

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-503623
(P2024-503623A)

(43)公表日 令和6年1月26日(2024.1.26)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/86 (2006.01)	C 1 2 N	15/86	Z Z N A	4 C 0 7 6
C 1 2 N	15/11 (2006.01)	C 1 2 N	15/11	Z	4 C 0 8 4
A 6 1 K	35/768 (2015.01)	A 6 1 K	35/768		4 C 0 8 5
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00		4 C 0 8 6
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	T	4 C 0 8 7
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全290頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2023-541041(P2023-541041)	(71)出願人	518267757	最終頁に続く	
(86)(22)出願日	令和4年1月6日(2022.1.6)		オンコラス, インコーポレイテッド		
(85)翻訳文提出日	令和5年9月4日(2023.9.4)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2		
(86)国際出願番号	PCT/US2022/011450		1 3 9, ケンブリッジ, ハンプシャー		
(87)国際公開番号	WO2022/150485		ストリート 5 0, スイート 4 0 1		
(87)国際公開日	令和4年7月14日(2022.7.14)	(74)代理人	100078282	最終頁に続く	
(31)優先権主張番号	63/134,376		弁理士 山本 秀策		
(32)優先日	令和3年1月6日(2021.1.6)	(74)代理人	100113413		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		弁理士 森下 夏樹		
(31)優先権主張番号	63/147,959	(74)代理人	100181674		
(32)優先日	令和3年2月10日(2021.2.10)		弁理士 飯田 貴敏	最終頁に続く	
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100181641		
(31)優先権主張番号	63/181,663		弁理士 石川 大輔		
		(74)代理人	230113332		
			弁護士 山本 健策		

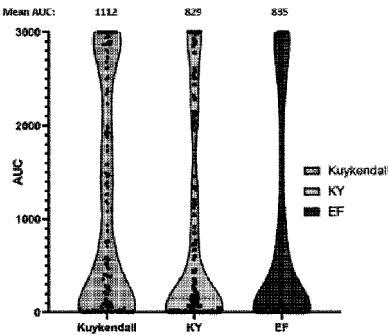
(54)【発明の名称】 カプセル化RNAポリヌクレオチド及び使用方法

(57)【要約】

本開示は、腫瘍溶解性ウイルスゲノムをコードする組換えRNA分子に関する。本開示はさらに、組換えRNA分子のカプセル化、ならびにがんの処置及び防止のための組換えRNA分子及び／または粒子の使用に関する。一態様において、本開示は、腫瘍溶解性コクサッキーウイルスをコードする合成RNAウイルスゲノムを含む脂質ナノ粒子(LNP)であって、コクサッキーウイルスが、EF株及びKY株から選択されるCVA 2 1株である、脂質ナノ粒子(LNP)を提供する。

【選択図】 図 1 2 A

Fig. 12A



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

腫瘍溶解性コクサッキーウイルスウイルスをコードする合成 RNA ウイルスゲノムを含む脂質ナノ粒子 (LNP) であって、前記コクサッキーウイルスが、Kuykendall 株、EF 株、及び KY 株から選択される CVA21 株である、前記脂質ナノ粒子 (LNP)。

【請求項 2】

前記コクサッキーウイルスが CVA21-KY 株であり、前記 CVA21-KY 株が、配列番号 5 との少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、または 100% の配列同一性を有するポリヌクレオチド配列を含む、請求項 1 に記載の LNP。

10

【請求項 3】

前記コクサッキーウイルスが CVA21-EF 株であり、前記 CVA21-EF 株が、配列番号 9 との少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、または 100% の配列同一性を有するポリヌクレオチド配列を含む、請求項 1 に記載の LNP。

【請求項 4】

前記コクサッキーウイルスが、配列番号 6 または 10 との少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、または 100% の配列同一性を有する 5' UTR (IRES) 配列を含む、請求項 1 に記載の LNP。

20

【請求項 5】

前記コクサッキーウイルスが、配列番号 7 または 11 との少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、または 100% の配列同一性を有する P1 配列を含む、請求項 1 に記載の LNP。

【請求項 6】

前記コクサッキーウイルスが、配列番号 8 または 12 との少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、または 100% の配列同一性を有する 3D 配列を含む、請求項 1 に記載の LNP。

【請求項 7】

前記合成 RNA ウイルスゲノムが、配列番号 1 との 95% 超、90% 超、85% 超、または 80% 超の配列同一性を有するポリヌクレオチド配列を含まない、請求項 1～6 のいずれか 1 項に記載の LNP。

30

【請求項 8】

腫瘍溶解性セネカバレーウイルス (SVV) をコードする合成 RNA ウイルスゲノムを含む脂質ナノ粒子 (LNP) であって、前記合成 RNA ウイルスゲノムが、配列番号 68 との少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、または 100% の配列同一性を有するポリヌクレオチド配列を含む、前記脂質ナノ粒子 (LNP)。

【請求項 9】

前記合成 RNA ウイルスゲノムが、配列番号 68 の核酸 1～670 との少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、または 100% の配列同一性を有する 5' UTR (IRES) 配列を含む、請求項 8 に記載の LNP。

40

【請求項 10】

前記合成 RNA ウイルスゲノムが、S177A 変異を含む SVV VP2 タンパク質をコードする、請求項 8 または 9 に記載の LNP。

【請求項 11】

前記 LNP を細胞に送達すると、前記細胞によるウイルス粒子の産生がもたらされ、前記ウイルス粒子が、感染性及び溶解性である、請求項 1～10 のいずれか 1 項に記載の LNP。

【請求項 12】

50

前記合成RNAウイルスゲノムが、外因性ペイロードタンパク質をコードする異種ポリヌクレオチドをさらに含む、請求項1～11のいずれか1項に記載のLNP。

【請求項13】

外因性ペイロードタンパク質をコードする第2の組換えRNA分子をさらに含む、請求項1～11のいずれか1項に記載のLNP。

【請求項14】

前記外因性ペイロードタンパク質が、MLKL 4HBDドメイン、ガスダーミンDN末端断片、ガスダーミンEN末端断片、HMGB1 Box Bドメイン、SMAC/Diablo、メリチン、L-アミノ酸オキシダーゼ(LAAO)、ディスインテグリン、TRAIL(TNFSF10)、ニトロレダクターゼ、レオウイルスFASTタンパク質、レプチン/FOSL2、 α -1, 3-ガラクトシルトランスフェラーゼ、またはアデノシンデアミナーゼ2(ADA2)を含むまたはそれらからなる、請求項12または13に記載のLNP。

【請求項15】

前記ニトロレダクターゼが、NfsBまたはNfsAである、請求項14に記載のLNP。

【請求項16】

前記レオウイルスFASTタンパク質が、ARV p14、BRV p15、またはp14-p15ハイブリッドである、請求項14に記載のLNP。

【請求項17】

前記外因性ペイロードタンパク質が、蛍光タンパク質、酵素タンパク質、サイトカイン、ケモカイン、細胞表面受容体に結合することができる抗原結合分子、または細胞表面受容体のリガンドである、請求項12または13に記載のLNP。

【請求項18】

a) 前記サイトカインが、GM-CSF、IFN γ 、IL-2、IL-7、IL-12、IL-18、IL-21、及びIL-36 γ から選択されるか、

b) 前記細胞表面受容体のリガンドが、Flt3リガンドもしくはTNFSF14であるか、または

c) 前記ケモカインが、CXCL10、CCL4、CCL21、及びCCL5から選択される、

請求項17に記載のLNP。

【請求項19】

前記抗原結合分子が、免疫チェックポイント受容体に結合してそれを阻害することができる、請求項17に記載のLNP。

【請求項20】

前記免疫チェックポイント受容体が、PD-1である、請求項19に記載のLNP。

【請求項21】

前記抗原結合分子が、腫瘍抗原に結合することができる、請求項17に記載のLNP。

【請求項22】

前記抗原結合分子が、二重特異性T細胞エンゲージャー分子(BiTE)または二重特異性軽量T細胞エンゲージャー分子(LiT E)である、請求項21に記載のLNP。

【請求項23】

前記腫瘍抗原が、HBV-コア(B型肝炎コア抗原)、HBV-pol、HbS-Ag、HPV E6、HPV E7、メルケル細胞ポリオーマラージT抗原、及びエプスタイン・バーウイルス抗原EBNA2またはBZLF1から選択されるウイルス抗原である、請求項21または22に記載のLNP。

【請求項24】

前記腫瘍抗原がDLL3またはEpCAMである、請求項21または22に記載のLNP。

【請求項25】

10

20

30

40

50

前記合成RNAウイルスゲノム及び／または前記組換えRNA分子が、マイクロRNA (miRNA) 標的配列 (miR-TS) カセットを含み、前記miR-TSカセットが、1つ以上のmiRNA標的配列を含む、請求項1～24のいずれか1項に記載のLNP。

【請求項26】

前記1つ以上のmiRNAが、miR-124、miR-1、miR-143、miR-128、miR-219、miR-219a、miR-122、miR-204、miR-217、miR-137、miR-142、及びmiR-126から選択される、請求項25に記載のLNP。

【請求項27】

前記miR-TSカセットが、

a. miR-124標的配列の1つ以上のコピー、miR-1標的配列の1つ以上のコピー、及びmiR-143標的配列の1つ以上のコピー、

b. miR-128標的配列の1つ以上のコピー、miR-219a標的配列の1つ以上のコピー、及びmiR-122標的配列の1つ以上のコピー、

c. miR-128標的配列の1つ以上のコピー、miR-204標的配列の1つ以上のコピー、及びmiR-219標的配列の1つ以上のコピー、または

d. miR-217標的配列の1つ以上のコピー、miR-137標的配列の1つ以上のコピー、及びmiR-126標的配列の1つ以上のコピーを含む、

請求項26に記載のLNP。

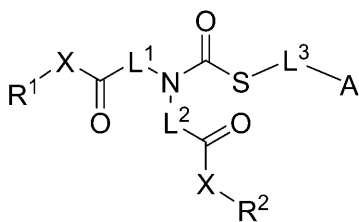
【請求項28】

前記LNPが、カチオン性脂質、ヘルパー脂質、構造脂質、及びPEG脂質を含む、請求項1～27のいずれか1項に記載のLNP。

【請求項29】

前記カチオン性脂質が、式(I)の化合物：

【化101】



式(I)

またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物であり、式中、

Aは、 $-N(CH_2R^{N1})(CH_2R^{N2})$ 、または少なくとも1つのNを含む4～7員ヘテロシクリル環であり、前記4～7員ヘテロシクリル環は、0～6つの R^3 で場合により置換されており、

各Xは、独立的に、 $-O-$ 、 $-N(R^1)-$ 、または $-N(R^2)-$ であり、

R^1 は、場合により置換されている C_1-C_{31} 脂肪族及びステロイジルからなる群から選択され、

R^2 は、場合により置換されている C_1-C_{31} 脂肪族及びステロイジルからなる群から選択され、

R^3 は、場合により置換されている C_1-C_6 脂肪族であり、

R^{N1} 及び R^{N2} は、各々独立的に、水素、ヒドロキシ- C_1-C_6 アルキル、 C_2-C_6 アルケニル、または C_3-C_7 シクロアルキルであり、

L^1 は、場合により置換されている C_1-C_{20} アルキレン鎖、及び二価で場合により置換されている C_2-C_{20} アルケニレン鎖からなる群から選択され、

L^2 は、場合により置換されている C_1-C_{20} アルキレン鎖、及び二価で場合により

置換されている $C_2 - C_{20}$ アルケニレン鎖からなる群から選択され、

L^3 は結合、場合により置換されている $C_1 - C_6$ アルキレン鎖、または二価で場合により置換されている $C_3 - C_7$ シクロアルキレンであるが、

ただし、 A が $-N(CH_3)(CH_3)$ であり、 X が O であるとき、 L^3 は $C_1 - C_6$ アルキレン鎖ではないことを条件とする、

請求項 28 に記載の LNP 。

【請求項 30】

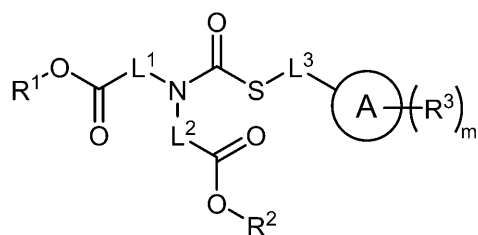
チオレートの S と A に含まれる最も近い N との間の炭素原子の数が $2 \sim 4$ である、請求項 29 に記載の LNP 。

【請求項 31】

前記カチオン性脂質が、式 (I-a) の化合物：

【化 102】

10



20

式 (I-a)

またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物であり、式中、

m は $0, 1, 2, 3, 4, 5$ 、または 6 である、

請求項 29 または 30 に記載の LNP 。

【請求項 32】

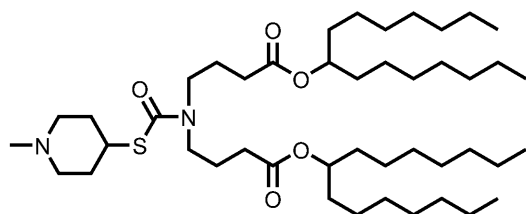
A が、場合により置換されている $5 \sim 6$ 員ヘテロシクリル環である、請求項 29 ～ 31 のいずれか 1 項に記載の LNP 。

【請求項 33】

前記カチオン性脂質が、

【化 103】

30



またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物である、請求項 29 に記載の LNP

40

【請求項 34】

前記カチオン性脂質が、 $DLinDMA$ 、 $DLin-KC2-DMA$ 、 $DLin-MC3-DMA$ ($MC3$)、 $COATSOME$ (登録商標) $SS-LC$ (旧名： $SS-18/4PE-13$)、 $COATSOME$ (登録商標) $SS-EC$ (旧名： $SS-33/4PE-15$)、 $COATSOME$ (登録商標) $SS-OC$ 、 $COATSOME$ (登録商標) $SS-OP$ 、ジ((Z)-ノナ-2-エン-1-イル)9-(4-ジメチルアミノ)ブタノイル)オキシ)ヘプタデカンジオエート ($L-319$)、または $N-(2,3-ジオレオイルオキシ)プロピル-N,N,N$ -トリメチルアンモニウムクロリド ($DOTAP$) から選択される、請求項 28 に記載の LNP 。

50

【請求項 35】

前記ヘルパー脂質が、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (DSPC)、1,2-ジラウロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン (DLPE)、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (DOPC)、及び1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン (DOPE) から選択される、請求項 28～34 のいずれか 1 項に記載の LNP。

【請求項 36】

前記カチオン性脂質が、1,2-ジオレオイル-3-トリメチルアンモニウム-プロパン (DOTAP) であり、前記ヘルパー脂質が、1,2-ジラウロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン (DLPE) または 1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン (DOPE) である、請求項 28 に記載の LNP。

10

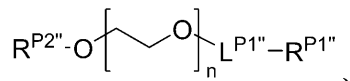
【請求項 37】

前記構造脂質がコレステロールである、請求項 28～36 のいずれか 1 項に記載の LNP。

【請求項 38】

前記 PEG 脂質が、式 (A'') の化合物：

【化 104】



20

式 (A'')

またはその薬学的に許容される塩であり、式中、

n は、すべての端点を含む 10～200 の整数であり、

$L^{P1''}$ は結合、 $-(CH_2)_{0-3}-C(O)O-$ 、 $-(CH_2)_{0-3}-C(O)O-(CH_2)_{1-3}-OC(O)-$ 、または $-C(O)N(H)-$ であり、

$R^{P1''}$ は、 C_5-C_{25} アルキルまたは C_5-C_{25} アルケニルであり、

$R^{P2''}$ は水素または $-CH_3$ であり、

前記 LNP が、約 0.001%～約 5% の PEG 脂質のモル比を有する、

30

請求項 28～37 のいずれか 1 項に記載の LNP。

【請求項 39】

$L^{P1''}$ は結合、 $-CH_2C(O)O-$ 、 $-CH_2CH_2C(O)O-$ 、 $-CH_2C(O)OCH_2C(O)O-$ 、 $-CH_2C(O)OCH_2CH_2OC(O)-$ 、または $-C(O)N(H)-$ である、請求項 38 に記載の LNP。

【請求項 40】

$L^{P1''}$ は結合である、請求項 38 に記載の LNP。

【請求項 41】

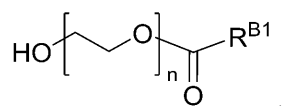
$R^{P2''}$ は水素である、請求項 38～40 のいずれか 1 項に記載の LNP。

【請求項 42】

40

前記 PEG 脂質が、式 (B) の化合物：

【化 105】



式 (B)

またはその薬学的に許容される塩であり、式中、

n は、すべての端点を含む 10～200 の整数であり、

50

R^{B1} は、 $C_5 - C_{25}$ アルキルまたは $C_5 - C_{25}$ アルケニルであり、
前記 LNP が、約 0.001% ~ 約 5% の PEG 脂質のモル比を有する、
請求項 28 ~ 37 のいずれか 1 項に記載の LNP。

【請求項 43】

前記 PEG 脂質が、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノール
アミン-N-[アミノ(ポリエチレングリコール)](DSPE-PEG)、1,2-ジ
パルミトイル-rac-グリセロールメトキシポリエチレングリコール(DPG-PEG)
)、1,2-ジステアロイル-rac-グリセロ-3-メチルポリオキシエチレン(DS
G-PEG)、1,2-ジステアロイル-rac-グリセロ-3-メチルポリオキシエチ
レン(DSG-PEG)、1,2-ジミリストイル-rac-グリセロ-3-メチルポリ
オキシエチレン(DMG-PEG)、及び 1,2-ジミリストイル-rac-グリセロ-
3-メチルポリオキシエチレン(DMG-PEG)、または 1,2-ジステアロイル-s
n-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[アミノ(ポリエチレングリコール)
](DSPE-PEG-アミン)から選択される、請求項 28 ~ 37 のいずれか 1 項に記
載の LNP。

10

【請求項 44】

前記 PEG 脂質が、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノール
アミン-N-[アミノ(ポリエチレングリコール)-5000](DSPE-PEG5K
)、1,2-ジパルミトイル-rac-グリセロールメトキシポリエチレングリコール-
2000(DPG-PEG2K)、1,2-ジステアロイル-rac-グリセロ-3-メ
チルポリオキシエチレン-5000(DSG-PEG5K)、1,2-ジステアロイル-
rac-グリセロ-3-メチルポリオキシエチレン-2000(DSG-PEG2K)、
1,2-ジミリストイル-rac-グリセロ-3-メチルポリオキシエチレン-5000
(DMG-PEG5K)、及び 1,2-ジミリストイル-rac-グリセロ-3-メチル
ポリオキシエチレン-2000(DMG-PEG2K)から選択される、請求項 28 ~ 3
7 のいずれか 1 項に記載の LNP。

20

【請求項 45】

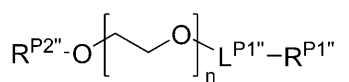
前記カチオン性脂質が COATSOME (登録商標) SS-OC を含み、前記ヘルパー
脂質が DSPC を含み、前記構造脂質がコレステロール(Chol)を含み、前記 PEG
脂質が DPG-PEG2000 を含む、請求項 28 に記載の LNP。

30

【請求項 46】

前記カチオン性脂質が COATSOME (登録商標) SS-OC を含み、前記ヘルパー
脂質が DSPC を含み、前記構造脂質がコレステロール(Chol)を含み、前記 PEG
脂質が、式(A'')の化合物：

【化 106】



式(A'')

40

またはその薬学的に許容される塩であり、式中、
n は、すべての端点を含む 10 ~ 200 の整数であり、
 $L^{P1''}$ は結合であり、
 $R^{P1''}$ は、 $C_5 - C_{25}$ アルキルまたは $C_5 - C_{25}$ アルケニルであり、
 $R^{P2''}$ は水素であり、
前記 LNP が、約 0.001% ~ 約 5% の PEG 脂質のモル比を有する、
請求項 28 に記載の LNP。

【請求項 47】

前記 PEG 脂質が、BRIJ (商標) S100、BRIJ (商標) S20、BRIJ (

50

商標) O 2 0、及び B R I J (商標) C 2 0 からなる群から選択される、請求項 2 8 ~ 3 7 及び 4 6 のいずれか 1 項に記載の L N P。

【請求項 4 8】

前記 P E G 脂質が B R I J (商標) S 1 0 0 である、請求項 2 8 ~ 3 7 及び 4 6 のいずれか 1 項に記載の L N P。

【請求項 4 9】

S S - O C : D S P C : C h o l : P E G 脂質の比率 (総脂質含有量に占めるパーセンテージとして) が A : B : C : D であり、 $A + B + C + D = 100\%$ であり、

a. $A = 40\% \sim 60\%$ 、 $B = 10\% \sim 25\%$ 、 $C = 20\% \sim 30\%$ 、及び $D = 0.01\% \sim 3\%$ 、

b. $A = 45\% \sim 50\%$ 、 $B = 20\% \sim 25\%$ 、 $C = 25\% \sim 30\%$ 、及び $D = 0.01\% \sim 1\%$ 、または

c. $A = \text{約 } 49\%$ 、 $B = \text{約 } 22\%$ 、 $C = \text{約 } 28\%$ 、及び $D = \text{約 } 0.5\%$ である、請求項 4 5 ~ 4 8 のいずれか 1 項に記載の L N P。

【請求項 5 0】

S S - O C : D S P C : C h o l : P E G 脂質の比率 (総脂質含有量に占めるパーセンテージとして) が A : B : C : D であり、 $A + B + C + D = 100\%$ であり、

a. $A = 40\% \sim 60\%$ 、 $B = 10\% \sim 30\%$ 、 $C = 20\% \sim 45\%$ 、及び $D = 0\% \sim 3\%$ 、

b. $A = 40\% \sim 60\%$ 、 $B = 10\% \sim 30\%$ 、 $C = 25\% \sim 45\%$ 、及び $D = 0.01\% \sim 3\%$ 、

c. $A = 45\% \sim 55\%$ 、 $B = 10\% \sim 20\%$ 、 $C = 30\% \sim 40\%$ 、及び $D = 1\% \sim 2\%$ 、

d. $A = 45\% \sim 50\%$ 、 $B = 10\% \sim 15\%$ 、 $C = 35\% \sim 40\%$ 、及び $D = 1\% \sim 2\%$ 、または

e. $A = \text{約 } 49\%$ 、 $B = \text{約 } 11\%$ 、 $C = \text{約 } 38\%$ 、及び $D = \text{約 } 1.5\%$ である、請求項 4 5 ~ 4 8 のいずれか 1 項に記載の L N P。

【請求項 5 1】

S S - O C : D S P C : C h o l : P E G 脂質の比率 (総脂質含有量に占めるパーセンテージとして) が約 A : B : C : D であり、 $A + B + C + D = 100\%$ であり、

a. $A = 45\% \sim 65\%$ 、 $B = 5\% \sim 20\%$ 、 $C = 20\% \sim 45\%$ 、及び $D = 0\% \sim 3\%$ 、

b. $A = 50\% \sim 60\%$ 、 $B = 5\% \sim 15\%$ 、 $C = 30\% \sim 45\%$ 、及び $D = 0.01\% \sim 3\%$ 、

c. $A = 55\% \sim 60\%$ 、 $B = 5\% \sim 15\%$ 、 $C = 30\% \sim 40\%$ 、及び $D = 1\% \sim 2\%$ 、

d. $A = 55\% \sim 60\%$ 、 $B = 5\% \sim 10\%$ 、 $C = 30\% \sim 35\%$ 、及び $D = 1\% \sim 2\%$ 、または

e. $A = \text{約 } 58\%$ 、 $B = \text{約 } 7\%$ 、 $C = \text{約 } 33\%$ 、及び $D = \text{約 } 1.5\%$ である、請求項 4 5 ~ 4 8 のいずれか 1 項に記載の L N P。

【請求項 5 2】

脂質ナノ粒子 (L N P) であって、

a. セネカバレーウイルス (S V V) をコードする合成 R N A ウイルスゲノム、ならびに

b. カチオン性脂質、ヘルパー脂質、構造脂質、及び P E G 脂質を含み、前記 P E G 脂質が、式 (A ") の化合物:

10

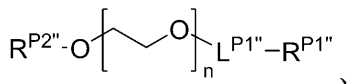
20

30

40

50

【化 1 0 7】



式 (A'')

またはその薬学的に許容される塩であり、式中、

n は、すべての端点を含む 10～200 の整数であり、

$L^{P1''}$ は結合、 $\text{---}[(\text{CH}_2)_{0-3}-\text{C}(\text{O})\text{O}]_{1-3}\text{---}$ 、 $\text{---}(\text{CH}_2)_{0-3}-\text{C}(\text{O})\text{O}-(\text{CH}_2)_{1-3}-\text{OC}(\text{O})\text{---}$ 、または $\text{---}\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{H})\text{---}$ であり、

$R^{P1''}$ は、 C_5-C_{25} アルキルまたは C_5-C_{25} アルケニルであり、

$R^{P2''}$ は水素または ---CH_3 であり、

前記 LNP が、約 0.001%～約 5% の PEG 脂質のモル比を有する、

前記脂質ナノ粒子 (LNP)。

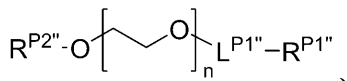
【請求項 53】

脂質ナノ粒子 (LNP) であって、

a. コクサッキーウイルスをコードする合成 RNA ウイルスゲノム、ならびに

b. カチオン性脂質、ヘルパー脂質、構造脂質、及び PEG 脂質を含み、前記 PEG 脂質が、式 (A'') の化合物：

【化 1 0 8】



式 (A'')

またはその薬学的に許容される塩であり、式中、

n は、すべての端点を含む 10～200 の整数であり、

$L^{P1''}$ は結合、 $\text{---}[(\text{CH}_2)_{0-3}-\text{C}(\text{O})\text{O}]_{1-3}\text{---}$ 、 $\text{---}(\text{CH}_2)_{0-3}-\text{C}(\text{O})\text{O}-(\text{CH}_2)_{1-3}-\text{OC}(\text{O})\text{---}$ 、または $\text{---}\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{H})\text{---}$ であり、

$R^{P1''}$ は、 C_5-C_{25} アルキルまたは C_5-C_{25} アルケニルであり、

$R^{P2''}$ は水素または ---CH_3 であり、

前記 LNP が、約 0.001%～約 5% の PEG 脂質のモル比を有する、

前記脂質ナノ粒子 (LNP)。

【請求項 54】

R^1 は、 $\text{C}_{16}-\text{C}_{18}$ アルキルまたは $\text{C}_{16}-\text{C}_{18}$ アルケニルである、請求項 52 または 53 に記載の LNP。

【請求項 55】

$L^{P1''}$ は結合、 $\text{---CH}_2\text{C}(\text{O})\text{O}\text{---}$ 、 $\text{---CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{O}\text{---}$ 、 $\text{---CH}_2\text{C}(\text{O})\text{OCH}_2\text{C}(\text{O})\text{O}\text{---}$ 、 $\text{---CH}_2\text{C}(\text{O})\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})\text{---}$ 、または $\text{---}\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{H})\text{---}$ である、請求項 52～54 のいずれか 1 項に記載の LNP。

【請求項 56】

$L^{P1''}$ は結合である、請求項 52～54 のいずれか 1 項に記載の LNP。

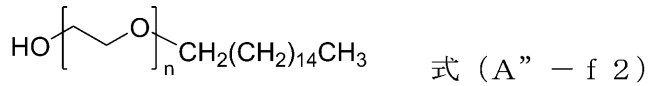
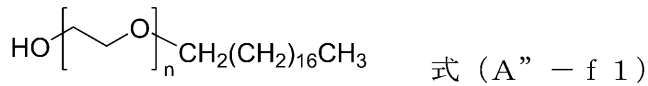
【請求項 57】

$R^{P2''}$ は水素である、請求項 52～56 のいずれか 1 項に記載の LNP。

【請求項 58】

前記 PEG 脂質は、式 (A''-f1)、式 (A''-f2)、もしくは式 (A''-f3) の化合物：

【化 1 0 9】



10

またはその薬学的に許容される塩である、請求項 5 2 または 5 3 に記載の方法。

【請求項 5 9】

脂質ナノ粒子 (LNP) であって、

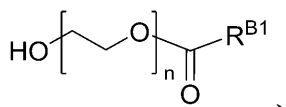
a. セネカバレーウイルス (SVV) をコードする合成 RNA ウイルスゲノム、ならびに

b. カチオン性脂質、ヘルパー脂質、構造脂質、及び PEG 脂質を含み、前記 PEG 脂質が、

式 (B) の化合物：

20

【化 1 1 0】



式 (B)

またはその薬学的に許容される塩であり、式中、

n は、すべての端点を含む 1 0 ~ 2 0 0 の整数であり、

R^{B1} は、C₅ - C₂₅ アルキルまたは C₅ - C₂₅ アルケニルであり、

30

前記 LNP が、約 0. 0 0 1 % ~ 約 5 % の PEG 脂質のモル比を有する、

前記脂質ナノ粒子 (LNP) 。

【請求項 6 0】

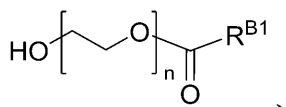
脂質ナノ粒子 (LNP) であって、

a. コクサッキーウイルスをコードする合成 RNA ウイルスゲノム、ならびに

b. カチオン性脂質、ヘルパー脂質、構造脂質、及び PEG 脂質を含み、前記 PEG 脂質が、

式 (B) の化合物：

【化 1 1 1】



式 (B)

40

またはその薬学的に許容される塩であり、式中、

n は、すべての端点を含む 1 0 ~ 2 0 0 の整数であり、

R^{B1} は、C₅ - C₂₅ アルキルまたは C₅ - C₂₅ アルケニルであり、

前記 LNP が、約 0. 0 0 1 % ~ 約 5 % の PEG 脂質のモル比を有する、

前記脂質ナノ粒子 (LNP) 。

50

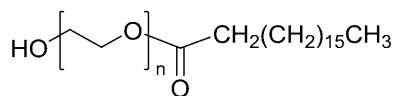
【請求項 6 1】

R¹ は、C₁₅ - C₁₇ アルキルまたは C₁₅ - C₁₇ アルケニルである、請求項 5 9 または 6 0 に記載の L N P。

【請求項 6 2】

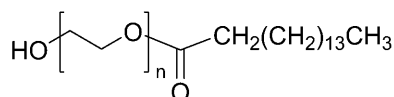
前記 P E G 脂質は、式 (B - a) もしくは式 (B - b) の化合物：

【化 1 1 2】



式 (B - a)

10



式 (B - b)

またはその薬学的に許容される塩である、請求項 5 9 または 6 0 に記載の L N P。

【請求項 6 3】

n は、平均で約 2 0、約 4 0、約 5 0、または約 1 0 0 である、請求項 5 2 ~ 6 2 のいずれか 1 項に記載の L N P。

【請求項 6 4】

n は、平均で約 1 0 0 である、請求項 5 2 ~ 6 2 のいずれか 1 項に記載の L N P。

20

【請求項 6 5】

前記 P E G 脂質が、約 2 0 0 ダルトン ~ 約 1 0, 0 0 0 ダルトン、約 5 0 0 ダルトン ~ 約 7, 0 0 0 ダルトン、または約 8 0 0 ダルトン ~ 約 6, 0 0 0 ダルトンの平均分子量を有する P E G 部分を含む、請求項 5 2 ~ 6 4 のいずれか 1 項に記載の L N P。

【請求項 6 6】

前記 P E G 脂質が、HO - P E G 1 0 0 - CH₂ (CH₂)₁₆ CH₃、HO - P E G 2 0 - CH₂ (CH₂)₁₄ CH₃、HO - P E G 2 0 - C₁₈ H₃₅、HO - P E G 1 0 0 - C (O) - CH₂ (CH₂)₁₃ CH₃、HO - P E G 5 0 - C (O) - CH₂ (CH₂)₁₃ CH₃、HO - P E G 4 0 - C (O) - CH₂ (CH₂)₁₃ CH₃、HO - P E G 1 0 0 - C (O) - CH₂ (CH₂)₁₅ CH₃、HO - P E G 4 0 - C (O) - CH₂ (CH₂)₁₅ CH₃、及び HO - P E G 5 0 - C (O) - CH₂ (CH₂)₁₅ CH₃ からなる群から選択される、請求項 5 2 ~ 6 5 のいずれか 1 項に記載の L N P。

30

【請求項 6 7】

前記 L N P が、前記式 (A ") の P E G 脂質及び / または式 (I) のイオン化可能な脂質を欠いている対照 L N P と比較して低減した免疫応答を *in vivo* で誘導し、場合により、前記対照 L N P 中の P E G 脂質は P E G 2 K - D P G または P E G 2 K - D M G である、請求項 5 2 ~ 6 6 のいずれか 1 項に記載の L N P。

【請求項 6 8】

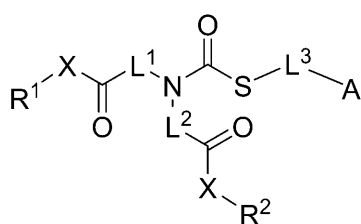
前記免疫応答が、前記 L N P の加速血液クリアランス (A B C) 及び / または抗 P E G I g M 応答である、請求項 6 7 に記載の L N P。

40

【請求項 6 9】

前記カチオン性脂質が、式 (I) の化合物：

【化 1 1 3】



式 (I)

10

またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物であり、式中、

A は、 $-N(CH_2R^{N1})(CH_2R^{N2})$ 、または少なくとも 1 つの N を含む 4 ～ 7 員ヘテロシクリル環であり、前記 4 ～ 7 員ヘテロシクリル環は、0 ～ 6 つの R^3 で場合により置換されており、

各 X は、独立的に、 $-O-$ 、 $-N(R^1)-$ 、または $-N(R^2)-$ であり、

R^1 は、場合により置換されている $C_1 - C_{31}$ 脂肪族及びステロイジルからなる群から選択され、

R^2 は、場合により置換されている $C_1 - C_{31}$ 脂肪族及びステロイジルからなる群から選択され、

20

R^3 は、場合により置換されている $C_1 - C_6$ 脂肪族であり、

R^{N1} 及び R^{N2} は、各々独立的に、水素、ヒドロキシ- $C_1 - C_6$ アルキル、 $C_2 - C_6$ アルケニル、または $C_3 - C_7$ シクロアルキルであり、

L^1 は、場合により置換されている $C_1 - C_{20}$ アルキレン鎖、及び二価で場合により置換されている $C_2 - C_{20}$ アルケニレン鎖からなる群から選択され、

L^2 は、場合により置換されている $C_1 - C_{20}$ アルキレン鎖、及び二価で場合により置換されている $C_2 - C_{20}$ アルケニレン鎖からなる群から選択され、

L^3 は結合、場合により置換されている $C_1 - C_6$ アルキレン鎖、または二価で場合により置換されている $C_3 - C_7$ シクロアルキレンであるが、

ただし、A が $-N(CH_3)(CH_3)$ であり、X が O であるとき、 L^3 は $C_1 - C_6$ アルキレン鎖ではないことを条件とする、

30

請求項 52 ～ 68 のいずれか 1 項に記載の LNP。

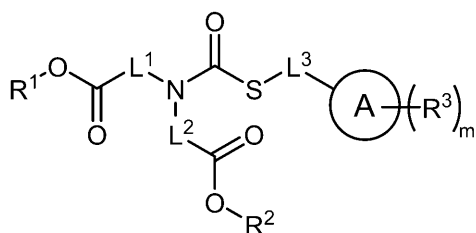
【請求項 70】

チオレートの S と A に含まれる最も近い N との間の炭素原子の数が 2 ～ 4 である、請求項 69 に記載の LNP。

【請求項 71】

前記カチオン性脂質が、式 (I-a) の化合物：

【化 1 1 4】



式 (I-a)

40

またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物であり、式中、

m は 0、1、2、3、4、5、または 6 である、

50

請求項 69 または 70 に記載の LNP。

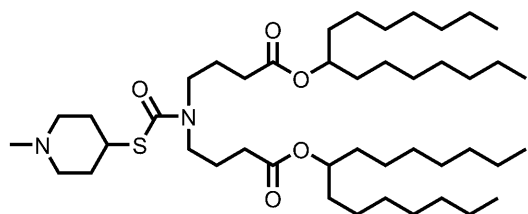
【請求項 72】

A が、場合により置換されている 5～6 員ヘテロシクリル環である、請求項 69～71 のいずれか 1 項に記載の LNP。

【請求項 73】

前記カチオン性脂質が、

【化 115】



10

またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物である、請求項 69 に記載の LNP。

【請求項 74】

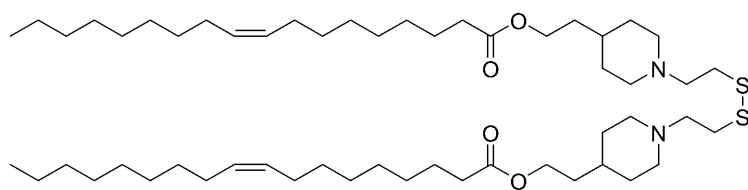
前記カチオン性脂質が、DLinDMA、DLin-KC2-DMA、DLin-MC3-DMA (MC3)、COATSOME (登録商標) SS-LC (旧名: SS-18/4PE-13)、COATSOME (登録商標) SS-EC (旧名: SS-33/4PE-15)、COATSOME (登録商標) SS-OC、COATSOME (登録商標) SS-OP、ジ((Z)-ノナ-2-エン-1-イル)9-((4-ジメチルアミノ)ブタノイル)オキシ)ヘプタデカンジオエート(L-319)、N-(2,3-ジオレオイルオキシ)プロピル)-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド(DOTAP)、またはそれらの混合物から選択される、請求項 52～68 のいずれか 1 項に記載の LNP。

20

【請求項 75】

前記カチオン性脂質が、式(II-1a)の化合物:

【化 116】

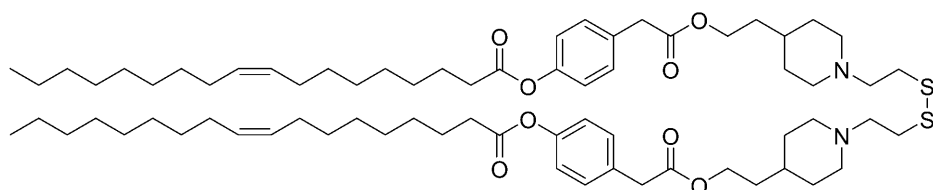


式(II-1a)、

30

または式(II-2a)の化合物:

【化 117】



式(II-2a)

40

である、請求項 52～68 のいずれか 1 項に記載の LNP。

【請求項 76】

前記カチオン性脂質が式(II-1a)の化合物であり、前記構造脂質がコレステロー

50

ルであり、前記ヘルパー脂質がDSPCであり、前記PEG脂質がBRIJ（商標）S100である、請求項52～75のいずれか1項に記載のLNP。

【請求項77】

前記カチオン性脂質が式（II-1a）の化合物であり、前記構造脂質がコレステロールであり、前記ヘルパー脂質がDSPCであり、前記PEG脂質がMYRJ（商標）S100、MYRJ（商標）S50、またはMYRJ（商標）S40である、請求項52～75のいずれか1項に記載のLNP。

【請求項78】

前記LNPが、約0.1%～約2%のモル比のPEG脂質、例えば約0.2%～約0.8mol%、約0.4%～約0.6mol%、約0.7%～約1.3%、または約1.2%～約1.8%のPEG脂質を含む、請求項52～77のいずれか1項に記載のLNP。

10

【請求項79】

前記LNPが、約0.2%～約0.8%、または約0.5%のモル比のPEG脂質を含む、請求項52～78のいずれか1項に記載のLNP。

【請求項80】

前記LNPが、約1.2%～約1.8%、または約1.5%のモル比のPEG脂質を含む、請求項52～78のいずれか1項に記載のLNP。

【請求項81】

前記LNPが、約44%～約54%のカチオン性脂質、約19%～約25%のヘルパー脂質、約24%～約33%の構造脂質、及び約0.2%～約0.8%のPEG脂質のモル比を有する、請求項52～80のいずれか1項に記載のLNP。

20

【請求項82】

前記LNPが、式（II-1a）の化合物と、コレステロールと、DSPCと、HO-PEG100-CH₂(CH₂)₁₆CH₃、HO-PEG20-CH₂(CH₂)₁₆CH₃、HO-PEG20-CH₂(CH₂)₁₄CH₃、HO-PEG20-C₁₈H₃₅、HO-PEG100-C(O)-CH₂(CH₂)₁₃CH₃、HO-PEG50-C(O)-CH₂(CH₂)₁₃CH₃、HO-PEG40-C(O)-CH₂(CH₂)₁₃CH₃、HO-PEG100-C(O)-CH₂(CH₂)₁₅CH₃、HO-PEG40-C(O)-CH₂(CH₂)₁₅CH₃、及びHO-PEG50-C(O)-CH₂(CH₂)₁₅CH₃から選択されるPEG脂質とを含み、式（II-1a）の化合物：コレステロール：DSPC：PEG脂質のモル比が、49：28.5：22：0.5である、請求項52～81のいずれか1項に記載のLNP。

30

【請求項83】

前記LNPが、式（II-1a）の化合物と、コレステロールと、DSPCと、HO-PEG100-CH₂(CH₂)₁₆CH₃、HO-PEG20-CH₂(CH₂)₁₆CH₃、HO-PEG20-CH₂(CH₂)₁₄CH₃、HO-PEG20-C₁₈H₃₅、HO-PEG100-C(O)-CH₂(CH₂)₁₃CH₃、HO-PEG50-C(O)-CH₂(CH₂)₁₃CH₃、HO-PEG40-C(O)-CH₂(CH₂)₁₃CH₃、HO-PEG100-C(O)-CH₂(CH₂)₁₅CH₃、HO-PEG40-C(O)-CH₂(CH₂)₁₅CH₃、及びHO-PEG50-C(O)-CH₂(CH₂)₁₅CH₃から選択されるPEG脂質とを含み、式（II-1a）の化合物：コレステロール：DSPC：PEG脂質のモル比が、49：27.5：22：1.5である、請求項52～81のいずれか1項に記載のLNP。

40

【請求項84】

前記LNPが、式（II-1a）の化合物と、コレステロールと、DSPCと、HO-PEG100-CH₂(CH₂)₁₆CH₃、HO-PEG20-CH₂(CH₂)₁₆CH₃、HO-PEG20-CH₂(CH₂)₁₄CH₃、HO-PEG20-C₁₈H₃₅、HO-PEG100-C(O)-CH₂(CH₂)₁₃CH₃、HO-PEG50-C(O)-CH₂(CH₂)₁₃CH₃、HO-PEG40-C(O)-CH₂(CH₂)₁₃CH₃、HO-PEG100-C(O)-CH₂(CH₂)₁₅CH₃、HO-PEG

50

40-C(O)-CH₂(CH₂)₁₅CH₃、及びHO-PEG50-C(O)-CH₂(CH₂)₁₅CH₃から選択されるPEG脂質とを含み、式(II-1a)の化合物：コレステロール：DSPC：PEG脂質のモル比が、49：38.5：11：1.5である、請求項52～81のいずれか1項に記載のLNP。

【請求項85】

前記LNPが、約1～約25の脂質窒素対リン酸(N:P)比を有する、請求項52～84のいずれか1項に記載のLNP。

【請求項86】

前記LNPが、約14のN:P比を有する、請求項52～85のいずれか1項に記載のLNP。

【請求項87】

ヒアルロナンが、前記LNPの表面にコンジュゲートされている、請求項1～86のいずれか1項に記載のLNP。

【請求項88】

請求項1～87のいずれか1項に記載の複数の脂質ナノ粒子を含む医薬組成物。

【請求項89】

前記複数のLNPが、約50nm～約500nm、約150nm～約500nm、約200nm～約500nm、約300nm～約500nm、約350nm～約500nm、約400nm～約500nm、約425nm～約500nm、約450nm～約500nm、または約475nm～約500nmの平均直径を有する、請求項88に記載の医薬組成物。

【請求項90】

前記複数のLNPが、約50nm～約120nmの平均直径を有する、請求項88に記載の医薬組成物。

【請求項91】

前記複数のLNPが、約50nm、60nm、70nm、80nm、90nm、100nm、110nm、または約120nmの平均直径を有する、請求項88に記載の医薬組成物。

【請求項92】

前記複数のLNPが、約100nmの平均直径を有する、請求項88に記載の医薬組成物。

【請求項93】

前記複数のLNPが、約40mV～約-40mV、約20mV～約-20mV、約10mV～約-10mV、約5mV～約-5mV、または約20mV～約-40mVの平均ゼータ電位を有する、請求項88～92のいずれか1項に記載の医薬組成物。

【請求項94】

前記複数のLNPが、約5mV未満、約0mV未満、約-5mV未満、約-10mV未満、約-20mV未満、約-30mV未満、約-35mV未満、または約-40mV未満の平均ゼータ電位を有する、請求項88～92のいずれか1項に記載の医薬組成物。

【請求項95】

前記複数のLNPが、約-50mV～約-20mV、約-40mV～約-20mV、約-30mV～約-10mV、約-20mV～約0mV、約-15mV～約5mV、または約-10mV～約10mVの平均ゼータ電位を有する、請求項88～92のいずれか1項に記載の医薬組成物。

【請求項96】

前記複数のLNPが、約-30mV、約-31mV、約-32mV、約-33mV、約-34mV、約-35mV、約-36mV、約-37mV、約-38mV、約-39mV、または約-40mVの平均ゼータ電位を有する、請求項94または95に記載の医薬組成物。

【請求項97】

10

20

30

40

50

前記医薬組成物を対象に投与すると、組換えRNAポリヌクレオチドが前記対象の標的細胞に送達され、前記組換えRNAポリヌクレオチドが、前記対象の前記標的細胞を溶解することができる感染性腫瘍溶解性ウイルスを産生する、請求項88～96のいずれか1項に記載の医薬組成物。

【請求項98】

前記標的細胞が、がん性細胞である、請求項97に記載の医薬組成物。

【請求項99】

前記組成物が、静脈内及び／または腫瘍内送達用に製剤化されている、請求項88～98のいずれか1項に記載の医薬組成物。

【請求項100】

前記組成物が、前記式(A'')のPEG脂質及び／または式(I)のイオン化可能な脂質を欠いている組成物のものよりも長いin vivo治療効果持続期間を有する、請求項88～99のいずれか1項に記載の医薬組成物。

【請求項101】

前記組成物が、約1時間以上、約2時間以上、約3時間以上、約4時間以上、約5時間以上、約6時間以上、約7時間以上、約8時間以上、約9時間以上、約10時間以上、約12時間以上、約14時間以上、約16時間以上、約18時間以上、約20時間以上、約25時間以上、約30時間以上、約35時間以上、約40時間以上、約45時間以上、または約50時間以上のin vivo治療効果持続期間を有する、請求項99または100に記載の医薬組成物。

【請求項102】

前記組成物が、所定の閾値を超えるまたはそれと等しいin vivoの半減期及び／またはAUCを有する、請求項99または100に記載の医薬組成物。

【請求項103】

前記LNPによる前記合成RNAウイルスゲノムのカプセル化効率が、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91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%である、請求項88～102のいずれか1項に記載の医薬組成物。

【請求項104】

前記組成物が、約10mM、約20mM、約30mM、約40mM、または約50mMの総脂質濃度を有する、請求項88～103のいずれか1項に記載の医薬組成物。

【請求項105】

前記組成物が、約2.5、約3、約3.5、約4、約4.5、約5、約5.5、または約6のpHで製剤化されている、請求項88～104のいずれか1項に記載の医薬組成物。

【請求項106】

前記組成物が複数投与用に製剤化されている、請求項88～105のいずれか1項に記載の医薬組成物。

【請求項107】

後続投与が、第1の投与の少なくとも3日後、少なくとも5日後、少なくとも7日後、少なくとも9日後、少なくとも11日後、少なくとも14日後、または少なくとも21日後に投与される、請求項106に記載の医薬組成物。

【請求項108】

薬学的に許容される担体をさらに含む、請求項88～107のいずれか1項に記載の医薬組成物。

【請求項109】

腫瘍溶解性コクサッキーウイルスをコードする合成RNAウイルスゲノムを含む組換えRNA分子であって、前記コクサッキーウイルスが、Kuykendall株、EF株、及びKY株から選択されるCVA21株である、前記組換えRNA分子。

【請求項 110】

前記コクサッキーウイルスが CVA21-KY 株であり、前記 CVA21-KY 株が、配列番号 5 による少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、または 100% の配列同一性を有するポリヌクレオチド配列を含む、請求項 109 に記載の組換え RNA 分子。

【請求項 111】

前記コクサッキーウイルスが CVA21-EF 株であり、前記 CVA21-EF 株が、配列番号 9 による少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、または 100% の配列同一性を有するポリヌクレオチド配列を含む、請求項 109 に記載の組換え RNA 分子。

10

【請求項 112】

前記コクサッキーウイルスが、配列番号 6 または 10 による少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、または 100% の配列同一性を有する 5' UTR (IRES) 配列を含む、請求項 109 に記載の組換え RNA 分子。

【請求項 113】

前記コクサッキーウイルスが、配列番号 7 または 11 による少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、または 100% の配列同一性を有する P1 配列を含む、請求項 109 に記載の組換え RNA 分子。

【請求項 114】

前記コクサッキーウイルスが、配列番号 8 または 12 による少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、または 100% の配列同一性を有する 3D 配列を含む、請求項 109 に記載の組換え RNA 分子。

20

【請求項 115】

前記合成 RNA ウイルスゲノムが、配列番号 1 による 95% 超、90% 超、85% 超、または 80% 超の配列同一性を有するポリヌクレオチド配列を含まない、請求項 109 ~ 114 のいずれか 1 項に記載の組換え RNA 分子。

【請求項 116】

前記組換え RNA 分子が、野生型コクサッキーウイルスウイルスのものとの 100% の配列同一性を有する RNA ウイルスゲノムを含まない、請求項 109 ~ 115 のいずれか 1 項に記載の組換え RNA 分子。

30

【請求項 117】

セネカバレーウイルス (SVV) をコードする合成 RNA ウイルスゲノムを含む組換え RNA 分子であって、前記 SVV が、キメラ SVV を含み、前記合成 RNA ウイルスゲノムが、配列番号 68 との少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、または 100% の配列同一性を有するポリヌクレオチド配列を含む、前記組換え RNA 分子。

【請求項 118】

前記腫瘍溶解性ウイルスをコードする前記ポリヌクレオチド配列に挿入されたマイクロ RNA (miRNA) 標的配列 (miR-TS) カセットをさらに含み、前記 miR-TS カセットが、1 つ以上の miRNA 標的配列を含み、細胞内の対応する前記 miRNA のうちの 1 つ以上の発現が、前記細胞内の前記コードされたウイルスの複製を阻害する、請求項 109 ~ 117 のいずれか 1 項に記載の組換え RNA 分子。

40

【請求項 119】

前記 1 つ以上の miRNA が、miR-124、miR-1、miR-143、miR-128、miR-219、miR-219a、miR-122、miR-204、miR-217、miR-137、miR-142、及び miR-126 から選択される、請求項 118 に記載の組換え RNA 分子。

【請求項 120】

前記 miR-TS カセットが、

a. miR-124 標的配列の 1 つ以上のコピー、miR-1 標的配列の 1 つ以上の

50

コピー、及びmiR-143標的配列の1つ以上のコピー、

b. miR-128標的配列の1つ以上のコピー、miR-219a標的配列の1つ以上のコピー、及びmiR-122標的配列の1つ以上のコピー、

c. miR-128標的配列の1つ以上のコピー、miR-204標的配列の1つ以上のコピー、及びmiR-219標的配列の1つ以上のコピー、または

d. miR-217標的配列の1つ以上のコピー、miR-137標的配列の1つ以上のコピー、及びmiR-126標的配列の1つ以上のコピーを含む、

請求項119に記載の組換えRNA分子。

【請求項121】

前記組換えRNA分子が、非ウイルス送達ビヒクルによって細胞に導入されると、複製可能な腫瘍溶解性ウイルスを産生することができる、請求項109～120のいずれか1項に記載の組換えRNA分子。 10

【請求項122】

前記細胞が、哺乳動物細胞である、請求項121に記載の組換えRNA分子。

【請求項123】

前記細胞が、哺乳動物対象に存在する哺乳動物細胞である、請求項122に記載の組換えRNA分子。

【請求項124】

前記1つ以上のmiR-TSカセットが、1つ以上のウイルス遺伝子の5'非翻訳領域(UTR)または3'UTRに組み込まれている、請求項118～123のいずれか1項に記載の組換えRNA分子。 20

【請求項125】

前記1つ以上のmiR-TSカセットが、1つ以上のウイルス遺伝子のオープンリーディングフレーム(ORF)、5'非翻訳領域(UTR)、または3'UTRに組み込まれている、請求項118～123のいずれか1項に記載の組換えRNA分子。

【請求項126】

前記組換えRNA分子が、核酸ベクターに挿入されている、請求項109～125のいずれかに記載の組換えRNA分子。

【請求項127】

前記核酸ベクターがレプリコンである、請求項126に記載の組換えRNA分子。 30

【請求項128】

前記合成RNAウイルスゲノムが、外因性パイロドタンパク質をコードする異種ポリヌクレオチドをさらに含む、請求項109～127に記載の組換えRNA分子。

【請求項129】

前記外因性パイロドタンパク質が、MLKL 4HBDドメイン、ガスダーミンDN末端断片、ガスダーミンEN末端断片、HMGB1 Box Bドメイン、SMAC/Diablo、メリチン、L-アミノ酸オキシダーゼ(LAAO)、ディスインテグリン、TRAIL(TNFSF10)、ニトロレダクターゼ、レオウイルスFASTタンパク質、レプチン/FOSL2、 α -1, 3-ガラクトシルトランスフェラーゼ、またはアデノシンデアミナーゼ2(ADA2)を含むまたはそれらからなる、請求項128に記載の組換えRNA分子。 40

【請求項130】

前記ニトロレダクターゼが、NfsBまたはNfsAである、請求項129に記載のLNP。

【請求項131】

前記レオウイルスFASTタンパク質が、ARV p14、BRV p15、またはp14-p15ハイブリッドである、請求項129に記載のLNP。

【請求項132】

前記外因性パイロドタンパク質が、蛍光タンパク質、酵素タンパク質、サイトカイン、ケモカイン、細胞表面受容体に結合することができる抗原結合分子、または細胞表面受 50

容体に結合することができるリガンドである、請求項 1 2 8 に記載の組換え RNA 分子。

【請求項 1 3 3】

a) 前記サイトカインが、GM-CSF、IFN γ 、IL-2、IL-7、IL-12、IL-18、IL-21、及び IL-36 γ から選択される、

b) 前記細胞表面受容体のリガンドが、Flt3 リガンドまたは TNFSF14 である、

c) 前記ケモカインが、CXCL10、CCL4、CCL21、及び CCL5 から選択される、

請求項 1 3 2 に記載の組換え RNA 分子。

【請求項 1 3 4】

前記抗原結合分子が、免疫チェックポイント受容体に結合してそれを阻害することができる、請求項 1 3 2 に記載の組換え RNA 分子。

【請求項 1 3 5】

前記免疫チェックポイント受容体が、PD-1 である、請求項 1 3 4 に記載の組換え RNA 分子。

【請求項 1 3 6】

前記抗原結合分子が、腫瘍抗原に結合することができる、請求項 1 3 2 に記載の組換え RNA 分子。

【請求項 1 3 7】

前記抗原結合分子が、二重特異性 T 細胞エンゲージャー分子 (BiTE) または二重特異性軽量 T 細胞エンゲージャー分子 (LiTE) である、請求項 1 3 6 に記載の組換え RNA 分子。

【請求項 1 3 8】

前記腫瘍抗原が、HBV-コア (B 型肝炎コア抗原)、HBV-pol、HbS-Ag、HPV E6、HPV E7、メルケル細胞ポリオーマラージ T 抗原、及びエプスタイン・バーウイルス抗原 EBNA2 または BZLF1 から選択されるウイルス抗原である、請求項 1 3 6 または 1 3 7 に記載の組換え RNA 分子。

【請求項 1 3 9】

前記腫瘍抗原が DLL3 または EpCAM である、請求項 1 3 6 または 1 3 7 に記載の組換え RNA 分子。

【請求項 1 4 0】

5' から 3' に、プロモーター配列、5' 接合部切断配列、合成 RNA ウイルスゲノムを含む RNA 分子をコードするポリヌクレオチド配列、ポリ A 尾部、及び 3' 接合部切断配列を含む組換え DNA 鑄型。

【請求項 1 4 1】

5' から 3' に、プロモーター配列、5' 接合部切断配列、合成 RNA ウイルスゲノムを含む RNA 分子をコードするポリヌクレオチド配列、ポリ A 尾部、及び 3' 接合部切断配列を含む組換え DNA 分子であって、前記 RNA 分子が、請求項 1 0 9 ~ 1 3 9 のいずれか 1 項から選択される、前記組換え DNA 分子。

【請求項 1 4 2】

前記プロモーター配列と前記 5' 接合部切断配列との間にリーダー配列を含む、請求項 1 4 0 または 1 4 1 に記載の組換え DNA 分子。

【請求項 1 4 3】

5' から 3' に、プロモーター配列、リーダー配列、5' 接合部切断配列、合成 RNA ウイルスゲノムを含む組換え RNA 分子をコードするポリヌクレオチド配列、ポリ A 尾部、及び 3' 接合部切断配列を含む組換え DNA 分子。

【請求項 1 4 4】

前記リーダー配列が、100 bp 未満の長さである、請求項 1 4 2 または 1 4 3 に記載の組換え DNA 分子。

【請求項 1 4 5】

10

20

30

40

50

前記プロモーター配列が、T7プロモーター配列である、請求項140～144のいずれか1項に記載の組換えDNA分子。

【請求項146】

前記ポリA尾部が、約50～90bpの長さまたは約65～75bpの長さである、請求項140～145のいずれか1項に記載の組換えDNA分子。

【請求項147】

前記ポリA尾部が、約70bpの長さである、請求項145に記載の組換えDNA分子。

【請求項148】

前記ポリA尾部が、約10～50bp、または25～35bpの長さである、請求項140～145のいずれか1項に記載の組換えDNA分子。 10

【請求項149】

前記5'接合部切断配列が、リボザイム配列を含むかまたはそれからなり、前記3'接合部切断配列が、リボザイム配列を含むかまたはそれからなる、請求項140～148のいずれか1項に記載の組換えDNA分子。

【請求項150】

前記5'リボザイム配列が、ハンマーヘッド型リボザイム配列であり、前記3'リボザイム配列が、デルタ肝炎ウイルスリボザイム配列である、請求項149に記載の組換えDNA分子。

【請求項151】 20

前記5'接合部切断配列が、RNAseHプライマー結合配列を含むかまたはそれからなり、前記3'接合部切断配列が、制限酵素認識配列を含むかまたはそれからなる、請求項140～148のいずれか1項に記載の組換えDNA分子。

【請求項152】

前記5'接合部切断配列が、リボザイム配列を含むかまたはそれからなり、前記3'接合部切断配列が、制限酵素認識配列を含むかまたはそれからなる、請求項140～148のいずれか1項に記載の組換えDNA分子。

【請求項153】

前記5'リボザイム配列が、ハンマーヘッド型リボザイム配列、ピストル型リボザイム配列、または修飾されたピストル型リボザイム配列を含むかまたはそれからなる、請求項152に記載の組換えDNA分子。 30

【請求項154】

前記3'接合部切断配列が、IIS型制限酵素認識配列を含むかまたはそれからなる、請求項140～153のいずれか1項に記載の組換えDNA分子。

【請求項155】

前記RNA分子が、コクサッキーウイルス(CVA)のRNAウイルスゲノムをコードする、請求項140～154のいずれか1項に記載の組換えDNA分子。

【請求項156】

前記コクサッキーウイルスがCVA21株である、請求項155に記載の組換えDNA分子。 40

【請求項157】

前記リーダー配列が、配列番号14または15による少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、または100%の配列同一性を有するポリヌクレオチド配列を含むかまたはそれからなる、請求項155または156に記載の組換えDNA分子。

【請求項158】

前記5'接合部切断配列が、配列番号18との少なくとも80%、少なくとも90%、または100%の配列同一性を有するピストル型リボザイム配列を含むかまたはそれからなり、前記5'リボザイム配列のP2モチーフが、「TTTT」のポリヌクレオチド配列を有する、請求項155～157のいずれか1項に記載の組換えDNA分子。 50

【請求項 159】

前記 5' 接合部切断配列が、配列番号 17 との少なくとも 80%、少なくとも 90%、または 100% の配列同一性を有するピストル型リボザイム配列を含むかまたはそれからなり、前記 5' リボザイム配列の P2 モチーフが、「TTTA」のポリヌクレオチド配列を有する、請求項 155～157 のいずれか 1 項に記載の組換え DNA 分子。

【請求項 160】

前記 3' 接合部切断配列が、BsmBI 認識配列を含むかまたはそれからなる、請求項 155～159 のいずれか 1 項に記載の組換え DNA 分子。

【請求項 161】

前記 3' 接合部切断配列が、BsaI 認識配列を含むかまたはそれからなる、請求項 155～159 のいずれか 1 項に記載の組換え DNA 分子。

10

【請求項 162】

前記プロモーター配列が、T7 プロモーター配列であり、前記リーダー配列が、配列番号 15 によるポリヌクレオチド配列からなり、前記 5' 接合部切断配列が、配列番号 18 によるピストル型リボザイム配列を含むかまたはそれからなり、前記ポリ A 尾部が、約 70 bp の長さであり、前記 3' 接合部切断配列が、BsmBI 認識配列を含むかまたはそれからなる、請求項 156 に記載の組換え DNA 分子。

【請求項 163】

前記プロモーター配列が、T7 プロモーター配列であり、前記リーダー配列が、配列番号 15 によるポリヌクレオチド配列からなり、前記 5' 接合部切断配列が、配列番号 18 によるピストル型リボザイム配列を含むかまたはそれからなり、前記ポリ A 尾部が、約 70 bp の長さであり、前記 3' 接合部切断配列が、BsaI 認識配列を含むかまたはそれからなる、請求項 156 に記載の組換え DNA 分子。

20

【請求項 164】

前記 RNA 分子が、セネカバレーウイルス (SVV) の RNA ウイルスゲノムをコードする、請求項 140～154 のいずれか 1 項に記載の組換え DNA 分子。

【請求項 165】

前記リーダー配列が、配列番号 53～63 のいずれか 1 つによる少なくとも 70%、少なくとも 80%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、または 100% の配列同一性を有するポリヌクレオチド配列を含むかまたはそれからなる、請求項 164 に記載の組換え DNA 分子。

30

【請求項 166】

前記リーダー配列が、配列番号 58 による少なくとも 70%、少なくとも 80%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、または 100% の配列同一性を有するポリヌクレオチド配列を含むかまたはそれからなる、請求項 164 に記載の組換え DNA 分子。

【請求項 167】

前記 5' リボザイム配列が、配列番号 64 または 65 との少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、または 100% の配列同一性を有するピストル型リボザイム配列であり、前記 5' リボザイム配列の P2 モチーフが、「TCAA」または「TTAA」のポリヌクレオチド配列を有する、請求項 164～166 のいずれか 1 項に記載の組換え DNA 分子。

40

【請求項 168】

前記 RNA ウイルスゲノムが、配列番号 68 の核酸 1～670 との少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、または 100% の配列同一性を有する 5' UTR (IRES) 配列を含む、請求項 164～167 のいずれか 1 項に記載の組換え DNA 分子。

【請求項 169】

前記 3' 接合部切断配列が、SapI 認識配列を含むかまたはそれからなる、請求項 164～168 のいずれか 1 項に記載の組換え DNA 分子。

【請求項 170】

50

前記プロモーター配列が、T7プロモーター配列であり、前記リーダー配列が、配列番号53によるポリヌクレオチド配列からなり、前記5'接合部切断配列が、配列番号64によるピストル型リボザイム配列を含むかまたはそれからなり、前記ポリA尾部が、約70bpの長さであり、前記3'接合部切断配列が、SapI認識配列を含むかまたはそれからなる、請求項164に記載の組換えDNA分子。

【請求項171】

前記プロモーター配列が、T7プロモーター配列であり、前記リーダー配列が、配列番号58によるポリヌクレオチド配列からなり、前記5'接合部切断配列が、配列番号64によるピストル型リボザイム配列を含むかまたはそれからなり、前記ポリA尾部が、約70bpの長さであり、前記3'接合部切断配列が、SapI認識配列を含むかまたはそれからなる、請求項164に記載の組換えDNA分子。

10

【請求項172】

前記組換えDNA分子が、前記プロモーター配列及び前記3'接合部切断配列にわたる領域内に追加の核酸を含まない、請求項140～171のいずれか1項に記載の組換えDNA分子。

【請求項173】

請求項140～172のいずれか1項に記載のDNA分子の*in vitro*転写、及び得られる組換えRNA分子の精製を含む、組換えRNA分子を産生する方法。

【請求項174】

前記組換えRNA分子が、前記合成RNAウイルスゲノムによってコードされる前記腫瘍溶解性ウイルスにとって天然である5'末端及び3'末端を含む、請求項173に記載の方法。

20

【請求項175】

有効量の請求項109～139のいずれか1項に記載の組換えRNA分子、及び哺乳動物対象への投与に好適な担体を含む組成物。

【請求項176】

請求項109～139のいずれか1項に記載の組換えRNA分子を含む粒子。

【請求項177】

前記粒子が生分解性である、請求項176に記載の粒子。

【請求項178】

前記粒子が、ナノ粒子、エクソソーム、リポソーム、及びリポプレックスからなる群から選択される、請求項177に記載の粒子。

30

【請求項179】

前記エクソソームが、無傷エクソソームまたは空のエクソソームに由来する修飾エクソソームである、請求項178に記載の粒子。

【請求項180】

請求項176～179のいずれか1項に記載の複数の粒子を含む医薬組成物。

【請求項181】

前記複数の粒子が、約50nm～約500nm、約150nm～約500nm、約200nm～約500nm、約300nm～約500nm、約350nm～約500nm、約400nm～約500nm、約425nm～約500nm、約450nm～約500nm、または約475nm～約500nmの平均サイズを有する、請求項180に記載の医薬組成物。

40

【請求項182】

前記複数の粒子が、約50nm～約120nmの平均サイズを有する、請求項180に記載の医薬組成物。

【請求項183】

前記複数の粒子が、約50nm、60nm、70nm、80nm、90nm、100nm、110nm、または約120nmの平均サイズを有する、請求項180に記載の医薬組成物。

50

【請求項 184】

前記複数の粒子が、約 100 nm の平均サイズを有する、請求項 180 に記載の医薬組成物。

【請求項 185】

前記複数の粒子が、約 40 mV ～ 約 - 40 mV、約 20 mV ～ 約 - 20 mV、約 10 mV ～ 約 - 10 mV、約 5 mV ～ 約 - 5 mV、または約 20 mV ～ 約 - 40 mV の平均ゼータ電位を有する、請求項 180 ～ 184 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 186】

前記複数の粒子が、約 5 mV 未満、約 0 mV 未満、約 - 5 mV 未満、約 - 10 mV 未満、約 - 20 mV 未満、約 - 30 mV 未満、約 - 35 mV 未満、または約 - 40 mV 未満の平均ゼータ電位を有する、請求項 180 ～ 184 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

10

【請求項 187】

前記複数の粒子が、約 - 50 mV ～ 約 - 20 mV、約 - 40 mV ～ 約 - 20 mV、約 - 30 mV ～ 約 - 10 mV、約 - 20 mV ～ 約 0 mV、約 - 15 mV ～ 約 5 mV、または約 - 10 mV ～ 約 10 mV の平均ゼータ電位を有する、請求項 180 ～ 186 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 188】

前記複数の粒子が、約 - 30 mV、約 - 31 mV、約 - 32 mV、約 - 33 mV、約 - 34 mV、約 - 35 mV、約 - 36 mV、約 - 37 mV、約 - 38 mV、約 - 39 mV、または約 - 40 mV の平均ゼータ電位を有する、請求項 180 ～ 186 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

20

【請求項 189】

前記組成物を対象に送達すると、カプセル化された組換え RNA 分子が標的細胞に送達され、前記カプセル化された組換え RNA 分子が、前記標的細胞を溶解することができる感染性ウイルスを産生する、請求項 180 ～ 188 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 190】

請求項 109 ～ 139 のいずれか 1 項に記載の組換え RNA 分子を含む無機粒子。

【請求項 191】

前記無機粒子が、金ナノ粒子 (GNP)、金ナノロッド (GNR)、磁性ナノ粒子 (MNP)、磁性ナノチューブ (MNT)、カーボンナノホーン (CNH)、カーボンフラーレン、カーボンナノチューブ (CNT)、リン酸カルシウムナノ粒子 (CPNP)、メソポーラスシリカナノ粒子 (MSN)、シリカナノチューブ (SNT)、または星状中空シリカナノ粒子 (SHNP) からなる群から選択される、請求項 190 に記載の無機粒子。

30

【請求項 192】

請求項 190 または 191 に記載の無機粒子を含む組成物であって、前記粒子の平均直径が、約 500 nm 未満であるか、約 50 nm ～ 500 nm であるか、約 250 nm ～ 約 500 nm であるか、または約 350 nm である、前記組成物。

【請求項 193】

ペイロード分子をコードする第 2 の組換え RNA 分子をさらに含む、請求項 1 ～ 87 のいずれか 1 項に記載の LNP、請求項 176 ～ 179 のいずれか 1 項に記載の粒子、または請求項 190 もしくは 191 に記載の無機粒子。

40

【請求項 194】

前記第 2 の組換え RNA 分子がレプリコンである、請求項 193 に記載の LNP、粒子、または無機粒子。

【請求項 195】

請求項 1 ～ 87 のいずれか 1 項に記載の LNP、請求項 176 ～ 179 のいずれか 1 項に記載の粒子、または請求項 190 もしくは 191 に記載の無機粒子を含む医薬組成物であって、前記組成物が静脈内及び／または腫瘍内送達用に製剤化されている、前記医薬組成物。

