(例、ガイドRNA)は、標的物のアクチベーターとの制御された(すなわち、条件付き)結合を可能とするよう設計され得る。デュアルガイド核酸(例、ガイドRNA)は、アクチベーターおよび標的物の両方がCas9との機能的複合体において結合されない限り機能的ではないので、デュアルガイド核酸(例、ガイドRNA)は、アクチベーターと誘導できる標的物との間の結合を与えることによって誘導可能(例、薬物誘導可能)であり得る。1つの非限定的例として、RNAアプタマーを用いて、アクチベーターの標的物との結合を調整(すなわち、制御)し得る。従って、アクチベーターおよび/または標的物は、RNAアプタマー配列を含み得る。

【0351】

アプタマー(例、RNAアプタマー)は、当該分野で公知であり、そして一般にリボスイッチの合成版である。用語「RNAアプタマー」および「リボスイッチ」は、本明細書中互いに交換可能で使用され、それらが一部である核酸分子(例、RNA、DNA/RNAハイブリッドなど)の構造(および従って特異的配列の利用可能性)の誘導可能な調整を提供する合成および天然核酸配列の両方を含む。RNAアプタマーは、通常、特定の構造(例、ヘアピン)へと折り畳まれる配列を含み、これは特定の薬物(例、小分子)を特異的に結合する。薬物の結合は、RNAの折り畳みにおいて構造変化を引き起こし、これはアプタマーが一部である核酸の特徴を変化させる。非限定的例として:(i)アプタマーを有するアクチベーターは、アプタマーが適切な薬物によって結合されない限り、同種標的物に結合することができない;(ii)アプタマーを有する標的物は、アプタマーが適切な薬物によって結合されない限り、同種アクチベーターに結合することができない;および(iii)それぞれ異なる薬物を結合する異なるアプタマーを含む標的物およびアクチベーターは、両方の薬物が存在しない限り、互いに結合することができない。これらの例によって説明されるように、デュアルガイド核酸(例、ガイドRNA)は誘導可能であるように設計され得る。

【0352】

アプタマーおよびリボスイッチの例は、例えば:Nakamura et al., Genes Cells. 2012 May;17(5):344-64; Vavalle et al., Future Cardiol. 2012 May;8(3):371-82; Citartan et al., Biosens Bioelectron. 2012 Apr 15;34(1):1-11;およびLiberman et al., Wiley Interdiscip Rev RNA. 2012 May-Jun;3(3):369-84において見い出され得;これらは全て、それらの全体が本明細書中に参考として援用される。

【0353】

ハイブリダイズしてタンパク質結合断片を形成し得る国際特許出願番号PCT/US2016/052690およびPCT/US2017/062617に含まれるデュアルガイド核酸(例、ガイドR

NA)、またはそれらの相補体に含まれ得るヌクレオチド配列の非限定的例。

【0354】

被検体シングルガイド核酸(例、ガイドRNA)は、ハイブリダイズしてタンパク質-結合断片(従ってステムループ構造を生じる)二本鎖RNA二本鎖(dsRNA二本鎖)を形成し、そして介在ヌクレオチド(「リンカー」または「リンカーヌクレオチド」)によって共有結合される、ヌクレオチド(デュアルガイド核酸の「標的物」および「アクチベーター」に似ている)の互いに相補的である2つの伸長を含む。従って、被検体シングルガイド核酸(例、シングルガイドRNA)は、それぞれ二本鎖-形成断片を有する標的物およびアクチベーターを含み得、ここで標的物およびアクチベーターの二本鎖-形成断片は互いにハイブリダイズしてdsRNA二本鎖を形成する。標的物およびアクチベーターは、標的物の3'末端およびアクチベーターの5'末端を介して共有結合され得る。あるいは、標的物およびアクチベーターは、標的物の5'末端およびアクチベーターの3'末端を介して共有結合され得る。

10

【0355】

シングルガイド核酸のリンカーは、3ヌクレオチド~100ヌクレオチドの長さを有し得る。いくつかの実施態様において、シングルガイド核酸(例、ガイドRNA)のリンカーは4 ntである。

【0356】

例示的なシングルガイド核酸(例、ガイドRNA)は、ヌクレオチドのハイブリダイズしてdsRNA二本鎖を形成する2つの相補的な伸長を含む。いくつかの実施態様において、シングルガイド核酸(例、ガイドRNA)(または伸長をコードするDNA)のヌクレオチドの2つの相補的な伸長の1つは、8以上の隣接するヌクレオチド(例、8以上の隣接するヌクレオチド、10以上の隣接するヌクレオチド、12以上の隣接するヌクレオチド、15以上の隣接するヌクレオチド、または20以上の隣接するヌクレオチド)の伸長に対して、国際特許出願番号PCT/US2016/052690およびPCT/US2017/062617に記載のアクチベーター(tracrRNA)分子の1つ、またはそれらの相補体と60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%以上同一または100%同一である。

20

【0357】

いくつかの実施態様において、シングルガイド核酸(例、ガイドRNA)(または伸長をコードするDNA)のヌクレオチドの2つの相補的な伸長の1つは、8以上の隣接するヌクレオチド(例、8以上の隣接するヌクレオチド、10以上の隣接するヌクレオチド、12以上の隣接するヌクレオチド、15以上の隣接するヌクレオチド、または20以上の隣接するヌクレオチド)の伸長に対して、国際特許出願番号PCT/US2016/052690およびPCT/US2017/062617に記載の標的物(crRNA)配列の1つ、またはそれらの相補体と60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%以上同一または100%同一である。

30

【0358】

いくつかの実施態様において、シングルガイド核酸(例、ガイドRNA)(または伸長をコードするDNA)のヌクレオチドの2つの相補的な伸長の1つは、8以上の隣接するヌクレオチド(例、8以上の隣接するヌクレオチド、10以上の隣接するヌクレオチド、12以上の隣接するヌクレオチド、15以上の隣接するヌクレオチド、または20以上の隣接するヌクレオチド)の伸長に対して、国際特許出願番号PCT/US2016/052690およびPCT/US2017/062617に記載の標的物(crRNA)配列またはアクチベーター(tracrRNA)配列の1つ、またはそれらの相補体と60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%以上同一または100%同一である。

40

【0359】

標的物およびアクチベーターの適切な同種対は、種の名前および塩基対合(タンパク質-結合ドメインのdsRNA二本鎖について)を考慮して規定通りに決定され得る。任意のアクチベーター/標的物対は、デュアルガイド核酸(例、ガイドRNA)の一部としてまたはシングルガイド核酸(例、ガイドRNA)の一部として使用され得る。

50

【0360】

いくつかの実施態様において、デュアルガイド核酸(例、ガイドRNA)(例、デュアルガイドRNA)またはシングルガイド核酸(例、ガイドRNA)(例、シングルガイドRNA)のアクチベーター(例、trRNA、trRNA-様分子など)は、国際特許出願番号PCT/US2016/052690およびPCT/US2017/062617に記載のアクチベーター(tracrRNA)分子、またはそれらの相補体と60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%以上、または100%配列同一性を有するヌクレオチドの伸長を含む。

【0361】

いくつかの実施態様において、デュアルガイド核酸(例、デュアルガイドRNA)またはシングルガイド核酸(例、シングルガイドRNA)のアクチベーター(例、trRNA、trRNA-様分子など)は、30以上のヌクレオチド(nt)(例、40以上、50以上、60以上、70以上、75以上のnt)を含む。いくつかの実施態様において、デュアルガイド核酸(例、デュアルガイドRNA)またはシングルガイド核酸(例、シングルガイドRNA)のアクチベーター(例、trRNA、trRNA-様分子など)は、30~200ヌクレオチド(nt)の範囲の長さを有する。

10

【0362】

タンパク質-結合断片は、10ヌクレオチド~100ヌクレオチドの長さを有し得る。

【0363】

また、被検体シングルガイド核酸(例、シングルガイドRNA)および被検体デュアルガイド核酸(例、デュアルガイドRNA)の両方に関し、タンパク質-結合断片のdsRNA二本鎖は、6塩基対(bp)~50bpの長さを有し得る。ハイブリダイズしてタンパク質-結合断片のdsRNA二本鎖を形成するヌクレオチド配列間のパーセント相同性は60%以上であり得る。例えば、ハイブリダイズしてタンパク質-結合断片のdsRNA二本鎖を形成するヌクレオチド配列間のパーセント相同性は、65%以上、70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、98%以上、または99%以上であり得る(例、いくつかの実施態様において、ハイブリダイズせず、そして従ってdsRNA二本鎖内で隆起を生成するいくつかのヌクレオチドがある。いくつかの実施態様において、ハイブリダイズしてタンパク質-結合断片のdsRNA二本鎖を形成するヌクレオチド配列間のパーセント相同性は100%である。

20

【0364】

ハイブリッドガイド核酸

30

いくつかの実施態様において、ガイド核酸は2つのRNA分子(デュアルガイドRNA)である。いくつかの実施態様において、ガイド核酸は1つのRNA分子(シングルガイドRNA)である。いくつかの実施態様において、ガイド核酸はDNA/RNAハイブリッド分子である。このような実施態様において、ガイド核酸のタンパク質-結合断片はRNAであり、そしてRNA二本鎖を形成する。従って、アクチベーターおよび標的物の二本鎖-形成断片はRNAである。しかし、ガイド核酸の標的化断片はDNAであり得る。従って、DNA/RNAハイブリッドガイド核酸がデュアルガイド核酸である場合、「標的物」分子はハイブリッド分子である(例、標的化断片はDNAであり得、そして二本鎖-形成断片はRNAであり得る)。このような実施態様において、「アクチベーター」分子の二本鎖-形成断片はRNAであり得(例、標的物分子の二本鎖-形成断片を有するRNA-二本鎖を形成するために)、一方、二本鎖-形成断片の外側にある「アクチベーター」分子のヌクレオチドはDNAであり得(この場合においてアクチベーター分子はハイブリッドDNA/RNA分子である)、あるいはRNAであり得る(この場合においてアクチベーター分子はRNAである)。DNA/RNAハイブリッドガイド核酸がシングルガイド核酸である場合、標的化断片はDNAであり得、二本鎖-形成断片(シングルガイド核酸のタンパク質-結合断片を作り出す)はRNAであり得、そして標的化および二本鎖-形成断片の外側のヌクレオチドはRNAまたはDNAであり得る。

40

【0365】

DNA/RNAハイブリッドガイド核酸は、いくつかの実施態様において、例えば標的核酸がRNAである場合に有用であり得る。Cas9は、通常、標的DNAとハイブリダイズし、従

50

って標的部位でDNA-RNA二本鎖を形成するガイドRNAと関連する。従って、標的核酸がRNAである場合、RNAの代わりにDNAである(ガイド核酸の)標的化断片を用いることによって標的部位でDNA-RNA二本鎖を反復することが時々有利である。しかし、ガイド核酸のタンパク質-結合断片はRNA-二本鎖であるので、標的物分子は、標的化断片においてDNAであり、そして二本鎖-形成断片においてRNAである。ハイブリッドガイド核酸は、二本鎖標的核酸に対して一本鎖標的核酸へのCas9結合を偏らせ得る。

【0366】

例示的なガイド核酸

任意のガイド核酸が使用され得る。多くの異なるタイプのガイド核酸が当該分野で公知である。選択されたガイド核酸は、使用される特定のCRISPR系(例、特定のRNA誘導エンドヌクレアーゼが使用される)に適切に対合される。従って、ガイド核酸は、例えば、本明細書中に記載されたまたは当該分野で公知の任意のRNA誘導エンドヌクレアーゼに対応するガイド核酸であり得る。ガイド核酸およびRNA誘導エンドヌクレアーゼは、例えば、国際特許出願番号PCT/US2016/052690およびPCT/US2017/062617に記載されている。

10

【0367】

いくつかの実施態様において、適切なガイド核酸は、2つの別個のRNAポリヌクレオチド分子を含む。いくつかの実施態様において、第1の2つの別個のRNAポリヌクレオチド分子(アクチベーター)は、8以上の隣接するヌクレオチド(例、8以上の隣接するヌクレオチド、10以上の隣接するヌクレオチド、12以上の隣接するヌクレオチド、15以上の隣接するヌクレオチド、または20以上の隣接するヌクレオチド)の伸長に対して、国際特許出願番号PCT/US2016/052690およびPCT/US2017/062617に記載のヌクレオチド配列の任意の1つ、またはそれらの相補体と60%以上(例、65%以上、70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、98%以上、99%以上、または100%)のヌクレオチド配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施態様において、第2の2つの別個のRNAポリヌクレオチド分子(標的物)は、8以上の隣接するヌクレオチド(例、8以上の隣接するヌクレオチド、10以上の隣接するヌクレオチド、12以上の隣接するヌクレオチド、15以上の隣接するヌクレオチド、または20以上の隣接するヌクレオチド)の伸長に対して、国際特許出願番号PCT/US2016/052690およびPCT/US2017/062617に記載のヌクレオチド配列の任意の1つ、またはそれらの相補体と60%以上(例、65%以上、70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、98%以上、99%以上、または100%)のヌクレオチド配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。

20

30

【0368】

いくつかの実施態様において、適切なガイド核酸は、シングルRNAポリヌクレオチドであり、そして8以上の隣接するヌクレオチド(例、8以上の隣接するヌクレオチド、10以上の隣接するヌクレオチド、12以上の隣接するヌクレオチド、15以上の隣接するヌクレオチド、または20以上の隣接するヌクレオチド)の伸長に対して、国際特許出願番号PCT/US2016/052690およびPCT/US2017/062617に記載のヌクレオチド配列の任意の1つ、またはそれらの相補体と60%以上(例、65%以上、70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、98%以上、99%以上、または100%)のヌクレオチド配列同一性を有する第1および第2のヌクレオチド配列を含む。

40

【0369】

いくつかの実施態様において、ガイドRNAはCpf1および/またはCas9ガイドRNAである。Cpf1および/またはCas9ガイドRNAは、30ヌクレオチド(nt)~100 nt、例えば、30 nt~40 nt、40 nt~45 nt、45 nt~50 nt、50 nt~60 nt、60 nt~70 nt、70 nt~80 nt、80 nt~90 nt、または90 nt~100 ntの全長を有し得る。いくつかの実施態様において、Cpf1および/またはCas9ガイドRNAは、35 nt、36 nt、37 nt、38 nt、39 nt、40 nt、41 nt、42 nt、43 nt、44 nt、45 nt、46 nt、47 nt、48 nt、49 nt、または50 ntの全長を有する。Cpf1および/またはCas9ガイドR

50

NAは、標的核酸-結合断片および二本鎖-形成断片を含み得る。

【0370】

Cpf1および/またはCas9ガイドRNAの標的核酸-結合断片は、15 nt～30 nt、例えば、15 nt、16 nt、17 nt、18 nt、19 nt、20 nt、21 nt、22 nt、23 nt、24 nt、25 nt、26 nt、27 nt、28 nt、29 nt、または30 ntの長さを有し得る。いくつかの実施態様において、標的核酸-結合断片は23 ntの長さを有する。いくつかの実施態様において、標的核酸-結合断片は24 ntの長さを有する。いくつかの実施態様において、標的核酸-結合断片は25 ntの長さを有する。

【0371】

Cpf1および/またはCas9ガイドRNAの標的核酸-結合断片は、標的核酸配列の対応する長さで100%相補性を有し得る。標的断片は、標的核酸配列の対応する長さで100%未満の相補性を有し得る。例えば、Cpf1および/またはCas9ガイドRNAの標的核酸結合断片は、標的核酸配列と相補的ではない1、2、3、4、または5ヌクレオチドを有し得る。例えば、いくつかの実施態様において、標的核酸-結合断片は25ヌクレオチドの長さを有し、そして標的核酸配列は25ヌクレオチドの長さを有し、いくつかの実施態様において、標的核酸-結合断片は標的核酸配列と100%相補性を有する。別の例として、いくつかの実施態様において、標的核酸-結合断片は25ヌクレオチドの長さを有し、そして標的核酸配列は25ヌクレオチドの長さを有し、いくつかの実施態様において、標的核酸-結合断片は、1つの非相補的ヌクレオチドおよび24の標的核酸配列と相補的なヌクレオチドを有する。

【0372】

Cpf1および/またはCas9ガイドRNAの二本鎖-形成断片は、15 nt～25 nt、例えば、15 nt、16 nt、17 nt、18 nt、19 nt、20 nt、21 nt、22 nt、23 nt、24 nt、または25 ntの長さを有し得る。

【0373】

いくつかの実施態様において、Cpf1ガイドRNAの二本鎖-形成断片は、ヌクレオチド配列5'-AAUUUCUACUGUUGUAGAU-3'を含み得る。

【0374】

さらなる要素

いくつかの実施態様において、ガイド核酸(例、ガイドRNA)は、さらなる断片(単数または複数)(いくつかの実施態様において、5'末端で、いくつかの実施態様において、3'末端で、いくつかの実施態様において、5'または3'末端のいずれかで、いくつかの実施態様において、配列内に埋め込まれ(すなわち、5'および/または3'末端ではない)、いくつかの実施態様において、5'末端および3'末端の両方で、いくつかの実施態様において、埋め込まれそして5'末端および/または3'末端で、など)を含む。例えば、適切なさらなる断片は、5'キャップ(例、7-メチルグアニル酸キャップ(m⁷G));3'ポリアデニル化テール(すなわち、3'ポリ(A)テール);リボザイム配列(例えば、ガイド核酸またはガイド核酸の成分の自己開裂を可能にするため、例、標的物、アクチベーターなど);リボスイッチ配列(例、タンパク質およびタンパク質複合体によって調節された安定性および/または調節されたアクセス性を可能にするため);dsRNA二本鎖(すなわち、ヘアピン)を形成する配列);RNAを細胞内部位(例、核、ミトコンドリア、葉緑体など)に標的化する配列;追跡を提供する修飾または配列(例、蛍光分子(すなわち、蛍光染料)などの標識、蛍光検出を容易にする配列または他の部分);タンパク質(例、DNAに作用するタンパク質、転写アクチベーター、転写リプレッサー、DNAメチルトランスフェラーゼ、DNAデメチラーゼ、ヒストンアセチルトランスフェラーゼ、ヒストンデアセチラーゼ、RNA(例、RNAアプタマー)を結合するタンパク質、標識化タンパク質、蛍光標識化タンパク質などを含む)のための結合部位を提供する配列または他の修飾;増加した、減少したおよび/または制御可能な安定性を提供する修飾または配列;およびそれらの組み合わせを含み得る。