【請求項 196】

50

前記 L N P、前記粒子、または前記無機粒子の前記標的細胞が、がん性細胞である、請求項 1 9 5 に記載の医薬組成物。

【請求項 1 9 7】

がん性細胞を殺傷する方法であって、前記がん性細胞を、請求項 1 ～ 8 7、1 7 6 ～ 1 7 9、または 1 9 0 もしくは 1 9 1 のいずれか 1 項に記載の粒子、請求項 1 0 9 ～ 1 3 9 のいずれか 1 項に記載の組換え R N A 分子、あるいはそれらの組成物に、前記粒子を前記がん性細胞に細胞内送達するのに十分な条件下で曝露することを含み、カプセル化ポリヌクレオチドによって産生される前記複製可能なウイルスが、前記がん性細胞の殺傷をもたらす、前記方法。

【請求項 1 9 8】

前記複製可能なウイルスが、非がん性細胞で産生されない、請求項 1 9 7 に記載の方法。

【請求項 1 9 9】

前記方法が、*in vivo*、*in vitro*、または *ex vivo* で行われる、請求項 1 9 7 または 1 9 8 に記載の方法。

【請求項 2 0 0】

対象のがんを処置する方法であって、前記がん罹患している対象に、有効量の請求項 1 ～ 8 7、1 7 6 ～ 1 7 9、または 1 9 0 もしくは 1 9 1 のいずれか 1 項に記載の粒子、請求項 1 0 9 ～ 1 3 9 のいずれか 1 項に記載の組換え R N A 分子、あるいはそれらの組成物を投与することを含む、前記方法。

【請求項 2 0 1】

前記粒子またはその組成物が、静脈内に、鼻腔内に、腫瘍内に、腹腔内に、または吸入剤として投与される、請求項 2 0 0 に記載の方法。

【請求項 2 0 2】

前記粒子またはその組成物が、腫瘍内及び／または静脈内に投与される、請求項 2 0 0 に記載の方法。

【請求項 2 0 3】

前記粒子またはその組成物が、前記対象に繰り返し投与される、請求項 2 0 0 ～ 2 0 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 0 4】

前記対象が、マウス、ラット、ウサギ、ネコ、イヌ、ウマ、非ヒト霊長類、またはヒトである、請求項 2 0 0 ～ 2 0 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 0 5】

前記がんが、肺癌、乳癌、結腸癌、または膵臓癌であり、前記合成 R N A ウイルスゲノムが、K Y 株に由来するポリヌクレオチド配列を含む、請求項 2 0 0 ～ 2 0 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 2 0 6】

前記がんが、膀胱癌、腎細胞癌、卵巣癌、胃癌または肝臓癌であり、前記合成 R N A ウイルスゲノムが、E F 株に由来するポリヌクレオチド配列を含む、請求項 2 0 0 ～ 2 0 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 2 0 7】

前記がんが、肺癌、乳癌、卵巣癌、子宮頸癌、前立腺癌、精巣癌、大腸癌、結腸癌、膵臓癌、肝臓癌、腎細胞癌、胃癌、頭頸部癌、甲状腺癌、悪性神経膠腫、膠芽腫、メラノーマ、B 細胞慢性リンパ球性白血病、多発性骨髄腫、意義不明の単クローン性高ガンマグロブリン血症 (M G U S)、メルケル細胞癌、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (D L B C L)、肉腫、神経芽細胞腫、神経内分泌癌、横紋筋肉腫、髓芽腫、膀胱癌、及び辺縁帯リンパ腫 (M Z L) から選択される、請求項 1 9 7 ～ 2 0 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 0 8】

前記がんが、肺癌、乳癌、結腸癌、膵臓癌、膀胱癌、腎細胞癌、卵巣癌、胃癌、及び肝臓癌からなる群から選択される、請求項 1 9 7 ～ 2 0 4 のいずれかに記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 209】

前記がんが、腎細胞癌、肺癌、または肝臓癌である、請求項 197～204 のいずれかに記載の方法。

【請求項 210】

前記肺癌が、小細胞肺癌または非小細胞肺癌（例えば、肺扁平上皮癌または肺腺癌）である、請求項 205、207、または 208 に記載の方法。

【請求項 211】

前記肝臓癌が、肝細胞癌（HCC）（例えば、B 型肝炎ウイルス関連 HCC）である、請求項 206、207、及び 208 のいずれかに記載の方法。

【請求項 212】

前記前立腺癌が、処置下で発現した神経内分泌前立腺癌である、請求項 207 に記載の方法。

【請求項 213】

前記がんが、肺癌、肝臓癌、前立腺癌（例えば、CRPC-NE）、膀胱癌、膵臓癌、結腸癌、胃癌、乳癌、神経芽細胞腫、腎細胞癌、卵巣癌、横紋筋肉腫、髄芽腫、神経内分泌癌、メルケル細胞癌、またはメラノーマである、請求項 197～204 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 214】

前記がんが、小細胞肺癌（SCLC）または神経芽細胞腫である、請求項 197～204 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 215】

がんの処置を必要とする対象においてそれを行う方法であって、有効量の CVA21-EF ウイルスを前記対象に投与することを含む、前記方法。

【請求項 216】

がんの処置を必要とする対象においてそれを行う方法であって、有効量の CVA21-KY ウイルスを前記対象に投与することを含む、前記方法。

【請求項 217】

がんの処置を必要とする対象においてそれを行う方法であって、有効量の CVA21-Kuykendall ウイルスを前記対象に投与することを含む、前記方法。

【請求項 218】

前記ウイルスが、腫瘍内及び／または静脈内に投与される、請求項 215～217 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 219】

免疫チェックポイント阻害剤を前記対象に投与することをさらに含む、請求項 197～218 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 220】

前記免疫チェックポイント阻害剤が、PD-1 の阻害剤である、請求項 219 に記載の方法。

【請求項 221】

エンジニアリングされた抗原受容体を含むエンジニアリングされた免疫細胞を投与することをさらに含む、請求項 197～218 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 222】

がんの処置を必要とする対象においてそれを行う方法であって、治療有効量の、腫瘍溶解性コクサッキーウイルスであって、CVA21 株である前記コクサッキーウイルス、または前記 CVA21 をコードするポリヌクレオチドを前記対象に投与することを含み、前記がんが、ICAM-1 の発現及び／または ICAM-1 陽性がん細胞のパーセンテージに基づいて CVA21 感染感受性と分類される、前記方法。

【請求項 223】

がんの処置を必要とする対象においてそれを行う方法であって、

（a）前記がんにおける ICAM1 の発現レベル及び／または ICAM-1 陽性がん細胞

10

20

30

40

50

胞のパーセンテージを決定すること、

(b) 前記がんを、(a) で決定された I C A M-1 の前記発現及び／または I C A M-1 陽性がん細胞の前記パーセンテージに基づいて、コクサッキーウイルス 21 (C V A 21) 感染感受性と分類すること、ならびに

(c) 前記がんがステップ (b) で C V A 21 感染感受性と分類された場合、治療有効量の C V A 21 または前記 C V A 21 をコードするポリヌクレオチドを前記対象に投与すること

を含む、前記方法。

【請求項 224】

コクサッキーウイルス 21 (C V A 21) または前記 C V A 21 をコードするポリヌクレオチドによる処置のために、がん罹患している対象を選択する方法であって、

(a) 前記がんにおける I C A M-1 の発現レベル及び／または I C A M-1 陽性がん細胞のパーセンテージを決定すること、

(b) 前記がんを、(a) で決定された I C A M-1 の前記発現レベル及び／または I C A M-1 陽性がん細胞の前記パーセンテージに基づいて、C V A 21 感染感受性と分類すること、

(c) 前記がんが (b) で C V A 21 感染感受性と分類された場合、前記 C V A 21 または前記 C V A 21 をコードする前記ポリヌクレオチドによる処置のために前記対象を選択すること、ならびに

(d) 前記選択された対象に、前記 C V A 21 または前記 C V A 21 をコードする前記ポリヌクレオチドを投与すること

を含む、前記方法。

【請求項 225】

前記 C V A 21 株が C V A 21-K Y である、請求項 222～224 のいずれか 1 項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2021 年 1 月 6 日に提出された米国特許仮出願第 63/134,376 号、2021 年 2 月 10 日に提出された米国特許仮出願第 63/147,959 号、2021 年 4 月 29 日に提出された米国特許仮出願第 63/181,899 号、2021 年 4 月 29 日に提出された米国特許仮出願第 63/181,917 号、及び 2021 年 4 月 29 日に提出された米国特許仮出願第 63/181,663 号の利益を主張するものであり、これらの各々の内容は、全体として参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

電子提出されたテキストファイルの組み込み

本明細書と共に電子提出されたテキストファイルの内容は、全体として参照により本明細書に組み込まれる。配列表のコンピュータ可読形式のコピー（ファイル名：O N C R _ 0 2 3 _ 0 3 W O _ S e q L i s t _ S T 2 5 . t x t、作成日：2022 年 1 月 6 日、ファイルサイズ：約 524 キロバイト）。

【0003】

分野

本開示は概して、免疫学、炎症、及びがん治療の分野に関する。より詳細には、本開示は、腫瘍溶解性ウイルス株、ウイルスゲノム発現のための組換え DNA 分子の設計、及び粒子カプセル化ウイルスゲノムに関する。本開示はさらに、がんなどの増殖性障害の処置及び防止に関する。

【背景技術】

【0004】

背景

腫瘍溶解性ウイルスは、腫瘍細胞に感染してそれを溶解することができる溶解性ライフサイクルを備えた複製可能なウイルスである。直接的な腫瘍細胞溶解は、細胞死をもたらすだけでなく、局所的な抗原提示細胞によって取り込まれ提示される腫瘍抗原に対する自然免疫及び適応免疫の応答の生成ももたらす。したがって、腫瘍溶解性ウイルスは、直接的な細胞溶解、及びウイルスクリアランス後の抗腫瘍応答を維持できる抗原特異的適応応答の促進の両方を通じて、腫瘍細胞成長に対抗する。

【0005】

しかしながら、複製可能なウイルスの臨床使用は、いくつかの課題を提示する。一般に、ウイルス曝露は自然免疫経路を活性化し、幅広い非特異的な炎症応答を引き起こす。患者が以前にウイルスに曝露されていない場合、この最初の自然免疫応答は、適応性抗ウイルス応答の発生及び中和抗体の産生につながり得る。患者が以前にウイルスに曝露されている場合、既存の中和抗ウイルス抗体が、所望される溶解効果を妨げ得る。どちらの場合も、中和抗体の存在は、標的細胞のウイルス溶解を妨げるだけでなく、ウイルス治療薬の再投与を無効にする。これらの要因は、転移性がんの処置におけるウイルス治療薬の使用を制限する。これは、かかるがんの処置に必要な繰り返し全身投与の有効性が、天然に発生する抗ウイルス応答によって妨げられるためである。かかる障害の非存在下でさえ、非疾患性細胞におけるその後のウイルス複製は、周囲の細胞及び組織への実質的な疾患外の付随的損傷をもたらし得る。さらに、異なる腫瘍溶解性ウイルス株は、通常、がん細胞の殺傷において著しく異なるトロピズム及び効力を示す。

【0006】

当技術分野には、複製可能なウイルスの治療的使用、ウイルス及び対応する発現鑄型のエンジニアリング、ならびに異なる治療適応症のための適切なウイルス株の選択に関する組成物及び方法に対する、長年にわたり満たされていない必要性が残っている。本開示は、かかる組成物及び方法などを提供する。

【発明の概要】

【0007】

一態様において、本開示は、腫瘍溶解性コクサッキーウイルスウイルスをコードする合成RNAウイルスゲノムを含む脂質ナノ粒子(LNP)であって、コクサッキーウイルスが、EF株及びKY株から選択されるCVA21株である、脂質ナノ粒子(LNP)を提供する。いくつかの実施形態では、コクサッキーウイルスはCVA21-KY株であり、CVA21-KY株は、配列番号5との少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または100%の配列同一性を有するポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、コクサッキーウイルスはCVA21-EF株であり、CVA21-EF株は、配列番号9との少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または100%の配列同一性を有するポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、コクサッキーウイルスは、配列番号6または10との少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または100%の配列同一性を有する5'UTR(IRES)配列を含む。いくつかの実施形態では、コクサッキーウイルスは、配列番号7または11との少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または100%の配列同一性を有するP1配列を含む。いくつかの実施形態では、コクサッキーウイルスは、配列番号8または12との少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または100%の配列同一性を有する3D配列を含む。いくつかの実施形態では、合成RNAウイルスゲノムは、配列番号1との95%超、90%超、85%超、または80%超の配列同一性を有するポリヌクレオチド配列を含まない。

【0008】

一態様において、本開示は、腫瘍溶解性コクサッキーウイルスウイルスをコードする合成RNAウイルスゲノムを含む脂質ナノ粒子(LNP)であって、コクサッキーウイルスが、CVA21 Kuykendall株である、脂質ナノ粒子(LNP)を提供する。

【0009】

一態様において、本開示は、腫瘍溶解性セネカバレーウイルス（SVV）をコードする合成RNAウイルスゲノムを含む脂質ナノ粒子（LNP）であって、合成RNAウイルスゲノムが、配列番号68との少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または100%の配列同一性を有するポリヌクレオチド配列を含む、脂質ナノ粒子（LNP）を提供する。いくつかの実施形態では、合成RNAウイルスゲノムは、配列番号68の核酸1～670との少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または100%の配列同一性を有する5'UTR（IRES）配列を含む。いくつかの実施形態では、合成RNAウイルスゲノムは、S177A変異を含むSVV VP2タンパク質をコードする。

【0010】

いくつかの実施形態では、LNPを細胞に送達すると、細胞によるウイルス粒子の産生がもたらされ、ウイルス粒子は、感染性及び溶解性である。いくつかの実施形態では、合成RNAウイルスゲノムは、外因性ペイロードタンパク質をコードする異種ポリヌクレオチドをさらに含む。いくつかの実施形態では、LNPは、外因性ペイロードタンパク質をコードする第2の組換えRNA分子をさらに含む。

【0011】

いくつかの実施形態では、外因性ペイロードタンパク質は、MLKL 4HBDメイン、ガスダーミンD N末端断片、ガスダーミンE N末端断片、HMGB1 Box Bドメイン、SMAC/Diablo、メリチン、L-アミノ酸オキシダーゼ（LAO）、ディスインテグリン、TRAIL（TNFSF10）、ニトロレダクターゼ、レオウイルスFASTタンパク質、レプチン/FOSL2、 α -1, 3-ガラクトシルトランスフェラーゼ、またはアデノシンデアミナーゼ2（ADA2）を含むかまたはそれからなる。いくつかの実施形態では、ニトロレダクターゼは、NfsBまたはNfsAである。いくつかの実施形態では、レオウイルスFASTタンパク質は、ARV p14、BRV p15、またはp14-p15ハイブリッドである。いくつかの実施形態では、外因性ペイロードタンパク質は、蛍光タンパク質、酵素タンパク質、サイトカイン、ケモカイン、細胞表面受容体に結合することができる抗原結合分子、または細胞表面受容体のリガンドである。いくつかの実施形態では、サイトカインは、GM-CSF、IFN γ 、IL-2、IL-7、IL-12、IL-18、IL-21、及びIL-36 γ から選択される。いくつかの実施形態では、細胞表面受容体のリガンドは、Flt3リガンドまたはTNFSF14である。いくつかの実施形態では、ケモカインは、CXCL10、CCL4、CCL21、及びCCL5から選択される。いくつかの実施形態では、抗原結合分子は、免疫チェックポイント受容体に結合してそれを阻害することができる。いくつかの実施形態では、免疫チェックポイント受容体は、PD-1である。いくつかの実施形態では、抗原結合分子は、腫瘍抗原に結合することができる。いくつかの実施形態では、抗原結合分子は、二重特異性T細胞エンゲージャー分子（BiTE）または二重特異性軽量T細胞エンゲージャー分子（LiTE）である。いくつかの実施形態では、腫瘍抗原は、HBV-コア（B型肝炎コア抗原）、HBV-pol、HbS-Ag、HPV E6、HPV E7、メルケル細胞ポリオーマラージT抗原、及びエプスタイン・バーウイルス抗原EBNA2またはBZLF1から選択されるウイルス抗原である。いくつかの実施形態では、腫瘍抗原はDLL3またはEpCAMである。

【0012】

いくつかの実施形態では、合成RNAウイルスゲノム及び／または組換えRNA分子は、マイクロRNA（miRNA）標的配列（miR-TS）カセットを含み、miR-TSカセットが、1つ以上のmiRNA標的配列を含む。いくつかの実施形態では、1つ以上のmiRNAは、miR-124、miR-1、miR-143、miR-128、miR-219、miR-219a、miR-122、miR-204、miR-217、miR-137、miR-142、及びmiR-126から選択される。いくつかの実施形態では、miR-TSカセットは、

a. miR-124標的配列の1つ以上のコピー、miR-1標的配列の1つ以上の

10

20

30

40

50

コピー、及びmiR-143標的配列の1つ以上のコピー、

b. miR-128標的配列の1つ以上のコピー、miR-219a標的配列の1つ以上のコピー、及びmiR-122標的配列の1つ以上のコピー、

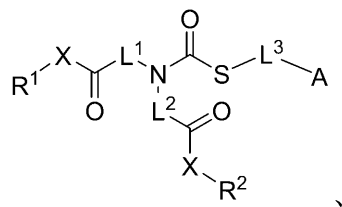
c. miR-128標的配列の1つ以上のコピー、miR-204標的配列の1つ以上のコピー、及びmiR-219標的配列の1つ以上のコピー、または

d. miR-217標的配列の1つ以上のコピー、miR-137標的配列の1つ以上のコピー、及びmiR-126標的配列の1つ以上のコピーを含む。

【0013】

いくつかの実施形態では、LNPは、カチオン性脂質、ヘルパー脂質、構造脂質、及びPEG脂質を含む。いくつかの実施形態では、カチオン性脂質は、式(I)の化合物：

【化1】



式(I)

またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物であり、式中、

Aは、-N(CH₂R^{N1})(CH₂R^{N2})、または少なくとも1つのNを含む4～7員ヘテロシクリル環であり、4～7員ヘテロシクリル環は、0～6つのR³で場合により置換されており、

各Xは、独立的に、-O-、-N(R¹)-、または-N(R²)-であり、

R¹は、場合により置換されているC₁-C₃₁脂肪族及びステロイジルからなる群から選択され、

R²は、場合により置換されているC₁-C₃₁脂肪族及びステロイジルからなる群から選択され、

R³は、場合により置換されているC₁-C₆脂肪族であり、

R^{N1}及びR^{N2}は、各々独立的に、水素、ヒドロキシ-C₁-C₆アルキル、C₂-C₆アルケニル、またはC₃-C₇シクロアルキルであり、

L¹は、場合により置換されているC₁-C₂₀アルキレン鎖、及び二価で場合により置換されているC₂-C₂₀アルケニレン鎖からなる群から選択され、

L²は、場合により置換されているC₁-C₂₀アルキレン鎖、及び二価で場合により置換されているC₂-C₂₀アルケニレン鎖からなる群から選択され、

L³は結合、場合により置換されているC₁-C₆アルキレン鎖、または二価で場合により置換されているC₃-C₇シクロアルキレンであるが、

ただし、Aが-N(CH₃)(CH₃)であり、XがOであるとき、L³はC₁-C₆アルキレン鎖ではないことを条件とする。

【0014】

いくつかの実施形態では、チオレートのSとAに含まれる最も近いNとの間の炭素原子の数が2～4である。いくつかの実施形態では、カチオン性脂質は、式(I-a)の化合物：

10

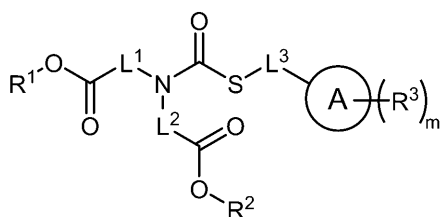
20

30

40

50

【化 2】



式 (I - a)

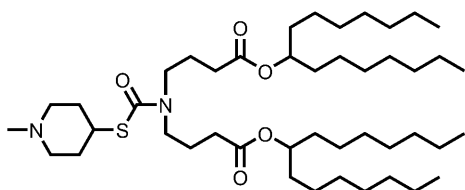
10

またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物であり、式中、
mは0、1、2、3、4、5、または6である。

【0015】

いくつかの実施形態では、Aは、場合により置換されている5～6員ヘテロシクリル環である。いくつかの実施形態では、カチオン性脂質は、

【化 3】



20

またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物である。

【0016】

いくつかの実施形態では、カチオン性脂質は、DLinDMA、DLin-KC2-DMA、DLin-MC3-DMA (MC3)、COATSOME (登録商標) SS-LC (旧名: SS-18/4PE-13)、COATSOME (登録商標) SS-EC (旧名: SS-33/4PE-15)、COATSOME (登録商標) SS-OC、COATSOME (登録商標) SS-OP、ジ((Z)-ノナ-2-エン-1-イル)9-((4-ジメチルアミノ)ブタノイル)オキシ)ヘプタデカンジオエート(L-319)、またはN-(2,3-ジオレオイルオキシ)プロピル)-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド(DOTAP)から選択される。

30

【0017】

いくつかの実施形態では、ヘルパー脂質は、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DSPC)、1,2-ジラウロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン(DLPE)、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DOPC)、及び1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン(DOPE)から選択される。

40

【0018】

いくつかの実施形態では、カチオン性脂質は、1,2-ジオレオイル-3-トリメチルアンモニウム-プロパン(DOTAP)であり、ヘルパー脂質は、1,2-ジラウロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン(DLPE)または1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン(DOPE)である。

【0019】

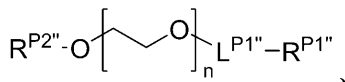
いくつかの実施形態では、構造脂質はコレステロールである。

【0020】

いくつかの実施形態では、PEG脂質は、式(A'')の化合物：

50

【化 4】



式 (A'')

またはその薬学的に許容される塩であり、式中、

n は、すべての端点を含む 10～200 の整数であり、

$L^{P1''}$ は結合、 $-(CH_2)_{0-3}-C(O)O-$ 、 $-(CH_2)_{0-3}-C(O)O-(CH_2)_{1-3}-OC(O)-$ 、または $-C(O)N(H)-$ であり、

$R^{P1''}$ は、 C_5-C_{25} アルキルまたは C_5-C_{25} アルケニルであり、

$R^{P2''}$ は水素または $-CH_3$ であり、

LNP は、約 0.001%～約 5% の PEG 脂質のモル比を有する。

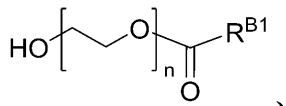
【0021】

いくつかの実施形態では、 $L^{P1''}$ は結合、 $-CH_2C(O)O-$ 、 $-CH_2CH_2C(O)O-$ 、 $-CH_2C(O)OCH_2C(O)O-$ 、 $-CH_2C(O)OCH_2CH_2OC(O)-$ 、または $-C(O)N(H)-$ である。

【0022】

いくつかの実施形態では、 $L^{P1''}$ は結合である。いくつかの実施形態では、 $R^{P2''}$ は水素である。いくつかの実施形態では、PEG 脂質は、式 (B) の化合物：

【化 5】



式 (B)

またはその薬学的に許容される塩であり、式中、

n は、すべての端点を含む 10～200 の整数であり、

R^{B1} は、 C_5-C_{25} アルキルまたは C_5-C_{25} アルケニルであり、

LNP は、約 0.001%～約 5% の PEG 脂質のモル比を有する。

【0023】

いくつかの実施形態では、PEG 脂質は、1,2-ジステアロイル- s_n -グリセロール-3-ホスホエタノールアミン-N-[アミノ(ポリエチレングリコール)] (DSPE-PEG)、1,2-ジパルミトイル- rac -グリセロールメトキシポリエチレングリコール (DPG-PEG)、1,2-ジステアロイル- rac -グリセロール-3-メチルポリオキシエチレン (DSG-PEG)、1,2-ジステアロイル- rac -グリセロール-3-メチルポリオキシエチレン (DSG-PEG)、1,2-ジミリストイル- rac -グリセロール-3-メチルポリオキシエチレン (DMG-PEG)、及び 1,2-ジミリストイル- rac -グリセロール-3-メチルポリオキシエチレン (DMG-PEG)、または 1,2-ジステアロイル- s_n -グリセロール-3-ホスホエタノールアミン-N-[アミノ(ポリエチレングリコール)] (DSPE-PEG-アミン) から選択される。

【0024】

いくつかの実施形態では、PEG 脂質は、1,2-ジステアロイル- s_n -グリセロール-3-ホスホエタノールアミン-N-[アミノ(ポリエチレングリコール)-5000] (DSPE-PEG5K)、1,2-ジパルミトイル- rac -グリセロールメトキシポリエチレングリコール-2000 (DPG-PEG2K)、1,2-ジステアロイル- rac -グリセロール-3-メチルポリオキシエチレン-5000 (DSG-PEG5K)、1,2-ジステアロイル- rac -グリセロール-3-メチルポリオキシエチレン-2000 (D

S G - P E G 2 K)、1, 2-ジミリスティル-r a c-グリセロ-3-メチルポリオキシエチレン-5 0 0 0 (D M G - P E G 5 K)、及び1, 2-ジミリスティル-r a c-グリセロ-3-メチルポリオキシエチレン-2 0 0 0 (D M G - P E G 2 K) から選択される。

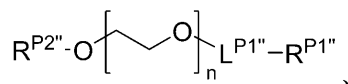
【0025】

いくつかの実施形態では、カチオン性脂質はC O A T S O M E (登録商標) S S - O C を含み、ヘルパー脂質はD S P Cを含み、構造脂質はコレステロール (C h o l) を含み、P E G 脂質はD P G - P E G 2 0 0 0を含む。

【0026】

いくつかの実施形態では、カチオン性脂質はC O A T S O M E (登録商標) S S - O C を含み、ヘルパー脂質はD S P Cを含み、構造脂質はコレステロール (C h o l) を含み、P E G 脂質は、式 (A'') の化合物：

【化6】



式 (A'')

またはその薬学的に許容される塩であり、式中、

nは、すべての端点を含む10～200の整数であり、

L^{P1''}は結合であり、

R^{P1''}は、C₅-C₂₅アルキルまたはC₅-C₂₅アルケニルであり、

R^{P2''}は水素であり、

L N Pは、約0.001%～約5%のP E G 脂質のモル比を有する。

【0027】

いくつかの実施形態では、P E G 脂質は、B R I J (商標) S 1 0 0、B R I J (商標) S 2 0、B R I J (商標) O 2 0、及びB R I J (商標) C 2 0からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、P E G 脂質はB R I J (商標) S 1 0 0である。

【0028】

いくつかの実施形態では、S S - O C : D S P C : C h o l : P E G 脂質の比率 (総脂質含有量に占めるパーセンテージとして) はA : B : C : Dであり、A + B + C + D = 100%であり、

e. A = 40%～60%、B = 10%～25%、C = 20%～30%、及びD = 0.01%～3%、

f. A = 45%～50%、B = 20%～25%、C = 25%～30%、及びD = 0.01%～1%、または

g. A = 約49%、B = 約22%、C = 約28%、及びD = 約0.5%である。

【0029】

いくつかの実施形態では、S S - O C : D S P C : C h o l : P E G 脂質の比率 (総脂質含有量に占めるパーセンテージとして) はA : B : C : Dであり、A + B + C + D = 100%であり、

h. A = 40%～60%、B = 10%～30%、C = 20%～45%、及びD = 0%～3%、

i. A = 40%～60%、B = 10%～30%、C = 25%～45%、及びD = 0.01%～3%、

j. A = 45%～55%、B = 10%～20%、C = 30%～40%、及びD = 1%～2%、

k. A = 45%～50%、B = 10%～15%、C = 35%～40%、及びD = 1%～2%、または

10

20

30

40

50

l. A = 約 49%、B = 約 11%、C = 約 38%、及び D = 約 1.5% である。

【0030】

いくつかの実施形態では、SS-OC: DSPC: Chol: PEG 脂質の比率（総脂質含有量に占めるパーセンテージとして）は約 A: B: C: D であり、A + B + C + D = 100% であり、

m. A = 45% ~ 65%、B = 5% ~ 20%、C = 20% ~ 45%、及び D = 0% ~ 3%、

n. A = 50% ~ 60%、B = 5% ~ 15%、C = 30% ~ 45%、及び D = 0.01% ~ 3%、

o. A = 55% ~ 60%、B = 5% ~ 15%、C = 30% ~ 40%、及び D = 1% ~ 2%、

p. A = 55% ~ 60%、B = 5% ~ 10%、C = 30% ~ 35%、及び D = 1% ~ 2%、または

q. A = 約 58%、B = 約 7%、C = 約 33%、及び D = 約 1.5% である。

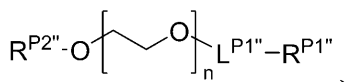
【0031】

一態様において、本開示は、脂質ナノ粒子（LNP）であって、

a. セネカバレーウイルス（SVV）をコードする合成 RNA ウイルスゲノム、ならびに

b. カチオン性脂質、ヘルパー脂質、構造脂質、及び PEG 脂質を含み、PEG 脂質が、式（A''）の化合物：

【化 7】



式（A''）

またはその薬学的に許容される塩であり、式中、

n は、すべての端点を含む 10 ~ 200 の整数であり、

$L^{P1''}$ は結合、 $\text{---}[(\text{CH}_2)_{0-3}-\text{C}(\text{O})\text{O}]_{1-3}\text{---}$ 、 $\text{---}(\text{CH}_2)_{0-3}-\text{C}(\text{O})\text{O}\text{---}(\text{CH}_2)_{1-3}-\text{OC}(\text{O})\text{---}$ 、または $\text{---}\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{H})\text{---}$ であり、

$R^{P1''}$ は、 $\text{C}_5\text{---}\text{C}_{25}$ アルキルまたは $\text{C}_5\text{---}\text{C}_{25}$ アルケニルであり、

$R^{P2''}$ は水素または ---CH_3 であり、

LNP が、約 0.001% ~ 約 5% の PEG 脂質のモル比を有する、脂質ナノ粒子（LNP）を提供する。

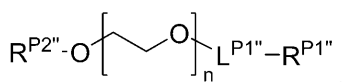
【0032】

一態様において、本開示は、脂質ナノ粒子（LNP）であって、

a. コクサッキーウイルスをコードする合成 RNA ウイルスゲノム、ならびに

b. カチオン性脂質、ヘルパー脂質、構造脂質、及び PEG 脂質を含み、PEG 脂質が、式（A''）の化合物：

【化 8】



式（A''）

またはその薬学的に許容される塩であり、式中、

n は、すべての端点を含む 10 ~ 200 の整数であり、

$L^{P1''}$ は結合、 $\text{---}[(\text{CH}_2)_{0-3}-\text{C}(\text{O})\text{O}]_{1-3}\text{---}$ 、 $\text{---}(\text{CH}_2)_{0-3}-\text{C}$

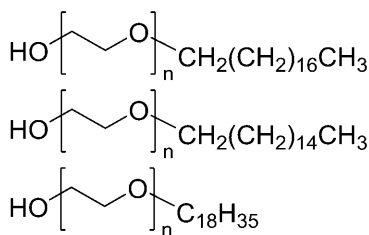
(O) O - (CH₂)₁₋₃ - O C (O) -、または - C (O) N (H) - であり、
 R^{P1} は、C₅ - C₂₅ アルキルまたは C₅ - C₂₅ アルケニルであり、
 R^{P2} は水素または - CH₃ であり、
 LNP が、約 0.001 % ~ 約 5 % の PEG 脂質のモル比を有する、
 脂質ナノ粒子 (LNP) を提供する。

【0033】

いくつかの実施形態では、R¹ は、C₁₆ - C₁₈ アルキルまたは C₁₆ - C₁₈ アルケニルである。いくつかの実施形態では、L^{P1} は結合、- CH₂ C (O) O -、- CH₂ CH₂ C (O) O -、- CH₂ C (O) O CH₂ C (O) O -、- CH₂ C (O) O CH₂ CH₂ O C (O) -、または - C (O) N (H) - である。いくつかの実施形態では、L^{P1} は結合である。いくつかの実施形態では、R^{P2} は水素である。いくつかの実施形態では、PEG 脂質は、式 (A'' - f1)、式 (A'' - f2)、もしくは式 (A'' - f3) の化合物：

10

【化9】



20

またはその薬学的に許容される塩である。

【0034】

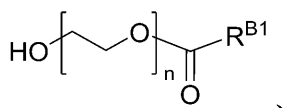
一態様において、本開示は、脂質ナノ粒子 (LNP) であって、

- a. セネカバレーウイルス (SVV) をコードする合成 RNA ウイルスゲノム、ならびに
- b. カチオン性脂質、ヘルパー脂質、構造脂質、及び PEG 脂質を含み、PEG 脂質が、

式 (B) の化合物：

30

【化10】



式 (B)

またはその薬学的に許容される塩であり、式中、

n は、すべての端点を含む 10 ~ 200 の整数であり、

R^{B1} は、C₅ - C₂₅ アルキルまたは C₅ - C₂₅ アルケニルであり、

40

LNP が、約 0.001 % ~ 約 5 % の PEG 脂質のモル比を有する、
 脂質ナノ粒子 (LNP) を提供する。

【0035】

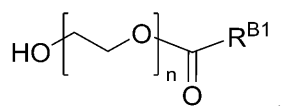
一態様において、本開示は、脂質ナノ粒子 (LNP) であって、

- a. コクサッキーウイルスをコードする合成 RNA ウイルスゲノム、ならびに
- b. カチオン性脂質、ヘルパー脂質、構造脂質、及び PEG 脂質を含み、PEG 脂質が、

式 (B) の化合物：

50

【化 1 1】



式 (B)

またはその薬学的に許容される塩であり、式中、

n は、すべての端点を含む 10～200 の整数であり、

$\text{R}^{\text{B}1}$ は、 $\text{C}_5 - \text{C}_{25}$ アルキルまたは $\text{C}_5 - \text{C}_{25}$ アルケニルであり、

LNP が、約 0.001%～約 5% の PEG 脂質のモル比を有する、

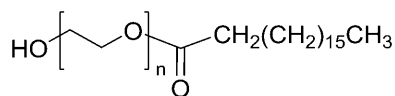
脂質ナノ粒子 (LNP) を提供する。いくつかの実施形態では、 R^1 は、 $\text{C}_{15} - \text{C}_{17}$ アルキルまたは $\text{C}_{15} - \text{C}_{17}$ アルケニルである。

10

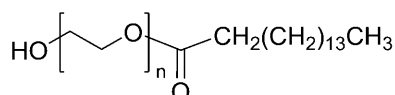
【0036】

いくつかの実施形態では、PEG 脂質は、式 (B-a) もしくは式 (B-b) の化合物：

【化 1 2】



20



またはその薬学的に許容される塩である。

【0037】

いくつかの実施形態では、 n は、平均で約 20、約 40、約 50、または約 100 である。いくつかの実施形態では、 n は、平均で約 100 である。いくつかの実施形態では、PEG 脂質は、約 200 ダルトン～約 10,000 ダルトン、約 500 ダルトン～約 7,000 ダルトン、または約 800 ダルトン～約 6,000 ダルトンの平均分子量を有する PEG 部分を含む。

30

【0038】

いくつかの実施形態では、PEG 脂質は、 $\text{HO}-\text{PEG}100-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{16}\text{CH}_3$ 、 $\text{HO}-\text{PEG}20-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{16}\text{CH}_3$ 、 $\text{HO}-\text{PEG}20-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_3$ 、 $\text{HO}-\text{PEG}20-\text{C}_{18}\text{H}_{35}$ 、 $\text{HO}-\text{PEG}100-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_3$ 、 $\text{HO}-\text{PEG}50-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_3$ 、 $\text{HO}-\text{PEG}40-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_3$ 、 $\text{HO}-\text{PEG}100-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{15}\text{CH}_3$ 、 $\text{HO}-\text{PEG}40-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{15}\text{CH}_3$ 、及び $\text{HO}-\text{PEG}50-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{15}\text{CH}_3$ からなる群から選択される。

40

【0039】

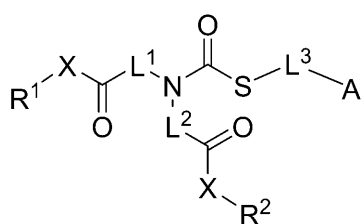
いくつかの実施形態では、LNP は、式 (A'') の PEG 脂質及び／または式 (I) のイオン化可能な脂質を欠いている対照 LNP と比較して低減した免疫応答を *in vivo* で誘導し、場合により、対照 LNP 中の PEG 脂質は PEG2K-DPG または PEG2K-DMG である。いくつかの実施形態では、免疫応答は、LNP の加速血液クリアランス (ABC) 及び／または抗 PEG IgM 応答である。

【0040】

いくつかの実施形態では、カチオン性脂質は、式 (I) の化合物：

50

【化 1 3】



式 (I)

10

またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物であり、式中、

A は、 $-N(CH_2R^{N1})(CH_2R^{N2})$ 、または少なくとも 1 つの N を含む 4 ～ 7 員ヘテロシクリル環であり、4 ～ 7 員ヘテロシクリル環は、0 ～ 6 つの R^3 で場合により置換されており、

各 X は、独立的に、 $-O-$ 、 $-N(R^1)-$ 、または $-N(R^2)-$ であり、

R^1 は、場合により置換されている $C_1 - C_{31}$ 脂肪族及びステロイジルからなる群から選択され、

R^2 は、場合により置換されている $C_1 - C_{31}$ 脂肪族及びステロイジルからなる群から選択され、

20

R^3 は、場合により置換されている $C_1 - C_6$ 脂肪族であり、

R^{N1} 及び R^{N2} は、各々独立的に、水素、ヒドロキシ- $C_1 - C_6$ アルキル、 $C_2 - C_6$ アルケニル、または $C_3 - C_7$ シクロアルキルであり、

L^1 は、場合により置換されている $C_1 - C_{20}$ アルキレン鎖、及び二価で場合により置換されている $C_2 - C_{20}$ アルケニレン鎖からなる群から選択され、

L^2 は、場合により置換されている $C_1 - C_{20}$ アルキレン鎖、及び二価で場合により置換されている $C_2 - C_{20}$ アルケニレン鎖からなる群から選択され、

L^3 は結合、場合により置換されている $C_1 - C_6$ アルキレン鎖、または二価で場合により置換されている $C_3 - C_7$ シクロアルキレンであるが、

ただし、A が $-N(CH_3)(CH_3)$ であり、X が O であるとき、 L^3 は $C_1 - C_6$ アルキレン鎖ではないことを条件とする。

30

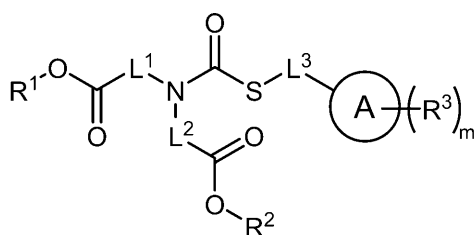
【0041】

いくつかの実施形態では、チオレートの S と A に含まれる最も近い N との間の炭素原子の数が 2 ～ 4 である。

【0042】

いくつかの実施形態では、カチオン性脂質は、式 (I-a) の化合物：

【化 1 4】



式 (I-a)

40

またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物であり、式中、

m は 0、1、2、3、4、5、または 6 である。

【0043】

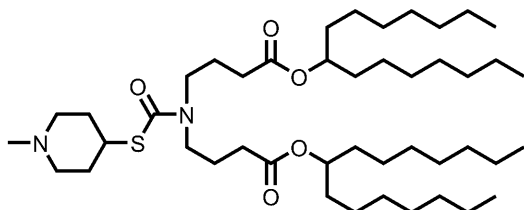
50

いくつかの実施形態では、Aは、場合により置換されている5～6員ヘテロシクリル環である。

【0044】

いくつかの実施形態では、カチオン性脂質は、

【化15】



10

またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物である。

【0045】

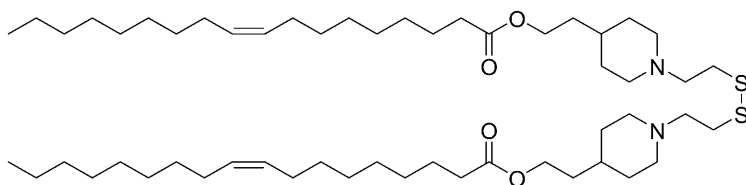
いくつかの実施形態では、カチオン性脂質は、DLinDMA、DLin-KC2-DMA、DLin-MC3-DMA (MC3)、COATSOME (登録商標) SS-LC (旧名: SS-18/4PE-13)、COATSOME (登録商標) SS-EC (旧名: SS-33/4PE-15)、COATSOME (登録商標) SS-OC、COATSOME (登録商標) SS-OP、ジ((Z)-ノナ-2-エン-1-イル)9-((4-ジメチルアミノ)ブタノイル)オキシ)ヘプタデカンジオエート(L-319)、N-(2,3-ジオレオイルオキシ)プロピル)-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド(DOTAP)、またはそれらの混合物から選択される。

20

【0046】

いくつかの実施形態では、カチオン性脂質は、式(II-1a)の化合物:

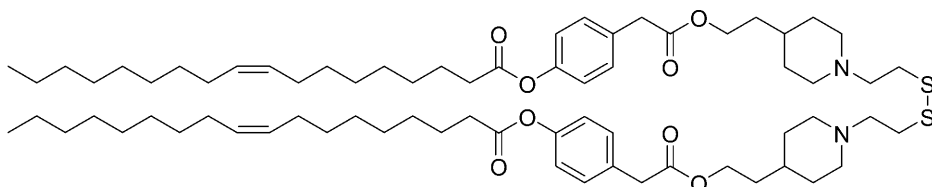
【化16】



30

式(II-2a)の化合物である。

【化17】



40

【0047】

いくつかの実施形態では、カチオン性脂質は式(II-1a)の化合物であり、構造脂質はコレステロールであり、ヘルパー脂質はDSPCであり、PEG脂質はBRIJ (商標) S100である。

【0048】

いくつかの実施形態では、カチオン性脂質は式(II-1a)の化合物であり、構造脂質はコレステロールであり、ヘルパー脂質はDSPCであり、PEG脂質はMYRJ (商標) S100、MYRJ (商標) S50、またはMYRJ (商標) S40である。

50

【0049】

いくつかの実施形態では、LNPは、約0.1%～約2%のモル比のPEG脂質、例えば約0.2%～約0.8mol%、約0.4%～約0.6mol%、約0.7%～約1.3%、または約1.2%～約1.8%のPEG脂質を含む。いくつかの実施形態では、LNPは、約0.2%～約0.8%、または約0.5%のモル比のPEG脂質を含む。いくつかの実施形態では、LNPは、約1.2%～約1.8%、または約1.5%のモル比のPEG脂質を含む。いくつかの実施形態では、LNPは、約44%～約54%のカチオン性脂質、約19%～約25%のヘルパー脂質、約24%～約33%の構造脂質、及び約0.2%～約0.8%のPEG脂質のモル比を有する。

【0050】

いくつかの実施形態では、LNPは、式(II-1a)の化合物と、コレステロールと、DSPCと、 $\text{HO-PEG100-CH}_2(\text{CH}_2)_{16}\text{CH}_3$ 、 $\text{HO-PEG20-CH}_2(\text{CH}_2)_{16}\text{CH}_3$ 、 $\text{HO-PEG20-CH}_2(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_3$ 、 $\text{HO-PEG20-C}_{18}\text{H}_{35}$ 、 $\text{HO-PEG100-C(O)-CH}_2(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_3$ 、 $\text{HO-PEG50-C(O)-CH}_2(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_3$ 、 $\text{HO-PEG40-C(O)-CH}_2(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_3$ 、 $\text{HO-PEG100-C(O)-CH}_2(\text{CH}_2)_{15}\text{CH}_3$ 、 $\text{HO-PEG40-C(O)-CH}_2(\text{CH}_2)_{15}\text{CH}_3$ 、及び $\text{HO-PEG50-C(O)-CH}_2(\text{CH}_2)_{15}\text{CH}_3$ から選択されるPEG脂質とを含み、式(II-1a)の化合物：コレステロール：DSPC：PEG脂質のモル比は、49：28.5：22：0.5である。

【0051】

いくつかの実施形態では、LNPは、式(II-1a)の化合物と、コレステロールと、DSPCと、 $\text{HO-PEG100-CH}_2(\text{CH}_2)_{16}\text{CH}_3$ 、 $\text{HO-PEG20-CH}_2(\text{CH}_2)_{16}\text{CH}_3$ 、 $\text{HO-PEG20-CH}_2(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_3$ 、 $\text{HO-PEG20-C}_{18}\text{H}_{35}$ 、 $\text{HO-PEG100-C(O)-CH}_2(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_3$ 、 $\text{HO-PEG50-C(O)-CH}_2(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_3$ 、 $\text{HO-PEG40-C(O)-CH}_2(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_3$ 、 $\text{HO-PEG100-C(O)-CH}_2(\text{CH}_2)_{15}\text{CH}_3$ 、 $\text{HO-PEG40-C(O)-CH}_2(\text{CH}_2)_{15}\text{CH}_3$ 、及び $\text{HO-PEG50-C(O)-CH}_2(\text{CH}_2)_{15}\text{CH}_3$ から選択されるPEG脂質とを含み、式(II-1a)の化合物：コレステロール：DSPC：PEG脂質のモル比は、49：27.5：22：1.5である。

【0052】

いくつかの実施形態では、LNPは、式(II-1a)の化合物と、コレステロールと、DSPCと、 $\text{HO-PEG100-CH}_2(\text{CH}_2)_{16}\text{CH}_3$ 、 $\text{HO-PEG20-CH}_2(\text{CH}_2)_{16}\text{CH}_3$ 、 $\text{HO-PEG20-CH}_2(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_3$ 、 $\text{HO-PEG20-C}_{18}\text{H}_{35}$ 、 $\text{HO-PEG100-C(O)-CH}_2(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_3$ 、 $\text{HO-PEG50-C(O)-CH}_2(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_3$ 、 $\text{HO-PEG40-C(O)-CH}_2(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_3$ 、 $\text{HO-PEG100-C(O)-CH}_2(\text{CH}_2)_{15}\text{CH}_3$ 、 $\text{HO-PEG40-C(O)-CH}_2(\text{CH}_2)_{15}\text{CH}_3$ 、及び $\text{HO-PEG50-C(O)-CH}_2(\text{CH}_2)_{15}\text{CH}_3$ から選択されるPEG脂質とを含み、式(II-1a)の化合物：コレステロール：DSPC：PEG脂質のモル比は、49：38.5：11：1.5である。

【0053】

いくつかの実施形態では、LNPは、約1～約25の脂質窒素対リン酸(N:P)比を有する。いくつかの実施形態では、LNPは、約14のN:P比を有する。いくつかの実施形態では、ヒアルロナンが、LNPの表面にコンジュゲートされている。

【0054】

一態様において、本開示は、本開示の複数の脂質ナノ粒子を含む医薬組成物を提供する。いくつかの実施形態では、複数のLNPは、約50nm～約500nm、約150nm～約500nm、約200nm～約500nm、約300nm～約500nm、約350

10

20

30

40

50

nm～約500nm、約400nm～約500nm、約425nm～約500nm、約450nm～約500nm、または約475nm～約500nmの平均直径を有する。いくつかの実施形態では、複数のLNPは、約50nm～約120nmの平均直径を有する。いくつかの実施形態では、複数のLNPは、約50nm、60nm、70nm、80nm、90nm、100nm、110nm、または約120nmの平均直径を有する。いくつかの実施形態では、複数のLNPは、約100nmの平均直径を有する。

【0055】

いくつかの実施形態では、複数のLNPは、約40mV～約-40mV、約20mV～約-20mV、約10mV～約-10mV、約5mV～約-5mV、または約20mV～約-40mVの平均ゼータ電位を有する。いくつかの実施形態では、複数のLNPは、約5mV未満、約0mV未満、約-5mV未満、約-10mV未満、約-20mV未満、約-30mV未満、約-35mV未満、または約-40mV未満の平均ゼータ電位を有する。いくつかの実施形態では、複数のLNPは、約-50mV～約-20mV、約-40mV～約-20mV、約-30mV～約-10mV、約-20mV～約0mV、約-15mV～約5mV、または約-10mV～約10mVの平均ゼータ電位を有する。いくつかの実施形態では、複数のLNPは、約-30mV、約-31mV、約-32mV、約-33mV、約-34mV、約-35mV、約-36mV、約-37mV、約-38mV、約-39mV、または約-40mVの平均ゼータ電位を有する。

【0056】

いくつかの実施形態では、医薬組成物を対象に投与すると、組換えRNAポリヌクレオチドが対象の標的細胞に送達され、組換えRNAポリヌクレオチドが、対象の標的細胞を溶解することができる感染性腫瘍溶解性ウイルスを産生する。いくつかの実施形態では、標的細胞は、がん性細胞である。いくつかの実施形態では、該組成物は、静脈内及び／または腫瘍内送達用に製剤化されている。

【0057】

いくつかの実施形態では、該組成物は、式(A'')のPEG脂質及び／または式(I)のイオン化可能な脂質を欠いている組成物のものよりも長いin vivo治療効果持続期間を有する。いくつかの実施形態では、該組成物は、約1時間以上、約2時間以上、約3時間以上、約4時間以上、約5時間以上、約6時間以上、約7時間以上、約8時間以上、約9時間以上、約10時間以上、約12時間以上、約14時間以上、約16時間以上、約18時間以上、約20時間以上、約25時間以上、約30時間以上、約35時間以上、約40時間以上、約45時間以上、または約50時間以上のin vivo治療効果持続期間を有する。該組成物は、所定の閾値を超えるまたはそれと等しいin vivoの半減期及び／またはAUCを有する。

【0058】

いくつかの実施形態では、LNPによる合成RNAウイルスゲノムのカプセル化効率は、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91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%である。いくつかの実施形態では、該組成物は、約10mM、約20mM、約30mM、約40mM、または約50mMの総脂質濃度を有する。いくつかの実施形態では、該組成物は、約2.5、約3、約3.5、約4、約4.5、約5、約5.5、または約6のpHで製剤化されている。

【0059】

いくつかの実施形態では、該組成物は複数投与用に製剤化されている。いくつかの実施形態では、後続投与は、第1の投与の少なくとも3日後、少なくとも5日後、少なくとも7日後、少なくとも9日後、少なくとも11日後、少なくとも14日後、または少なくとも21日後に投与される。いくつかの実施形態では、該組成物は、薬学的に許容される担体をさらに含む。

【0060】

10

20

30

40

50

一態様において、本開示は、腫瘍溶解性コクサッキーウイルスウイルスをコードする合成RNAウイルスゲノムを含む組換えRNA分子であって、コクサッキーウイルスが、EF株及びKY株から選択されるCVA21株である、組換えRNA分子を提供する。いくつかの実施形態では、コクサッキーウイルスはCVA21-KY株であり、CVA21-KY株は、配列番号5による少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または100%の配列同一性を有するポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、コクサッキーウイルスはCVA21-EF株であり、CVA21-EF株は、配列番号9による少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または100%の配列同一性を有するポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、コクサッキーウイルスは、配列番号6または10による少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または100%の配列同一性を有する5'UTR(IRES)配列を含む。いくつかの実施形態では、コクサッキーウイルスは、配列番号7または11による少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または100%の配列同一性を有するP1配列を含む。いくつかの実施形態では、コクサッキーウイルスは、配列番号8または12による少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または100%の配列同一性を有する3D配列を含む。いくつかの実施形態では、合成RNAウイルスゲノムは、配列番号1による95%超、90%超、85%超、または80%超の配列同一性を有するポリヌクレオチド配列を含まない。いくつかの実施形態では、組換えRNA分子は、野生型コクサッキーウイルスウイルスのものとの100%の配列同一性を有するRNAウイルスゲノムを含まない。

10

20

【0061】

一態様において、本開示は、腫瘍溶解性コクサッキーウイルスウイルスをコードする合成RNAウイルスゲノムを含む組換えRNA分子であって、コクサッキーウイルスが、CVA21 Kuykendall株である、組換えRNA分子を提供する。

【0062】

一態様において、本開示は、セネカバレーウイルス(SVV)をコードする合成RNAウイルスゲノムを含む組換えRNA分子であって、SVVが、キメラSVVを含み、合成RNAウイルスゲノムが、配列番号68との少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または100%の配列同一性を有するポリヌクレオチド配列を含む、組換えRNA分子を提供する。

30

【0063】

いくつかの実施形態では、組換えRNA分子は、腫瘍溶解性ウイルスをコードするポリヌクレオチド配列に挿入されたマイクロRNA(miRNA)標的配列(miR-TS)カセットをさらに含み、miR-TSカセットは、1つ以上のmiRNA標的配列を含み、細胞内の対応するmiRNAのうちの1つ以上の発現は、細胞内のコードされたウイルスの複製を阻害する。いくつかの実施形態では、1つ以上のmiRNAは、miR-124、miR-1、miR-143、miR-128、miR-219、miR-219a、miR-122、miR-204、miR-217、miR-137、miR-142、及びmiR-126から選択される。いくつかの実施形態では、miR-TSカセットは、

40

- a. miR-124標的配列の1つ以上のコピー、miR-1標的配列の1つ以上のコピー、及びmiR-143標的配列の1つ以上のコピー、
- b. miR-128標的配列の1つ以上のコピー、miR-219a標的配列の1つ以上のコピー、及びmiR-122標的配列の1つ以上のコピー、
- c. miR-128標的配列の1つ以上のコピー、miR-204標的配列の1つ以上のコピー、及びmiR-219標的配列の1つ以上のコピー、または
- d. miR-217標的配列の1つ以上のコピー、miR-137標的配列の1つ以上のコピー、及びmiR-126標的配列の1つ以上のコピーを含む。

【0064】

50

いくつかの実施形態では、組換えRNA分子は、非ウイルス送達ビヒクルによって細胞に導入されると、複製可能な腫瘍溶解性ウイルスを産生することができる。いくつかの実施形態では、細胞は、哺乳動物細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、哺乳動物対象に存在する哺乳動物細胞である。いくつかの実施形態では、1つ以上のmiR-TSカセットは、1つ以上のウイルス遺伝子の5'非翻訳領域(UTR)または3'UTRに組み込まれている。いくつかの実施形態では、1つ以上のmiR-TSカセットは、1つ以上のウイルス遺伝子のオープンリーディングフレーム(ORF)、5'非翻訳領域(UTR)、または3'UTRに組み込まれている。いくつかの実施形態では、組換えRNA分子は、核酸ベクターに挿入されている。いくつかの実施形態では、核酸ベクターはレプリコンである。

10

【0065】

いくつかの実施形態では、合成RNAウイルスゲノムは、外因性ペイロードタンパク質をコードする異種ポリヌクレオチドをさらに含む。いくつかの実施形態では、外因性ペイロードタンパク質は、MLKL 4HBDドメイン、ガスダーミンD N末端断片、ガスダーミンE N末端断片、HMGB1 Box Bドメイン、SMAC/Diablo、メリチン、L-アミノ酸オキシダーゼ(LAAO)、ディスインテグリン、TRAIL(TNFSF10)、ニトロレダクターゼ、レオウイルスFASTタンパク質、レプチン/FOSL2、 α -1, 3-ガラクトシルトランスフェラーゼ、またはアデノシンデアミナーゼ2(ADA2)を含むかまたはそれからなる。いくつかの実施形態では、ニトロレダクターゼは、NfsBまたはNfsAである。いくつかの実施形態では、レオウイルスFASTタンパク質は、ARV p14、BRV p15、またはp14-p15ハイブリッドである。いくつかの実施形態では、外因性ペイロードタンパク質は、蛍光タンパク質、酵素タンパク質、サイトカイン、ケモカイン、細胞表面受容体に結合することができる抗原結合分子、または細胞表面受容体に結合することができるリガンドである。いくつかの実施形態では、サイトカインは、GM-CSF、IFN γ 、IL-2、IL-7、IL-12、IL-18、IL-21、及びIL-36 γ から選択される。いくつかの実施形態では、細胞表面受容体のリガンドは、Flt3リガンドまたはTNFSF14である。いくつかの実施形態では、ケモカインは、CXCL10、CCL4、CCL21、及びCCL5から選択される。いくつかの実施形態では、抗原結合分子は、免疫チェックポイント受容体に結合してそれを阻害することができる。いくつかの実施形態では、免疫チェックポイント受容体は、PD-1である。いくつかの実施形態では、抗原結合分子は、腫瘍抗原に結合することができる。いくつかの実施形態では、抗原結合分子は、二重特異性T細胞エンゲージャー分子(BiTE)または二重特異性軽量T細胞エンゲージャー分子(LiTE)である。いくつかの実施形態では、腫瘍抗原は、HBV-コア(B型肝炎コア抗原)、HBV-pol、HbS-Ag、HPV E6、HPV E7、メルケル細胞ポリオマラージT抗原、及びエプスタイン・バーウイルス抗原EBNA2またはBZLF1から選択されるウイルス抗原である。いくつかの実施形態では、腫瘍抗原はDLL3またはEpCAMである。

20

30

【0066】

一態様において、本開示は、5'から3'に、プロモーター配列、5'接合部切断配列、合成RNAウイルスゲノムを含むRNA分子をコードするポリヌクレオチド配列、ポリA尾部、及び3'接合部切断配列を含む組換えDNA鑄型を提供する。

40

【0067】

一態様において、本開示は、5'から3'に、プロモーター配列、5'接合部切断配列、合成RNAウイルスゲノムを含む本開示のRNA分子をコードするポリヌクレオチド配列、ポリA尾部、及び3'接合部切断配列を含む組換えDNA分子を提供する。

【0068】

いくつかの実施形態では、組換えDNA分子は、プロモーター配列と5'接合部切断配列との間にリーダー配列を含む。

【0069】

50

一態様において、本開示は、5'から3'に、プロモーター配列、リーダー配列、5'接合部切断配列、合成RNAウイルスゲノムを含む組換えRNA分子をコードするポリヌクレオチド配列、ポリA尾部、及び3'接合部切断配列を含む組換えDNA分子を提供する。

【0070】

いくつかの実施形態では、リーダー配列は、100bp未満の長さである。いくつかの実施形態では、プロモーター配列は、T7プロモーター配列である。いくつかの実施形態では、ポリA尾部は、約50～90bpの長さまたは約65～75bpの長さである。いくつかの実施形態では、ポリA尾部は、約70bpの長さである。いくつかの実施形態では、ポリA尾部は、約10～50bp、または25～35bpの長さである。

【0071】

いくつかの実施形態では、5'接合部切断配列は、リボザイム配列を含むかまたはそれからなり、3'接合部切断配列は、リボザイム配列を含むかまたはそれからなる。いくつかの実施形態では、5'リボザイム配列は、ハンマーヘッド型リボザイム配列であり、3'リボザイム配列は、デルタ肝炎ウイルスリボザイム配列である。いくつかの実施形態では、5'接合部切断配列は、RNAseHプライマー結合配列を含むかまたはそれからなり、3'接合部切断配列は、制限酵素認識配列を含むかまたはそれからなる。いくつかの実施形態では、5'接合部切断配列は、リボザイム配列を含むかまたはそれからなり、3'接合部切断配列は、制限酵素認識配列を含むかまたはそれからなる。いくつかの実施形態では、5'リボザイム配列は、ハンマーヘッド型リボザイム配列、ピストル型リボザイム配列、または修飾されたピストル型リボザイム配列を含むかまたはそれからなる。

【0072】

いくつかの実施形態では、3'接合部切断配列は、IIS型制限酵素認識配列を含むかまたはそれからなる。

【0073】

いくつかの実施形態では、RNA分子は、コクサッキーウイルス(CVA)のRNAウイルスゲノムをコードする。いくつかの実施形態では、コクサッキーウイルスはCVA21株である。いくつかの実施形態では、リーダー配列は、配列番号14または15による少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、または100%の配列同一性を有するポリヌクレオチド配列を含むかまたはそれからなる。いくつかの実施形態では、5'接合部切断配列は、配列番号18との少なくとも80%、少なくとも90%、または100%の配列同一性を有するピストル型リボザイム配列を含むかまたはそれからなり、5'リボザイム配列のP2モチーフは、「TTTT」のポリヌクレオチド配列を有する。いくつかの実施形態では、5'接合部切断配列は、配列番号17との少なくとも80%、少なくとも90%、または100%の配列同一性を有するピストル型リボザイム配列を含むかまたはそれからなり、5'リボザイム配列のP2モチーフは、「TTTA」のポリヌクレオチド配列を有する。いくつかの実施形態では、3'接合部切断配列は、BsmBI認識配列を含むかまたはそれからなる。いくつかの実施形態では、3'接合部切断配列は、BsaI認識配列を含むかまたはそれからなる。いくつかの実施形態では、プロモーター配列は、T7プロモーター配列であり、リーダー配列は、配列番号15によるポリヌクレオチド配列からなり、5'接合部切断配列は、配列番号18によるピストル型リボザイム配列を含むかまたはそれからなり、ポリA尾部は、約70bpの長さであり、3'接合部切断配列は、BsmBI認識配列を含むかまたはそれからなる。いくつかの実施形態では、プロモーター配列は、T7プロモーター配列であり、リーダー配列は、配列番号15によるポリヌクレオチド配列からなり、5'接合部切断配列は、配列番号18によるピストル型リボザイム配列を含むかまたはそれからなり、ポリA尾部は、約70bpの長さであり、3'接合部切断配列は、BsaI認識配列を含むかまたはそれからなる。

【0074】

いくつかの実施形態では、RNA分子は、セネカバレーウイルス(SVV)のRNAウイルスゲノムをコードする。いくつかの実施形態では、リーダー配列は、配列番号53～

63のいずれか1つによる少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、または100%の配列同一性を有するポリヌクレオチド配列を含むかまたはそれからなる。いくつかの実施形態では、リーダー配列は、配列番号58による少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、または100%の配列同一性を有するポリヌクレオチド配列を含むかまたはそれからなる。いくつかの実施形態では、5'リボザイム配列は、配列番号64または65との少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または100%の配列同一性を有するピストル型リボザイム配列であり、5'リボザイム配列のP2モチーフは、「TCAA」または「TTAA」のポリヌクレオチド配列を有する。いくつかの実施形態では、RNAウイルスゲノムは、配列番号68の核酸1~670との少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または100%の配列同一性を有する5'UTR(IRES)配列を含む。いくつかの実施形態では、3'接合部切断配列は、SapI認識配列を含むかまたはそれからなる。いくつかの実施形態では、プロモーター配列は、T7プロモーター配列であり、リーダー配列は、配列番号53によるポリヌクレオチド配列からなり、5'接合部切断配列は、配列番号64によるピストル型リボザイム配列を含むかまたはそれからなり、ポリA尾部は、約70bpの長さであり、3'接合部切断配列は、SapI認識配列を含むかまたはそれからなる。いくつかの実施形態では、プロモーター配列は、T7プロモーター配列であり、リーダー配列は、配列番号58によるポリヌクレオチド配列からなり、5'接合部切断配列は、配列番号64によるピストル型リボザイム配列を含むかまたはそれからなり、ポリA尾部は、約70bpの長さであり、3'接合部切断配列は、SapI認識配列を含むかまたはそれからなる。

10

20

【0075】

いくつかの実施形態では、組換えDNA分子は、プロモーター配列及び3'接合部切断配列にわたる領域内に追加の核酸を含まない。

【0076】

一態様において、本開示は、本開示のDNA分子の*in vitro*転写、及び得られる組換えRNA分子の精製を含む、組換えRNA分子を産生する方法を提供する。いくつかの実施形態では、組換えRNA分子は、合成RNAウイルスゲノムによってコードされる腫瘍溶解性ウイルスにとって天然である5'末端及び3'末端を含む。

【0077】

一態様において、本開示は、有効量の本開示の組換えRNA分子、及び哺乳動物対象への投与に好適な担体を含む組成物を提供する。

【0078】

一態様において、本開示は、本開示の組換えRNA分子を含む粒子を提供する。いくつかの実施形態では、粒子は生分解性である。いくつかの実施形態では、粒子は、ナノ粒子、エクソソーム、リボソーム、及びリボプレックスからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、エクソソームは、無傷エクソソームまたは空のエクソソームに由来する修飾エクソソームである。

【0079】

一態様において、本開示は、本開示の複数の粒子を含む医薬組成物を提供する。いくつかの実施形態では、複数の粒子は、約50nm~約500nm、約150nm~約500nm、約200nm~約500nm、約300nm~約500nm、約350nm~約500nm、約400nm~約500nm、約425nm~約500nm、約450nm~約500nm、または約475nm~約500nmの平均サイズを有する。いくつかの実施形態では、複数の粒子は、約50nm~約120nmの平均サイズを有する。いくつかの実施形態では、複数の粒子は、約50nm、60nm、70nm、80nm、90nm、100nm、110nm、または約120nmの平均サイズを有する。いくつかの実施形態では、複数の粒子は、約100nmの平均サイズを有する。

30

40

【0080】

いくつかの実施形態では、複数の粒子は、約40mV~約-40mV、約20mV~約

50

−20 mV、約10 mV〜約−10 mV、約5 mV〜約−5 mV、または約20 mV〜約−40 mVの平均ゼータ電位を有する。いくつかの実施形態では、複数の粒子は、約5 mV未満、約0 mV未満、約−5 mV未満、約−10 mV未満、約−20 mV未満、約−30 mV未満、約−35 mV未満、または約−40 mV未満の平均ゼータ電位を有する。いくつかの実施形態では、複数の粒子は、約−50 mV〜約−20 mV、約−40 mV〜約−20 mV、約−30 mV〜約−10 mV、約−20 mV〜約0 mV、約−15 mV〜約5 mV、または約−10 mV〜約10 mVの平均ゼータ電位を有する。いくつかの実施形態では、複数の粒子は、約−30 mV、約−31 mV、約−32 mV、約−33 mV、約−34 mV、約−35 mV、約−36 mV、約−37 mV、約−38 mV、約−39 mV、または約−40 mVの平均ゼータ電位を有する。

10

【0081】

いくつかの実施形態では、該組成物を対象に送達すると、カプセル化された組換えRNA分子が標的細胞に送達され、カプセル化された組換えRNA分子は、標的細胞を溶解することができる感染性ウイルスを産生する。

【0082】

一態様において、本開示は、本開示の組換えRNA分子を含む無機粒子を提供する。いくつかの実施形態では、無機粒子は、金ナノ粒子（GNP）、金ナノロッド（GNR）、磁性ナノ粒子（MNP）、磁性ナノチューブ（MNT）、カーボンナノホーン（CNH）、カーボンフラーレン、カーボンナノチューブ（CNT）、リン酸カルシウムナノ粒子（CPNP）、メソポーラスシリカナノ粒子（MSN）、シリカナノチューブ（SNT）、または星状中空シリカナノ粒子（SHNP）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、粒子の平均直径は、約500 nm未満であるか、約50 nm〜500 nmであるか、約250 nm〜約500 nmであるか、または約350 nmである。

20

【0083】

いくつかの実施形態では、本開示のLNP、本開示の粒子、または本開示の無機粒子は、ペイロード分子をコードする第2の組換えRNA分子をさらに含む。いくつかの実施形態では、第2の組換えRNA分子はレプリコンである。

【0084】

一態様において、本開示は、本開示のLNP、本開示の粒子、または本開示の無機粒子を含む医薬組成物を提供し、該組成物は静脈内及び／または腫瘍内送達用に製剤化されている。いくつかの実施形態では、標的細胞は、がん性細胞である。

30

【0085】

一態様において、本開示は、がん性細胞を殺傷する方法であって、がん性細胞を、本開示の粒子、本開示の組換えRNA分子、またはそれらの組成物に、粒子を前記がん性細胞に細胞内送達するのに十分な条件下で曝露することを含み、カプセル化ポリヌクレオチドによって産生される複製可能なウイルスが、がん性細胞の殺傷をもたらす、方法を提供する。いくつかの実施形態では、複製可能なウイルスは、非がん性細胞で産生されない。いくつかの実施形態では、該方法は、*in vivo*、*in vitro*、または*ex vivo*で行われる。

【0086】

一態様において、本開示は、対象のがんを処置する方法であって、がん罹患している対象に、有効量の本開示の粒子、本開示の組換えRNA分子、またはそれらの組成物を投与することを含む、方法を提供する。いくつかの実施形態では、粒子またはその組成物は、静脈内に、鼻腔内に、腫瘍内に、腹腔内に、または吸入剤として投与される。いくつかの実施形態では、粒子またはその組成物は、腫瘍内及び／または静脈内に投与される。いくつかの実施形態では、粒子またはその組成物は、対象に繰り返し投与される。いくつかの実施形態では、対象は、マウス、ラット、ウサギ、ネコ、イヌ、ウマ、非ヒト霊長類、またはヒトである。

40

【0087】

いくつかの実施形態では、がんは、肺癌、乳癌、結腸癌、または膵臓癌であり、合成R

50

N A ウイルスゲノムは、K Y 株に由来するポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、がんは、膀胱癌、腎細胞癌、卵巣癌、胃癌または肝臓癌であり、合成 R N A ウイルスゲノムは、E F 株に由来するポリヌクレオチド配列を含む。

【0088】

いくつかの実施形態では、がんは、肺癌、乳癌、卵巣癌、子宮頸癌、前立腺癌、精巣癌、大腸癌、結腸癌、膵臓癌、肝臓癌、腎細胞癌、胃癌、頭頸部癌、甲状腺癌、悪性神経膠腫、膠芽腫、メラノーマ、B細胞慢性リンパ球性白血病、多発性骨髄腫、意義不明の単クローン性高ガンマグロブリン血症(MGUS)、メルケル細胞癌、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫(DLBCL)、肉腫、神経芽細胞腫、神経内分泌癌、横紋筋肉腫、髄芽腫、膀胱癌、及び辺縁帯リンパ腫(MZL)から選択される。いくつかの実施形態では、がんは、肺癌、乳癌、結腸癌、膵臓癌、膀胱癌、腎細胞癌、卵巣癌、胃癌、及び肝臓癌からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、がんは、腎細胞癌、肺癌、または肝臓癌である。いくつかの実施形態では、肺癌は、小細胞肺癌または非小細胞肺癌(例えば、肺扁平上皮癌または肺腺癌)である。いくつかの実施形態では、肝臓癌は、肝細胞癌(HCC)(例えば、B型肝炎ウイルス関連HCC)である。いくつかの実施形態では、前立腺癌は、処置下で発現した神経内分泌前立腺癌である。いくつかの実施形態では、がんは、肺癌、肝臓癌、前立腺癌(例えば、CRPC-NE)、膀胱癌、膵臓癌、結腸癌、胃癌、乳癌、神経芽細胞腫、腎細胞癌、卵巣癌、横紋筋肉腫、髄芽腫、神経内分泌癌、メルケル細胞癌、またはメラノーマである。いくつかの実施形態では、がんは、小細胞肺癌(SCLC)または神経芽細胞腫である。

10

20

【0089】

一態様において、本開示は、がんの処置を必要とする対象においてそれを行う方法であって、有効量のCVA21-EFウイルスを対象に投与することを含む、方法を提供する。

【0090】

一態様において、本開示は、がんの処置を必要とする対象においてそれを行う方法であって、有効量のCVA21-KYウイルスを対象に投与することを含む、方法を提供する。

【0091】

一態様において、本開示は、がんの処置を必要とする対象においてそれを行う方法であって、有効量のCVA21-Kuykendallウイルスを対象に投与することを含む、方法を提供する。

30

【0092】

いくつかの実施形態では、ウイルスは、腫瘍内及び／または静脈内に投与される。

【0093】

いくつかの実施形態では、該方法は、免疫チェックポイント阻害剤を対象に投与することをさらに含む。いくつかの実施形態では、免疫チェックポイント阻害剤は、PD-1の阻害剤である。いくつかの実施形態では、該方法は、エンジニアリングされた抗原受容体を含むエンジニアリングされた免疫細胞を投与することをさらに含む。

【0094】

一態様において、本開示は、がんの処置を必要とする対象においてそれを行う方法であって、治療有効量の、腫瘍溶解性コクサッキーウイルスであって、CVA21株であるコクサッキーウイルス、またはCVA21をコードするポリヌクレオチドを対象に投与することを含み、がんが、ICAM-1の発現及び／またはICAM-1陽性がん細胞のパーセンテージに基づいてCVA21感染感受性と分類される、方法を提供する。

40

【0095】

一態様において、本開示は、がんの処置を必要とする対象においてそれを行う方法であって、

(a) がんにおけるICAM1の発現レベル及び／またはICAM-1陽性がん細胞のパーセンテージを決定すること、

50

(b) がんを、(a) で決定された ICAM-1 の発現及び／または ICAM-1 陽性がん細胞のパーセンテージに基づいて、コクサッキーウイルス 21 (CVA21) 感染感受性と分類すること、ならびに

(c) がんがステップ (b) で CVA21 感染感受性と分類された場合、治療有効量の CVA21 または CVA21 をコードするポリヌクレオチドを対象に投与することを含む、方法を提供する。

【0096】

一態様において、本開示は、コクサッキーウイルス 21 (CVA21) または CVA21 をコードするポリヌクレオチドによる処置のために、がんに罹患している対象を選択する方法であって、

(a) がんにおける ICAM-1 の発現レベル及び／または ICAM-1 陽性がん細胞のパーセンテージを決定すること、

(b) がんを、(a) で決定された ICAM-1 の発現レベル及び／または ICAM-1 陽性がん細胞のパーセンテージに基づいて、CVA21 感染感受性と分類すること、

(c) がんが (b) で CVA21 感染感受性と分類された場合、CVA21 または CVA21 をコードするポリヌクレオチドによる処置のために対象を選択すること、ならびに

(d) 選択された対象に、CVA21 または CVA21 をコードするポリヌクレオチドを投与すること

を含む、方法を提供する。

【0097】

いくつかの実施形態では、CVA21 株は CVA21-KY である。

【図面の簡単な説明】

【0098】

【図1】PBSもしくはLipofectamineと共に製剤化されたCVA21-RNA分子の腫瘍内投与、またはCVA21-Kuykendall株RNA分子を含むLNP（製剤ID：70032-6C）の静脈内投与後のSK-MEL-28腫瘍担持マウスにおける腫瘍体積を示す。

【0099】

【図2A】3' IIS型制限酵素認識部位を使用してピコルナウイルスの真の3'末端を生成するためのin vitro転写手法の概要を示す。

【図2B】BsmBIまたはBsaI制限酵素によるDNA消化の電気泳動を示す。

【0100】

【図3】5' DNAプライマー及びRNaseH酵素を使用してピコルナウイルスの真の5'末端を生成するためのRNaseH手法を示す。

【0101】

【図4】ピコルナウイルスの真の5'末端を生成するためのリボザイム手法を示す。

【0102】

【図5】A及びBは、個別の5'末端を生成するためのハンマーヘッド型リボザイムを示す。Aは、矢印で5'末端にアニーリングして切断する最小限のハンマーヘッド型リボザイム(HHR)の構造モデルを示す（配列番号75）。Bは、矢印で5'末端を切断するための安定化ステムI(STBL)を有するリボザイムの構造モデルを示す（配列番号76）。

【0103】

【図6A】個別の5'末端を生成するためのピストル型リボザイムを示す。野生型ピストル型リボザイムの特徴の概略図を示す（配列番号77）。

【図6B】個別の5'末端を生成するためのピストル型リボザイムを示す。mFOLDによってモデル化された、P3鎖を融合させるためにテトラループが付加されたP.Polymer由来のピストル型リボザイムを示す。破線の枠は、ウイルス配列との関連でリボザイムのフォールドを保持するように変異誘発した領域である。破線の枠内に示される「GUC」配列を「UCA」に変異させてピストル1を生成し、「GUC」配列を「TT

10

20

30

40

50

A」に変異させてピストル2（配列番号78）を生成した。

【図6C】個別の5'末端を生成するためのピストル型リボザイムを示す。複数のピストル型リボザイムバリエーションの配列アラインメント及びP2モチーフの位置を示す。

【0104】

【図7】A及びBは、RNAポリヌクレオチドからの感染性CVA21ウイルスの産生を示す。Aは、RNAポリヌクレオチドからの感染性CVA21の産生に対する5'UTR配列の効果を示す。Bは、配列番号2の5'UTRを含むRNAポリヌクレオチドからの感染性CVA21の産生を示す。

【0105】

【図8A】CVA-LNPの*in vivo*効果を示す。腫瘍測定値を示す。

10

【図8B】CVA-LNPの*in vivo*効果を示す。経時的な体重変化を示す。

【図8C】CVA21感染によるH1299細胞溶解（左）、ならびに示された細胞系におけるICAM1及びDAFのウェスタンブロッツの発現分析（右）の結果を示す。

【図8D】CVA21-KY感染に対する感受性／抵抗性に基づく、130のヒト細胞系における平均ICAM-1 mRNA及びタンパク質発現を示すチャートである。

【図8E】ICAM-1発現とCVA21-KY感染感受性との間の相関性を示す図である。

【0106】

【図9】LNP／ピコルナウイルスRNA組成物及び作用様式の概略表現を示す。LNP／ピコルナウイルスRNAが全身投与され、ピコルナウイルスRNAゲノムが許容性腫瘍細胞に送達され、ここでそれらが複製してピコルナウイルスビリオンを産生する。次いでピコルナウイルス感染は近隣の腫瘍細胞に広がり、腫瘍溶解及び抗ウイルス免疫応答を誘起する。

20

【0107】

【図10】CVA21-RNA及びNeg-RNAの*in vitro*転写プロセスを示す。5'及び3'リボザイム（Rib）によるCVA21-RNAの自己触媒的切断により、複製に必要な個別の5'末端及び3'末端を有するCVA21-RNAが生成された。これに対し、Neg-RNA構築物は、リボザイム配列を欠いており、複製及びビリオン産生が不可能であった。

【0108】

【図11A】ウイルスの個別の5'及び3'天然末端を維持するために、接合部切断配列を使用してゲノム転写物から非ウイルスRNAポリヌクレオチドを除去することの一般的概略を示す。

30

【図11B】ウイルスの個別の5'及び3'天然末端を維持するために、接合部切断配列を使用してゲノム転写物から非ウイルスRNAポリヌクレオチドを除去することの概略図を示し、ここで、3'接合部切断配列は制限酵素認識部位を含む。

【0109】

【図12A】3つのCVA21株について細胞傷害性スクリーンから得られたAUCをまとめた図を示す。

【図12B】各個の細胞15系についての相対IC50値を示す。

40

【0110】

【図13】様々ながんタイプにおける各個の細胞系についての3つのCVA21株のIC50値を示す。

【0111】

【図14】肺及びNSCLC癌細胞系を使用したEF及びKY株のAUC値の比率としてプロットされた結果を示す。

【0112】

【図15A】乳腺細胞系を使用したEF及びKY株のAUC値の比率としてプロットされた結果を示す。

【図15B】結腸／GI細胞系を使用したEF及びKY株のAUC値の比率としてプロット

50

トされた結果を示す。

【図 1 5 C】膵臓癌細胞系を使用した E F 及び K Y 株の A U C 値の比率としてプロットされた結果を示す。

【0 1 1 3】

【図 1 6 A】免疫組織化学によるヒト肺癌マイクロアレイでの I C A M - 1 発現を示す。これには、I C A M - 1 陽性である腫瘍細胞のパーセンテージ、及び H スコアが含まれる（式には、+ 1、+ 2、+ 3 I C A M - 1 強度レベルを発現する細胞のパーセンテージが含まれる）。

【図 1 6 B】様々な肺腺癌細胞系に対する E F 及び K Y 株の腫瘍溶解有効性を示す。

【図 1 6 C】様々な大細胞肺癌細胞系に対する E F 及び K Y 株の腫瘍溶解有効性を示す。

【0 1 1 4】

【図 1 7 A】膀胱癌細胞系を使用した E F 及び K Y 株の A U C 値の比率としてプロットされた結果を示す。

【図 1 7 B】腎癌細胞系を使用した E F 及び K Y 株の A U C 値の比率としてプロットされた結果を示す。

【図 1 7 C】肝臓癌細胞系を使用した E F 及び K Y 株の A U C 値の比率としてプロットされた結果を示す。

【図 1 7 D】卵巣癌細胞系を使用した E F 及び K Y 株の A U C 値の比率としてプロットされた結果を示す。

【図 1 7 E】GBM 癌細胞系を使用した E F 及び K Y 株の A U C 値の比率としてプロットされた結果を示す。

【0 1 1 5】

【図 1 8 A】乳癌細胞系を使用した E F 及び K Y 株の A U C 値の比率としてプロットされた結果を示す。

【図 1 8 B】腎細胞癌細胞系を使用した E F 及び K Y 株の A U C 値の比率としてプロットされた結果を示す。

【図 1 8 C】肝細胞癌細胞系を使用した E F 及び K Y 株の A U C 値の比率としてプロットされた結果を示す。

【0 1 1 6】

【図 1 9】T C I D 5 0 値に基づく K Y 及び E F 株に対する細胞系感受性をまとめた表である。

【0 1 1 7】

【図 2 0 A】感染後 2 4 時間及び 7 2 時間の時点での 3 名のドナーからのヒトの解離腫瘍細胞における K Y 及び E F 株のコピー数をプロットした図を示す。

【図 2 0 B】感染後 2 4 時間及び 7 2 時間の時点での 3 名のドナーからのヒトの解離腫瘍細胞における K Y 及び E F 株のコピー数をプロットした図を示す。

【0 1 1 8】

【図 2 1】N C I - H 1 2 9 9 異種移植モデルに基づく、示されている L N P で処置された動物における腫瘍サイズの経時的変化、及び T G I パーセンテージ計算値を示す。

【0 1 1 9】

【図 2 2】N C I - H 2 1 2 2 異種移植モデルに基づく、示されている L N P で処置された動物における腫瘍サイズの経時的変化、及び T G I パーセンテージ計算値を示す。

【0 1 2 0】

【図 2 3】P C 3 異種移植モデルに基づく、示されている L N P で処置された動物における腫瘍サイズの経時的変化、及び T G I パーセンテージ計算値を示す。

【0 1 2 1】

【図 2 4】示されている処置を受けた動物における経時的な体重の変化（上のパネル）、及び肝臓の化学変化（下のパネル）を示す。

【0 1 2 2】

【図 2 5 A】示されているウイルスゲノムを含む L N P で処置された動物の様々な組織に

10

20

30

40

50

における RT-qPCR に基づく CVA21 鎖 RNA のコピー数を示す。処置後 48 時間の CVA21 (−) 鎖 RNA のコピー数を示す。

【図 25B】示されているウイルスゲノムを含む LNP で処置された動物の様々な組織における RT-qPCR に基づく CVA21 鎖 RNA のコピー数を示す。処置後 7 日目の CVA21 (−) 鎖 RNA のコピー数を示す。

【図 25C】示されているウイルスゲノムを含む LNP で処置された動物の様々な組織における RT-qPCR に基づく CVA21 鎖 RNA のコピー数を示す。示されているウイルスゲノムを含む LNP で処置された動物の様々な組織における、感染 48 時間後または 7 日後の RT-qPCR に基づく CVA21 (+) 鎖 RNA のコピー数をプロットした図を示す。

【0123】

【図 26】示されている組織から抽出された試料のウイルスプラークアッセイの結果を示す。

【0124】

【図 27A】示されているウイルス株に感染させる前に漸増量の IFN で前処理された、示されている細胞系の細胞生存率を示す。生存した細胞の相対パーセンテージの計算では、モック感染群に従って 100% の値を設定し、IFN 前処理なしの CVA21 ウイルス感染群に従って 0% の値を設定している。H1299 細胞系についての結果を示す。

【図 27B】示されているウイルス株に感染させる前に漸増量の IFN で前処理された、示されている細胞系の細胞生存率を示す。生存した細胞の相対パーセンテージの計算では、モック感染群に従って 100% の値を設定し、IFN 前処理なしの CVA21 ウイルス感染群に従って 0% の値を設定している。H2122 細胞系についての結果を示す。

【図 27C】示されているウイルス株に感染させる前に漸増量の IFN で前処理された、示されている細胞系の細胞生存率を示す。生存した細胞の相対パーセンテージの計算では、モック感染群に従って 100% の値を設定し、IFN 前処理なしの CVA21 ウイルス感染群に従って 0% の値を設定している。HFF 細胞系についての結果を示す。

【0125】

【図 28】A は、示されているウイルス株の相対的なリバビリン抵抗性頻度の比率を示す。B は、示されているアッセイ群から回収された、組み換えられた生存ウイルスの量を示す。

【0126】

【図 29】A は、リーダー配列及び 5' リボザイム配列の分析のための鋳型構築物の設計を示す。B は、異なるリーダー配列設計に基づく、示されている *in vitro* 転写産物のゲル電気泳動結果を示す。

【0127】

【図 30】異なる 5' リボザイム設計に基づく、示されている *in vitro* 転写産物のゲル電気泳動結果を示す。

【0128】

【図 31A】NCI-H1299 異種移植モデルを使用して、異なる設計（例えば、異なるポリ A 尾部の長さ及び 5' リボザイム配列）の DNA 鋳型の *in vitro* 転写から得られた RNA ウイルスゲノムを含む、示されている LNP で処置された動物における、腫瘍サイズの経時的变化をプロットした図である。

【図 31B】示されている LNP で処置された動物における腫瘍サイズの経時的变化をプロットした図を示す。

【0129】

【図 32】3 つの CVA21 株（EF、KY、及び Kuykendall）の RNA ウイルスゲノムのドメイン構成の概略及び選択的領域の核酸開始／終了位置を示す。

【0130】

【図 33】CVA21 発現構築物設計の非限定的な例、ならびに 5' 及び 3' に正確な末端を有する合成 RNA ウイルスゲノムを生成するための対応する *in vitro* 転写プロ

10

20

30

40

50

セスの概略図を示す。

【0131】

【図34】SVVウイルスゲノムのドメイン構成及びキメラウイルスの構築を示す概略図である。

【0132】

【図35】GFPレポーター遺伝子を有するSVV-001またはSVV-IRESキメラウイルスに感染させたNCI-H69AR細胞の蛍光顕微鏡検査画像を示す。

【0133】

【図36】IFN α 前処理ありまたはなしで示されているSVVビリオンに感染させたNCI-H69AR及びNCI-H69細胞の蛍光強度をプロットした図（左）、ならびに感染12時間後の代表的な蛍光画像（右）を示す。

【0134】

【図37】GFPレポーター遺伝子を有するSVV-001またはSVV-P1キメラウイルスに感染させたNCI-H69AR細胞の蛍光顕微鏡検査画像を示す。

【0135】

【図38】A及びBは、GFPレポーター遺伝子を有するSVV-001またはSVV-P3キメラウイルスに感染させたNCI-H69AR細胞の蛍光顕微鏡検査画像を示す。

【0136】

【図39A】SVV鑄型のリーダー配列及び5'リボザイム配列の分析のための鑄型構築物の設計を示す。

【図39B】SVV鑄型の異なるリーダー配列設計に基づく、示されているin vitro転写産物のゲル電気泳動結果を示す。

【図39C】H1299細胞を使用したウイルスプラークアッセイの結果を示す。

【図39D】異なるSVVリーダー配列を使用したウイルスゲノムのin vitro転写産物のRP-HPLC分析を示す。

【0137】

【図40A】H446腫瘍を担持する胸腺欠損ヌードマウスを示されているLNPで処置した、in vivo用量滴定有効性研究の結果を示す。経時的な腫瘍サイズを示す。

【図40B】H446腫瘍を担持する胸腺欠損ヌードマウスを示されているLNPで処置した、in vivo用量滴定有効性研究の結果を示す。0.1mg/kgの96062-1 LNPで処置されたマウスの腫瘍組織におけるSVV複製に関するRT-qPCR測定値を示す。

【図40C】H446腫瘍を担持する胸腺欠損ヌードマウスを示されているLNPで処置した、in vivo用量滴定有効性研究の結果を示す。SVV複製についてのFISHアッセイを示す。

【0138】

【図41】LNPで処置されたH446腫瘍を担持するマウスの経時的な腫瘍サイズを示す。

【0139】

【図42】H446 SCLC腫瘍モデルに基づく、示されているLNPで処置された動物における腫瘍サイズの経時的变化を示す。

【0140】

【図43】H446 SCLC腫瘍モデルに基づく、抗SVV中和抗体の存在下または非存在下の、示されているLNPまたはSVVビリオンで処置された動物における腫瘍サイズの経時的变化を示す。

【0141】

【図44】H82 SCLC腫瘍モデルに基づく、示されているLNPで処置された動物における腫瘍サイズの経時的变化を示す。

【0142】

【図45】H82 SCLC同所性腫瘍モデルに基づく、示されているLNPで処置され

10

20

30

40

50

た動物における経時的な生存の確率を示す。

【0143】

【図46A】hDLL3 IHCに基づく腫瘍量の量的分析を示すチャートである。

【図46B】hDLL3 IHC画像を示す。

【0144】

【図47A】SCLC PDX腫瘍モデルのSVV処置結果を示す。SCLC PDX腫瘍モデルに基づく、示されているLNPで処置された動物における腫瘍サイズの経時的变化を示す。

【図47B】SCLC PDX腫瘍モデルのSVV処置結果を示す。RT-qPCR測定の結果を示す。

【0145】

【図48】異なる長さのポリA尾部を有するSVV RNAウイルスゲノムを含む、示されているLNPで処置された動物における腫瘍サイズの経時的变化を示す。

【0146】

【図49A】N1E-115同系神経芽細胞腫モデルにおける免疫細胞浸潤ならびにSVV/LNP及び抗PD1の併用処置の効果を示す。腫瘍1mg当たりのNK、NKT、CD4、CD8、及びTreg細胞の数を示す。

【図49B】N1E-115同系神経芽細胞腫モデルにおける免疫細胞浸潤ならびにSVV/LNP及び抗PD1の併用処置の効果を示す。CD8/Treg比を示す。

【図49C】N1E-115同系神経芽細胞腫モデルにおける免疫細胞浸潤ならびにSVV/LNP及び抗PD1の併用処置の効果を示す。腫瘍1mg当たりの、CTLA-4またはPD-1を発現するCD8 T細胞の数を示す。

【図49D】N1E-115同系神経芽細胞腫モデルにおける免疫細胞浸潤ならびにSVV/LNP及び抗PD1の併用処置の効果を示す。腫瘍1mg当たりの、SLEC(CD127-KLRG1+)またはMPEC(CD127+-KLRG1-)であるCD8 T細胞の数を示す。

【図49E】N1E-115同系神経芽細胞腫モデルにおける免疫細胞浸潤ならびにSVV/LNP及び抗PD1の併用処置の効果を示す。M1/M2マクロファージの比率を示す。

【図49F】N1E-115同系神経芽細胞腫モデルにおける免疫細胞浸潤ならびにSVV/LNP及び抗PD1の併用処置の効果を示す。M1及びM2マクロファージの数を示す。

【図49G】N1E-115同系神経芽細胞腫モデルにおける免疫細胞浸潤ならびにSVV/LNP及び抗PD1の併用処置の効果を示す。腫瘍1mg当たりのCD45-PD-L1+細胞の数を示す。

【0147】

【図50】N1E-115同系神経芽細胞腫モデルに基づく、示されているLNPで処置された動物における腫瘍サイズの経時的变化を示す。

【0148】

【図51】N1E-115同系神経芽細胞腫モデルを有する動物におけるSVV-LNP及び抗PD1療法の複合効果を示す。

【0149】

【図52A】本開示のLNP組成物を繰り返し投薬した際の腫瘍の成長を示すH446マウス腫瘍モデルの結果を表すチャートである。

【図52B】LNP組成物を投与した際のH446マウス腫瘍モデルの体重変化を表すチャートである。

【0150】

【図53A】PEG2k-DPG、PEG2k-DMG、またはBRIJ(商標)S100をPEG脂質として含むLNP組成物のマウスにおけるPK研究の結果を表すチャートである。

10

20

30

40

50

【図53B】PEG2k-DPG、PEG2k-DMG、またはBRIJ（商標）S100をPEG脂質として含むLNP組成物のマウスにおけるPK研究の結果を表すチャートである。

【0151】

【図54A】オリゴdTクロマトグラフィーを使用した、様々なポリA尾部の長さのCV A21ウイルスゲノムのUV A280吸収プロファイルを示す。

【図54B】オリゴdTクロマトグラフィーを使用した、様々なポリA尾部の長さのSV VウイルスゲノムのUV A280吸収プロファイルを示す。

【0152】

【図55】A～Cは、CAT4及びCAT5のLNP組成物の粒子の特徴を示す。Aは、粒径を示し、Bは、様々なRNA酸性化緩衝液を用いて作製されたCAT4及びCAT5のLNP組成物の動的光散乱実験で決定された多分散指数を示す。Cは、RiboGreenによって測定されたこれらのLNP組成物のカプセル化効率を示す。

10

【0153】

【図56】A～Cは、示されているCAT脂質を含むLNP組成物の粒子の特徴を示す。Aは、粒径を示し、Bは、LNP組成物の動的光散乱実験で決定された多分散指数を示す。Cは、RiboGreenによって測定されたこれらのLNP組成物のカプセル化効率を示す。

【0154】

【図57】LNP製剤の製剤化プロセスの概略表現を示す。

20

【0155】

【図58A】NanoLucルシフェラーゼ活性化によって測定されたRNAレベルを示す。それぞれのLNP製剤の投薬96時間後のNanoLucルシフェラーゼ活性化によって測定されたRNAレベルを示す。

【図58B】NanoLucルシフェラーゼ活性化によって測定されたRNAレベルを示す。それぞれのLNP製剤の投薬96時間後のNanoLucルシフェラーゼ活性化によって測定されたRNAレベルを示す。

【図58C】NanoLucルシフェラーゼ活性化によって測定されたRNAレベルを示す。それぞれのLNP製剤の投薬96時間後のNanoLucルシフェラーゼ活性化によって測定されたRNAレベルを示す。

30

【図58D】NanoLucルシフェラーゼ活性化によって測定されたRNAレベルを示す。それぞれのLNP製剤の投薬72時間後のNanoLucルシフェラーゼ活性化によって測定されたRNAレベルを示す。

【図58E】NanoLucルシフェラーゼ活性化によって測定されたRNAレベルを示す。それぞれのLNP製剤の投薬72時間後のNanoLucルシフェラーゼ活性化によって測定されたRNAレベルを示す。

【図58F】NanoLucルシフェラーゼ活性化によって測定されたRNAレベルを示す。それぞれのLNP製剤の投薬72時間後のNanoLucルシフェラーゼ活性化によって測定されたRNAレベルを示す。

【0156】

40

【図59A】それぞれのLNP製剤で処置されたマウスの処置期間にわたる腫瘍体積（左）及び体重変化（右）を示す。CAT1、2、3、4、及び5のLNP製剤についての結果を示す。

【図59B】それぞれのLNP製剤で処置されたマウスの処置期間にわたる腫瘍体積（左）及び体重変化（右）を示す。CAT6、7、8、9、10のLNP製剤についての結果を示す。

【図59C】それぞれのLNP製剤で処置されたマウスの処置期間にわたる腫瘍体積（左）及び体重変化（右）を示す。CAT11、12、13、14、15、16についての結果を示す。

【図59D】それぞれのLNP製剤で処置されたマウスの処置期間にわたる腫瘍体積（左

50

）及び体重変化（右）を示す。CAT 17、19、20、25、31、及び7のLNP製剤についての結果を示す。

【図59E】それぞれのLNP製剤で処置されたマウスの処置期間にわたる腫瘍体積（左）及び体重変化（右）を示す。CAT 18、21、22、23、26、28、29、32、34のLNP製剤についての結果を示す。

【0157】

【図60A】示されているLNP製剤についての*in vivo* RNAレベルならびに腫瘍体積及び体重に対する効果を示す。それぞれのLNP製剤の投薬72時間後のNanoLucシフェラーゼ活性化によって生成された発光によって測定されたRNAレベルを示す。

10

【図60B】示されているLNP製剤についての*in vivo* RNAレベルならびに腫瘍体積及び体重に対する効果を示す。それぞれのLNP製剤で処置されたマウスの処置期間にわたる腫瘍体積（右）及び体重変化（左）を示す。

【0158】

【図61】A～Dは、LC-MSによって測定された、処置マウスの血漿中の、LNPに含まれるイオン化可能な脂質（SS-OC）の濃度を示す。Aは、Q1W2投薬スケジュールでのOC/Br i jについての結果を示す。Bは、Q2W2投薬スケジュールでのOC/Br i jについての結果を示す。Cは、Q2W2投薬スケジュールでのOC/DMGについての結果を示す。Dは、Q2W2投薬スケジュールでのOC/DPGについての結果を示す。

20

【0159】

【図62A】LC-MSによって測定された、処置マウスの血漿中の、LNPに含まれるイオン化可能な脂質（SS-OCまたはCAT 7）の濃度を示す。Q2W2投薬スケジュールでのOC/Br i jについての結果を示す。

【図62B】LC-MSによって測定された、処置マウスの血漿中の、LNPに含まれるイオン化可能な脂質（SS-OCまたはCAT 7）の濃度を示す。Q2W2投薬スケジュールでのCAT 7/DMG__6についての結果を示す。

【図62C】LC-MSによって測定された、処置マウスの血漿中の、LNPに含まれるイオン化可能な脂質（SS-OCまたはCAT 7）の濃度を示す。Q2W2投薬スケジュールでのCAT 7/DMG__3についての結果を示す。

30

【図62D】LC-MSによって測定された、処置マウスの血漿中の、LNPに含まれるイオン化可能な脂質（SS-OCまたはCAT 7）の濃度を示す。Q2W2投薬スケジュールでのCAT 7/DMG__5についての結果を示す。

【図62E】LC-MSによって測定された、処置マウスの血漿中の、LNPに含まれるイオン化可能な脂質（SS-OCまたはCAT 7）の濃度を示す。Q2W2投薬スケジュールでのCAT 7/DMG1__1についての結果を示す。

【図62F】LC-MSによって測定された、処置マウスの血漿中の、LNPに含まれるイオン化可能な脂質（SS-OCまたはCAT 7）の濃度を示す。Q2W2投薬スケジュールでのCAT 7/CHM6__4についての結果を示す。

【0160】

40

【図63A】LC-MSによって測定された、処置マウスの血漿中の、LNPに含まれるイオン化可能な脂質（SS-OC、CAT 7、またはCAT 11）の濃度を示す。CAT 7/Br i jについての結果を示す。

【図63B】LC-MSによって測定された、処置マウスの血漿中の、LNPに含まれるイオン化可能な脂質（SS-OC、CAT 7、またはCAT 11）の濃度を示す。OC/DMGについての結果を示す。

【図63C】LC-MSによって測定された、処置マウスの血漿中の、LNPに含まれるイオン化可能な脂質（SS-OC、CAT 7、またはCAT 11）の濃度を示す。CAT 7/CHM6__4についての結果を示す。

【図63D】LC-MSによって測定された、処置マウスの血漿中の、LNPに含まれる

50

イオン化可能な脂質（SS-OC、CAT7、またはCAT11）の濃度を示す。CAT11 / DMG についての結果を示す。

【図63E】LC-MSによって測定された、処置マウスの血漿中の、LNPに含まれるイオン化可能な脂質（SS-OC、CAT7、またはCAT11）の濃度を示す。CAT11 / Birj についての結果を示す。

【0161】

【図64A】ELISAアッセイによって測定された、それぞれのLNP製剤で処置されたマウスの、示されている時点でのIgMレベルを示す。

【図64B】ELISAアッセイによって測定された、それぞれのLNP製剤で処置されたマウスの、示されている時点でのIgMレベルを示す。

【0162】

【図65A】ELISAアッセイによって測定された、それぞれのLNP製剤で処置されたマウスの、示されている時点でのIgGレベルを示す。

【図65B】ELISAアッセイによって測定された、それぞれのLNP製剤で処置されたマウスの、示されている時点でのIgGレベルを示す。

【0163】

【図66】A及びBは、ECLアッセイによって測定されたmRNA BITE（A）またはhEPO（B）の血漿レベルを示す。

【0164】

【図67】CAT7を含むLNPのスクリーニング実験のA最適（A-optimal）設計を示す。

【0165】

【図68】CAT7を含むLNPの実験設計ランに基づき、かつSVEM（Self-Validated Ensemble Modeling）法を使用してモデル化された、予測プロファイラーを示す。

【発明を実施するための形態】

【0166】

当技術分野には、特定のがんタイプにおいて適切なトロピズム及び高い効力を有する特異的腫瘍溶解性ウイルス株を選択する必要性がある。異なるウイルス株は、同じ種からのものであっても、がん細胞の殺傷における有効性及び毒性の点で大きく異なる。キメラウイルスは、1つのウイルス株のウイルスゲノムの部分を異なる株の対応する部分で置き換えることによって生成され得る。いくつかの実施形態では、そのようなキメラウイルスは、がん細胞の殺傷においてより有効であり得、及び／または他の有利な特性を有し得る。さらに、そのようなウイルスまたは対応するウイルスゲノムを含む組成物の生産は、ベクター鑄型の設計及び製造プロセス（例えば、発現、精製、カプセル化、及び貯蔵）の最適化を必要とする。いくつかの実施形態では、本開示は、in vitroでのウイルス発現のためのウイルスゲノム及び鑄型ベクターの設計を提供する。いくつかの実施形態では、ウイルスゲノムは複製可能である。本開示は、対象に繰り返し投与され得る、脂質ナノ粒子、ポリマーナノ粒子、またはエクソソームなどの非免疫原性粒子にカプセル化され得るウイルスゲノムも提供する。いくつかの実施形態では、粒子は、ペイロード分子をコードするポリヌクレオチドをさらにカプセル化する。したがって、本開示は、安全で有効な組換えポリヌクレオチドベクターの全身送達を可能にし、広範囲の増殖性障害（例えば、がん）の処置及び防止のための方法を提供する。

【0167】

本明細書で使用されるセクションの見出しは、構成を目的としたものにすぎず、記載された主題を限定するものとして解釈されてはならない。特許、特許出願、論文、書籍、及び論説を含むがこれらに限定されない、本明細書で引用されるすべての文書または文書の一部は、その全体があらゆる目的のために参照により明示的に本明細書に組み込まれる。組み込まれた文書または文書の一部の1つ以上が、ある用語を定義し、それが本出願でのその用語の定義と矛盾する場合、本出願に記載される定義が優先する。しかしながら、本

10

20

30

40

50

明細書で引用されるいずれの参考文献、論文、刊行物、特許、特許公開、及び特許出願の言及も、それらが有効な先行技術を構成する、または世界のいずれかの国における一般的な知識の一部を形成するという認識でも、いかなる形態の示唆でもなく、そのように解釈されるべきではない。

【0168】

定義

本明細書では、あらゆる濃度の範囲、パーセンテージの範囲、比の範囲、または整数の範囲は、別段示されない限り、記述された範囲内のあらゆる整数の値、及び適切な場合には、その分数（整数の10分の1及び100分の1など）を含むものと理解されたい。本明細書で使用される「a」及び「an」という用語は、別段示されない限り、列挙された構成要素の「1つ以上」を指すことを理解されたい。代替手段（例えば、「または」）の使用は、代替手段の一方、両方、またはそれらの任意の組み合わせのいずれかを意味すると理解されるべきである。本明細書で使用される場合、「含む（include）」及び「含む（comprise）」という用語は同義語として使用される。本明細書で使用される場合、「複数」は、1つ以上の構成要素（例えば、1つ以上のmiRNA標的配列）を指し得る。本出願では、「または」の使用は、別途記載のない限り、「及び／または」を意味する。

10

【0169】

本出願で使用される場合、「約」及び「およそ」という用語は、均等物として使用される。本出願で使用される任意の数字は、約／およその有無にかかわらず、関連技術分野の当業者によって認識されるあらゆる正常変動をカバーすることを意図する。ある特定の実施形態では、「およそ」または「約」という用語は、別途記載のない限りまたは別途文脈から明らかでない限り（かかる数が可能な値の100%を超える場合を除く）、述べられた基準値のいずれかの方向（上回るまたは下回る）において、10%に含まれる値の範囲を指す。いくつかの実施形態では、「およそ」または「約」という用語は、別途記載のない限りまたは別途文脈から明らかでない限り（かかる数が可能な値の100%を超える場合を除く）、述べられた基準値のいずれかの方向（上回るまたは下回る）において、10%に含まれる値の範囲を指す。

20

【0170】

「減少する」または「低減する」は、基準値と比較した、特定の値の少なくとも5%、例えば、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、99、または100%の減少または低減を指す。特定の値の減少または低減はまた、基準値と比較した値の倍数変化として表すことができ、例えば、基準値と比較して少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、500、1000倍以上の減少である。

30

【0171】

「増加」は、基準値と比較した、特定の値の少なくとも5%、例えば5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、99、100、200、300、400、500%以上の増加を指す。特定の値の増加はまた、基準値と比較した値の倍数変化として表すことができ、例えば、基準値のレベルと比較して、少なくとも1倍、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、500、1000倍以上の増加である。

40

【0172】

「配列同一性」という用語は、同じであり、同じ相対位置にある2つのポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列間の塩基またはアミノ酸のパーセンテージを指す。かかるものとして、1つのポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列は、別のポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列と比較して、特定のパーセンテージの配列同一性を有する。配列比較の場合、通常、1つの配列が基準配列として機能し、試験配列が比較される。「基準配列

50

」という用語は、試験配列が比較される分子を指す。特記なき限り、特許請求の範囲における「配列同一性」という用語は、デフォルトパラメータを使用してC l u s t a l O m e g a（登録商標）バージョン1.2.4によって計算された配列同一性を指す。

【0173】

「に由来する」という用語は、基準のポリペプチドまたはポリヌクレオチド配列の全部または一部を含むポリペプチドまたはポリヌクレオチド配列を指す。例えば、本明細書に記載されるS V VまたはC V AゲノムをコードするRNAポリヌクレオチドは、基準のS V VまたはC V Aゲノム（例えば、天然に存在するまたは修飾されたS V VまたはC V Aゲノム）の全部または一部に由来するポリヌクレオチド配列を含み得る。基準のポリペプチドまたはポリヌクレオチド配列「に由来する」ポリペプチドまたはポリヌクレオチド配列には、基準のポリペプチドまたはポリヌクレオチド配列に比してもう1つのアミノ酸または核酸変異（例えば、置換、欠失、及び／または挿入）を含むポリペプチド及び／またはポリヌクレオチド配列も含まれる。

10

【0174】

「相補的」は、天然に存在するまたは天然に存在しない（例えば、上記のように修飾された）塩基（ヌクレオチド）またはその類似体を含む2つの配列間の、塩基スタッキング及び特異的水素結合を介した対形成の能力を指す。例えば、核酸のある位置の塩基が、標的の対応する位置の塩基と水素結合することができる場合、これらの塩基は、その位置で互いに相補的であると考えられる。核酸は、普遍的な塩基、または水素結合に正または負の寄与を提供しない不活性な脱塩基スペーサーを含むことができる。塩基対には、標準的なワトソン-クリック塩基対及び非ワトソン-クリック塩基対（例えば、ゆらぎ塩基対及びフーグスティーン塩基対）の両方が含まれ得る。相補的塩基対の場合、アデノシン型塩基（A）はチミジン型塩基（T）またはウラシル型塩基（U）に相補的であり、シトシン型塩基（C）はグアノシン型塩基（G）に相補的であり、3-ニトロピロールまたは5-ニトロインドールなどの普遍的な塩基は、任意のA、C、U、またはTとハイブリダイズし、それらに相補的であると考えられることが理解される。Nichols et al., Nature, 1994; 369: 492-493、及びLoakes et al., Nucleic Acids Res., 1994; 22: 4039-4043。イノシン（I）もまた、当技術分野において普遍的な塩基であると考えられており、任意のA、C、U、またはTに相補的であると考えられている。Watkins and Santalucia, Nucleic Acids Research, 2005; 33(19): 6258-6267を参照されたい。

20

30

【0175】

「発現カセット」または「発現構築物」は、プロモーターと作動可能に連結されたポリヌクレオチド配列を指す。「作動可能に連結された」とは、そのように記載された構成要素が、それらが意図された様式で機能することを可能にする関係にある並置を指す。例えば、プロモーターがポリヌクレオチド配列の転写または発現に影響を与える場合、プロモーターはポリヌクレオチド配列に作動可能に連結されている。

【0176】

「対象」という用語は、例えば、哺乳動物などの動物を含む。いくつかの実施形態では、哺乳動物は、霊長類である。いくつかの実施形態では、哺乳動物は、ヒトである。いくつかの実施例では、対象は、畜牛、ヒツジ、ヤギ、乳牛、ブタなどの畜産動物、またはイヌ及びネコなどの飼育慣らされた動物である。いくつかの実施形態では（例えば、特に研究の文脈において）、対象は、げっ歯類（例えば、マウス、ラット、ハムスター）、ウサギ、霊長類、または近交系ブタのようなブタなどである。「対象」及び「患者」という用語は、本明細書では互換的に使用される。

40

【0177】

「投与」は、本明細書において、薬剤または組成物を対象に導入すること、あるいは組成物を細胞及び／または組織と接触させることを指す。

【0178】

50

本明細書で使用される「処置」は、生理学的結果に影響を与えるために、薬剤または組成物を対象に送達することを指す。いくつかの実施形態では、処置は、哺乳動物、例えば、ヒトにおける疾患の処置を指し、(a) 疾患を阻害すること、すなわち疾患の発症を阻止すること、または疾患の進行を防止すること、(b) 疾患を軽減する、すなわち疾患の状態の退行をもたらすこと、及び(c) 疾患を治癒させることを含む。

【0179】

「有効量」という用語は、特定の生理学的効果をもたらすのに必要な薬剤または組成物の量を指す（例えば、特定の生理学的効果を増加、活性化、及び／または増強するのに必要な量）。特定の薬剤の有効量は、質量／体積、細胞数／体積、粒子／体積、（薬剤の質量）／（対象の質量）、細胞数／（対象の質量）、または粒子／（対象の質量）などの薬剤の性質に基づいて、様々な方法で表され得る。特定の薬剤の有効量は、最大半量有効濃度（EC₅₀）として表すこともでき、これは、基準レベル及び最大応答レベルの中間にある大きさの特定の生理学的応答をもたらす薬剤の濃度を指す。

【0180】

細胞の「集団」は、1を超える任意の数の細胞を指すが、好ましくは、少なくとも 1×10^3 個の細胞、少なくとも 1×10^4 個の細胞、少なくとも 1×10^5 個の細胞、少なくとも 1×10^6 個の細胞、少なくとも 1×10^7 個の細胞、少なくとも 1×10^8 個の細胞、少なくとも 1×10^9 個の細胞、少なくとも 1×10^{10} 個の細胞、またはそれ以上の細胞である。細胞の集団は、*in vitro*の集団（例えば、培養中の細胞の集団）または*in vivo*の集団（例えば、特定の組織に存在する細胞の集団）を指し得る。

【0181】

「エフェクター機能」は、標的細胞または標的抗原に対する免疫応答の生成、維持、及び／または増強に関連する免疫細胞の機能を指す。

【0182】

「マイクロRNA」、「miRNA」、及び「miR」という用語は、本明細書では互換的に使用され、分解または翻訳抑制のためにそれらの標的メッセンジャーRNA（mRNA）を誘導することによって遺伝子発現を制御する、約21～25ヌクレオチドの長さの小さなノンコーディング内因性RNAを指す。

【0183】

本明細書で使用される「組成物」という用語は、対象または細胞に投与または送達することができる、本明細書に記載の組換えRNA分子または粒子カプセル化組換えRNA分子の製剤を指す。

【0184】

「薬学的に許容される」という表現は、本明細書では、安全な医学的判断の範囲内で、過度の毒性、刺激、アレルギー反応、または他の問題もしくは合併症を伴わずに、ヒト及び動物の組織と接触させて使用するのに好適であり、妥当なベネフィット／リスク比に見合う、化合物、材料、組成物、及び／または剤形を指すように用いられる。

【0185】

本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される担体、希釈剤、または賦形剤」は、限定されるものではないが、ヒト及び／または家畜動物での使用に許容されるものとして米国食品医薬品局によって承認されている、任意のアジュバント、担体、賦形剤、流動促進剤、甘味剤、希釈剤、防腐剤、染料／着色剤、風味増強剤、界面活性剤、湿潤剤、分散剤、懸濁剤、安定剤、等張剤、溶媒、界面活性剤、及び／または乳化剤を含む。

【0186】

「複製可能なウイルスゲノム」という用語は、ウイルス複製及び感染性ウイルス粒子の産生に必要なすべてのウイルス遺伝子をコードするウイルスゲノムを指す。

【0187】

「腫瘍溶解性ウイルス」という用語は、がん細胞に優先的に感染するように修飾されているか、または天然にがん細胞に優先的に感染するウイルスを指す。

【0188】

10

20

30

40

50

「ベクター」という用語は、別の核酸分子を輸送、コード、または運搬することができる核酸分子を指すために本明細書で使用される。

【0189】

アミノ酸または核酸の位置（複数可）に関して本明細書で使用される「に対応する（corresponding to）」または「に対応する（correspond to）」という用語は、第1及び基準のポリペプチド／ポリヌクレオチド配列がアラインされたとき、基準のポリペプチド／ポリヌクレオチド配列における所定のアミノ酸／核酸とアラインする、第1のポリペプチド／ポリヌクレオチド配列における位置（複数可）を指す。アラインメントは、この目的のために設計されたソフトウェア、例えば、Clustal Omegaバージョン1.2.4を使用して、そのバージョンでのデフォルトパラメータを用いて、当業者によって行われる。

10

【0190】

「カプセル化効率」または「EE%」という用語は、LNPへの封入に成功した標的分子（例えば、合成RNAウイルスゲノム）のパーセンテージを指す。カプセル化効率は、次式：

$$(EE\%) = (W_t / W_i) \times 100\%$$

を使用して計算することができ、式中、 W_t は、LNP懸濁液中の薬物の総量であり、 W_i は、調製中に最初に加えられた薬物の総量である。説明のための例として、組成物に最初に提供された合計100mgの標的分子のうち、97mgの標的分子がLNPに封入される場合、カプセル化効率は97%と与えられ得る。

20

【0191】

「脂質窒素対リン酸比」または「(N:P)」という用語は、脂質ナノ粒子中の核酸リン酸基に対する正に帯電可能な脂質アミン基の比を指す。

【0192】

「半減期」という用語は、分子（例えば、脂質ナノ粒子にカプセル化された分子）の薬物動態特性を指す。半減期は、例えば、血清中で（すなわち、循環半減期）、または他の組織で測定した場合に、生物学的プロセス（例えば、代謝、排泄、加速血液クリアランスなど）を通じて、in vivoで既知量の50%の分子をその投与後に対象の身体（例えば、ヒト患者または他の哺乳動物）またはその特定のコンパートメントから排除するのに必要な時間として表すことができる。一般に、半減期の増加は、投与された分子の循環中の平均滞留時間（MRT）の増加をもたらす。

30

【0193】

「加速血液クリアランス」または「ABC」という用語は、ある特定の医薬品（例えば、PEG含有LNP）が第2及び後続の投与の際に血液から迅速に排除される現象を指す。ABCは、リボソーム及びLNPを含む多くの脂質送達ビヒクルについて観察されている。

【0194】

本明細書で使用される場合、脂質組成物に関して（例えば、総脂質含有量に占めるパーセンテージとして）使用される場合の「比」という用語は、明らかに別の意味が示されない限り、モル比を指す。総脂質含有量に占めるパーセンテージとしてのモル比は、「mol%」によって表すこともできる。例えば、「49:22:28.5:0.5mol%」は、49:22:28.5:0.5のモル比を意味する。

40

【0195】

本明細書で使用される「脂肪族」または「脂肪族基」という用語は、完全に飽和している、もしくは1つ以上の不飽和単位を含む、直鎖（すなわち、非分岐状）もしくは分岐状で、置換もしくは非置換の炭化水素鎖、または、完全に飽和している、もしくは1つ以上の不飽和単位を含むが、分子の残部に対する単一の結合点を有する、芳香族ではない単環式炭化水素もしくは二環式炭化水素（本明細書では「炭素環」、「脂環式」、または「シクロアルキル」とも称される）を意味する。別段の規定がない限り、脂肪族基は1～6つの脂肪族炭素原子を含む。いくつかの実施形態では、脂肪族基は1～5つの脂肪族炭素原

50

子を含む。他の実施形態では、脂肪族基は1～4つの脂肪族炭素原子を含む。さらに他の実施形態では、脂肪族基は1～3つの脂肪族炭素原子を含み、なおも他の実施形態では、脂肪族基は1～2つの脂肪族炭素原子を含む。いくつかの実施形態では、「脂環式」（または「炭素環」もしくは「シクロアルキル」）は、完全に飽和している、または1つ以上の不飽和単位を含むが、分子の残部に対する単一の結合点を有する、芳香族ではない単環式 C_3-C_6 炭化水素を指す。好適な脂肪族基は、線状または分岐状、置換または非置換のアルキル、アルケニル、アルキニル基、及びそれらのハイブリッド、例えば（シクロアルキル）アルキル、（シクロアルケニル）アルキル、または（シクロアルキル）アルケニルを含むが、これらに限定されない。

【0196】

本明細書で使用される「アルキル」という用語は、規定数の炭素原子を有する分岐状または非分岐状の飽和炭化水素基である。いくつかの実施形態では、アルキルは、3つの炭素原子（ C_3 ）を有する分岐状または非分岐状の飽和炭化水素基を指す。いくつかの実施形態では、アルキルは、6つの炭素原子（ C_6 ）を有する分岐状または非分岐状の飽和炭化水素基を指す。いくつかの実施形態では、「アルキル」という用語は、メチル、エチル、 n -プロピル、イソプロピル、 n -ブチル、イソブチル、 s -ブチル、 t -ブチル、 n -ペンチル、イソペンチル、 s -ペンチル、ネオペンチル、及びヘキシルを含むが、これらに限定されない。

【0197】

本明細書で使用される場合、「アルキレン」という用語は、二価アルキル基を指す。「アルキレン鎖」は、ポリメチレン基、すなわち、 $-(CH_2)_n-$ であり、ここで、 n は、正の整数、好ましくは1～6、1～4、1～3、1～2、または2～3である。置換アルキレン鎖は、1つ以上のメチレン水素原子が置換基で置き換えられているポリメチレン基である。好適な置換基には、置換脂肪族基について後述するものが含まれる。

【0198】

単独で、または「アラルキル」、「アラルコキシ」、もしくは「アリーロキシアルキル」のように、より大きな部分の一部として使用される「アリール」という用語は、合計5～14個の環員を有する単環式及び二環式の環系を指し、この系における少なくとも1つの環は芳香族であり、この系における各環は3～7個の環員を含む。「アリール」という用語は、「アリール環」という用語と互換的に使用され得る。本開示のある特定の実施形態では、「アリール」は、1つ以上の置換基を有し得る、フェニル、ビフェニル、ナフチル、アントラシルなどを含むがこれらに限定されない芳香族環系を指す。「アリール」という用語が本明細書で使用される場合、その範囲には、インダニル、フタリミジル、ナフチミジル、フェナントリジニル、またはテトラヒドロナフチルなど、1つ以上の非芳香族環に芳香族環が縮合している基も含まれる。

【0199】

単独で、または「ヘテロアラルキル」もしくは「ヘテロアラルコキシ」などのより大きな部分の一部として使用される「ヘテロアリール」及び「ヘテロアラ（heteroar）」という用語は、5～10個の環原子、好ましくは5、6、または9個の環原子を有し、環状配置で共有された6、10、または14個の π 電子を有し、かつ炭素原子に加えて1～5個のヘテロ原子を有する基を指す。「ヘテロ原子」という用語は、窒素、酸素、または硫黄を指し、あらゆる酸化型の窒素または硫黄、及びあらゆる四級化型の塩基性窒素を含む。ヘテロアリール基は、限定されるものではないが、チエニル、フラニル、ピロリル、イミダゾリル、ピラゾリル、トリアゾリル、テトラゾリル、オキサゾリル、イソオキサゾリル、オキサジアゾリル、チアゾリル、イソチアゾリル、チアジアゾリル、ピリジニル、ピリダジニル、ピリミジニル、ピラジニル、インドリジニル、プリニル、ナフチリジニル、及びプテリジニルを含む。本明細書で使用される「ヘテロアリール」及び「ヘテロアラ（heteroar）」という用語には、ヘテロ芳香族環が1つ以上のアリール、脂環式、またはヘテロシクリル環に縮合しており、ラジカルまたは結合点がヘテロ芳香族環上にある基も含まれる。非限定的な例としては、インドリル、イソインドリル、ベンゾ

10

20

30

40

50

チエニル、ベンゾフラニル、ジベンゾフラニル、インダゾリル、ベンズイミダゾリル、ベンズチアゾリル、キノリル、イソキノリル、シンノリニル、フタラジニル、キナゾリニル、キノキサリニル、4H-キノリジニル、カルバゾリル、アクリジニル、フェナジニル、フェノチアジニル、フェノキサジニル、テトラヒドロキノリニル、テトラヒドロイソキノリニル、及びピリド[2,3-b]-1,4-オキサジン-3(4H)-オンが挙げられる。ヘテロアリール基は、単環式または二環式であり得る。「ヘテロアリール」という用語は、「ヘテロアリール環」、「ヘテロアリール基」、または「ヘテロ芳香族」という用語と互換的に使用することができ、これらの用語はいずれも、場合により置換されている環を含む。「ヘテロアルキル」という用語は、ヘテロアリールによって置換されたアルキル基を指し、ここで、アルキル及びヘテロアリール部分は、独立的に、場合により置換されている。

10

【0200】

「ハロ脂肪族」という用語は、1つ以上のハロゲン原子で置換されている脂肪族基を指す。

【0201】

「ハロアルキル」という用語は、1つ以上のハロゲン原子で置換されている直鎖または分岐状のアルキル基を指す。

【0202】

「ハロゲン」という用語は、F、Cl、Br、またはIを意味する。

【0203】

本明細書で使用される場合、「複素環」、「ヘテロシクリル」、「複素環式ラジカル」、及び「複素環式環」という用語は、互換的に使用され、飽和または部分不飽和であり、炭素原子に加えて、上記で定義したようなヘテロ原子を1つ以上、好ましくは1~4つ有する、安定な5~7員単環式または7~10員二環式複素環式部分を指す。複素環の環原子に関して使用される場合、「窒素」という用語には置換された窒素が含まれる。一例として、酸素、硫黄または窒素から選択される0~3つのヘテロ原子を有する飽和または部分不飽和の環において、窒素はN(3,4-ジヒドロ-2H-ピロリルなどの場合)、NH(ピロリジニルなどの場合)、または⁺NR(TV置換ピロリジニルなどの場合)であり得る。複素環式環は、安定な構造をもたらす任意のヘテロ原子または炭素原子でそのペンダント基に結合していてもよく、いずれかの環原子は、場合により置換されていてもよい。かかる飽和または部分不飽和の複素環式ラジカルの例は、限定されるものではないが、テトラヒドロフラニル、テトラヒドロチオフェニルピロリジニル、ピペリジニル、ピロリニル、テトラヒドロキノリニル、テトラヒドロイソキノリニル、デカヒドロキノリニル、オキサゾリジニル、ピペラジニル、ジオキサニル、ジオキサラニル、ジアゼピニル、オキサゼピニル、チアゼピニル、モルホリニル、及びキヌクリジニルを含む。「複素環」、「ヘテロシクリル」、「ヘテロシクリル環」、「複素環式基」、「複素環式部分」、及び「複素環式ラジカル」という用語は、本明細書では互換的に使用され、インドリニル、3H-インドリル、クロマニル、フェナントリジニル、またはテトラヒドロキノリニルなど、1つ以上のアリール、ヘテロアリール、または脂環式環にヘテロシクリル環が縮合している基も含み、ラジカルまたは結合点はヘテロシクリル環上にある。ヘテロシクリル基は、単環式または二環式であり得る。「ヘテロシクリルアルキル」という用語は、ヘテロシクリルによって置換されたアルキル基を指し、ここで、アルキル及びヘテロシクリル部分は、独立的に、場合により置換されている。

20

30

40

【0204】

複素環式環は、安定な構造をもたらす任意のヘテロ原子または炭素原子でそのペンダント基に結合していてもよく、いずれかの環原子は、場合により置換されていてもよい。かかる飽和または部分不飽和の複素環式ラジカルの例は、限定されるものではないが、テトラヒドロフラニル、テトラヒドロチオフェニルピロリジニル、ピペリジニル、ピロリニル、テトラヒドロキノリニル、テトラヒドロイソキノリニル、デカヒドロキノリニル、オキサゾリジニル、ピペラジニル、ジオキサニル、ジオキサラニル、ジアゼピニル、オキサゼ

50

ピニル、チアゼピニル、モルホリニル、及びキヌクリジニルを含む。「複素環」、「ヘテロシクリル」、「ヘテロシクリル環」、「複素環式基」、「複素環式部分」、及び「複素環式ラジカル」という用語は、本明細書では互換的に使用され、インドリニル、3H-インドリル、クロマニル、フェナントリジニル、またはテトラヒドロキノリニルなど、1つ以上のアリール、ヘテロアリール、または脂環式環にヘテロシクリル環が縮合している基も含み、ラジカルまたは結合点はヘテロシクリル環上にある。ヘテロシクリル基は、単環式または二環式であり得る。「ヘテロシクリルアルキル」という用語は、ヘテロシクリルによって置換されたアルキル基を指し、ここで、アルキル及びヘテロシクリル部分は、独立的に、場合により置換されている。

【0205】

本明細書に記載されるように、本開示の化合物は、「場合により置換されている」部分を含み得る。概して、「置換」という用語は、「場合により」という用語が先行するか否かにかかわらず、指定された部分の1つ以上の水素が好適な置換基で置き換えられることを意味する。別段示されない限り、「場合により置換されている」基は、その基の置換可能な位置の各々に好適な置換基を有することができ、任意の与えられた構造における複数の位置が特定の群から選択される複数の置換基で置換され得る場合、置換基は各位置で同じであっても異なってもよい。本開示によって想定される置換基の組み合わせは、好ましくは、安定なまたは化学的に実現可能な化合物の形成をもたらすものである。本明細書で使用される場合、「安定」という用語は、本明細書で開示される目的のうちの1つ以上のための、化合物の生産、検出、そしてある特定の実施形態では、それらの回収、精製、及び使用を可能にする条件に供されたとき、実質的に変化しない化合物を指す。

【0206】

「場合により置換されている」基の置換可能な炭素原子上の好適な一価置換基は、独立的に、ハロゲン； $-(CH_2)_0-4R^\circ$ ； $-(CH_2)_0-4OR^\circ$ ； $-O(CH_2)_0-4R^\circ$ ； $-O-(CH_2)_0-4C(O)OR^\circ$ ； $-(CH_2)_0-4CH(OR^\circ)_2$ ； $-(CH_2)_0-4SR^\circ$ ； R° で置換されていてもよい $-(CH_2)_0-4Ph$ ； R° で置換されていてもよい $-(CH_2)_0-4O(CH_2)_0-1Ph$ ； R° で置換されていてもよい $-CH=CHPh$ ； R° で置換されていてもよい $-(CH_2)_0-4O(CH_2)_0-1$ -ピリジル； $-NO_2$ ； $-CN$ ； $-N_3$ ； $-(CH_2)_0-4N(R^\circ)_2$ ； $-(CH_2)_0-4N(R^\circ)C(O)R^\circ$ ； $-N(R^\circ)C(S)R^\circ$ ； $-(CH_2)_0-4N(R^\circ)C(O)NR^\circ_2$ ； $-N(R^\circ)C(S)NR^\circ_2$ ； $-(CH_2)_0-4N(R^\circ)C(O)OR^\circ$ ； $-N(R^\circ)N(R^\circ)C(O)R^\circ$ ； $-N(R^\circ)N(R^\circ)C(O)NR^\circ_2$ ； $-N(R^\circ)N(R^\circ)C(O)OR^\circ$ ； $-(CH_2)_0-4C(O)R^\circ$ ； $-C(S)R^\circ$ ； $-(CH_2)_0-4C(O)OR^\circ$ ； $-(CH_2)_0-4C(O)SR^\circ$ ； $-(CH_2)_0-4C(O)OSiR^\circ_3$ ； $-(CH_2)_0-4OC(O)R^\circ$ ； $-OC(O)(CH_2)_0-4SR^\circ$ ； $SC(S)SR^\circ$ ； $-(CH_2)_0-4SC(O)R^\circ$ ； $-(CH_2)_0-4C(O)NR^\circ_2$ ； $-C(S)NR^\circ_2$ ； $-C(S)SR^\circ$ ； $-SC(S)SR^\circ$ ； $-(CH_2)_0-4OC(O)NR^\circ_2$ ； $-C(O)N(OR^\circ)R^\circ$ ； $-C(O)C(O)R^\circ$ ； $-C(O)CH_2C(O)R^\circ$ ； $-C(NOR^\circ)R^\circ$ ； $-(CH_2)_0-4SSR^\circ$ ； $-(CH_2)_0-4S(O)_2R^\circ$ ； $-(CH_2)_0-4S(O)_2OR^\circ$ ； $-(CH_2)_0-4OS(O)_2R^\circ$ ； $-S(O)_2NR^\circ_2$ ； $-(CH_2)_0-4S(O)R^\circ$ ； $-N(R^\circ)S(O)_2NR^\circ_2$ ； $-N(R^\circ)S(O)_2R^\circ$ ； $-N(OR^\circ)R^\circ$ ； $-C(NH)NR^\circ_2$ ； $-P(O)_2R^\circ$ ； $-P(O)R^\circ_2$ ； $-OP(O)R^\circ_2$ ； $-OP(O)(OR^\circ)_2$ ； SiR°_3 ； $-(C_{1-4}$ 直鎖または分岐状のアルキレン) $O-N(R^\circ)_2$ ；または $-(C_{1-4}$ 直鎖または分岐状のアルキレン) $C(O)O-N(R^\circ)_2$ であり、ここで、各 R° は、以下に定義するように置換されていてもよく、独立的に、水素、 C_{1-6} 脂肪族、 $-CH_2Ph$ 、 $-O(CH_2)_0-1Ph$ 、 $-CH_2-$ (5~6員ヘテロアリール環)、または、窒素、酸素、もしくは硫黄から独立的に選択される0~4つのヘテロ原子を有する、5~6員飽和、部分不飽和、もしくはアリール環であるか、あるいは、上記の定義にかかわらず、 R° の2つの独立した存在は、そ

10

20

30

40

50

これらの介在原子（複数可）と一緒にあって、以下に定義するように置換されていてもよい、窒素、酸素、もしくは硫黄から独立的に選択される0～4つのヘテロ原子を有する、3～12員飽和、部分不飽和、またはアリール単環式もしくは二環式環を形成する。

【0207】

R° （または R° の2つの独立した存在を介在原子と一緒にすることによって形成された環）上の好適な一価置換基は、独立的に、ハロゲン、 $-(CH_2)_{0-2}R^\bullet$ 、 $-(ハロR^\bullet)$ 、 $-(CH_2)_{0-2}OH$ 、 $-(CH_2)_{0-2}OR^\bullet$ 、 $-(CH_2)_{0-2}CH(OR^\bullet)_2$ ； $-O(ハロR^\bullet)$ 、 $-CN$ 、 $-N_3$ 、 $-(CH_2)_{0-2}C(O)R^\bullet$ 、 $-(CH_2)_{0-2}C(O)OH$ 、 $-(CH_2)_{0-2}C(O)OR^\bullet$ 、 $-(CH_2)_{0-2}SR^\bullet$ 、 $-(CH_2)_{0-2}SH$ 、 $-(CH_2)_{0-2}NH_2$ 、 $-(CH_2)_{0-2}NHR^\bullet$ 、 $-(CH_2)_{0-2}NR^\bullet_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SiR^\bullet_3$ 、 $-OSiR^\bullet_3$ 、 $-C(O)SR^\bullet$ 、 $-(C_{1-4}直鎖または分岐状のアルキレン)C(O)OR^\bullet$ 、または $-SSR^\bullet$ であり、ここで、各 $R^\bullet$ は、非置換であるか、または「ハロ」が先行する場合は1つ以上のハロゲンのみで置換されており、 C_{1-4} 脂肪族、 $-CH_2Ph$ 、 $-O(CH_2)_{0-1}Ph$ 、または、窒素、酸素、もしくは硫黄から独立的に選択される0～4つのヘテロ原子を有する、5～6員飽和、部分不飽和、もしくはアリール環から独立的に選択される。 R° の飽和炭素原子上の好適な二価置換基は、 $=O$ 及び $=S$ を含む。

【0208】

「場合により置換されている」基の飽和炭素原子上の好適な二価置換基は、 $=O$ 、 $=S$ 、 $=NNR^*_2$ 、 $=NNHC(O)R^*$ 、 $=NNHC(O)OR^*$ 、 $=NNHS(O)_2R^*$ 、 $=NR^*$ 、 $=NOR^*$ 、 $-O(C(R^*_2))_{2-3}O-$ 、または $-S(C(R^*_2))_{2-3}S-$ を含み、ここで、 R^* の独立した各存在は、水素、以下に定義するように置換されていてもよい C_{1-6} 脂肪族、または、窒素、酸素、もしくは硫黄から独立的に選択される0～4つのヘテロ原子を有する、非置換の5～6員飽和、部分不飽和、もしくはアリール環から選択される。「場合により置換されている」基の近傍の置換可能な炭素に結合する好適な二価置換基は、 $-O(CR^*_2)_{2-3}O-$ を含み、ここで、 R^* の独立した各存在は、水素、以下に定義するように置換されていてもよい C_{1-6} 脂肪族、または、窒素、酸素、もしくは硫黄から独立的に選択される0～4つのヘテロ原子を有する、非置換の5～6員飽和、部分不飽和、もしくはアリール環から選択される。

【0209】

R^* の脂肪族基上の好適な置換基は、ハロゲン、 $-R^\bullet$ 、 $-(ハロR^\bullet)$ 、 $-OH$ 、 $-OR^\bullet$ 、 $-O(ハロR^\bullet)$ 、 $-CN$ 、 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)OR^\bullet$ 、 $-NH_2$ 、 $-NHR^\bullet$ 、 $-NR^\bullet_2$ 、または $-NO_2$ を含み、ここで、各 $R^\bullet$ は、非置換であるか、または「ハロ」が先行する場合は1つ以上のハロゲンのみで置換されており、独立的に、 C_{1-4} 脂肪族、 $-CH_2Ph$ 、 $-O(CH_2)_{0-1}Ph$ 、または、窒素、酸素、もしくは硫黄から独立的に選択される0～4つのヘテロ原子を有する、5～6員飽和、部分不飽和、もしくはアリール環である。

【0210】

「場合により置換されている」基の置換可能な窒素上の好適な置換基は、 $-R^\dagger$ 、 $-NR^\dagger_2$ 、 $-C(O)R^\dagger$ 、 $-C(O)OR^\dagger$ 、 $-C(O)C(O)R^\dagger$ 、 $-C(O)CH_2C(O)R^\dagger$ 、 $-S(O)_2R^\dagger$ 、 $-S(O)_2NR^\dagger_2$ 、 $-C(S)NR^\dagger_2$ 、 $-C(NH)NR^\dagger_2$ 、または $-N(R^\dagger)S(O)_2R^\dagger$ を含み、ここで、各 $R^\dagger$ は、独立的に、水素、以下に定義するように置換されていてもよい C_{1-6} 脂肪族、非置換 $-OPh$ 、または、窒素、酸素、もしくは硫黄から独立的に選択される0～4つのヘテロ原子を有する、非置換の5～6員飽和、部分不飽和、もしくはアリール環であるか、あるいは、上記の定義にかかわらず、 $R^\dagger$ の2つの独立した存在は、それらの介在原子（複数可）と一緒にあって、窒素、酸素、もしくは硫黄から独立的に選択される0～4つのヘテロ原子を有する、非置換の3～12員飽和、部分不飽和、またはアリール単環式もしくは二環式環を形成する。

【0211】

10

20

30

40

50

R^+ の脂肪族基上の好適な置換基は、独立的に、ハロゲン、 $-R^\bullet$ 、 $-(\text{ハロ}R^\bullet)$ 、 $-OH$ 、 $-OR^\bullet$ 、 $-O(\text{ハロ}R^\bullet)$ 、 $-CN$ 、 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)OR^\bullet$ 、 $-NH_2$ 、 $-NHR^\bullet$ 、 $-NR^\bullet_2$ 、または $-NO_2$ であり、ここで、各 $R^\bullet$ は、非置換であるか、または「ハロ」が先行する場合は1つ以上のハロゲンのみで置換されており、独立的に、 C_{1-4} 脂肪族、 $-CH_2Ph$ 、 $-O(CH_2)_{0-1}Ph$ 、または、窒素、酸素、もしくは硫黄から独立的に選択される0～4つのヘテロ原子を有する、5～6員飽和、部分不飽和、もしくはアリール環である。

【0212】

本明細書で使用される場合、「部分不飽和」という用語は、少なくとも1つの二重結合または三重結合を含む環部分を指す。「部分不飽和」という用語は、複数の不飽和部位を有する環を包含することを意図するが、本明細書で定義されるようなアリールまたはヘテロアリール部分を含むことは意図しない。

10

【0213】

本明細書で使用する場合、「薬学的に許容される塩」という用語は、安全な医学的判断の範囲内で、過度の毒性、刺激、アレルギー反応などを伴わずに、ヒト及び下等動物の組織と接触させて使用するのに好適であり、妥当なベネフィット／リスク比に見合う塩を指す。薬学的に許容される塩は当技術分野で周知である。例えば、S. M. Berge et al. は、薬学的に許容される塩について、参照により本明細書に組み込まれる J. Pharmaceutical Sciences, 1977, 66, 1-19 に詳細に記載している。本開示の化合物の薬学的に許容される塩には、好適な無機及び有機の酸及び塩基に由来するものが含まれる。薬学的に許容される非毒性の酸付加塩の例は、塩酸、臭化水素酸、リン酸、硫酸及び過塩素酸のような無機酸、または酢酸、シュウ酸、マレイン酸、酒石酸、クエン酸、コハク酸もしくはマロン酸のような有機酸と形成されるか、あるいは、イオン交換のような、当技術分野において使用されている他の方法を使用することによって形成される、アミノ基の塩である。その他の薬学的に許容される塩としては、アジピン酸塩、アルギン酸塩、アスコルビン酸塩、アスパラギン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、安息香酸塩、重硫酸塩、ホウ酸塩、酪酸塩、樟脳酸塩、カンファースルホン酸塩、クエン酸塩、シクロペンタンプロピオン酸塩、ジグルコン酸塩、ドデシル硫酸塩、エタンスルホン酸塩、ギ酸塩、フマル酸塩、グルコヘプトン酸塩、グリセロリン酸塩、グルコン酸塩、ヘミ硫酸塩、ヘプタン酸塩、ヘキサノ酸塩、ヨウ化水素酸塩、2-ヒドロキシーエタンスルホン酸塩、ラクチン酸塩、乳酸塩、ラウリン酸塩、ラウリル硫酸塩、リンゴ酸塩、マレイン酸塩、マロン酸塩、メタンスルホン酸塩、2-ナフタレンスルホン酸塩、ニコチン酸塩、硝酸塩、オレイン酸塩、シュウ酸塩、パルミチン酸塩、パモ酸塩、ペクチン酸塩、過硫酸塩、3-フェニルプロピオン酸塩、リン酸塩、ピバル酸塩、プロピオン酸塩、ステアリン酸塩、コハク酸塩、硫酸塩、酒石酸塩、チオシアン酸塩、p-トルエンスルホン酸塩、ウンデカン酸塩、吉草酸塩などが挙げられる。

20

30

【0214】

適切な塩基に由来する塩としては、アルカリ金属塩、アルカリ土類金属塩、アンモニウム塩、及び $N(C_{1-4}\text{アルキル})_4$ 塩が挙げられる。代表的なアルカリまたはアルカリ土類金属塩としては、ナトリウム、リチウム、カリウム、カルシウム、マグネシウムなどが挙げられる。さらなる薬学的に許容される塩には、適切な場合、非毒性アンモニウム、第四級アンモニウム、ならびにハロゲン化物、水酸化物、カルボン酸、硫酸、リン酸、硝酸、低級アルキルスルホン酸及びアリールスルホン酸などの対イオンを使用して形成されたアミンカチオンが含まれる。