【0375】

RNA-誘導エンドヌクレアーゼ

ガイド核酸に加えて、またはその代わりに、組成物はRNA-誘導エンドヌクレアーゼタンパク質またはこれをコードする核酸(例、mRNAまたはベクター)を含有し得る。任意のRNA-誘導エンドヌクレアーゼが使用され得る。使用されるRNA誘導エンドヌクレアーゼの選択は、少なくとも一部は、使用されるCRISPR系の意図する最終用途に依存する。

【0376】

いくつかの実施態様において、ポリペプチドはCas9ポリペプチドである。本開示の組成物に含めるのに適切なCas9ポリペプチドは、以下に記載されるように、天然に存在するCas9ポリペプチド(例、細菌および/または古細菌細胞に天然に存在する)、または非自然発生Cas9ポリペプチド(例、Cas9ポリペプチドは、以下で議論される変異体Cas9ポリペプチド、キメラポリペプチドなど)を含む。いくつかの実施態様において、当業者は、本明細書中で開示したCas9ポリペプチドが任意の源に由来するまたは任意の源から単離された任意の変異体であり得ることを理解し得る。他の実施態様において、本開示のCas9ペプチドは、以下に記載の機能性変異を含むがこれらに限定されない、文献に記載の1つ以上の変異を含み得る:Fonfara et al. Nucleic Acids Res. 2014 Feb;42(4):2577-90; Nishimasu H. et al. Cell. 2014 Feb 27;156(5):935-49; Jinek M. et al. Science. 2012 337:816-21;およびJinek M. et al. Science. 2014 Mar 14;343(6176);2013年3月15日に出願された米国特許出願番号13/842,859、これは本明細書中に参考として援用される、もまた参照;さらに、米国特許番号8,697,359; 8,771,945; 8,795,965; 8,865,406; 8,871,445; 8,889,356; 8,895,308; 8,906,616; 8,932,814; 8,945,839; 8,993,233;および8,999,641、これらは全て本明細書中に参考として援用される、を参照。従って、いくつかの実施態様において、本明細書中で開示した系および方法は、二本鎖ヌクレアーゼ活性を有する野生型Cas9タンパク質、一本鎖ニッカーゼとして作用するCas9変異体、または修飾ヌクレアーゼ活性を有する他の変異体とともに使用され得る。従って、本開示の組成物に含めるのに適切なCas9ポリペプチドは、例えば、標的核酸における一本鎖または二本鎖切断を行い得るか、あるいは野生型Cas9ポリペプチドと比較して減少した酵素活性を有し得る酵素的に活性なCas9ポリペプチドであり得る。

【0377】

天然に存在するCas9ポリペプチドはガイド核酸を結合し、それによって標的核酸(標的部位)内の特定の配列に向けられ、そして標的核酸を開裂する(例、dsDNAを開裂して二本鎖切断を生じる、ssDNAを開裂する、ssRNAを開裂するなど)。被検体Cas9ポリペプチドは、2つの部分、RNA-結合部分および活性部分を含む。RNA-結合部分は被検体ガイド核酸と相互作用し、そして活性部分は部位-指向酵素活性(例、ヌクレアーゼ活性、DNAおよび/またはRNAメチル化のための活性、DNAおよび/またはRNA開裂のための活性、ヒストンアセチル化のための活性、ヒストンメチル化のための活性、RNA修飾のための活性、RNA-結合のための活性、RNAスプライシングのための活性などを示す。いくつかの実施態様において、活性部分は、野生型Cas9ポリペプチドの対応する部分に関して減少したヌクレアーゼ活性を示す。いくつかの実施態様において、活性部分は酵素的に不活性である。

【0378】

タンパク質が被検体ガイド核酸と相互作用するRNA-結合部分を有するかどうかを決定するアッセイは、タンパク質と核酸との間の結合について試験する任意の便利な結合アッセイであり得る。例示的な結合アッセイは、ガイド核酸およびCas9ポリペプチドを標的核酸に加えることを含む結合アッセイ(例、ゲルシフトアッセイ)を含む。

【0379】

タンパク質が活性部分を有するかどうかを決定する(例、ポリペプチドが標的核酸を開裂するヌクレアーゼ活性を有するかどうかを決定する)アッセイは、核酸開裂について試験する任意の便利な核酸開裂アッセイであり得る。ガイド核酸およびCas9ポリペプチドを標的核酸に加えることを含む例示的な開裂アッセイ。

【0380】

いくつかの実施態様において、本開示の組成物に含めるのに適切なCas9ポリペプチドは、標的核酸を修飾する酵素活性(例、ヌクレアーゼ活性、メチルトランスフェラーゼ活性、デメチラーゼ活性、DNA修復活性、DNA損傷活性、脱アミノ化活性、ジスムターゼ活性、アルキル化活性、脱プリン活性、酸化活性、ピリミジンダイマー形成活性、インテグラーゼ活性、トランスポーゼース活性、リコンビナーゼ活性、ポリメラーゼ活性、リガーゼ活性、ヘリカーゼ活性、ホトリアーゼ活性またはグリコシラーゼ活性)を有する。

【0381】

他の実施態様において、本開示の組成物に含めるのに適切なCas9ポリペプチドは、標的核酸に関連するポリペプチド(例、ヒストン)を修飾する酵素活性(例、メチルトランスフェラーゼ活性、デメチラーゼ活性、アセチルトランスフェラーゼ活性、デアセチラーゼ活性、キナーゼ活性、ホスファターゼ活性、ユビキチンリガーゼ活性、脱ユビキチン化活性、アデニル化活性、脱アデニル化活性、SUMO化活性、脱SUMO化活性、リボシル化活性、脱リボシル化活性、ミリスチル化活性または脱ミリスチル化活性)を有する。

【0382】

広範な種々の種からの多くのCas9オルソログが同定されており、そしていくつかの実施態様において、タンパク質はいくつかの同一のアミノ酸のみを共有する。全ての同定されたCas9オルソログは、中央のHNHエンドヌクレアーゼドメインおよび分裂RuvC/RNaseHドメインと同じドメイン構造を有する。Cas9タンパク質は、保存された構造を有する4つの鍵となるモチーフを共有する。モチーフ1、2、および4はRuvC様モチーフであり、一方モチーフ3はHNH-モチーフである。

【0383】

いくつかの実施態様において、適切なCas9ポリペプチドは4つのモチーフを有するアミノ酸配列を含み、モチーフ1-4のそれぞれは、図1に示すCas9アミノ酸配列(配列番号1);あるいは、以下の表1に示すCas9アミノ酸配列のモチーフ1-4;あるいは、図1に示すCas9アミノ酸配列(配列番号1)のアミノ酸7-166または731-1003と60%以上、70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、99%以上または100%のアミノ酸配列同一性を有する。

【0384】

いくつかの実施態様において、Cas9ポリペプチドは、図1に示しそして配列番号1に示すアミノ酸配列と75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、または98%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み;そして配列番号1に示すアミノ酸配列に関してN497、R661、Q695、およびQ926のアミノ酸置換を含み;または配列番号1に示すアミノ酸配列に関してK855のアミノ酸置換を含み;あるいは配列番号1に示すアミノ酸配列に関してK810、K1003、およびR1060のアミノ酸置換を含み;あるいは配列番号1に示すアミノ酸配列に関してK848、K1003、およびR1060のアミノ酸置換を含む。

【0385】

本明細書中で使用される用語「Cas9ポリペプチド」は、用語「変異体Cas9ポリペプチド」を含み;および用語「変異体Cas9ポリペプチド」は用語「キメラCas9ポリペプチド」を含む。

【0386】

変異体Cas9ポリペプチド

本開示の組成物に含めるのに適切なCas9ポリペプチドは、変異体Cas9ポリペプチドを含む。変異体Cas9ポリペプチドは、野生型Cas9ポリペプチド(例、上記のような天然に存在するCas9ポリペプチド)のアミノ酸配列と比較した場合に1つのアミノ酸が異なる(例、欠失、挿入、置換、融合を有する)(すなわち、少なくとも1つのアミノ酸が異なる)アミノ酸配列を有する。いくつかの場合において、変異体Cas9ポリペプチドは、Cas9ポリペプチドのヌクレアーゼ活性を減少させるアミノ酸変化(例、欠失、挿入、または置換)を有する。例えば、いくつかの場合において、変異体Cas9ポリペプチドは、対応する野生型Cas9ポリペプチドのヌクレアーゼ活性の50%未満、40%未満、30%未満、2

10

20

30

40

50

0%未満、10%未満、5%未満、または1%未満を有する。いくつかの実施態様において、変異体Cas9ポリペプチドは、実質的なヌクレアーゼ活性を有しない。Cas9ポリペプチドが実質的なヌクレアーゼ活性を有しない変異体Cas9ポリペプチドである場合、それは「dCas9」と呼ばれ得る。

【0387】

いくつかの実施態様において、変異体Cas9ポリペプチドは減少したヌクレアーゼ活性を有する。例えば、本開示の結合方法における使用に適切な変異体Cas9ポリペプチドは、野生型Cas9ポリペプチド、例えば、図1に示すアミノ酸配列(配列番号1)を含む野生型Cas9ポリペプチドのエンドヌクレアーゼ活性の約20%未満、約15%未満、約10%未満、約5%未満、約1%未満、または約0.1%未満を示す。

【0388】

いくつかの実施態様において、変異体Cas9ポリペプチドは、標的核酸の相補的鎖を開裂し得るが、二本鎖標的核酸の非相補的鎖を開裂する能力が減少している。例えば、変異体Cas9ポリペプチドは、RuvCドメイン(例、図1の「ドメイン1」)の機能を減少させる変異(アミノ酸置換)を有し得る。非限定的例として、いくつかの実施態様において、変異体Cas9ポリペプチドは、D10A変異(例、配列番号1の位置10に対応するアミノ酸位置でアスパルテートからアラニンへ)を有し、そしてそれゆえ二本鎖標的核酸の相補的鎖を開裂し得るが、二本鎖標的核酸(従って、変異体Cas9ポリペプチドが二本鎖標的核酸を開裂する場合、二本鎖切断(DSB)の代わりに一本鎖切断(SSB)を生じる)(例えば、Jinek et al., Science. 2012 Aug 17;337(6096):816-21を参照)の非相補的鎖を開裂する能力が減少している。

【0389】

いくつかの実施態様において、変異体Cas9ポリペプチドは、二本鎖標的核酸の非相補的鎖を開裂し得るが、標的核酸の相補的鎖を開裂する能力が減少している。例えば、変異体Cas9ポリペプチドは、HNHドメイン(RuvC/HNH/RuvCドメインモチーフ、図1の「ドメイン2」)の機能を減少させる変異(アミノ酸置換)を有し得る。非限定的例として、いくつかの実施態様において、変異体Cas9ポリペプチドはH840A変異(例、配列番号1の位置840に対応するアミノ酸位置でヒスチジンからアラニンへ)(図1)を有し得、そしてそれゆえ標的核酸の非相補的鎖を開裂し得るが、標的核酸(従って、変異体Cas9ポリペプチドが二本鎖標的核酸を開裂する場合、DSBの代わりにSSBを生じる)の相補的鎖を開裂する能力が減少している。このようなCas9ポリペプチドは、標的核酸(例、一本鎖標的核酸)を開裂する能力が減少しているが、標的核酸(例、一本鎖または二本鎖標的核酸)を結合する能力を維持する。

【0390】

いくつかの実施態様において、変異体Cas9ポリペプチドは、二本鎖標的核酸の相補的鎖および非相補的鎖の両方を開裂する能力が減少している。非限定的例として、いくつかの実施態様において、変異体Cas9ポリペプチドはD10A変異およびH840A変異の両方(例、RuvCドメインおよびHNHドメインの両方における変異)を有し、その結果、ポリペプチドは、二本鎖標的核酸の相補的鎖および非相補的鎖の両方を開裂する能力が減少している。このようなCas9ポリペプチドは、標的核酸(例、一本鎖標的核酸または二本鎖標的核酸)を開裂する能力が減少しているが、標的核酸(例、一本鎖標的核酸または二本鎖標的核酸)を結合する能力を維持する。

【0391】

別の非限定的例として、いくつかの実施態様において、変異体Cas9ポリペプチドは、W476A変異およびW1126A変異を有し、その結果、ポリペプチドは標的核酸を開裂する能力が減少している。このようなCas9ポリペプチドは、標的核酸を開裂する能力が減少しているが、標的核酸を結合する能力を維持する。

【0392】

別の非限定的例として、いくつかの実施態様において、変異体Cas9ポリペプチドはP475A変異、W476A変異、N477A変異、D1125A変異、W1126A変異、およびD1127

10

20

30

40

50

A変異を有し、その結果、ポリペプチドは標的核酸を開裂する能力が減少している。このようなCas9ポリペプチドは、標的核酸を開裂する能力が減少しているが、標的核酸を結合する能力を維持する。

【0393】

別の非限定的例として、いくつかの実施態様において、変異体Cas9ポリペプチドはH840A変異、W476A変異、およびW1126A変異を有し、その結果、ポリペプチドは標的核酸を開裂する能力が減少している。このようなCas9ポリペプチドは、標的核酸を開裂する能力が減少しているが、標的核酸を結合する能力を維持する。

【0394】

別の非限定的例として、いくつかの実施態様において、変異体Cas9ポリペプチドはH840A変異、D10A変異、W476A変異、およびW1126A変異を有し、その結果、ポリペプチドは標的核酸を開裂する能力が減少している。このようなCas9ポリペプチドは、標的核酸を開裂する能力が減少しているが、標的核酸を結合する能力を維持する。

【0395】

別の非限定的例として、いくつかの実施態様において、変異体Cas9ポリペプチドはH840A変異、P475A変異、W476A変異、N477A変異、D1125A変異、W1126A変異、およびD1127A変異を有し、その結果、ポリペプチドは標的核酸を開裂する能力が減少している。このようなCas9ポリペプチドは、標的核酸を開裂する能力が減少しているが、標的核酸を結合する能力を維持する。

【0396】

別の非限定的例として、いくつかの実施態様において、変異体Cas9ポリペプチドはD10A変異、H840A変異、P475A変異、W476A変異、N477A変異、D1125A変異、W1126A変異、およびD1127A変異を有し、その結果、ポリペプチドは標的核酸を開裂する能力が減少している。このようなCas9ポリペプチドは、標的核酸を開裂する能力が減少しているが、標的核酸を結合する能力を維持する。

【0397】

他の残基は、変異して上記の効果を達成し得る(すなわち、1つまたは他のヌクレアーゼ部分を不活性化し得る)。非限定的例として、残基D10、G12、G17、E762、H840、N854、N863、H982、H983、A984、D986、および/またはA987は、変更(すなわち、置換)され得る(Cas9アミノ酸残基の保存に関するさらなる情報について表1を参照)。また、アラニン置換以外の変異が適切である。

【0398】

いくつかの実施態様において、減少した触媒活性を有する変異体Cas9ポリペプチド(例、Cas9タンパク質がD10、G12、G17、E762、H840、N854、N863、H982、H983、A984、D986、および/またはA987変異、例えば、D10A、G12A、G17A、E762A、H840A、N854A、N863A、H982A、H983A、A984Aおよび/またはD986Aを有する場合)、変異体Cas9ポリペプチドは、それがガイド核酸と相互作用する能力を維持する限り、依然として、部位-特異的様式で標的核酸に結合し得る(それがガイド核酸によって標的核酸配列に依然として誘導されるので)。

【0399】

10

20

30

40

50

【表 1】

表 1. 表 1 は、種々の種からの Cas9 配列において存在する 4 つのモチーフを列挙する。本明細書中に列挙されたアミノ酸は、*S. pyogenes* からの Cas9 からのものである(配列番号 1)。

モチーフ	モチーフ	アミノ酸(残基#)	高度に保存された
1	RuvC	IGLDIGTNSVGWAVI (7-21) (配列番号 3)	D10, G12, G17
2	RuvC	IVIEMARE (759-766) (配列番号 4)	E762
3	HNH-モチーフ	DVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKN (837-863) (配列番号 5)	H840, N854, N863
4	RuvC	HHAHDAYL (982-989) (配列番号 6)	H982, H983, A984, D986, A987

10

【0400】

上記に加えて、変異体 Cas9 タンパク質は、配列同一性について、Cas9 ポリペプチドについて上記したのと同じパラメーターを有し得る。従って、いくつかの実施態様において、適切な変異体 Cas9 ポリペプチドは、4 つのモチーフを有するアミノ酸配列を含み、モチーフ 1-4 のそれぞれは、図 1 に示す Cas9 アミノ酸配列(配列番号 1)の 60% 以上、70% 以上、75% 以上、80% 以上、85% 以上、90% 以上、95% 以上、99% 以上または 100% のアミノ酸配列同一性を有し、またはあるいはモチーフ 1-4 (配列番号 1 のモチーフ 1-4 は、表 1 に示されるようにそれぞれ配列番号 3-6 である)に対して; またはあるいは図 1 に示す Cas9 アミノ酸配列(配列番号 1)のアミノ酸 7-166 または 731-1003 に対して。国際特許出願番号 PCT/US2016/052690 および PCT/US2017/062617 において具体的に参照されるものを含む、上記で定義した任意の Cas9 タンパク質が、本開示の組成物において Cas9 ポリペプチドとして、またはキメラ Cas9 ポリペプチドの一部として使用され得る。

20

【0401】

いくつかの実施態様において、適切な変異体 Cas9 ポリペプチドは、図 1 に示す Cas9 アミノ酸配列(配列番号 1)の 60% 以上、70% 以上、75% 以上、80% 以上、85% 以上、90% 以上、95% 以上、99% 以上または 100% のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。国際特許出願番号 PCT/US2016/052690 および PCT/US2017/062617 において具体的に参照されるものを含む、上記で定義した任意の Cas9 タンパク質が、本開示の組成物において変異体 Cas9 ポリペプチドとして、またはキメラ変異体 Cas9 ポリペプチドの一部として使用され得る。

30

【0402】

キメラポリペプチド(融合ポリペプチド)

いくつかの実施態様において、変異体 Cas9 ポリペプチドはキメラ Cas9 ポリペプチド(本明細書中、融合ポリペプチド、例えば、「Cas9 融合ポリペプチド」ともいう)である。Cas9 融合ポリペプチドは、標的核酸および/または標的核酸に関連するポリペプチドを結合および/または修飾(例、開裂、メチル化、脱メチル化など)し得る(例、例えばヒストンテールのメチル化、アセチル化など)。

40

【0403】

Cas9 融合ポリペプチドは、野生型 Cas9 ポリペプチド(例、天然に存在する Cas9 ポリペプチド)からの配列の相違による変異体 Cas9 ポリペプチドである。Cas9 融合ポリペプチドは、共有結合した異種ポリペプチド(「融合パートナー」ともいう)に融合した Cas9 ポリペプチド(例、野生型 Cas9 ポリペプチド、変異体 Cas9 ポリペプチド、減少したヌクレアーゼ活性を有する変異体 Cas9 ポリペプチド(上記のような)など)である。いくつかの

50

実施態様において、Cas9融合ポリペプチドは、共有結合した異種ポリペプチドに融合した、ヌクレアーゼ活性が減少した変異体Cas9ポリペプチド(例、dCas9)である。いくつかの実施態様において、異種ポリペプチドは、Cas9融合ポリペプチド(例、メチルトランスフェラーゼ活性、アセチルトランスフェラーゼ活性、キナーゼ活性、ユビキチン化活性など)によっても示される活性(例、酵素活性)を示す(そしてそれゆえ提供する)。いくつかのこのような実施態様において、例えば、Cas9ポリペプチドが標的核酸を修飾する活性(例、酵素活性)を有する融合パートナーを有する(すなわち、異種ポリペプチドを有する)変異体Cas9ポリペプチドである場合の結合方法、本方法はまた、標的核酸を修飾する方法であると考えられ得る。いくつかの実施態様において、標的核酸(例、一本鎖標的核酸)を結合する方法は、標的核酸の修飾を生じ得る。従って、いくつかの実施態様において、標的核酸(例、一本鎖標的核酸)を結合する方法は、標的核酸を修飾する方法であり得る。

10

【0404】

いくつかの実施態様において、異種配列は、細胞内局在性を提供し、すなわち、異種配列は、核への標的化のための細胞内局在性配列(例、核局在化シグナル(NLS)、融合タンパク質を核外に維持するための配列、例えば、核外輸送配列(NES)、融合タンパク質を細胞質に保持するための配列、ミトコンドリアへの標的化のためのミトコンドリア局在化シグナル、葉緑体への標的化のための葉緑体局在化シグナル、小胞体(ER)保留シグナルなど)である。いくつかの実施態様において、変異体Cas9は、NLSを含まず、その結果、タンパク質は核に標的化されない(これは、例えば、標的核酸が細胞質ゾルに存在するRNAである場合、有利であり得る)。いくつかの実施態様において、異種配列は、追跡および/または精製の容易さのためのタグ(すなわち、異種配列は検出可能標識である)(例、蛍光タンパク質、例、緑色蛍光タンパク質(GFP)、YFP、RFP、CFP、mCherry、tdTomatoなど;ヒスチジンタグ、例、6XHisタグ;ヘマグルチニン(HA)タグ;FLAGタグ;Mycタグ;など)を提供し得る。いくつかの実施態様において、異種配列は、増加したまたは減少した安定性を提供し得る(すなわち、異種配列は安定性制御ペプチド、例、デグロンであり、これはいくつかの実施態様において制御可能である(例、温度感受性または薬物制御可能デグロン配列、以下を参照)。いくつかの実施態様において、異種配列は標的核酸からの増加したまたは減少した転写を提供し得る(すなわち、異種配列は転写調節配列、例、転写因子/アクチベーターまたはそれらの断片、転写因子/アクチベーターを採用するタンパク質またはそれらの断片、転写リプレッサーまたはそれらの断片、転写リプレッサーを採用するタンパク質またはそれらの断片、小分子/薬物-応答性転写調節遺伝子などである)。いくつかの実施態様において、異種配列は結合ドメインを提供し得る(すなわち、異種配列はタンパク質結合配列、例、Cas9融合ポリペプチドの目的の別のタンパク質、例、DNAまたはヒストン修飾タンパク質に結合する能力を提供するため、転写因子または転写リプレッサー、採用タンパク質、RNA修飾酵素、RNA-結合タンパク質、翻訳開始因子、RNAスプライシング因子などである)。異種核酸配列は、(例、遺伝子工学によって)別の核酸配列に連結され、キメラポリペプチドをコードするキメラヌクレオチド配列を生成し得る。

20

30

【0405】

被検体Cas9融合ポリペプチド(Cas9融合タンパク質)は、上記の任意の組み合わせにおいて複数(1以上、2以上、3以上など)の融合パートナーを有し得る。例示的な例として、Cas9融合タンパク質は活性(例、転写調節、標的修飾、標的核酸に関連するタンパク質の修飾などのため)を提供する異種配列を有し得、そしてまた細胞内局在性配列を有し得る。いくつかの実施態様において、このようなCas9融合タンパク質はまた、追跡および/または精製の容易さのためのタグ(例、緑色蛍光タンパク質(GFP)、YFP、RFP、CFP、mCherry、tdTomatoなど;ヒスチジンタグ、例、6XHisタグ;ヘマグルチニン(HA)タグ;FLAGタグ;Mycタグ;など)を有し得る。別の例示的な例として、Cas9タンパク質は1個以上のNLS(例、2つ以上、3つ以上、4つ以上、5つ以上、1、2、3、4、または5つのNLS)を有し得る。いくつかの実施態様において、融合パートナー(または複数の

40

50

融合パートナー)(例、NLS、タグ、活性を提供する融合パートナーなど)は、Cas9のC-末端にまたはその近くに位置する。いくつかの実施態様において、融合パートナー(または複数の融合パートナー)(例、NLS、タグ、活性を提供する融合パートナーなど)は、Cas9のN-末端に位置する。いくつかの実施態様において、Cas9はN-末端およびC-末端の両方に融合パートナー(または複数の融合パートナー)(例、NLS、タグ、活性を提供する融合パートナーなど)を有する。

【0406】

増加したまたは減少した安定性を提供する適切な融合パートナーは、デグロン配列を含むが、これに限定されない。デグロンはそれらが一部であるタンパク質の安定性を制御するアミノ酸配列であることは当業者に容易に理解される。例えば、デグロン配列を含むタンパク質の安定性は、一部はデグロン配列によって制御される。いくつかの実施態様において、適切なデグロンは構成的であり、その結果、デグロンは、実験的制御と無関係にタンパク質の安定性に対してその影響を発揮する(すなわち、デグロンは薬物誘導可能ではなく、温度誘導可能ではないなど)。いくつかの実施態様において、デグロンは制御可能な安定性を有する変異体Cas9ポリペプチドを提供し、その結果、変異体Cas9ポリペプチドは、所望の条件に依存して「オン」(すなわち、安定)または「オフ」(すなわち、不安定、分解する)に向けられ得る。例えば、デグロンが温度感受性デグロンである場合、変異体Cas9ポリペプチドは、閾値温度以下(例、42℃、41℃、40℃、39℃、38℃、37℃、36℃、35℃、34℃、33℃、32℃、31℃、30℃など)で機能的(すなわち、「オン」、安定)であり得るが、閾値温度を超えると非機能的(すなわち、「オフ」、分解する)であり得る。別の例として、デグロンが薬物誘導可能デグロンである場合、薬物の存在または不在は、タンパク質を「オフ」(すなわち、不安定)状態から「オン」(すなわち、安定)状態に、あるいはその逆に切り替え得る。例示的な薬物誘導可能デグロンは、FKBP12タンパク質由来である。デグロンの安定性は、デグロンに結合する小分子の存在または不在によって制御される。

【0407】

適切なデグロンの例は、Shield-1、DHFR、オーキシン、および/または温度によって制御されるデグロンを含むが、これらに限定されない。適切なデグロンの非限定的な例は当該分野で公知である(例、Dohmen et al., Science, 1994, 263(5151): p. 1273-1276: Heat-inducible degron: a method for constructing temperature-sensitive mutants; Schoeber et al., Am J Physiol Renal Physiol. 2009 Jan;296(1):F204-11: Conditional fast expression and function of multimeric TRPV5 channels using Shield-1; Chu et al., Bioorg Med Chem Lett. 2008 Nov 15;18(22):5941-4: Recent progress with FKBP-derived destabilizing domains; Kanemaki, Pflugers Arch. 2012 Dec 28: Frontiers of protein expression control with conditional degrons; Yang et al., Mol Cell. 2012 Nov 30;48(4):487-8: Titivated for destruction: the methyl degron; Barbour et al., Biosci Rep. 2013 Jan 18;33(1):. Characterization of the bipartite degron that regulates ubiquitin-independent degradation of thymidylate synthase;およびGreussing et al., J Vis Exp. 2012 Nov 10;(69): Monitoring of ubiquitin-proteasome activity in living cells using a Degron (dgn)-destabilized green fluorescent protein(GFP)-based reporter protein;これらは全て、それらの全体が本明細書中に参考として援用される)。

【0408】

例示的なデグロン配列はよく特徴付けられており、そして細胞および動物の両方において試験されている。従って、Cas9(例、野生型Cas9;変異体Cas9;減少したヌクレアーゼ活性を有する変異体Cas9、例、dCas9;など)のデグロン配列への融合は、「調節可能」でかつ「誘導可能」なCas9ポリペプチドを産生する。本明細書中に記載の任意の融合パートナーは、任意の所望の組み合わせで使用され得る。この点を説明する1つの非限定的例として、Cas9融合タンパク質(すなわち、キメラCas9ポリペプチド)は、検出のため

のYFP配列、安定性のためのデグロン配列、および標的核酸の転写を増加させるための転写アクチベーター配列を含み得る。Cas9ポリペプチド(例、野生型Cas9、変異体Cas9、減少したヌクレアーゼ機能を有する変異体Cas9など)のための融合パートナーとしての使用のための適切なリポータータンパク質は、以下の例示的なタンパク質(またはそれらの機能的断片):his3、 β -ガラクトシダーゼ、蛍光タンパク質(例、GFP、RFP、YFP、サクランボ、トマトなど、およびそれらの種々の誘導体)、ルシフェラーゼ、 β -グルクロニダーゼ、およびアルカリホスファターゼを含むが、これらに限定されない。さらに、Cas9融合タンパク質に使用され得る融合パートナーの数は制限がない。いくつかの実施態様において、Cas9融合タンパク質は1つ以上(例えば2つ以上、3つ以上、4つ以上、または5つ以上)の異種配列を含む。

10

【0409】

適切な融合パートナーは、メチルトランスフェラーゼ活性、デメチラーゼ活性、アセチルトランスフェラーゼ活性、デアセチラーゼ活性、キナーゼ活性、ホスファターゼ活性、ユビキチンリガーゼ活性、脱ユビキチン化活性、アデニル化活性、脱アデニル化活性、SUMO化活性、脱SUMO化活性、リボシル化活性、脱リボシル化活性、ミリスチル化活性、または脱ミリスチル化活性、これらはいずれも核酸を直接修飾すること(例、DNAまたはRNAのメチル化)または核酸-関連のポリペプチド(例、ヒストン、DNA結合タンパク質、およびRNA結合タンパク質など)を修飾することに指向され得る、を提供するポリペプチドを含むが、これらに限定されない。さらなる適切な融合パートナーは、境界要素(例、CTCF)、末梢補充を提供するタンパク質およびそれらの断片(例、ラミンA、ラミンBなど)、およびタンパク質ドッキング要素(例、FKBP/FRB、Pil1/Aby1など)を含むが、これらに限定されない。

20

【0410】

被検体変異体Cas9ポリペプチドのための種々のさらなる適切な融合パートナー(またはそれらの断片)の例は、PCT特許出願:WO2010/075303、WO2012/068627、およびWO2013/155555、これらはそれらの全体が本明細書中に参考として援用される、に記載のものを含むが、これらに限定されない。

【0411】

適切な融合パートナーは、標的核酸または標的核酸に関連するポリペプチド(例、ヒストン、DNA-結合タンパク質、RNA-結合タンパク質、RNA編集タンパク質など)に直接作用することによって転写を間接的に増加させる活性を提供するポリペプチドを含むが、これらに限定されない。適切な融合パートナーは、メチルトランスフェラーゼ活性、デメチラーゼ活性、アセチルトランスフェラーゼ活性、デアセチラーゼ活性、キナーゼ活性、ホスファターゼ活性、ユビキチンリガーゼ活性、脱ユビキチン化活性、アデニル化活性、脱アデニル化活性、SUMO化活性、脱SUMO化活性、リボシル化活性、脱リボシル化活性、ミリスチル化活性、または脱ミリスチル化活性を提供するポリペプチドを含むが、これらに限定されない。

30

【0412】

さらなる適切な融合パートナーは、標的核酸の増加した転写および/または翻訳を直接提供するポリペプチド(例、転写アクチベーターまたはそれらの断片、転写アクチベーターを補充するタンパク質またはそれらの断片、小分子/薬物-応答性転写および/または翻訳調節遺伝子、翻訳-調節タンパク質など)を含むが、これらに限定されない。

40

【0413】

増加したまたは減少した転写を達成するための融合パートナーの非限定的な例は、転写アクチベーターおよび転写リプレッサードメイン(例、Kruppel関連ボックス(KRABまたはSKD);Mad mSIN3相互作用ドメイン(SID);ERFリプレッサードメイン(ERD)など)を含む。いくつかのこのような実施態様において、Cas9融合タンパク質は、ガイド核酸によって標的核酸中の特定の位置(すなわち、配列)に標的化され、そしてプロモーター(これは転写アクチベーター機能を選択的に阻害する)に結合するRNAポリメラーゼをブロックする、および/または局所クロマチン状態(例、標的核酸を修飾するまたは標的核酸

50

に関連するポリペプチドを修飾する融合配列が使用される場合)を修飾するなどの遺伝子座特異的調整を発揮する。いくつかの実施態様において、変化は一時的(例、転写抑制または活性化)である。いくつかの実施態様において、変化は遺伝性(例、エピジェネティック修飾が標的核酸または標的核酸に関連するタンパク質、例、ヌクレオソームヒストンになされる場合)である。

【0414】

ssRNA標的核酸を標的化する場合に使用するための融合パートナーの非限定的な例は：スプライシング因子(例、RSドメイン);タンパク質翻訳成分(例、翻訳開始、伸長、および/または終結因子;例、eIF4G);RNAメチラーゼ;RNA編集酵素(例、RNAデアミナーゼ、例、RNAに作用するアデノシンデアミナーゼ(ADAR)、A~Iおよび/またはC~U編集酵素を含む);ヘリ態様(heliembodiment);RNA-結合タンパク質;などを含む(がこれらに限定されない)。融合パートナーはタンパク質全体を含み得、またはいくつかの実施態様においてタンパク質の断片(例、機能性ドメイン)を含み得ることが理解される。

10

【0415】

いくつかの実施態様において、異種配列はCas9ポリペプチドのC-末端に融合され得る。いくつかの実施態様において、異種配列はCas9ポリペプチドのN-末端に融合され得る。いくつかの実施態様において、異種配列はCas9ポリペプチドの内部部分(すなわち、N-またはC-末端以外の部分)に融合され得る。

【0416】

さらに、キメラCas9ポリペプチドの融合パートナーは、一次的または不可逆的、直接的または間接的に関わらずssRNAと相互作用し得る任意のドメイン(これは、この開示の開示のために、分子内および/または分子間2次構造、例、ヘアピン、ステムループなどの二本鎖RNA二本鎖を含む)であり得;エンドヌクレアーゼ(例えば、RNase I、CRR22 DYWドメイン、Dicer、ならびにSMG5およびSMG6などのタンパク質からのPIN(Pilt N-末端)ドメイン);RNA開裂を刺激するのに関与するタンパク質およびタンパク質ドメイン(例えば、CPSF、CstF、CFImおよびCFIIm);エクソヌクレアーゼ(例えば、XRN-1またはエクソヌクレアーゼT);デアデニラーゼ(例えば、HNT3);ナンセンス媒介RNA崩壊に関与するタンパク質およびタンパク質ドメイン(例えば、UPF1、UPF2、UPF3、UPF3b、RNP S1、Y14、DEK、REF2、およびSRm160);RNAの安定化に関与するタンパク質およびタンパク質ドメイン(例えば、PABP);翻訳の抑制に関与するタンパク質およびタンパク質ドメイン(例えば、Ago2およびAgo4);翻訳の刺激に関与するタンパク質およびタンパク質ドメイン(例えば、Staufen);翻訳の調節に関与する(例えば、調節し得る)タンパク質およびタンパク質ドメイン(例、開始因子、伸長因子、終結因子などの翻訳因子、例、eIF4G);RNAのポリアデニル化に関与するタンパク質およびタンパク質ドメイン(例えば、PAP1、GLD-2、およびStar-PAP);RNAのポリウリジニル化に関与するタンパク質およびタンパク質ドメイン(例えば、C1D1および末端ウリジレートトランスフェラーゼ);RNA局在化に関与するタンパク質およびタンパク質ドメイン(例えば、IMP1、ZBP1、She2p、She3p、およびBicaudal-Dから);RNAの核内保持に関与するタンパク質およびタンパク質ドメイン(例えば、Rrp6);RNAの核外輸送に関与するタンパク質およびタンパク質ドメイン(例えば、TAP、NXF1、THO、TREX、REF、およびAly);RNAスプライシングの抑制に関与するタンパク質およびタンパク質ドメイン(例えば、PTB、Sam68、およびhnRNP A1);RNAスプライシングの刺激に関与するタンパク質およびタンパク質ドメイン(例えば、セリン/アルギニン-豊富(SR)ドメイン);転写の効率を減少させるのに関与するタンパク質およびタンパク質ドメイン(例えば、FUS(TLS));ならびに転写の刺激に関与するタンパク質およびタンパク質ドメイン(例えば、CDK7およびHIV Tat)を含む群より選ばれるエフェクタードメインを含むが、これらに限定されない。あるいは、エフェクタードメインは、エンドヌクレアーゼ;RNA開裂を刺激し得るタンパク質およびタンパク質ドメイン;エクソヌクレアーゼ;デアデニラーゼ;ナンセンス媒介RNA崩壊活性を有するタンパク質およびタンパク質ドメイン;RNAを安定化し得るタンパク質およびタンパク質ドメイン;翻訳を抑制し得るタンパク質およびタンパク質ドメイ

20

30

40

50

ン;翻訳を刺激し得るタンパク質およびタンパク質ドメイン;翻訳を調節し得るタンパク質およびタンパク質ドメイン(例、開始因子、伸長因子、終結因子などの翻訳因子、例、eIF4G);RNAをポリアデニル化し得るタンパク質およびタンパク質ドメイン;RNAをポリウリジニル化し得るタンパク質およびタンパク質ドメイン;RNA局在化活性を有するタンパク質およびタンパク質ドメイン;RNAを核内保持し得るタンパク質およびタンパク質ドメイン;RNA核外輸送活性を有するタンパク質およびタンパク質ドメイン;RNAスプライシングを抑制し得るタンパク質およびタンパク質ドメイン;RNAスプライシングを刺激し得るタンパク質およびタンパク質ドメイン;転写の効率を減少させ得るタンパク質およびタンパク質ドメイン;ならびに転写を刺激し得るタンパク質およびタンパク質ドメインを含む群より選ばれ得る。別の適切な融合パートナーはPUF RNA-結合ドメインであり、これはWO2012068627により詳細に記載されている。