40

【0215】

「薬学的に許容される誘導体」は、レシipientに投与すると、直接的または間接的に、本開示の化合物またはその活性代謝産物もしくは残留物を提供することができる、本開示の化合物のあらゆる非毒性の塩、エステル、エステルの塩または他の誘導体を意味する。

【0216】

50

「第三級アミン」という用語は、3つの炭素含有基（これらの基の各々は、その基の炭素原子を通じてアミン基に共有結合している）に結合したアミン（窒素原子）を表すために使用される。第三級アミンは、プロトン化されている場合もあれば、ルイス酸と複合体を形成する場合もある。

【0217】

本明細書における変数の任意の定義の中の化学基のリストの記載は、任意の単一の基または列挙された基の組み合わせとしてのその変数の定義を含む。本明細書における変数についての実施形態の記載は、任意の単一の実施形態としての、または任意の他の実施形態もしくはその一部と組み合わせた、その実施形態を含む。別途記載のない限り、本明細書で示される構造は、その構造のあらゆるエナンチオマー型、ジアステレオマー型、及び幾何学（または立体構造）型、例えば、各不斉中心のR及びS構成、Z及びE二重結合異性体、ならびにZ及びE立体構造異性体を含むことも意図している。したがって、本開示の化合物の単一の立体化学異性体、ならびにエナンチオマー、ジアステレオマー、及び幾何学（または立体構造）の混合物は、本開示の範囲内にある。別途記載のない限り、本開示の化合物のあらゆる互変異性体型が本開示の範囲内にある。

10

【0218】

分子及び細胞生化学の一般的な方法は、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Ed. (Sambrook et al., Harbor Laboratory Press 2001)、Short Protocols in Molecular Biology, 4th Ed. (Ausubel et al. eds., John Wiley & Sons 1999)、Protein Methods (Bollag et al., John Wiley & Sons 1996)、Nonviral Vectors for Gene Therapy (Wagner et al. eds., Academic Press 1999)、Viral Vectors (Kaplift & Loewy eds., Academic Press 1995)、Immunology Methods Manual (I. Lefkovits ed., Academic Press 1997)、及びCell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology (Doyle & Griffiths, John Wiley & Sons 1998)などの標準的な教本に見出すことができ、これらの開示は、参照により本明細書に組み込まれる。

20

30

【0219】

合成RNAウイルスゲノム

いくつかの実施形態では、本開示は、腫瘍溶解性ウイルス（例えば、RNAゲノム）をコードする組換えRNA分子を提供する。そのような組換えRNA分子は、本明細書では「合成ウイルスゲノム」または「合成RNAウイルスゲノム」と称される。そのような実施形態では、合成RNAウイルスゲノムは、非ウイルス送達ビヒクルによって細胞に導入されると感染性で溶解性のウイルスを産生することができ、感染性ウイルスを複製及び産生するために細胞内に追加の外因性遺伝子またはタンパク質が存在する必要はない。むしろ、宿主細胞内の内因性翻訳メカニズムが、合成RNAウイルスゲノムからのウイルスタンパク質の発現を媒介する。発現されたウイルスタンパク質は、次いで、ウイルス複製、及びRNAウイルスゲノムを含む感染性ウイルス粒子（カプシドタンパク質、エンベロープタンパク質、及び／または膜タンパク質を含み得る）へのアセンブリを媒介する。したがって、本明細書に記載されるRNAポリヌクレオチド（すなわち、合成RNAウイルスゲノム）は、宿主細胞に導入されると、別の宿主細胞に感染することができるウイルスを産生する。いくつかの実施形態では、腫瘍溶解性ウイルスは、ピコルナウイルスである（図9の概略図を参照のこと）。いくつかの実施形態では、ピコルナウイルスはCVA21である。いくつかの実施形態では、ピコルナウイルスはSVVである。

40

【0220】

いくつかの実施形態では、合成ウイルスゲノムは、組換えリボ核酸（RNA）（すなわ

50

ち、合成RNAウイルスゲノム)として提供される。いくつかの実施形態では、合成RNAウイルスゲノムは、1つ以上の核酸類似体を含む。核酸類似体の例としては、2'-O-メチル置換RNA、2'-O-メトキシエチル塩基、2'-フルオロ塩基、ロックド核酸(LNA)、アンロックド核酸(UNA)、架橋核酸(BNA)、モルホリノ、及びペプチド核酸(PNA)が挙げられる。いくつかの実施形態では、合成RNAウイルスゲノムは、レプリコン、導入遺伝子をコードするRNAウイルスゲノム、mRNA分子、または環状RNA分子(circRNA)である。いくつかの実施形態では、合成RNAウイルスゲノムは、一本鎖RNA(ssRNA)ウイルスゲノムを含む。いくつかの実施形態では、一本鎖ゲノムは、ポジティブセンスまたはネガティブセンスゲノムであり得る。

【0221】

いくつかの実施形態では、組換えRNA分子は、環状RNA分子(circRNA)である。CircRNA分子は、エキソヌクレアーゼ媒介性分解に必要な自由端を欠いており、したがって、RNA分子の半減期を延長させ、より安定な経時的タンパク質産生を可能にする(例えば、Wesselhoeft et al., Engineering circular RNA for potent and stable translation in eukaryotic cells. Nature Communications. (2018) 9:2629を参照のこと)。circRNA分子から機能的なRNAウイルスを産生するためには、適切な3'及び5'天然末端を持つ線状RNAゲノムが産生され得るように、環状構築物が細胞に入ったらこれを「こじ開ける」必要がある。したがって、いくつかの実施形態では、腫瘍溶解性ウイルスをコードする組換えRNA分子は、circRNA分子として提供され、細胞内部のcircRNA分子の線形化を容易にする1つ以上の追加のRNA配列をさらに含む。そのような追加のRNA配列の例としては、siRNA標的部位、miRNA標的部位、及びガイドRNA標的部位が挙げられる。対応するsiRNA、miRNA、またはgRNAは、circRNA分子と合剤にすることができる。あるいは、miRNA標的部位は、circRNA分子の切断及びコードされた腫瘍溶解性ウイルスの初期発現が、特定のmiRNAを発現する標的細胞に限定されるように、標的細胞における同族miRNAの発現に基づいて選択されてもよい。

【0222】

本明細書に記載される合成RNAウイルスゲノムは、腫瘍溶解性ウイルスをコードする。腫瘍溶解性ウイルスの例は、当技術分野で公知であり、限定されるものではないが、ピコルナウイルス(例えば、コクサッキーウイルス)、ポリオウイルス、麻疹ウイルス、水疱性口内炎ウイルス、オルトミクソウイルス、及びマラバウイルスを含む。いくつかの実施形態では、合成RNAウイルスゲノムによってコードされる腫瘍溶解性ウイルスは、ピコルナウイルス科のウイルス、例えばコクサッキーウイルス、ポリオウイルス(PVSRIPPOなどのキメラポリオウイルス及び他のキメラピコルナウイルスを含む)、もしくはセネカバレーウイルス、もしくは多数のピコルナウイルスのいずれかのキメラ起源のあらゆるウイルス、アレナウイルス科のウイルス、例えばラッサウイルス、レトロウイルス科のウイルス、例えばマウス白血病ウイルス、オルトミクソウイルス科のウイルス、例えばA型インフルエンザウイルス、パラミクソウイルス科のウイルス、例えばニューカッスル病ウイルスもしくは麻疹ウイルス、レオウイルス科のウイルス、例えば哺乳動物オルトレオウイルス、トガウイルス科のウイルス、例えばシンドビスウイルス、またはラブドウイルス科のウイルス、例えば水疱性口内炎ウイルス(VSV)もしくはマラバウイルスである。

【0223】

ポジティブセンスの一本鎖RNAウイルス

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される合成RNAウイルスゲノムは、一本鎖RNA(ssRNA)ウイルスゲノムをコードする。いくつかの実施形態では、ssRNAウイルスは、ポジティブセンスのssRNA(+センスssRNA)ウイルスである。例示的な+センスssRNAウイルスには、ピコルナウイルス科(例えば、コクサッキー

ウイルス、ポリオウイルス、及びセネカバレーウイルス（SVV）、SVV-Aを含む）、コロナウイルス科（例えば、HCoV-229E及びHCoV-NL63などのアルファコロナウイルス、HCoV-HKU1、HCoV-OC43、及びMERS-CoVなどのベータコロナウイルス）、レトロウイルス科（例えば、マウス白血病ウイルス）、及びトガウイルス科（例えば、セムリキ森林ウイルス、シンドビスウイルス、ロスリバーウイルス、またはチクングニアウイルスなどのアルファウイルス）のメンバーが含まれる。ポジティブセンスのssRNAウイルスの追加の例示的な属及び種を以下の表1に示す。

【表1-1】

表1：ポジティブセンスssRNAウイルス

科/亜科	属	自然宿主	種
ピコルナウイルス科	カルジオウイルス	ヒト	
	コサウイルス	ヒト	
	エンテロウイルス	ヒト	コクサッキーウイルス
		ヒト	ポリオウイルス
	ヘパトウイルス	ヒト	
	コブウイルス	ヒト	
	パレコウイルス	ヒト	
	ロサウイルス	ヒト	
	サリウイルス	ヒト	
	パシウイルス	ブタ (Pig)	
	セネカウイルス	ブタ (Pig)	セネカバレーウイルス A
カリシウイルス科	サポウイルス	ヒト	
	ノロウイルス	ヒト	
	ネボウイルス	ウシ	
	ベシウイルス	ネコ/ブタ (Swine)	
ヘペウイルス科	オルトヘペウイルス		
アストロウイルス科	ママストロウイルス	ヒト	
	アバストロウイルス	トリ	
フラビウイルス科	ヘパシウイルス	ヒト	
	フラビウイルス	節足動物	
	ペギウイルス		
	ペスチウイルス	哺乳動物	

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

科/亜科	属	自然宿主	種
コロナウイルス科/コロナウイルス亜科	アルファコロナウイルス		HCoV-229E
			HCoV-NL63
	ベータコロナウイルス		HCoV-HKU1
			HCoV-OC43
			MERS-CoV
コロナウイルス科/トロウイルス亜科	バフィンウイルス		
	トロウイルス		
レトロウイルス科	ガンマレトロウイルス		マウス白血病ウイルス
トガウイルス科	アルファウイルス		シンドビスウイルス
			セムリキ森林ウイルス
			ロスリバーウイルス
			チクングニアウイルス
			ベネズエラウマ脳炎ウイルス

10

20

30

【0224】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される組換えRNA分子は、コクサッキーウイルス、ポリオウイルス、及びセネカバレーウイルス（SVV）から選択されるピコルナウイルスをコードする。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される組換えRNA分子は、コクサッキーウイルスをコードする。この実施形態のいくつかの態様では、組換えRNA分子は、コクサッキーウイルスをコードし、配列番号2の5'UTR配列を含む（例えば、Brown et al., Complete Genomic Sequencing Shows that Polioviruses and Members of Human Enterovirus Species C Are Closely Related in the Noncapsid Coding Region. Journal of Virology, (2003) 77:16, p. 8973-8984. GenBank受入番号AF546702を参照のこと）。そのような実施形態では、配列番号2の5'UTR配列は、他の既報の5'UTR配列と比較して、機能的なコクサッキーウイルスの産生を予想外に増加させる（例えば、Newcombe et al., Cellular receptor interactions of C-cluster human group A coxsackieviruses Journal of General Virology (2003), 84, 3041-3050. GenBank受入番号AF465515を参照のこと）。この実施形態のいくつかの態様では、組換えRNA分子は、コクサッキーウイルスをコードし、配列番号

40

50

1 の配列を含む。

【0225】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される合成RNAウイルスゲノムは、コクサッキーウイルスをコードする。いくつかの実施形態では、コクサッキーウイルスは、CVB3、CVA21、及びCVA9から選択される。例示的なコクサッキーウイルスの核酸配列は、GenBank 参照番号M33854.1 (CVB3)、GenBank 参照番号KT161266.1 (CVA21)、及びGenBank 参照番号D00627.1 (CVA9) で提供される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される合成RNAウイルスゲノムは、Kuykendall (Kuyk) 株である、配列番号1を含む修飾されたCVA21ウイルスをコードする。いくつかの実施形態では、Kuykendall 株のウイルスゲノムの配列は、GenBank 受入番号AF465515.1またはAF546702.1によるものである。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される合成RNAウイルスゲノムは、キメラコクサッキーウイルスをコードする。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される合成RNAウイルスゲノムは、CVA21-EF株及びCVA21-KY株から選択されるCVA21株をコードする。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される合成RNAウイルスゲノムは、CVA21-EF株をコードする。EF株のウイルスゲノムの例示的な配列は、GenBank 受入番号EF015029.1によるものである。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される合成RNAウイルスゲノムは、CVA21-KY株をコードする。KY株のウイルスゲノムの例示的な配列は、GenBank 受入番号KY284011.1によるものである。図11～26に示すように、EF及びKY株は、Kuykendall 実験室株及び既報の合成ピコルナウイルス組成物に勝る治療効果をもたらす。

【0226】

3つのCVA21株 (EF、KY、及びKuykendall) のドメイン構成を図32に示し、これら3つの株の様々な領域間の配列同一性を以下の表2に示す。

10

20

30

40

50

【表 2】

表 2：異なる CVA21 株の対応する領域間の配列同一性

領域	株 1 (配列)	株 2 (配列)	配列同一性
ウイルス全体	CVA21-KY (配列番号 5)	CVA21-Kuykendall (配列番号 1)	88.8%
	CVA21-EF (配列番号 9)	CVA21-Kuykendall (配列番号 1)	79.6%
	CVA21-EF (配列番号 9)	CVA21-KY (配列番号 5)	79.4%
5' UTR (IRES)	CVA21-KY (配列番号 6)	CVA21-Kuykendall (配列番号 2)	91.2%
	CVA21-EF (配列番号 10)	CVA21-Kuykendall (配列番号 2)	85.0%
	CVA21-EF (配列番号 10)	CVA21-KY (配列番号 6)	86.1%
P1	CVA21-KY (配列番号 7)	CVA21-Kuykendall (配列番号 3)	87.5%
	CVA21-EF (配列番号 11)	CVA21-Kuykendall (配列番号 3)	78.6%
	CVA21-EF (配列番号 11)	CVA21-KY (配列番号 7)	78.3%
3D	CVA21-KY (配列番号 8)	CVA21-Kuykendall (配列番号 4)	89.9%
	CVA21-EF (配列番号 12)	CVA21-Kuykendall (配列番号 4)	82.7%
	CVA21-EF (配列番号 12)	CVA21-KY (配列番号 8)	82.5%

10

20

30

【0227】

CVA21 EF または KY 株のウイルスゲノムにおける 1 つ以上の特定領域が、EF 及び KY 株で観察された、Kuykendall 実験室株に勝る有益な治療効果に寄与する可能性がある。いくつかの実施形態では、1 つ以上の特定領域は、5' UTR (IRES) 領域、P1 領域、及び 3D 領域からなる群から選択される。本明細書に記載されるウイルス株のこれらの特定領域の各々の核酸位置は、次のとおりである：

40

(a) CVA21-Kuykendall の 5' UTR (IRES) 領域は、配列番号 1 の核酸 1～713 を包含する。CVA21-KY の 5' UTR (IRES) 領域は、配列番号 5 の核酸 1～713 を包含する。CVA21-EF の 5' UTR (IRES) 領域は、配列番号 9 の核酸 1～748 を包含する。

(b) CVA21-Kuykendall の P1 領域は、配列番号 1 の核酸 714～3350 を包含する。CVA21-KY の P1 領域は、配列番号 5 の核酸 714～3350 を包含する。CVA21-EF の P1 領域は、配列番号 9 の核酸 749～3385 を包含する。

(c) CVA21-Kuykendall の 3D 領域は、配列番号 1 の核酸 5952～7340 を包含する。CVA21-KY の 3D 領域は、配列番号 5 の核酸 5952～7340 を包含する。CVA21-EF の 3D 領域は、配列番号 9 の核酸 5987～7375

50

を包含する。

【0228】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される合成RNAウイルスゲノムは、CVA21-KY株をコードする。いくつかの実施形態では、CVA21-KY株をコードする合成RNAウイルスゲノムは、配列番号5によるポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、CVA21-KY株をコードする合成RNAウイルスゲノムは、配列番号5との少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、少なくとも99.8%、少なくとも99.9%、または100%の（それらの間のすべての範囲及び部分的範囲を含む）配列同一性を有するポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、CVA21-KY株をコードする合成RNAウイルスゲノムは、配列番号1と95%未満、90%未満、85%未満、または80%未満同一の（それらの間のすべての範囲及び部分的範囲を含む）ポリヌクレオチド配列を含む。

10

【0229】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される合成RNAウイルスゲノムは、CVA21-KY株をコードし、配列番号6による5'UTR(IRES)配列を含む（配列番号5の核酸1~713に対応する）。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される合成RNAウイルスゲノムは、CVA21-KY株をコードし、配列番号6との少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、少なくとも99.8%、少なくとも99.9%、または100%の（それらの間のすべての範囲及び部分的範囲を含む）配列同一性を有する5'UTR(IRES)配列を含む。いくつかの実施形態では、CVA21-KY株をコードする合成RNAウイルスゲノムは、配列番号2と95%未満、90%未満、85%未満、または80%未満（それらの間のすべての範囲及び部分的範囲を含む）同一の5'UTR(IRES)配列を含む。

20

【0230】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される合成RNAウイルスゲノムは、CVA21-KY株をコードし、配列番号7によるP1配列を含む（配列番号5の核酸714~3350に対応する）。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される合成RNAウイルスゲノムは、CVA21-KY株をコードし、配列番号7との少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、少なくとも99.8%、少なくとも99.9%、または100%の（それらの間のすべての範囲及び部分的範囲を含む）配列同一性を有するP1配列を含む。いくつかの実施形態では、CVA21-KY株をコードする合成RNAウイルスゲノムは、配列番号3と95%未満、90%未満、85%未満、または80%未満（それらの間のすべての範囲及び部分的範囲を含む）同一のP1配列を含む。

30

【0231】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される合成RNAウイルスゲノムは、CVA21-KY株をコードし、配列番号8による3D配列を含む（配列番号5の核酸5952~7340に対応する）。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される合成RNAウイルスゲノムは、CVA21-KY株をコードし、配列番号8との少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、少なくとも99.8%、少なくとも99.9%、または100%の（それらの間のすべての範囲及び部分的範囲を含む）配列同一性を有する3D配列を含む。いくつかの実施形態では、CVA21-KY

40

50

株をコードする合成RNAウイルスゲノムは、配列番号4と95%未満、90%未満、85%未満、または80%未満（それらの間のすべての範囲及び部分的範囲を含む）同一の3D配列を含む。

【0232】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される合成RNAウイルスゲノムは、CVA21-EF株をコードする。いくつかの実施形態では、CVA21-EF株をコードする合成RNAウイルスゲノムは、配列番号9によるポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、CVA21-EF株をコードする合成RNAウイルスゲノムは、配列番号9との少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、少なくとも99.8%、少なくとも99.9%、または100%の（それらの間のすべての範囲及び部分的範囲を含む）配列同一性を有するポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、CVA21-EF株をコードする合成RNAウイルスゲノムは、配列番号1と95%未満、90%未満、85%未満、または80%未満（それらの間のすべての範囲及び部分的範囲を含む）同一のポリヌクレオチド配列を含む。

10

【0233】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される合成RNAウイルスゲノムは、CVA21-EF株をコードし、配列番号10による5'UTR(IRES)配列を含む（配列番号9の核酸1〜748に対応する）。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される合成RNAウイルスゲノムは、CVA21-EF株をコードし、配列番号10との少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、少なくとも99.8%、少なくとも99.9%、または100%の（それらの間のすべての範囲及び部分的範囲を含む）配列同一性を有する5'UTR(IRES)配列を含む。いくつかの実施形態では、CVA21-EF株をコードする合成RNAウイルスゲノムは、配列番号2と95%未満、90%未満、85%未満、または80%未満（それらの間のすべての範囲及び部分的範囲を含む）同一の5'UTR(IRES)配列を含む。

20

【0234】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される合成RNAウイルスゲノムは、CVA21-EF株をコードし、配列番号11によるP1配列を含む（配列番号9の核酸749〜3385に対応する）。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される合成RNAウイルスゲノムは、CVA21-EF株をコードし、配列番号11との少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、少なくとも99.8%、少なくとも99.9%、または100%の（それらの間のすべての範囲及び部分的範囲を含む）配列同一性を有するP1配列を含む。いくつかの実施形態では、CVA21-EF株をコードする合成RNAウイルスゲノムは、配列番号3と95%未満、90%未満、85%未満、または80%未満（それらの間のすべての範囲及び部分的範囲を含む）同一のP1配列を含む。

30

40

【0235】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される合成RNAウイルスゲノムは、CVA21-EF株をコードし、配列番号12による3D配列を含む（配列番号9の核酸5987〜7375に対応する）。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される合成RNAウイルスゲノムは、CVA21-EF株をコードし、配列番号12との少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、少なくとも99.8

50

%、少なくとも99.9%、または100%の（それらの間のすべての範囲及び部分的範囲を含む）配列同一性を有する3D配列を含む。いくつかの実施形態では、CVA21-EF株をコードする合成RNAウイルスゲノムは、配列番号4と95%未満、90%未満、85%未満、または80%未満（それらの間のすべての範囲及び部分的範囲を含む）同一の3D配列を含む。

【0236】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるCVA21 RNAウイルスゲノムは、ヌクレオチド配列CGUCUC（配列番号83）またはGAGACG（配列番号84）を含まない。対応する相補的DNA配列であるCGTCTC（配列番号85）及びGAGACG（配列番号86）は、BsmBI制限酵素認識部位である。

10

【0237】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるCVA21 RNAウイルスゲノムは、ヌクレオチド配列GGUCUC（配列番号87）またはGAGACC（配列番号88）を含まない。対応する相補的DNA配列であるGGTCTC（配列番号89）及びGAGACC（配列番号90）は、BsaI制限酵素認識部位である。

【0238】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される合成RNAウイルスゲノムは、セネカバレーウイルス（SVV）をコードする。いくつかの実施形態では、SVVは、野生型SVV（SVV-001、配列番号25など）、または変異体SVVもしくはキメラSVV（配列番号26によってコードされるSVV-001-S177A、または配列番号68もしくは配列番号73によってコードされるSVV-IRES-2-S177Aなど）から選択される。

20

【0239】

いくつかの実施形態では、SVVは、SVV-S177変異体である。いくつかの実施形態では、SVVは、SVV-S177A変異体である。SVVウイルスゲノムに関して本明細書で使用される場合、「S177変異体」という用語は、野生型タンパク質のアミノ酸S177（配列番号25によってコードされるVP2タンパク質によるアミノ酸付番）に変異を含むVP2タンパク質をコードするSVVウイルスゲノムを指す。したがって、「S177A変異体」という用語は、VP2タンパク質のS177Aのアミノ酸置換を有するSVV変異体を指す。配列番号25において、VP2 S177残基は、核酸1645～1647位のコドン「UCU」によってコードされる。したがって、SVV-S177変異体は、配列番号25の核酸1645～1647位に対応する領域内の核酸変異を含む。いくつかの実施形態では、SVV-S177A変異体は、配列番号25の核酸1645～1647位に対応する領域に、コドン配列「GCU」、「GCC」、「GCA」、または「GCG」を含む。いくつかの実施形態では、SVV-S177A変異体は、配列番号25の核酸1645～1647位に対応する領域に、コドン配列「GCG」を含む。

30

【0240】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるSVV RNAウイルスゲノムは、ヌクレオチド配列GCUCUUC（配列番号79）またはGAAGAGC（配列番号80）を含まない。対応する相補的DNA配列であるGCTCTTC（配列番号81）及びGAAGAGC（配列番号82）は、SapI制限酵素認識部位である。いくつかの実施形態では、野生型SVV RNAウイルスゲノムは、配列番号25の核酸1504～1510及び／または核酸5293～5299に対応する位置に、配列番号79を含む。いくつかの実施形態では、本開示のSVV RNAウイルスゲノムは、配列番号25の核酸1504～1510及び／または核酸5293～5299に対応する領域内に、配列番号79と比較して少なくとも1ヌクレオチドの置換を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも1ヌクレオチドの置換は、DNAの対応する領域によってコードされるアミノ酸を変化させないサイレント変異である。いくつかの実施形態では、本開示のSVV RNAウイルスゲノムは、配列番号25の核酸1509及び／または5298に対応する位置に、シチジン（「C」）を含む。

40

50

【0241】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるSVV RNAウイルスゲノムは、ヌクレオチド配列GGUCUC（配列番号87）またはGAGACC（配列番号88）を含まない。対応する相補的DNA配列であるGGTCTC（配列番号89）及びGAGACC（配列番号90）は、BsaI制限酵素認識部位である。

【0242】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される合成RNAウイルスゲノムは、キメラピコルナウイルスをコードする（例えば、第1のピコルナウイルスに由来するカプシドタンパク質またはIRESなどの1つの部分と、第2のピコルナウイルスに由来するプロテアーゼまたはポリメラーゼなどの非構造遺伝子のような別の部分とを含むウイルスをコードする）。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される合成RNAウイルスゲノムは、キメラSVVをコードする。

【0243】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される合成RNAウイルスゲノムは、SVV-001（配列番号25または配列番号72（GenBank識別番号DQ641257.1））、SVA/BRA/MG2/2015（配列番号69；GenBank識別番号KR063108.1）、SVA/Canada/MB/NCFAD-104/2015（配列番号70；GenBank識別番号KY486156.1）、及びSVV-MN15-308（配列番号71；GenBank識別番号KU359214.1）からなる群から選択されるSVV株に由来する1つ以上の特定領域を含むSVVをコードする。いくつかの実施形態では、1つ以上の特定領域は、5'UTR（IRES）領域、P1領域、及びP3領域からなる群から選択される。本明細書に記載されるウイルス株のこれらの特定領域の各々の核酸位置は、次のとおりである：

（a）SVV-001の5'UTR（IRES）領域は、配列番号25の核酸1～668を包含する。SVA/BRA/MG2/2015の5'UTR（IRES）領域は、配列番号69の核酸1～656を包含する。SVA/Canada/MB/NCFAD-104/2015の5'UTR（IRES）領域は、配列番号70の核酸1～612を包含する。SVV-MN15-308の5'UTR（IRES）領域は、配列番号71の核酸1～610を包含する。

（b）SVV-001のP1領域は、配列番号25の核酸669～3477を包含する。SVA/BRA/MG2/2015のP1領域は、配列番号69の核酸657～3465を包含する。SVA/Canada/MB/NCFAD-104/2015のP1領域は、配列番号70の核酸613～3421を包含する。SVV-MN15-308のP1領域は、配列番号71の核酸611～3419を包含する。

（c）SVV-001のP3領域は、配列番号25の核酸4855～7212を包含する。SVA/BRA/MG2/2015のP3領域は、配列番号69の核酸4843～7200を包含する。SVA/Canada/MB/NCFAD-104/2015のP3領域は、配列番号70の核酸4799～7156を包含する。SVV-MN15-308のP3領域は、配列番号71の核酸4797～7154を包含する。

【0244】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される合成RNAウイルスゲノムは、SVA/BRA/MG2/2015に由来する5'UTR（IRES）領域（配列番号69の核酸1～656）を含むSVVをコードする。いくつかの実施形態では、SVVをコードする合成RNAウイルスゲノムは、配列番号69の核酸1～656との少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、少なくとも99.8%、少なくとも99.9%、または100%の（それらの間のすべての範囲及び部分的範囲を含む）配列同一性を有するポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、SVA/BRA/MG2/2015に由来する1つ以上の領域以外の、SVVウイルスゲノ

ムの残りは、SVV-001に由来し、配列番号25の対応する領域との少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、少なくとも99.8%、少なくとも99.9%、または100%の（それらの間のすべての範囲及び部分的範囲を含む）配列同一性を有するポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、SVVは、SVV-S177変異体（例えば、S177A変異体）である。

【0245】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される合成RNAウイルスゲノムは、SVA/Canada/MB/NCFAD-104/2015に由来する5'UTR（IRES）領域（配列番号70の核酸1～612）を含むSVVをコードする。いくつかの実施形態では、SVVをコードする合成RNAウイルスゲノムは、配列番号70の核酸1～612との少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、少なくとも99.8%、少なくとも99.9%、または100%の（それらの間のすべての範囲及び部分的範囲を含む）配列同一性を有するポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、SVA/Canada/MB/NCFAD-104/2015に由来する1つ以上の領域以外の、SVVウイルスゲノムの残りは、SVV-001に由来し、配列番号25の対応する領域との少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、少なくとも99.8%、少なくとも99.9%、または100%の（それらの間のすべての範囲及び部分的範囲を含む）配列同一性を有するポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、SVVは、SVV-S177変異体（例えば、S177A変異体）である。

【0246】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される合成RNAウイルスゲノムは、SVV-MN15-308に由来する5'UTR（IRES）領域（配列番号71の核酸1～610）を含むSVVをコードする。いくつかの実施形態では、SVVをコードする合成RNAウイルスゲノムは、配列番号71の核酸1～610との少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、少なくとも99.8%、少なくとも99.9%、または100%の（それらの間のすべての範囲及び部分的範囲を含む）配列同一性を有するポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、SVV-MN15-308に由来する1つ以上の領域以外の、SVVウイルスゲノムの残りは、SVV-001に由来し、配列番号25の対応する領域との少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、少なくとも99.8%、少なくとも99.9%、または100%の（それらの間のすべての範囲及び部分的範囲を含む）配列同一性を有するポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、SVVは、SVV-S177変異体（例えば、S177A変異体）である。

【0247】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される合成RNAウイルスゲノムは、SVA/BRA/MG2/2015に由来するP1領域（配列番号69の核酸657～3465）を含むSVVをコードする。いくつかの実施形態では、SVVをコードする合成RNAウイルスゲノムは、配列番号69の核酸657～3465との少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93

%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、少なくとも99.8%、少なくとも99.9%、または100%の（それらの間のすべての範囲及び部分的範囲を含む）配列同一性を有するポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、SVA/BRA/MG2/2015に由来する1つ以上の領域以外の、SVVウイルスゲノムの残りは、SVV-001に由来し、配列番号25の対応する領域との少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、少なくとも99.8%、少なくとも99.9%、または100%の（それらの間のすべての範囲及び部分的範囲を含む）配列同一性を有するポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、SVVは、SVV-S177変異体（例えば、S177A変異体）である。

10

【0248】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される合成RNAウイルスゲノムは、SVA/Canada/MB/NCFAD-104/2015に由来するP1領域（配列番号70の核酸613～3421）を含むSVVをコードする。いくつかの実施形態では、SVVをコードする合成RNAウイルスゲノムは、配列番号70の核酸613～3421との少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、少なくとも99.8%、少なくとも99.9%、または100%の（それらの間のすべての範囲及び部分的範囲を含む）配列同一性を有するポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、SVA/Canada/MB/NCFAD-104/2015に由来する1つ以上の領域以外の、SVVウイルスゲノムの残りは、SVV-001に由来し、配列番号25の対応する領域との少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、少なくとも99.8%、少なくとも99.9%、または100%の（それらの間のすべての範囲及び部分的範囲を含む）配列同一性を有するポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、SVVは、SVV-S177変異体（例えば、S177A変異体）である。

20

30

【0249】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される合成RNAウイルスゲノムは、SVV-MN15-308に由来するP1領域（配列番号71の核酸611～3419）を含むSVVをコードする。いくつかの実施形態では、SVVをコードする合成RNAウイルスゲノムは、配列番号71の核酸611～3419との少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、少なくとも99.8%、少なくとも99.9%、または100%の（それらの間のすべての範囲及び部分的範囲を含む）配列同一性を有するポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、SVV-MN15-308に由来する1つ以上の領域以外の、SVVウイルスゲノムの残りは、SVV-001に由来し、配列番号25の対応する領域との少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、少なくとも99.8%、少なくとも99.9%、または100%の（それらの間のすべての範囲及び部分的範囲を含む）配列同一性を有するポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、SVVは、SVV-S177変異体（例えば、S177A変異体）である。

40

【0250】

50

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される合成RNAウイルスゲノムは、SVA／BRA／MG2／2015に由来するP3領域（配列番号69の核酸4843～7200）を含むSVVをコードする。いくつかの実施形態では、SVVをコードする合成RNAウイルスゲノムは、配列番号69の核酸4843～7200との少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、少なくとも99.8%、少なくとも99.9%、または100%の（それらの間のすべての範囲及び部分的範囲を含む）配列同一性を有するポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、SVA／BRA／MG2／2015に由来する1つ以上の領域以外の、SVVウイルスゲノムの残りは、SVV-001に由来し、配列番号25の対応する領域との少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、少なくとも99.8%、少なくとも99.9%、または100%の（それらの間のすべての範囲及び部分的範囲を含む）配列同一性を有するポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、SVVは、SVV-S177変異体（例えば、S177A変異体）である。

10

【0251】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される合成RNAウイルスゲノムは、SVA／Canada／MB／NCFAD-104／2015に由来するP3領域（配列番号70の核酸4799～7156）を含むSVVをコードする。いくつかの実施形態では、SVVをコードする合成RNAウイルスゲノムは、配列番号70の核酸4799～7156との少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、少なくとも99.8%、少なくとも99.9%、または100%の（それらの間のすべての範囲及び部分的範囲を含む）配列同一性を有するポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、SVA／Canada／MB／NCFAD-104／2015に由来する1つ以上の領域以外の、SVVウイルスゲノムの残りは、SVV-001に由来し、配列番号25の対応する領域との少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、少なくとも99.8%、少なくとも99.9%、または100%の（それらの間のすべての範囲及び部分的範囲を含む）配列同一性を有するポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、SVVは、SVV-S177変異体（例えば、S177A変異体）である。

20

30

【0252】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される合成RNAウイルスゲノムは、SVV-MN15-308に由来するP3領域（配列番号71の核酸4797～7154）を含むSVVをコードする。いくつかの実施形態では、SVVをコードする合成RNAウイルスゲノムは、配列番号71の核酸4797～7154との少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、少なくとも99.8%、少なくとも99.9%、または100%の（それらの間のすべての範囲及び部分的範囲を含む）配列同一性を有するポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、SVV-MN15-308に由来する1つ以上の領域以外の、SVVウイルスゲノムの残りは、SVV-001に由来し、配列番号25の対応する領域との少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも9

40

50

8 %、少なくとも99 %、少なくとも99.5 %、少なくとも99.8 %、少なくとも99.9 %、または100 %の（それらの間のすべての範囲及び部分的範囲を含む）配列同一性を有するポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、SVVは、SVV-S177変異体（例えば、S177A変異体）である。

【0253】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される合成RNAウイルスゲノムは、SVA/Canada/MB/NCFAD-104/2015（配列番号70）に由来する5' UTR（IRES）領域、及びSVV-001（配列番号25）に由来するウイルスゲノムの残りを含む、キメラSVVをコードする。いくつかの実施形態では、SVVは、SVV-S177変異体（例えば、S177A変異体）である。いくつかの実施形態では、合成RNAウイルスゲノムは、配列番号68との少なくとも80 %、少なくとも85 %、少なくとも90 %、少なくとも91 %、少なくとも92 %、少なくとも93 %、少なくとも94 %、少なくとも95 %、少なくとも96 %、少なくとも97 %、少なくとも98 %、少なくとも99 %、少なくとも99.5 %、少なくとも99.8 %、少なくとも99.9 %、または100 %の（それらの間のすべての範囲及び部分的範囲を含む）配列同一性を有する。

10

【0254】

いくつかの実施形態では、合成RNAウイルスゲノムは、エンジニアリングされており、野生型ウイルス（例えば、野生型CVA21または野生型SVV）のものとの100 %未満の配列同一性を含む。いくつかの実施形態では、合成RNAウイルスゲノムは、対応する野生型ウイルスのものとの、99.9 %未満、99.8 %未満、99.7 %未満、99.6 %未満、99.5 %未満、99 %未満、98 %未満、97 %未満、96 %未満、95 %未満、94 %未満、93 %未満、92 %未満、91 %未満、または90 %未満の配列同一性を含む。

20

【0255】

いくつかの実施形態では、合成RNAウイルスゲノムは、マイクロRNA（miRNA）標的配列（miR-TS）カセットを含み、miR-TSカセットは、1つ以上のmiRNA標的配列を含み、細胞内の対応するmiRNAのうちの1つ以上の発現は、細胞内のコードされた腫瘍溶解性ウイルスの複製を阻害する。いくつかの実施形態では、1つ以上のmiRNAは、miR-124、miR-1、miR-143、miR-128、miR-219、miR-219a、miR-122、miR-204、miR-217、miR-137、miR-142、及びmiR-126から選択される。いくつかの実施形態では、miR-TSカセットが、miR-124標的配列の1つ以上のコピー、miR-1標的配列の1つ以上のコピー、及びmiR-143標的配列の1つ以上のコピーを含む。いくつかの実施形態では、miR-TSカセットが、miR-128標的配列の1つ以上のコピー、miR-219a標的配列の1つ以上のコピー、及びmiR-122標的配列の1つ以上のコピーを含む。いくつかの実施形態では、miR-TSカセットが、miR-128標的配列の1つ以上のコピー、miR-204標的配列の1つ以上のコピー、及びmiR-219標的配列の1つ以上のコピーを含む。いくつかの実施形態では、miR-TSカセットが、miR-217標的配列の1つ以上のコピー、miR-137標的配列の1つ以上のコピー、及びmiR-126標的配列の1つ以上のコピーを含む。

30

40

【0256】

いくつかの実施形態では、合成RNAウイルスゲノムは、1つ以上の必須ウイルス遺伝子の5' 非翻訳領域（UTR）または3' UTRに組み込まれた1つ以上のmiR-TSカセットを含む。いくつかの実施形態では、合成RNAウイルスゲノムは、1つ以上の非必須遺伝子の5' 非翻訳領域（UTR）または3' UTRに組み込まれた1つ以上のmiR-TSカセットを含む。いくつかの実施形態では、合成RNAウイルスゲノムは、1つ以上の必須ウイルス遺伝子の5' または3' に組み込まれた1つ以上のmiR-TSカセットを含む。

【0257】

50

いくつかの実施形態では、合成RNAウイルスゲノムは、ペイロード分子をコードする異種ポリヌクレオチドを含む。そのような実施形態では、合成RNAウイルスゲノムは、感染性腫瘍溶解性ウイルスの産生及びペイロード分子の発現を推進する。いくつかの実施形態では、ペイロード分子の発現は、腫瘍溶解性ウイルスの治療有効性を増加させることができる。いくつかの実施形態では、ペイロード分子は、IL-12、GM-CSF、CXCL10、IL-36 γ 、CCL21、IL-18、IL-2、CCL4、CCL5、抗CD3-抗FAP BiTE、DLL3と結合する抗原結合分子、またはEpCAMと結合する抗原結合分子から選択される。いくつかの実施形態では、ペイロード分子は、MLKL 4 HBDドメインを含むかまたはそれからなる。いくつかの実施形態では、ペイロード分子は、ガスダーミンD N末端断片を含むかまたはそれからなる。いくつかの実施形態では、ペイロード分子は、ガスダーミンE N末端断片を含むかまたはそれからなる。いくつかの実施形態では、ペイロード分子は、HMGB1 Box Bドメインを含むかまたはそれからなる。いくつかの実施形態では、ペイロード分子は、SMAC/Diabloを含むかまたはそれからなる。いくつかの実施形態では、ペイロード分子は、メリチンを含むかまたはそれからなる。いくつかの実施形態では、ペイロード分子は、L-アミノ酸オキシダーゼ(LAAO)を含むかまたはそれからなる。いくつかの実施形態では、ペイロード分子は、ディスインテグリンを含むかまたはそれからなる。いくつかの実施形態では、ペイロード分子は、TRAIL(TNFSF10)を含むかまたはそれからなる。いくつかの実施形態では、ペイロード分子は、ニトロレダクターゼ(例えば、E.coli NfsBまたはNfsA)を含むかまたはそれからなる。いくつかの実施形態では、ペイロード分子は、レオウイルスFASTタンパク質(例えば、ARV p14、BRV p15、またはp14-p15ハイブリッド)を含むかまたはそれからなる。いくつかの実施形態では、ペイロード分子は、レプチン/FOSL2を含むかまたはそれからなる。いくつかの実施形態では、ペイロード分子は、 α -1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼを含むかまたはそれからなる。いくつかの実施形態では、ペイロード分子は、アデノシンデアミナーゼ2(ADA2)を含むかまたはそれからなる。いくつかの実施形態では、ペイロード分子は、IL-IL-36 γ 、IL-7、IL-12、IL-18、IL-21、IL2またはIFN γ から選択されるサイトカインを含むかまたはそれからなる。これらの実施形態で使用するのに好適なペイロード分子の種類に関するさらなる説明を以下に提供する。

10

20

30

【0258】

組換えRNAウイルスゲノムを産生する方法

いくつかの実施形態では、本開示は、本明細書に記載される合成RNAウイルスゲノムをコードする組換えDNA分子を提供する。そのような組換えDNA分子は、本明細書では「DNA鋳型」または「組換えDNA鋳型」と称される。いくつかの実施形態では、組換えDNA分子は、コードされた合成RNAウイルスゲノムのin vitro転写のための鋳型として使用される。いくつかの実施形態では、組換えDNA分子(例えば、DNA鋳型)は、5'から3'に、次のエレメントのうちの1つ以上を含む：(i)プロモーター、(ii)5'リーダー配列、(iii)5'接合部切断配列、(iv)合成RNAゲノムをコードするDNAポリヌクレオチド配列、(v)ポリA尾部、及び/または(vi)3'接合部切断配列。いくつかの実施形態では、組換えRNA分子をコードする組換えDNA分子(例えば、DNA鋳型)は、次のエレメントの各々を含む：(i)プロモーター、(ii)5'リーダー配列、(iii)5'接合部切断配列、(iv)合成RNAゲノムをコードするDNAポリヌクレオチド配列、(v)ポリA尾部、及び(vi)3'接合部切断配列。これらのエレメントの各々について、以下に詳細に説明する。各個のエレメントについて提供される説明は、各エレメントの特定の実施形態が最終的な組換えDNA分子(例えば、DNA鋳型)に統合され得るようなものである。例えば、特定のリーダー配列の開示を特定の5'接合部切断配列の開示と組み合わせることなどができる。

40

【0259】

いくつかの実施形態では、組換えDNA分子(例えば、DNA鋳型)は、2つの隣接す

50

るエレメントの間には追加の核酸を含まないが、プロモーター配列の上流または3'接合部切断配列の下流に追加の核酸を含み得る。いくつかの実施形態では、プロモーター配列は、T7プロモーター配列である。いくつかの実施形態では、T7プロモーター配列は、配列番号91を含むかまたはそれからなる。

【0260】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される合成RNAウイルスゲノムは、合成RNAウイルスゲノムをコードするポリヌクレオチドを含む1つ以上の組換えDNA鑄型を使用して *in vitro* で産生される。言い換えると、組換えDNA鑄型は、合成RNAウイルスゲノムをコードするポリヌクレオチドを含むベクターである。「ベクター」という用語は、別の核酸分子を輸送、コード、または運搬することができる核酸分子を指すために本明細書で使用される。輸送される核酸は、通常、ベクター核酸分子に挿入される。ベクターは、細胞内での自律複製を指示する配列を含み得、及び／または宿主細胞DNAへの組み込みを可能にするのに十分な配列を含み得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の腫瘍溶解性ウイルスをコードする組換えRNA分子は、1つ以上のDNAベクターを使用して産生される。

10

【0261】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される合成RNAウイルスゲノムは、組換えRNA分子をコードするポリヌクレオチドを含む組換えDNA分子（例えば、DNA鑄型）を好適な宿主細胞に *in vitro* で（例えば、トランスフェクション、形質導入、エレクトロポレーションなどの手段により）導入することによって産生される。好適な宿主細胞には、昆虫及び哺乳動物の細胞系が含まれる。宿主細胞は、ポリヌクレオチドの発現及び合成RNAウイルスゲノムの産生を可能にする適切な時間にわたって培養される。次いで、合成RNAウイルスゲノムが、宿主細胞から単離され、治療的使用のために製剤化される（例えば、粒子にカプセル化される）。3'及び5'リボザイムを含むCVA21 RNAウイルスゲノムの *in vitro* 合成の概略を図10に示す。同じ概略が、接合部切断配列の他の組み合わせを使用したRNAウイルスゲノム（例えば、CVA21またはSVVウイルスゲノム）の合成に適用される（例えば図11Aを参照のこと）。3'接合部切断配列が制限酵素認識部位を含むかまたはそれからなる場合、組換えDNA分子（例えば、DNA鑄型）は、図11Bに示すように、*in vitro* 転写プロセスの前に対応する制限酵素で消化され得る。

20

30

【0262】

T7プロモーター

いくつかの実施形態では、組換えDNA分子（例えば、DNA鑄型）は、T7プロモーターを含む。いくつかの実施形態では、T7プロモーターは、配列番号91のポリヌクレオチド配列を含むかまたはそれからなる。いくつかの実施形態では、T7プロモーターは、最大1、2、3、または4つの変異を含む配列番号91のポリヌクレオチド配列を含むかまたはそれからなる。

【0263】

いくつかの実施形態では、T7プロモーターはリーダー配列の直前に配置され、その間に追加のヌクレオチドは存在しない。いくつかの実施形態では、T7プロモーターは5'接合部切断配列の直前に配置され、その間に追加のヌクレオチドは存在しない。いくつかの実施形態では、ウイルスゲノムは、CVA21またはSVVをコードする。

40

【0264】

接合部切断配列

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される合成RNAウイルスゲノムを含む組換えRNA分子は、ウイルスにとって天然である個別の5'末端及び3'末端を必要とする。*in vitro* でT7 RNAポリメラーゼによって、または哺乳動物RNA Pol IIによって産生されるRNA転写物は、哺乳動物の5'及び3'UTRを含み、感染性RNAウイルスの産生に必要な個別の天然末端を含まない。例えば、T7 RNAポリメラーゼは、転写を開始するために、鑄型ポリヌクレオチドの5'末端にグアノシン残基を必

50

要とする。しかしながら、SVVは、その5'末端のウリジン残基で始まる。したがって、SVV転写物の*in vitro*転写に必要とされるT7リーダー配列は、機能的な感染性SVVの産生に必要な天然5' SVV末端を生成するために除去されなければならない。したがって、いくつかの実施形態では、本明細書に記載される合成RNAウイルスゲノムの産生において使用するのに好適な組換えDNA分子（例えば、DNA鋳型）は、ウイルスにとって天然の個別の5'末端及び3'末端の生成を可能にする追加の非ウイルス5'及び3'配列を必要とする。かかる配列は、本明細書では接合部切断配列（JCS）と称される。いくつかの実施形態では、接合部切断配列は、非ウイルスRNAポリヌクレオチドがウイルスの内因性の5'及び3'の個別の末端を維持するために転写物から除去されるように、ウイルスRNA及び哺乳動物mRNA配列の接合部でT7 RNAポリメラーゼまたはPol IIコードRNA転写物を切断するように作用する（図11Aに示す概略図を参照のこと）。いくつかの実施形態では、接合部切断配列は、合成ウイルスゲノムをコードするDNAプラスミドの線形化中に適切な末端を生成するように作用する（例えば、プラスミド鋳型の線形化の際、かつ合成RNAゲノムの*in vitro*転写の前に、適切な3'末端を生成するための3'制限酵素認識配列の使用）。

10

20

30

40

50

【0265】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される合成RNAウイルスゲノムの産生において使用するのに好適な組換えDNA分子（例えば、DNA鋳型）は、少なくとも1つの5'接合部切断配列及び少なくとも1つの3'接合部切断配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される合成RNAウイルスゲノムの産生において使用するのに好適な組換えDNA分子（例えば、DNA鋳型）は、1つ以上の5'接合部切断配列及び少なくとも1つの3'接合部切断配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される合成RNAウイルスゲノムの産生において使用するのに好適な組換えDNA分子（例えば、DNA鋳型）は、少なくとも1つの5'接合部切断配列及び1つ以上の3'接合部切断配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される合成RNAウイルスゲノムの産生において使用するのに好適な組換えDNA分子（例えば、DNA鋳型）は、2つの5'接合部切断配列及び少なくとも1つの3'接合部切断配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される合成RNAウイルスゲノムの産生において使用するのに好適な組換えDNA分子（例えば、DNA鋳型）は、少なくとも1つの5'接合部切断配列及び2つの3'接合部切断配列を含む。

【0266】

接合部切断配列の性質及びウイルスゲノム転写物からの非ウイルスRNAの除去は、様々な方法によって達成することができる。例えば、いくつかの実施形態では、接合部切断配列は、RNA干渉（RNAi）分子の標的である。本明細書で使用される「RNA干渉分子」は、内因性遺伝子サイレンシング経路（例えば、ダイサー及びRNA誘導サイレンシング複合体（RISC））を介して標的mRNA配列の分解を媒介するRNAポリヌクレオチドを指す。例示的なRNA干渉剤には、マイクロRNA（miRNA）、人工miRNA（amiRNA）、ショートヘアピンRNA（shRNA）、及び低分子干渉RNA（siRNA）が含まれる。さらに、現在当技術分野で公知である、または将来定義される特定の部位でRNA転写物を切断するための任意の系を使用して、ウイルスにとって天然の個別の末端を生成することができる。

【0267】

いくつかの実施形態では、RNAi分子は、miRNAである。miRNAは、標的mRNA配列と少なくとも部分的に相補的である、約18~25ヌクレオチドの長さの天然に存在する小さなノンコーディングRNA分子を指す。動物では、miRNAの遺伝子は、二本鎖であり、ステムループ構造を形成する、一次miRNA（pri-miRNA）に転写される。次に、Pri-miRNAは、クラス2 RNase III、ドロシー

ャ及びマイクロプロセッササブユニット、DCGR8を含むマイクロプロセッサ複合体によって核内で切断され、70～100ヌクレオチドの前駆体miRNA (pre-miRNA) を形成する。pre-miRNAはヘアピン構造を形成し、細胞質に輸送され、ここでRNase III酵素、ダイサーによってプロセシングされて約18～25ヌクレオチドのmiRNA二本鎖となる。二本鎖のどちらの鎖も機能的なmiRNAとして機能し得るが、通常、miRNAの1つの鎖が分解され、1つの鎖のみがアルゴノート (AGO) ヌクレアーゼに負荷されて、miRNA及びそのmRNA標的が相互作用するエフェクターRNA誘導サイレンシング複合体 (RISC) が産生される (Wahid et al., 1803:11, 2010, 1231-1243)。いくつかの実施形態では、5' 及び／または3' 接合部切断配列は、miRNA標的配列である。

10

【0268】

いくつかの実施形態では、RNAi分子は、合成miRNAが埋め込まれたPol I転写物に由来する人工miRNA (amiRNA) である (例えば、Liu et al., Nucleic Acids Res (2008) 36:9; 2811-2834、Zeng et al., Molecular Cell (2002), 9; 1327-1333、Fellman et al., Cell Reports (2013) 5; 1704-1713を参照されたい)。いくつかの実施形態では、5' 及び／または3' 接合部切断配列は、amiRNA標的配列である。

【0269】

いくつかの実施形態では、RNAi分子は、siRNA分子である。siRNAは、典型的に約21～23ヌクレオチドの長さの二本鎖RNA分子を指す。二本鎖siRNA分子は、RNA誘導サイレンシング複合体 (RISC) と称される多タンパク質複合体と会合することにより細胞質でプロセシングされ、その間に「パッセンジャー」センス鎖が二本鎖から酵素的に切断される。次に、活性化RISCに含まれるアンチセンス「ガイド」鎖が、配列相補性によってRISCを対応するmRNAに誘導し、AGOヌクレアーゼが、標的mRNAを切断して、特定の遺伝子サイレンシングを引き起こす。いくつかの実施形態では、siRNA分子は、shRNA分子に由来する。shRNAは、ステムループ構造を形成する約50～70ヌクレオチドの長さの一本鎖人工RNA分子である。細胞内でのshRNAの発現は、shRNAをコードするDNAポリヌクレオチドをプラスミドまたはウイルスベクターによって導入することによって達成される。次いで、shRNAが転写されてpre-miRNAのステムループ構造を模倣する産物になり、核外輸送の後、ヘアピンがダイサーによってプロセシングされて二本鎖siRNA分子を形成し、次いでこれが、標的遺伝子サイレンシングを媒介するRISCによってさらにプロセシングされる。いくつかの実施形態では、5' 及び／または3' 接合部切断配列は、siRNA標的配列である。

20

30

【0270】

いくつかの実施形態では、接合部切断配列は、ガイドRNA (gRNA) 標的配列である。そのような実施形態では、gRNAは、RNase活性を有するCasエンドヌクレアーゼ (例えば、Cas13) を用いて設計及び導入され、正確な接合部位でのウイルスゲノム転写物の切断を媒介することができる。いくつかの実施形態では、5' 及び／または3' 接合部切断配列は、gRNA標的配列である。

40

【0271】

いくつかの実施形態では、接合部切断配列は、pri-miRNAをコードする配列である。ウイルスゲノムをコードするポリヌクレオチド (例えば、組換えRNA分子) が転写されると、これらの配列は、pri-miRNAステムループ構造を形成し、これがドロシャによって核内で切断され、正確な接合部位で転写物が切断される。いくつかの実施形態では、5' 及び／または3' 接合部切断配列は、pri-mRNA標的配列である。

【0272】

いくつかの実施形態では、接合部切断配列は、エンドリボヌクレアーゼのRNase Hによる切断を促進するプライマー結合配列である。そのような実施形態では、5' 及び／

50

10

20

30

40

50

【 0 2 7 5 】

いくつかの実施形態では、接合部切断配列は、RNAi分子（例えば、siRNA分子、shRNA分子、miRNA分子、またはamiRNA分子）、gRNA分子、またはRNAseHプライマーの標的配列である。そのような実施形態では、接合部切断配列は、RNAi分子、gRNA分子、またはプライマー分子の配列と少なくとも部分的に相補的である。パーセント配列同一性及びパーセント相補性の比較及び決定のための配列アラインメントの方法は、当技術分野で周知である。比較のための配列の最適なアラインメントは、例えば、Needleman and Wunsch, (1970) J. Mol. Biol. 48:443の相同性アラインメントアルゴリズムによって、Pearson and Lipman, (1988) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444の類似性検索法によって、これらのアルゴリズムのコンピュータ化された実装 (Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WIのGAP、BESTFIT、FASTA、及びTFASTA) によって、手動アラインメント及び目視検査（例えば、Brent et al., (2003) Current Protocols in Molecular Biologyを参照されたい）によって、Altschul et al., (1977) Nuc. Acids Res. 25:3389-3402及びAltschul et al., (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410にそれぞれ記載されているBLAST及びBLAST2.0アルゴリズムを含む当技術分野で公知のアルゴリズムを使用することによって行うことができる。BLAST分析を実行するためのソフトウェアは、米国国立生物工学情報センターを通じて公開されている。

【0276】

いくつかの実施形態では、5'接合部切断配列及び3'接合部切断配列は、同じ群に由来する（例えば、両方ともRNAi標的配列、両方ともリボザイムをコードする配列などである）。例えば、いくつかの実施形態では、接合部切断配列は、RNAi標的配列（例えば、siRNA、shRNA、amiRNA、またはmiRNA標的配列）であり、ウイルスゲノムをコードするポリヌクレオチド（例えば、組換えRNA分子）の5'末端及び3'末端に組み込まれる。そのような実施形態では、5'及び3'RNAi標的配列は、同じ（すなわち、同じsiRNA、amiRNA、またはmiRNAの標的）であるか、または異なり得る（すなわち、5'配列が1つのsiRNA、shmiRNA、またはmiRNAの標的であり、3'配列が別のsiRNA、amiRNA、またはmiRNAの標的である）。いくつかの実施形態では、接合部切断配列は、ガイドRNA標的配列であり、ウイルスゲノムをコードするポリヌクレオチド（例えば、組換えRNA分子）の5'末端及び3'末端に組み込まれる。そのような実施形態では、5'及び3'gRNA標的配列は、同じ（すなわち、同じgRNAの標的）であるか、または異なり得る（すなわち、5'配列が1つのgRNAの標的であり、3'配列が別のgRNAの標的である）。いくつかの実施形態では、接合部切断配列は、pri-mRNAをコードする配列であり、ウイルスゲノムをコードするポリヌクレオチド（例えば、組換えRNA分子）の5'末端及び3'末端に組み込まれる。いくつかの実施形態では、接合部切断配列は、リボザイムをコードする配列であり、ウイルスゲノムをコードするポリヌクレオチド配列（例えば、組換えRNA分子）のすぐ5'及び3'側に組み込まれる。

【0277】

いくつかの実施形態では、5'接合部切断配列及び3'接合部切断配列は、同じ群に由来するが、異なるバリエーションまたは種類である。例えば、いくつかの実施形態では、5'及び3'接合部切断配列は、RNAi分子の標的配列であり得、5'接合部切断配列は、siRNA標的配列であり、3'接合部切断配列は、miRNA標的配列である（またはその逆である）。いくつかの実施形態では、5'及び3'接合部切断配列は、リボザイムをコードする配列であり得、5'接合部切断配列は、ハンマーヘッド型リボザイムをコードする配列であり、3'接合部切断配列は、デルタ肝炎ウイルスリボザイムをコードする配列である。

【0278】

いくつかの実施形態では、5' 接合部切断配列及び3' 接合部切断配列は異なる種類である。例えば、いくつかの実施形態では、5' 接合部切断配列は、RNAi 標的配列（例えば、siRNA、amiRNA、またはmiRNA 標的配列）であり、3' 接合部切断配列は、リボザイム配列、アプタザイム配列、pri-miRNA 配列、またはgRNA 標的配列である。いくつかの実施形態では、5' 接合部切断配列は、リボザイム配列であり、3' 接合部切断配列は、RNAi 標的配列（例えば、siRNA、amiRNA、またはmiRNA 標的配列）、アプタザイム配列、pri-miRNA をコードする配列、またはgRNA 標的配列である。いくつかの実施形態では、5' 接合部切断配列は、アプタザイム配列であり、3' 接合部切断配列は、RNAi 標的配列（例えば、siRNA、amiRNA、またはmiRNA 標的配列）、リボザイム配列、pri-miRNA 配列、またはgRNA 標的配列である。いくつかの実施形態では、5' 接合部切断配列は、pri-miRNA 配列であり、3' 接合部切断配列は、RNAi 標的配列（例えば、siRNA、amiRNA、またはmiRNA 標的配列）、リボザイム配列、アプタザイム配列、またはgRNA 標的配列である。いくつかの実施形態では、5' 接合部切断配列は、gRNA 標的配列であり、3' 接合部切断配列は、RNAi 標的配列（例えば、siRNA、amiRNA、またはmiRNA 標的配列）、リボザイム配列、pri-miRNA 配列、またはアプタザイム配列である。

【0279】

合成ウイルスゲノムをコードするポリヌクレオチドに比した接合部切断配列の例示的な配置を、以下の表3 及び4 に示す。

【表3】

表3：対称接合部切断配列（JSC）配置

5'	JCS		JCS	3'
	siRNA TS	合成ゲノム	siRNA TS	
	miR TS	合成ゲノム	miR TS	
	AmiR TS	合成ゲノム	AmiR TS	
	gRNA TS	合成ゲノム	gRNA TS	
	pri-miR	合成ゲノム	pri-miR	
	リボザイム	合成ゲノム	リボザイム	
	アプタザイム	合成ゲノム	アプタザイム	
	RNAseH プライマーTS	合成ゲノム	RNAseH プライマーTS	

【表 4 - 1】

表 4 : 非対称 J C S 配置

5'	JCS		JCS	3'
	siRNA TS	合成ゲノム	miR TS	
	siRNA TS	合成ゲノム	AmiR TS	
	siRNA TS	合成ゲノム	gRNA TS	
	siRNA TS	合成ゲノム	pri-miR	
	siRNA TS	合成ゲノム	リボザイム	
	siRNA TS	合成ゲノム	アプタザイム	
	siRNA TS	合成ゲノム	RNAseH プライマー-TS	
	siRNA TS	合成ゲノム	Restr Enz RS	
	miR TS	合成ゲノム	siRNA TS	
	miR TS	合成ゲノム	AmiR TS	
	miR TS	合成ゲノム	gRNA TS	
	miR TS	合成ゲノム	pri-miR	
	miR TS	合成ゲノム	リボザイム	
	miR TS	合成ゲノム	アプタザイム	
	miR TS	合成ゲノム	RNAseH プライマー-TS	
	miR TS	合成ゲノム	Restr Enz RS	
	AmiR TS	合成ゲノム	siRNA TS	
	AmiR TS	合成ゲノム	miR TS	
	AmiR TS	合成ゲノム	gRNA TS	
	AmiR TS	合成ゲノム	pri-miR	
	AmiR TS	合成ゲノム	リボザイム	
	AmiR TS	合成ゲノム	アプタザイム	
	AmiR TS	合成ゲノム	RNAseH プライマー-TS	
	AmiR TS	合成ゲノム	Restr Enz RS	
	gRNA TS	合成ゲノム	siRNA TS	
	gRNA TS	合成ゲノム	miR TS	
	gRNA TS	合成ゲノム	AmiR TS	
	gRNA TS	合成ゲノム	pri-miR	
	gRNA TS	合成ゲノム	リボザイム	
	gRNA TS	合成ゲノム	アプタザイム	
	gRNA TS	合成ゲノム	RNAseH プライマー-TS	
	gRNA TS	合成ゲノム	Restr Enz RS	
	pri-miR	合成ゲノム	siRNA TS	
	pri-miR	合成ゲノム	miR TS	
	pri-miR	合成ゲノム	AmiR TS	
	pri-miR	合成ゲノム	gRNA TS	

10

20

30

40

50

【表 4 - 2】

5'	JCS		JCS	3'
	pri-miR	合成ゲノム	リボザイム	
	pri-miR	合成ゲノム	アプタザイム	
	pri-miR	合成ゲノム	RNaseH プライマー-TS	
	pri-miR	合成ゲノム	Restr Enz RS	
	リボザイム	合成ゲノム	siRNA TS	
	リボザイム	合成ゲノム	miR TS	
	リボザイム	合成ゲノム	AmiR TS	
	リボザイム	合成ゲノム	gRNA TS	
	リボザイム	合成ゲノム	pri-miR	
	リボザイム	合成ゲノム	アプタザイム	
	リボザイム	合成ゲノム	RNaseH プライマー-TS	
	リボザイム	合成ゲノム	Restr Enz RS	
	アプタザイム	合成ゲノム	siRNA TS	
	アプタザイム	合成ゲノム	miR TS	
	アプタザイム	合成ゲノム	AmiR TS	
	アプタザイム	合成ゲノム	gRNA TS	
	アプタザイム	合成ゲノム	pri-miR	
	アプタザイム	合成ゲノム	リボザイム	
	アプタザイム	合成ゲノム	RNaseH プライマー-TS	
	アプタザイム	合成ゲノム	Restr Enz RS	
	RNaseH プライマー-TS	合成ゲノム	siRNA TS	
	RNaseH プライマー-TS	合成ゲノム	miR TS	
	RNaseH プライマー-TS	合成ゲノム	AmiR TS	
	RNaseH プライマー-TS	合成ゲノム	gRNA TS	
	RNaseH プライマー-TS	合成ゲノム	pri-miR	
	RNaseH プライマー-TS	合成ゲノム	リボザイム	
	RNaseH プライマー-TS	合成ゲノム	アプタザイム	
	RNaseH プライマー-TS	合成ゲノム	Restr Enz RS	

* 「Restr Enz RS」は制限酵素認識部位を指す

【0280】

いくつかの実施形態では、接合部切断配列は、リボザイムをコードする配列であり、合成RNAゲノム中間体の自己切断を媒介して、最終的な合成ウイルスRNAゲノム及びその後の感染性RNAウイルスの産生に必要な天然の個別の5'末端及び／または3'末端を産生する。例示的なリボザイムには、ハンマーヘッド型リボザイム（例えば、図5Aに示すハンマーヘッド型リボザイム）、Varkudサテライト（VS）リボザイム、ヘアピンリボザイム、GIR1分岐リボザイム、glmSリボザイム、ツイスターリボザイム、ツイスターシスターリボザイム（例えば、ツイスターシスター1またはツイスターシスター2）、ピストル型リボザイム（例えば、図6A～6Cに示すピストル型リボザイム、Env25ピストル型リボザイム、またはAlistipes Putredinisピス

トル型リボザイム)、ハチエットリボザイム、及びデルタ肝炎ウイルスリボザイムが含まれる。いくつかの実施形態では、5'及び／または3'接合部切断配列は、リボザイムをコードする配列である。

【0281】

いくつかの実施形態では、5'接合部切断配列は、リボザイム配列を含むかまたはそれからなる。いくつかの実施形態では、5'リボザイム配列は、ハンマーヘッド型リボザイム配列、ピストル型リボザイム配列、またはツイスターシスターリボザイム配列から選択される。

【0282】

いくつかの実施形態では、5'接合部切断配列は、5'ピストル型リボザイム配列を含む 10
かまたはそれからなる。いくつかの実施形態では、5'ピストル型リボザイム配列は、P・polymyxaに由来する。いくつかの実施形態では、P・polymyxaに由来する5'ピストル型リボザイム配列は、配列番号16~19及び23~24のいずれか1つとの少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の(それらの間のすべての範囲及び部分的範囲を含む)配列同一性を有する配列を含むかまたはそれからなる。いくつかの実施形態では、5'ピストル型リボザイム配列には、4ヌクレオチドの長さであり、配列番号16~19及び23~24の核酸27~30位 20
に対応する領域に位置する、図6A及び6Cに示されるP2モチーフが含まれる。いくつかの実施形態では、P・polymyxaに由来する5'ピストル型リボザイム配列は、配列番号17との少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の(それらの間のすべての範囲及び部分的範囲を含む)配列同一性を有する配列を含むかまたはそれからなり、そのP2モチーフのポリヌクレオチド配列は「TTTA」である。いくつかの実施形態では、P・polymyxaに由来する5'ピストル型リボザイム配列は、配列番号18との少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の(それらの間のすべての範囲及び部分的範囲を含む)配列同一性を有する配列を含むかまたはそれからなり、そのP2モチーフのポリヌクレオチド配列は「TTTT」である。いくつかの実施形態では、P・polymyxaに 30
由来する5'ピストル型リボザイム配列は、配列番号19との少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の(それらの間のすべての範囲及び部分的範囲を含む)配列同一性を有する配列を含むかまたはそれからなり、そのP2モチーフのポリヌクレオチド配列は「TTGT」である。いくつかの実施形態では、5'ピストル型リボザイム配列は、コクサッキーウイルス(例えば、CVA21)RNAウイルスゲノムのin vitro転写のために、組換えDNA分子に組み込まれる。

【0283】

いくつかの実施形態では、5'接合部切断配列は、5'ピストル型リボザイム配列を含む 40
かまたはそれからなる。いくつかの実施形態では、5'ピストル型リボザイム配列は、P・polymyxaに由来する。いくつかの実施形態では、P・polymyxaに由来する5'ピストル型リボザイム配列は、配列番号64または65との少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の(それらの間のすべての範囲及び部分的範囲を含む)配列同一性を有する配列を含むかまたはそれからなる。いくつかの実施形態では、5'ピストル型リボザイム配列には、4ヌクレオチドの長さであり、配列番号64または65の核酸27~30位に対応する領域に位置するP2モチーフが含まれる。いくつかの実施形態では、P・polymyxaに由来する5'ピストル型リボザイム配列は、配列番号64との少なくとも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% 50

、少なくとも 99 %、または 100 %の（それらの間のすべての範囲及び部分的範囲を含む）配列同一性を有する配列を含むかまたはそれからなり、その P2モチーフのポリヌクレオチド配列は「T C A A」である。いくつかの実施形態では、P. polymyxa に由来する 5'ピストル型リボザイム配列は、配列番号 65 との少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、または 100 %の（それらの間のすべての範囲及び部分的範囲を含む）配列同一性を有する配列を含むかまたはそれからなり、その P2モチーフのポリヌクレオチド配列は「T T A A」である。いくつかの実施形態では、5'ピストル型リボザイム配列は、SVV（例えば、SVV-IRES-2）RNA ウィルスゲノムの *in vitro* 転写のために、組換え DNA 分子に組み込まれる。

10

【0284】

いくつかの実施形態では、5'接合部切断配列は、Env25ピストル型リボザイムを含むかまたはそれからなる。いくつかの実施形態では、Env25ピストル型リボザイムをコードする DNA 配列は、配列番号 96 との少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、または 100 %の（それらの間のすべての範囲及び部分的範囲を含む）配列同一性を有する配列を含むかまたはそれからなる。いくつかの実施形態では、Env25ピストル型リボザイム RNA 配列は、配列番号 100 との少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、または 100 %の（それらの間の

20

【0285】

いくつかの実施形態では、5'接合部切断配列は、Alistipes Putredinidisピストル型リボザイムを含むかまたはそれからなる。いくつかの実施形態では、Alistipes Putredinidisピストル型リボザイムをコードする DNA 配列は、配列番号 97 との少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、または 100 %の（それらの間のすべての範囲及び部分的範囲を含む）配列同一性を有する配列を含むかまたはそれからなる。いくつかの実施形態では、Alistipes Putredinidisピストル型リボザイム RNA 配列は、配列番号 101 との少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、または 100 %の（それらの間のすべての範囲及び部分的範囲を含む）配列同一性を有する配列を含むかまたはそれからなる。

30

【0286】

いくつかの実施形態では、5'接合部切断配列は、ツイスターシスター1リボザイムを含むかまたはそれからなる。いくつかの実施形態では、ツイスターシスター1リボザイムをコードする DNA 配列は、配列番号 98 との少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、または 100 %の（それらの間のすべての範囲及び部分的範囲を含む）配列同一性を有する配列を含むかまたはそれからなる。いくつかの実施形態では、ツイスターシスター1リボザイム RNA 配列は、配列番号 102 との少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、または 100 %の（それらの間の