10

【0417】

Cas9ポリペプチドのための融合パートナーとして(全体またはそれらの断片として)使用され得るいくつかのRNAスプライシング因子は、別個の配列-特異的RNA結合モジュールおよびスプライシングエフェクタードメインを有するモジュール構造化を有する。例えば、セリン/アルギニン-豊富(SR)タンパク質ファミリーのメンバーは、エキソン内包を促進するプレ-mRNAおよびC-末端RSドメイン中のエキソンスプライシングエンハンサー(ESE)に結合するN-末端RNA認識モチーフ(RRM)を含む。別の例として、hnRNPタンパク質hnRNP A1は、そのRRMドメインを介してエキソンスプライシングサイレンサー(ESS)に結合し、そしてC-末端グリシン-豊富ドメインを介したエキソン内包を阻害する。いくつかのスプライシング因子は、2つの別の部位間の調節配列に結合することによって、スプライス部位(ss)の代替使用を調節し得る。例えば、ASF/SF2は、ESEを認識し得、そしてイントロン近位部位の使用を促進し得、一方、hnRNP A1は、ESSに結合し得、そしてスプライシングをイントロン遠位部位の使用へ転換させ得る。このような因子の1つの用途は、内因性遺伝子の別のスプライシング、特に遺伝子に関連する疾患を調整するESFを生成することである。例えば、Bcl-x pre-mRNAは、2つの別の5'スプライス部位を有する2つのスプライシングアイソフォームを産生し、反対の機能のタンパク質をコードする。長いスプライシングアイソフォームBcl-xLは、長寿命の分裂終了細胞において発現される強力なアポトーシス阻害剤であり、そして多くの癌細胞、アポトーシスシグナルに対する保護細胞において上方制御される。短いアイソフォームBcl-xSは、プロアポトーシスのアイソフォームであり、そして高い回転率を有する細胞(例、リンパ球を発生する)において高いレベルで発現される。2つのBcl-xスプライシングアイソフォームの比は、核エキソン領域またはエキソン伸長領域のいずれか(すなわち、2つの別の5'スプライス部位の間)に位置する複数のcw-要素によって調節される。さらなる例について、WO2010075303を参照。

20

30

【0418】

いくつかの実施態様において、Cas9ポリペプチド(例、野生型Cas9、変異体Cas9、減少したヌクレアーゼ活性を有する変異体Cas9など)は、ペプチドスパーサーを介して融合パートナーに連結され得る。

【0419】

いくつかの実施態様において、Cas9ポリペプチドは、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、炭水化物、あるいは脂質二重層、ミセル、細胞膜、オルガネラ膜、または小胞膜を横断することを容易にする有機または無機化合物に言及し得る「タンパク質形質導入ドメイン」またはPTD(CPP-細胞透過性ペプチドとしても知られる)を含む。小極性分子から大マクロ分子および/またはナノ粒子までの範囲にわたり得る別の分子に付着したPTDは、分子が膜を横断する、例えば細胞外空間から細胞内空間へ行く、または細胞質ゾルからオルガネラ内に行くのを容易にする。いくつかの実施態様において、別の分子に付着したPTDは、分子が核(例、いくつかの実施態様において、PTDは核局在化シグナル(NLS)を含む)に入るのを容易にする。いくつかの実施態様において、Cas9ポリペプチドは2つ以上のNLS、例えば、2つ以上のNLSを縦一列で含む。いくつかの実施態様において、PT

40

50

DはCas9ポリペプチドのアミノ末端に共有結合される。いくつかの実施態様において、PTDはCas9ポリペプチドのカルボキシル末端に共有結合される。いくつかの実施態様において、PTDはCas9ポリペプチドのアミノ末端およびカルボキシル末端に共有結合される。いくつかの実施態様において、PTDは核酸(例、ガイド核酸、ガイド核酸をコードするポリヌクレオチド、Cas9ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドなど)に共有結合される。例示的なPTDは、最少ウンデカペプチドタンパク質形質導入ドメイン(YGRKKRRQRRR;配列番号7を含むHIV-1 TATの残基47-57に対応);細胞に直接入るのに十分な数のアルギニン(例、3、4、5、6、7、8、9、10、または10-50のアルギニン)を含むポリアルギニン配列;VP22ドメイン(Zender et al. (2002) Cancer Gene Ther. 9(6):489-96);Drosophila Antennapediaタンパク質形質導入ドメイン(Noguchi et al. (2003) Diabetes 52(7):1732-1737);切断ヒトカルシトニンペプチド(Trehin et al. (2004) Pharm. Research 21:1248-1256);ポリリジン(Wender et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:13003-13008);RRQRRTSKLMKR(配列番号8);Transportan GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL(配列番号9);KALAWAKLAKALAKALAKHLAKALAKALKCEA(配列番号10);およびRQIKIWFQNRRMKWKK(配列番号11)を含むが、これらに限定されない。例示的なPTDは、YGRKKRRQRRR(配列番号12)、RKKRRQRRR(配列番号13);3アルギニン残基~50アルギニン残基のアルギニンホモポリマーを含むが、これらに限定されない;例示的なPTDドメインアミノ酸配列は、以下のいずれかを含むが、これらに限定されない:YGRKKRRQRRR(配列番号14);RKKRRQRR(配列番号15);YARAAARQARA(配列番号16);THRLPRRRRRR(配列番号17);およびGGRRARRRRRRR(配列番号18)。いくつかの実施態様において、PTDは活性化可能なCPP(ACPP)(Aguilera et al. (2009) Integr Biol (Camb) June; 1(5-6): 371-381)である。ACPPsは、開裂可能なリンカーを介してマッチングポリアニオン(例、Glu9または「E9」)に接続されたポリカチオン性CPP(例、Arg9または「R9」)を含み、これは、正味の電荷をほぼゼロに減少させ、そしてそれによって細胞への接着および取り込みを阻害する。リンカーが開裂すると、ポリアニオンが放出され、ポリアルギニンおよびその固有の接着性を局所的に脱マスクングし、従ってACPPを「活性化」して膜を横断する。

10

20

30

40

50

【0420】

いくつかの実施態様において、組成物はCpf1 RNA-誘導エンドヌクレアーゼを含有し得、この例は図2、3、または4に提供される。Cpf1 RNA-誘導エンドヌクレアーゼについての別の名前はCas12aである。本開示のCpf1 CRISPR系は、i)シングルエンドヌクレアーゼタンパク質、およびii)crRNAを含み、ここでcrRNAの3'末端の部分は標的核酸に相補的なガイド配列を含む。この系において、Cpf1ヌクレアーゼはcrRNAによって標的DNAに直接補充される。いくつかの実施態様において、Cpf1のためのガイド配列は、検出可能なDNA開裂を達成するために少なくとも12nt、13nt、14nt、15nt、または16ntでなければならない、そして十分なDNA開裂を達成するために最少14nt、15nt、16nt、17nt、または18ntである。

【0421】

本開示のCpf1系は、様々な方法でCas9とは異なる。第1に、Cas9とは異なり、Cpf1は開裂のために別個のtracrRNAを必要としない。いくつかの実施態様において、Cpf1 crRNAは約42-44塩基長ほどの短さであり得、このうち23-25 ntはガイド配列であり、そして19 ntは構成的直接反復配列である。対照的に、組み合わせたCas9 tracrRNAおよびcrRNA合成配列は約100塩基長であり得る。

【0422】

第2に、Cpf1はその標的の5'上流に位置する「TTN」PAMモチーフを好む。これはCas9系についての標的DNAの3'に位置する「NGG」PAMモチーフとは対照的である。いくつかの実施態様において、ガイド配列の直前のウラシル塩基は置換され得ない(Zetsche, B. et al. 2015. "Cpf1 Is a Single RNA-Guided Endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas System" Cell 163, 759-771、これは、全ての目的についてその

全体が本明細書中に参考として援用される)。

【0423】

第3に、Cpf1についての切断部位は約3-5塩基によって互い違いであり、これは「付着末端」を作り出す(Kim et al., 2016. “Genome-wide analysis reveals specificities of Cpf1 endonucleases in human cells”, 2016年6月06日にオンライン発行)。3-5 bp突出を有するこれらの付着末端は、NHEJ-媒介-ライゲーションを容易にし、そしてマッチング末端を有するDNA断片の遺伝子編集を改善すると考えられる。切断部位は、PAMである5'末端に対して遠位の標的DNAの3'末端である。切断位置は、通常、ハイブリダイズしていない鎖上の18番目の塩基およびcrRNAにハイブリダイズした相補的鎖上の対応する23番目の塩基に続く。

10

【0424】

第4に、Cpf1複合体において、「種子」領域はガイド配列の最初の5 nt内に位置する。Cpf1 crRNA種子領域は、変異に対して非常に高感度であり、そしてこの領域における一塩基置換でさえ開裂活性を劇的に減少させ得る(Zetsche B. et al. 2015 “Cpf1 Is a Single RNA-Guided Endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas System” Cell 163, 759-771を参照)。非常に、Cas9 CRISPR標的とは異なり、Cpf1系の開裂部位および種子領域は重複しない。Cpf1 crRNA標的化オリゴの設計に対するさらなる指導は入手可能である(Zetsche B. et al. 2015. “Cpf1 Is a Single RNA-Guided Endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas System” Cell 163, 759-771)。

20

【0425】

当業者は、本明細書中に開示したCpf1が任意の源から誘導されたかまたは単離された任意の変異体であり得、これらの多くが当該分野で公知であることを理解する。例えば、いくつかの実施態様において、本開示のCpf1ペプチドは、図2に示すFnCPF1(例、配列番号2)、AsCpf1(例、図3)、LbCpf1(例、図4)あるいは種々の他の微生物種からの任意の他の多くの公知のCpf1タンパク質およびそれらの合成変異体を含み得る。

【0426】

いくつかの実施態様において、組成物はCpf1ポリペプチドを含有する。いくつかの実施態様において、Cpf1ポリペプチドは酵素的に活性であり、例えば、Cpf1ポリペプチドは、ガイドRNAに結合される場合、標的核酸を開裂する。いくつかの実施態様において、Cpf1ポリペプチドは、野生型Cpf1ポリペプチドに対して(例、図2、3、または4に示すアミノ酸配列を含むCpf1ポリペプチドに対して)減少した酵素活性を示し、そしてDNA結合活性を維持する。

30

【0427】

いくつかの実施態様において、Cpf1ポリペプチドは、図2、3、または4に示すアミノ酸配列と少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも90%、または100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施態様において、Cpf1ポリペプチドは、図2、3、または4に示すアミノ酸配列の100アミノ酸~200アミノ酸(aa)、200 aa~400 aa、400 aa~600 aa、600 aa~800 aa、800 aa~1000 aa、1000 aa~1100 aa、1100 aa~1200 aa、または1200 aa~1300 aaの隣接する伸長と少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも90%、または100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

40

【0428】

いくつかの実施態様において、Cpf1ポリペプチドは、図2、3、または4に示すアミノ酸配列のCpf1ポリペプチドのRuvC1ドメインと少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少

50

なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも90%、または100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施態様において、Cpf1ポリペプチドは、図2、3、または4に示すアミノ酸配列のCpf1ポリペプチドのRuvCIIドメインと少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも90%、または100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施態様において、Cpf1ポリペプチドは、図2、3、または4に示すアミノ酸配列のCpf1ポリペプチドのRuvCIIIドメインと少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも90%、または100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

10

20

30

40

50

【0429】

いくつかの実施態様において、Cpf1ポリペプチドは、野生型Cpf1ポリペプチドに対して(例、図2、3、または4に示すアミノ酸配列を含むCpf1ポリペプチドに対して)減少した酵素活性を示し、そしてDNA結合活性を維持する。いくつかの実施態様において、Cpf1ポリペプチドは、図2、3、または4に示すアミノ酸配列と少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも90%、または100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み;そして図2、3、または4に示すアミノ酸配列のアミノ酸917に対応するアミノ酸残基でアミノ酸置換(例、D→A置換)を含む。いくつかの実施態様において、Cpf1ポリペプチドは、図2、3、または4に示すアミノ酸配列と少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも90%、または100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み;そして図2、3、または4に示すアミノ酸配列のアミノ酸1006に対応するアミノ酸残基でアミノ酸置換(例、E→A置換)を含む。いくつかの実施態様において、Cpf1ポリペプチドは、図2、3、または4に示すアミノ酸配列と少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも90%、または100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み;そして図2、3、または4に示すアミノ酸配列のアミノ酸1255に対応するアミノ酸残基でアミノ酸置換(例、D→A置換)を含む。

【0430】

いくつかの実施態様において、Cpf1ポリペプチドは融合ポリペプチドであり、例えば、ここでCpf1融合ポリペプチドは:a)Cpf1ポリペプチド;およびb)異種融合パートナーを含む。いくつかの実施態様において、異種融合パートナーはCpf1ポリペプチドのN-末端に融合される。いくつかの実施態様において、異種融合パートナーはCpf1ポリペプチドのC-末端に融合される。いくつかの実施態様において、異種融合パートナーはCpf1ポリペプチドのN-末端およびC-末端の両方に融合される。いくつかの実施態様において、異種融合パートナーはCpf1ポリペプチド内に内部に挿入される。

【0431】

適切な異種融合パートナーは、NLS、エピトープタグ、蛍光ポリペプチドなどを含む。

【0432】

結合したガイドRNAおよびドナー核酸

1つの局面において、本発明は、RNA-誘導エンドヌクレアーゼ(例えば、Cas9または

Cpf1ポリペプチド)、ガイドRNAおよびドナーポリヌクレオチドを含むCRISPR系を含む複合体を提供し、ここでガイドRNAおよびドナーポリヌクレオチドは結合されている。本明細書中で例示されるように、ガイドRNAおよびドナーポリヌクレオチドは、共有結合され得るかまたは非共有結合され得るかのいずれかである。1つの実施態様において、ガイドRNAおよびドナーポリヌクレオチドは化学的に結合される。別の実施態様において、ガイドRNAおよびドナーポリヌクレオチドは酵素的に結合される。1つの実施態様において、ガイドRNAおよびドナーポリヌクレオチドは互いにハイブリダイズする。別の実施態様において、ガイドRNAおよびドナーポリヌクレオチドは両方ともブリッジ配列にハイブリダイズする。任意の数のこのようなハイブリダイゼーションスキームが可能である。

10

【0433】

デアミナーゼ

いくつかの実施態様において、複合体または組成物はデアミナーゼ(例、アデニン塩基エディター)をさらに含む。本明細書中で使用される用語「デアミナーゼ」または「デアミナーゼドメイン」は、分子からのアミン基の除去、すなわち脱アミノ化を触媒する酵素をいう。いくつかの実施態様において、デアミナーゼはシチジンデアミナーゼであり、シチジンまたはデオキシシチジンのそれぞれウリジンまたはデオキシウリジンへの加水分解脱アミノ化を触媒する。いくつかの実施態様において、デアミナーゼはシトシンデアミナーゼであり、シトシンのウラシル(例、RNA中)またはチミン(例、DNA中)への加水分解脱アミノ化を触媒する。

20

【0434】

いくつかの実施態様において、デアミナーゼはアデノシンデアミナーゼであり、これはアデニンまたはアデノシンの加水分解脱アミノ化を触媒する。いくつかの実施態様において、デアミナーゼまたはデアミナーゼドメインはアデノシンデアミナーゼであり、アデノシンまたはデオキシアデノシンのそれぞれイノシンまたはデオキシイノシンへの加水分解脱アミノ化を触媒する。いくつかの実施態様において、アデノシンデアミナーゼは、デオキシリボ核酸(DNA)におけるアデニンまたはアデノシンの加水分解脱アミノ化を触媒する。本明細書中で提供されるアデノシンデアミナーゼ(例えば改変されたアデノシンデアミナーゼ、発生したアデノシンデアミナーゼ)は、バクテリアなどの任意の有機体からあり得る。いくつかの実施態様において、デアミナーゼまたはデアミナーゼドメインは、ヒト、チンパンジー、ゴリラ、サル、ウシ、イヌ、ラット、またはマウスなどの有機体からの天然に存在するデアミナーゼの変異体である。

30

【0435】

いくつかの実施態様において、デアミナーゼまたはデアミナーゼドメインは天然に存在しない。例えば、いくつかの実施態様において、デアミナーゼまたはデアミナーゼドメインは、天然に存在するデアミナーゼと少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または少なくとも99.5%同一である。いくつかの実施態様において、アデノシンデアミナーゼは、*E. coli*、*S. aureus*、*S. typhi*、*S. putrefaciens*、*H. influenzae*、または*C. crescentus*などのバクテリアからである。いくつかの実施態様において、アデノシンデアミナーゼはTadAデアミナーゼである。いくつかの実施態様において、TadAデアミナーゼは*E. coli* TadAデアミナーゼ(ecTadA)である。いくつかの実施態様において、TadAデアミナーゼは切断*E. coli* TadAデアミナーゼである。例えば、切断ecTadAは、全長ecTadAに対して1つ以上のN-末端アミノ酸を欠損し得る。いくつかの実施態様において、切断ecTadAは、全長ecTadAに対して1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、6、17、18、19、または20のN-末端アミノ酸残基を欠損し得る。いくつかの実施態様において、切断ecTadAは、全長ecTadAに対して1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、6、17、18、19、または20のC-末端アミノ酸残基を欠損し得る。いくつかの実施態様に

40

50

において、ecTadAデアミナーゼはN-末端メチオニンを含まない。いくつかの実施態様において、デアミナーゼはAPOBEC1またはその変異体である。

【0436】

デアミナーゼは、本明細書中に記載の任意の他のCRISPR要素と接合して(すなわち、組成物として)使用され得るか、またはデアミナーゼは本明細書中に記載の任意の他のCRISPR要素(例、Cas9またはCpf1)に融合され得る(すなわち、複合体として)。いくつかの実施態様において、デアミナーゼはCas9、Cpf1、またはそれらの変異体に融合される。

【0437】

他の成分

組成物は、典型的には核酸またはタンパク質送達処方において使用される任意の他の成分をさらに含有し得る。例えば、組成物は、脂質、リポタンパク質(例、コレステロールおよび誘導体)、リン脂質、ポリマーあるいはリポソームまたはミセル送達ビヒクルの他の成分をさらに含有し得る。組成物はまた、細胞あるいは哺乳動物またはヒトなどの宿主への投与に適切な溶媒または担体を含有し得る。