40

【0287】

いくつかの実施形態では、5'接合部切断配列は、ツイスターシスター2リボザイムを含むかまたはそれからなる。いくつかの実施形態では、ツイスターシスター2リボザイム

50

をコードするDNA配列は、配列番号99との少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の（それらの間のすべての範囲及び部分的範囲を含む）配列同一性を有する配列を含むかまたはそれからなる。いくつかの実施形態では、ツイスターシスター2リボザイムRNA配列は、配列番号103との少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の（それらの間のすべての範囲及び部分的範囲を含む）配列同一性を有する配列を含むかまたはそれからなる。

【0288】

リーダー配列

いくつかの実施形態では、組換えDNA分子（例えば、DNA鋳型）は、プロモーター配列と5'接合部切断配列との間にリーダー配列を含む。いくつかの実施形態では、リーダー配列の存在は、下流5'接合部切断配列（例えば、5'リボザイム配列）の適切なフォールディングを促進するか、または確実にする。

【0289】

いくつかの実施形態では、リーダー配列は、約5bp、約10bp、約15bp、約20bp、約25bp、約30bp、約35bp、約40bp、約45bp、約50bp、約55bp、約60bp、約65bp、約70bp、約75bp、約80bp、約85bp、約90bp、約95bp、または約100bpの長さであり、それらの間のすべての範囲及び部分的範囲を含む。いくつかの実施形態では、リーダー配列は、少なくとも5bp、少なくとも10bp、少なくとも15bp、少なくとも20bp、少なくとも25bp、少なくとも30bp、少なくとも35bp、少なくとも40bp、少なくとも45bp、少なくとも50bp、少なくとも55bp、少なくとも60bp、少なくとも65bp、少なくとも70bp、少なくとも75bp、少なくとも80bp、少なくとも85bp、少なくとも90bp、少なくとも95bp、または少なくとも100bpの長さであり、それらの間のすべての範囲及び部分的範囲を含む。いくつかの実施形態では、リーダー配列は、5bp未満、10bp未満、15bp未満、20bp未満、25bp未満、30bp未満、35bp未満、40bp未満、45bp未満、50bp未満、55bp未満、60bp未満、65bp未満、70bp未満、75bp未満、80bp未満、85bp未満、90bp未満、95bp未満、または100bp未満の長さであり、それらの間のすべての範囲及び部分的範囲を含む。いくつかの実施形態では、リーダー配列は、約50~70bp、約40~60bp、約60~80bp、約40~80bp、約30~70bp、約50~90bp、約30~90bp、約20~60bp、または約60~100bpの長さであり、それらの間のすべての範囲及び部分的範囲を含む。いくつかの実施形態では、リーダー配列は、約57bpまたは約55~60bpの長さである。

【0290】

いくつかの実施形態では、リーダー配列は、配列番号13~15のいずれか1つによる少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の（それらの間のすべての範囲及び部分的範囲を含む）配列同一性を有するポリヌクレオチド配列を含むかまたはそれからなる。いくつかの実施形態では、リーダー配列は、配列番号13~15のいずれか1つによるポリヌクレオチド配列を含むかまたはそれからなる。いくつかの実施形態では、リーダー配列は、配列番号15による少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の（それらの間のすべての範囲及び部分的範囲を含む）配列同一性を有するポリヌクレオチド配列を含むかまたはそれからなる。いくつかの実施形態では、リーダー配列は、配列番号15によるポリヌクレオチド配列を含む

10

20

30

40

50

かまたはそれからなる。いくつかの実施形態では、リーダー配列の後または直後には、5'ピストル型リボザイム配列（例えば、P. Polymyx a由来のピストル型リボザイムまたはそのバリエーション）が続く。いくつかの実施形態では、リーダー配列は、CVA21 RNA ウイルスゲノムの *in vitro* 転写のために、組換えDNA分子（例えば、DNA 鋳型）に組み込まれる。

【0291】

いくつかの実施形態では、リーダー配列は、配列番号53～63のいずれか1つによる少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の（それらの間のすべての範囲及び部分的範囲を含む）配列同一性を有するポリヌクレオチド配列を含むかまたはそれからなる。いくつかの実施形態では、リーダー配列は、配列番号53～60及び62～63のいずれか1つによる少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の（それらの間のすべての範囲及び部分的範囲を含む）配列同一性を有するポリヌクレオチド配列を含むかまたはそれからなる。いくつかの実施形態では、リーダー配列は、配列番号53～60及び62～63のいずれか1つによるポリヌクレオチド配列を含むかまたはそれからなる。

10

【0292】

いくつかの実施形態では、リーダー配列は、配列番号53による少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の（それらの間のすべての範囲及び部分的範囲を含む）配列同一性を有するポリヌクレオチド配列を含むかまたはそれからなる。いくつかの実施形態では、リーダー配列は、配列番号53によるポリヌクレオチド配列を含むかまたはそれからなる。

20

【0293】

いくつかの実施形態では、リーダー配列は、配列番号58による少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の（それらの間のすべての範囲及び部分的範囲を含む）配列同一性を有するポリヌクレオチド配列を含むかまたはそれからなる。いくつかの実施形態では、リーダー配列は、配列番号58によるポリヌクレオチド配列を含むかまたはそれからなる。

30

【0294】

いくつかの実施形態では、リーダー配列の後または直後には、5'ピストル型リボザイム配列（例えば、配列番号64もしくは65によるピストル型リボザイムまたはそのバリエーション）が続く。いくつかの実施形態では、リーダー配列は、SVV RNA ウイルスゲノムの *in vitro* 転写のために、組換えDNA分子（例えば、DNA 鋳型）に組み込まれる。

40

【0295】

ポリA尾部

いくつかの実施形態では、組換えDNA分子（例えば、DNA 鋳型）は、ポリA尾部をコードする配列を含む。いくつかの実施形態では、ポリA尾部が合成RNA ウイルスゲノムの3'末端に付加される。いくつかの実施形態では、ポリA尾部は、2～500bpの長さ（すなわち、2～500pA）である。いくつかの実施形態では、ポリA尾部は、2～100、2～150、2～200、2～250、2～300、2～400、または2～500bpの長さであり、それらの間のすべての範囲及び部分的範囲を含む。いくつかの実施形態では、ポリA尾部は、約5、10、15、20、25、30、35、40、45

50

、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、または200bpの長さであり、それらの間のすべての範囲及び部分的範囲を含む。いくつかの実施形態では、ポリA尾部は、約10～30、20～40、30～50、40～60、50～70、60～80、70～90、80～100、90～110、100～120、110～130、120～140、130～150、140～160、150～170、160～180、170～190、または180～200bpの長さであり、それらの間のすべての範囲及び部分的範囲を含む。いくつかの実施形態では、ポリA尾部は、約65～75、60～80、55～85、50～90、45～95、または40～100bpの長さであり、それらの間のすべての範囲及び部分的範囲を含む。いくつかの実施形態では、ポリA尾部は、約70bpの長さである。いくつかの実施形態では、より長いポリA尾部（例えば、約70bpの長さ）は、より短いポリA尾部（例えば、約30bpの長さ）を持つ対応する合成RNAウイルスゲノムと比較して、オリゴdTクロマトグラフィーにおける合成RNAウイルスゲノムの負荷能力を改善する。いくつかの実施形態では、負荷能力は、約30bpの長さのポリA尾部を持つ合成RNAウイルスゲノムと比較して、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも1倍、少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも7倍、または少なくとも10倍改善する。

10

【0296】

20

組換えDNA分子設計の非限定的な例

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される合成RNAウイルスゲノムは、*in vitro* RNA転写により、*in vitro*で産生される（例えば、図10、図11A、図11B、及び図33の概略図を参照のこと）。次いで、合成RNAウイルスゲノムが精製され、治療的使用のために製剤化される（例えば、脂質ナノ粒子にカプセル化される）。

【0297】

いくつかの実施形態では、組換えDNA分子（例えば、DNA鋳型）は、5'から3'に、（i）プロモーター配列（例えば、T7ポリメラーゼプロモーター）、（ii）リボザイム配列を含むかまたはそれからなる5'接合部切断配列、（iii）合成RNAウイルスゲノムをコードするポリヌクレオチド、及び（iv）リボザイム配列を含むかまたはそれからなる3'接合部切断配列を含む。いくつかの実施形態では、組換えDNA分子（例えば、DNA鋳型）は、5'から3'に、（i）プロモーター配列（例えば、T7ポリメラーゼプロモーター）、（ii）5'ハンマーヘッド型リボザイム配列（例えば、図5A及び図5Bに提供されるような野生型HHRまたは修飾されたHHR）、（iii）合成RNAウイルスゲノムをコードするポリヌクレオチド、及び（iv）3'デルタ肝炎ウイルスリボザイム配列を含む。

30

【0298】

いくつかの実施形態では、組換えDNA分子（例えば、DNA鋳型）は、5'から3'に、（i）プロモーター配列（例えば、T7ポリメラーゼプロモーター）、（ii）リボザイム配列を含むかまたはそれからなる5'接合部切断配列、（iii）合成RNAウイルスゲノムをコードするポリヌクレオチド、及び（iv）制限酵素認識部位を含む3'接合部切断配列を含む。いくつかの実施形態では、組換えDNA分子（例えば、DNA鋳型）は、5'から3'に、（i）プロモーター配列（例えば、T7ポリメラーゼプロモーター）、（ii）5'ハンマーヘッド型リボザイム配列（例えば、図5A及び図5Bに提供されるような野生型HHRまたは修飾されたHHR）、（iii）合成RNAウイルスゲノムをコードするポリヌクレオチド、及び（iv）SapI制限酵素認識部位を含むかまたはそれからなる3'接合部切断配列を含む。

40

【0299】

いくつかの実施形態では、組換えDNA分子（例えば、DNA鋳型）は、5'から3'に

50

、(i) プロモーター配列 (例えば、T7 ポリメラーゼプロモーター)、(ii) リボザイム配列を含むかまたはそれからなる5' 接合部切断配列、(iii) 合成RNA ウイルスゲノムをコードするポリヌクレオチド、及び(iv) 制限酵素認識部位を含むかまたはそれからなる3' 接合部切断配列を含む。いくつかの実施形態では、DNA 鑄型は、5' から3' に、(i) プロモーター配列 (例えば、T7 ポリメラーゼプロモーター)、(ii) 5' ハンマーヘッド型リボザイム配列 (例えば、図5A 及び図5B に提供されるような野生型HHR または修飾されたHHR)、(iii) 合成RNA ウイルスゲノムをコードするポリヌクレオチド、及び(iv) BsaI 制限酵素認識部位を含むかまたはそれからなる3' 接合部切断配列を含む。

【0300】

10

いくつかの実施形態では、組換えDNA 分子 (例えば、DNA 鑄型) は、5' から3' に、(i) プロモーター配列 (例えば、T7 ポリメラーゼプロモーター)、(ii) 5' ピストル型リボザイム配列 (例えば、図6B に示すピストル1 またはピストル2 リボザイム配列) を含むかまたはそれからなる5' 接合部切断配列、(iii) 合成RNA ウイルスゲノムをコードするポリヌクレオチド、及び(iv) SapI 制限酵素認識部位を含むかまたはそれからなる3' 接合部切断配列を含む。

【0301】

いくつかの実施形態では、組換えDNA 分子 (例えば、DNA 鑄型) は、5' から3' に、(i) プロモーター配列 (例えば、T7 ポリメラーゼプロモーター)、(ii) 5' ピストル型リボザイム配列 (例えば、図6B に示すピストル1 またはピストル2 リボザイム配列) を含むかまたはそれからなる5' 接合部切断配列、(iii) 合成RNA ウイルスゲノムをコードするポリヌクレオチド、及び(iv) BsaI 制限酵素認識部位を含むかまたはそれからなる3' 接合部切断配列を含む。

20

【0302】

いくつかの実施形態では、組換えDNA 分子 (例えば、DNA 鑄型) は、5' から3' に、(i) プロモーター配列 (例えば、T7 ポリメラーゼプロモーター)、(ii) 5' RNAseH プライマー結合部位を含むかまたはそれからなる5' 接合部切断配列、(iii) 合成RNA ウイルスゲノムをコードするポリヌクレオチド、及び(iv) 制限酵素認識部位を含む3' 接合部切断配列を含む。いくつかの実施形態では、組換えDNA 分子 (例えば、DNA 鑄型) は、5' から3' に、(i) プロモーター配列 (例えば、T7 ポリメラーゼプロモーター)、(ii) 5' RNAseH プライマー結合部位を含むかまたはそれからなる5' 接合部切断配列、(iii) 合成RNA ウイルスゲノムをコードするポリヌクレオチド、及び(iv) SapI 制限酵素認識部位を含むかまたはそれからなる3' 接合部切断配列を含むポリヌクレオチドを含む。

30

【0303】

いくつかの実施形態では、組換えDNA 分子 (例えば、DNA 鑄型) は、5' から3' に、(i) プロモーター配列 (例えば、T7 ポリメラーゼプロモーター)、(ii) 5' RNAseH プライマー結合部位を含むかまたはそれからなる5' 接合部切断配列、(iii) 合成RNA ウイルスゲノムをコードするポリヌクレオチド、及び(iv) 制限酵素認識部位を含む3' 接合部切断配列を含む。いくつかの実施形態では、組換えDNA 分子 (例えば、DNA 鑄型) は、5' から3' に、(i) プロモーター配列 (例えば、T7 ポリメラーゼプロモーター)、(ii) 5' RNAseH プライマー結合部位を含むかまたはそれからなる5' 接合部切断配列、(iii) 合成RNA ウイルスゲノムをコードするポリヌクレオチド、及び(iv) BsaI 制限酵素認識部位を含むかまたはそれからなる3' 接合部切断配列を含むポリヌクレオチドを含む。

40

【0304】

いくつかの実施形態では、合成RNA ウイルスゲノムは、コクサッキーウイルス (CVA) ゲノムである。いくつかの実施形態では、コクサッキーウイルスはCVA21 株である。いくつかの実施形態では、CVA21 株はEF 株である。いくつかの実施形態では、CVA21 株はKY 株である。

50

【0305】

いくつかの実施形態では、組換えDNA分子（例えば、DNA鋳型）は、5'から3'に、（i）プロモーター配列（例えば、T7ポリメラーゼプロモーター）、（ii）任意選択のリーダー配列、（iii）5'ピストル型リボザイム配列（例えば、P. Polymyx a由来のピストル型リボザイムまたはそのバリエーション）を含むかまたはそれからなる5'接合部切断配列、（iv）合成RNAウイルスゲノムをコードするポリヌクレオチド、（v）ポリA尾部（例えば、約20～80bpの長さ、または約30～70bpの長さ）、及び（vi）制限酵素認識部位（例えば、BsmBIまたはBsaI制限酵素のため）を含むかまたはそれからなる3'接合部切断配列を含む。

【0306】

10

いくつかの実施形態では、組換えDNA分子（例えば、DNA鋳型）は、5'から3'に、（i）プロモーター配列（例えば、T7ポリメラーゼプロモーター）、（ii）リーダー配列（例えば、配列番号14または15）、（iii）5'ピストル型リボザイム配列（例えば、P. Polymyx a由来のピストル型リボザイムまたはそのバリエーション）を含むかまたはそれからなる5'接合部切断配列、（iv）CVA21合成RNAウイルスゲノムをコードするポリヌクレオチド、（v）ポリA尾部（例えば、約20～80bpの長さ、または約30～70bpの長さ）、及び（vi）BsmBI制限酵素認識部位を含むかまたはそれからなる3'接合部切断配列を含む。

【0307】

いくつかの実施形態では、組換えDNA分子（例えば、DNA鋳型）は、5'から3'に、（i）プロモーター配列（例えば、T7ポリメラーゼプロモーター）、（ii）リーダー配列（例えば、配列番号14または15）、（iii）5'ピストル型リボザイム配列（例えば、P. Polymyx a由来のピストル型リボザイムまたはそのバリエーション）を含むかまたはそれからなる5'接合部切断配列、（iv）CVA21合成RNAウイルスゲノムをコードするポリヌクレオチド、（v）ポリA尾部（例えば、約20～80bpの長さ、または約30～70bpの長さ）、及び（vi）BsaI制限酵素認識部位を含むかまたはそれからなる3'接合部切断配列を含む。

【0308】

いくつかの実施形態では、組換えDNA分子（例えば、DNA鋳型）は、5'から3'に、（i）プロモーター配列（例えば、T7ポリメラーゼプロモーター）、（ii）配列番号15によるリーダー配列、（iii）5'ピストル型リボザイム配列を含むかまたはそれからなる5'接合部切断配列、（iv）CVA21合成RNAウイルスゲノムをコードするポリヌクレオチド、（v）ポリA尾部、及び（vi）BsmBI制限酵素認識部位を含むかまたはそれからなる3'接合部切断配列を含み、ここで、5'ピストル型リボザイム配列及びポリA尾部の組み合わせは、以下の表5Aに提供される実施形態E1～E68のうちの1つから選択される。

【0309】

いくつかの実施形態では、組換えDNA分子（例えば、DNA鋳型）は、5'から3'に、（i）プロモーター配列（例えば、T7ポリメラーゼプロモーター）、（ii）配列番号15によるリーダー配列、（iii）5'ピストル型リボザイム配列を含むかまたはそれからなる5'接合部切断配列、（iv）CVA21合成RNAウイルスゲノムをコードするポリヌクレオチド、（v）ポリA尾部、及び（vi）BsaI制限酵素認識部位を含むかまたはそれからなる3'接合部切断配列を含み、ここで、5'ピストル型リボザイム配列及びポリA尾部の組み合わせは、以下の表5Aに提供される実施形態E1～E68のうちの1つから選択される。

【0310】

いくつかの実施形態では、組換えDNA分子（例えば、DNA鋳型）は、5'から3'に、（i）プロモーター配列（例えば、T7ポリメラーゼプロモーター）、（ii）配列番号14によるリーダー配列、（iii）5'ピストル型リボザイム配列を含むかまたはそれからなる5'接合部切断配列、（iv）CVA21合成RNAウイルスゲノムをコード

50

するポリヌクレオチド、(v)ポリA尾部、及び(vi)BsmBI制限酵素認識部位を含むかまたはそれからなる3'接合部切断配列を含み、ここで、5'ピストル型リボザイム配列及びポリA尾部の組み合わせは、以下の表5Aに提供される実施形態E1～E68のうちの1つから選択される。

【0311】

いくつかの実施形態では、組換えDNA分子(例えば、DNA鋳型)は、5'から3'に、(i)プロモーター配列(例えば、T7ポリメラーゼプロモーター)、(ii)配列番号14によるリーダー配列、(iii)5'ピストル型リボザイム配列を含むかまたはそれからなる5'接合部切断配列、(iv)CVA21合成RNAウイルスゲノムをコードするポリヌクレオチド、(v)ポリA尾部、及び(vi)BsaI制限酵素認識部位を含むかまたはそれからなる3'接合部切断配列を含み、ここで、5'ピストル型リボザイム配列及びポリA尾部の組み合わせは、以下の表5Aに提供される実施形態E1～E68のうちの1つから選択される。

10

20

30

40

50

【表 5 A - 1】

表 5 A : C V A 2 1 ウイルスゲノムを発現するための DNA 鋳型におけるリーダー配列、5' リボザイム配列、及びポリ A 尾部の非限定的な実施形態

	「TTTA」の P2 モチーフを含む 5'ピストル型リボザイム	「TTTT」の P2 モチーフを含む 5'ピストル型リボザイム
配列番号 14 によるリーダー配列； 約 100pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 E1	実施形態 E2
配列番号 14 によるリーダー配列； 約 90pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 E3	実施形態 E4
配列番号 14 によるリーダー配列； 約 80pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 E5	実施形態 E6
配列番号 14 によるリーダー配列； 約 70pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 E7	実施形態 E8
配列番号 14 によるリーダー配列； 約 60pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 E9	実施形態 E10
配列番号 14 によるリーダー配列； 約 50pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 E11	実施形態 E12
配列番号 14 によるリーダー配列； 約 40pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 E13	実施形態 E14
配列番号 14 によるリーダー配列； 約 30pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 E15	実施形態 E16
配列番号 14 によるリーダー配列； 約 20pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 E17	実施形態 E18
配列番号 14 によるリーダー配列； 約 80～100pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 E19	実施形態 E20
配列番号 14 によるリーダー配列； 約 70～90pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 E21	実施形態 E22
配列番号 14 によるリーダー配列； 約 60～80pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 E23	実施形態 E24
配列番号 14 によるリーダー配列； 約 50～70pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 E25	実施形態 E26
配列番号 14 によるリーダー配列； 約 40～60pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 E27	実施形態 E28
配列番号 14 によるリーダー配列； 約 30～50pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 E29	実施形態 E30
配列番号 14 によるリーダー配列； 約 20～40pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 E31	実施形態 E32

10

20

30

40

50

【表 5 A - 2】

	「TTTA」の P2 モチーフを含む 5'ピストル型リボザイム	「TTTT」の P2 モチーフを含む 5'ピストル型リボザイム
配列番号 14 によるリーダー配列； 約 10～30pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 E33	実施形態 E34
配列番号 15 によるリーダー配列； 約 100pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 E35	実施形態 E36
配列番号 15 によるリーダー配列； 約 90pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 E37	実施形態 E38
配列番号 15 によるリーダー配列； 約 80pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 E39	実施形態 E40
配列番号 15 によるリーダー配列； 約 70pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 E41	実施形態 E42
配列番号 15 によるリーダー配列； 約 60pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 E43	実施形態 E44
配列番号 15 によるリーダー配列； 約 50pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 E45	実施形態 E46
配列番号 15 によるリーダー配列； 約 40pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 E47	実施形態 E48
配列番号 15 によるリーダー配列； 約 30pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 E49	実施形態 E50
配列番号 15 によるリーダー配列； 約 20pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 E51	実施形態 E52
配列番号 15 によるリーダー配列； 約 80～100pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 E53	実施形態 E54
配列番号 15 によるリーダー配列； 約 70～90pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 E55	実施形態 E56
配列番号 15 によるリーダー配列； 約 60～80pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 E57	実施形態 E58
配列番号 15 によるリーダー配列； 約 50～70pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 E59	実施形態 E60
配列番号 15 によるリーダー配列； 約 40～60pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 E61	実施形態 E62
配列番号 15 によるリーダー配列； 約 30～50pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 E63	実施形態 E64
配列番号 15 によるリーダー配列； 約 20～40pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 E65	実施形態 E66
配列番号 15 によるリーダー配列； 約 10～30pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 E67	実施形態 E68

10

20

30

40

【0312】

いくつかの実施形態では、組換え DNA 分子（例えば、DNA 鋳型）は、5' から 3' に、(i) T7 ポリメラーゼプロモーター配列、(ii) 配列番号 15 によるリーダー配列、(iii) 配列番号 18 による 5' ピストル型リボザイム配列を含むかまたはそれからなる 5' 接合部切断配列、(iv) CVA21 合成 RNA ウイルスゲノムをコードするポリヌクレオチド、(v) ポリ A 尾部（例えば、約 70bp、約 60～80bp、または約 50～90bp の長さのポリ A 尾部）、及び (vi) BsmBI 制限酵素認識部位を含むかまたはそれからなる 3' 接合部切断配列を含む。

【0313】

50

いくつかの実施形態では、組換えDNA分子（例えば、DNA鋳型）は、5'から3'に、(i) T7ポリメラーゼプロモーター配列、(ii) 配列番号15によるリーダー配列、(iii) 配列番号18による5'ピストル型リボザイム配列を含むかまたはそれからなる5'接合部切断配列、(iv) CVA21合成RNAウイルスゲノムをコードするポリヌクレオチド、(v) ポリA尾部（例えば、約70bp、約60～80bp、または約50～90bpの長さのポリA尾部）、及び(vi) BsaI制限酵素認識部位を含むかまたはそれからなる3'接合部切断配列を含む。

【0314】

いくつかの実施形態では、組換えDNA分子（例えば、DNA鋳型）には、CVA21-KY株ウイルスゲノムをコードし、配列番号20による配列を含むかまたはそれからなるDNAポリヌクレオチドが含まれる。いくつかの実施形態では、CVA21-KY株ウイルスゲノムをコードするDNAポリヌクレオチドは、配列番号20による少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の（それらの間のすべての範囲及び部分的範囲を含む）配列同一性を有する配列を含むかまたはそれからなる。

【0315】

いくつかの実施形態では、組換えDNA分子（例えば、DNA鋳型）には、CVA21-KY株ウイルスゲノムをコードし、配列番号93による配列を含むかまたはそれからなるDNAポリヌクレオチドが含まれる。いくつかの実施形態では、CVA21-KY株ウイルスゲノムをコードするDNAポリヌクレオチドは、配列番号93による少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の（それらの間のすべての範囲及び部分的範囲を含む）配列同一性を有する配列を含むかまたはそれからなる。

【0316】

いくつかの実施形態では、組換えDNA分子（例えば、DNA鋳型）には、CVA21-EF株ウイルスゲノムをコードし、配列番号21による配列を含むかまたはそれからなるDNAポリヌクレオチドが含まれる。いくつかの実施形態では、CVA21-EF株ウイルスゲノムをコードするDNAポリヌクレオチドは、配列番号21による少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の（それらの間のすべての範囲及び部分的範囲を含む）配列同一性を有する配列を含むかまたはそれからなる。

【0317】

いくつかの実施形態では、組換えDNA分子（例えば、DNA鋳型）には、CVA21-EF株ウイルスゲノムをコードし、配列番号95による配列を含むかまたはそれからなるDNAポリヌクレオチドが含まれる。いくつかの実施形態では、CVA21-EF株ウイルスゲノムをコードするDNAポリヌクレオチドは、配列番号95による少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の（それらの間のすべての範囲及び部分的範囲を含む）配列同一性を有する配列を含むかまたはそれからなる。

【0318】

いくつかの実施形態では、組換えDNA分子（例えば、DNA鋳型）には、CVA21-Kuykendall株ウイルスゲノムをコードし、配列番号22による配列を含むかまたはそれからなるDNAポリヌクレオチドが含まれる。いくつかの実施形態では、CVA21-Kuykendall株ウイルスゲノムをコードするDNAポリヌクレオチドは、配列番号22による少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99

%、または100%の（それらの間のすべての範囲及び部分的範囲を含む）配列同一性を有する配列を含むかまたはそれからなる。

【0319】

いくつかの実施形態では、組換えDNA分子（例えば、DNA鋳型）には、CVA21-Kuykendall株ウイルスゲノムをコードし、配列番号94による配列を含むかまたはそれからなるDNAポリヌクレオチドが含まれる。いくつかの実施形態では、CVA21-Kuykendall株ウイルスゲノムをコードするDNAポリヌクレオチドは、配列番号94による少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の（それらの間のすべての範囲及び部分的範囲を含む）配列同一性を有する配列を含むかまたはそれからなる。

10

【0320】

いくつかの実施形態では、合成RNAウイルスゲノムは、セネカバレーウイルス（SVV）ゲノムである。

【0321】

いくつかの実施形態では、組換えDNA分子（例えば、DNA鋳型）は、5'から3'に、（i）プロモーター配列（例えば、T7ポリメラーゼプロモーター）、（ii）任意選択のリーダー配列、（iii）5'ピストル型リボザイム配列（例えば、P. Polymyx A由来のピストル型リボザイムまたはそのバリエーション）を含むかまたはそれからなる5'接合部切断配列、（iv）合成RNAウイルスゲノムをコードするポリヌクレオチド、（v）ポリA尾部（例えば、約20～80bpの長さ、または約30～70bpの長さ）、及び（vi）制限酵素認識部位（例えば、SapIまたはBsaI制限酵素のため）を含むかまたはそれからなる3'接合部切断配列を含む。

20

【0322】

いくつかの実施形態では、組換えDNA分子（例えば、DNA鋳型）は、5'から3'に、（i）プロモーター配列（例えば、T7ポリメラーゼプロモーター）、（ii）リーダー配列（例えば、配列番号53～60及び62～63のいずれか1つ）、（iii）5'ピストル型リボザイム配列（例えば、配列番号64もしくは65、またはそのバリエーションによる）を含むかまたはそれからなる5'接合部切断配列、（iv）SVV合成RNAウイルスゲノムをコードするポリヌクレオチド、（v）ポリA尾部（例えば、約20～80bpの長さ、または約30～70bpの長さ）、及び（vi）SapI制限酵素認識部位を含むかまたはそれからなる3'接合部切断配列を含む。

30

【0323】

いくつかの実施形態では、組換えDNA分子（例えば、DNA鋳型）は、5'から3'に、（i）プロモーター配列（例えば、T7ポリメラーゼプロモーター）、（ii）リーダー配列（例えば、配列番号53～60及び62～63のいずれか1つ）、（iii）5'ピストル型リボザイム配列（例えば、配列番号64もしくは65、またはそのバリエーションによる）を含むかまたはそれからなる5'接合部切断配列、（iv）SVV合成RNAウイルスゲノムをコードするポリヌクレオチド、（v）ポリA尾部（例えば、約20～80bpの長さ、または約30～70bpの長さ）、及び（vi）BsaI制限酵素認識部位を含むかまたはそれからなる3'接合部切断配列を含む。

40

【0324】

いくつかの実施形態では、組換えDNA分子（例えば、DNA鋳型）は、ポリA尾部の後に3'SapI制限酵素認識部位を含み、SVV合成RNAウイルスゲノムをコードするポリヌクレオチドの中にはSapI制限酵素認識部位を含まない。

【0325】

いくつかの実施形態では、組換えDNA分子（例えば、DNA鋳型）は、ポリA尾部の後に3'BsaI制限酵素認識部位を含み、SVV合成RNAウイルスゲノムをコードするポリヌクレオチドの中にはBsaI制限酵素認識部位を含まない。

【0326】

50

いくつかの実施形態では、組換えDNA分子（例えば、DNA鋳型）は、5'から3'に、（i）プロモーター配列（例えば、T7ポリメラーゼプロモーター）、（ii）配列番号53～60及び62～63のいずれか1つによるリーダー配列、（iii）5'ピストル型リボザイム配列を含むかまたはそれからなる5'接合部切断配列、（iv）SVV合成RNAウイルスゲノムをコードするポリヌクレオチド、（v）ポリA尾部、及び（vi）SapI制限酵素認識部位を含むかまたはそれからなる3'接合部切断配列を含み、ここで、リーダー配列、5'ピストル型リボザイム配列及びポリA尾部の組み合わせは、以下の表5Bに提供される実施形態S1～S340のうちの1つから選択される。

【0327】

いくつかの実施形態では、組換えDNA分子（例えば、DNA鋳型）は、5'から3'に 10、（i）プロモーター配列（例えば、T7ポリメラーゼプロモーター）、（ii）配列番号53～60及び62～63のいずれか1つによるリーダー配列、（iii）5'ピストル型リボザイム配列を含むかまたはそれからなる5'接合部切断配列、（iv）SVV合成RNAウイルスゲノムをコードするポリヌクレオチド、（v）ポリA尾部、及び（vi）BsaI制限酵素認識部位を含むかまたはそれからなる3'接合部切断配列を含み、ここで、リーダー配列、5'ピストル型リボザイム配列及びポリA尾部の組み合わせは、以下の表5Bに提供される実施形態S1～S340のうちの1つから選択される。

20

30

40

50

【表 5 B - 1】

表 5 B : S V V ウイルスゲノムを発現するための DNA 鋳型におけるリーダー配列、5' リボザイム配列、及びポリ A 尾部の非限定的な実施形態

	「TCAA」の P2 モチーフを含む 5'ピストル型リボザイム	「TTAA」の P2 モチーフを含む 5'ピストル型リボザイム
配列番号 53 によるリーダー配列；約 100pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S1	実施形態 S2
配列番号 53 によるリーダー配列；約 90pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S3	実施形態 S4
配列番号 53 によるリーダー配列；約 80pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S5	実施形態 S6
配列番号 53 によるリーダー配列；約 70pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S7	実施形態 S8
配列番号 53 によるリーダー配列；約 60pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S9	実施形態 S10
配列番号 53 によるリーダー配列；約 50pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S11	実施形態 S12
配列番号 53 によるリーダー配列；約 40pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S13	実施形態 S14
配列番号 53 によるリーダー配列；約 30pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S15	実施形態 S16
配列番号 53 によるリーダー配列；約 20pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S17	実施形態 S18
配列番号 53 によるリーダー配列；約 80～100pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S19	実施形態 S20
配列番号 53 によるリーダー配列；約 70～90pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S21	実施形態 S22

10

20

30

40

50

【表 5 B - 2】

	「TCAA」の P2 モチーフを含む 5'ピストル型リボザイム	「TTAA」の P2 モチーフを含む 5'ピストル型リボザイム
配列番号 53 によるリーダー配列；約 60～80pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S23	実施形態 S24
配列番号 53 によるリーダー配列；約 50～70pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S25	実施形態 S26
配列番号 53 によるリーダー配列；約 40～60pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S27	実施形態 S28
配列番号 53 によるリーダー配列；約 30～50pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S29	実施形態 S30
配列番号 53 によるリーダー配列；約 20～40pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S31	実施形態 S32
配列番号 53 によるリーダー配列；約 10～30pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S33	実施形態 S34
配列番号 54 によるリーダー配列；約 100pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S35	実施形態 S36
配列番号 54 によるリーダー配列；約 90pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S37	実施形態 S38
配列番号 54 によるリーダー配列；約 80pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S39	実施形態 S40
配列番号 54 によるリーダー配列；約 70pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S41	実施形態 S42
配列番号 54 によるリーダー配列；約 60pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S43	実施形態 S44
配列番号 54 によるリーダー配列；約 50pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S45	実施形態 S46
配列番号 54 によるリーダー配列；約 40pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S47	実施形態 S48
配列番号 54 によるリーダー配列；約 30pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S49	実施形態 S50
配列番号 54 によるリーダー配列；約 20pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S51	実施形態 S52
配列番号 54 によるリーダー配列；約 80～100pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S53	実施形態 S54
配列番号 54 によるリーダー配列；約 70～90pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S55	実施形態 S56

10

20

30

40

50

【表 5 B - 3】

	「TCAA」の P2 モチーフを含む 5'ピストル型リボザイム	「TTAA」の P2 モチーフを含む 5'ピストル型リボザイム
配列番号 54 によるリーダー配列；約 60～80pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S57	実施形態 S58
配列番号 54 によるリーダー配列；約 50～70pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S59	実施形態 S60
配列番号 54 によるリーダー配列；約 40～60pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S61	実施形態 S62
配列番号 54 によるリーダー配列；約 30～50pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S63	実施形態 S64
配列番号 54 によるリーダー配列；約 20～40pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S65	実施形態 S66
配列番号 54 によるリーダー配列；約 10～30pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S67	実施形態 S68
配列番号 55 によるリーダー配列；約 100pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S69	実施形態 S70
配列番号 55 によるリーダー配列；約 90pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S71	実施形態 S72
配列番号 55 によるリーダー配列；約 80pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S73	実施形態 S74
配列番号 55 によるリーダー配列；約 70pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S75	実施形態 S76
配列番号 55 によるリーダー配列；約 60pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S77	実施形態 S78
配列番号 55 によるリーダー配列；約 50pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S79	実施形態 S80
配列番号 55 によるリーダー配列；約 40pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S81	実施形態 S82
配列番号 55 によるリーダー配列；約 30pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S83	実施形態 S84
配列番号 55 によるリーダー配列；約 20pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S85	実施形態 S86
配列番号 55 によるリーダー配列；約 80～100pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S87	実施形態 S88
配列番号 55 によるリーダー配列；約 70～90pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S89	実施形態 S90

10

20

30

40

50

【表 5 B - 4】

	「TCAA」の P2 モチーフを含む 5'ピストル型リボザイム	「TTAA」の P2 モチーフを含む 5'ピストル型リボザイム
配列番号 55 によるリーダー配列；約 60～80pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S91	実施形態 S92
配列番号 55 によるリーダー配列；約 50～70pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S93	実施形態 S94
配列番号 55 によるリーダー配列；約 40～60pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S95	実施形態 S96
配列番号 55 によるリーダー配列；約 30～50pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S97	実施形態 S98
配列番号 55 によるリーダー配列；約 20～40pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S99	実施形態 S100
配列番号 55 によるリーダー配列；約 10～30pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S101	実施形態 S102
配列番号 56 によるリーダー配列；約 100pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S103	実施形態 S104
配列番号 56 によるリーダー配列；約 90pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S105	実施形態 S106
配列番号 56 によるリーダー配列；約 80pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S107	実施形態 S108
配列番号 56 によるリーダー配列；約 70pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S109	実施形態 S110
配列番号 56 によるリーダー配列；約 60pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S111	実施形態 S112
配列番号 56 によるリーダー配列；約 50pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S113	実施形態 S114
配列番号 56 によるリーダー配列；約 40pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S115	実施形態 S116
配列番号 56 によるリーダー配列；約 30pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S117	実施形態 S118
配列番号 56 によるリーダー配列；約 20pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S119	実施形態 S120
配列番号 56 によるリーダー配列；約 80～100pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S121	実施形態 S122
配列番号 56 によるリーダー配列；約 70～90pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S123	実施形態 S124

10

20

30

40

50

【表 5 B - 5】

	「TCAA」の P2 モチーフを含む 5'ピストル型リボザイム	「TTAA」の P2 モチーフを含む 5'ピストル型リボザイム
配列番号 56 によるリーダー配列；約 60～80pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S125	実施形態 S126
配列番号 56 によるリーダー配列；約 50～70pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S127	実施形態 S128
配列番号 56 によるリーダー配列；約 40～60pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S129	実施形態 S130
配列番号 56 によるリーダー配列；約 30～50pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S131	実施形態 S132
配列番号 56 によるリーダー配列；約 20～40pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S133	実施形態 S134
配列番号 56 によるリーダー配列；約 10～30pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S135	実施形態 S136
配列番号 57 によるリーダー配列；約 100pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S137	実施形態 S138
配列番号 57 によるリーダー配列；約 90pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S139	実施形態 S140
配列番号 57 によるリーダー配列；約 80pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S141	実施形態 S142
配列番号 57 によるリーダー配列；約 70pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S143	実施形態 S144
配列番号 57 によるリーダー配列；約 60pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S145	実施形態 S146
配列番号 57 によるリーダー配列；約 50pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S147	実施形態 S148
配列番号 57 によるリーダー配列；約 40pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S149	実施形態 S150
配列番号 57 によるリーダー配列；約 30pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S151	実施形態 S152
配列番号 57 によるリーダー配列；約 20pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S153	実施形態 S154
配列番号 57 によるリーダー配列；約 80～100pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S155	実施形態 S156
配列番号 57 によるリーダー配列；約 70～90pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S157	実施形態 S158

10

20

30

40

50

【表 5 B - 6】

	「TCAA」の P2 モチーフを含む 5'ピストル型リボザイム	「TTAA」の P2 モチーフを含む 5'ピストル型リボザイム
配列番号 57 によるリーダー配列；約 60～80pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S159	実施形態 S160
配列番号 57 によるリーダー配列；約 50～70pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S161	実施形態 S162
配列番号 57 によるリーダー配列；約 40～60pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S163	実施形態 S164
配列番号 57 によるリーダー配列；約 30～50pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S165	実施形態 S166
配列番号 57 によるリーダー配列；約 20～40pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S167	実施形態 S168
配列番号 57 によるリーダー配列；約 10～30pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S169	実施形態 S170
配列番号 58 によるリーダー配列；約 100pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S171	実施形態 S172
配列番号 58 によるリーダー配列；約 90pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S173	実施形態 S174
配列番号 58 によるリーダー配列；約 80pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S175	実施形態 S176
配列番号 58 によるリーダー配列；約 70pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S177	実施形態 S178
配列番号 58 によるリーダー配列；約 60pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S179	実施形態 S180
配列番号 58 によるリーダー配列；約 50pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S181	実施形態 S182
配列番号 58 によるリーダー配列；約 40pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S183	実施形態 S184
配列番号 58 によるリーダー配列；約 30pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S185	実施形態 S186
配列番号 58 によるリーダー配列；約 20pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S187	実施形態 S188
配列番号 58 によるリーダー配列；約 80～100pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S189	実施形態 S190
配列番号 58 によるリーダー配列；約 70～90pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S191	実施形態 S192

10

20

30

40

50

【表 5 B - 7】

	「TCAA」の P2 モチーフを含む 5'ピストル型リボザイム	「TTAA」の P2 モチーフを含む 5'ピストル型リボザイム
配列番号 58 によるリーダー配列；約 60～80pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S193	実施形態 S194
配列番号 58 によるリーダー配列；約 50～70pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S195	実施形態 S196
配列番号 58 によるリーダー配列；約 40～60pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S197	実施形態 S198
配列番号 58 によるリーダー配列；約 30～50pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S199	実施形態 S200
配列番号 58 によるリーダー配列；約 20～40pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S201	実施形態 S202
配列番号 58 によるリーダー配列；約 10～30pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S203	実施形態 S204
配列番号 59 によるリーダー配列；約 100pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S205	実施形態 S206
配列番号 59 によるリーダー配列；約 90pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S207	実施形態 S208
配列番号 59 によるリーダー配列；約 80pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S209	実施形態 S210
配列番号 59 によるリーダー配列；約 70pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S211	実施形態 S212
配列番号 59 によるリーダー配列；約 60pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S213	実施形態 S214
配列番号 59 によるリーダー配列；約 50pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S215	実施形態 S216
配列番号 59 によるリーダー配列；約 40pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S217	実施形態 S218
配列番号 59 によるリーダー配列；約 30pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S219	実施形態 S220
配列番号 59 によるリーダー配列；約 20pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S221	実施形態 S222
配列番号 59 によるリーダー配列；約 80～100pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S223	実施形態 S224
配列番号 59 によるリーダー配列；約 70～90pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S225	実施形態 S226

10

20

30

40

50

【表 5 B - 8】

	「TCAA」の P2 モチーフを含む 5'ピストル型リボザイム	「TTAA」の P2 モチーフを含む 5'ピストル型リボザイム
配列番号 59 によるリーダー配列；約 60～80pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S227	実施形態 S228
配列番号 59 によるリーダー配列；約 50～70pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S229	実施形態 S230
配列番号 59 によるリーダー配列；約 40～60pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S231	実施形態 S232
配列番号 59 によるリーダー配列；約 30～50pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S233	実施形態 S234
配列番号 59 によるリーダー配列；約 20～40pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S235	実施形態 S236
配列番号 59 によるリーダー配列；約 10～30pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S237	実施形態 S238
配列番号 60 によるリーダー配列；約 100pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S239	実施形態 S240
配列番号 60 によるリーダー配列；約 90pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S241	実施形態 S242
配列番号 60 によるリーダー配列；約 80pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S243	実施形態 S244
配列番号 60 によるリーダー配列；約 70pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S245	実施形態 S246
配列番号 60 によるリーダー配列；約 60pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S247	実施形態 S248
配列番号 60 によるリーダー配列；約 50pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S249	実施形態 S250
配列番号 60 によるリーダー配列；約 40pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S251	実施形態 S252
配列番号 60 によるリーダー配列；約 30pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S253	実施形態 S254
配列番号 60 によるリーダー配列；約 20pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S255	実施形態 S256
配列番号 60 によるリーダー配列；約 80～100pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S257	実施形態 S258
配列番号 60 によるリーダー配列；約 70～90pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S259	実施形態 S260

10

20

30

40

50

【表 5 B - 9】

	「TCAA」の P2 モチーフを含む 5'ピストル型リボザイム	「TTAA」の P2 モチーフを含む 5'ピストル型リボザイム
配列番号 60 によるリーダー配列；約 60～80pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S261	実施形態 S262
配列番号 60 によるリーダー配列；約 50～70pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S263	実施形態 S264
配列番号 60 によるリーダー配列；約 40～60pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S265	実施形態 S266
配列番号 60 によるリーダー配列；約 30～50pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S267	実施形態 S268
配列番号 60 によるリーダー配列；約 20～40pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S269	実施形態 S270
配列番号 60 によるリーダー配列；約 10～30pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S271	実施形態 S272
配列番号 62 によるリーダー配列；約 100pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S273	実施形態 S274
配列番号 62 によるリーダー配列；約 90pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S275	実施形態 S276
配列番号 62 によるリーダー配列；約 80pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S277	実施形態 S278
配列番号 62 によるリーダー配列；約 70pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S279	実施形態 S280
配列番号 62 によるリーダー配列；約 60pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S281	実施形態 S282
配列番号 62 によるリーダー配列；約 50pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S283	実施形態 S284
配列番号 62 によるリーダー配列；約 40pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S285	実施形態 S286
配列番号 62 によるリーダー配列；約 30pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S287	実施形態 S288
配列番号 62 によるリーダー配列；約 20pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S289	実施形態 S290
配列番号 62 によるリーダー配列；約 80～100pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S291	実施形態 S292
配列番号 62 によるリーダー配列；約 70～90pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S293	実施形態 S294

10

20

30

40

50

【表 5 B - 1 0】

	「TCAA」の P2 モチーフを含む 5'ピストル型リボザイム	「TTAA」の P2 モチーフを含む 5'ピストル型リボザイム
配列番号 62 によるリーダー配列；約 60～80pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S295	実施形態 S296
配列番号 62 によるリーダー配列；約 50～70pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S297	実施形態 S298
配列番号 62 によるリーダー配列；約 40～60pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S299	実施形態 S300
配列番号 62 によるリーダー配列；約 30～50pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S301	実施形態 S302
配列番号 62 によるリーダー配列；約 20～40pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S303	実施形態 S304
配列番号 62 によるリーダー配列；約 10～30pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S305	実施形態 S306
配列番号 63 によるリーダー配列；約 100pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S307	実施形態 S308
配列番号 63 によるリーダー配列；約 90pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S309	実施形態 S310
配列番号 63 によるリーダー配列；約 80pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S311	実施形態 S312
配列番号 63 によるリーダー配列；約 70pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S313	実施形態 S314
配列番号 63 によるリーダー配列；約 60pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S315	実施形態 S316
配列番号 63 によるリーダー配列；約 50pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S317	実施形態 S318
配列番号 63 によるリーダー配列；約 40pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S319	実施形態 S320
配列番号 63 によるリーダー配列；約 30pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S321	実施形態 S322
配列番号 63 によるリーダー配列；約 20pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S323	実施形態 S324
配列番号 63 によるリーダー配列；約 80～100pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S325	実施形態 S326
配列番号 63 によるリーダー配列；約 70～90pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S327	実施形態 S328

10

20

30

40

50

【表 5 B - 1 1】

	「TCAA」の P2 モチーフを含む 5'ピストル型リボザイム	「TTAA」の P2 モチーフを含む 5'ピストル型リボザイム
配列番号 63 によるリーダー配列；約 60～80pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S329	実施形態 S330
配列番号 63 によるリーダー配列；約 50～70pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S331	実施形態 S332
配列番号 63 によるリーダー配列；約 40～60pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S333	実施形態 S334
配列番号 63 によるリーダー配列；約 30～50pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S335	実施形態 S336
配列番号 63 によるリーダー配列；約 20～40pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S337	実施形態 S338
配列番号 63 によるリーダー配列；約 10～30pA の長さのポリ A 尾部	実施形態 S339	実施形態 S340

10

20

【0328】

いくつかの実施形態では、組換え DNA 分子（例えば、DNA 鑄型）は、5'から3'に、（i）T7 ポリメラーゼプロモーター配列、（ii）配列番号 53 によるリーダー配列、（iii）配列番号 64 による 5'ピストル型リボザイム配列を含むかまたはそれからなる 5'接合部切断配列、（iv）SVV 合成 RNA ウイルスゲノムをコードするポリヌクレオチド、（v）ポリ A 尾部（例えば、約 70bp、約 60～80bp、または約 50～90bp の長さのポリ A 尾部）、及び（vi）SapI 制限酵素認識部位を含むかまたはそれからなる 3'接合部切断配列を含む。

【0329】

いくつかの実施形態では、組換え DNA 分子（例えば、DNA 鑄型）は、5'から3'に、（i）T7 ポリメラーゼプロモーター配列、（ii）配列番号 53 によるリーダー配列、（iii）配列番号 64 による 5'ピストル型リボザイム配列を含むかまたはそれからなる 5'接合部切断配列、（iv）SVV 合成 RNA ウイルスゲノムをコードするポリヌクレオチド、（v）ポリ A 尾部（例えば、約 70bp、約 60～80bp、または約 50～90bp の長さのポリ A 尾部）、及び（vi）BsaI 制限酵素認識部位を含むかまたはそれからなる 3'接合部切断配列を含む。

30

【0330】

いくつかの実施形態では、組換え DNA 分子（例えば、DNA 鑄型）は、5'から3'に、（i）T7 ポリメラーゼプロモーター配列、（ii）配列番号 58 によるリーダー配列、（iii）配列番号 64 による 5'ピストル型リボザイム配列を含むかまたはそれからなる 5'接合部切断配列、（iv）SVV 合成 RNA ウイルスゲノムをコードするポリヌクレオチド、（v）ポリ A 尾部（例えば、約 70bp、約 60～80bp、または約 50～90bp の長さのポリ A 尾部）、及び（vi）SapI 制限酵素認識部位を含むかまたはそれからなる 3'接合部切断配列を含む。

40

【0331】

いくつかの実施形態では、組換え DNA 分子（例えば、DNA 鑄型）は、5'から3'に、（i）T7 ポリメラーゼプロモーター配列、（ii）配列番号 58 によるリーダー配列、（iii）配列番号 64 による 5'ピストル型リボザイム配列を含むかまたはそれからなる 5'接合部切断配列、（iv）SVV 合成 RNA ウイルスゲノムをコードするポリヌ

50

クレオチド、(v) ポリA尾部（例えば、約70bp、約60～80bp、または約50～90bpの長さのポリA尾部）、及び(vi) BsaI制限酵素認識部位を含むかまたはそれからなる3'接合部切断配列を含む。

【0332】

いくつかの実施形態では、組換えDNA分子（例えば、DNA鋳型）は、5'から3'に、(i) T7ポリメラーゼプロモーター配列、(ii) 配列番号58によるリーダー配列、(iii) 配列番号64による5'ピストル型リボザイム配列を含むかまたはそれからなる5'接合部切断配列、(iv) SVV合成RNAウイルスゲノムをコードするポリヌクレオチド、(v) 約70bpの長さのポリA尾部、及び(vi) SapI制限酵素認識部位を含むかまたはそれからなる3'接合部切断配列を含む。

10

【0333】

いくつかの実施形態では、組換えDNA分子（例えば、DNA鋳型）は、5'から3'に、(i) T7ポリメラーゼプロモーター配列、(ii) 配列番号58によるリーダー配列、(iii) 配列番号64による5'ピストル型リボザイム配列を含むかまたはそれからなる5'接合部切断配列、(iv) SVV合成RNAウイルスゲノムをコードするポリヌクレオチド、(v) 約70bpの長さのポリA尾部、及び(vi) BsaI制限酵素認識部位を含むかまたはそれからなる3'接合部切断配列を含む。

【0334】

いくつかの実施形態では、組換えDNA分子（例えば、DNA鋳型）には、SVVウイルスゲノムをコードし、配列番号52による配列を含むかまたはそれからなるDNAポリヌクレオチドが含まれる。いくつかの実施形態では、SVV株ウイルスゲノムをコードするDNAポリヌクレオチドは、配列番号52による少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の（それらの間のすべての範囲及び部分的範囲を含む）配列同一性を有する配列を含むかまたはそれからなる。

20

【0335】

いくつかの実施形態では、組換えDNA分子（例えば、DNA鋳型）には、SVVウイルスゲノムをコードし、配列番号92による配列を含むかまたはそれからなるDNAポリヌクレオチドが含まれる。いくつかの実施形態では、SVV株ウイルスゲノムをコードするDNAポリヌクレオチドは、配列番号92による少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の（それらの間のすべての範囲及び部分的範囲を含む）配列同一性を有する配列を含むかまたはそれからなる。

30

【0336】

SVVまたはCVAゲノムをコードするDNA鋳型の例示的な実施形態を以下の表18に提供する。

40

50

【表 1 8】

表 1 8：例示的なDNA鋳型構造

プロモーター	リーダー	5' JCS	コードされるゲノム	ポリ A 尾部	3' JCS	鋳型全体
T7 プロモーター	配列番号 15 (CVA21-L6)	配列番号 18	CVA21 KY 株	70 AA	配列番号 86 (BsmBI)	配列番号 20
T7 プロモーター	配列番号 15 (CVA21-L6)	配列番号 18	CVA21 EF 株	70 AA	配列番号 86 (BsmBI)	配列番号 21
T7 プロモーター	配列番号 15 (CVA21-L6)	配列番号 18	CVA21 Kuykendall 株	70 AA	配列番号 86 (BsmBI)	配列番号 22
T7 プロモーター	配列番号 15 (CVA21-L6)	配列番号 18	CVA21 KY 株	70 AA	配列番号 90 (BsaI)	配列番号 93
T7 プロモーター	配列番号 15 (CVA21-L6)	配列番号 18	CVA21 EF 株	70 AA	配列番号 90 (BsaI)	配列番号 95
T7 プロモーター	配列番号 15 (CVA21-L6)	配列番号 18	CVA21 Kuykendall 株	70 AA	配列番号 90 (BsaI)	配列番号 94
T7 プロモーター	配列番号 53 (SVV-L0)	配列番号 64	SVV	70 AA	配列番号 82 (SapI)	配列番号 52
T7 プロモーター	配列番号 58 (SVV-L5)	配列番号 64	SVV	70 AA	配列番号 82 (SapI)	配列番号 92

【0 3 3 7】

合成RNAゲノムを含む粒子

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の合成RNAゲノムは、「粒子」にカプセル化される。本明細書で使用される場合、粒子は、リポソーム、リポプレックス、ナノ粒子、ナノカプセル、微粒子、ミクロスフェア、脂質粒子、エクソソーム、小胞などの物質の非組織由来組成物を指す。ある特定の実施形態では、粒子は、非タンパク質性及び非免疫原性である。そのような実施形態では、本明細書に記載の合成RNAゲノムのカプセル化は、全身性の抗ウイルス免疫応答を誘導することなくウイルスゲノムの送達を可能にし、抗ウイルス抗体を中和する効果を軽減する。さらに、本明細書に記載の合成RNAゲノムのカプセル化は、ゲノムを分解から保護し、標的宿主細胞への導入を容易にする。いくつかの実施形態では、本開示は、本明細書に記載される合成RNAゲノムを含むナノ粒子を提供する。いくつかの実施形態では、ナノ粒子は、脂質ナノ粒子である。いくつかの実施形態では、ナノ粒子は、ペイロード分子をコードする第2のRNA分子をさらに含む。

【0 3 3 8】

いくつかの実施形態では、粒子は、対象において生分解性である。そのような実施形態では、複数用量の粒子は、対象に粒子が蓄積することなく対象に投与することができる。好適な粒子の例には、ポリスチレン粒子、ポリ（乳酸-コ-グリコール酸）PLGA粒子、ポリペプチド系カチオン性ポリマー粒子、シクロデキストリン粒子、キトサン、N，N，N-トリメチルキトサン粒子、脂質系粒子、ポリ（β-アミノエステル）粒子、低分子量ポリエチレンイミン粒子、ポリホスホエステル粒子、ジスルフィド架橋ポリマー粒子、ポリアミドアミン粒子、ポリエチレンイミン（PEI）粒子、及びPLURIONICS安定化ポリプロピレンスルフィド粒子が含まれる。

【0 3 3 9】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のポリヌクレオチドは、無機粒子にカプセル

化される。いくつかの実施形態では、無機粒子は、金ナノ粒子（GNP）、金ナノロッド（GNR）、磁性ナノ粒子（MNP）、磁性ナノチューブ（MNT）、カーボンナノホーン（CNH）、カーボンフラーレン、カーボンナノチューブ（CNT）、リン酸カルシウムナノ粒子（CPNP）、メソポーラスシリカナノ粒子（MSN）、シリカナノチューブ（SNT）、または星状中空シリカナノ粒子（SHNP）である。

【0340】

好ましくは、本明細書に記載の粒子は、溶解性を高め、食細胞によるクリアランス及び *in vivo* での凝集によって引き起こされる可能性のある合併症を回避し、飲作用を促進するために、サイズがナノスコピックである。いくつかの実施形態では、粒子は、約 1000 nm 未満の平均直径を有する。いくつかの実施形態では、粒子は、約 500 nm 未満の平均直径を有する。いくつかの実施形態では、粒子は、約 30～約 100 nm、約 50～約 100 nm、または約 75～約 100 nm の平均直径を有する。いくつかの実施形態では、粒子は、約 30～約 75 nm、または約 30～約 50 nm の平均直径を有する。いくつかの実施形態では、粒子は、約 100～約 500 nm の平均直径を有する。いくつかの実施形態では、粒子は、約 200～400 nm の平均直径を有する。いくつかの実施形態では、粒子は、約 350 nm の平均サイズを有する。

【0341】

エクソソーム

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の合成 RNA ゲノムは、エクソソームにカプセル化される。エクソソームは、エンドサイトーシス起源の小さな膜小胞であり、多小胞体が親細胞（例えば、エクソソームが放出される細胞、本明細書ではドナー細胞とも称される）の原形質膜と融合した後に細胞外環境に放出される。エクソソームの表面は、親細胞の細胞膜に由来する脂質二重層を含み、親細胞表面に発現される膜タンパク質をさらに含むことができる。いくつかの実施形態では、エクソソームは、親細胞からのサイトゾルを含む場合もある。エクソソームは、上皮細胞、B 及び T リンパ球、肥満細胞（MC）、及び樹状細胞（DC）を含む多くの異なる細胞種によって産生され、血漿、尿、気管支肺胞洗浄液、腸上皮細胞、及び腫瘍組織で同定されている。エクソソームの組成は、それらが由来する親細胞種に依存するため、「エクソソーム特異的」タンパク質は存在しない。しかしながら、多くのエクソソームは、親細胞においてエクソソームが生じた細胞内小胞に関連するタンパク質（例えば、エンドソーム及びリソソームに関連する及び／またはそれらによって発現されるタンパク質）を含む。例えば、エクソソームは、主要組織適合遺伝子複合体 I 及び II（MHC-I 及び MHC-II）などの抗原提示分子、テトラスパニン（例えば、CD63）、いくつかの熱ショックタンパク質、アクチン及びチューブリンなどの細胞骨格成分、細胞内膜融合に関与するタンパク質、細胞間相互作用分子（例えば、CD54）、シグナル伝達タンパク質、及び細胞質ゾル酵素が豊富であり得る。

【0342】

エクソソームは、エクソソーム膜を標的細胞の原形質膜と融合させることにより、1つの細胞（例えば、親細胞）から標的またはレシピエント細胞への細胞タンパク質の移動を媒介し得る。したがって、エクソソームによってカプセル化される物質を修飾することにより、本明細書に記載のポリヌクレオチドなどの外因性薬剤を標的細胞に導入することができるメカニズムが提供される。1つ以上の外因性薬剤（例えば、本明細書に記載のポリヌクレオチド）を含むように修飾されているエクソソームは、本明細書では「修飾エクソソーム」と称される。いくつかの実施形態では、修飾エクソソームは、外因性薬剤（例えば、本明細書に記載のポリヌクレオチド）の導入によって産生され、親細胞に導入される。そのような実施形態では、外因性核酸は、外因性核酸自体、または外因性核酸の転写物が、親細胞から産生される修飾エクソソームに組み込まれるように、親のエクソソーム産生細胞に導入される。外因性核酸は、当技術分野で公知である手段、例えば、外因性核酸の形質導入、トランスフェクション、形質転換、エレクトロポレーション、及び／またはマイクロインジェクションによって親細胞に導入することができる。

【0343】

いくつかの実施形態では、修飾エクソソームは、本明細書に記載の合成RNAゲノムをエクソソームに直接的に導入することによって産生される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の合成RNAゲノムは、無傷エクソソームに導入される。「無傷エクソソーム」とは、それらを産生する親細胞に由来するタンパク質及び／または遺伝物質を含むエクソソームを指す。無傷エクソソームを得るための方法は当技術分野で公知である（例えば、Alvarez-Erviti L. et al., Nat Biotechnol. 2011 Apr; 29 (4) : 34-5、Ohno S, et al., Mol Ther 2013 Jan; 21 (1) : 185-91、及び欧州特許公開第2010663号を参照されたい）。

【0344】

特定の実施形態では、合成RNAゲノムは、空のエクソソームに導入される。「空のエクソソーム」とは、親細胞に由来するタンパク質及び／または遺伝物質（例えば、DNAまたはRNA）を欠くエクソソームを指す。空のエクソソーム（例えば、親細胞由来の遺伝物質を欠く）を産生する方法は、当技術分野で公知であり、UV曝露、エクソソームへの核酸の負荷を媒介する内因性タンパク質の変異／欠失、ならびに内因性遺伝物質が開いた細孔を通してエクソソームから出ていくようにエクソソーム膜に細孔を開けるためのエレクトロポレーション及び化学的処理を含む。いくつかの実施形態では、空のエクソソームは、エクソソーム膜を得るために約9～約14のpHを有する水溶液で処理することによってエクソソームを開き、小胞内成分（例えば、小胞内タンパク質及び／または核酸）を除去し、エクソソーム膜を再アセンブルして空のエクソソームを形成することによって産生される。いくつかの実施形態では、小胞内成分（例えば、小胞内タンパク質及び／または核酸）は、超遠心分離または密度勾配超遠心分離によって除去される。いくつかの実施形態では、膜は、超音波処理、機械的振動、多孔質膜からの押し出し、電流、またはこれらの技術のうちの1つ以上の組み合わせによって再アセンブルされる。特定の実施形態では、膜は、超音波処理によって再アセンブルされる。

【0345】

いくつかの実施形態では、修飾エクソソームを産生するために本明細書に記載の合成RNAゲノムを無傷または空のエクソソームに負荷することは、*in vitro*での形質転換、トランスフェクション、及び／またはマイクロインジェクションなどの従来の分子生物学技術を使用して達成することができる。いくつかの実施形態では、外因性薬剤（例えば、本明細書に記載のポリヌクレオチド）は、エレクトロポレーションによって無傷または空のエクソソームに直接的に導入される。いくつかの実施形態では、外因性薬剤（例えば、本明細書に記載のポリヌクレオチド）は、リポフェクション（例えば、トランスフェクション）によって無傷または空のエクソソームに直接的に導入される。本開示によるエクソソームの産生に使用するのに好適なリポフェクションキットは当技術分野で知られており、市販されている（例えば、RocheからのFuGENE（登録商標）HDトランスフェクション試薬、及びInvitrogenからのLIPOFECTAMINE（商標）2000）。いくつかの実施形態では、外因性薬剤（例えば、本明細書に記載のポリヌクレオチド）は、熱ショックを使用した形質転換によって無傷または空のエクソソームに直接的に導入される。そのような実施形態では、親細胞から単離したエクソソームは、エクソソーム膜を透過性にするために、 Ca^{2+} （ $CaCl_2$ 中）などの二価カチオンの存在下で冷却される。次に、エクソソームを外因性核酸とインキュベートし、短時間熱ショックを与えることができる（例えば、42℃で30～120秒間インキュベート）。特定の実施形態では、外因性薬剤（例えば、本明細書に記載のポリヌクレオチド）を空のエクソソームに負荷することは、小胞内成分の除去後に薬剤をエクソソーム膜と混合またはコインキュベーションすることによって達成することができる。したがって、エクソソーム膜から再アセンブルされた修飾エクソソームは、外因性薬剤を小胞内空間に組み込むことになる。エクソソームカプセル化核酸を産生するための追加の方法は、当技術分野で公知である（例えば、米国特許第9,889,210号、同第9,629,929号、及び同第9,085,778号、国際PCT公開第WO2017/161010号及び同第

10

20

30

40

50

WO 2018 / 039119号を参照されたい)。

【0346】

エクソソームは、細胞系、骨髄由来細胞、及び初代患者試料に由来する細胞を含む、多数の異なる親細胞から得ることができる。親細胞から放出されたエクソソームは、当技術分野で公知である手段によって親細胞培養物の上清から単離することができる。例えば、エクソソームの物理的特性を利用して、電荷（例えば、電気泳動分離）、サイズ（例えば、濾過、分子ふるいなど）、密度（例えば、通常の遠心分離または勾配遠心分離）、及びスベドベルグ定数（例えば、外力の有無を問わない沈降など）に基づく分離を含め、培地または他の源からエクソソームを分離することができる。あるいは、またはさらに、単離は、1つ以上の生物学的特性に基づくことができ、表面マーカーを用い得る方法を含み得る（例えば、沈殿、固相への可逆的結合、FACS分離、特異的リガンド結合、非特異的リガンド結合など）。エクソソーム表面タンパク質の分析は、CD63などのエクソソーム関連タンパク質に対する蛍光標識抗体を使用したフローサイトメトリーによって決定できる。エクソソームを特性解析するための追加のマーカーは、国際PCT公開第WO 2017 / 161010に記載されている。なおもさらなる企図された方法において、エクソソームは、PEG誘導融合及び／または超音波融合を含む化学的及び／または物理的方法を使用して融合することもできる。

10

【0347】

いくつかの実施形態では、サイズ排除クロマトグラフィーを利用して、エクソソームを単離することができる。いくつかの実施形態では、エクソソームは、当技術分野で広く知られているように、遠心分離技術による（1つ以上のクロマトグラフィー画分の）クロマトグラフィー分離後にさらに単離することができる。いくつかの実施形態では、エクソソームの単離は、既報の分画遠心分離（例えば、Raposo, G. et al., J. Exp. Med. 183, 1161-1172 (1996)を参照されたい）、超遠心分離、サイズベースの膜濾過、濃縮、及び／または速度ゾーン遠心分離を含むがこれらに限定されない方法の組み合わせを伴い得る。

20

【0348】

いくつかの実施形態では、エクソソーム膜は、リン脂質、糖脂質、脂肪酸、スフィンゴ脂質、ホスホグリセリド、ステロール、コレステロール、及びホスファチジルセリンのうちの1つ以上を含む。さらに、膜は、1つ以上のポリペプチド及び1つ以上の多糖、例えばグリカンを含むことができる。例示的なエクソソーム膜組成物及び1つ以上の膜成分の相対量を修飾するための方法は、国際PCT公開第WO 2018 / 039119号に記載されている。

30

【0349】

いくつかの実施形態では、粒子はエクソソームであり、約30～約100 nm、約30～約200 nm、または約30～約500 nmの直径を有する。いくつかの実施形態では、粒子はエクソソームであり、約10 nm～約100 nm、約20 nm～約100 nm、約30 nm～約100 nm、約40 nm～約100 nm、約50 nm～約100 nm、約60 nm～約100 nm、約70 nm～約100 nm、約80 nm～約100 nm、約90 nm～約100 nm、約100 nm～約200 nm、約100 nm～約150 nm、約150 nm～約200 nm、約100 nm～約250 nm、約250 nm～約500 nm、または約10 nm～約1000 nmの直径を有する。いくつかの実施形態では、粒子はエクソソームであり、約20 nm～300 nm、約40 nm～200 nm、約20 nm～250 nm、約30 nm～150 nm、または約30 nm～100 nmの直径を有する。

40

【0350】

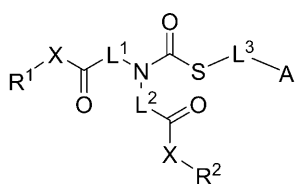
化合物

式(I)の化合物

様々な実施形態では、本明細書で提供されるのは、式(I)の化合物：

50

【化 1 8】



式 (I)

10

またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物であり、式中、

A は、 $-N(CH_2R^{N1})(CH_2R^{N2})$ 、または少なくとも 1 つの N を含む 4 ～ 7 員ヘテロシクリル環であり、4 ～ 7 員ヘテロシクリル環は、0 ～ 6 つの R^3 で場合により置換されており、

各 X は、独立的に、 $-O-$ 、 $-N(R^1)-$ 、または $-N(R^2)-$ であり、

R^1 は、場合により置換されている C_1-C_{31} 脂肪族及びステロイジルからなる群から選択され、

R^2 は、場合により置換されている C_1-C_{31} 脂肪族及びステロイジルからなる群から選択され、

R^3 は、場合により置換されている C_1-C_6 脂肪族であり、

20

R^{N1} 及び R^{N2} は、各々独立的に、水素、ヒドロキシ- C_1-C_6 アルキル、 C_2-C_6 アルケニル、または C_3-C_7 シクロアルキルであり、

L^1 は、場合により置換されている C_1-C_{20} アルキレン鎖、及び二価で場合により置換されている C_2-C_{20} アルケニレン鎖からなる群から選択され、

L^2 は、場合により置換されている C_1-C_{20} アルキレン鎖、及び二価で場合により置換されている C_2-C_{20} アルケニレン鎖からなる群から選択され、

L^3 は結合、場合により置換されている C_1-C_6 アルキレン鎖、または二価で場合により置換されている C_3-C_7 シクロアルキレンである。

【0351】

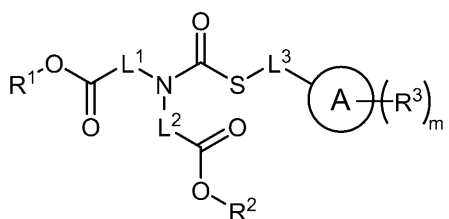
いくつかの実施形態では、A が $-N(CH_3)(CH_3)$ であり、X が O であるとき、 L^3 は C_1-C_6 アルキレン鎖ではない。

30

【0352】

いくつかの実施形態では、本開示は、式 (I-a) の化合物：

【化 1 9】



式 (I-a)

40

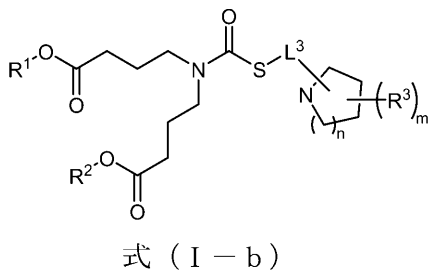
またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物を含み、式中、m は 0、1、2、3、4、5、または 6 である。

【0353】

いくつかの実施形態では、本開示は、式 (I-b) の化合物：

50

【化 2 0】



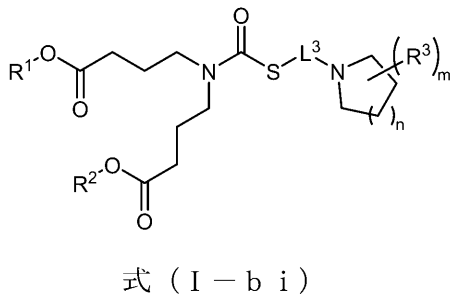
10

またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物を含み、式中、 n は0、1、2、または3であり、 m は0、1、2、3、4、5、または6である。