【0438】

いくつかの実施態様において、組成物は1つ以上の界面活性剤をさらに含有する。界面活性剤は非イオン性界面活性剤および/または両性界面活性剤であり得る。いくつかの実施態様において、界面活性剤は、エチレンオキシド(EO)、プロピレンオキシド(PO)、ブチレンオキシド(BO)、グリコール酸(GA)、乳酸(LA)のポリマーまたはコポリマー、あるいはそれらの組み合わせである。例えば、界面活性剤は、ポリエチレングリコール(PEG)、ポリプロピレングリコール、ポリグリコール酸(PGA)、ポリ乳酸、またはそれらの混合物であり得る。例示的な界面活性剤のリストは:ポリオキシエチレンソルビタンエステル界面活性剤(通常Tweensと呼ばれる)、特にポリソルベート20およびポリソルベート80;エチレンオキシド(EO)、プロピレンオキシド(PO)、および/またはブチレンオキシド(BO)のコポリマー、DOWFAX(登録商標)商品名で販売、例えば線状EO/POブロックコポリマー;オクトキシノール、これは繰返しエトキシ(オキシ-1,2-エタンジイル)基の数が増加し得、オクトキシノール-9(Triton X-100、またはt-オクチルフェノキシポリエトキシエタノール)は特に興味深い;(オクチルフェノキシ)ポリエトキシエタノール(IGEPAL CA-6301NP-40);ホスファチジルコリン(レシチン)などのリン脂質;トリエチレングリコールモノラウリルエーテル(Brij 30)などの、ラウリル、セチル、ステアリルおよびオレイルアルコールから誘導されるポリオキシエチレン脂肪酸エーテル(Brij界面活性剤として知られる);ポリオキシエチレン-9-ラウリルエーテル、ならびにソルビタントリオレエート(Span 85)およびソルビタンモノラウレートなどのソルビタンエステル(一般にSpanとして知られる)を含むが、これらに限定されない。いくつかの実施態様において、界面活性剤は抗凝固剤(例、ヘパリンなど)である。いくつかの実施態様において、組成物は1つ以上の薬学的に許容可能な担体および/または賦形剤をさらに含有する。

【0439】

いくつかの場合において、成分(例、核酸成分(例、ガイド核酸など);タンパク質成分(例、Cas9またはCpf1ポリペプチド、変異体Cas9またはCpf1ポリペプチド);など)は標識部分を含む。本明細書中で使用される用語「標識」、「検出可能な標識」、または「標識部分」は、シグナル検出を提供し、そしてアッセイの特定の性質に依存して広範に変化し得る任意の部分を用いる。目的の標識部分は、直接的に検出可能な標識(直接標識)(例、蛍光標識)および間接的に検出可能な標識(間接標識)(例、結合対メンバー)の両方を含む。蛍光標識は、任意の蛍光標識(例、蛍光染料(例、フルオレセイン、テキサスレッド(Texas red)、ローダミン、ALEXAFLUOR(登録商標)標識など)、蛍光タンパク質(例、緑色蛍光タンパク質(GFP)、増強GFP(EGFP)、黄色蛍光タンパク質(YFP)、赤色蛍光タンパク質(RFP)、シアン蛍光タンパク質(CFP)、サクランボ、トマト、タンジェリン、およびそれらの任意の蛍光誘導体)など)であり得る。本方法における使用のために適切な検出可能(直接的または間接的)標識部分は、分光学的、光化学的、生化学的、免疫化学的、

10

20

30

40

50

電氣的、光學的、化學的、または他の手段によって検出可能である任意の部分を含む。例えば、適切な間接的標識は、ビオチン(結合対メンバー)を含み、これはストレプトアビジン(これは、それ自体直接的または間接的に標識され得る)によって結合され得る。標識はまた:放射標識(直接標識)(例、 ^3H 、 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C 、または ^{32}P);酵素(間接標識)(例、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、グルコースオキシダーゼなど);蛍光タンパク質(直接標識)(例、緑色蛍光タンパク質、赤色蛍光タンパク質、黄色蛍光タンパク質、およびそれらの任意の便利な誘導体);金属標識(直接標識);比色分析標識;結合対メンバー;などを含み得る。「結合対のパートナー」または「結合対メンバー」は、第1および第2の部分のうちの1つを意味し、ここで第1および第2の部分は互いに対して特異的結合親和性を有する。適切な結合対は:抗原/抗体(例えば、ジゴキシゲニン/抗-ジゴキシゲニン、ジニトロフェニル(DNP)/抗-DNP、ダンシル-X-抗-ダンシル、フルオレセイン/抗-フルオレセイン、ルシファーイエロー/抗-ルシファーイエロー、およびローダミン抗-ローダミン)、ビオチン/アビジン(またはビオチン/ストレプトアビジン)およびカルモジュリン結合タンパク質(CBP)/カルモジュリンを含むが、これらに限定されない。任意の結合対メンバーは、間接的に検出可能な標識部分としての使用に適切であり得る。

10

【0440】

任意の所定の成分、または成分の組み合わせは、標識され得ないか、または標識部分で検出可能に標識され得る。いくつかの実施態様において、2つ以上の成分が標識される場合、それらは、互いに区別可能である標識部分で標識され得る。

20

【0441】

カプセル化およびナノ粒子

組成物のいくつかの実施態様において、ポリマーは核酸および/またはポリペプチドと組み合わせられ、そして部分的にまたは完全に核酸および/またはポリペプチドをカプセル化する。組成物は、いくつかの処方物において、ポリマーならびに核酸および/またはポリペプチドを含むナノ粒子を提供し得る。

【0442】

いくつかの実施態様において、組成物は、本明細書中に記載のポリマーおよび核酸またはポリペプチドに加えて、核ナノ粒子を含有し得る。金属(例、金)ナノ粒子またはポリマーナノ粒子を含む、任意の適切なナノ粒子が使用され得る。

30

【0443】

本明細書中に記載のポリマーおよび核酸(例、ガイドRNA、ドナーポリヌクレオチド、または両方)またはポリペプチドは、ナノ粒子表面に直接的または間接的に接合され得る。例えば、本明細書中に記載のポリマーおよび核酸(例、ガイドRNA、ドナーポリヌクレオチド、または両方)またはポリペプチドは、ナノ粒子の表面に直接的に、または介在リンカーを介して間接的に接合され得る。

【0444】

任意のタイプの分子がリンカーとして使用され得る。例えば、リンカーは、少なくとも2個の炭素原子(例、3、4、5、6、7、8、9、10個以上の炭素原子)を含む脂肪族鎖であり得、そしてケトン、エーテル、エステル、アミド、アルコール、アミン、尿素、チオ尿素、スルホキシド、スルホン、スルホンアミド、およびジスルフィド官能性を含む1個以上の官能基で置換され得る。ナノ粒子が金を含む実施態様において、リンカーは任意のチオール-含有分子であり得る。チオール基の金との反応は、共有スルフィド(-S-)結合を生じる。リンカーの設計および合成は、当該分野で周知である。

40

【0445】

いくつかの実施態様において、ナノ粒子に接合した核酸は、本明細書中に記載の1つ以上の要素(例、Cas9ポリペプチド、およびガイドRNA、ドナーポリヌクレオチド、ならびにCpf1ポリペプチド)をナノ粒子-核酸接合体に非共有結合するよう働くリンカー核酸である。例えば、リンカー核酸は、ガイドRNAまたはドナーポリヌクレオチドにハイブリダイズする配列を有し得る。

50

【0446】

ナノ粒子(例、コロイド状金属(例、金)ナノ粒子;生体適合性ポリマーを含むナノ粒子)に接合した核酸は、任意の適切な長さを有し得る。核酸がガイドRNAまたはドナーポリヌクレオチドである場合、長さは、本明細書中で議論されそして当該分野で公知のように、このような分子に適切である。核酸がリンカー核酸である場合、それはリンカーについて任意の適切な長さ、例えば10ヌクレオチド(nt)~1000 nt、例、約1 nt~約25 nt、約25 nt~約50 nt、約50 nt~約100 nt、約100 nt~約250 nt、約250 nt~約500 nt、または約500 nt~約1000 ntの長さを有し得る。いくつかの場合において、ナノ粒子(例、コロイド状金属(例、金)ナノ粒子;生体適合性ポリマーを含むナノ粒子)ナノ粒子に接合した核酸は、1000 ntよりも大きい長さを有し得る。

10

【0447】

ナノ粒子に結合した(例、共有結合した;非共有結合した)核酸が、本開示の複合体に存在するガイドRNAまたはドナーポリヌクレオチドの少なくとも一部にハイブリダイズするヌクレオチド配列を含む場合、それは、ハイブリダイゼーションを容易にするのに十分なガイドRNAまたはドナーポリヌクレオチド配列の相補体の領域と配列同一性を有する領域を有する。いくつかの実施態様において、本開示の複合体におけるナノ粒子と結合した核酸は、複合体に存在するガイドRNAまたはドナーポリヌクレオチドの10~50ヌクレオチド(例、10ヌクレオチド(nt)~15 nt、15 nt~20 nt、20 nt~25 nt、25 nt~30 nt、30 nt~40 nt、または40 nt~50 nt)の相補体と少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%のヌクレオチド配列同一性を有する。

20

【0448】

いくつかの実施態様において、ナノ粒子に結合した(例、共有結合した;非共有結合した)核酸は、ドナーポリヌクレオチドであるか、あるいはドナーポリヌクレオチドと同じかまたは実質的に同じヌクレオチド配列を有する。いくつかの実施態様において、ナノ粒子に結合した(例、共有結合した;非共有結合した)核酸は、ドナーDNAテンプレートに相補的であるヌクレオチド配列を含む。

【0449】

ナノ粒子は、ナノ粒子が安定である限り、任意の適切なサイズを有し得る。例えば、ナノ粒子は、約20 nm~約500 nm、約50 nm~約500 nm、約20 nm~約400 nm、約20 nm~約300 nm、約20 nm~約250 nm、約50 nm~約400 nm、約50 nm~約300 nm、または約50 nm~約250 nmの平均直径を有し得る。いくつかの実施態様において、ナノ粒子は約50 nm~約25 nmの平均直径を有する。

30

【0450】

ナノ粒子は任意の適切な多分散性指数(PDI)を有し得る。例えば、ナノ粒子は、0.05~約0.5、約0.1~約0.5、約0.2~約0.5、約0.05~約0.4、約0.1~約0.4、約0.2~約0.4、約0.05~約0.3、約0.1~約0.3、または約0.2~約0.3の多分散性指数を有し得る。いくつかの実施態様において、ナノ粒子は約0.1~約0.3の平均多分散性指数を有する。

【0451】

使用方法

本明細書中、核酸および/またはポリペプチドを細胞に送達する方法もまた提供され、ここで細胞はインビトロまたはインビボであり得る。本方法は、本明細書中に記載の、本明細書中で提供されるポリマーならびに核酸および/またはポリペプチドを含有する組成物を、細胞または細胞を含む被検体に投与することを含む。本方法は、任意のタイプの細胞または被検体に関して使用され得るが、哺乳類細胞(例、ヒト細胞)にとって特に有用である。いくつかの実施態様において、ポリマーは標的化剤を含み、その結果、核酸および/またはポリペプチドは、標的細胞または組織(例、末梢神経系、中枢神経系(例えば、脳または脊髄)、被検体の眼、肝臓、筋肉、肺、骨(例、造血細胞)の細胞または組織、あるいは腫瘍細胞または組織)に主としてまたは独占的に送達される。

40

50

【0452】

タンパク質または核酸を被検体中の細胞(すなわち、インビボ)に送達するために使用される場合、ポリマーは血清中で安定であることが望ましい。血清中の安定性は、ポリマーがタンパク質または核酸ペイロードを血清中の細胞(例えば、インビトロまたはインビボ)に送達する効率の関数として評価され得る。従って、いくつかの実施態様において、ポリマーは、所定のタンパク質または核酸を血清中の細胞に、特定の組織タイプについて同一条件下でpAsp[DET]を用いて生じるよりも大きい効率または指向性で送達する。

【0453】

いくつかの実施態様において、本明細書中に開示したポリマーは、ある特定の細胞または組織タイプに対して特定の指向性を示す。いくつかの実施態様において、本明細書中に開示したポリマーは、末梢神経系または中枢神経系の組織について指向性を有し(すなわち、宿主に投与すると、ポリマーは、他の組織と比較して末梢神経系または中枢神経系の組織に最大量または最大濃度で送達される)、そしてタンパク質または核酸を末梢神経系または中枢神経系の組織に送達する(例えば、タンパク質または核酸を哺乳動物の末梢神経系または中枢神経系の細胞または組織に送達する)ために使用される。

【0454】

ポリマーは、本明細書中に記載の任意のポリマー(例えば、式1または1A-1C、あるいはそうでなければ、それらの任意のおよび全ての特徴および実施態様を含む本明細書中に記載した通りのポリマーなどの、加水分解性ポリマー骨格を含むポリマー、該ポリマー骨格は(i)疎水性側鎖を含むモノマー単位;および(ii)ポリアミン基およびポリアルキレンオキシド基を含む側鎖を含むモノマー単位、および必要に応じて(iii)ポリアミン基を含みポリアルキレンオキシド基を含まない側鎖を含むモノマー単位を含む)であり得る。

【0455】

いくつかの実施態様において、組成物は、本明細書中に記載の「追加のポリマー」または「第2ポリマー」、例えば、(a)疎水性基を含む側鎖を有するモノマー単位、および(b)オリゴアミンまたはポリアミンを含む側鎖を有するモノマー単位を含むポリマーを含有する。いくつかの実施態様において、第2ポリマーはまた、他のモノマー、例えばイオン性基、必要に応じて7未満のpKaを有する、を含む側鎖を有するモノマー単位を含む。いくつかの実施態様において、第2ポリマーは、ポリアミド、ポリ-N-アルキルアミド、ポリエステル、ポリカーボネート、ポリカルバメート、またはそれらの組み合わせなどの加水分解性ポリマー骨格を含む。いくらかの実施態様において、加水分解性ポリマー骨格はポリアミドを含む。いくつかの実施態様において、第2ポリマーはポリアルキレンオキシド部分を含まない。いくつかの実施態様において、第2ポリマーはWO2021/217082、WO2020219776、WO2020086910A1、WO2020243370またはWO2019210326A2のいずれかのポリマーである。追加のまたは「第2」ポリマーの全ての他の局面および実施態様は、本明細書中で先に記載した通りであり、本使用方法に従って使用され得る。

【0456】

本法における使用のための組成物の全ての他の局面は、本明細書中で先に記載した通りである。

【0457】

CRISPR系の1つ以上の成分を含有する組成物とともに使用する場合、本方法は、標的核酸または遺伝子を編集するために使用され得る。いくつかの実施態様において、標的核酸を修飾する方法は相同組換え修復(HDR)を含む。いくつかの実施態様において、HDRを行うための本開示の複合体の使用は、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10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、または25%超のHDRの効率を提供する。いくつかの実施態様において、標的核酸を修飾する方法は非相同末端結合(NHEJ)を含む。いくつかの実施態様において、HDRを行うための本開示の複合体の使用は、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10%、少なくとも15%、少なく

とも20%、少なくとも25%、または25%超のNHEJの効率を提供する。

【0458】

以下の実施例は、本発明をさらに説明するが、もちろん、いかようにもその範囲を限定すると解釈されるべきではない。

【0459】

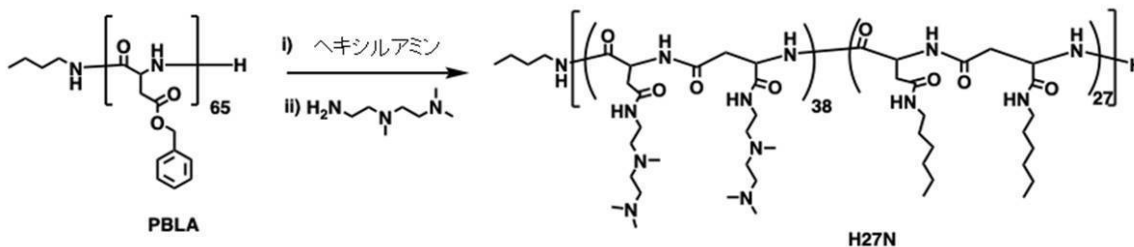
実施例1

比較ポリマー1(「H27N」)を、PBLAを N^1 -(2-アミノエチル)- N^1,N^2,N^2 -トリメチルエタン-1,2-ジアミンおよびヘキシルアミンで修飾することによって調製した。手順をスキーム1に説明する。

スキーム1: ポリマーH27Nの合成

【0460】

【化106】



【0461】

(H27N中の括弧書きはブロックコポリマー構造を意味しない)

【0462】

凍結乾燥したPBLA(50 mg, 0.0037 mmol; 重合度(「DP」)65)ををフラスコに入れ、そしてテトラヒドロフラン/ N -メチル-2-ピロリジン(それぞれ1 mL)に溶解した。透明溶液に n -ヘキシルアミン(160当量)を加え、そして透明反応混合物を室温で24時間攪拌した。約24時間後、 N^1 -(2-アミノエチル)- N^1,N^2,N^2 -トリメチルエタン-1,2-ジアミン(PBLA部分のベンジル基に対して50当量)を、温和な無水条件下で透明混合物に加えた。室温で約18時間後、反応混合物をジエチルエーテル(10-12X体積, 35 mL)中に沈殿させた。次いで沈殿物を遠心分離し、そしてジエチルエーテルで2回洗浄した。ポリマーを1 M HCl(3 mL)に溶解し、そして3.5-5 KDカットオフメンブレンで過剰の脱イオン水に透析した。溶液のpHが5-6の間であった場合、透析を停止し、そして溶液を凍結乾燥して比較ポリマー1(H27N)を得た。説明した手順によって理解されるように、得られたポリマーは、ポリマー中にランダムに分散したポリアミンおよび疎水性側鎖を含んだ。従って、上記構造中の括弧書きした基は、生じた側鎖種のおおよその数を単に表し、そしてポリマー中の側鎖の任意の特定の配置を意味しない。

【0463】

実施例2

ポリマー前駆体Aを、PBLAをアミンおよび N -(2-アミノエチル)エタン-1,2-ジアミン(「DET」)で修飾することによって調製した。手順をスキーム2に説明する。

【0464】

10

20

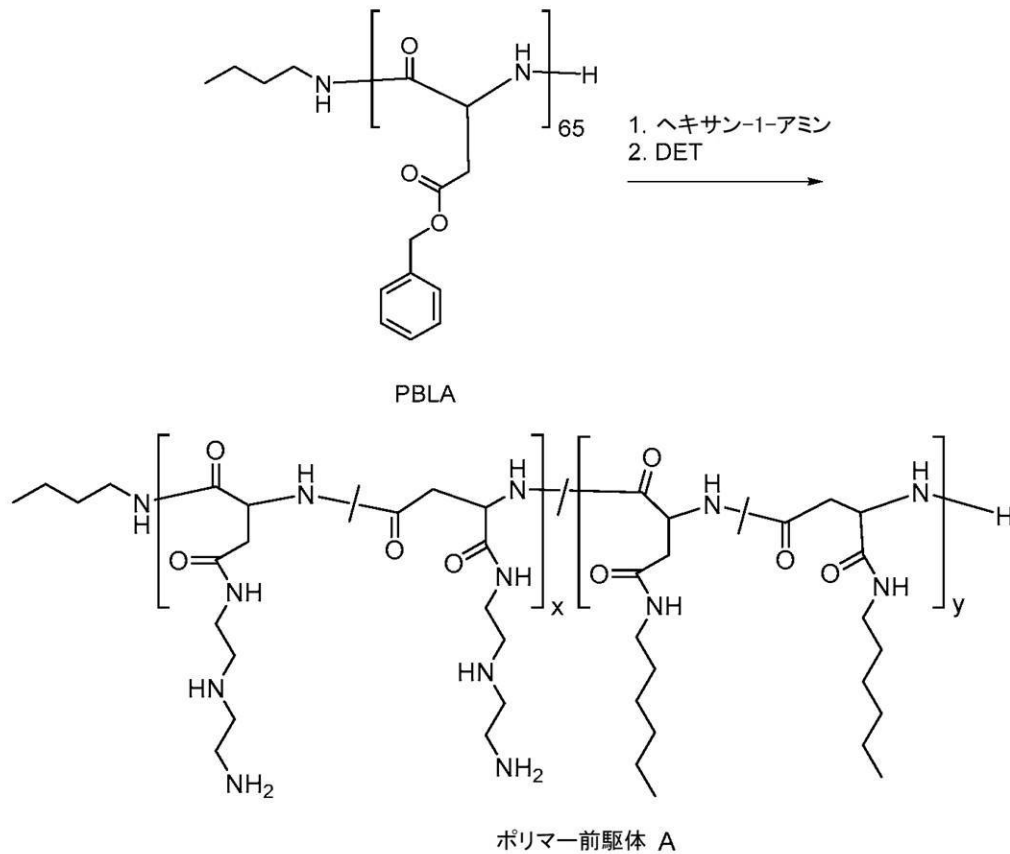
30

40

50

【化 1 0 7】

スキーム 2.



【0 4 6 5】

凍結乾燥したPBLA(50 mg, 0.0037 mMol)をフラスコに入れ、そしてテトラヒドロフラン/*N*-メチル-2-ピロリジン(それぞれ1 mL)に溶解した。透明溶液に*n*-ヘキシルアミン(58.8 μ L, 0.44 mMol, 120当量)を加え、そして透明反応混合物を室温で24時間攪拌した。約24時間後、ジエチレントリアミン(PBLA部分のベンジル基に対して50当量, 1.0 g)を温和な無水条件下で透明混合物に加えた。室温で約18時間後、反応混合物をジエチルエーテル(10-12X体積, 35 mL)中に沈殿させた。次いで白色沈殿物を遠心分離し、そしてジエチルエーテルで2回洗浄した。白色ポリマーを1 M HCl(3 mL)に溶解し、そして3.5-5 KDカットオフメンブレンで過剰の脱イオン水に透析した。溶液のpHが5-6の間であった場合、透析を停止し、そして溶液を凍結乾燥して約60 mgのポリマー前駆体Aを得た。表2(*x*および*y*は平均値を表す)に示すように、異なる量の*n*-ヘキシルアミンおよびPBLAを用いてポリマー前駆体A1、A2、およびA3を得た。置換度は ^1H NMR分光法によって確認した。ポリマーA構造中に示される括弧書きした基は、生じた側鎖種のおおよその数を単に表し、そしてポリマー中の側鎖の任意の特定の配置を意味しない。

【0 4 6 6】

【表 2】

表 2.

ポリマー	PBLA に対するヘキサン-1-アミンの当量	<i>x</i>	<i>y</i>
ポリマー前駆体 A1	160	21	44
ポリマー前駆体 A2	120	32	33
ポリマー前駆体 A3	200	15	50

10

20

30

40

50

【0467】

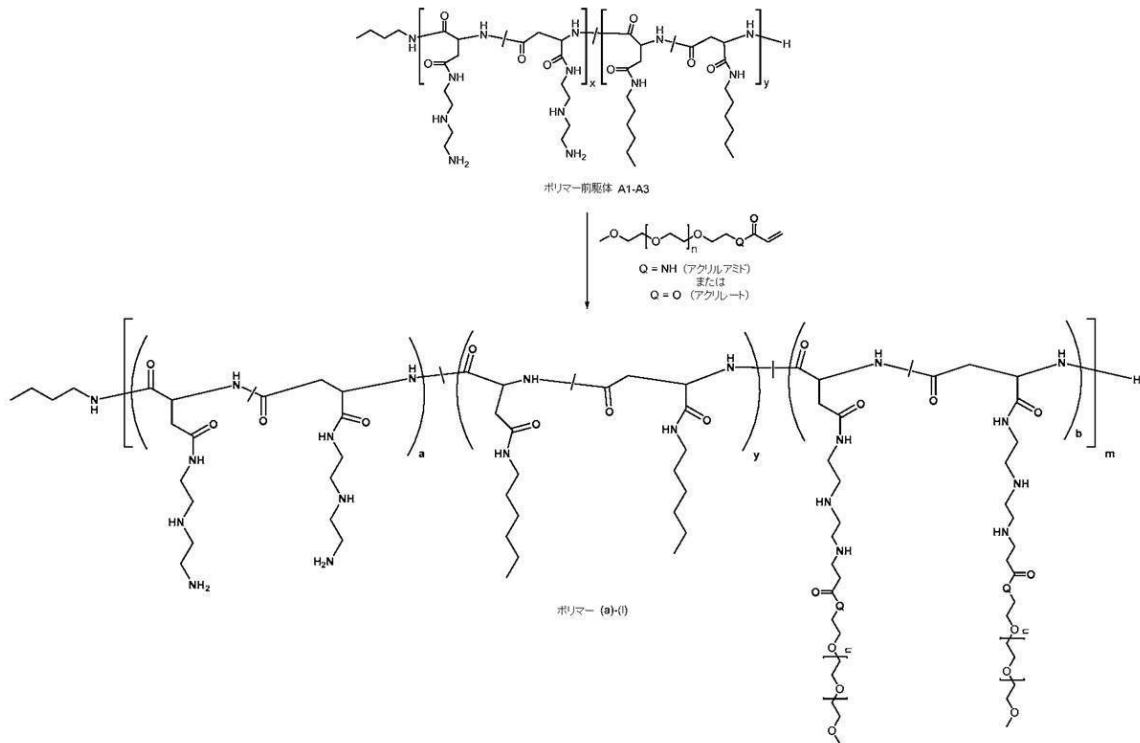
実施例3

ポリマー(a)-(l)を、ポリマー前駆体A1、ポリマー前駆体A2、またはポリマー前駆体A3をペグ化(pegylated)アクリルアミドまたはペグ化アクリレートで修飾することによって調製した。手順をスキーム3に説明する。

スキーム3: ポリマー(a)-(l)の合成

【0468】

【化108】



10

20

【0469】

一般手順A. トリエチルアミンをポリマー前駆体A1、ポリマー前駆体A2、またはポリマー前駆体A3のメタノール溶液に加えた。得られた溶液にペグ化アクリルアミドまたはペグ化アクリレート(〜2000 Da; n = ∼45)を加え、そして25℃で攪拌した。粗PEG-結合生成物をエーテル中に沈殿させ、そして精製して最終生成物を得た。

【0470】

一般手順B. 水溶液(pH = 9)にポリマー前駆体A1、ポリマー前駆体A2、またはポリマー前駆体A3を加えた。得られた溶液に可変量のペグ化アクリルアミドまたはペグ化アクリレート(〜2000 Da; n = ∼45)を加え、そして50℃で攪拌した。粗PEG-結合生成物をエーテル中に沈殿させ、そして精製して最終生成物を得た。

【0471】

一般手順C. トリエチルアミンをポリマー前駆体A1、ポリマー前駆体A2、またはポリマー前駆体A3のメタノール溶液に加えた。得られた溶液にペグ化アクリルアミドまたはペグ化アクリレート(〜400 Da; n = ∼9)を加え、そして25℃で攪拌した。粗PEG-結合生成物をエーテル中に沈殿させ、そして精製して最終生成物を得た。

【0472】

表3に示すように、ポリマー(a)-(l)を一般手順A、一般手順B、または一般手順Cに従って調製した。

【0473】

30

40

50

【表 3】

表 3.

ポリマー	ポリマー 前駆体	反応手順 (温度; 時間)	変数 「n」 (MW)	変数 「Q」	変数 「a」, 「y」, 「b」, 「m」
(a)	A1	A (25°C; 1 日)	45 (~2000 Da)	0 (アクリレート)	14, 44, 7, 65
(b)	A1	A (25°C; 1 日)	45 (~2000 Da)	0 (アクリレート)	18, 44, 3, 65
(c)	A1	A (25°C; 1 日)	45 (~2000 Da)	0 (アクリレート)	19, 44, 2, 65
(d)	A2	A (25°C; 2 日)	45 (~2000 Da)	NH (アクリルアミド)	31, 33, 1, 65
(e)	A2	A (25°C; 4 日)	45 (~2000 Da)	NH (アクリルアミド)	28, 33, 4, 65
(f)	A2	A (25°C; 2 日)	45 (~2000 Da)	NH (アクリルアミド)	30, 33, 2, 65
(g)	A2	B (50°C; 1 日)	45 (~2000 Da)	NH (アクリルアミド)	18, 33, 14, 65
(h)	A2	B (50°C; 1 日)	45 (~2000 Da)	NH (アクリルアミド)	27, 33, 5, 65
(i)	A2	C (25°C; 1 日)	9 (~400 Da)	0 (アクリレート)	29, 33, 3, 65
(j)	A2	C (25°C; 1 日)	9 (~400 Da)	0 (アクリレート)	25, 33, 7, 65
(k)	A3	C (25°C; 1 日)	9 (~400 Da)	0 (アクリレート)	12, 50, 3, 65
(l)	A3	C (25°C; 1 日)	9 (~400 Da)	0 (アクリレート)	1, 50, 14, 65
(m)	A3	B (25°C; 1 日)	9 (~2000 Da)	0 (アクリレート)	16, 41, 8, 65
(n)	A3	B (25°C; 1 日)	9 (~2000 Da)	0 (アクリレート)	16, 46, 3, 65

【0474】

実施例 4

以下の実施例は、本発明のポリマーを用いてCre mRNAをAi9マウスによって示されるマウスに送達することを説明する。

【0475】

2つのポリマーナノ粒子組成物を、Cre mRNAを(i)比較ポリマー1のみ(組成物(i))、または(ii)比較ポリマー1とポリマー(c)との混合物と合わせることによって調製した。mRNAおよびポリマー溶液を、マイクロ流体混合、続いて凍結乾燥によって合わせた。両方の調製物とも、良好なカプセル化効率を示した。

【0476】

ナノ粒子組成物のmRNAをインビボで送達する能力を試験するため、図5に説明する赤色蛍光レポーター構築物を有するAi9マウスに0.5 mg/mlの組成物(i)または組成物(ii)を注射した(髄腔内)。レポーター遺伝子の5'に挿入された終止配列をLoxP要素によってフランキングし、そして終止配列はレポーター遺伝子の発現を、それらがCreリコンビナーゼタンパク質によって励起されるまで阻止する。未処置マウスはコントロールとして機能した。

【0477】

処置後、脳および脊髄を採集し、そして生体外(エクスビボ)落射蛍光で画像化した。結果を図6に示す。脳はまた、矢状に切片化し、そして再画像化して落射蛍光をより明確に表示し、そして結果を図7に示す。

10

【0478】

結果は、組成物(i)と比較して、組成物(ii)による脳への、特に脳の後部領域へのCre mRNAの送達の増加を示す。

【0479】

実施例5

以下の実施例は、本開示に従う追加のポリマーの調製を説明する。

【0480】

合成のスキームは以下の通りであった：

【0481】

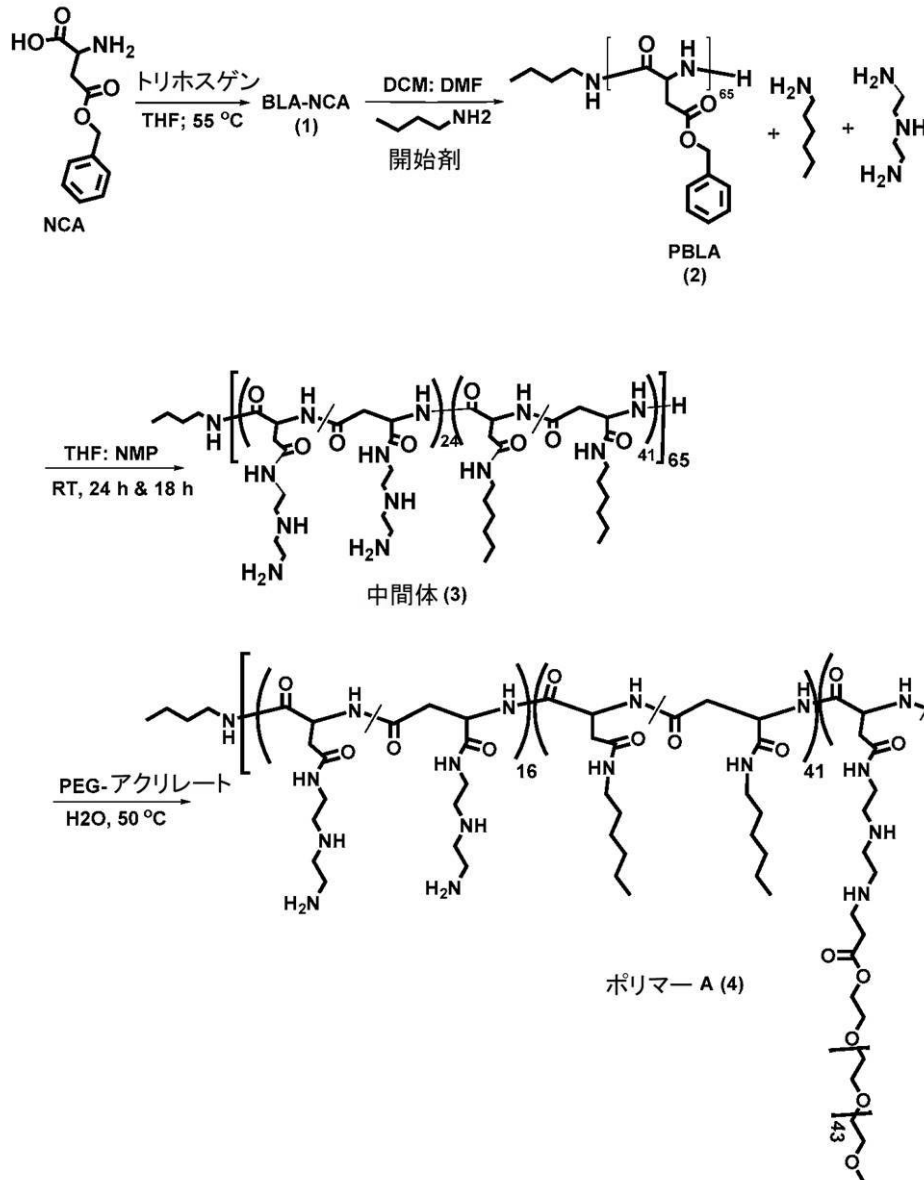
20

30

40

50

【化 1 0 9】



【0 4 8 2】

BLA-NCA(1)の合成:オープン乾燥した250 mL丸底フラスコにβ-ベンジルアスパラギン酸(10 g, 0.44モル)を加え、そして無水THF(90 mL)中に懸濁させた。この溶液にトリホスゲン(7.97 g, 0.026モル)を一度に加えた。反応混合物を55℃で1時間加熱した。THFを、水浴温度を28℃に維持しながら減圧下で除去し、粗BLA-NCA生成物(13.75 g)を得た。粗BLA-NCA生成物を50 mL THF中に溶解し、そして粗生成物を750 mLのヘキサン中に沈殿させ、粗BLA-NCA(9.87 g)を得た。粗BLA-NCAを無水DCM(250 mL)中に懸濁させ、そしてアルゴン雰囲気下で30-40分攪拌した。BLA-NCA溶液を25gのCelite (登録商標) Sベッド(セラライトをオープン中、130℃で2日乾燥した)を通して濾過した。セラライトベッドを200 mLのDCMでさらに洗浄した。BLA-NCAの合わせたDCM(約350 mL)洗浄液を同じCelite (登録商標) Sベッドを通して2回濾過し、そしてDCM(200 mL)で洗浄した。合わせたDCM溶液を、水浴温度を28℃に維持しながら減圧下でエバポレートした。精製したBLA-NCAをTHF(30 mL)中に溶解し、そして生成物をヘキサン(450 mL)中に沈殿させてBLA-NCA(1)を白色固体として2.87 g、25.7%収率で得た。高真空下で2-3時間乾燥し、そして-80℃で保存した。1H NMR (DMSO-d₆; 800 MHz): 9.0 (1H), 7.35 (m, 5H), 5.15 (s, 2H), 4.62 (m, 1H), 3.20-2.85 (dd, 2H)。

【0483】

PBLA(2)の合成:オープン乾燥した1000 mL丸底フラスコにBLA-NCA(1)(2.0 g, 8.025 mmol)を加え、そして25 mLのジクロロメタン(DCM)および2.5 mLのN,N-ジメチルホルムアミド(DMF)の混合物中に溶解した。この溶液にn-ブチルアミン(13.22 μ L, 0.1337 mmol)を加えた。反応混合物を室温で96時間攪拌し、PBLA 2を得た。反応混合物をジエチルエーテル(420 mL)中に沈殿させた。PBLA-含有ジエチルエーテル溶液をファルコンチューブ(50 mL)中に集め、そして遠心分離(3500 xg, 7分, 25°C)して中間体2(1.7 gm)を白色固体として得た。¹H NMR (DMSO-d₆; 800 MHz): 8.25 (m, 60H), 7.40-7.10 (m, 332 H), 5.10-4.85 (m, 134H), 4.63 (63H), 2.75 (m, 65H), 2.50 (m, 65H), 1.25 (m, 4H), 0.82 (t, 3H)。