【0354】

いくつかの実施形態では、本開示は、式 (I - b i) の化合物：

【化 2 1】



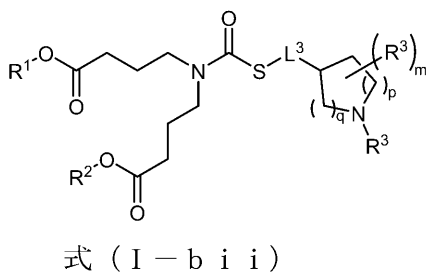
20

またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物を含む。

【0355】

いくつかの実施形態では、本開示は、式 (I - b i i) の化合物：

【化 2 2】



40

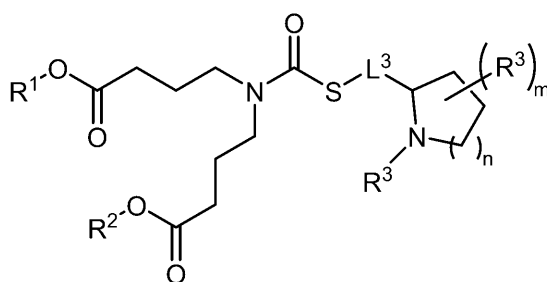
またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物を含み、式中、 m は0、1、2、または3であり、 p 及び q は各々0、1、2、または3であり、 $q + p$ は3以下である。

【0356】

いくつかの実施形態では、本開示は、式 (I - b i i i) の化合物：

50

【化 2 3】



式 (I-b i i i)

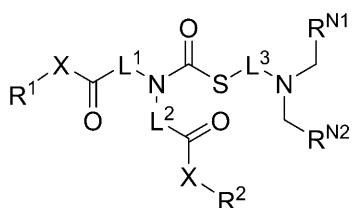
10

またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物を含む。

【0357】

いくつかの実施形態では、本開示は、式 (I-c) の化合物：

【化 2 4】



式 (I-c)

20

またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物を含む。

【0358】

いくつかの実施形態では、A は、 $-N(CH_2 R^{N1})(CH_2 R^{N2})$ であるか、または少なくとも 1 つの N を含む、場合により置換されている 4 ~ 7 員ヘテロシクリル環である。

30

【0359】

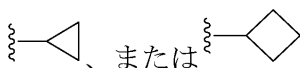
いくつかの実施形態では、A は、 $-N(CH_2 R^{N1})(CH_2 R^{N2})$ である。いくつかの実施形態では、 R^{N1} 及び R^{N2} は、各々独立的に、水素、ヒドロキシ- C_1-C_3 アルキレン、 C_2-C_4 アルケニル、または C_3-C_4 シクロアルキルから選択される。

【0360】

いくつかの実施形態では、 R^{N1} 及び R^{N2} は、各々独立的に、水素、 $-CH_2CH=CH_2$ 、 $-CH_2CH_2OH$ 、

【化 2 5】

40

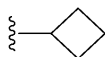


、または

から選択される。いくつかの実施形態では、 R^{N1} 及び R^{N2} は同じである。いくつかの実施形態では、 R^{N1} 及び R^{N2} は各々、水素である。いくつかの実施形態では、 R^{N1} 及び R^{N2} は各々、 C_2-C_4 アルケニル、例えば、 $-CH_2CH=CH_2$ である。いくつかの実施形態では、 R^{N1} 及び R^{N2} は各々、ヒドロキシ- C_1-C_3 アルキレン、例えば、 $-CH_2CH_2OH$ である。いくつかの実施形態では、 R^{N1} 及び R^{N2} は異なる。いくつかの実施形態では、 R^{N1} 及び R^{N2} の一方は水素であり、他方は C_3-C_4 シクロアルキルである。いくつかの実施形態では、 R^{N1} 及び R^{N2} の一方は水素であり、

50

他方は
【化 2 6】



である。

【0 3 6 1】

いくつかの実施形態では、Aは、少なくとも1つのNを含む、場合により置換されている4～7員ヘテロシクリル環である。いくつかの実施形態では、Aは、Nを1つだけ含む、場合により置換されている4～7員ヘテロシクリル環である。いくつかの実施形態では、Aは、少なくとも1つのNを含む、非置換の4～7員ヘテロシクリル環である。いくつかの実施形態では、Aは、Nを1つだけ含む、非置換の4～7員ヘテロシクリル環である。いくつかの実施形態では、Aは、少なくとも1つのNを含む、場合により置換されている5～6員ヘテロシクリル環である。いくつかの実施形態では、Aは、少なくとも1つのNを含む、非置換の5～6員ヘテロシクリル環である。

10

【0 3 6 2】

いくつかの実施形態では、Aは、少なくとも1つのNを含む、場合により置換されている4～7員ヘテロシクリル環であり、AのN原子は、第三級アミンである。

20

【0 3 6 3】

いくつかの実施形態では、Aは、少なくとも1つのNを含み、さらに1つ以上のSを含む、場合により置換されている4～7員ヘテロシクリル環である。いくつかの実施形態では、Aは、少なくとも1つのNを含み、さらにSを1つだけ含む、場合により置換されている4～7員ヘテロシクリル環である。

【0 3 6 4】

いくつかの実施形態では、Aは、アゼチジン、ピロリジン、ピペリジン、アゼパン、及びチオモルホリンからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、Aは、ピロリジン及びピペリジンからなる群から選択される。

【0 3 6 5】

いくつかの実施形態では、 L^1 は、場合により置換されている $C_1 - C_{20}$ アルキレン鎖、及び二価で場合により置換されている $C_1 - C_{20}$ アルケニレン鎖からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、 L^2 は、場合により置換されている $C_1 - C_{20}$ アルキレン鎖、及び二価で場合により置換されている $C_1 - C_{20}$ アルケニレン鎖からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、 L^1 は、場合により置換されている $C_1 - C_{20}$ アルキレン鎖である。いくつかの実施形態では、 L^2 は、場合により置換されている $C_1 - C_{20}$ アルキレン鎖である。

30

【0 3 6 6】

いくつかの実施形態では、 L^1 及び L^2 は同じである。いくつかの実施形態では、 L^1 及び L^2 は異なる。

【0 3 6 7】

いくつかの実施形態では、 L^1 は、場合により置換されている $C_1 - C_{10}$ アルキレン鎖である。いくつかの実施形態では、 L^2 は、場合により置換されている $C_1 - C_{10}$ アルキレン鎖である。いくつかの実施形態では、 L^1 は、場合により置換されている $C_1 - C_5$ アルキレン鎖である。いくつかの実施形態では、 L^2 は、場合により置換されている $C_1 - C_5$ アルキレン鎖である。

40

【0 3 6 8】

いくつかの実施形態では、 L^1 及び L^2 は各々、 $-CH_2CH_2CH_2CH_2-$ である。いくつかの実施形態では、 L^1 及び L^2 は各々、 $-CH_2CH_2CH_2-$ である。いくつかの実施形態では、 L^1 及び L^2 は各々、 $-CH_2CH_2-$ である。

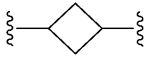
【0 3 6 9】

50

いくつかの実施形態では、 L^3 は結合、場合により置換されている C_1-C_6 アルキレン鎖、または二価で場合により置換されている C_3-C_6 シクロアルキレンである。いくつかの実施形態では、 L^3 は結合である。いくつかの実施形態では、 L^3 は、場合により置換されている C_1-C_6 アルキレン鎖である。いくつかの実施形態では、 L^3 は、場合により置換されている C_1-C_3 アルキレン鎖である。いくつかの実施形態では、 L^3 は、非置換の C_1-C_3 アルキレン鎖である。いくつかの実施形態では、 L^3 は、 $-CH_2-$ である。いくつかの実施形態では、 L^3 は、 $-CH_2CH_2-$ である。いくつかの実施形態では、 L^3 は、 $-CH_2CH_2CH_2-$ である。いくつかの実施形態では、 L^3 は、二価 C_3-C_6 シクロアルキレンである。いくつかの実施形態では、 L^3 は

【化27】

10



である。

【0370】

いくつかの実施形態では、式(I)のチオレートのSとAのNとの間の炭素原子の数は2~10である。いくつかの実施形態では、式(I)のチオレートのSとAのNとの間の炭素原子の数は2~8である。いくつかの実施形態では、式(I)のチオレートのSとAのNとの間の炭素原子の数は2~5である。いくつかの実施形態では、式(I)のチオレートのSとAのNとの間の炭素原子の数は2~4である。いくつかの実施形態では、式(I)のチオレートのSとAのNとの間の炭素原子の数は2である。いくつかの実施形態では、式(I)のチオレートのSとAのNとの間の炭素原子の数は3である。いくつかの実施形態では、式(I)のチオレートのSとAのNとの間の炭素原子の数は4である。

20

【0371】

いくつかの実施形態では、 R^1 は、場合により置換されている C_1-C_{31} 脂肪族及び場合により置換されているステロイジルからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、 R^2 は、場合により置換されている C_1-C_{31} 脂肪族及び場合により置換されているステロイジルからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、 R^1 は、場合により置換されている C_1-C_{31} アルキルである。いくつかの実施形態では、 R^2 は、場合により置換されている C_1-C_{31} アルキルである。いくつかの実施形態では、 R^1 は、場合により置換されている C_5-C_{25} アルキルである。いくつかの実施形態では、 R^2 は、場合により置換されている C_5-C_{25} アルキルである。いくつかの実施形態では、 R^1 は、場合により置換されている $C_{10}-C_{20}$ アルキルである。いくつかの実施形態では、 R^2 は、場合により置換されている $C_{10}-C_{20}$ アルキルである。いくつかの実施形態では、 R^1 は、場合により置換されている $C_{10}-C_{20}$ アルキルである。いくつかの実施形態では、 R^2 は、場合により置換されている $C_{10}-C_{20}$ アルキルである。いくつかの実施形態では、 R^1 は、非置換の $C_{10}-C_{20}$ アルキルである。いくつかの実施形態では、 R^2 は、非置換の $C_{10}-C_{20}$ アルキルである。

30

【0372】

いくつかの実施形態では、 R^1 は、場合により置換されている $C_{14}-C_{16}$ アルキルである。いくつかの実施形態では、 R^2 は、場合により置換されている $C_{14}-C_{16}$ アルキルである。いくつかの実施形態では、 R^1 は、非置換の $C_{14}-C_{16}$ アルキルである。いくつかの実施形態では、 R^2 は、非置換の $C_{14}-C_{16}$ アルキルである。

40

【0373】

いくつかの実施形態では、 R^1 は、場合により置換されている分岐状 C_3-C_{31} アルキルである。いくつかの実施形態では、 R^2 は、場合により置換されている分岐状 C_3-C_{31} アルキルである。いくつかの実施形態では、 R^1 は、場合により置換されている分岐状 $C_{10}-C_{20}$ アルキルである。いくつかの実施形態では、 R^2 は、場合により置換されている分岐状 $C_{10}-C_{20}$ アルキルである。いくつかの実施形態では、 R^1 は、場

50

合により置換されている分岐状 $C_{14}-C_{16}$ アルキルである。いくつかの実施形態では、 R^2 は、場合により置換されている分岐状 $C_{14}-C_{16}$ アルキルである。いくつかの実施形態では、 R^1 は、置換された分岐状 C_3-C_{31} アルキルである。いくつかの実施形態では、 R^2 は、置換された分岐状 C_3-C_{31} アルキルである。いくつかの実施形態では、 R^1 は、置換された分岐状 $C_{10}-C_{20}$ アルキルである。いくつかの実施形態では、 R^2 は、置換された分岐状 $C_{10}-C_{20}$ アルキルである。いくつかの実施形態では、 R^1 は、置換された分岐状 $C_{14}-C_{16}$ アルキルである。いくつかの実施形態では、 R^2 は、置換された分岐状 $C_{14}-C_{16}$ アルキルである。

【0374】

いくつかの実施形態では、 R^1 及び R^2 は同じである。

10

【0375】

いくつかの実施形態では、 R^1 及び R^2 は異なる。いくつかの実施形態では、 R^1 は、場合により置換されている C_6-C_{20} アルケニルであり、 R^2 は、場合により置換されている $C_{10}-C_{20}$ アルキルである。いくつかの実施形態では、 R^1 は、 C_6-C_{20} アルケニルであり、 R^2 は、分岐状 $C_{10}-C_{20}$ アルキルである。

【0376】

いくつかの実施形態では、 A は、少なくとも1つの N を含み、0～6つの R^3 で場合により置換されている4～7員ヘテロシクリル環である。いくつかの実施形態では、 R^3 は、場合により置換されている C_1-C_6 脂肪族である。いくつかの実施形態では、 R^3 は、場合により置換されている C_1-C_3 脂肪族である。いくつかの実施形態では、 R^3 は、場合により置換されている C_1-C_6 アルキルである。いくつかの実施形態では、 R^3 は、場合により置換されている C_1-C_3 アルキルである。いくつかの実施形態では、 R^3 は、非置換の C_1-C_6 アルキルである。いくつかの実施形態では、 R^3 は、非置換の C_1-C_3 アルキルである。いくつかの実施形態では、 R^3 は、場合により置換されている C_1-C_6 アルケニルである。いくつかの実施形態では、 R^3 は、場合により置換されている C_1-C_3 アルケニルである。いくつかの実施形態では、 R^3 は、非置換の C_1-C_6 アルケニルである。いくつかの実施形態では、 R^3 は、非置換の C_1-C_3 アルケニルである。

20

【0377】

いくつかの実施形態では、 R^3 は、1～3つの C_3-C_6 シクロアルキルで置換されている。いくつかの実施形態では、 R^3 は、1つの C_3-C_6 シクロアルキルで置換されている。いくつかの実施形態では、 R^3 は、シクロプロパニルで置換されている。いくつかの実施形態では、 R^3 は、1～3つの $-OH$ で置換されている。いくつかの実施形態では、 R^3 は、1つの $-OH$ で置換されている。

30

【0378】

いくつかの実施形態では、 m は0、1、2、3、4、5、または6である。いくつかの実施形態では、 m は0または1である。いくつかの実施形態では、 m は0である。いくつかの実施形態では、 m は1である。いくつかの実施形態では、 m は2である。いくつかの実施形態では、 m は3である。いくつかの実施形態では、 m は4である。いくつかの実施形態では、 m は5である。いくつかの実施形態では、 m は6である。

40

【0379】

いくつかの実施形態では、 n は0、1、2、または3である。いくつかの実施形態では、 n は1または2である。いくつかの実施形態では、 n は0である。いくつかの実施形態では、 n は1である。いくつかの実施形態では、 n は2である。いくつかの実施形態では、 n は3である。

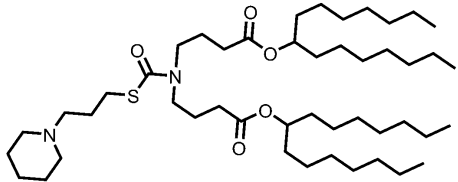
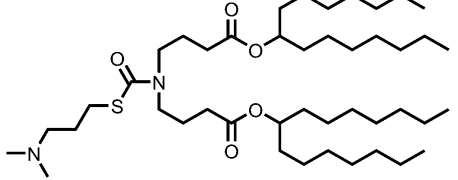
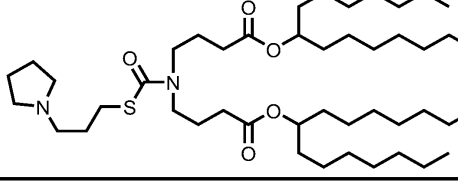
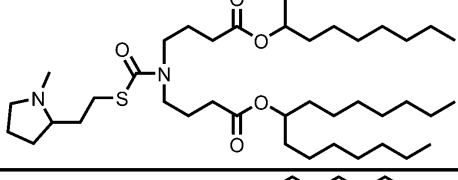
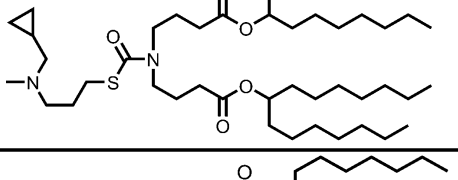
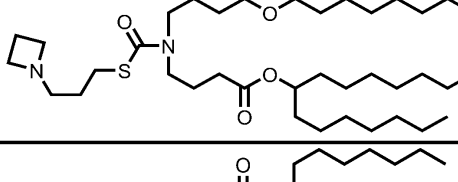
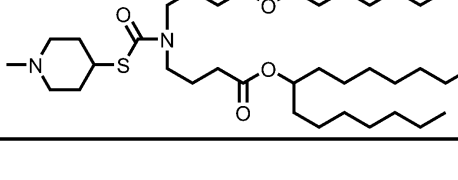
【0380】

いくつかの実施形態では、式 (I) の化合物は、表 21 から選択される化合物、またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物である。

50

【表 2 1 - 1】

表 2 1

化合物番号	構造
CAT1	
CAT2	
CAT3	
CAT4	
CAT5	
CAT6	
CAT7	

10

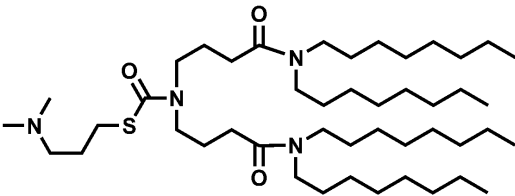
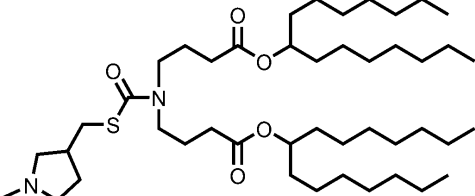
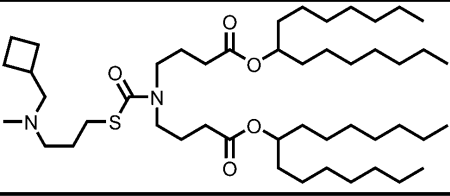
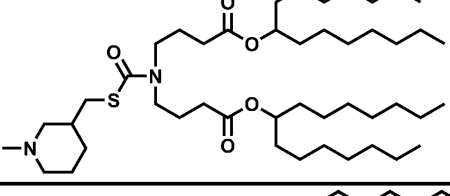
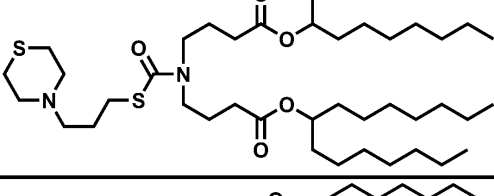
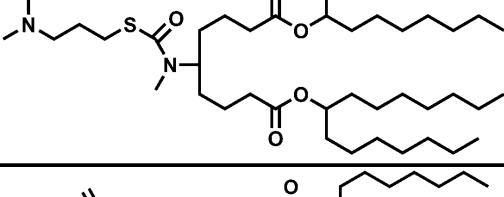
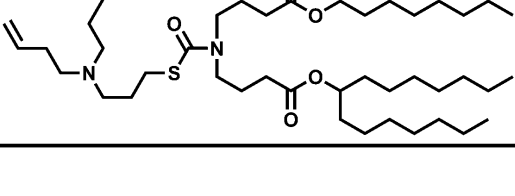
20

30

40

50

【表 2 1 - 2】

CAT8	
CAT9	
CAT10	
CAT11	
CAT12	
CAT13	
CAT14	

10

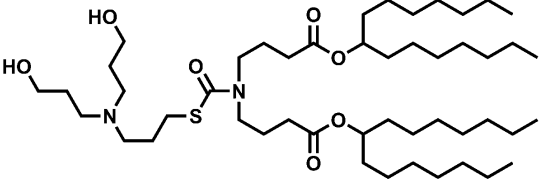
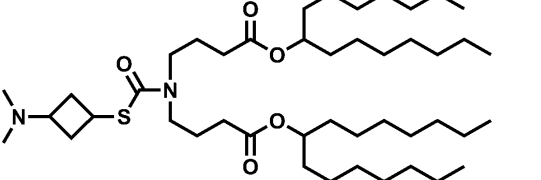
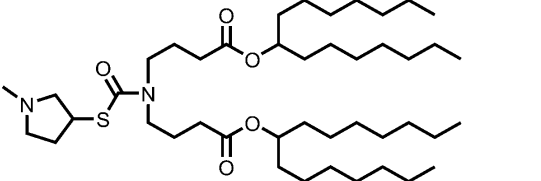
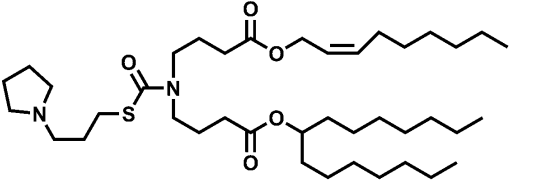
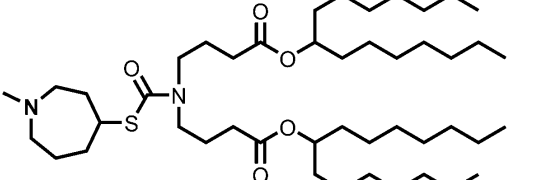
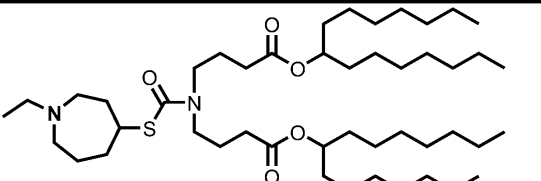
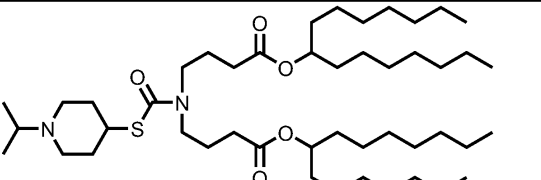
20

30

40

50

【表 2 1 - 3】

CAT15	
CAT16	
CAT17	
CAT18	
CAT19	
CAT20	
CAT21	

10

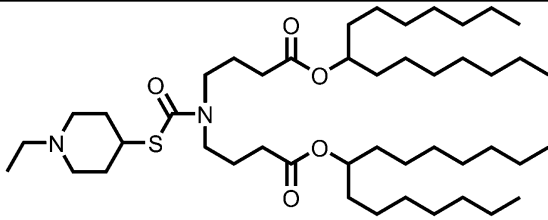
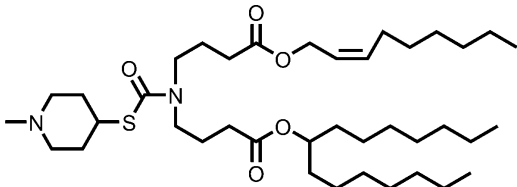
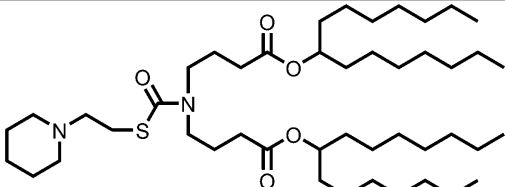
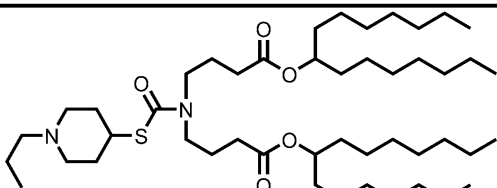
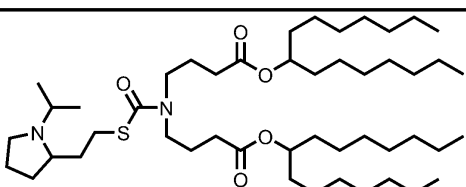
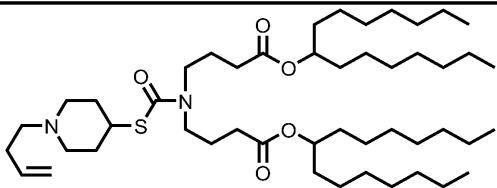
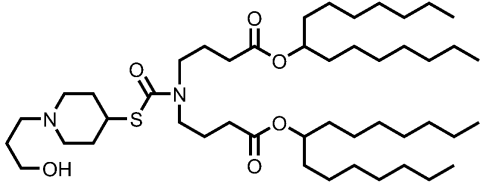
20

30

40

50

【表 2 1 - 4】

CAT22	
CAT23	
CAT24	
CAT25	
CAT26	
CAT27	
CAT28	

10

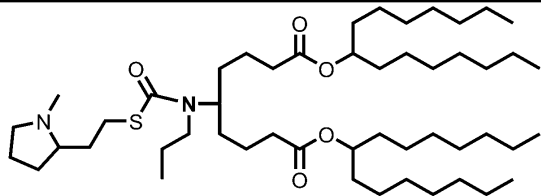
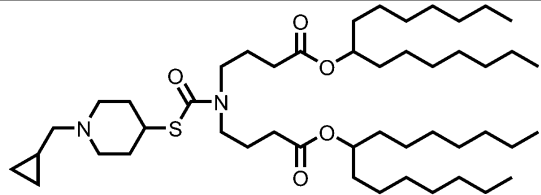
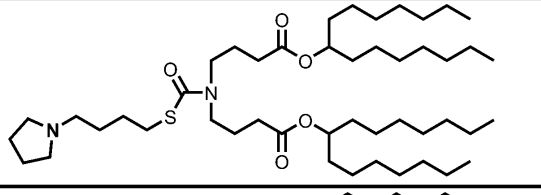
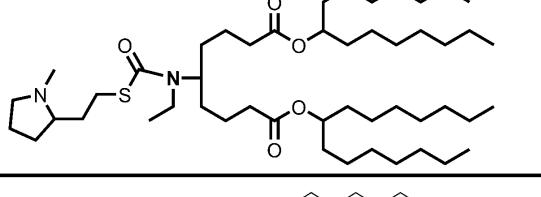
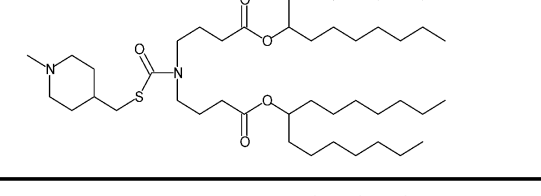
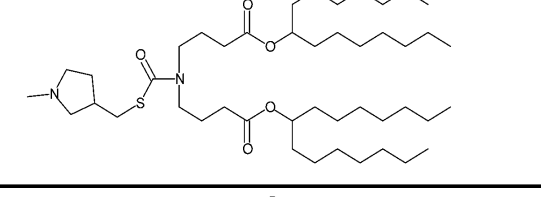
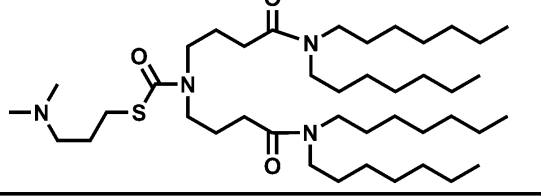
20

30

40

50

【表 2 1 - 5】

CAT29	
CAT30	
CAT31	
CAT32	
CAT33	
CAT34	
CAT35	

10

20

30

40

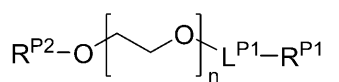
【0381】

式 (A) の化合物

様々な実施形態では、本明細書で提供されるのは、式 (A) の化合物：

50

【化 2 8】



式 (A)

またはその薬学的に許容される塩であり、式中、

n は、すべての端点を含む 10～200 の整数であり、

L^{P1} は、 $-(CH_2)_{0-3}-C(O)O-$ 、 $-(CH_2)_{0-3}-C(O)O-(CH_2)_{1-3}-OC(O)-$ 、または $-C(O)N(H)-$ であり、

R^{P1} は、 C_5-C_{25} アルキルまたは C_5-C_{25} アルケニルであり、

R^{P2} は、水素または $-CH_3$ である。

10

【0382】

いくつかの実施形態では、式 (A) は、 $HO-(CH_2CH_2O)_n-C(O)N(H)-(CH_2)_{17}CH_3$ ではない。

【0383】

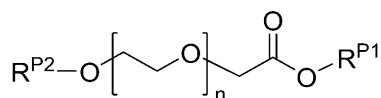
いくつかの実施形態では、 L^{P1} は、 $-CH_2C(O)O-$ 、 $-CH_2CH_2C(O)O-$ 、 $-CH_2C(O)OCH_2C(O)O-$ 、 $-CH_2C(O)OCH_2CH_2OC(O)-$ 、または $-C(O)N(H)-$ である。

20

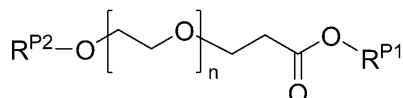
【0384】

いくつかの実施形態では、PEG 脂質は、式 (A-a)、式 (A-b)、式 (A-c)、式 (A-d)、もしくは式 (A-e) の化合物：

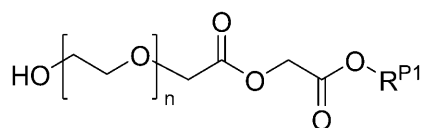
【化 2 9】



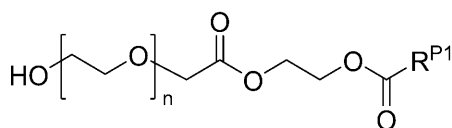
式 (A-a)



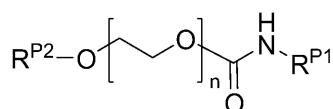
式 (A-b)



式 (A-c)



式 (A-d)



式 (A-e)

30

またはその薬学的に許容される塩である。

【0385】

いくつかの実施形態では、 R^{P1} は、 C_6-C_{24} 、 $C_{10}-C_{20}$ 、 $C_{10}-C_{18}$ 、 $C_{10}-C_{16}$ 、 $C_{10}-C_{14}$ 、 $C_{10}-C_{12}$ 、 $C_{12}-C_{20}$ 、 $C_{12}-C_{18}$ 、 $C_{12}-C_{16}$ 、 $C_{12}-C_{14}$ 、 $C_{14}-C_{20}$ 、 $C_{14}-C_{18}$ 、 $C_{14}-C_{16}$ 、 $C_{16}-C_{20}$ 、 $C_{16}-C_{18}$ 、または $C_{18}-C_{20}$ アルキルである。いくつかの実施形態では、 R^{P1} は、 $C_{14}-C_{18}$ アルキルである。いくつかの実施形態では、 R^{P1} は、 $C_{14}-C_{16}$ アルキルである。いくつかの実施形態では、 R^{P1} は、 $C_{15}-C_{17}$ アルキルである。いくつかの実施形態では、 R^{P1} は、 $C_{16}-C_{18}$ アルキルである。いくつかの実施形態では、 R^{P1} は、 C_6 、 C_7 、 C_8 、 C_9 、 C_{10} 、 C_{11} 、 C_{12} 、 C_{13} 、 C

40

50

14、C15、C16、C17、C18、C19、C20、C21、C22、C23、またはC24アルキルである。いくつかの実施形態では、R^{P1}は、C6-C24、C10-C20、C10-C18、C10-C16、C10-C14、C10-C12、C12-C20、C12-C18、C12-C16、C12-C14、C14-C20、C14-C18、C14-C16、C16-C20、C16-C18、またはC18-C20アルケニルである。いくつかの実施形態では、R^{P1}は、C14-C18アルケニルである。いくつかの実施形態では、R^{P1}は、C14-16アルケニルである。いくつかの実施形態では、R^{P1}は、C15-C17アルケニルである。いくつかの実施形態では、R^{P1}は、C16-18アルケニルである。いくつかの実施形態では、R^{P1}は、C6、C7、C8、C9、C10、C11、C12、C13、C14、C15、C16、C17、C18、C19、C20、C21、C22、C23、またはC24アルケニルである。

10

【0386】

いくつかの実施形態では、R^{P2}は水素である。いくつかの実施形態では、R^{P2}は、-CH₃である。

【0387】

いくつかの実施形態では、nは、平均で、10~200、10~180、10~160、10~140、10~120、10~100、10~80、10~60、10~40、10~20、20~200、20~180、20~160、20~140、20~120、20~100、20~80、20~60、20~40、40~200、40~180、40~160、40~140、40~120、40~100、40~80、40~60、60~200、60~180、60~160、60~140、60~120、60~100、60~80、80~200、80~180、80~160、80~140、80~120、80~100、100~200、100~180、100~160、100~140、100~120、120~200、120~180、120~160、120~140、140~200、140~180、140~160、160~200、160~180、または180~200である。いくつかの実施形態では、nは、平均で、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、または200である。いくつかの実施形態では、nは、平均で約20である。いくつかの実施形態では、nは、平均で約40である。いくつかの実施形態では、nは、平均で約45である。いくつかの実施形態では、nは、平均で約50である。いくつかの実施形態では、nは、平均で約68である。いくつかの実施形態では、nは、平均で約75である。いくつかの実施形態では、nは、平均で約100である。

20

30

【0388】

いくつかの実施形態では、式(A)の化合物は、

HO-(CH₂CH₂O)_n-CH₂C(O)O-(CH₂)₁₇CH₃ [nは、平均で約45である]、

H₃CO-(CH₂CH₂O)_n-CH₂C(O)O-(CH₂)₁₇CH₃ [nは、平均で約45である]、

HO-(CH₂CH₂O)_n-CH₂C(O)O-(CH₂)₁₅CH₃ [nは、平均で約45である]、

40

HO-(CH₂CH₂O)_n-CH₂C(O)O-(CH₂)₁₃CH₃ [nは、平均で約45である]、及び

HO-(CH₂CH₂O)_n-C(O)N(H)-(CH₂)₁₇CH₃ [nは、平均で約45である]

からなる群から選択される化合物、またはその薬学的に許容される塩である。

【0389】

代替的な実施形態

代替的な実施形態において、本明細書に記載される化合物は、1つ以上の同位体置換を含んでもよい。例えば、水素は²H (Dもしくは重水素) または³H (Tもしくはトリチ

50

ウム)でもよく、炭素は例えば、 ^{13}C または ^{14}C でもよく、酸素は例えば、 ^{18}O でもよく、窒素は例えば、 ^{15}N などでもよい。他の実施形態では、特定の同位体(例えば、 ^3H 、 ^{13}C 、 ^{14}C 、 ^{18}O 、または ^{15}N)が、化合物の特定の部位を占有する元素の総同位体存在度の少なくとも1%、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも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99%、または少なくとも99.9%に相当してもよい。

【0390】

脂質ナノ粒子

ある特定の実施形態では、本明細書に記載の合成RNAウイルスゲノムは、脂質ナノ粒子(LNP)にカプセル化される。ある特定の実施形態では、LNPは、トリグリセリド(例えば、トリステアリン)、ジグリセリド(例えば、グリセロールバヘネート)、モノグリセリド(例えば、グリセロールモノステアレート)、脂肪酸(例えば、ステアリン酸)、ステロイド(例えば、コレステロール)、及びワックス(例えば、パルミチン酸セチル)などの1つ以上の脂質を含む。いくつかの実施形態では、LNPは、1つ以上のカチオン性脂質、1つ以上の構造脂質、及び1つ以上のヘルパー脂質を含む。いくつかの実施形態では、LNPは、1つ以上のカチオン性脂質、コレステロール、及び1つ以上の中性脂質を含む。

【0391】

いくつかの実施形態では、本開示の化合物は、ナノ粒子を形成するために使用される。いくつかの実施形態では、ナノ粒子は、脂質ナノ粒子(LNP)である。いくつかの実施形態では、LNPは、PEG脂質、イオン化可能な脂質、ヘルパー脂質、及び構造脂質を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるLNPは、治療剤を必要とする対象にそれを送達するために製剤化されている。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるLNPは、核酸分子を必要とする対象にそれを送達するために製剤化されている。

【0392】

LNP中の脂質の配合は、特定のLNPの治療的使用及び有効性に著しく影響する。例えば、SS-OC/コレステロール/DSPC/PEG2k-DPGなどのLNP製剤は、典型的に、例えばマウス、非ヒト霊長類(NHP)、及び/またはヒトにおける繰り返し静脈内(IV)投与の際に増加したクリアランス速度を示し、第1投薬後よりも第2投薬後に大幅に短いin vivo循環時間を示す。短縮された循環時間は、おそらく標的へのLNPの曝露が減少することにより、LNPの送達効率に悪影響を及ぼし得る。したがって、そのような製剤は、複数投与を必要としない薬剤の送達において有用であり得るが、後続投与を必要とする薬剤の送達のためのそれらの使用は、この短縮された循環時間によって制約され得る。

【0393】

in vivoで繰り返し投薬した際に、調節可能な循環及び標的細胞への曝露、例えば、持続的な循環及び一貫した曝露を示すLNP製剤が依然として必要とされている。本開示は、LNPの脂質配合に本開示のイオン化可能な脂質及び/またはPEG脂質を組み込むことにより、そのようなLNP製剤を提供する。繰り返し投与時の本開示のLNPの持続的な循環は、結果として、その中にカプセル化された合成RNAウイルスゲノムの持続的な治療効果を可能にする。

【0394】

いくつかの実施形態では、本開示のイオン化可能な脂質及び/またはPEG脂質がなければ、合成RNAウイルスゲノムの放出前に身体がLNPを排除し得るため、繰り返し投薬時のLNP及びその成分の急速なクリアランスにより、後続用量のカプセル化合成RNAウイルスゲノムの送達効率が低下する。いくつかの実施形態では、本開示のイオン化可能な脂質及び/またはPEG脂質は、LNPに組み込まれた場合、繰り返し投薬時のLNP

10

20

30

40

50

P のクリアランスを遅延させ、カプセル化合成 RNA ウイルスゲノムの放出及び治療効果の持続を可能にする。

【0395】

ポリエチレングリコール（PEG）脂質

いくつかの実施形態では、本開示の PEG 脂質は、親水性頭部基及び疎水性脂質尾部を含む。いくつかの実施形態では、親水性頭部基は PEG 部分である。いくつかの実施形態では、本開示の PEG 脂質は、モノ脂質尾部を含む。いくつかの実施形態では、本開示の PEG 脂質は、モノアルキル脂質尾部、モノアルケニル脂質尾部、モノアルキニル脂質尾部、またはモノアシル脂質尾部を含む。いくつかの実施形態では、モノ脂質尾部は、エーテル基、カルボニル基、またはエステル基を含む。いくつかの実施形態では、本開示の PEG 脂質は、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレンアルケニルエーテル、またはポリオキシエチレンアルキニルエーテル（そのような分子は BRIJ（商標）または Br i j 分子としても知られている）を含み得る。いくつかの実施形態では、本開示の PEG 脂質は、ポリオキシエチレンアルキルエステル、ポリオキシエチレンアルケニルエステル、またはポリオキシエチレンアルキニルエステル（そのような分子は MYRJ（商標）分子としても知られている）を含み得る。

10

【0396】

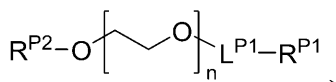
いくつかの実施形態では、PEG 脂質は、ジースイル脂質尾部を含み得る。

【0397】

いくつかの実施形態では、PEG 脂質は、式（A）の化合物

20

【化30】



式（A）

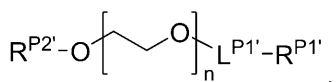
またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物であり、式中、変数は本明細書で定義されている。

【0398】

30

いくつかの実施形態では、PEG 脂質は、式（A'）の化合物：

【化31】



式（A'）

またはその薬学的に許容される塩であり、式中、

n は、すべての端点を含む 10～200 の整数であり、

40

L^{P1'} は結合、-C(O)-、-[(CH₂)₀₋₃-C(O)O]₁₋₃-、-(CH₂)₀₋₃-C(O)O-(CH₂)₁₋₃-OC(O)-、または -C(O)N(H)- であり、

R^{P1'} は、C₅-C₂₅ アルキルまたは C₅-C₂₅ アルケニルであり、

R^{P2'} は、水素または -CH₃ である。

【0399】

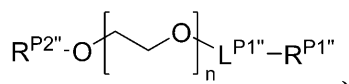
いくつかの実施形態では、L^{P1'} は結合、-C(O)-、-CH₂C(O)O-、-CH₂CH₂C(O)O-、-CH₂C(O)OCH₂C(O)O-、-CH₂C(O)OCH₂CH₂OC(O)-、または -C(O)N(H)- である。いくつかの実施形態では、R^{P1'} は、R^{P1} である。いくつかの実施形態では、R^{P2'} は、R^{P2} である。

50

【0400】

いくつかの実施形態では、PEG脂質は、式（A''）の化合物：

【化32】



式（A''）

またはその薬学的に許容される塩であり、式中、

nは、すべての端点を含む10～200の整数であり、

L^{P1''}は結合、 $-(\text{CH}_2)_{0-3}-\text{C}(\text{O})\text{O}-$ 、 $-(\text{CH}_2)_{0-3}-\text{C}(\text{O})\text{O}-(\text{CH}_2)_{1-3}-\text{OC}(\text{O})-$ 、または $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{H})-$ であり、

R^{P1''}は、C₅～C₂₅アルキルまたはC₅～C₂₅アルケニルであり、

R^{P2''}は、水素または $-\text{CH}_3$ である。

10

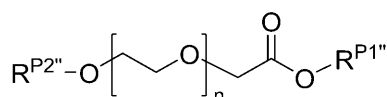
【0401】

いくつかの実施形態では、L^{P1''}は結合、 $-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{O}-$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{O}-$ 、 $-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{OCH}_2\text{C}(\text{O})\text{O}-$ 、 $-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})-$ 、または $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{H})-$ である。

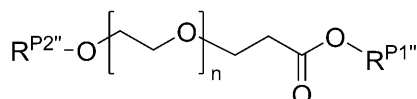
【0402】

いくつかの実施形態では、PEG脂質は、式（A''-a）、式（A''-b）、式（A''-c）、式（A''-cd）、式（A''-e）、もしくは式（A''-f）の化合物：

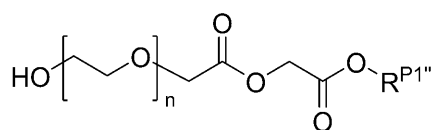
【化33】



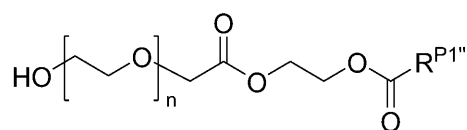
式（A''-a）



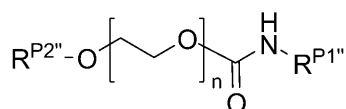
式（A''-b）



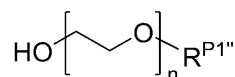
式（A''-c）



式（A''-d）



式（A''-e）



式（A''-f）

30

またはその薬学的に許容される塩である。

40

【0403】

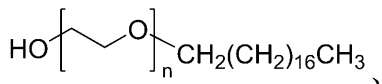
いくつかの実施形態では、R^{P1''}は、R^{P1}である。いくつかの実施形態では、R^{P2''}は、R^{P2}である。

【0404】

いくつかの実施形態では、PEG脂質は、式（A''-f1）の化合物：

50

【化 3 4】



式 (A'' - f 1)

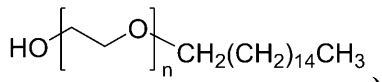
またはその薬学的に許容される塩である。

【0 4 0 5】

いくつかの実施形態では、PEG 脂質は、式 (A'' - f 2) の化合物：

10

【化 3 5】



式 (A'' - f 2)

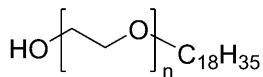
またはその薬学的に許容される塩である。

【0 4 0 6】

いくつかの実施形態では、PEG 脂質は、式 (A'' - f 3) の化合物：

20

【化 3 6】



式 (A'' - f 3)

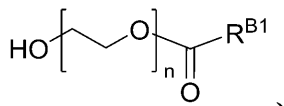
またはその薬学的に許容される塩である。

【0 4 0 7】

いくつかの実施形態では、本開示の PEG 脂質は、式 (B) の化合物：

30

【化 3 7】



式 (B)

またはその薬学的に許容される塩であり、式中、

n は、すべての端点を含む 10 ~ 200 の整数であり、

R^{B1} は、C₅ - C₂₅ アルキルまたは C₅ - C₂₅ アルケニルである。

40

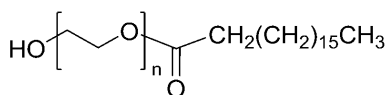
【0 4 0 8】

いくつかの実施形態では、R^{B1} は、R^{P1} である。

【0 4 0 9】

いくつかの実施形態では、PEG 脂質は、式 (B - a) の化合物：

【化 3 8】



式 (B - a) 、

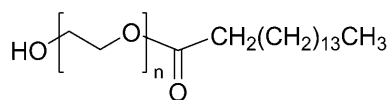
50

またはその薬学的に許容される塩である。

【0410】

いくつかの実施形態では、PEG脂質は、式（B-b）の化合物：

【化39】



式（B-b）、

またはその薬学的に許容される塩である。

10

【0411】

いくつかの実施形態では、nは、平均で、10～200、10～180、10～160、10～140、10～120、10～100、10～80、10～60、10～40、10～20、20～200、20～180、20～160、20～140、20～120、20～100、20～80、20～60、20～40、40～200、40～180、40～160、40～140、40～120、40～100、40～80、40～60、60～200、60～180、60～160、60～140、60～120、60～100、60～80、80～200、80～180、80～160、80～140、80～120、80～100、100～200、100～180、100～160、100～140、100～120、120～200、120～180、120～160、120～140、140～200、140～180、140～160、160～200、160～180、または180～200である。いくつかの実施形態では、nは、平均で、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、または200である。いくつかの実施形態では、nは、平均で約20である。いくつかの実施形態では、nは、平均で約40である。いくつかの実施形態では、nは、平均で約45である。いくつかの実施形態では、nは、平均で約50である。いくつかの実施形態では、nは、平均で約68である。いくつかの実施形態では、nは、平均で約75である。いくつかの実施形態では、nは、平均で約100である。

20

【0412】

いくつかの実施形態では、PEG脂質は、約500～約10,000ダルトンの平均分子量を有するPEG部分を含む。いくつかの実施形態では、PEG脂質は、約500～約5,000ダルトン、約500～約4,000ダルトン、約500～約3,000ダルトン、約500～約2,000ダルトン、約500～約1,000ダルトン、約500～約800ダルトン、約500～約600ダルトン、約600～約5,000ダルトン、約600～約4,000ダルトン、約600～約3,000ダルトン、約600～約2,000ダルトン、約600～約1,000ダルトン、約600～約800ダルトン、約800～約5,000ダルトン、約800～約4,000ダルトン、約800～約3,000ダルトン、約800～約2,000ダルトン、約800～約1,000ダルトン、約1,000～約5,000ダルトン、約1,000～約4,000ダルトン、約1,000～約3,000ダルトン、約1,000～約2,000ダルトン、約2,000～約5,000ダルトン、約2,000～約4,000ダルトン、約2,000～約3,000ダルトン、約3,000～約5,000ダルトン、約3,000～約4,000ダルトン、約5,000～約10,000ダルトン、約5,000～約7,500ダルトン、または約7,500～約10,000ダルトンの平均分子量を有するPEG部分を含む。いくつかの実施形態では、PEG脂質のPEG部分は、約1,500～約2,500ダルトンの平均分子量を有する。いくつかの実施形態では、PEG脂質のPEG部分は、約1,000～約5,000ダルトンの平均分子量を有する。いくつかの実施形態では、PEG脂質は、約500、約600、約800、約1,000、約1,500、約2,000、約2,500、約3,000、約3,500、約4,000、約4,500、約5,000、約6

30

40

50

、000、約7,000、約8,000、約9,000、または約10,000ダルトンの平均分子量を有するPEG部分を含む。いくつかの実施形態では、PEG脂質は、少なくとも500、少なくとも1,000、少なくとも1,500、少なくとも2,000、少なくとも2,500、少なくとも3,000、少なくとも3,500、少なくとも4,000、少なくとも4,500、少なくとも5,000、少なくとも6,000、少なくとも7,000、少なくとも8,000、少なくとも9,000、または少なくとも10,000ダルトンの平均分子量を有するPEG部分を含む。いくつかの実施形態では、PEG脂質は、500ダルトン以下、1,000ダルトン以下、1,500ダルトン以下、2,000ダルトン以下、2,500ダルトン以下、3,000ダルトン以下、3,500ダルトン以下、4,000ダルトン以下、4,500ダルトン以下、5,000ダルトン以下、6,000ダルトン以下、7,000ダルトン以下、8,000ダルトン以下、9,000ダルトン以下、または10,000ダルトン以下の平均分子量を有するPEG部分を含む。すべての値は、すべての端点を含む。

10

【0413】

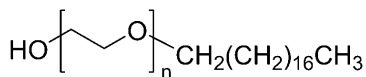
いくつかの実施形態では、PEG脂質は、ポリオキシエチレン(100)ステアリルエーテル、ポリオキシエチレン(20)セチルエーテル、ポリオキシエチレン(20)オレイルエーテル、ポリオキシエチレン(20)ステアリルエーテル、またはそれらの混合物である。いくつかの実施形態では、PEG脂質は、ポリオキシエチレン(100)ステアレート、ポリオキシエチレン(50)ステアレート、ポリオキシエチレン(40)ステアレート、ポリオキシエチレンパルミテート、またはそれらの混合物である。

20

【0414】

本開示のいくつかの実施形態では、PEG脂質は、

【化40】



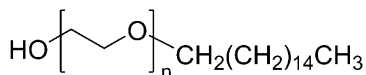
(BRIJ(商標)S100)であり、CAS番号は9005-00であり、示性式は $\text{C}_{18}\text{H}_{37}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$ であり、式中、 n は100である。BRIJ(商標)S100は、通称、ポリオキシエチレン(100)ステアリルエーテルとしても知られている。したがって、いくつかの実施形態では、PEG脂質は、 $\text{HO}-\text{PEG}100-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{16}\text{CH}_3$ である。

30

【0415】

本開示のいくつかの実施形態では、PEG脂質は、

【化41】



40

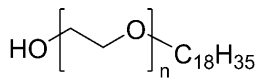
(BRIJ(商標)C20)であり、CAS番号は9004-95-9であり、示性式は $\text{C}_{16}\text{H}_{33}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$ であり、式中、 n は20である。BRIJ(商標)C20は、BRIJ(商標)58としても知られ、通称、ポリエチレングリコールヘキサデシルエーテル、ポリオキシエチレン(20)セチルエーテルとしても知られている。したがって、いくつかの実施形態では、PEG脂質は、 $\text{HO}-\text{PEG}20-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_3$ である。

【0416】

本開示のいくつかの実施形態では、PEG脂質は、

50

【化 4 2】



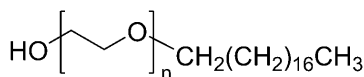
(BRIJ (商標) O20) であり、CAS 番号は 9004-98-2 であり、示性式は $\text{C}_{18}\text{H}_{35}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$ であり、式中、 n は 20 である。BRIJ (商標) O20 は、通称、ポリオキシエチレン (20) オレイルエーテルとしても知られている。したがって、いくつかの実施形態では、PEG 脂質は、 $\text{HO}-\text{PEG}20-\text{C}_{18}\text{H}_{35}$ である。

10

【0 4 1 7】

本開示のいくつかの実施形態では、PEG 脂質は、

【化 4 3】



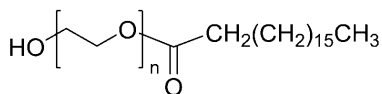
(BRIJ (商標) S20) であり、CAS 番号は 9005-00-9 であり、示性式は $\text{C}_{18}\text{H}_{37}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$ であり、式中、 n は 20 である。BRIJ (商標) S20 は、通称、ポリエチレングリコールオクタデシルエーテルまたはポリオキシエチレン (20) ステアリルエーテルとしても知られている。したがって、いくつかの実施形態では、PEG 脂質は、 $\text{HO}-\text{PEG}20-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{16}\text{CH}_3$ である。

20

【0 4 1 8】

本開示のいくつかの実施形態では、PEG 脂質は、

【化 4 4】



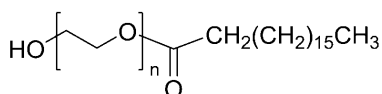
30

(MYRJ (商標) S100) であり、CAS 番号は 9004-99-3 であり、示性式は $\text{C}_{17}\text{H}_{35}\text{C}(\text{O})(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$ であり、式中、 n は 100 である。MYRJ (商標) S100 は、通称、ポリオキシエチレン (100) ステアレートとしても知られている。したがって、いくつかの実施形態では、PEG 脂質は、 $\text{HO}-\text{PEG}100-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{15}\text{CH}_3$ である。

【0 4 1 9】

本開示のいくつかの実施形態では、PEG 脂質は、

【化 4 5】



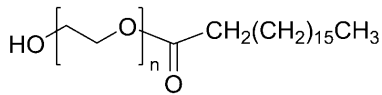
40

(MYRJ (商標) S50) であり、CAS 番号は 9004-99-3 であり、示性式は $\text{C}_{17}\text{H}_{35}\text{C}(\text{O})(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$ であり、式中、 n は 50 である。MYRJ (商標) S50 は、通称、ポリオキシエチレン (50) ステアレートとしても知られている。したがって、いくつかの実施形態では、PEG 脂質は、 $\text{HO}-\text{PEG}50-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{15}\text{CH}_3$ である。

50

【0420】

本開示のいくつかの実施形態では、PEG脂質は、
【化46】

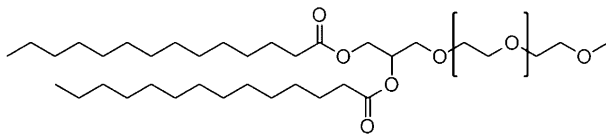


(MYRJ (商標) S40) であり、CAS 番号は9004-99-3であり、示性式は $\text{C}_{17}\text{H}_{35}\text{C}(\text{O})(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$ であり、式中、 n は40である。MYRJ (商標) S40は、通称、ポリオキシエチレン(40)ステアレートとしても知られている。したがって、いくつかの実施形態では、PEG脂質は、 $\text{HO}-\text{PEG}40-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{15}\text{CH}_3$ である。

10

【0421】

本開示のいくつかの実施形態では、PEG脂質は、
【化47】

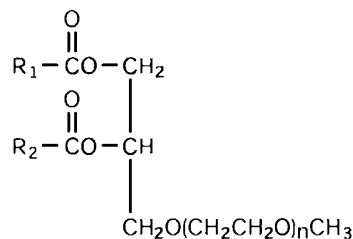


20

である。

【0422】

本開示のいくつかの実施形態では、PEG脂質は、
【化48】



30

である。

【0423】

本開示のいくつかの実施形態では、PEG脂質は、PEG-ジラウロイルグリセロール、PEG-ジミリストイルグリセロール (PEG-DMG)、PEG-ジパルミトイルグリセロール、PEG-ジステアロイルグリセロール (PEG-DSPE)、PEG-ジラウリルグリカミド、PEG-ジミリスチルグリカミド、PEG-ジパルミトイルグリカミド、PEG-ジステアロイルグリカミド、PEG-コレステロール (l-[8'-(コレスター-5-エン-3 [ベータ]-オキシ) カルボキサミド-3', 6'-ジオキサオクタニル] カルバモイル-[オメガ]-メチル-ポリ(エチレングリコール)、PEG-DMB (3, 4-ジテトラデコキシルベンジル-[オメガ]-メチル-ポリ(エチレングリコール) エーテル)、l, 2-ジミリストイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[メトキシ(ポリエチレングリコール)-2000] (PEG2k-DMG)、l, 2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[メトキシ(ポリエチレングリコール)-2000] (PEG2k-DSPE)、1, 2-ジステアロイル-sn-グリセロール、メトキシポリエチレングリコール (PEG2k-DSG)

40

50

、ポリ（エチレングリコール）－２０００－ジメタクリレート（PEG 2 k－DMA）、または、１，２－ジステアリルオキシプロピル－３－アミン－N－[メトキシ（ポリエチレングリコール）－２０００]（PEG 2 k－DSA）であり得る。いくつかの実施形態では、PEG 脂質はPEG 2 k－DMGであり得る。いくつかの実施形態では、PEG 脂質はPEG 2 k－DSGであり得る。他の実施形態では、PEG 脂質はPEG 2 k－DSP Eであり得る。いくつかの実施形態では、PEG 脂質はPEG 2 k－DMAであり得る。さらに他の実施形態では、PEG 脂質はPEG 2 k－C－DMAであり得る。いくつかの実施形態では、PEG 脂質はPEG 2 k－DSAであり得る。他の実施形態では、PEG 脂質はPEG 2 k－C 1 1であり得る。いくつかの実施形態では、PEG 脂質はPEG 2 k－C 1 4であり得る。いくつかの実施形態では、PEG 脂質はPEG 2 k－C 1 6であり得る。いくつかの実施形態では、PEG 脂質はPEG 2 k－C 1 8であり得る。

10

【０４２４】

いくつかの実施形態では、本開示の単一脂質尾部を有するPEG 脂質（例えば、式（A）、（A'）、（A''）、または（B）のPEG 脂質）は、本開示のLNP組成物の投与及び／または繰り返し投与の際に、加速血液クリアランス（ABC）を低減させ得る。いくつかの実施形態では、本開示の単一脂質尾部を有するPEG 脂質は、本開示のLNP組成物の投与及び／または繰り返し投与の際に、対象の免疫系によって生成されるPEG 特異的抗体（例えば、抗PEG IgM）を低減または枯渇させ得る。

【０４２５】

いくつかの実施形態では、PEG 脂質は、１つ以上のC 6－C 2 0アルキルを含む脂質と共有結合した最大5 kDaの長さのポリ（エチレン）グリコール鎖を含む。いくつかの実施形態では、PEG 脂質は、１，２－ジステアロイル－sn－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン－ポリ（エチレングリコール）（DSPE－PEG）、または１，２－ジステアロイル－sn－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン－N－[アミノ（ポリエチレングリコール）]（DSPE－PEG－アミン）である。いくつかの実施形態では、PEG 脂質は、１，２－ジステアロイル－sn－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン－N－[アミノ（ポリエチレングリコール）－５０００]（DSPE－PEG 5 K）、１，２－ジパルミトイル－rac－グリセロールメトキシポリエチレングリコール－２０００（DPG－PEG 2 K）、１，２－ジステアロイル－rac－グリセロ－３－メチルポリオキシエチレン－５０００（DSG－PEG 5 K）、１，２－ジステアロイル－rac－グリセロ－３－メチルポリオキシエチレン－２０００（DSG－PEG 2 K）、１，２－ジミリストイル－rac－グリセロ－３－メチルポリオキシエチレン－５０００（DMG－PEG 5 K）、及び１，２－ジミリストイル－rac－グリセロ－３－メチルポリオキシエチレン－２０００（DMG－PEG 2 K）から選択される。いくつかの実施形態では、PEG 脂質は、DSPE－PEG 5 Kである。いくつかの実施形態では、PEG 脂質は、DPG－PEG 2 Kである。いくつかの実施形態では、PEG 脂質は、DSG－PEG 2 Kである。いくつかの実施形態では、PEG 脂質は、DMG－PEG 2 Kである。いくつかの実施形態では、PEG 脂質は、DSG－PEG 5 Kである。いくつかの実施形態では、PEG 脂質は、DMG－PEG 5 Kである。

20

30

【０４２６】

いくつかの実施形態では、PEG 脂質は、切断可能なPEG 脂質である。切断可能な結合を有するPEG 誘導体の例としては、ペプチド結合で修飾されたもの（Kulkarni et al. (2014). Mmp-9 responsive PEG cleavable nanovesicles for efficient delivery of chemotherapeutics to pancreatic cancer. Mol Pharmaceutics 11:2390-9、Lin et al. (2015). Drug/dye-loaded, multifunctional peg-chitosan-iron oxide nanocomposites for methotrexate synergistically self-targeted cancer therapy and dual model imag

40

50

ing. ACS Appl Mater Interfaces 7:11908–20.
 .)、ジスルフィド鍵(disulfide keys)で修飾されたもの(Yan et al (2014). A method to accelerate the gelation of disulfide-crosslinked hydrogels. Chin J Polym Sci 33:118–27、Wu&Yan (2015). Copper nanopowder catalyzed cross-coupling of diaryl disulfides with aryl iodides in PEG-400. Synlett 26:537–42)、ビニルエーテル結合、ヒドラゾン結合で修飾されたもの(Kelly et al. (2016). Polymeric prodrug combination to exploit the therapeutic potential of antimicrobial peptides against cancer cells. Org Bio mol Chem 14:9278–86.)、及びエステル結合で修飾されたものが挙げられる(Xu et al. (2008). Esterase-catalyzed dePEGylation of pH-sensitive vesicles modified with cleavable PEG-lipid derivatives. J Control Release 130:238–45)。Fang et al., (2017) Cleaveable PEGylation: a strategy for overcoming the “PEG dilemma” in efficient drug delivery. Drug Delivery 24:22–32も参照されたい。

【0427】

いくつかの実施形態では、PEG脂質は、活性化PEG脂質である。例示的な活性化PEG脂質としては、PEG-NH₂、PEG-MAL、PEG-NHS、及びPEG-ALDが挙げられる。そのような官能化PEG脂質は、粒子を特定の標的細胞または組織に誘導するための(例えば、抗原結合分子、ペプチド、グリカンなどの結合による)脂質ナノ粒子へのターゲティング部分のコンジュゲーションにおいて有用である。いくつかの実施形態では、官能化部分(例えば、-NH₂、-MAL、-NHS、-ALD)は、本開示のPEG脂質(例えば、BRIJ(商標)またはMYRJ(商標)ファミリーPEG脂質)のPEG部分の自由端に付加される。

【0428】

カチオン性脂質

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるLNPは、1つ以上のカチオン性脂質を含む。「カチオン性脂質」及び「イオン化可能な脂質」は、本明細書では互換的に使用される。

【0429】

カチオン性脂質は、生理学的pHなどの選択されたpHで正味の正電荷を帯びる複数の脂質種のいずれかを指す。かかる脂質は、限定されるものではないが、1,2-ジリノレイルオキシ-N,N-ジメチルアミノプロパン(DLiNDMA)、1,2-ジリノレニルオキシ-N,N-ジメチルアミノプロパン(DLeNDMA)、ジオクタデシルジメチルアンモニウム(DODMA)、ジステアリルジメチルアンモニウム(DSDMA)、N,N-ジオレイル-N,N-ジメチルアンモニウムクロリド(DODAC)、N-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド(DOTMA)、N,N-ジステアリル-N,N-ジメチルアンモニウムブロミド(DDAB)、N-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド(DOTAP)、3-(N-(N',N'-ジメチルアミノエタン)-カルバモイル)コレステロール(DC-Chol)、及びN-(1,2-ジミリスチルオキシプロパ-3-イル)-N,N-ジメチル-N-ヒドロキシエチルアンモニウムブロミド(DMRIE)を含む。例えば、生理学的pH未満で正電荷を有するカチオン性脂質は、限定されるものではないが、DODAP、DODMA、及びDMDMAを含む。いくつかの実

施形態では、カチオン性脂質は、 C_{18} アルキル鎖、頭部基とアルキル鎖との間のエーテル結合、及び0～3の二重結合を含む。かかる脂質には、例えば、DSDMA、DLinDMA、DLenDMA、及びDODMAが含まれる。

【0430】

いくつかの実施形態では、カチオン性脂質は、プロトン化可能な第三級アミン頭部基を含む。かかる脂質は、本明細書ではイオン化可能な脂質と称される。イオン化可能な脂質は、イオン化可能なアミン頭部基を含み、典型的には約7未満の pK_a を含む脂質種を指す。したがって、酸性 pH の環境では、イオン化可能なアミン頭部基は、イオン化可能な脂質が負に帯電した分子（例えば、本明細書に記載の組換えポリヌクレオチドなどの核酸）と優先的に相互作用するようにプロトン化され、したがってナノ粒子のアセンブリ及びカプセル化を促進する。したがって、いくつかの実施形態では、イオン化可能な脂質は、脂質ナノ粒子への核酸の負荷を増加させることができる。 pH が約7よりも大きい環境（例えば、約7.4の生理学的 pH ）では、イオン化可能な脂質は中性電荷を含む。イオン化可能な脂質を含む粒子がエンドソームの低 pH 環境（例えば、 $pH < 7$ ）に取り込まれると、イオン化可能な脂質は再びプロトン化され、アニオン性エンドソーム膜と結合して、粒子によってカプセル化された内容物の放出を促進する。いくつかの実施形態では、LNPは、イオン化可能な脂質、例えば、7. SS切断可能な pH 応答性脂質様物質（COATSOME（登録商標）SSシリーズなど）を含む。

10

【0431】

いくつかの実施形態では、LNPのカチオン性脂質は、DLinDMA、DLin-KC2-DMA、DLin-MC3-DMA（MC3）、COATSOME（登録商標）SS-LC（旧名：SS-18/4PE-13）、COATSOME（登録商標）SS-EC（旧名：SS-33/4PE-15）、COATSOME（登録商標）SS-OC、COATSOME（登録商標）SS-OP、ジ（（Z）-ノナ-2-エン-1-イル）9-（（4-ジメチルアミノ）ブタノイル）オキシ）ヘプタデカンジオエート（L-319）、N-（2,3-ジオレオイルオキシ）プロピル）-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド（DOTAP）、またはそれらの混合物である。

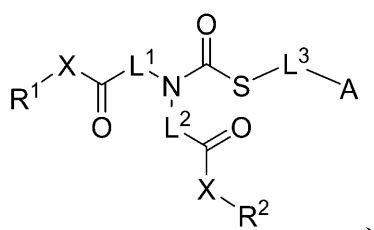
20

【0432】

いくつかの実施形態では、LNPのカチオン性脂質は、式（I）の化合物：

【化49】

30



式（I）

40

またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物であり、式中、変数は本明細書で定義されている。

【0433】

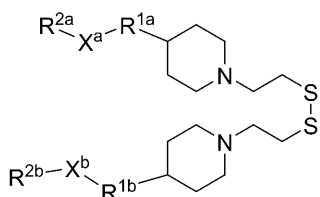
いくつかの実施形態では、本開示のカチオン性脂質は、表21から選択される化合物、またはその薬学的に許容される塩である。

【0434】

いくつかの実施形態では、LNPのカチオン性脂質は、式（II-1）の化合物：

50

【化 5 0】



またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物であり、式中、

10

R^{1a} 及び R^{1b} は、各々独立的に、 $C_1 - C_8$ 脂肪族または $-O(C_1 - C_8 \text{ 脂肪族})$ であり、ここで、O 原子は、存在する場合、ピペリジン環に結合しており、

X^a 及び X^b は、各々独立的に、 $-C(O)O^*$ 、 $-OC(O)^*$ 、 $-C(O)N(R_x^1)^*$ 、 $-N(R_x^1)C(O)^*$ 、 $-O(C=O)N(R_x^1)^*$ 、 $-N(R_x^1)(C=O)O^*$ 、または $-O-$ であり、ここで、 * は、それぞれ R^{2a} または R^{2b} への結合点を示し、 R_x^1 の各存在は、水素及び場合により置換されている $C_1 - C_4$ アルキルから独立的に選択され、

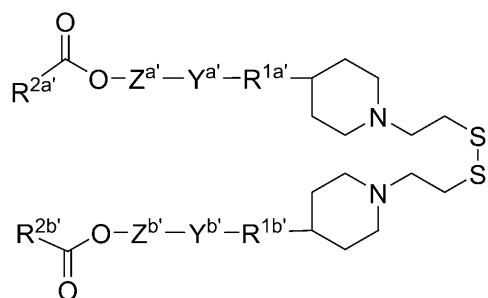
R^{2a} 及び R^{2b} は、各々独立的に、ステロール残基、脂溶性ビタミン残基、または $C_{13} - C_{23}$ 脂肪族である。

20

【0435】

いくつかの実施形態では、LNP のカチオン性脂質は、式 (II-2) の化合物：

【化 5 1】



式 (II-2)、

30

またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物であり、式中、

$R^{1a'}$ 及び $R^{1b'}$ は、各々独立的に、 $C_1 - C_8$ アルキレンまたは $-O(C_1 - C_8 \text{ アルキレン})$ であり、ここで、O 原子は、存在する場合、ピペリジン環に結合しており、

Y^a 及び Y^b は、各々独立的に、 $-C(O)O^*$ 、 $-OC(O)^*$ 、 $-C(O)N(R_x^1)^*$ 、 $-N(R_x^1)C(O)^*$ 、 $-O(C=O)N(R_x^1)^*$ 、 $-N(R_x^1)(C=O)O^*$ 、 $-N(R_x^1)C(O)N(R_x^1)^*$ 、または $-O-$ であり、ここで、 * は、 R^{2a} または R^{2b} への結合点を示し、 R_x^1 の各存在は、水素及び場合により置換されている $C_1 - C_4$ アルキルから独立的に選択され、

40

Z^a 及び Z^b は、各々独立的に、場合により置換されているアリーレン- $C_0 - C_8$ アルキレンまたは場合により置換されているアリーレン- $C_0 - C_8$ ヘテロアルキレンであり、ここで、アルキレンまたはヘテロアルキレン基は、それぞれ Y^a 及び Y^b に結合しており、

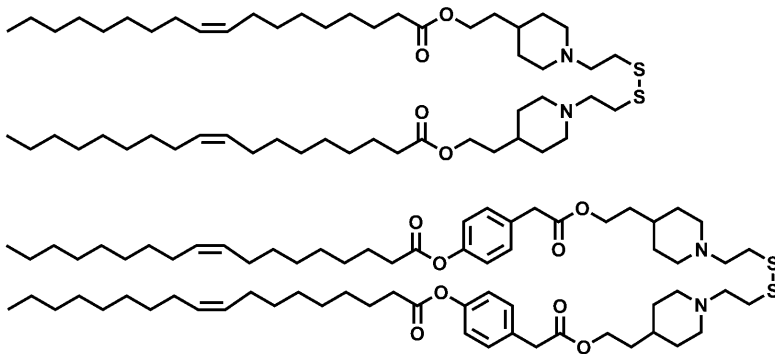
$R^{2a'}$ 及び $R^{2b'}$ は、各々独立的に、ステロール残基、脂溶性ビタミン残基、または $C_{12} - C_{22}$ 脂肪族である。

【0436】

いくつかの実施形態では、LNP のカチオン性脂質は、式 (II-1a) の化合物 (COATSOME (登録商標) SS-OC) または式 (II-2a) の化合物 (COATSOME (登録商標) SS-OP) である。