10

【0484】

中間体(3)(H41D24)の合成:オープン乾燥した250 mL丸底フラスコに30 mLのDMSO中に溶解したPBLA 2(1.0 g, 0.0074 mmol)を加えた。次に、溶液を10 mLのTHFで希釈した。この溶液にn-ヘキシルアミン(1183 μ L, 8.95 mmol)を加え、そして室温で28 h攪拌した。次いで、この反応混合物にジエチレントリアミン(DET)(7.7 gm, 74.6 mmol)を加え、20 h攪拌した。粗中間体3を、三角フラスコ中で750 mLのジエチルエーテル中に沈殿させ、油状沈殿物を得た。沈殿物を16 x 50 MLファルコンチューブ(8 x 2回)を用いて25°Cで3500xg、7分の遠心分離によって集めた。エーテルをデカントし、そしてサンプルをRTで2 hr乾燥した。沈殿物を0.5 M HCl(3 mL)中に懸濁させ、そして4°Cで一晩維持して溶解させた。さらに、粗中間体3を、8-10 kDカットオフ透析バッグを用い、透析液として0.01M HClを用いて4°Cで18 hさらに精製した。さらに、透析液を新たに調製した0.01M HClに交換し、そして透析を4°Cで12h続けた。続いて、透析液を4時間毎に分子生物学グレードの水に交換し、そして透析を4°Cで続けた。純粋な中間体3の70 mL溶液を凍結乾燥し、中間体3を綿状の白色固体(840 mg)として得た。¹H NMR (D₂O, 800 MHz): 3.86-2.20 (0.9H, m), 1.90-0.34 (1H, m)。

20

【0485】

ポリマーA(4)の合成:20 mLシンチレーションバイアルに7 mLの水(分子生物学グレード)中に溶解した中間体(3)(150 mg, 0.01 mmol)を加えた。この溶液に5 mLの分子生物学グレードの水中に溶解した2000 KDa PEGアクリレート(800 mg, 0.4 mmol)を加えた。反応混合物を50°Cで48 h加熱した。反応混合物をRTまで冷却し、そして凍結乾燥して粗ポリマーA(4)を薄茶色綿状固体として得た。およそその粗収量は950 mgである。粗ポリマーA(4)をPierce™強カチオン交換スピンカラム(ThermoFisher Scientific, Catalog No.: 90009)を用いて精製した。最後に、ポリマー溶液を凍結乾燥して純粋なポリマーA(4)を薄黄色粉末(230 mg)として得た。¹H NMR (D₂O, 800 MHz): 4.45-4.12 (m, 19H), 4.00-3.60 (m, 1171H), 3.57-2.12 (m, 427H), 1.72-0.46 (m, 451H)。

30

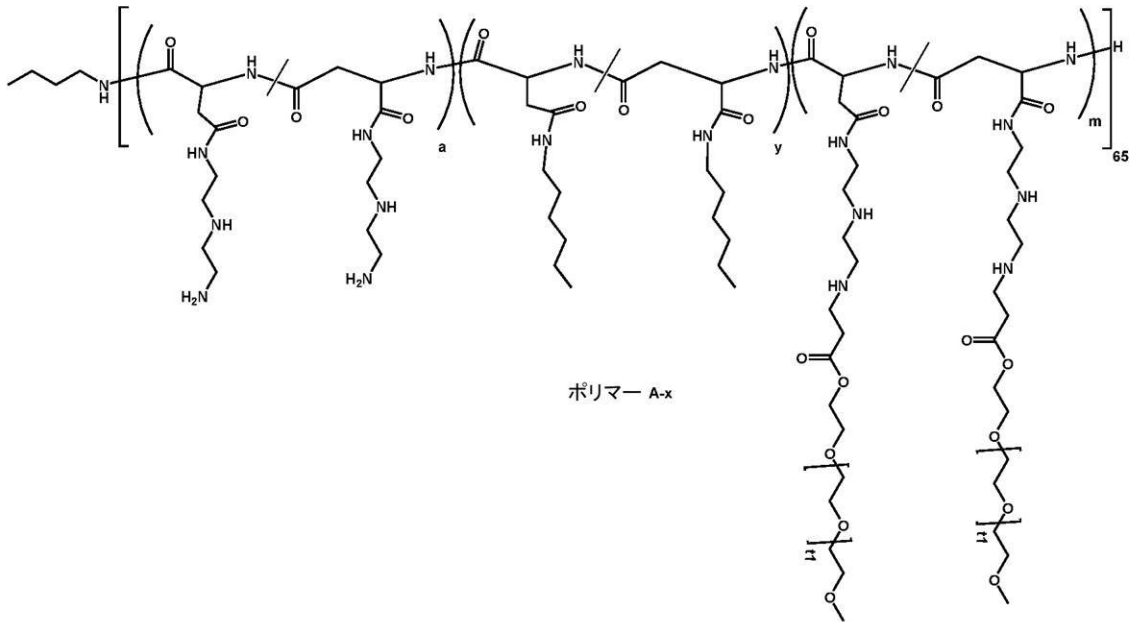
【0486】

追加のポリマーは、上記の手順を用いて作製したが、中間体(3)として中間体3と同じ構造を有するが疎水性(H)側鎖とアミン(D)側鎖との異なる比を有し、そしてその他は表4および5に示す通りの化合物を用いることによって修飾した:

40

【0487】

【化 1 1 0】



【 0 4 8 8 】

【表 4】

表 4: 中間体(3)として H33D32 および反応条件を用いる:水、PEG アクリレート、50℃、40 時間

ポリマー	PEG アクリレート	PEG 当量	疎水性単位(y)	結合していないアミン単位の数* (a)	結合した PEG の数* (m)	純度**
A-1	Me-PEG-0.48K-アクリレート	5	33	29	3	84.7
A-2	“	10	“	28	4	99.9
A-3	“	20	“	27	5	99.9
A-4	“	40	“	25	7	99.9
A-5	Me-PEG-2K-アクリレート	5	“	30	2	99.4
A-6	“	10	“	29	3	99.7
A-7	“	20	“	27	5	98.0
A-8	“	40	“	25	7	99.7
A-9	Me-PEG-5K-アクリレート	5	“	29	3	93.9
A-10	“	10	“	28	4	97
A-11	“	20	“	27	5	91.6
A-12	“	40	“	24	8	90.9

*NMR によって決定した。

**GPC によって決定した。

【 0 4 8 9 】

10

20

30

40

50

【表 5】

表 5: 中間体(3)として H50D15 および反応条件を用いる:水、PEG アクリレート、50℃、40 時間

ポリマー	PEG アクリレート	PEG 当量	疎水性単位(y)	結合していないアミン単位の数* (a)	結合したPEG の数* (m)	純度**
A-13	Me-PEG-0.48K-アクリレート	5	50	12	3	97
A-14	“	10	“	10	5	97.5
A-15	“	20	“	7	8	98
A-16	“	40	“	1	14	99
A-17	Me-PEG-2K-アクリレート	5	“	11	4	99
A-18	“	10	“	9.5	5.5	99
A-19	“	20	“	8	7	98.3
A-20	“	40	“	3	12	98.2
A-21	Me-PEG-5K-アクリレート	5	“	13	2	96
A-22	“	10	“	11	4	97
A-23	“	20	“	8	7	97
A-24	“	40	“	6	9	96

*NMR によって決定した。

**GPC によって決定した。

【0490】

実施例6

以下の実施例は、本開示に従うポリマーを用いて核酸を送達することを説明する。

【0491】

20 mM HEPESを用いて、それぞれ、以下に示すポリマーブレンドを1 mg/mlの最終濃度に調製し、そしてルシフェラーゼmRNAを0.2 mg/mlの最終濃度に調製した。ポリマーナノ粒子(PNPs)を等体積のルシフェラーゼmRNA(0.2 mg/ml)およびポリマー(1 mg/ml)を加えることによって処方した。これは、mRNA:ポリマーの比1:5を有するPNPの処方物を生じる。PNPを10分インキュベートし、続いてスクロースを加えて10 mg/mLの最終濃度にした。得られたPNPを液体窒素中で急速冷凍し、そして凍結乾燥した。

【0492】

PNPを、ゆっくりとピペットで取りそして20 mM HEPES緩衝液中に落とすことによって、1 mg/mlの最終濃度のmRNAに再懸濁し、そして10分インキュベートした。雄FVBマウス(6-8週)を誘導チャンバ中で1.5-2%イソフルランで麻酔し、そして10 μ l PNPをL5棘突起とL6棘突起との間で髄腔内腰椎穿刺によって投与した。PNP投与後、マウスを、ケージに戻して回復させる前に、頭を30度傾けた仰向けでトレンドレンプルグ体位でイソフルラン麻酔下30分保持した。

【0493】

トランスフェクションおよび生体内分布を生物発光画像法で分析した。動物を酸素中2-2.5%イソフルランで麻酔しそして保持した。D-ルシフェリンを150 mg/kgで腹腔内注射によって投与した。動物をインビボイメージングシステム(IVIS)を用いて連続的に画像化した。光子を集め、そして1分間積算した。総流束強度をFUS標的化領域にわたって目的の領域から測定した。

【0494】

最終インビボ生物発光画像化期間直後に、動物を安楽死させた。脳脊髄をすばやく除去

し、10 mg/ml D-ルシフェリン中に浸し、そしてIVISで画像化した。光子を2分間積算した。

【0495】

結果を図8-10に示す。図8-10において識別したポリマーは表6に示す実施例5のポリマーに相関する。

【0496】

【表6】

表6

ポリマー1 (50 wt.%)		ポリマー2 (50 wt.%)	ナノ粒子
No.	名称		
A-1	H33D29P0.5K3	H27N	RD-038
A-2	H33D28P0.5K4	“	RD-039
A-3	H33D27P0.5K5	“	RD-040
A-4	H33D25P0.5K7	“	RD-041
A-5	H33D30P2k2	“	RD-042
A-6	H33D29P2k3	“	RD-043
A-7	H33D27P2k5	“	RD-044
A-8	H33D25P2k7	“	RD-045
A-9	H33D29P5k3	“	RD-046
A-10	H33D28P5K4	“	RD-047
A-11	H33D27P5k5	“	RD-048
A-12	H33D24P5k8	“	RD-049
A-13	H50D12P0.5K3	“	P500-20
A-17	H50D11P2k4	“	P2000-5
A-18	H50D9.5P2k5.5	“	P2000-10
A-19	H50D8P2k7	“	P2000-20
A-20	H50D3P2k12	“	P2000-40
A-21	H50D13P5k2	“	P5000-5
A-22	H50D11P5k4	“	P5000-10
A-23	H50D8P5k7	“	P5000-20
A-24	H50D6P5k9	“	P5000-40

【0497】

本発明を実施するための本発明者らに公知のベストモードを含む、この発明の好適な実施態様を本明細書中に記載する。これらの好適な実施態様の変形例は、前述の記載を読めば当業者に明らかになり得る。本発明者らは、当業者がこのような変形例を必要に応じて採用することを期待し、そして本発明者らは本明細書中に具体的に記載された以外で本発明が実施されることを意図する。従って、この発明は、適用可能な法律によって許されたとおり、本明細書に添付された特許請求の範囲に記載の主題の全ての改変物および等価物を含む。さらに、本明細書中で特段示されるか、文脈によって明らかに矛盾しないかぎり、全ての可能な変形例における上記の要素の任意の組み合わせは本発明に包含される。

【0498】

値の範囲が提供されている場合、文脈がそうでないと明確に指示しない限り、各介在値は、その範囲の上限および下限とその述べた範囲における任意の他の述べたまたは介在する値との間で、下限の単位の10分の1まで、本発明内に含まれることが理解される。これらのより小さい範囲の上限および下限は、独立してより小さい範囲に含まれ得、そしてまた本発明内に含まれ、述べた範囲における任意の特に排除された限定に供される。述べ

た範囲が1つまたは両方の限定を含む場合、これらの含まれる限定のいずれかまたは両方を排除する範囲もまた、本発明に含まれる。

【0499】

そうでないと定義しない限り、本明細書中で使用される全ての技術的および科学的用語は、本発明が属する分野の当業者によって通常理解されるのと同じ意味を有する。本明細書中に記載されたのと同様または等しい任意の方法および物質もまた、本発明の実施または試験において使用され得るが、好ましい方法および物質は今記載される。本明細書中で述べた全ての刊行物は、刊行物が引用されるのに関連して方法および/または物質を開示および記載するために、本明細書中に参考として援用される。

【0500】

本明細書中および添付の特許請求の範囲中で使用されるように、単数形「a」、「an」、および「the」は、文脈がそうでないと明確に指示しない限り複数の指示を含むことに留意しなければならない。従って、例えば、「複合体(a complex)」に対する言及は、多数のこのような複合体を含み、そして「Cas9ポリペプチド(the Cas9 polypeptide)」に対する言及は、当業者に公知の1つ以上のCas9ポリペプチドおよびそれらの等価物などへの言及を含む。特許請求の範囲は任意の必要に応じた要素を排除するよう起草され得ることがさらに留意される。従って、この陳述は、クレーム要素の記載に関連して「単独(solely)」、「のみ(only)」などのこのような排他的な専門用語の使用のため、または「否定的な(negative)」限定の使用のための先行詞として役立つことが意図される。

【0501】

明確性のために別個の実施態様の文脈において記載される本発明のある特徴もまた、単一の実施態様において組み合わせで提供され得ることが理解される。反対に、簡潔さのために単一の実施態様の文脈において記載される本発明の種々の特徴もまた、別個にまたは任意の適切なサブの組み合わせで提供され得る。本発明に関する実施態様の全ての組み合わせは、各および全ての組み合わせが個々にかつ明確に開示されていたかのごとく、本発明によって特別に含まれ、そして本明細書中に開示される。さらに、種々の実施態様およびそれらの要素の全てのサブの組み合わせもまた、各および全てのサブの組み合わせが本明細書中に個々にかつ明確に開示されていたかのごとく、本発明によって特別に含まれ、そして本明細書中に開示される。

【0502】

本明細書中で議論した刊行物は、本願の出願日前のそれらの開示のためだけに提供される。本発明が前の発明によりこのような刊行物に先行する権利を与えられないという許可と解釈される記載は本明細書にはない。さらに、提供された公開日は、実際の公開日とは異なり得、これは独立して確認される必要があり得る。

10

20

30

40

50

【図面】
【図 1】

Streptococcus pyogenes Cas9 GenBank AKP81606									
1	mdkysgld	ignsguav	ddykvpk	kfvlgmtr	hskkniga	lfdsgtae	モナーフ1 ドメイン1		
61	atlrktrr	rytrknrc	yloelnsnm	akvdsfhr	leesfveed	kkhrtpfg			
121	nivdevayhe	kyptyhrk	klvstdkad	rllyalah	mikrghli	egdlpndsd			
181	vdklfiqv	lyndleerp	inasgdaka	lsarsksr	renlaqp	geknslgn			
241	lialsglp	nksntdae	daktlskdt	yddldnla	qigdyadif	laaknlsdai			
301	lslslvnt	etkapisas	mikrydehq	dlikkalr	qigdykei	phqihgeli			
361	gyldgdsqe	etkykpl	ekmdgteell	mikredlr	krtdngsi	fdqskngya			
421	alirdeqfy	plkdreki	ekltirpy	yvgplrgns	rfawmrkse	etlpwnfee			
481	wdkgasaqs	fiernmfck	nlpkewlpk	hsilyeyfv	yneltkvv	tegmrkpafi			
541	sgaqkkauld	lftmrktv	vkpkedyfk	kiedsvei	sgvedfnas	lgyrhdli			
601	lklkdfidne	enediediv	littfedre	kiefsvei	hifdkvmkq	lkrtygwg			
661	rlsklingi	rdkqsqtil	dfksdgtan	rlmfqlhdd	sifkedqk	aqvsgagdsi			
721	hehianlgs	paikgqlt	vkvdvlkv	mghkpenlv	iemarehgtt	qkgqknshr	モナーフ2		
781	mkrteeqike	lgsqikehp	ventiqnek	lyvylngv	nrtdydvdi	nrtdydvdi	モナーフ3		
841	lpsstfidd	sidkvltvs	dknrgsdhv	psseevkmnk	nywrlnlak	liqrtdnl	ドメイン2		
901	tkaeagise	ldkagifkr	lvtrqtikh	vaqildsrnn	tkydenkll	revkvllks	モナーフ4		
961	klvsdrfkdf	qlykvreinn	ylhahdayn	avgtalikk	ypklesefv	galykydyvrk			
1021	mlakeqeql	kakakyfivs	nimrfktei	tlangerkr	plietheig	ewwdkgrdf			
1081	atrvkvlsm	qvnvsktev	qtgfskesi	lpkmsdki	arkkdwpkk	ygdspiva			
1141	ysvvlwakve	kgsskklsv	kelgitime	rssteknpi	flaekkyev	kkdliikpk			
1201	ysfelngv	krmlasagel	qkgrelaps	kyvnyilas	hyekllgspe	dneqkqlve			
1261	qkhyldeli	eqeefskrv	iladanlckv	lsaynkhrck	pireqaeni	hiftnlga			
1321	paafkytdtt	idrknytsk	evidatlhq	sitglyetri	dlsgggd				