50

【化 5 2】



10

【0 4 3 7】

いくつかの実施形態では、LNPのカチオン性脂質は、式（II-1a）の化合物（COATSOME（登録商標）SS-OC）である。COATSOME（登録商標）SS-OCは、SS-18 / 4PE-16としても知られている。

【0 4 3 8】

いくつかの実施形態では、LNPのカチオン性脂質は、式（II-2a）の化合物（COATSOME（登録商標）SS-OP）である。

20

【0 4 3 9】

いくつかの実施形態では、LNPのカチオン性脂質は、1,2-ジオレオイル-3-トリメチルアンモニウム-プロパン（DOTAP）である。

【0 4 4 0】

ヘルパー脂質

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるLNPは、1つ以上のヘルパー脂質を含む。「ヘルパー脂質」という用語は、標的への、例えば細胞へのLNPの送達を増加させることができる脂質を指す。いずれかの特定の理論に束縛されることを望むものではないが、ヘルパー脂質は、脂質ナノ粒子の安定性及び／または膜融合性を増強させ得ることが企図される。いくつかの実施形態では、ヘルパー脂質は、リン脂質である。いくつかの実施形態では、ヘルパー脂質は、リン脂質代替物または代用物である。いくつかの実施形態では、ヘルパー脂質は、アルキルレゾルシノールである。

30

【0 4 4 1】

いくつかの実施形態では、ヘルパー脂質は、ホスファチジルコリン（PC）である。いくつかの実施形態では、ヘルパー脂質は、ホスファチジルコリン（PC）ではない。いくつかの実施形態では、ヘルパー脂質は、リン脂質またはリン脂質代替物である。いくつかの実施形態では、リン脂質またはリン脂質代替物は、例えば、1つ以上の飽和もしくは（ポリ）不飽和リン脂質、もしくはリン脂質代替物、またはそれらの組み合わせであり得る。一般に、リン脂質は、リン酸頭部基及び1つ以上の脂肪酸尾部を含む。いくつかの実施形態では、リン脂質は、1つ以上の多重（例えば、二重または三重）結合（すなわち、1つ以上の不飽和）を含み得る。いくつかの実施形態では、ヘルパー脂質は、非カチオン性である。

40

【0 4 4 2】

リン酸頭部基は、例えば、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルセリン、ホスファチジン酸、2-リゾホスファチジルコリン、及びスフィンゴミエリンからなる非限定的な群から選択され得る。

【0 4 4 3】

脂肪酸尾部は、例えば、ラウリン酸、ミリスチン酸、ミリストレイン酸、パルミチン酸、パルミトレイン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、アルファ-リノレン酸、エルカ酸、フィタン酸（phytanoic acid）、アラキジン酸、アラキドン酸

50

、エイコサペンタエン酸、ベヘン酸、ドコサペンタエン酸、及びドコサヘキサエン酸からなる非限定的な群から選択され得る。

【0444】

リン脂質は、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジリンイノシトール、ホスファチジグリセロール、及びホスファチジン酸などのグリセロリン脂質を含むが、これらに限定されない。リン脂質は、スフィンゴミエリンなどのホスホスフィンゴ脂質も含む。

【0445】

いくつかの実施形態では、非カチオン性ヘルパー脂質は、DSPC類似体、DSPC代替物、オレイン酸、またはオレイン酸類似体である。

【0446】

いくつかの実施形態では、非カチオン性ヘルパー脂質は、非ホスファチジルコリン（PC）双性イオン脂質、DSPC類似体、オレイン酸、オレイン酸類似体、または1，2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン（DSPC）代替物である。

【0447】

いくつかの実施形態では、リン脂質は、膜への融合を容易にし得る。例えば、カチオン性リン脂質は、膜（例えば、細胞膜または細胞内膜）の1つ以上の負に帯電したリン脂質と相互作用し得る。膜へのリン脂質の融合は、脂質含有組成物の1つ以上の要素に膜を通過させて、例えば、1つ以上の要素の細胞への送達を可能にし得る。

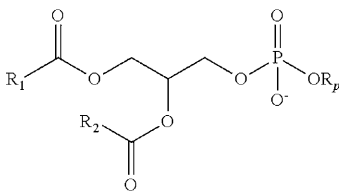
【0448】

いくつかの実施形態では、リン酸頭部基は、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルセリン、ホスファチジン酸、2-リゾホスファチジルコリン、及びスフィンゴミエリンからなる非限定的な群から選択され得る。脂肪酸尾部は、例えば、ラウリン酸、ミリスチン酸、ミリストレイン酸、パルミチン酸、パルミトレイン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、アルファ-リノレン酸、エルカ酸、フィタン酸（phytanoic acid）、アラキジン酸、アラキドン酸、エイコサペンタエン酸、ベヘン酸、ドコサペンタエン酸、及びドコサヘキサエン酸からなる非限定的な群から選択され得る。

【0449】

いくつかの実施形態では、リン脂質は、式（III）による化合物：

【化53】



であり、式中、 R_p は、リン酸頭部基を表し、 R_1 及び R_2 は、同じでも異なってもよい不飽和の有無を問わない脂肪酸尾部を表す。リン酸頭部基は、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルセリン、ホスファチジン酸、2-リゾホスファチジルコリン、及びスフィンゴミエリンからなる非限定的な群から選択され得る。脂肪酸尾部は、ラウリン酸、ミリスチン酸、ミリストレイン酸、パルミチン酸、パルミトレイン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、アルファ-リノレン酸、エルカ酸、フィタン酸（phytanic acid）、アラキジン酸、アラキドン酸、エイコサペンタエン酸、ベヘン酸、ドコサペンタエン酸、及びドコサヘキサエン酸からなる非限定的な群から選択され得る。分岐、酸化、環化、及びアルキンなどの修飾及び置換を有する天然種を含む非天然種も企図される。例えば、リン脂質は、1つ以上のアルキンで官能化されるか、またはそれと架橋されてもよい（例えば、1つ以上の二重結合が三重結合で置き換えられたアルケニル基）。適切な反応条件下で、ア

ルキン基は、アジドに曝露されると、銅触媒付加環化を起こし得る。そのような反応は、膜透過もしくは細胞認識を容易にするためのLNPの脂質二重層の官能化、またはターゲティング部分もしくはイメージング部分（例えば、色素）などの有用な成分へのLNPのコンジュゲーションにおいて有用であり得る。

【0450】

いくつかの実施形態では、LNPは、1つ以上の非カチオン性ヘルパー脂質（例えば、中性脂質）を含む。例示的な中性ヘルパー脂質には、（1，2-ジラウロイル-s n-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン）（DLPE）、1，2-ジフィタノイル-s n-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン（DiPPE）、1，2-ジステアロイル-s n-グリセロ-3-ホスホコリン（DSPC）、1，2-ジパルミトイル-s n-グリセロ-3-ホスホコリン（DPPC）、1，2-ジオレイル-s n-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン（DOPE）、1，2-ジパルミトイル-s n-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン（DPPE）、1，2-ジミリストイル-s n-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン（DMPE）、（1，2-ジオレオイル-s n-グリセロ-3-ホスホ-（l'-rac-グリセロール）（DOPG）、1，2-ジオレオイル-s n-グリセロ-3-ホスホコリン（DOPC）、1，2-ジステアロイル-s n-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン（DSPE）、セラミド、及びスフィンゴミエリンが含まれる。いくつかの実施形態では、1つ以上のヘルパー脂質は、1，2-ジステアロイル-s n-グリセロ-3-ホスホコリン（DSPC）、1，2-ジラウロイル-s n-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン（DLPE）、1，2-ジオレオイル-s n-グリセロ-3-ホスホコリン（DOPC）、及び1，2-ジオレオイル-s n-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン（DOPE）から選択される。いくつかの実施形態では、LNPのヘルパー脂質は、1，2-ジラウロイル-s n-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン（DLPE）または1，2-ジオレオイル-s n-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン（DOPE）を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる。いくつかの実施形態では、LNPは、DSPCを含む。いくつかの実施形態では、LNPは、DOPCを含む。いくつかの実施形態では、LNPは、DLPEを含む。いくつかの実施形態では、LNPは、DOPEを含む。

【0451】

いくつかの実施形態では、リン脂質は、1，2-ジステアロイル-s n-グリセロ-3-ホスホコリン（DSPC）、1，2-ジオレオイル-s n-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン（DOPE）、1，2-ジリノレオイル-s n-グリセロ-3-ホスホコリン（DLPC）、1，2-ジミリストイル-s n-グリセロ-3-ホスホコリン（DMPC）、1，2-ジオレオイル-s n-グリセロ-3-ホスホコリン（DOPC）、1，2-ジパルミトイル-s n-グリセロ-3-ホスホコリン（DPPC）、1，2-ジウンデカノイル-s n-グリセロ-3-ホスホコリン（DUPC）、1-パルミトイル-2-オレオイル-s n-グリセロ-3-ホスホコリン（POPC）、1，2-ジ-0-オクタデセニル-s n-グリセロ-3-ホスホコリン（18:0ジエテルPC）、1-オレオイル-2-コレステリルヘミスクシノイル-s n-グリセロ-3-ホスホコリン（OChemSPC）、1-ヘキサデシル-s n-グリセロ-3-ホスホコリン（C16 Lyso PC）、1，2-ジリノレノイル-s n-グリセロ-3-ホスホコリン（18:3（cis）PC）、1，2-ジアラキドノイル-s n-グリセロ-3-ホスホコリン（DAPC）、1，2-ジドコサヘキサエノイル-s n-グリセロ-3-ホスホコリン（22:6（cis）PC）1，2-ジフィタノイル-s n-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン（4ME 16.0 PE）、1，2-ジステアロイル-s n-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン（DSPE）、1，2-ジリノレオイル-s n-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン（PE（18:2/18:2））、1，2-ジリノレノイル-s n-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン（PE 18:3（9Z、12Z、15Z））、1，2-ジアラキドノイル-s n-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン（DAPE 18:3（9Z、12Z、15Z））、1，2-ジドコサヘキサエノイル-s n-グリセロ-3-ホスホエ

タノールアミン（22：6（cis）PE）、1，2-ジオレオイル-sn-グリセロール-3-ホスホ-rac-（1-グリセロール）ナトリウム塩（DOPG）、及びスフィンゴミエリンからなる非限定的な群から選択される。

【0452】

いくつかの実施形態では、ヘルパー脂質は、ジステアロイル-sn-グリセロール-3-ホスホエタノールアミン、ジステアロイルホスファチジルコリン（DSPC）、ジオレオイルホスファチジルコリン（DOPC）、ジパルミトイルホスファチジルコリン（DPPC）、ジオレオイルホスファチジルグリセロール（DOPG）、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール（DPPG）、ジオレオイル-ホスファチジルエタノールアミン（DOPE）、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン（POPC）、パルミトイルオレオイルホスファチジルエタノールアミン（POPE）、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン4-（N-マレイミドメチル）-シクロヘキサン-1-カルボキシレート（DOPE-mal）、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン（DPPE）、ジミリストイルホスホエタノールアミン（DMPE）、ジステアロイル-ホスファチジル-エタノールアミン（DSPE）、モノメチル-ホスファチジルエタノールアミン、ジメチルホスファチジルエタノールアミン、18-1-trans PE、L-ステアロイル-2-オレオイルホスファチジエタノールアミン（SOPE）、水素添加大豆ホスファチジルコリン（HSPC）、卵ホスファチジルコリン（EPC）、ジオレオイルホスファチジルセリン（DOPS）、スフィンゴミエリン（SM）、ジミリストイルホスファチジルコリン（DMP C）、ジミリストイルホスファチジルグリセロール（DMPG）、ジステアロイルホスファチジルグリセロール（DSPG）、ジェルコイルホスファチジルコリン（DEPC）、パルミトイルオレイオルホスファチジルグリセロール（POPG）、ジェライドイル-ホスファチジルエタノールアミン（DEPE）、レシチン、ホスファチジルエタノールアミン、リゾレシチン、リゾホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、スフィンゴミエリン、卵スフィンゴミエリン（ESM）、セファリン、カルジオリピン、ホスファチジン酸、セレブロシド、ジセチルホスフェート、リゾホスファチジルコリン、及びジリノレオイルホスファチジルコリンからなる群から選択される。

【0453】

いくつかの実施形態では、本開示のヘルパー脂質はDSPCである。

【0454】

いくつかの実施形態では、LNPはDSPCを含む。いくつかの実施形態では、LNPはDOPEを含む。いくつかの実施形態では、LNPはDMPEを含む。いくつかの実施形態では、LNPはDSPC及びDOPEの両方を含む。

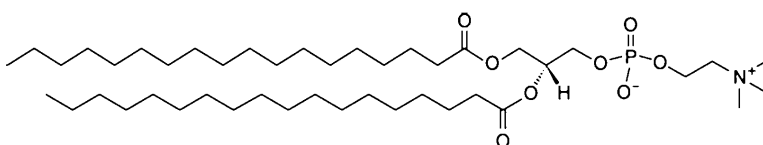
【0455】

いくつかの実施形態では、ヘルパー脂質は、DSPC、DMPE、及びDOPCまたはそれらの組み合わせからなる群から選択される。

【0456】

本開示のいくつかの実施形態では、ヘルパー脂質は、

【化54】



である。

【0457】

いくつかの実施形態では、本開示のリン脂質は、修飾型尾部を含む。いくつかの実施形態では、リン脂質は、修飾型尾部を含む、DSPC（1，2-ジオクタデカノイル-sn

ーグリセロール-3-ホスホコリン)、またはその類似体である。本明細書に記載される場合、「修飾型尾部」は、より短いもしくはより長い脂肪族鎖、分岐が導入された脂肪族鎖、置換基が導入された脂肪族鎖、1つ以上のメチレンが環式基もしくはヘテロ原子基で置き換えられた脂肪族鎖、またはそれらのいずれかの組み合わせを含む尾部であり得る。

【0458】

いくつかの実施形態では、本開示のヘルパー脂質は、リン脂質ではない代替的な脂質である。

【0459】

いくつかの実施形態では、本開示で有用なリン脂質は、修飾型尾部を含む。いくつかの実施形態では、本開示で有用なリン脂質は、修飾型尾部を含む、DSPC、またはその類似体である。本明細書に記載される場合、「修飾型尾部」は、より短いもしくはより長い脂肪族鎖、分岐が導入された脂肪族鎖、置換基が導入された脂肪族鎖、1つ以上のメチレンが環式基もしくはヘテロ原子基で置き換えられた脂肪族鎖、またはそれらのいずれかの組み合わせを含む尾部であり得る。

10

【0460】

いくつかの実施形態では、本開示で有用なリン脂質は、第四級アミンをホスホリル基に連結するアルキル鎖がエチレンではない(例えば、nが2ではない)、修飾型ホスホコリン部分を含む。

【0461】

いくつかの実施形態では、本開示のLNPは、オレイン酸またはオレイン酸類似体をヘルパー脂質として含む。いくつかの実施形態では、オレイン酸類似体は、修飾型オレイン酸尾部、修飾型カルボン酸部分、またはその両方を含む。いくつかの実施形態では、オレイン酸類似体は、オレイン酸のカルボン酸部分が異なる基で置き換えられた化合物である。

20

【0462】

いくつかの実施形態では、本開示のLNPは、ヘルパー脂質としてリン脂質の代わりに異なる双性イオン基を含む。

【0463】

いくつかの実施形態では、本開示のヘルパー脂質は、天然に存在する膜脂質である。いくつかの実施形態では、本開示のヘルパー脂質は、1,2-ジパルミトイル-s n-グリセロール-3-O-4'-(N,N,N-トリメチル)-ホモセリン(DGTS)、モノガラクトシルジアシルグリセロール(MGDG)、ジガラクトシルジアシルグリセロール(DGDG)、スルホキノボシルジアシルグリセロール(SQDG)、1-パルミトイル-2-cis-9,10-メチレンヘキサデカノイル-s n-グリセロール-3-ホスホコリン(シクロPC)、またはそれらの組み合わせである。いくつかの実施形態では、本開示のLNPは、ヘルパー脂質の組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、ヘルパー脂質の組み合わせは、DSPCを含まない。いくつかの実施形態では、ヘルパー脂質の組み合わせは、DSPCを含む。いくつかの実施形態では、1つ以上の天然に存在する膜脂質(例えば、DGTS)を含むLNPは、唯一のヘルパー脂質としてDSPCを含むLNPと比較して、LNP中にカプセル化された標的分子の肝臓トランスフェクション/送達が改善している。

30

40

【0464】

いくつかの実施形態では、本開示のヘルパー脂質は、5-ヘプタデシルレゾルシノールまたはその誘導体である。

【0465】

構造脂質

いくつかの実施形態では、本開示のLNPは、1つ以上の構造脂質を含む。脂質ナノ粒子への構造脂質の組み込みは、粒子中の他の脂質の凝集を軽減させるのに役立ち得る。構造脂質は、ステロール、またはステロール部分を含む脂質であり得るが、これらに限定されない。

50

【0466】

いくつかの実施形態では、LNPの構造脂質は、ステロール（例えば、植物ステロールまたは動物ステロール）である。いくつかの実施形態では、ステロールは、コレステロール、またはその類似体もしくは誘導体である。いくつかの実施形態では、ステロールは、コレステロールである。いくつかの実施形態では、ステロールは、単独または組み合わせの、コレステロール、 β -シトステロール、フェコステロール、エルゴステロール、シトステロール、カンペステロール、スチグマステロール、ブラシカステロール、エルゴステロール、トマチジン、トマチン、ウルソル酸、アルファートコフェロールであり、それらの類似体、塩、またはエステルを含む。

【0467】

いくつかの実施形態では、LNPの構造脂質は、コレステロール、コルチコステロイド（例えば、プレドニゾロン、デキサメタゾン、プレドニゾン、及びヒドロコルチゾンなど）、またはそれらの組み合わせである。

【0468】

いくつかの実施形態では、LNPの構造脂質は、植物ステロールである。いくつかの実施形態では、植物ステロールは、単独または組み合わせの、シトステロール、スチグマステロール、カンペステロール、シトスタノール、カンペスタノール、ブラシカステロール、フコステロール、ベータ-シトステロール、スチグマスタノール、ベータ-シトスタノール、エルゴステロール、ルペオール、シクロアルテノール、A5-アベナセロール、A7-アベナセロール、またはA7-スチグマステロールであり、それらの類似体、塩、またはエステルを含む。

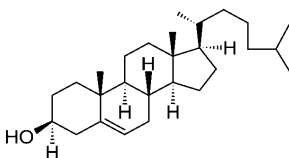
【0469】

いくつかの実施形態では、LNPは、1つ以上の植物ステロールを含む。いくつかの実施形態では、LNPの植物ステロール成分は、単一の植物ステロールである。いくつかの実施形態では、本開示のLNPの植物ステロール成分は、異なる植物ステロール（例えば、2、3、4、5または6つの異なる植物ステロール）の混合物である。いくつかの実施形態では、本開示のLNPの植物ステロール成分は、1つ以上の植物ステロールと1つ以上の動物ステロールとのブレンド、例えば植物ステロール（例えば、ベータ-シトステロールなどのシトステロール）とコレステロールとのブレンドである。

【0470】

本開示のいくつかの実施形態では、LNPの構造脂質は、コレステロールである。

【化55】



【0471】

いくつかの実施形態では、LNPは、カチオン性脂質及び1つ以上のヘルパー脂質を含み、カチオン性脂質はDOTAPである。いくつかの実施形態では、LNPは、カチオン性脂質及び1つ以上のヘルパー脂質を含み、カチオン性脂質はDLin-MC3-DMA（MC3）である。いくつかの実施形態では、LNPは、カチオン性脂質及び1つ以上のヘルパー脂質を含み、カチオン性脂質はCOATSOME（登録商標）SS-ECである。いくつかの実施形態では、LNPは、カチオン性脂質及び1つ以上のヘルパー脂質を含み、カチオン性脂質はCOATSOME（登録商標）SS-LCである。いくつかの実施形態では、LNPは、カチオン性脂質及び1つ以上のヘルパー脂質を含み、カチオン性脂質はCOATSOME（登録商標）SS-OCである。いくつかの実施形態では、LNPは、カチオン性脂質及び1つ以上のヘルパー脂質を含み、カチオン性脂質はCOATSOME（登録商標）SS-OPである。いくつかの実施形態では、LNPは、カチオン性脂

10

20

30

40

50

質及び1つ以上のヘルパー脂質を含み、カチオン性脂質はL-319である。いくつかの実施形態では、LNPは、構造脂質をさらに含む。いくつかの実施形態では、構造脂質はコレステロールである。

【0472】

いくつかの実施形態では、LNPは、カチオン性脂質及び1つ以上のヘルパー脂質を含む。いくつかの実施形態では、LNPは、カチオン性脂質及び1つ以上のヘルパー脂質を含み、1つ以上のヘルパー脂質はDLPEを含む。いくつかの実施形態では、LNPは、カチオン性脂質及び1つ以上のヘルパー脂質を含み、1つ以上のヘルパー脂質はDSPCを含む。いくつかの実施形態では、LNPは、カチオン性脂質及び1つ以上のヘルパー脂質を含み、1つ以上のヘルパー脂質はDOPEを含む。いくつかの実施形態では、LNPは、カチオン性脂質及び1つ以上のヘルパー脂質を含み、1つ以上のヘルパー脂質はDOPCを含む。いくつかの実施形態では、LNPは、構造脂質をさらに含む。いくつかの実施形態では、構造脂質はコレステロールである。

10

【0473】

いくつかの実施形態では、LNPは、カチオン性脂質、ヘルパー脂質、及び構造脂質を含む。いくつかの実施形態では、構造脂質はコレステロールである。いくつかの実施形態では、カチオン性脂質はDOTAPであり、ヘルパー脂質はDLPEである。いくつかの実施形態では、カチオン性脂質はMC3であり、ヘルパー脂質はDSPCである。いくつかの実施形態では、ヘルパー脂質は、DOPEである。いくつかの実施形態では、ヘルパー脂質は、DSPCである。いくつかの実施形態では、LNPは、カチオン性脂質、構造脂質、及び少なくとも2つのヘルパー脂質を含み、カチオン性脂質はDOTAPであり、少なくとも2つのヘルパー脂質は、DLPE及びDSPEを含む。いくつかの実施形態では、LNPは、カチオン性脂質、構造脂質、及び少なくとも2つのヘルパー脂質を含み、カチオン性脂質はMC3であり、少なくとも2つのヘルパー脂質は、DSPC及びDMGを含む。いくつかの実施形態では、少なくとも2つのヘルパー脂質は、DOPE及びDSPEを含む。いくつかの実施形態では、少なくとも2つのヘルパー脂質は、DSPC、及びDMGを含む。いくつかの実施形態では、構造脂質はコレステロールである。いくつかの実施形態では、LNPは、DOTAP、コレステロール、及びDLPEを含む。いくつかの実施形態では、LNPは、MC3、コレステロール、及びDSPCを含む。いくつかの実施形態では、LNPは、DOTAP、コレステロール、及びDOPEを含む。いくつかの実施形態では、LNPは、DOTAP、コレステロール、DLPE、及びDSPEを含む。いくつかの実施形態では、LNPは、MC3、コレステロール、DSPC、及びDMGを含む。いくつかの実施形態では、LNPは、DOTAP、コレステロール、DLPE、及びDSPE-PEGを含む。いくつかの実施形態では、LNPは、MC3、コレステロール、DSPC、及びDMG-PEGを含む。いくつかの実施形態では、LNPは、DOTAP、コレステロール、DOPE、及びDSPEを含む。いくつかの実施形態では、LNPは、DOTAP、コレステロール、DOPE、及びDSPE-PEGを含む。いくつかの実施形態では、LNPは、SS-OC、DSPC、コレステロール、及びDPG-PEG（例えば、DPG-PEG 2K）を含む。いくつかの実施形態では、LNPは、SS-OC、DSPC、コレステロール、及び式(I)のPEG脂質（例えば、BRJ（商標）S100）を含む。

20

30

40

【0474】

LNP組成物中の脂質モル比

いくつかの実施形態では、本開示のLNPは、40mol%~70mol%のカチオン性脂質、最大50mol%のヘルパー脂質、10mol%~50mol%の構造脂質、及び0.001mol%~5mol%のPEG脂質を含む（すべての端点を含む）。いくつかの実施形態では、カチオン性脂質、ヘルパー脂質、構造脂質、及びPEG脂質の総mol%は100%である。

【0475】

いくつかの実施形態では、LNP中のカチオン性脂質のmol%は、40~70mol%

50

%、40～55mol%、40～50mol%、40～45mol%、44～54mol%、45～60mol%、45～55mol%、45～50mol%、50～60mol%、49～64mol%、50～55mol%、または55～60mol%である。いくつかの実施形態では、LNP中のカチオン性脂質のmol%は、44～54mol%である。いくつかの実施形態では、LNP中のカチオン性脂質のmol%は、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、または60mol%である。いくつかの実施形態では、LNP中のカチオン性脂質のmol%は、約40、約41、約42、約43、約44、約45、約46、約47、約48、約49、約50、約51、約52、約53、約54、約55、約56、約57、約58、約59、または約60mol%である。すべての値は、すべての端点を含む。

10

【0476】

いくつかの実施形態では、LNP中の構造脂質のmol%は、10～60mol%、10～30mol%、15～35mol%、20～40mol%、20～45mol%、25～33mol%、24～32mol%、25～45mol%、30～50mol%、35～43mol%、35～55mol%、または40～60mol%である。いくつかの実施形態では、LNP中の構造脂質のmol%は、20～45mol%である。いくつかの実施形態では、LNP中の構造脂質のmol%は、24～32mol%である。いくつかの実施形態では、LNP中の構造脂質のmol%は、25～33mol%である。いくつかの実施形態では、LNP中の構造脂質のmol%は、22～28mol%である。いくつかの実施形態では、LNP中の構造脂質のmol%は、35～45mol%である。いくつかの実施形態では、LNP中の構造脂質のmol%は、35～43mol%である。いくつかの実施形態では、LNP中の構造脂質のmol%は、10～60mol%である。いくつかの実施形態では、LNP中の構造脂質のmol%は、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、または60mol%である。いくつかの実施形態では、LNP中の構造脂質のmol%は、約10、約11、約12、約13、約14、約15、約16、約17、約18、約19、約20、約21、約22、約23、約24、約25、約26、約27、約28、約29、約30、約31、約32、約33、約34、約35、約36、約37、約38、約39、約40、約41、約42、約43、約44、約45、約46、約47、約48、約49、約50、約51、約52、約53、約54、約55、約56、約57、約58、約59、または約60mol%である。いくつかの実施形態では、構造脂質はコレステロールである。すべての値は、すべての端点を含む。

20

30

【0477】

いくつかの実施形態では、LNP中のヘルパー脂質のmol%は、1～50mol%である。いくつかの実施形態では、LNP中のヘルパー脂質のmol%は、最大29mol%である。いくつかの実施形態では、LNP中のヘルパー脂質のmol%は、1～10mol%、5～9mol%、5～15mol%、8～14mol%、18～22%、19～25mol%、10～20mol%、10～25mol%、15～25mol%、20～30mol%、25～35mol%、30～40mol%、または35～50mol%である。いくつかの実施形態では、LNP中のヘルパー脂質のmol%は、10～25mol%である。いくつかの実施形態では、LNP中のヘルパー脂質のmol%は、5～9mol%である。いくつかの実施形態では、LNP中のヘルパー脂質のmol%は、8～14mol%である。いくつかの実施形態では、LNP中のヘルパー脂質のmol%は、18～22mol%である。いくつかの実施形態では、LNP中のヘルパー脂質のmol%は、19～25mol%である。いくつかの実施形態では、LNP中のヘルパー脂質のmol%は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、

40

50

29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、または40mol%である。いくつかの実施形態では、LNP中のヘルパー脂質のmol%は、約1、約2、約3、約4、約5、約6、約7、約8、約9、約10、約11、約12、約13、約14、約15、約16、約17、約18、約19、約20、約21、約22、約23、約24、約25、約26、約27、約28、約29、約30、約31、約32、約33、約34、約35、約36、約37、約38、約39、または約40mol%である。いくつかの実施形態では、ヘルパー脂質は、DSPCである。すべての値は、すべての端点を含む。

【0478】

いくつかの実施形態では、LNP中のPEG脂質のmol%は、LNP中に存在する総脂質の0mol%超かつ最大5mol%である。いくつかの実施形態では、PEG脂質のmol%は、LNP中に存在する総脂質の0.1mol%、0.2mol%、0.25mol%、0.3mol%、0.4mol%、0.5mol%、0.6mol%、0.7mol%、0.8mol%、0.9mol%、1.0mol%、1.1mol%、1.2mol%、1.3mol%、1.4mol%、1.5mol%、1.6mol%、1.7mol%、1.8mol%、1.9mol%、2.0mol%、2.1mol%、2.2mol%、2.3mol%、2.4mol%、2.5mol%、2.6mol%、2.7mol%、2.8mol%、2.9mol%、3.0mol%、3.1mol%、3.2mol%、3.3mol%、3.4mol%、3.5mol%、4.0mol%、4.5mol%、または5mol%である。いくつかの実施形態では、PEG脂質のmol%は、LNP中に存在する総脂質の約0.1mol%、約0.2mol%、約0.25mol%、約0.3mol%、約0.4mol%、約0.5mol%、約0.6mol%、約0.7mol%、約0.8mol%、約0.9mol%、約1.0mol%、約1.1mol%、約1.2mol%、約1.3mol%、約1.4mol%、約1.5mol%、約1.6mol%、約1.7mol%、約1.8mol%、約1.9mol%、約2.0mol%、約2.1mol%、約2.2mol%、約2.3mol%、約2.4mol%、約2.5mol%、約2.6mol%、約2.7mol%、約2.8mol%、約2.9mol%、約3.0mol%、約3.1mol%、約3.2mol%、約3.3mol%、約3.4mol%、約3.5mol%、約4.0mol%、約4.5mol%、または約5mol%である。いくつかの実施形態では、PEG脂質のmol%は、LNP中に存在する総脂質の少なくとも0.1mol%、少なくとも0.2mol%、少なくとも0.25mol%、少なくとも0.3mol%、少なくとも0.4mol%、少なくとも0.5mol%、少なくとも0.6mol%、少なくとも0.7mol%、少なくとも0.8mol%、少なくとも0.9mol%、少なくとも1.0mol%、少なくとも1.1mol%、少なくとも1.2mol%、少なくとも1.3mol%、少なくとも1.4mol%、少なくとも1.5mol%、少なくとも1.6mol%、少なくとも1.7mol%、少なくとも1.8mol%、少なくとも1.9mol%、少なくとも2.0mol%、少なくとも2.1mol%、少なくとも2.2mol%、少なくとも2.3mol%、少なくとも2.4mol%、少なくとも2.5mol%、少なくとも2.6mol%、少なくとも2.7mol%、少なくとも2.8mol%、少なくとも2.9mol%、少なくとも3.0mol%、少なくとも3.1mol%、少なくとも3.2mol%、少なくとも3.3mol%、少なくとも3.4mol%、少なくとも3.5mol%、少なくとも4.0mol%、少なくとも4.5mol%、または少なくとも5mol%である。いくつかの実施形態では、PEG脂質のmol%は、LNP中に存在する総脂質の最大0.1mol%、最大0.2mol%、最大0.25mol%、最大0.3mol%、最大0.4mol%、最大0.5mol%、最大0.6mol%、最大0.7mol%、最大0.8mol%、最大0.9mol%、最大1.0mol%、最大1.1mol%、最大1.2mol%、最大1.3mol%、最大1.4mol%、最大1.5mol%、最大1.6mol%、最大1.7mol%、最大1.8mol%、最大1.9mol%、最大2.0mol%、最大2.1mol%、最大2.2mol%、最大2.3mol%、最大2.4mol%、最大2.5mol%、最大2.6mol%、最大2.7mol%、最大2.8mol%、最大2.9mol%、最大3.0mol%、最大3.1mol%、最大3.2mol%、最大3.3mol%、最大3.4mol%、最大3.5mol%、最大4.0mol%、最大4.5mol%、または最大5mol%である。

10

20

30

40

50

4 mol %、最大 2.5 mol %、最大 2.6 mol %、最大 2.7 mol %、最大 2.8 mol %、最大 2.9 mol %、最大 3.0 mol %、最大 3.1 mol %、最大 3.2 mol %、最大 3.3 mol %、最大 3.4 mol %、最大 3.5 mol %、最大 4.0 mol %、最大 4.5 mol %、または最大 5 mol % である。いくつかの実施形態では、PEG 脂質の mol % は、LNP 中に存在する総脂質の 0.1 ~ 4 mol % である。いくつかの実施形態では、PEG 脂質の mol % は、LNP 中に存在する総脂質の 0.1 ~ 2 mol % である。いくつかの実施形態では、PEG 脂質の mol % は、LNP 中に存在する総脂質の 0.2 ~ 0.8 mol %、0.4 ~ 0.6 mol %、0.7 ~ 1.3 mol %、1.2 ~ 1.8 mol %、または 1 ~ 3.5 mol % である。いくつかの実施形態では、PEG 脂質の mol % は、LNP 中に存在する総脂質の 0.1 ~ 0.7 mol %、0.2 ~ 0.8 mol %、0.3 ~ 0.9 mol %、0.4 ~ 0.8 mol %、0.4 ~ 0.6 mol %、0.4 ~ 1 mol %、0.5 ~ 1.1 mol %、0.6 ~ 1.2 mol %、0.7 ~ 1.3 mol %、0.8 ~ 1.4 mol %、0.9 ~ 1.5 mol %、1 ~ 3.5 mol %、1 ~ 1.6 mol %、1.1 ~ 1.7 mol %、1.2 ~ 1.8 mol %、1.3 ~ 1.9 mol %、1.4 ~ 2 mol %、1.5 ~ 2.1 mol %、1.6 ~ 2.2 mol %、1.7 ~ 2.3 mol %、1.8 ~ 2.4 mol %、1.9 ~ 2.5 mol %、2 ~ 2.6 mol %、2.4 ~ 3.8 mol %、または 2.6 ~ 3.4 mol % である。すべての値は、すべての端点を含む。

10

【0479】

いくつかの実施形態では、本開示の LNP は、44 ~ 60 mol % のカチオン性脂質、19 ~ 25 mol % のヘルパー脂質、25 ~ 33 mol % の構造脂質、及び 0.2 ~ 0.8 mol % の PEG 脂質を含む（端点を含む）。いくつかの実施形態では、本開示の LNP は、44 ~ 54 mol % のカチオン性脂質、19 ~ 25 mol % のヘルパー脂質、24 ~ 32 mol % の構造脂質、及び 1.2 ~ 1.8 mol % の PEG 脂質を含む（端点を含む）。いくつかの実施形態では、本開示の LNP は、44 ~ 54 mol % のカチオン性脂質、8 ~ 14 mol % のヘルパー脂質、35 ~ 43 mol % の構造脂質、及び 1.2 ~ 1.8 mol % の PEG 脂質を含む（端点を含む）。いくつかの実施形態では、本開示の LNP は、45 ~ 55 mol % のカチオン性脂質、5 ~ 9 mol % のヘルパー脂質、36 ~ 44 mol % の構造脂質、及び 2.5 ~ 3.5 mol % の PEG 脂質を含む（端点を含む）。

20

30

【0480】

いくつかの実施形態では、本開示の LNP は、以下の表 6 による LNP 中の総脂質の mol %（または総脂質の mol % 範囲）で、1 つ以上の本開示のカチオン性脂質、1 つ以上の本開示のヘルパー脂質、1 つ以上の本開示の構造脂質、及び 1 つ以上の本開示の PEG 脂質を含む。いくつかの実施形態では、これら 4 つの脂質成分の総 mol % は 100 % に等しい。いくつかの実施形態では、これら 4 つの脂質成分の総 mol % は 100 % 未満である。いくつかの実施形態では、カチオン性脂質は、式 (I) の化合物または表 21 から選択される化合物である。いくつかの実施形態では、構造脂質はコレステロールである。いくつかの実施形態では、ヘルパー脂質は、DSPC である。いくつかの実施形態では、PEG 脂質は、式 (A)、式 (A')、または式 (A'') のものである。

40

【表 6】

表 6：LNP中の脂質成分のMol%

カチオン性脂質 (mol%)	構造脂質(mol%)	ヘルパー脂質 (mol%)	PEG 脂質 (mol%)
49	28.5	22	0.5
47～52	27～30	21～23	0.4～0.6
44～54	25～32	19～25	0.2～0.8
44～54	25～33	19～25	0.2～0.8
49	27.5	22	1.5
47～52	26～29	21～23	1.3～1.7
44～54	24～31	19～25	1.1～1.9
44～54	24～32	19～25	1.2～1.8
49	39.5	11	0.5
47～52	38～41	11～13	0.4～0.6
44～54	36～43	9～15	0.2～0.8
49	38.5	11	1.5
47～52	37～40	11～13	1.3～1.7
44～54	35～42	9～15	1.1～1.9
44～54	35～43	8～14	1.2～1.8
20～60	10～60	≧20	0.5
20～60	10～60	≧20	0.3～0.7
20～60	10～60	≧20	0.1～0.9
20～60	10～60	10	1.5
20～60	10～60	8～12	1.3～1.7
20～60	10～60	6～14	1.1～1.9
50	40	7	3
45～55	35～45	5～9	2.5～3.5
54.5	25	20	0.5
50～60	22～28	18～22	0.3～0.7
54.6	25.1	20.1	0.25
44.5	50	5	0.5
40	50	8.75	1.25
60	25	14.5	0.5
60	34.3	5	0.7
50	42.5	7	0.5
58	33.5	7	1.5
58	34.5	7	0.5
35～65	25～55	5～25	0.3～3
49	28.5	22	0.5
40	39.5	20	0.5
40	50	8.75	1.25
60	34.3	5	0.7
54.6	25.1	20.1	0.25
50.1	42.6	7	0.24

【0481】

いくつかの実施形態では、本開示のLNPは、44～54mol%のカチオン性脂質、19～25mol%のヘルパー脂質、25～33mol%の構造脂質、及び0.2～0.8mol%のPEG脂質を含む（端点を含む）。いくつかの実施形態では、本開示のLNPは、44～54mol%の式（II-1a）の化合物、19～25mol%のDSPC、25～33mol%のコレステロール、ならびにHO-PEG100-CH₂(CH₂)₁₆CH₃、HO-PEG20-CH₂(CH₂)₁₆CH₃、HO-PEG20-CH₂(CH₂)₁₄CH₃、HO-PEG20-C₁₈H₃₅、HO-PEG100-C(O)-CH₂(CH₂)₁₃CH₃、HO-PEG50-C(O)-CH₂(CH₂)₁₃C

H_3 、 $\text{HO}-\text{PEG}40-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_3$ 、 $\text{HO}-\text{PEG}100-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{15}\text{CH}_3$ 、 $\text{HO}-\text{PEG}50-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{15}\text{CH}_3$ 、及び $\text{HO}-\text{PEG}40-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{15}\text{CH}_3$ から選択される0.2~0.8mol%のPEG脂質を含む(端点を含む)。

【0482】

いくつかの実施形態では、本開示のLNPは、44~54mol%のカチオン性脂質、19~25mol%のヘルパー脂質、24~32mol%の構造脂質、及び1.2~1.8mol%のPEG脂質を含む(端点を含む)。いくつかの実施形態では、本開示のLNPは、44~54mol%の式(II-1a)の化合物、19~25mol%のDSPC、24~32mol%のコレステロール、ならびに $\text{HO}-\text{PEG}100-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{16}\text{CH}_3$ 、 $\text{HO}-\text{PEG}20-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{16}\text{CH}_3$ 、 $\text{HO}-\text{PEG}20-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_3$ 、 $\text{HO}-\text{PEG}20-\text{C}_{18}\text{H}_{35}$ 、 $\text{HO}-\text{PEG}100-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_3$ 、 $\text{HO}-\text{PEG}50-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_3$ 、 $\text{HO}-\text{PEG}40-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_3$ 、 $\text{HO}-\text{PEG}100-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{15}\text{CH}_3$ 、 $\text{HO}-\text{PEG}50-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{15}\text{CH}_3$ 、及び $\text{HO}-\text{PEG}40-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{15}\text{CH}_3$ から選択される1.2~1.8mol%のPEG脂質を含む(端点を含む)。

【0483】

いくつかの実施形態では、本開示のLNPは、44~54mol%のカチオン性脂質、8~14mol%のヘルパー脂質、35~43mol%の構造脂質、及び1.2~1.8mol%のPEG脂質を含む(端点を含む)。いくつかの実施形態では、本開示のLNPは、44~54mol%の式(II-1a)の化合物、8~14mol%のDSPC、35~43mol%のコレステロール、ならびに $\text{HO}-\text{PEG}100-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{16}\text{CH}_3$ 、 $\text{HO}-\text{PEG}20-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{16}\text{CH}_3$ 、 $\text{HO}-\text{PEG}20-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_3$ 、 $\text{HO}-\text{PEG}20-\text{C}_{18}\text{H}_{35}$ 、 $\text{HO}-\text{PEG}100-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_3$ 、 $\text{HO}-\text{PEG}50-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_3$ 、 $\text{HO}-\text{PEG}40-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_3$ 、 $\text{HO}-\text{PEG}100-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{15}\text{CH}_3$ 、 $\text{HO}-\text{PEG}50-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{15}\text{CH}_3$ 、及び $\text{HO}-\text{PEG}40-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{15}\text{CH}_3$ から選択される1.2~1.8mol%のPEG脂質を含む(端点を含む)。

【0484】

いくつかの実施形態では、LNPは、SS-OC、DSPC、コレステロール(Chol)、及びPEG脂質を含み、SS-OC: DSPC: Chol: PEG脂質の比率(総脂質含有量に占めるパーセンテージとして)は約A: B: C: Dであり、 $A=40\text{mol}\% \sim 60\text{mol}\%$ 、 $B=10\text{mol}\% \sim 25\text{mol}\%$ 、 $C=20\text{mol}\% \sim 30\text{mol}\%$ 、及び $D=0\text{mol}\% \sim 3\text{mol}\%$ であり、 $A+B+C+D=100\text{mol}\%$ である。いくつかの実施形態では、LNPは、SS-OC、DSPC、コレステロール(Chol)、及びPEG脂質を含み、SS-OC: DSPC: Chol: PEG脂質の比率(総脂質含有量に占めるパーセンテージとして)は約A: B: C: Dであり、 $A=45\text{mol}\% \sim 50\text{mol}\%$ 、 $B=20\text{mol}\% \sim 25\text{mol}\%$ 、 $C=25\text{mol}\% \sim 30\text{mol}\%$ 、及び $D=0\text{mol}\% \sim 1\text{mol}\%$ であり、 $A+B+C+D=100\text{mol}\%$ である。いくつかの実施形態では、LNPは、SS-OC、DSPC、コレステロール(Chol)、及びPEG脂質を含み、SS-OC: DSPC: Chol: PEG脂質の比率(総脂質含有量に占めるパーセンテージとして)は、約49: 22: 28.5: 0.5である。いくつかの実施形態では、PEG脂質は、式(A)、式(A')、または式(A'')の化合物である。いくつかの実施形態では、PEG脂質は、BRIJ(商標)S100、BRIJ(商標)S20、BRIJ(商標)O20、及びBRIJ(商標)C20からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、PEG脂質はBRIJ(商標)S100である。

【0485】

いくつかの実施形態では、LNPは、DOTAP、コレステロール(Chol)、及び

DLPEを含み、DOTAP:Chol:DLPEの比率（総脂質含有量に占めるパーセンテージとして）は、約50:35:15である。いくつかの実施形態では、LNPは、DOTAP、コレステロール（Chol）、及びDLPEを含み、DOTAP:Chol:DOPEの比率（総脂質含有量に占めるパーセンテージとして）は、約50:35:15である。いくつかの実施形態では、LNPは、DOTAP、コレステロール（Chol）、DLPE、DSPE-PEGを含み、DOTP:Chol:DLPEの比率（総脂質含有量に占めるパーセンテージとして）は、約50:35:15であり、粒子は、約0.2mol%のDSPE-PEGを含む。いくつかの実施形態では、LNPは、MC3、コレステロール（Chol）、DSPC、及びDMG-PEGを含み、MC3:Chol:DSPC:DMG-PEGの比率（総脂質含有量に占めるパーセンテージとして）は、約49:38.5:11:1.5である。

10

【0486】

いくつかの実施形態では、LNPは、SS-OC、DSPC、コレステロール（Chol）、及びDPG-PEG2Kを含み、SS-OC:DSPC:Chol:DPG-PEG2Kの比率（総脂質含有量に占めるパーセンテージとして）は約A:B:C:Dであり、A=40mol%~60mol%、B=10mol%~25mol%、C=20mol%~30mol%、及びD=0mol%~3mol%であり、A+B+C+D=100mol%である。いくつかの実施形態では、LNPは、SS-OC、DSPC、コレステロール（Chol）、及びDPG-PEG2Kを含み、SS-OC:DSPC:Chol:DPG-PEG2Kの比率（総脂質含有量に占めるパーセンテージとして）は約A:B:C:Dであり、A=45mol%~50mol%、B=20mol%~25mol%、C=25mol%~30mol%、及びD=0mol%~1mol%であり、A+B+C+D=100mol%である。いくつかの実施形態では、LNPは、SS-OC、DSPC、コレステロール（Chol）、及びDPG-PEG2Kを含み、SS-OC:DSPC:Chol:DPG-PEG2Kの比率（総脂質含有量に占めるパーセンテージとして）は、約49:22:28.5:0.5である。

20

【0487】

いくつかの実施形態では、LNPは、SS-OC、DSPC、コレステロール（Chol）、及びDPG-PEG2Kを含み、SS-OC:DSPC:Chol:DPG-PEG2Kの比率（総脂質含有量に占めるパーセンテージとして）は約A:B:C:Dであり、A=40mol%~60mol%、B=10mol%~30mol%、C=20mol%~45mol%、及びD=0mol%~3mol%であり、A+B+C+D=100mol%である。いくつかの実施形態では、LNPは、SS-OC、DSPC、コレステロール（Chol）、及びDPG-PEG2Kを含み、SS-OC:DSPC:Chol:DPG-PEG2Kの比率（総脂質含有量に占めるパーセンテージとして）は約A:B:C:Dであり、A=40mol%~60mol%、B=10mol%~30mol%、C=25mol%~45mol%、及びD=0mol%~3mol%であり、A+B+C+D=100mol%である。いくつかの実施形態では、LNPは、SS-OC、DSPC、コレステロール（Chol）、及びDPG-PEG2Kを含み、SS-OC:DSPC:Chol:DPG-PEG2Kの比率（総脂質含有量に占めるパーセンテージとして）は約A:B:C:Dであり、A=45mol%~55mol%、B=10mol%~20mol%、C=30mol%~40mol%、及びD=1mol%~2mol%であり、A+B+C+D=100mol%である。いくつかの実施形態では、LNPは、SS-OC、DSPC、コレステロール（Chol）、及びDPG-PEG2Kを含み、SS-OC:DSPC:Chol:DPG-PEG2Kの比率（総脂質含有量に占めるパーセンテージとして）は約A:B:C:Dであり、A=45mol%~50mol%、B=10mol%~15mol%、C=35mol%~40mol%、及びD=1mol%~2mol%であり、A+B+C+D=100mol%である。いくつかの実施形態では、LNPは、SS-OC、DSPC、コレステロール（Chol）、及びDPG-PEG2Kを含み、SS-OC:DSPC:Chol:DPG-PEG2Kの比率（総脂質含有量に占め

30

40

50

るパーセンテージとして)は、49:11:38.5:1.5である。

【0488】

いくつかの実施形態では、LNPは、SS-OC、DSPC、コレステロール(Chol)、及びDPG-PEG2Kを含み、SS-OC: DSPC: Chol: DPG-PEG2Kの比率(総脂質含有量に占めるパーセンテージとして)は約A: B: C: Dであり、A=45mol%~65mol%、B=5mol%~20mol%、C=20mol%~45mol%、及びD=0mol%~3mol%であり、A+B+C+D=100mol%である。いくつかの実施形態では、LNPは、SS-OC、DSPC、コレステロール(Chol)、及びDPG-PEG2Kを含み、SS-OC: DSPC: Chol: DPG-PEG2Kの比率(総脂質含有量に占めるパーセンテージとして)は約A: B: C: Dであり、A=50mol%~60mol%、B=5mol%~15mol%、C=30mol%~45mol%、及びD=0mol%~3mol%であり、A+B+C+D=100mol%である。いくつかの実施形態では、LNPは、SS-OC、DSPC、コレステロール(Chol)、及びDPG-PEG2Kを含み、SS-OC: DSPC: Chol: DPG-PEG2Kの比率(総脂質含有量に占めるパーセンテージとして)は約A: B: C: Dであり、A=55mol%~60mol%、B=5mol%~15mol%、C=30mol%~40mol%、及びD=1mol%~2mol%であり、A+B+C+D=100mol%である。いくつかの実施形態では、LNPは、SS-OC、DSPC、コレステロール(Chol)、及びDPG-PEG2Kを含み、SS-OC: DSPC: Chol: DPG-PEG2Kの比率(総脂質含有量に占めるパーセンテージとして)は約A: B: C: Dであり、A=55mol%~60mol%、B=5mol%~10mol%、C=30mol%~35mol%、及びD=1mol%~2mol%であり、A+B+C+D=100mol%である。いくつかの実施形態では、LNPは、SS-OC、DSPC、コレステロール(Chol)、及びDPG-PEG2Kを含み、SS-OC: DSPC: Chol: DPG-PEG2Kの比率(総脂質含有量に占めるパーセンテージとして)は、58:7:33.5:1.5である。

10

20

【0489】

いくつかの実施形態では、ナノ粒子は、標的細胞によるナノ粒子の取り込みを調節または促進するために、グリコサミノグリカン(GAG)でコーティングされる。GAGは、ヘパリン/ヘパリン硫酸、コンドロイチン硫酸/デルマタン硫酸、ケラチン硫酸、またはヒアルロン酸(HA)であり得る。特定の実施形態では、ナノ粒子の表面は、HAでコーティングされ、腫瘍細胞による取り込みのための粒子を標的とする。いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子は、アルギニン-グリシン-アスパラギン酸トリペプチド(RGDペプチド)でコーティングされる(Ruoslahti, Advanced Materials, 24, 2012, 3747-3756、及びBellis et al., Biomaterials, 32(18), 2011, 4205-4210を参照されたい)。

30

【0490】

LNP組成物の特性

本開示は、本明細書に記載される複数のLNPを含む組成物(例えば、医薬組成物)を提供する。本明細書では、本明細書に記載されるLNP及びカプセル化分子を含む組成物も提供される。

40

【0491】

いくつかの実施形態では、本開示のLNPは、対照LNPと比較してin vivoの免疫応答を低減させ得る。いくつかの実施形態では、対照LNPは、式(A)、式(A')、または式(A'')のものではないPEG脂質を含むLNPである。いくつかの実施形態では、対照LNPのPEG脂質はPEG2k-DPGである。いくつかの実施形態では、対照LNPのPEG脂質はPEG2k-DMGである。いくつかの実施形態では、対照LNPは、本開示のLNPと同じPEG脂質のモル比を有する。いくつかの実施形態では、対照LNPが式(A)、式(A')、または式(A'')のものではないPEG脂質を含む

50

ことを除いては、対照 L N P は本開示の L N P と同一である（例えば、対照 L N P は、P E G 2 k - D P G または P E G 2 k - D M G を P E G 脂質として含み得る）。

【0492】

いくつかの実施形態では、対照 L N P は、式（I）のものではないカチオン性脂質を含む L N P である。いくつかの実施形態では、対照 L N P のカチオン性脂質は S S - O C である。いくつかの実施形態では、対照 L N P は、本開示の L N P と同じカチオン性脂質のモル比を有する。いくつかの実施形態では、対照 L N P が式（I）のものではないカチオン性脂質を含むことを除いては、対照 L N P は本開示の L N P と同一である（例えば、対照 L N P は S S - O C をカチオン性脂質として含み得る）。

【0493】

いくつかの実施形態では、免疫応答の低減は、加速血液クリアランス（A B C）における低減であり得る。いくつかの実施形態では、A B C は、天然 I g M 及び／または抗 P E G I g M の分泌に関連する。本明細書で使用される「天然 I g M」という用語は、既知の免疫曝露（例えば本開示の L N P への曝露）と無関係に存在する血清中の循環 I g M を指す。「A B C の低減」という用語は、対照 L N P と比較した、A B C におけるあらゆる低減を指す。いくつかの実施形態では、A B C における低減は、第2または後続の投薬時の、対照 L N P に比した L N P のクリアランスの低減であり得る。いくつかの実施形態では、低減は、少なくとも 10 %、15 %、20 %、25 %、30 %、35 %、40 %、45 %、50 %、55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、98 %、または 100 % であり得る。いくつかの実施形態では、低減は、約 10 % ~ 約 100 %、約 10 ~ 約 50 %、約 20 ~ 約 100 %、約 20 ~ 約 50 %、約 30 ~ 約 100 %、約 30 ~ 約 50 %、約 40 % ~ 約 100 %、約 40 ~ 約 80 %、約 50 ~ 約 90 %、または約 50 ~ 約 100 % である。いくつかの実施形態では、A B C における低減は、第2または後続の投与後のカプセル化合成 R N A ウイルスゲノムの増加、またはその持続的で検出可能なレベルによって測定され得る。いくつかの実施形態では、A B C における低減は、対照 L N P の投与後のカプセル化合成 R N A ウイルスゲノムのレベルに比したカプセル化合成 R N A ウイルスゲノムのレベルの上昇（例えば、2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、またはそれ以上の倍率の上昇）をもたらし得る。いくつかの実施形態では、低減した A B C は、抗 P E G I g M のより低い血清レベルに関連する。

【0494】

いくつかの実施形態では、本開示の L N P は、カプセル化分子の放出前に排除され得る対照 L N P と比較して、繰り返し投薬の際の L N P 及びその成分のクリアランスを遅延させ得る。したがって、本開示の L N P は、後続用量中のカプセル化分子（例えば、合成 R N A ウイルスゲノム）の送達効率を増加させ得る。

【0495】

いくつかの実施形態では、L N P は、約 50 nm ~ 約 500 nm の平均サイズ（すなわち、平均外径）を有する。いくつかの実施形態では、L N P は、約 50 nm ~ 約 200 nm、約 100 nm ~ 約 200 nm、約 150 nm ~ 約 200 nm、約 50 nm ~ 約 100 nm、約 50 nm ~ 約 150 nm、約 100 nm ~ 約 150 nm、約 200 nm ~ 約 250 nm、約 250 nm ~ 約 300 nm、約 300 nm ~ 約 400 nm、約 150 nm ~ 約 500 nm、約 200 nm ~ 約 500 nm、約 300 nm ~ 約 500 nm、約 350 nm ~ 約 500 nm、約 400 nm ~ 約 500 nm、約 425 nm ~ 約 500 nm、約 450 nm ~ 約 500 nm、または約 475 nm ~ 約 500 nm の平均サイズを有する。いくつかの実施形態では、L N P は、約 50 nm、60 nm、70 nm、80 nm、90 nm、100 nm、110 nm、約 120、または約 125 nm の平均サイズを有する。いくつかの実施形態では、L N P は、約 100 nm の平均サイズを有する。いくつかの実施形態では、L N P は、50 nm ~ 150 nm の平均サイズを有する。いくつかの実施形態では、L N P は、50 nm ~ 150 nm、50 nm ~ 125 nm、50 nm ~ 100 nm、50 nm ~ 75 nm、75 nm ~ 150 nm、75 nm ~ 125 nm、75 nm ~ 100 nm、100 nm ~ 150 nm、100 nm ~ 125 nm、または 125 nm ~ 150 nm

の平均サイズ（平均外径）を有する。いくつかの実施形態では、LNPは、70nm～90nm、80nm～100nm、90nm～110nm、100nm～120nm、110nm～130nm、120nm～140nm、または130nm～150nmの平均サイズを有する。いくつかの実施形態では、LNPは、90nm～110nmの平均サイズを有する。すべての値は端点を含む。

【0496】

いくつかの実施形態では、LNPは、約50nm～約150nmの平均サイズ（すなわち、平均外径）を有する。いくつかの実施形態では、本開示は、複数の脂質ナノ粒子を含む治療用組成物であって、複数のLNPが約60nm～約130nmの平均サイズを有する、治療用組成物を提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、複数の脂質ナノ粒子を含む治療用組成物であって、複数のLNPが約70nm～約120nmの平均サイズを有する、治療用組成物を提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、複数の脂質ナノ粒子を含む治療用組成物であって、複数のLNPが約70nmの平均サイズを有する、治療用組成物を提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、複数の脂質ナノ粒子を含む治療用組成物であって、複数のLNPが約80nmの平均サイズを有する、治療用組成物を提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、複数の脂質ナノ粒子を含む治療用組成物であって、複数のLNPが約90nmの平均サイズを有する、治療用組成物を提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、複数の脂質ナノ粒子を含む治療用組成物であって、複数のLNPが約100nmの平均サイズを有する、治療用組成物を提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、複数の脂質ナノ粒子を含む治療用組成物であって、複数のLNPが約110nmの平均サイズを有する、治療用組成物を提供する。すべての値は端点を含む。

【0497】

いくつかの実施形態では、LNPによる合成RNAウイルスゲノムのカプセル化効率は、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、または100%である。いくつかの実施形態では、複数のLNPの約70%、約75%、約80%、約90%、約95%、約97%、約98%、または約99%は、カプセル化合成RNAウイルスゲノムを含む。いくつかの実施形態では、LNPによる合成RNAウイルスゲノムのカプセル化効率は、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91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%である。いくつかの実施形態では、複数のLNPの少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%は、カプセル化合成RNAウイルスゲノムを含む。いくつかの実施形態では、複数のLNPの約70%～100%、約75%～100%、約80%～100%、約85%～100%、約90%～100%、約91%～100%、約92%～100%、約93%～100%、約94%～100%、約95%～100%、約96%～100%、約97%～100%、約98%～100%、約99%～100%は、カプセル化合成RNAウイルスゲノムを含む。

【0498】

いくつかの実施形態では、LNPは、中性電荷（例えば、約0mV～1mVの平均ゼータ電位）を有する。いくつかの実施形態では、LNPは、約40mV～約-40mVの平均ゼータ電位を有する。いくつかの実施形態では、LNPは、約40mV～約0mVの平均ゼータ電位を有する。いくつかの実施形態では、LNPは、約35mV～約0mV、約30mV～約0mV、約25mV～約0mV、約20mV～約0mV、約15mV～約0mV、約10mV～約0mV、または約5mV～約0mVの平均ゼータ電位を有する。いくつかの実施形態では、LNPは、約20mV～約-40mVの平均ゼータ電位を有する。いくつかの実施形態では、LNPは、約20mV～約-20mVの平均ゼータ電位を有する。いくつかの実施形態では、LNPは、約10mV～約-20mVの平均ゼータ電位

を有する。いくつかの実施形態では、LNPは、約10mV～約-10mVの平均ゼータ電位を有する。いくつかの実施形態では、LNPは、約10mV、約9mV、約8mV、約7mV、約6mV、約5mV、約4mV、約3mV、約2mV、約1mV、約0mV、約-1mV、約-2mV、約-3mV、約-4mV、約-5mV、約-6mV、約-7mV、約-8mV、約-9mV、約-9mVまたは約-10mVの平均ゼータ電位を有する。

【0499】

いくつかの実施形態では、LNPは、約0mV～-20mVの平均ゼータ電位を有する。いくつかの実施形態では、LNPは、約-20mV未満の平均ゼータ電位を有する。例えば、いくつかの実施形態では、LNPは、約-30mV未満、約35mV未満、または約-40mV未満の平均ゼータ電位を有する。いくつかの実施形態では、LNPは、約-50mV～約-20mV、約-40mV～約-20mV、または約-30mV～約-20mVの平均ゼータ電位を有する。いくつかの実施形態では、LNPは、約0mV、約-1mV、約-2mV、約-3mV、約-4mV、約-5mV、約-6mV、約-7mV、約-8mV、約-9mV、約-10mV、約-11mV、約-12mV、約-13mV、約-14mV、約-15mV、約-16mV、約-17mV、約-18mV、約-19mV、約-20mV、約-21mV、約-22mV、約-23mV、約-24mV、約-25mV、約-26mV、約-27mV、約-28mV、約-29mV、約-30mV、約-31mV、約-32mV、約-33mV、約-34mV、約-35mV、約-36mV、約-37mV、約-38mV、約-39mV、または約-40mVの平均ゼータ電位を有する。いくつかの実施形態では、LNPは、約-20mV未満、約-30mV未満、約35mV未満、または約-40mV未満の平均ゼータ電位を有する。

【0500】

いくつかの実施形態では、LNPは、本明細書に記載される組換え核酸分子を含み、約10:1～約60:1の脂質(L)対核酸(N)の質量比を有する。いくつかの実施形態では、LNPは、本明細書に記載される組換え核酸分子を含み、約20:1の脂質(L)対核酸(N)の質量比を有する。いくつかの実施形態では、LNPは、本明細書に記載される組換え核酸分子を含み、約30:1の脂質(L)対核酸(N)の質量比を有する。いくつかの実施形態では、LNPは、本明細書に記載される組換え核酸分子を含み、約40:1の脂質(L)対核酸(N)の質量比を有する。いくつかの実施形態では、LNPは、本明細書に記載される組換え核酸分子を含み、約15:1、約16:1、約17:1、約18:1、約19:1、約20:1、約21:1、約22:1、約23:1、約24:1、約25:1、約26:1、約27:1、約28:1、約29:1、約30:1、約31:1、約32:1、約33:1、約34:1、約35:1、約36:1、約237:1、約28:1、約39:1、約40:1、約41:1、約42:1、約43:1、約44:1、または約45:1のL:N質量比を有する。

【0501】

いくつかの実施形態では、LNPは、10:1～60:1、20:1～60:1、30:1～60:1、40:1～60:1、50:1～60:1、10:1～50:1、20:1～50:1、30:1～50:1、40:1～50:1、10:1～40:1、20:1～40:1、30:1～40:1、10:1～30:1、20:1～30:1、または10:1～20:1の脂質(L)対核酸分子(N)質量比を有する(すべての端点を含む)。いくつかの実施形態では、LNPは、30:1～40:1の脂質:核酸分子質量比を有する。いくつかの実施形態では、LNPは、30:1～36:1の脂質:核酸分子質量比を有する。

【0502】

いくつかの実施形態では、LNPは、本明細書に記載される組換え核酸分子を含み、約10:1～約60:1の脂質(L)対核酸(N)の質量比を有する。いくつかの実施形態では、LNPは、本明細書に記載される組換え核酸分子を含み、約20:1の脂質(L)対核酸(N)の質量比を有する。いくつかの実施形態では、LNPは、本明細書に記載さ

れる組換え核酸分子を含み、約 30 : 1 (L : N) の脂質 (L) 対核酸 (N) の質量比を有する。いくつかの実施形態では、LNP は、本明細書に記載される組換え核酸分子を含み、約 40 : 1 (L : N) の脂質 (L) 対核酸 (N) の質量比を有する。いくつかの実施形態では、LNP は、本明細書に記載される組換え核酸分子を含み、約 15 : 1、約 16 : 1、約 17 : 1、約 18 : 1、約 19 : 1、約 20 : 1、約 21 : 1、約 22 : 1、約 23 : 1、約 24 : 1、約 25 : 1、約 26 : 1、約 27 : 1、約 28 : 1、約 29 : 1、約 30 : 1、約 31 : 1、約 32 : 1、約 33 : 1、約 34 : 1、約 35 : 1、約 36 : 1、約 237 : 1、約 28 : 1、約 39 : 1、約 40 : 1、約 41 : 1、約 42 : 1、約 43 : 1、約 44 : 1、または約 45 : 1 の L : N 質量比を有する。

【0503】

いくつかの実施形態では、LNP は、核酸分子を含み、1 ~ 25 の脂質窒素対リン酸比 (N : P) を有する。いくつかの実施形態では、N : P は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、または 25 である。いくつかの実施形態では、N : P は、1 ~ 25、1 ~ 20、1 ~ 15、1 ~ 10、1 ~ 5、5 ~ 25、5 ~ 20、5 ~ 15、5 ~ 10、10 ~ 25、10 ~ 20、10 ~ 15、15 ~ 25、15 ~ 20、または 20 ~ 25 である。いくつかの実施形態では、LNP は、核酸分子を含み、14 の脂質窒素対リン酸比 (N : P) を有する。

【0504】

いくつかの実施形態では、LNP は、腫瘍溶解性ウイルスをコードする合成 RNA ウィルスゲノムを含み、コードされる腫瘍溶解性ウイルスは、対象への LNP 投与の部位から離れている腫瘍のサイズを低減させることができる。例えば、本明細書で提供される実施例に示すように、本明細書に記載される LNP の静脈内投与は、腫瘍組織におけるウイルス複製及び腫瘍サイズの低減をもたらす。これらのデータは、本開示の LNP が、LNP 投与の部位から離れている腫瘍またはがん性組織に局在できることを示す。このような効果は、容易にアクセスできない故に処置の腫瘍内送達に好適ではない腫瘍の処置において、本明細書に記載される LNP カプセル化腫瘍溶解性ウイルスを使用することを可能にする。

【0505】

LNP 調製方法

いくつかの実施形態では、本開示は、核酸分子を含む脂質ナノ粒子 (LNP) の組成物を調製する方法であって、

- (a) 水溶液中で所望の濃度まで核酸分子を希釈するステップと、
 - (b) マイクロ流体流を使用して、LNP の全脂質成分を含む有機脂質相を、核酸分子を含む水相と混合して、LNP を形成するステップと、
 - (c) LNP を緩衝液に対して透析して有機溶媒を除去するステップと、
 - (d) LNP を標的体積まで濃縮するステップと、
 - (e) 場合により、滅菌フィルターで濾過するステップと
- を含む方法を提供する。

【0506】

いくつかの実施形態では、有機脂質相及び水相は、1 : 1 (v : v) ~ 1 : 10 (v : v) の比率で混合される。いくつかの実施形態では、有機脂質相及び水相は、1 : 1 (v : v)、1 : 2 (v : v)、1 : 3 (v : v)、1 : 4 (v : v)、1 : 5 (v : v)、1 : 6 (v : v)、1 : 7 (v : v)、1 : 8 (v : v)、1 : 9 (v : v)、または 1 : 10 (v : v) の比率で混合される。いくつかの実施形態では、有機脂質相及び水相は、1 : 1 (v : v) ~ 1 : 3 (v : v)、1 : 2 (v : v) ~ 1 : 4 (v : v)、1 : 3 (v : v) ~ 1 : 5 (v : v)、1 : 4 (v : v) ~ 1 : 6 (v : v)、1 : 5 (v : v) ~ 1 : 7 (v : v)、1 : 6 (v : v) ~ 1 : 8 (v : v)、1 : 7 (v : v) ~ 1 : 9 (v : v)、または 1 : 8 (v : v) ~ 1 : 10 (v : v) の比率で混合される。いくつかの実施形態では、有機脂質相及び水相は、1 : 3 (v : v) ~ 1 : 5 (v : v) の比

10

20

30

40

50

率で混合される。いくつかの実施形態では、有機脂質相及び水相は、1 : 3 (v : v) の比率で混合される。いくつかの実施形態では、有機脂質相及び水相は、1 : 5 (v : v) の比率で混合される。

【0507】

いくつかの実施形態では、マイクロ流体流の総流量は5~20 mL / 分である。いくつかの実施形態では、マイクロ流体流の総流量は5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20 mL / 分である。いくつかの実施形態では、マイクロ流体流の総流量は9~20 mL / 分である。いくつかの実施形態では、マイクロ流体流の総流量は11~13 mL / 分である。

【0508】

いくつかの実施形態では、ステップ (b) における有機脂質相中の溶媒はエタノールである。いくつかの実施形態では、ステップ (b) の有機脂質相に、熱が適用される。いくつかの実施形態では、ステップ (b) の有機脂質相に、約40、45、50、55、60、65、70、75、または80℃が適用される。いくつかの実施形態では、ステップ (b) の有機脂質相に、60℃の熱が適用される。いくつかの実施形態では、ステップ (b) の有機脂質相に、熱が適用されない。

【0509】

いくつかの実施形態では、ステップ (a) の水溶液は、1~7のpHを有する。いくつかの実施形態では、ステップ (a) の水溶液は、1~3、2~4、3~5、4~6、または5~7のpHを有する。いくつかの実施形態では、ステップ (a) の水溶液は、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、または7のpHを有する。いくつかの実施形態では、ステップ (a) の水溶液は、3のpHを有する。いくつかの実施形態では、ステップ (a) の水溶液は、5のpHを有する。

【0510】

いくつかの実施形態では、総脂質濃度は、5 mM~80 mMである。いくつかの実施形態では、総脂質濃度は、約5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、または80 mMである。いくつかの実施形態では、総脂質濃度は、約20 mMである。いくつかの実施形態では、総脂質濃度は、約40 mMである。

【0511】

いくつかの実施形態では、この方法によって生成されたLNPは、1~25の脂質窒素対リン酸比 (N : P) を有する。いくつかの実施形態では、N : Pは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、または25である。いくつかの実施形態では、N : Pは、1~25、1~20、1~15、1~10、1~5、5~25、5~20、5~15、5~10、10~25、10~20、10~15、15~25、15~20、または20~25である。いくつかの実施形態では、LNPは、核酸分子を含み、14の脂質窒素対リン酸比 (N : P) を有する。

【0512】

いくつかの実施形態では、ステップ (c) の緩衝液は、中性pHを有する (例えば、1×PBS、pH 7.2)。いくつかの実施形態では、ステップ (d) は、濃縮のために遠心濾過を使用する。

【0513】

いくつかの実施形態では、本開示の方法のカプセル化効率は、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%である。いくつかの実施形態では、本開示の方法のカプセル化効率は、少なくとも90%である。いくつかの実施形態では、本開示の方法のカプセル化効率は、少なくとも95%である。いくつかの実施形態では、カプセル化効率はRiboGreenによって決定される。