図1

【図 3】

AsCpf1									
1	mtqegftnl	yvsktdrfe	lipqgkltkh	ieqgffeed	kamdhykel	kpidriykt			
61	yadqqlqv	ldwenisaai	dsyrkektee	tnalaeqa	tyrnahdyf	igtdnltida			
121	inkraeyk	gfkhaefng	kvkqlgtvt	ttehenalr	sidkftfys	gfyemknvf			
181	saedistaip	hrivqdnpk	fkfenchfr	liavpslre	hfenvkaig	ifvstisev			
241	fsptynql	tqtqdiyng	llglsreag	tekikgnev	lnlaiknde	tahiaslph			
301	rfipkqil	sdmtslf	eefksdeevi	qsfckytlk	menvelae	afnelnsid			
361	lthifshkk	letssakts	hwdtrnaly	eriselgtk	ltsakekvq	rskhedini			
421	keisaagke	lseaftqds	qlkavtahq	dqplttlkk	qeekeilskv	lslslgylh			
481	ldwfvadesn	evdpsarl	tgiklemeps	lsfynkamy	atkkpysvek	fklnqtmpl			
541	asgwvdknek	ngalfvkn	glylgimpk	qkgrykalsf	epkteksef	dkmydyfipd			
601	aakmpkpcst	qlkavtahq	thtppilsn	tnfleptk	eyjdlnpek	epkktqaya			
661	kktdqkgyr	ealokwidf	rdfskykt	tsidslsr	ssyqkdgey	yaelpnlva			
721	isfgtaeke	lmdavetgk	yfiqynkdf	akghngknl	htywtgifs	penlaksik			
781	lmgqaefyr	pkrmkmah	rigeminkkk	lkdktpipd	tyqelyoyv	nhrlshlsl			
841	earallpvi	tkvshelik	drftskoff	fnvplinyq	aanspskfq	rvaarqawsv			
901	etipigdrq	emlyitvi	dstgkileq	slntiqdty	qkklrnreke	vyarqawsv			
961	vgitklkag	ylsckvheiv	dimhiyqav	vlentfgfk	skrtgiaeka	vyqftekml			
1021	dklnclvkd	ypaekvggvl	npqitqdft	stakmgtrsg	fflyvpapyt	skidptgvr			
1081	dpfwkltkn	hesrknfleg	fdfhydykt	gdflnfkmn	mlsfgrlp	gmpawdvrf			
1141	eknetqtdak	gtpflagkr	vpvenhrft	elialeekg	ivfrdgsnl				
1201	pklenddsh	aidtmalar	svlqmrsna	atgedyinsp	vrdlmgvcd	srqnpwpm			
1261	dadangayhi	alkqgllnh	lkeskdlikq	ngisnqdwla	ylqelm				

図3

【図 2】

Francisella tularensis subsp. novicida U112 Cpf1									
1	msyqetvkn	yslktlfr	liqgkltkn	ikarglidd	ekradykka	kqidkyvhqf			
61	feelissvc	isedllqns	dvyrlkksd	ddnlqkdfs	aktikkkis	eykdsckf			
121	nfnqnlda	kkgsedlil	wikqskdngi	elfkansdit	didealeik	sfkgwttyfk			
181	gfhcnkny	ssndipsii	ynvddnlpk	flenkakes	lkdkapealn	yeqikkdlae			
241	elftdidykt	sevnqrfsi	deveianfn	nylnqsgtk	fnitggkrv	ngentkrkgi			
301	neynlvsqq	indklkyk	msvfkqils	dstesktvd	kleddsdvvt	tnqsfyeqla			
361	afkveeksi	ketislfdd	lkaqklidsk	lyfndkslt	disqvfdy	svigtavley			
421	itqiapknl	dnpkskeql	laktetaky	lsletikal	eefnkhrdd	kqcrfeella			
481	nfaipmfd	elaqndhla	qiskyqnqg	kkdlqasae	ddvkaikdl	qatnllhkl			
541	kfhiscsd	kanlidkdeh	fyvfeecyf	elanivplyn	kirnyitqk	ysdeklfnf			
601	enstlangwd	knkpnctai	lflkdkyyl	gymnkmmki	fdkkaiken	gegykkyvk			
661	lpgankmip	kvfsaksk	fympsedlr	irnhsthtk	gspqkygk	efniedcrkf			
721	idfykqsik	hpewskdgr	fsdtqynsi	deyrenvq	gykftenis	esydswnq			
781	gklyfuyj	kdfsayskr	prhitywka	lfdernlqv	vyktingael	fyrkspjkk			
841	itnpakeia	nkndnpkke	svfeydlidk	krftedfff	hopatnfs	sgankndei			
901	nllkekand	vhlsidrg	rhlavytdv	gkgnlkqdt	fnigndrmk	tnyhdklaai			
961	ekddysarkd	wkkninkem	kegytsqwh	eaikvieyn	aivwfdlnf	gkrgfrkve			
1021	kayqsklekm	lieklylrv	kdnedkqg	virayqlap	fafkkmqk	tgiiyyvpag			
1081	tskicpvtg	fnqlypkve	svksqefis	kdkicylap	kygfesidy	knfgdkaag			
1141	kwiasfgr	lfnrnsdkn	hnwdtreyp	tketlkld	ysieghgec	ikaacgesd			
1201	kkflaktisv	intlqmns	ktgteldyl	spvacvngnf	fdsrqapknm	pqdadangay			
1261	hglkgml	griknnqegk	klrviknee	yfefvqnmn					

図2

【図 4】

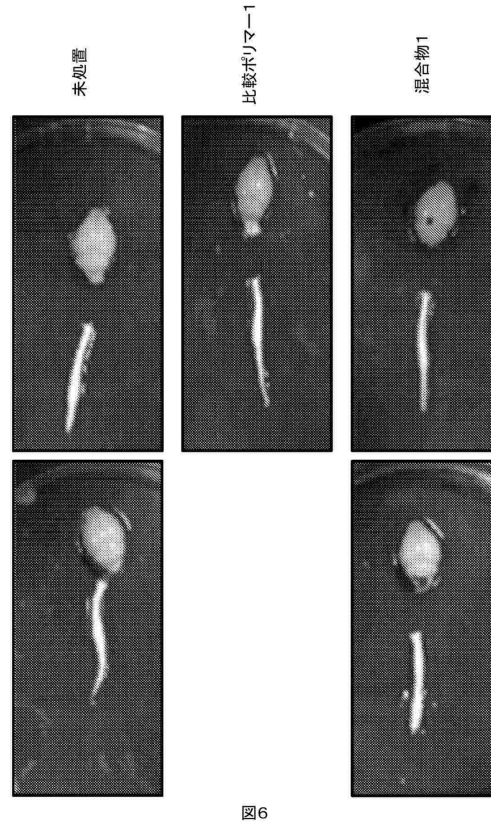
LbCpf1									
AASKLEKFTNCSYSLTRFKAIPVGKGTQENIDNKRLLVEDEKRAEDYGVYKLLDRYVL	SPINDVLSKLNLYSLFRKTRTEKENKELENLEINLRKEIAKAFKGAAGYKSLF	KKDIETLPEAADDEIALVNSFNGTTAFTGFDNRENMFSEAKSTSIARFCINEN	LTRYISNMDIFEKVAIFDKHEVQEIKLNSDYDVEDFEGEFNFVLTEGIDVYNA	IIGGFVTEGEEKIGLNEYINLYNAKTQALPKFKLYQVLSDRSLSFYEGEYTSDEE	VLEVRNLTNNSEIFSSIKLEKLFKNFDEYSSAGIFVKNGPASTISKDIFGEWNLIR	DKWNAEYDDIHLKKKAAVTEKEDDRKSKIGSFSLEQLQEYADADLSWEKLEIIL	QKVDIYKVGSEKLFADFVLEKSLKNDVAVIMKDLDSVKSFENYKAFEGEGKE	TNRDESFGDFVLAYDILLKVDHYDAIRNYVTQPKYSKDKFKLYFQNPQFMGGWDKDE	TDYRATILRYGSKYLAIMDKYAKCLQKIDKDDVNGNYEKIN'YKLLPGPNKMLPKVFFS
KKWMAYNPSEDIQKYKNGTFFKGDGMFNLDCHKLIDFKDSISYPKWSNAYDFNSE	TEKYKDIAGFYREVEEQYKVSFESASKEVDKLVVEEGKLYMFQYNNKDFSDKSHGTPNL	HTMYFKLLFDENNHGQIRLSGGAEILFMRASLKEELVHPANSPANKNPNPKKTTTL	SYDVYKDRFSEDQVLEHPIANKCPKNIFKINTEVRLLKHDDNPVIGIDRERNLL	YIYVWVGKNGVIEQYSLNEIINNFGIRIKTDYHSLLDKKEKFEREARNOWTSIENKEL	KAGYSQVHKICELVEKYDAVIALEDNSGFKNSRVKVEKQVYQKFEKMLDKLN'YMD	KKSNPCATGALKGYKNDKESFMSMTQNGFIFYPAWLTSKIDPSTGFWLLTKTYT	SIADSKKFISSFDRIYMPPEEDLFEFALDYKNFSRTDADYKWKWLYSYGNRIRIFAAK	KNNVFAWEEVCLTSAYKELNKGYNIGYQQDIRALLCEQSDKAFYSFMAVLSMLQWRN	SITGRDVFILSPVKNSDGIFYDSRNYEAQENAILPKNADANGAYNIARKVLWAIGQFK
KAEDKLDKVKIAISNKEWLEYAQTSVK									

図4

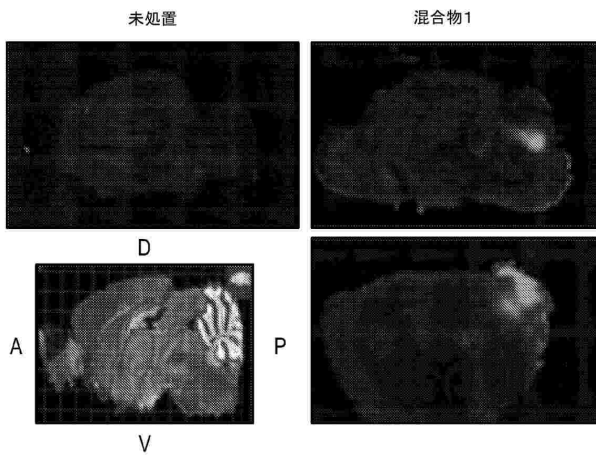
【図 5】



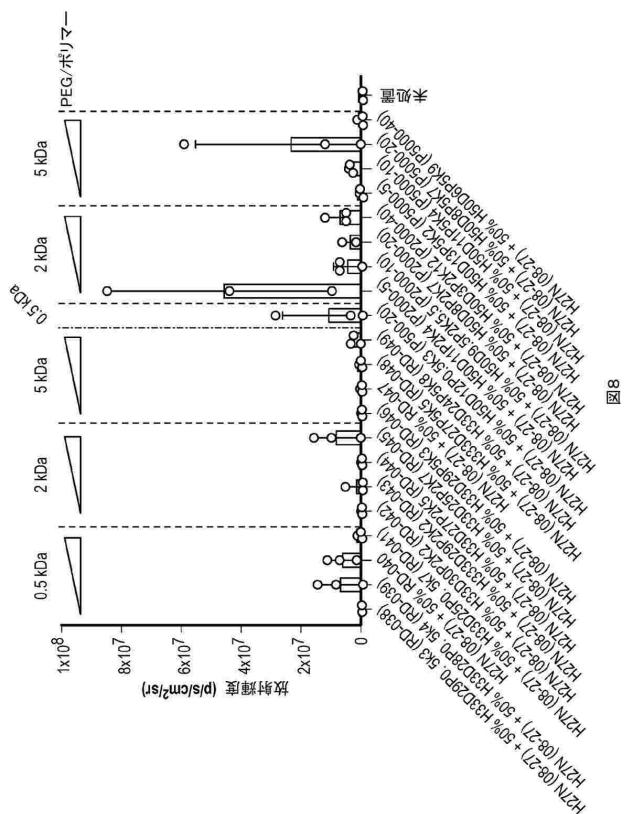
【図 6】



【図 7】



【図 8】



10

20

30

40

50

【図 9】

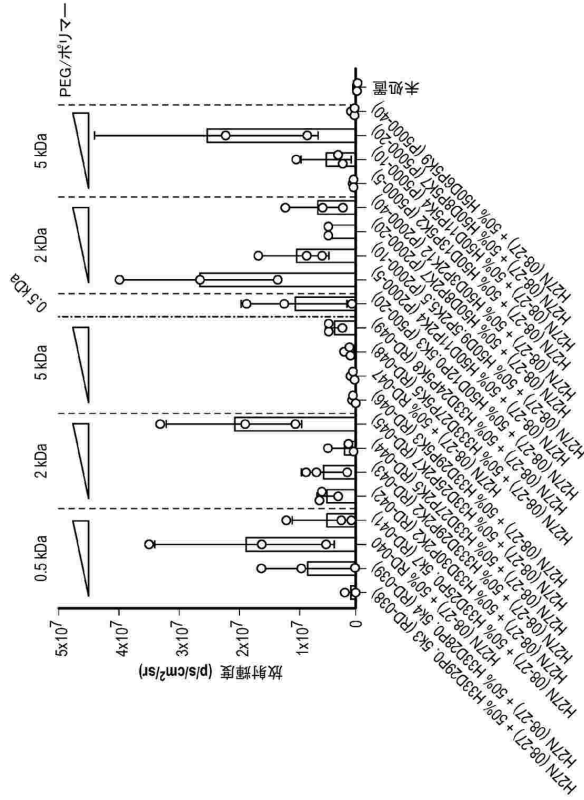


図 9

【図 10】

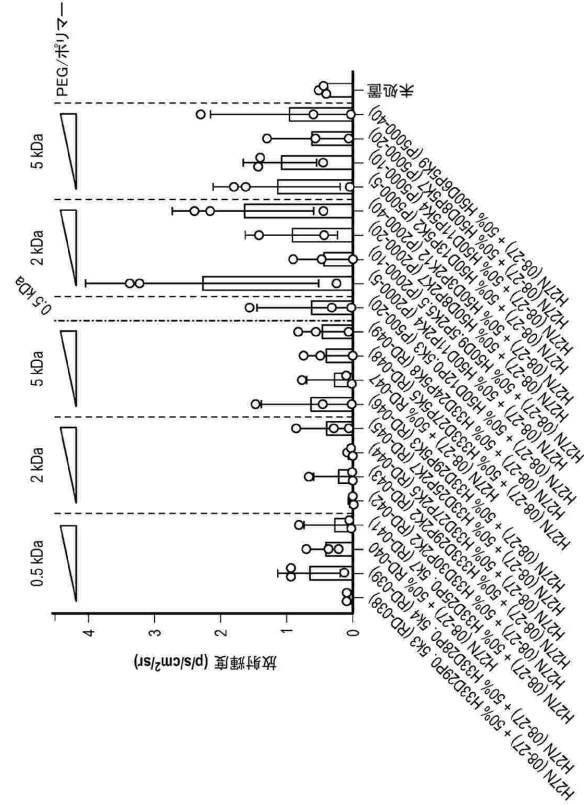


図 10

【配列表】

2024525141000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/033302

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV.	C08G69/10	C08G69/48 A61K9/51 A61K31/7105 A61K47/34
	C12N15/88	
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)		
C08G A61K C12N		
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	LIU C ET AL: "Novel biodegradable lipid nano complex for siRNA delivery significantly improving the chemosensitivity of human colon cancer stem cells to paclitaxel", JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 140, no. 3, 16 December 2009 (2009-12-16), pages 277-283, XP026778505, ISSN: 0168-3659, DOI: 10.1016/J.JCONREL.2009.08.013 [retrieved on 2009-08-21]	1, 2, 4-7, 19, 25-32, 34, 36, 42, 43
Y	figure 1 abstract table 1 page 281, column 2 - page 282 ----- -/--	3, 8-18, 20-24, 27-33, 35, 37-41
☒ 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		"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date		"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
"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)		"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
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
14 October 2022		27/10/2022
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Mader, Margarita

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/033302

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2020/243370 A1 (GENEDIT INC [US]) 3 December 2020 (2020-12-03) claims examples paragraph [0002] -----	3, 8-18, 20-24, 27-33, 35, 37-41

2

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

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2022/033302

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2022/033302

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2020243370 A1	03-12-2020	AU 2020282798 A1	16-12-2021
		CA 3142035 A1	03-12-2020
		EP 3976015 A1	06-04-2022
		JP 2022534245 A	28-07-2022
		KR 20220013570 A	04-02-2022
		WO 2020243370 A1	03-12-2020

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 K	38/00 (2006.01)	A 6 1 K	38/00	
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00	
A 6 1 K	31/7088(2006.01)	A 6 1 K	31/7088	
A 6 1 K	31/7105(2006.01)	A 6 1 K	31/7105	
A 6 1 K	38/46 (2006.01)	A 6 1 K	38/46	
A 6 1 K	38/53 (2006.01)	A 6 1 K	38/53	
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/09	1 1 0
C 1 2 N	15/113 (2010.01)	C 1 2 N	15/09	1 0 0
C 1 2 N	15/88 (2006.01)	C 1 2 N	15/113	Z
		C 1 2 N	15/88	Z

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. B R I J

2. T R I T O N

3. T W E E N

弁理士 當麻 博文

(74)代理人 100137729

弁理士 赤井 厚子

(74)代理人 100152308

弁理士 中 正道

(74)代理人 100201558

弁理士 亀井 恵二郎

(72)発明者 リー、クンウー

アメリカ合衆国、9 4 0 8 0 カリフォルニア州、サウス サン フランシスコ、ゲートウェイ ブ
ールヴァード 6 8 1、スイート 3 1 1 / 3 1 3

(72)発明者 マイティー、サンタヌ

アメリカ合衆国、9 4 0 8 0 カリフォルニア州、サウス サン フランシスコ、ゲートウェイ ブ
ールヴァード 6 8 1、スイート 3 1 1 / 3 1 3

(72)発明者 デヴェラパリー、ラモハン

アメリカ合衆国、9 4 0 8 0 カリフォルニア州、サウス サン フランシスコ、ゲートウェイ ブ
ールヴァード 6 8 1、スイート 3 1 1 / 3 1 3

(72)発明者 ミード、ブライアン パトリック

アメリカ合衆国、9 4 0 8 0 カリフォルニア州、サウス サン フランシスコ、ゲートウェイ ブ
ールヴァード 6 8 1、スイート 3 1 1 / 3 1 3

(72)発明者 ティルチナバリー、ゴビナート

アメリカ合衆国、9 4 0 8 0 カリフォルニア州、サウス サン フランシスコ、ゲートウェイ ブ
ールヴァード 6 8 1、スイート 3 1 1 / 3 1 3

(72)発明者 ペイロ、サラ マリー

アメリカ合衆国、9 4 0 8 0 カリフォルニア州、サウス サン フランシスコ、ゲートウェイ ブ
ールヴァード 6 8 1、スイート 3 1 1 / 3 1 3

F ターム (参考) 4C076 AA95 AA99 CC01 CC09 CC27 EE41 FF68

4C084 AA01 AA13 BA03 DC22 DC28 MA02 MA11 NA13 ZA01 ZA94

ZB26

F ターム (参考)	4C086	AA01 AA03 EA16 MA02 MA03 MA05 MA11 NA13 ZA01 ZA94 ZB26
	4J001	DA01 DB03 DD06 DD14 DD20 EA36 EC83 EC86 EC87 EE44C FA03 FB01 FC01 GA05 JA20