【0514】

いくつかの実施形態では、本開示の方法によって產生されたLNPは、約50nm～約500nmの平均サイズ（すなわち、平均外径）を有する。いくつかの実施形態では、LNPは、約50nm～約200nm、約100nm～約200nm、約150nm～約200nm、約50nm～約100nm、約50nm～約150nm、約100nm～約150nm、約200nm～約250nm、約250nm～約300nm、約300nm～約400nm、約150nm～約500nm、約200nm～約500nm、約300nm～約500nm、約350nm～約500nm、約400nm～約500nm、約425nm～約500nm、約450nm～約500nm、または約475nm～約500nmの平均サイズを有する。いくつかの実施形態では、複数のLNPは、約50nm、60nm、70nm、80nm、90nm、100nm、110nm、約120、または約125nmの平均サイズを有する。いくつかの実施形態では、複数のLNPは、約100nmの平均サイズを有する。いくつかの実施形態では、複数のLNPは、50nm～150nmの平均サイズを有する。いくつかの実施形態では、複数のLNPは、50nm～150nm、50nm～125nm、50nm～100nm、50nm～75nm、75nm～150nm、75nm～125nm、75nm～100nm、100nm～150nm、100nm～125nm、または125nm～150nmの平均サイズ（平均外径）を有する。いくつかの実施形態では、複数のLNPは、70nm～90nm、80nm～100nm、90nm～110nm、100nm～120nm、110nm～130nm、120nm～140nm、または130nm～150nmの平均サイズを有する。いくつかの実施形態では、複数のLNPは、90nm～110nmの平均サイズを有する。

10

20

【0515】

いくつかの実施形態では、複数のLNPの多分散指数は、0.01～0.3である。いくつかの実施形態では、複数のLNPの多分散指数は、0.1～0.15である。いくつかの実施形態では、複数のLNPの多分散指数は、約0.01、約0.02、約0.03、約0.04、約0.05、約0.06、約0.07、約0.08、約0.09、約0.10、約0.11、約0.12、約0.13、約0.14、約0.15、約0.16、約0.17、約0.18、約0.19、約0.20、約0.21、約0.22、約0.23、約0.24、約0.25、約0.26、約0.27、約0.28、約0.29、または約0.30である。いくつかの実施形態では、複数のLNPの多分散指数は、約0.10、約0.11、約0.12、約0.13、約0.14、または約0.15である。いくつかの実施形態では、平均直径及び／または多分散性は、動的光散乱によって決定される。

30

【0516】

ペイロード分子

いくつかの実施形態では、粒子は、合成RNAウイルスゲノムを含み、ペイロード分子をコードする組換えRNAポリヌクレオチドをさらに含む。いくつかの実施形態では、粒子は、脂質ナノ粒子であり、合成RNAウイルスゲノムを含み、ペイロード分子をコードする組換えRNAポリヌクレオチドをさらに含む。いくつかの実施形態では、粒子（例えば、LNP）中の合成RNAウイルスゲノムは、ペイロード分子をコードする組換えRNAポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、粒子（例えば、LNP）は、1）合成RNAウイルスゲノム（ペイロード分子をコードしてもしなくてもよい）、及び2）ペイロード分子をコードする第2の組換えRNAポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、合成RNAウイルスゲノムと、ペイロード分子をコードする第2の組換えRNAポリヌクレオチドとは、粒子（例えば、LNP）中で結合していない。いくつかの実施形態では、合成RNAウイルスゲノムと、ペイロード分子をコードする第2の組換えRNAポリヌクレオチドとは、非共有結合している。いくつかの実施形態では、合成RNAウイルスゲノムと、ペイロード分子をコードする第2の組換えRNAポリヌクレオチドとは、通常の3'，5'ホスホジエステル結合以外の共有結合を介して共有結合している。いくつかの実施形態では、1つ以上のmiRNA標的配列は、ペイロード分子をコードするRNAポリヌクレオチドの3'または5'UTRに組み込まれる。いくつかの実施形態では、1つ以上のmiRNA標的配列は、ペイロード分子をコードするポリヌクレオチドに挿

40

50

入される。そのような実施形態では、ペイロードの翻訳及びその後の発現は、対応する mRNA が発現される細胞では起こらないか、または実質的に低減する。いくつかの実施形態では、ペイロード分子をコードする組換え RNA ポリヌクレオチドはレプリコンである。

【0517】

いくつかの実施形態では、ペイロードは、細胞傷害性ペプチドである。本明細書で 사용되는場合、「細胞傷害性ペプチド」は、宿主細胞で発現された場合に細胞死を、及び／または宿主細胞によって分泌された場合に隣接細胞の細胞死を誘導することができるタンパク質を指す。いくつかの実施形態では、細胞傷害性ペプチドは、カスパーゼ、p53、ジフテリア毒素 (DT)、Pseudomonas 体外毒素 A (PEA)、I 型リボザイム不活性化タンパク質 (RIP) (例えば、サポリン及びジェロニン)、II 型 RIP (例えば、リシン)、志賀様毒素 1 (Sh1)、感光性活性酸素種 (例えば、キラーレッド) である。ある特定の実施形態では、細胞傷害性ペプチドは、カスパーゼ遺伝子など、アポトーシスを介して細胞死をもたらす自殺遺伝子によってコードされる。

10

【0518】

いくつかの実施形態では、ペイロードは、免疫調節ペプチドである。本明細書で 사용되는場合、「免疫調節ペプチド」は、特定の免疫受容体及び／または経路を調節する (例えば、活性化または阻害する) ことができるペプチドである。いくつかの実施形態では、免疫調節ペプチドは、免疫細胞、組織細胞、及び間質細胞を含む任意の哺乳動物細胞に作用することができる。好ましい実施形態では、免疫調節ペプチドは、T 細胞、NK 細胞、NK T 細胞、B 細胞、樹状細胞、マクロファージ、好塩基球、肥満細胞、または好酸球などの免疫細胞に作用する。例示的な免疫調節ペプチドには、抗体またはその抗原結合断片などの抗原結合分子、サイトカイン、ケモカイン、可溶性受容体、細胞表面受容体リガンド、二分ペプチド、及び酵素が含まれる。

20

【0519】

いくつかの実施形態では、ペイロードは、IL-1、IL-12、IL-15、IL-18、IL-36γ、TNFα、IFNα、IFNβ、IFNγ、または TNFSF14 などのサイトカインである。いくつかの実施形態では、ペイロードは、CXCL10、CXCL9、CCL21、CCL4、または CCL5 などのケモカインである。いくつかの実施形態では、ペイロードは、NKG2D リガンド、ニューロピリン リガンド、Flt3 リガンド、CD47 リガンド (例えば、SIRP1α) などの細胞表面受容体のリガンドである。いくつかの実施形態では、ペイロードは、可溶性サイトカイン受容体 (例えば、IL-13R、TGFβR1、TGFβR2、IL-35R、IL-15R、IL-2R、IL-12R、及びインターフェロン受容体) または可溶性自然免疫受容体 (例えば、Toll 様受容体、補体受容体など) などの可溶性受容体である。いくつかの実施形態では、ペイロードは、細胞内 RNA 及び／または DNA センシングに関与するタンパク質の優性アゴニスト変異体 (例えば、STING、RIG-1、または MDA-5 の優性アゴニスト変異体) である。

30

【0520】

いくつかの実施形態では、ペイロードは、抗体またはその抗原結合断片 (例えば、一本鎖可変断片 (scFv)、F(ab) など) などの抗原結合分子である。いくつかの実施形態では、抗原結合分子は、免疫チェックポイント受容体 (例えば、PD-1、PD-L1、及び CTLA4) または細胞の成長及び活性化に関与する追加の細胞表面受容体 (例えば、OX40、CD200R、CD47、CSF1R、TREM2、4-1BB、CD40、及び NKG2D) などの細胞表面受容体に特異的に結合する。

40

【0521】

いくつかの実施形態では、ペイロード分子は、クロロトキシン、BmKn-2、ネオブラジン1、ネオブラジン2、及びマウリポリン (mauriporin) などのサソリポリペプチドである。いくつかの実施形態では、ペイロード分子は、コントルトロスタチン、アポキシン I、ボトロプストキシン I、BJcUL、OHAP-1、ロドストミン、d

50

r C T - I、C T X - I I I、B 1 L、及び A C T X - 6 などのヘビポリペプチドである。いくつかの実施形態では、ペイロード分子は、ラタルシン及びヒアルロニダーゼなどのクモポリペプチドである。いくつかの実施形態では、ペイロード分子は、メリチン及びアパミンなどのハチポリペプチドである。いくつかの実施形態では、ペイロード分子は、P s T - 1、P d T - 1、及び P d T - 2 などのカエルポリペプチドである。

【0522】

いくつかの実施形態では、ペイロード分子は、酵素である。いくつかの実施形態では、酵素は、細胞外マトリックスを改変することによって腫瘍微小環境を調節することができる。そのような実施形態では、酵素は、限定されるものではないが、マトリックスメタロプロテアーゼ（例えば、M M P 9）、コラゲナーゼ、ヒアルロニダーゼ、ゼラチナーゼ、またはエラスターゼを含み得る。いくつかの実施形態では、酵素は、単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ、シトシンデアミナーゼ、ニトロレダクターゼ、カルボキシペプチダーゼ G 2、プリンヌクレオシドホスホリラーゼ、またはチトクローム P 4 5 0 などの遺伝子指向性酵素プロドラッグ療法（G D E P T）システムの一部である。いくつかの実施形態では、酵素は、標的細胞において細胞死経路を誘導または活性化することができる（例えば、カスパーゼ）。いくつかの実施形態では、酵素は、細胞外代謝産物またはメッセージを分解することができる（例えば、アデノシンデアミナーゼ、またはアルギナーゼ、または 1 5 - ヒドロキシプロスタグランジンデヒドロゲナーゼ）。

【0523】

いくつかの実施形態では、ペイロード分子は、M L K L である。いくつかの実施形態では、M L K L ポリペプチドは、配列番号 1 0 4 との少なくとも 7 0 %、少なくとも 7 5 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、または 1 0 0 % の同一性を有するアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。いくつかの実施形態では、ペイロード分子は、M L K L 4 H B ドメインを含むかまたはそれからなる。いくつかの実施形態では、M L K L 4 H B ドメインは、配列番号 1 0 4 のアミノ酸 1 ~ 1 2 0 との少なくとも 7 0 %、少なくとも 7 5 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、または 1 0 0 % の同一性を有するアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。

【0524】

いくつかの実施形態では、ペイロード分子は、ガスダーミン D（G S D M D）である。いくつかの実施形態では、ガスダーミン D（G S D M D）は、配列番号 1 0 5 との少なくとも 7 0 %、少なくとも 7 5 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、または 1 0 0 % の同一性を有するアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。いくつかの実施形態では、ペイロード分子は、ガスダーミン D N 末端断片を含むかまたはそれからなる。いくつかの実施形態では、ガスダーミン D N 末端断片は、配列番号 1 0 5 のアミノ酸 1 ~ 2 3 3 との少なくとも 7 0 %、少なくとも 7 5 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、または 1 0 0 % の同一性を有するアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。いくつかの実施形態では、ペイロード分子は、配列番号 1 0 5 の L 1 9 2 A に対応する変異を含む。

【0525】

いくつかの実施形態では、ペイロード分子は、ガスダーミン E（G S D M E）である。いくつかの実施形態では、ガスダーミン E（G S D M E）は、配列番号 1 0 6 との少なくとも 7 0 %、少なくとも 7 5 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、または 1 0 0 % の同一性を有するアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。いくつかの実施形態では、ペイロード分子は、ガスダーミン E N 末端断片を含むかまたはそれからなる。いくつかの実施形態では、ガスダーミン E N 末端断片は、配列番号 1 0 6 のアミノ酸

1～237との少なくとも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97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の同一性を有するアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。

【0526】

いくつかの実施形態では、ペイロード分子は、HMGB1である。いくつかの実施形態では、HMGB1ポリペプチドは、配列番号107との少なくとも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97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の同一性を有するアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。いくつかの実施形態では、ペイロード分子は、HMGB1 Box Bドメインを含むかまたはそれからなる。いくつかの実施形態では、HMGB1 Box Bドメインは、配列番号107のアミノ酸96～162との少なくとも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97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の同一性を有するアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。

10

【0527】

いくつかの実施形態では、ペイロード分子は、SMAC/Diabloである。いくつかの実施形態では、SMAC/Diabloは、配列番号108との少なくとも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97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の同一性を有するアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。いくつかの実施形態では、ペイロード分子は、配列番号108のアミノ酸56～239との少なくとも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97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の同一性を有するアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。

20

【0528】

いくつかの実施形態では、ペイロード分子は、メリチンである。いくつかの実施形態では、メリチンは、配列番号109との少なくとも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97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の同一性を有するアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。

30

【0529】

いくつかの実施形態では、ペイロード分子は、L-アミノ酸オキシダーゼ（LAAO）である。いくつかの実施形態では、L-アミノ酸オキシダーゼ（LAAO）は、配列番号110との少なくとも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97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の同一性を有するアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。

【0530】

いくつかの実施形態では、ペイロード分子は、ディスインテグリンである。いくつかの実施形態では、ディスインテグリンは、配列番号111との少なくとも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97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の同一性を有するアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。

40

【0531】

いくつかの実施形態では、ペイロード分子は、TRAIL（TNFSF10）である。いくつかの実施形態では、TRAIL（TNFSF10）は、配列番号112との少なくとも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97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の同一性を有するアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。

50

【0532】

いくつかの実施形態では、ペイロード分子は、ニトロレダクターゼである。いくつかの実施形態では、ニトロレダクターゼは、NfsB（例えば、E. coli 由来）である。いくつかの実施形態では、NfsBは、配列番号113との少なくとも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97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の同一性を有するアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。いくつかの実施形態では、ニトロレダクターゼは、NfsA（例えば、E. coli 由来）である。いくつかの実施形態では、NfsAは、配列番号114との少なくとも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97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の同一性を有するアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。

10

【0533】

いくつかの実施形態では、ペイロード分子は、レオウイルスFASTタンパク質である。いくつかの実施形態では、レオウイルスFASTタンパク質は、ARV p14、BRV p15、またはp14-p15ハイブリッドである。いくつかの実施形態では、ペイロード分子は、ARV p14である。いくつかの実施形態では、ARV p14は、配列番号115との少なくとも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97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の同一性を有するアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。いくつかの実施形態では、ペイロード分子は、BRV p15である。いくつかの実施形態では、BRV p15は、配列番号116との少なくとも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97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の同一性を有するアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。いくつかの実施形態では、ペイロード分子は、p14-p15ハイブリッドである。いくつかの実施形態では、p14-p15ハイブリッドは、配列番号117との少なくとも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97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の同一性を有するアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。

20

30

【0534】

いくつかの実施形態では、ペイロード分子は、レプチン/FOSL2である。いくつかの実施形態では、レプチン/FOSL2は、配列番号118との少なくとも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97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の同一性を有するアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。

【0535】

いくつかの実施形態では、ペイロード分子は、アデノシンデアミナーゼ2 (ADA2) である。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼ (ADA2) は、配列番号119との少なくとも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97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の同一性を有するアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。

40

【0536】

いくつかの実施形態では、ペイロード分子は、 α -1, 3-ガラクトシルトランスフェラーゼである。いくつかの実施形態では、 α -1, 3-ガラクトシルトランスフェラーゼは、配列番号120との少なくとも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97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の同一性を有するアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。

【0537】

50

いくつかの実施形態では、ペイロード分子は、IL-2である。いくつかの実施形態では、IL-2は、配列番号121との少なくとも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97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の同一性を有するアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。

【0538】

いくつかの実施形態では、ペイロード分子は、IL-7である。いくつかの実施形態では、IL-7は、配列番号122との少なくとも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97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の同一性を有するアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。

10

【0539】

いくつかの実施形態では、ペイロード分子は、IL12である。いくつかの実施形態では、ペイロード分子は、配列番号123との少なくとも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97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の同一性を有するアミノ酸配列を含むかまたはそれからなるIL-12ベータサブユニットを含む。いくつかの実施形態では、ペイロード分子は、配列番号124との少なくとも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97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の同一性を有するアミノ酸配列を含むかまたはそれからなるIL-12アルファサブユニットを含む。

20

【0540】

いくつかの実施形態では、ペイロード分子は、IL18である。いくつかの実施形態では、IL18は、配列番号125との少なくとも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97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の同一性を有するアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。

【0541】

いくつかの実施形態では、ペイロード分子は、IL-21である。いくつかの実施形態では、IL-21は、配列番号126との少なくとも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97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の同一性を有するアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。

30

【0542】

いくつかの実施形態では、ペイロード分子は、IL-36 γ である。いくつかの実施形態では、IL-36 γ は、配列番号127との少なくとも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97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の同一性を有するアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。

【0543】

いくつかの実施形態では、ペイロード分子は、IFN γ である。いくつかの実施形態では、IFN γ は、配列番号128との少なくとも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97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の同一性を有するアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。

40

【0544】

いくつかの実施形態では、ペイロード分子は、CCL21である。いくつかの実施形態では、CCL21は、配列番号129との少なくとも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97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の同一性を有するアミノ酸配

50

列を含むかまたはそれからなる。

【 0 5 4 5 】

いくつかの実施形態では、ペイロード分子は、以下の表 2 0 に提供される実施形態のうちの 1 つによるポリヌクレオチド分子によってコードされる。

【表 2 0 - 1 】

表 2 0 : ペイロード構成の非限定的な実施形態

ペイロード	ペイロードをコードする CVA(例えば、 CVA21)ウイルスゲノム	CVA(例えば、 CVA21)ウイルスゲノム及びペイロードをコードする第 2 の RNA 分子を含む LNP	ペイロードをコードする SVV ウイルスゲノム	SVV ウイルスゲノム及びペイロードをコードする第 2 の RNA 分子を含む LNP
MLKL	x	x	x	x
MLKL 4HB ドメイン	x	x	x	x
ガスダーミン D	x	x	x	x

10

20

30

40

50

【表 20 - 2】

ペイロード	ペイロードをコードする CVA(例えば、 CVA21)ウイルス スゲノム	CVA(例えば、 CVA21)ウイル スゲノム及びペ イロードをコー ドする第2の RNA 分子を含 む LNP	ペイロードをコー ドする SVV ウイルスゲノム	SVV ウイルス ゲノム及びペイ ロードをコード する第2の RNA 分子を含 む LNP
L192A を含むガス ダーミン D	x	x	x	x
ガスダーミン D N 末端断片	x	x	x	x
L192A を含むガス ダーミン D N 末端 断片	x	x	x	x
ガスダーミン E	x	x	x	x
ガスダーミン E N 末端断片	x	x	x	x
HMGB1	x	x	x	x
HMGB1 Box B ド メイン	x	x	x	x
SMAC/Diablo	x	x	x	x
メリチン	x	x	x	x
L-アミノ酸オキシ ダーゼ(LAAO)	x	x	x	x
ディスインテグリン	x	x	x	x
TRAIL (TNFSF10)	x	x	x	x
ニトロレダクター ゼ	x	x	x	x
NfsB	x	x	x	x
NfsA	x	x	x	x
レオウイルス FAST タンパク質	x	x	x	x
ARV p14	x	x	x	x
BRV p15	x	x	x	x
p14-p15 ハイブリ ッド	x	x	x	x
レプチン/FOSL2	x	x	x	x

10

20

30

40

50

【表 20-3】

ペイロード	ペイロードをコードする CVA(例えば、 CVA21)ウイルスゲノム	CVA(例えば、 CVA21)ウイルスゲノム及びペイロードをコードする第2の RNA分子を含むLNP	ペイロードをコードするSVV ウイルスゲノム	SVVウイルスゲノム及びペイロードをコードする第2の RNA分子を含むLNP
アデノシンデアミナーゼ2(ADA2)	x	x	x	x
アルファ-1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼ	x	x	x	x
IL-2	x	x	x	x
IL-7	x	x	x	x
IL-12	x	x	x	x
IL-12 ベータサブユニット	x	x	x	x
IL-12 アルファサブユニット	x	x	x	x
IL-18	x	x	x	x
IL-21	x	x	x	x
IL-36 ガンマ	x	x	x	x
IFN ガンマ	x	x	x	x
CCL21	x	x	x	x

*各「x」は実施形態を示す

【0546】

いくつかの実施形態では、ペイロード分子は、二分ペプチドである。本明細書で使用される場合、「二分ペプチド」は、非がん性エフェクター細胞上で発現される細胞表面抗原と結合することができる第1のドメインと、標的細胞（例えば、がん性細胞、腫瘍細胞、または異なる種類のエフェクター細胞）によって発現される細胞表面抗原と結合することができる第2のドメインとから構成される多量体タンパク質を指す。いくつかの実施形態では、二分ポリペプチドの個々のポリペプチドドメインは、抗体もしくはその結合断片（例えば、一本鎖可変断片（scFv）またはF(ab)）、ナノボディ、ダイアボディ、フレキシボディ、DOCK-AND-LOCK（商標）抗体、またはモノクローナル抗イディオタイプ抗体（mAb2）を含み得る。いくつかの実施形態では、二分ポリペプチドの構造は、二重可変ドメイン抗体（DVD-Ig（商標））、Tandab（登録商標）、二重特異性T細胞エンゲージャー（BiTE（商標））、DuoBody（登録商標）、または二重親和性リターゲティング（DART）ポリペプチドであり得る。いくつかの実施形態では、二分ポリペプチドは、BiTEであり、表8及び／または表9に示す抗原に特異的に結合するドメインを含む。例示的なBiTEを以下の表7に示す。

【表 7】

表 7：前臨床及び臨床研究で使用された検証済み B i T E

標的	名称	標的疾患	臨床段階	参考文献
CD19	ブリナツモマブ/MT-103/MEDI-538	NHL、ALL	第 I/II/III 相	1、2、3、4、5、6
EpCAM	MT110	固形腫瘍	第 I 相	7、8、9、10
CEA	MT111/MEDI-565	GI 腺癌	第 I 相	11、12
PSMA	BAY2010112/AMG112	前立腺	第 I 相	13
CD33	AMG330	AML	前臨床	14、15
EGFR	C-BiTE 及び P-BiTE 抗体	大腸癌	前臨床	16
Her2	FynomAb、COVA420、HER2-BsAb	乳癌及び胃癌	前臨床	17、18
EphA2	bscEphA2xCD3	複数の固形腫瘍	前臨床	19
MCSP	MCSP-BiTE	メラノーマ	前臨床	20
ADAM17	A300E	前立腺癌	前臨床	21
PSCA	CD3-PSCA(MB1)	前立腺癌	前臨床	22
17-A1	CD3/17-1A-二重特異性	大腸癌	前臨床	23
NKG2D リガンド	scFv-NKG2D、huNKG2D-OKT3	複数の固形及び液性腫瘍	前臨床	24、25
DLL3	AMG757	小細胞肺癌	臨床	26

【0547】

いくつかの実施形態では、エフェクター細胞で発現される細胞表面抗原は、以下の表 8 から選択される。いくつかの実施形態では、腫瘍細胞またはエフェクター細胞で発現される細胞表面抗原は、以下の表 9 から選択される。いくつかの実施形態では、腫瘍細胞で発現される細胞表面抗原は、腫瘍抗原である。いくつかの実施形態では、腫瘍抗原は、CD19、EpCAM、CEA、PSMA、CD33、EGFR、Her2、EphA2、MCSP、ADAM17、PSCA、17-A1、NKG2D リガンド、CSF1R、FAP、GD2、DLL3、TROP2、ネクチン4、またはニューロピリンから選択される。他の実施形態では、抗原は、がんの発達に関連するウイルス抗原である。いくつかの実施形態では、がんの発達に関連するウイルス抗原は、HBV-コア（B型肝炎コア抗原）、HBV-pol、HbS-Ag、HPV E6、HPV E7、メルケル細胞ポリオマラージ T 抗原、またはエプスタイン・バーウイルス抗原 EBNA2 もしくは BZLF1 である。いくつかの実施形態では、腫瘍抗原は、表 9 に列挙されるものから選択される。

10

20

30

40

50

【表 8】

表 8：例示的なエフェクター細胞標的抗原

T 細胞		NKT 細胞	NK 細胞	他
CD3	CD30	CD3	CD16	CD48
CD3 γ	CD38	CD3 γ	CD94/NKG2 (例えば、NKG2D)	LIGHT
CD3 δ	CD40	CD3 δ	NKp30	CD44
CD3 ϵ	CD57	CD3 ϵ	NKp44	CD45
CD3 ξ	CD69	CD3 ξ	NKp46	IL-1R2
CD2	CD70	インバリアント TCR	KAR	IL-1R α
CD4	CD73			IL-1R α 2
CD5	CD81			IL-13R α 2
CD6	CD82			IL-15Ra
CD7	CD96			CCR5
CD8	CD134			CCR8
CD16	CD137			
CD25	CD152			
CD27	CD278			
CD28				

10

20

【表 9 - 1】

表 9：例示的な標的細胞抗原

標的細胞抗原			
8H9	CRISP3	Lewis-Y	Fas
GnT-V、 β 1、6-N	DC-SIGN	LIV-1 (SLC39A6)	SOX2
AFP	DHFR	リビン	STEAP1
ART1	EGP40	LAMP1	SLITRK6
ART4	EZH2	MAGEA3	NaPi2a
ABCG2	EpCAM	MAGEA4	SOX1
B7-H3	EphA2	MAGEB6	SOX11
B7-H4	EphA2/Eck	MAGEA1	SPANXA1
B7-H6	EGFRvIII	MART-1	SART-1
BCMA	E-カドヘリン	MCSP	SSX4
B-サイクリン	EGP2	MME	SSX5
BMI1	ETA	メソテリン(MSLN)	サバイビン

30

40

50

【表 9 - 2】

標的細胞抗原			
CA-125	ERBB3	MAPK1	SSX2
カドヘリン	ERBB3/4	MUC16	TAG72
CABYR	ERBB4	MUC1	TEM1
CTAG2	EPO	MRP-3	TEM8
CA6	F3	MyoD-1	TSGA10
CAIX	FAR	NCAM	TSSK6
CEA	FBP	ネクチン 4	サイログロブリン
CEACAM5	FTHL17	ネスチン	トランスフェリン受容体
CEACAM6	胎児 AchR	NEP	TACSTD2 (TROP2)
Cav-1	FAP	NY-ESO-1	TMEM97
CD10	FGFR3	hHLA-A	TRP-2
CD117	FR-a	H60	TULP2
CD123	Fra-1/Fosl 1	OLIG2	TROP2
CD133	GAGE1	5T4	チロシナーゼ
CD138	GD2	p53	TRP1
CD15	GD3	P-カドヘリン	UPAR
CD171	Glil	PB	VEGF
CD19	GP100	P 糖タンパク質	VEGF 受容体
CD20	GPA33	PMCT (SLC13A5)	VEGRR2
CD21		PRAME	BRAF
CD22	グリピカン-3	PROX1	WT-1
CD30	HIV gp120	PSA	XAGE2
CD33	HLA-A	PSCA	ZNF165
CD37	HLA-A2	PSMA	$\alpha_v\beta_6$ インテグリン
CD38	HLA-AI	PSC1	β -カテニン
CD44v6	HLA-B	PVRL4	カテプシン B
CD44v7/8	HLA-C	Ras	CSAG2
CD74	HMW-MAA	ROR1	CTAG2
Cd79b	Her2/Neu	SART2	EGFR
CD124 (IL-4R)	Her3	SART3	EGP40

10

20

30

40

50

【表 9 - 3】

標的細胞抗原			
CDH3	u70/80	フィブロネクチンの がん胎児性バリアン ト	EZH2
Ki-67	LICAM	テネイシン	HIV sp120
CSPG4	ULBP1	LICAM	カップパ軽鎖
CALLA	ULBP2	Rae-1 α	LDHC
CSAG2	ULBP3	Rae-1 β	TRP-1
COX-2	ULBP6	Rae-1 δ	Fas-L
ラムダ	MICA	Rae-1 γ	DLL3
LAYN	MICB	PDGF	
LeuM-1	Her3	TROP2	
KDR	EGF		
CD47	SIRP1 α		

10

20

【0548】

医薬組成物及び使用方法

本開示の一態様は、本明細書に記載の組換えRNA分子または本明細書に記載の組換えRNA分子を含む粒子を含む医薬組成物、及びがんの処置方法に関する。いくつかの実施形態では、本開示は、がんの処置を必要とする対象においてそれを行う方法であって、有効量のCVA21-EF、CVA21-KY、もしくはSVVウイルス、または対応するRNAウイルスゲノムを対象に投与することを含む、方法を提供する。本明細書に記載の組成物は、所望の送達経路に好適な任意の様式で製剤化することができる。典型的には、製剤には、誘導体またはプロドラッグ、溶媒和物、立体異性体、ラセミ体、またはそれらの互変異性体を含むすべての生理学的に許容される組成物と、任意の薬学的に許容される担体、希釈剤、及び／または賦形剤が含まれる。

30

【0549】

本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される担体、希釈剤、または賦形剤」は、限定されるものではないが、ヒトまたは家畜動物での使用に許容されるものとして米国食品医薬品局によって承認されている、任意のアジュバント、担体、賦形剤、流動促進剤、甘味剤、希釈剤、防腐剤、染料／着色剤、風味増強剤、界面活性剤、湿潤剤、分散剤、懸濁剤、安定剤、等張剤、溶媒、界面活性剤、または乳化剤を含む。例示的な薬学的に許容される担体は、限定されるものではないが、乳糖、ブドウ糖、及びショ糖などの糖；トウモロコシデンプン及びジャガイモデンプンなどのデンプン；カルボキシメチルセルロースナトリウム、エチルセルロース、及び酢酸セルロースなどのセルロースならびにその誘導体；トラガカント；麦芽；ゼラチン；タルク；カカオバター、ワックス、動植物性脂肪、パラフィン、シリコン、ベントナイト、ケイ酸、酸化亜鉛；ピーナッツ油、綿実油、サフラワー油、ゴマ油、オリーブ油、コーン油、及び大豆油などの油；プロピレングリコールなどのグリコール；グリセリン、ソルビトール、マンニトール、及びポリエチレングリコールなどのポリオール；オレイン酸エチル及びラウリン酸エチルなどのエステル；寒天；水酸化マグネシウム及び水酸化アルミニウムなどの緩衝剤；アルギン酸；パイロジェンフリー水；等張食塩水；リンゲル液；エチルアルコール；リン酸緩衝液；ならびに医薬製剤に用いられる任意の他の適合性物質を含む。

40

【0550】

「薬学的に許容される塩」には、酸付加塩及び塩基付加塩の両方が含まれる。薬学的に

50

許容される塩には、酸付加塩（タンパク質の遊離アミノ基と共に形成される）が含まれ、これらは、例えば、塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸などの無機酸、ならびに限定されるものではないが酢酸、2,2-ジクロロ酢酸、アジピン酸、アルギン酸、アスコルビン酸、アスパラギン酸、ベンゼンスルホン酸、安息香酸、4-アセトアミド安息香酸、樟脳酸、樟脳-10-スルホン酸、カプリン酸、カプロン酸、カプリル酸、炭酸、桂皮酸、クエン酸、シクラミン酸、ドデシル硫酸、エタン-1,2-ジスルホン酸、エタンスルホン酸、2-ヒドロキシエタンスルホン酸、ギ酸、フマル酸、ガラクトール酸、ゲンチシン酸、グルコヘプトン酸、グルコン酸、グルクロン酸、グルタミン酸、グルタル酸、2-オキソグルタル酸、グリセロリン酸、グリコール酸、馬尿酸、イソ酪酸、乳酸、ラクトビオン酸、ラウリン酸、マレイン酸、リンゴ酸、マロン酸、マンデル酸、メタンスルホン酸、粘液酸、ナフタレン-1,5-ジスルホン酸、ナフタレン-2-スルホン酸、1-ヒドロキシ-2-ナフトエ酸、ニコチン酸、オレイン酸、オロト酸、シュウ酸、パルミチン酸、パモ酸、プロピオン酸、ピログルタミン酸、ピルビン酸、サリチル酸、4-アミノサリチル酸、セバシン酸、ステアリン酸、コハク酸、酒石酸、チオシアン酸、pトルエンスルホン酸、トリフルオロ酢酸、ウンデシレン酸などの有機酸と共に形成される。遊離カルボキシル基と共に形成される塩はまた、例えば、ナトリウム、カリウム、リチウム、アンモニウム、カルシウム、マグネシウム、鉄、亜鉛、銅、マンガン、アルミニウム塩などの無機塩基に由来し得る。有機塩基に由来する塩は、限定されるものではないが、第一級、第二級、及び第三級アミン、天然に存在する置換アミンを含む置換アミン、環状アミン及び塩基性イオン交換樹脂、例えばアンモニア、イソプロピルアミン、トリメチルアミン、ジエチルアミン、トリエチルアミン、トリプロピルアミン、ジエタノールアミン、エタノールアミン、デアノール、2-ジメチルアミノエタノール、2-ジエチルアミノエタノール、ジシクロヘキシルアミン、リジン、アルギニン、ヒスチジン、カフェイン、プロカイン、ヒドラバミン、コリン、ベタイン、ベネタミン、ベンザチン、エチレンジアミン、グルコサミン、メチルグルカミン、テオブロミン、トリエタノールアミン、トロメタミン、プリン、ペペラジン、ペペリジン、N-エチルペペリジン、ポリアミン樹脂などの塩を含む。特に好ましい有機塩基は、イソプロピルアミン、ジエチルアミン、エタノールアミン、トリメチルアミン、ジシクロヘキシルアミン、コリン、及びカフェインである。

10

20

30

40

50

【0551】

本開示は、がん性細胞への組成物の細胞内送達に十分な条件下で、本明細書に記載のRNAポリヌクレオチドもしくは粒子、またはその組成物に細胞を曝露することを含む、がん性細胞または標的細胞を殺傷する方法を提供する。本明細書で使用される場合、「がん性細胞」または「標的細胞」は、本明細書に記載のポリヌクレオチドもしくは粒子、または本明細書に記載のその組成物による処置または投与のために選択される哺乳動物細胞を指す。本明細書で使用される場合、「がん性細胞を殺傷する」とは、特に、アポトーシスまたは壊死によるがん性細胞の死を指す。がん性細胞の殺傷は、腫瘍サイズ測定、細胞数、ならびにアネキシンVなどの細胞死マーカーの検出及びヨウ化プロピジウムの組み込みについてのフローサイトメトリーを含むがこれらに限定されない、当技術分野で公知である方法によって決定され得る。

【0552】

本開示は、がんの処置または防止を必要とする対象においてそれを行う方法であって、有効量の本明細書に記載の医薬組成物が対象に投与される方法をさらに提供する。投与経路は、当然、処置される疾患の位置及び性質によって異なり、例えば、皮内、経皮（transdermal）、真皮下、非経口、経鼻、静脈内、筋肉内、鼻腔内、皮下、経皮（percutaneous）、気管内、腹腔内、腫瘍内、灌流、洗浄、直接的注入、及び経口投与を含み得る。本明細書に記載のカプセル化ポリヌクレオチド組成物は、全身投与が組成物を複数の器官及び／または細胞種に送達するために必要であり得る、転移性がんの処置において特に有用である。したがって、特定の実施形態では、本明細書に記載の組成物は、全身的に投与される。

【0553】

本明細書で互換的に使用される「有効量」または「有効用量」は、疾患または状態の症状の改善または向上をもたらす、本明細書に記載の組成物の量及び／または用量を指す。改善は、疾患もしくは状態、または疾患もしくは状態の症状のあらゆる改善または向上である。改善は、観察可能もしくは測定可能な改善であるか、または対象の全体的健康感における改善であり得る。したがって、当業者は、処置が疾患状態を改善する可能性があるが、疾患の完全な治癒ではない可能性があることを認識している。対象における改善は、限定されるものではないが、腫瘍量の減少、腫瘍細胞増殖の減少、腫瘍細胞死の増加、免疫経路の活性化、腫瘍進行までの時間の増加、がん性疼痛の減少、生存率の増加、または生活の質の改善を含み得る。

【0554】

いくつかの実施形態では、有効用量の投与は、本明細書に記載の組成物の単回用量の投与で達成され得る。本明細書で使用される場合、「用量」は、一度に送達される組成物の量を指す。いくつかの実施形態では、組換えRNA分子の用量は、50%組織培養感染用量(TCID₅₀)として測定される。いくつかの実施形態では、TCID₅₀は、少なくとも約 $10^3 \sim 10^9$ TCID₅₀/mL、例えば、少なくとも約 10^3 TCID₅₀/mL、約 10^4 TCID₅₀/mL、約 10^5 TCID₅₀/mL、約 10^6 TCID₅₀/mL、約 10^7 TCID₅₀/mL、約 10^8 TCID₅₀/mL、または約 10^9 TCID₅₀/mLである。いくつかの実施形態では、用量は、所与の体積中の粒子の数（例えば、粒子/mL）によって測定され得る。いくつかの実施形態では、用量は、各粒子に存在する本明細書に記載のRNAポリヌクレオチドのゲノムコピー数によってさらに洗練され得る（例えば、各粒子が、ポリヌクレオチドの少なくとも1つのゲノムコピーを含む、粒子数/mL）。いくつかの実施形態では、有効用量の送達は、本明細書に記載の組成物の複数用量の投与を必要とし得る。したがって、有効用量の投与は、本明細書に記載の組成物の少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、またはそれ以上の用量の投与を必要とし得る。

【0555】

本明細書に記載の組成物の複数の用量が投与される実施形態では、各用量は、同じ人物によって及び／または同じ地理的位置で投与される必要はない。さらに、投薬は、所定のスケジュールに従って投与され得る。例えば、所定の投薬スケジュールは、本明細書に記載の組成物の用量を、毎日、隔日、毎週、隔週、毎月、隔月、毎年、半年ごとなどに投与することを含み得る。所定の投薬スケジュールは、所与の患者に対して必要に応じて調整することができる（例えば、投与される組成物の量は増加または減少させることができ、及び／または用量の頻度は増加または減少させることができ、及び／または投与される用量の総数は増加または減少させることができる）。

【0556】

本明細書で使用される場合、「防止」または「予防」は、疾患の症状の完全な防止、疾患の症状の発症の遅延、またはその後発生する疾患の症状の重篤度の軽減を意味し得る。

【0557】

本明細書で使用される「対象」または「患者」という用語は、本明細書に記載の組成物が本明細書に記載の方法に従って投与される任意の哺乳動物対象を意味すると解釈される。特定の実施形態では、本開示の方法は、ヒト対象を処置するために利用される。本開示の方法は、非ヒト霊長類（例えば、サル、ヒヒ、及びチンパンジー）、マウス、ラット、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、ブタ、ウサギ、ヤギ、シカ、ヒツジ、フェレット、スナネズミ、モルモット、ハムスター、コウモリ、トリ（例えば、ニワトリ、シチメンチョウ、及びアヒル）、魚類、及び爬虫類を処置するためにも利用され得る。

【0558】

いくつかの実施形態では、本開示は、がんの処置を必要とする対象においてそれを行う方法であって、治療有効量の、腫瘍溶解性コクサッキーウイルスであって、CVA21株であるコクサッキーウイルス、またはCVA21をコードするポリヌクレオチドを対象に

10

20

30

40

50

投与することを含み、がんが、がんにおけるICAM-1の発現レベル及び／またはICAM-1陽性がん細胞のパーセンテージに基づいてCVA21感染感受性と分類される、方法を提供する。いくつかの実施形態では、CVA21株はCVA21-KYである。

【0559】

細胞内接着分子1（ICAM-1、別名BB2、CD54、P3.58）は、ICAM1遺伝子（NCBI遺伝子ID：3383）によってコードされるタンパク質（UniProt Ref：P03562）であり、細胞間相互作用の安定化及び白血球内皮遊出の促進において重要である。いくつかの実施形態では、特定のがんに関する処置の決断は、ICAM-1発現に基づいて下され、ICAM-1の発現は、がんにおいて決定され、がんは、ICAM-1発現のレベルに基づいてCVA21発現に対して感受性または抵抗性であると識別される。概して、ICAM-1の発現（陽性腫瘍細胞の割合（%）もしくは強度、またはその両方）が高いほど、CVA21感染への感受性が高いことを示す（実施例8を参照されたい）。ICAM-1発現は、mRNA及び／またはタンパク質の発現について当技術分野で公知である手段によって決定することができる。mRNA発現は、ノーザンブロット、リボヌクレアーゼ保護アッセイ、PCRベースの方法、シーケンシング方法などによって決定することができる。タンパク質発現は、イムノブロットング（例えばウエスタンブロット）、免疫組織化学、免疫蛍光、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）、フローサイトメトリー、サイトメトリックビーズアレイ、質量分析法、プロテオミクススペースの方法などによって決定することができる。

【0560】

いくつかの実施形態では、本開示は、がんの処置を必要とする対象においてそれを行う方法であって、（a）がんにおけるICAM-1の発現レベル及び／またはICAM-1陽性がん細胞のパーセンテージを決定すること、（b）がんを、（a）で決定されたICAM-1の発現レベル及び／またはICAM-1陽性がん細胞のパーセンテージに基づいて、コクサッキーウイルス21（CVA21）感染感受性と分類すること、ならびに（c）がんがステップ（b）でCVA21感染感受性と分類された場合、治療有効量のCVA21またはCVA21をコードするポリヌクレオチドを対象に投与することを含む、方法を提供する。いくつかの実施形態では、CVA21株はCVA21-KYである。

【0561】

いくつかの実施形態では、本開示は、コクサッキーウイルス21（CVA21）またはCVA21をコードするポリヌクレオチドによる処置のために、がんに罹患している対象を選択する方法であって、（a）がんにおけるICAM-1の発現レベル及び／またはICAM-1陽性がん細胞のパーセンテージを決定すること、（b）がんを、（a）で決定されたICAM-1の発現レベル及び／またはICAM-1陽性がん細胞のパーセンテージに基づいて、CVA21感染感受性と分類すること、（c）がんが（b）でCVA21感染感受性と分類された場合、CVA21またはCVA21をコードするポリヌクレオチドによる処置のために対象を選択すること、ならびに（d）選択された対象に、CVA21またはCVA21をコードするポリヌクレオチドを投与することを含む、方法を提供する。いくつかの実施形態では、CVA21株はCVA21-KYである。

【0562】

脂質ナノ粒子組成物及び使用方法

いくつかの実施形態では、本開示は、疾患または障害の処置を必要とする対象においてそれを行う方法であって、治療有効量の本開示の組成物（例えば、医薬組成物）を対象に投与することを含む方法を提供する。いくつかの実施形態では、疾患または障害は、がんを含む。いくつかの実施形態では、該組成物は、本開示のPEG脂質を含む。いくつかの実施形態では、該組成物は、PEG脂質を含む本開示のLNPを含む。いくつかの実施形態では、該組成物は、PEG脂質及び本開示のカプセル化分子（例えば、合成RNAウイルスゲノム）を含む本開示のLNPを含む。

【0563】

この方法は、特にカプセル化分子が治療剤である場合に、カプセル化分子が有効である

状態を有するか、または有するリスクのある対象を処置する方法であり得る。あるいは、この方法は、対象を診断する方法であり得、その場合、カプセル化分子は診断剤であり得る。

【0564】

予防的用途では、本開示のLNPを含む医薬組成物は、特定の障害にかかりやすい、またはさもなければそのリスクのある対象に、障害のリスクを消失もしくは低減させる、またはその発症を遅延させるのに十分な量で投与される。治療的用途では、本開示のLNPを含む組成物は、かかる障害の疑いがある、または既にそれに罹患している対象に、障害及びその合併症の症状を治癒する、または少なくとも部分的に止めるのに十分な量で投与される。これを達成するための適切な量は、治療有効用量または治療有効量と称される。予防及び治療のいずれの体制でも、十分な応答が達成されるまで複数の投与量で医薬組成物を投与することができる。典型的には、応答をモニターし、所望の応答が弱まり始めれば繰り返し投与量を与える。

10

【0565】

投与のために、本開示のLNPは、医薬組成物として製剤化され得る。いくつかの実施形態では、LNPは、カプセル化分子を含む。医薬組成物は、(i)本開示のLNP、及び(ii)薬学的に許容される担体、希釈剤、または賦形剤を含み得る。医薬組成物は、薬学的に有用な組成物を調製するための既知の方法に従って製剤化することができ、それにより、治療用分子は、薬学的に許容される担体、希釈剤、または賦形剤との混合物中に組み合わされる。担体は、その投与がレシピエント対象によって忍容され得る場合、「薬学的に許容される担体」と言われる。滅菌リン酸緩衝食塩水は、薬学的に許容される担体の一例である。他の好適な担体、希釈剤、または賦形剤は当業者に周知である(例えば、Gennaro(ed.), Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company, 19th ed., 1995)を参照のこと)。製剤は、バイアル表面でのタンパク質の損失などを防止するために、1つ以上の賦形剤、防腐剤、可溶化剤、緩衝剤、アルブミンをさらに含むことができる。

20

【0566】

本開示のLNPを含む医薬組成物は、経口単位剤形、静脈内単位剤形、鼻腔内単位剤形、坐薬単位剤形、皮内単位剤形、筋肉内単位剤形、腹腔内単位剤形、皮下単位剤形、硬膜外単位剤形、舌下単位剤形、及び脳内単位剤形からなる群から選択される剤形で製剤化され得る。経口単位剤形は、錠剤、丸薬、ペレット、カプセル、粉末、トローチ剤、顆粒、溶液、懸濁液、乳剤、シロップ、エリキシル剤、徐放性製剤、エアロゾル、及びスプレーからなる群から選択され得る。

30

【0567】

医薬組成剤は、治療有効量で対象に投与され得る。本開示の方法によれば、組成物は、例えば、筋肉内、皮下、静脈内、心房内、関節内、非経口、鼻腔内、肺内、経皮、胸膜内、くも膜下腔内、腫瘍内、及び経口投与経路を含む様々な投与様式によって対象に投与することができる。防止及び処置の目的では、組成物は、単回ボラス送達で、長期間にわたる連続送達(例えば、連続経皮送達)を介して、または繰り返し投与プロトコル(例えば、時間単位、日単位、週単位、または月単位)で対象に投与することができる。

40

【0568】

投与は、注射、灌注、吸入、摂取、電気浸透、血液透析、イオン泳動、及び当技術分野で公知である他の方法によって行うことができる。投与経路は、当然、処置される疾患の位置及び性質によって変わり、例えば、耳介、頬側、結膜、皮膚、歯、子宮頸管内、副鼻腔内、気管内、腸内、硬膜外、間質内、関節内、動脈内、腹内、耳介内、胆管内、気管支内、嚢内、海綿内、脳内、槽内、角膜内、歯冠内、冠動脈内、頭蓋内、皮内、円板内、腺管内、十二指腸内、十二指腸内、硬膜内、心外膜内、表皮内、食道内、胃内、歯肉内、肝内、回腸内、病巣内、舌内、管腔内、リンパ腺内、乳腺内、骨髓内、髄膜内、筋肉内、鼻腔内、節内、眼内、網内、卵巣内、腹腔内、心膜内、胸膜内、前立腺内、肺内、第一胃内

50

、洞内、脊髄内、滑液嚢内、腱内、精巣内、気管内、髄腔内、胸郭内、小管内、腫瘍内、鼓室内、子宮内、腹腔内、脈管内、脳室内、膀胱内、前庭内、静脈内、硝子体内、喉頭部、経鼻、経鼻胃、経口、眼、口咽頭、非経口、経皮（*percutaneous*）、関節周囲、硬膜外、神経周囲、歯周、呼吸器、尿細管後、直腸、脊髄、くも膜下、結膜下、皮下、真皮下、歯肉下、舌下、粘膜下、網膜下、局所、経皮（*transdermal*）、経心内膜、経粘膜、経胎盤、経気管、経鼓膜、尿管、尿道、及び／または腔灌流、洗浄、直接注射、ならびに経口による投与を含み得る。

【0569】

いくつかの実施形態では、医薬組成物は、全身投与用に製剤化されている。いくつかの実施形態では、全身投与は、静脈内投与、動脈内投与、腹腔内投与、筋肉内投与、皮内投与、皮下投与、鼻腔内投与、経口投与、またはそれらの組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、静脈内投与用に製剤化されている。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、局所投与用に製剤化されている。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、腫瘍内投与用に製剤化されている。

【0570】

本開示の組成物の有効用量は、投与手段、標的部位、対象の生理学的状態、対象がヒトであるか動物であるか、投与される他の薬剤、処置が予防的であるか治療的であるか、ならびに、組成物自体の比活性及び個体において所望される応答を誘起する能力を含む、多くの異なる要因に応じて変わる。いくつかの実施形態では、対象はヒトである。いくつかの実施形態では、対象は非ヒト哺乳動物であり得る。典型的に、投与計画は、最適な治療応答を提供するように、すなわち、安全性及び有効性を最適化するように調整される。

【0571】

この文脈における有効投与量の決定は、典型的には、ヒト臨床試験が後に続く動物モデル研究に基づくものであり、モデル対象における対象障害の発生または重篤度を著しく低減させる有効投与量及び投与プロトコルを決定することによって導かれる。本開示の組成物は、一度にまたは一連の処置にわたって対象に好適に投与することができ、診断以降の任意の時点で対象に投与することができる。本開示の組成物は、問題になっている状態の処置に有用な、単独処置として、単剤療法として、または他の薬物もしくは療法と併せて、併用療法として投与され得る。

【0572】

いくつかの実施形態では、本開示の組成物の治療有効量は、約 $1 \text{ ng} / \text{kg}$ 体重～約 $100 \text{ mg} / \text{kg}$ 体重である。いくつかの実施形態では、投与される本開示の組成物の範囲は、約 $1 \text{ ng} / \text{kg}$ 体重～約 $1 \mu\text{g} / \text{kg}$ 体重、約 $1 \text{ ng} / \text{kg}$ 体重～約 $100 \text{ ng} / \text{kg}$ 体重、約 $1 \text{ ng} / \text{kg}$ 体重～約 $10 \text{ ng} / \text{kg}$ 体重、約 $10 \text{ ng} / \text{kg}$ 体重～約 $1 \mu\text{g} / \text{kg}$ 体重、約 $10 \text{ ng} / \text{kg}$ 体重～約 $100 \text{ ng} / \text{kg}$ 体重、約 $100 \text{ ng} / \text{kg}$ 体重～約 $1 \mu\text{g} / \text{kg}$ 体重、約 $100 \text{ ng} / \text{kg}$ 体重～約 $10 \text{ pg} / \text{kg}$ 体重、約 $1 \mu\text{g} / \text{kg}$ 体重～約 $10 \text{ pg} / \text{kg}$ 体重、約 $1 \mu\text{g} / \text{kg}$ 体重～約 $100 \text{ pg} / \text{kg}$ 体重、約 $10 \text{ pg} / \text{kg}$ 体重～約 $100 \text{ pg} / \text{kg}$ 体重、約 $10 \text{ pg} / \text{kg}$ 体重～約 $1 \text{ mg} / \text{kg}$ 体重、約 $100 \mu\text{g} / \text{kg}$ 体重～約 $10 \text{ mg} / \text{kg}$ 体重、約 $1 \text{ mg} / \text{kg}$ 体重～約 $100 \text{ mg} / \text{kg}$ 体重、または約 $10 \text{ mg} / \text{kg}$ 体重～約 $100 \text{ mg} / \text{kg}$ 体重である。この範囲内の投与量は、例えば、1日に複数の投与、または毎日、毎週、隔週、もしくは毎月の投与を含め、単回または複数回の投与によって達成され得る。本開示の組成物は、必要もしくは適応に応じて、ボラスもしくは持続注入による単回用量として、またはボラスもしくは持続注入による複数用量として投与され得る。複数用量は、例えば、1日に複数回、1日1回、2、3、4、5、6もしくは7日ごと、毎週、2、3、4、5もしくは6週ごと、または毎月投与され得る。いくつかの実施形態では、本開示の組成物は、毎週投与される。いくつかの実施形態では、本開示の組成物は、隔週投与される。いくつかの実施形態では、本開示の組成物は、3週間ごとに投与される。しかしながら、他の投薬レジメンが有用な場合がある。この療法の進展は、従来の技術によって容易にモニターされる。

【0573】

成人対象への投与の場合、治療有効量は、投薬ごとに0.0006mg、投薬ごとに0.001mg、投薬ごとに0.003mg、投薬ごとに0.006mg、投薬ごとに0.01mg、投薬ごとに0.03mg、投薬ごとに0.06mg、投薬ごとに0.1mg、投薬ごとに0.3mg、投薬ごとに0.6mg、投薬ごとに1mg、投薬ごとに3mg、投薬ごとに6mg、投薬ごとに10mg、投薬ごとに30mg、投薬ごとに60mg、投薬ごとに100mg、投薬ごとに300mg、投薬ごとに600mg、及び投薬ごとに1000mgを含むがこれらに限定されない、投薬ごとに0.0006mg～1000mgの範囲内の用量で投与することができ、複数の、通常は連続した日用量を処置の過程で投与することができる。いくつかの実施形態では、本開示の組成物は、約0.001mg/kg投薬～約10mg/kg投薬、約0.001mg/kg投薬～約6mg/kg投薬、約0.001mg/kg投薬～約3mg/kg投薬、約0.001mg/kg投薬～約1mg/kg投薬、約0.001mg/kg投薬～約0.6mg/kg投薬、約0.001mg/kg投薬～約0.3mg/kg投薬、約0.001mg/kg投薬～約0.1mg/kg投薬、約0.001mg/kg投薬～約0.06mg/kg投薬、約0.001mg/kg投薬～約0.03mg/kg投薬、約0.001mg/kg投薬～約0.01mg/kg投薬、約0.001mg/kg投薬～約0.006mg/kg投薬、約0.001mg/kg投薬～約0.003mg/kg投薬、約0.003mg/kg投薬～約10mg/kg投薬、約0.003mg/kg投薬～約6mg/kg投薬、約0.003mg/kg投薬～約3mg/kg投薬、約0.003mg/kg投薬～約1mg/kg投薬、約0.003mg/kg投薬～約0.6mg/kg投薬、約0.003mg/kg投薬～約0.3mg/kg投薬、約0.003mg/kg投薬～約0.1mg/kg投薬、約0.003mg/kg投薬～約0.06mg/kg投薬、約0.003mg/kg投薬～約0.03mg/kg投薬、約0.003mg/kg投薬～約0.01mg/kg投薬、約0.006mg/kg投薬～約10mg/kg投薬、約0.006mg/kg投薬～約6mg/kg投薬、約0.006mg/kg投薬～約3mg/kg投薬、約0.006mg/kg投薬～約1mg/kg投薬、約0.006mg/kg投薬～約0.6mg/kg投薬、約0.006mg/kg投薬～約0.3mg/kg投薬、約0.006mg/kg投薬～約0.1mg/kg投薬、約0.006mg/kg投薬～約0.06mg/kg投薬、約0.006mg/kg投薬～約0.03mg/kg投薬、約0.006mg/kg投薬～約0.01mg/kg投薬、約0.01mg/kg投薬～約10mg/kg投薬、約0.01mg/kg投薬～約6mg/kg投薬、約0.01mg/kg投薬～約3mg/kg投薬、約0.01mg/kg投薬～約1mg/kg投薬、約0.01mg/kg投薬～約0.6mg/kg投薬、約0.01mg/kg投薬～約0.3mg/kg投薬、約0.01mg/kg投薬～約0.1mg/kg投薬、約0.01mg/kg投薬～約0.06mg/kg投薬、約0.01mg/kg投薬～約0.03mg/kg投薬、約0.01mg/kg投薬～約0.01mg/kg投薬、約0.03mg/kg投薬～約10mg/kg投薬、約0.03mg/kg投薬～約6mg/kg投薬、約0.03mg/kg投薬～約3mg/kg投薬、約0.03mg/kg投薬～約1mg/kg投薬、約0.03mg/kg投薬～約0.6mg/kg投薬、約0.03mg/kg投薬～約0.3mg/kg投薬、約0.03mg/kg投薬～約0.1mg/kg投薬、約0.03mg/kg投薬～約0.06mg/kg投薬、約0.03mg/kg投薬～約0.01mg/kg投薬、約0.06mg/kg投薬～約10mg/kg投薬、約0.06mg/kg投薬～約6mg/kg投薬、約0.06mg/kg投薬～約3mg/kg投薬、約0.06mg/kg投薬～約1mg/kg投薬、約0.06mg/kg投薬～約0.6mg/kg投薬、約0.06mg/kg投薬～約0.3mg/kg投薬、約0.06mg/kg投薬～約0.1mg/kg投薬、約0.06mg/kg投薬～約0.06mg/kg投薬、約0.06mg/kg投薬～約0.03mg/kg投薬、約0.06mg/kg投薬～約0.01mg/kg投薬、約0.1mg/kg投薬～約10mg/kg投薬、約0.1mg/kg投薬～約6mg/kg投薬、約0.1mg/kg投薬～約3mg/kg投薬、約0.1mg/kg投薬～約1mg/kg投薬、約0.1

10

20

30

40

50

mg/kg/投薬～約0.6mg/kg/投薬、約0.1mg/kg/投薬～約0.3mg/kg/投薬、約0.3mg/kg/投薬～約10mg/kg/投薬、約0.3mg/kg/投薬～約6mg/kg/投薬、約0.3mg/kg/投薬～約3mg/kg/投薬、約0.3mg/kg/投薬～約1mg/kg/投薬、約0.3mg/kg/投薬～約0.6mg/kg/投薬、約0.6mg/kg/投薬～約10mg/kg/投薬、約0.6mg/kg/投薬～約6mg/kg/投薬、約0.6mg/kg/投薬～約3mg/kg/投薬、約0.6mg/kg/投薬～約1mg/kg/投薬、約1mg/kg/投薬～約10mg/kg/投薬、約1mg/kg/投薬～約6mg/kg/投薬、約1mg/kg/投薬～約3mg/kg/投薬、約3mg/kg/投薬～約10mg/kg/投薬、約3mg/kg/投薬～約6mg/kg/投薬、または約6mg/kg/投薬～約10mg/kg/投薬の用量レベルで投与される。いくつかの実施形態では、本開示の組成物は、約0.001mg/kg/投薬、約0.003mg/kg/投薬、約0.006mg/kg/投薬、約0.01mg/kg/投薬、約0.03mg/kg/投薬、約0.06mg/kg/投薬、約0.1mg/kg/投薬、約0.3mg/kg/投薬、約0.6mg/kg/投薬、約1mg/kg/投薬、約3mg/kg/投薬、約6mg/kg/投薬、または約10mg/kg/投薬の用量レベルで投与される。本開示の組成物は、1日のうちの様々な時点で投与することができる。一実施形態において、最適な治療用量は夕方に投与され得る。別の実施形態では、最適な治療用量は午前中に投与され得る。予想されるとおり、投与量は、対象の状態、サイズ、年齢、及び状態に依存する。

10

【0574】

20

医薬組成物の投与量は、標的部位における所望の濃度を維持するように担当医が変更することができる。送達の様式に基づいて、より高いまたはより低い濃度が選択され得る。また、投与量は、投与される製剤の放出速度に基づいて調整されるべきである。

【0575】

いくつかの実施形態では、本開示の医薬組成物は、複数回（例えば、複数用量）で対象に投与される。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、2回以上、3回以上、4回以上などで投与される。いくつかの実施形態では、医薬組成物の投与は、1回、2回、3回、4回、5回、6回、7回、8回、9回、10回、またはそれ以上繰り返され得る。医薬組成物は、その意図される目的に応じて、慢性的または急性的に投与され得る。

【0576】

30

いくつかの実施形態では、医薬組成物の2回の連続する投薬間の間隔は、4週間未満、3週間未満、2週間未満、または1週間未満である。いくつかの実施形態では、2回の連続する投薬間の間隔は、3週間未満である。いくつかの実施形態では、2回の連続する投薬間の間隔は、2週間未満である。いくつかの実施形態では、2回の連続する投薬間の間隔は、1週間未満である。いくつかの実施形態では、2回の連続する投薬間の間隔は、28日未満、27日未満、26日未満、25日未満、24日未満、23日未満、22日未満、21日未満、20日未満、19日未満、18日未満、17日未満、16日未満、15日未満、14日未満、13日未満、12日未満、11日未満、10日未満、9日未満、8日未満、7日未満、6日未満、5日未満、4日未満、3日未満、2日未満、または1日未満である。いくつかの実施形態では、医薬組成物の2回の連続する投薬間の間隔は、少なくとも4、少なくとも3、少なくとも2、または少なくとも1週間である。いくつかの実施形態では、本開示の医薬組成物の2回の連続する投薬間の間隔は、少なくとも3週間である。いくつかの実施形態では、本開示の医薬組成物の2回の連続する投薬間の間隔は、少なくとも2週間である。いくつかの実施形態では、本開示の医薬組成物の2回の連続する投薬間の間隔は、少なくとも1週間である。いくつかの実施形態では、本開示の医薬組成物の2回の連続する投薬間の間隔は、少なくとも28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、または1日である。いくつかの実施形態では、対象は、本開示の医薬組成物の用量を毎日、2日ごと、3日ごと、4日ごと、5日ごと、6日ごと、7日ごと、8日ごと、9日ごと、10日ごと、11日ごと、12日ごと、13日ごと、

40

50

14日ごと、15日ごと、16日ごと、17日ごと、18日ごと、19日ごと、20日ごと、21日ごと、22日ごと、23日ごと、24日ごと、25日ごと、26日ごと、27日ごと、または28日ごとに1回投与される。いくつかの実施形態では、対象は、本開示の医薬組成物の用量を4週ごと、5週ごと、6週ごと、7週ごと、8週ごと、9週ごと、10週ごと、11週ごと、または12週ごとに1回投与される。いくつかの実施形態では、対象は、本開示の医薬組成物の用量を1か月ごと、2か月ごと、3か月ごと、4か月ごと、5か月ごと、6か月ごと、7か月ごと、8か月ごと、9か月ごと、10か月ごと、11か月ごと、または12か月ごとに1回投与される。

【0577】

いくつかの実施形態では、本開示の医薬組成物は複数回投与され、第2及び／または後続の投与後の対象におけるLNPの血清半減期は、第1の投与後のLNPの血清半減期の少なくとも40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、または95%である。

【0578】

いくつかの実施形態では、カプセル化分子（例えば、LNPにカプセル化された）を含む医薬組成物の第2及び後続の用量は、第2の投与または後続の投与後少なくとも1日間、2日間、3日間、4日間、5日間、6日間、または7日間にわたって、第1の用量の活性の少なくとも50%、または第1の用量の少なくとも60%、または第1の用量の少なくとも70%、または第1の用量の少なくとも75%、または第1の用量の少なくとも80%、または第1の用量の少なくとも85%、または第1の用量の少なくとも90%、または第1の用量の少なくとも95%、またはそれ以上であるカプセル化分子の活性を維持し得る。

【0579】

いくつかの実施形態では、本開示の医薬組成物は、約1時間以上、約2時間以上、約3時間以上、約4時間以上、約5時間以上、約6時間以上、約7時間以上、約8時間以上、約9時間以上、約10時間以上、約12時間以上、約14時間以上、約16時間以上、約18時間以上、約20時間以上、約25時間以上、約30時間以上、約35時間以上、約40時間以上、約45時間以上、または約50時間以上のin vivo治療効果持続期間を有する。いくつかの実施形態では、本開示の医薬組成物は、少なくとも1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、8時間、9時間、10時間、11時間、12時間、13時間、14時間、15時間、16時間、17時間、18時間、19時間、20時間、21時間、22時間、23時間、24時間、1.5日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、または10日のin vivo治療効果持続期間を有する。

【0580】

いくつかの実施形態では、本開示の医薬組成物は、所定の閾値のものに匹敵するin vivo半減期を有する。いくつかの実施形態では、本開示の医薬組成物は、所定の閾値のものよりも長いin vivo半減期を有する。いくつかの実施形態では、本開示の医薬組成物は、所定の閾値のものよりも短いin vivo半減期を有する。いくつかの実施形態では、所定の閾値は、LNPが、(i)式(A)、(A')、もしくは(A'')のものではないPEG脂質（例えば、対照組成物中のLNPのPEG脂質はPEG2k-DPGであり得る）、または(ii)式(I)のものではないカチオン性脂質を含むことを除いては同じペイロード分子及びLNPを含む対照組成物の半減期である。

【0581】

いくつかの実施形態では、本開示の医薬組成物は、繰り返し投薬後に、先行投薬後のAUC（血液濃度－時間曲線下面積）の少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、または少なくとも100%であるAUCを有する。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、先行投薬後のAUCの少なくとも60%であるAUCを有する。いくつかの実施形態では、繰り返し投薬後、医薬組成物のAUCは、先行投薬後のAUCと比較して70%未満、60%未満、60%未満、40%未満、30%未満、20%未満、10%未満、また

は5%未満減少する。いくつかの実施形態では、繰り返し投薬後、医薬組成物のAUCは、先行投薬後のAUCと比較して40%未満減少する。

【0582】

いくつかの実施形態では、本開示の医薬組成物は、腫瘍溶解性ウイルスのウイルスゲノムをコードする核酸分子を含み、腫瘍を有する対象への医薬組成物の投与により、核酸分子が腫瘍細胞中に送達される。いくつかの実施形態では、核酸分子は、RNA分子である。いくつかの実施形態では、医薬組成物の投与は、腫瘍細胞における腫瘍溶解性ウイルスの複製をもたらす。いくつかの実施形態では、腫瘍を有する対象への医薬組成物の投与は、正常細胞と比較して、腫瘍細胞における腫瘍溶解性ウイルスの選択的複製をもたらす。

【0583】

いくつかの実施形態では、腫瘍を有する対象への本開示の医薬組成物の投与は、腫瘍の成長を阻害する。いくつかの実施形態では、医薬組成物の投与は、少なくとも1週間、少なくとも1か月、少なくとも2か月、少なくとも3か月、少なくとも4か月、少なくとも6か月、少なくとも9か月、少なくとも12か月、少なくとも2年、またはそれ以上にわたって腫瘍の成長を阻害する。いくつかの実施形態では、腫瘍の成長の阻害は、規定期間にわたって医薬組成物の投与直前の腫瘍のサイズの100%以内に腫瘍のサイズを制御することを意味する。いくつかの実施形態では、腫瘍の成長の阻害は、医薬組成物の投与直前の腫瘍のサイズの110%以内、120%以内、130%以内、140%以内、または150%以内に腫瘍のサイズを制御することを意味する。

【0584】

いくつかの実施形態では、腫瘍を有する対象への医薬組成物の投与は、腫瘍の縮小または消失につながる。いくつかの実施形態では、医薬組成物の投与は、少なくとも1週間、少なくとも1か月、少なくとも2か月、少なくとも3か月、少なくとも4か月、少なくとも6か月、少なくとも9か月、少なくとも12か月、少なくとも2年、またはそれ以上にわたる腫瘍の縮小または消失につながる。いくつかの実施形態では、医薬組成物の投与は、1週間以内、2週間以内、3週間以内、4週間以内、1か月以内、2か月以内、3か月以内、4か月以内、6か月以内、9か月以内、12か月以内、または2年以内に腫瘍の縮小または消失につながる。いくつかの実施形態では、腫瘍の縮小は、腫瘍のサイズを、医薬組成物の投与直前の腫瘍のサイズと比較して少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、または少なくとも95%低減させることを意味する。いくつかの実施形態では、腫瘍の縮小は、腫瘍のサイズを、医薬組成物の投与直前の腫瘍のサイズと比較して少なくとも30%低減させることを意味する。

【0585】

医薬組成物は、本明細書に記載の医薬組成物を含む容器を備えるキットとして供給することができる。医薬組成物は、例えば、単回もしくは複数回用量の注射可能な溶液の形態で、または注射前に再構成される滅菌粉末として提供することができる。あるいは、そのようなキットは、医薬組成物を投与するための乾燥粉末分散器、液体エアロゾル発生器、またはネブライザーを含むことができる。そのようなキットは、医薬組成物の適応症及び使用法に関する書面情報をさらに備えることができる。

【0586】

本開示は、がんの処置を必要とする対象においてそれを行う方法であって、治療有効量の本明細書に記載される組成物を対象に投与することを含む方法に関する。

【0587】

いくつかの実施形態では、本開示は、細胞にカプセル化分子を送達する方法を提供し、この方法は、LNPまたはその医薬組成物と細胞を接触させることを含み、LNPは、カプセル化分子を含む。いくつかの実施形態では、カプセル化分子は、ウイルスをコードする核酸分子であり、細胞をLNPと接触させると、細胞によるウイルス粒子の産生がもたらされ、ウイルス粒子は、感染性及び溶解性である。

【0588】

いくつかの実施形態では、本開示は、本開示の L N P またはその医薬組成物を対象に投与することを含む、対象に L N P を送達する方法を提供する。いくつかの実施形態では、この方法は、複数投与を含む。いくつかの実施形態では、医薬組成物の 2 回の連続する投与間の間隔は、4 週間未満、3 週間未満、2 週間未満、または 1 週間未満である。いくつかの実施形態では、2 回の連続する投与間の間隔は、2 週間未満である。いくつかの実施形態では、2 回の連続する投与間の間隔は、1 週間未満である。いくつかの実施形態では、2 回の連続する投与間の間隔は、28 日未満、27 日未満、26 日未満、25 日未満、24 日未満、23 日未満、22 日未満、21 日未満、20 日未満、19 日未満、18 日未満、17 日未満、16 日未満、15 日未満、14 日未満、13 日未満、12 日未満、11 日未満、10 日未満、9 日未満、8 日未満、7 日未満、6 日未満、5 日未満、4 日未満、3 日未満、2 日未満、または 1 日未満である。いくつかの実施形態では、医薬組成物の 2 回の連続する投与間の間隔は、少なくとも 4、少なくとも 3、少なくとも 2、または少なくとも 1 週間である。いくつかの実施形態では、本開示の医薬組成物の 2 回の連続する投与間の間隔は、少なくとも 2 週間である。いくつかの実施形態では、本開示の医薬組成物の 2 回の連続する投与間の間隔は、少なくとも 1 週間である。いくつかの実施形態では、本開示の医薬組成物の 2 回の連続する投与間の間隔は、少なくとも 28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、または 1 日である。いくつかの実施形態では、この方法は、本開示の医薬組成物を対象に 1 日ごと、2 日ごと、3 日ごと、4 日ごと、5 日ごと、6 日ごと、7 日ごと、8 日ごと、9 日ごと、10 日ごと、11 日ごと、12 日ごと、13 日ごと、14 日ごと、15 日ごと、16 日ごと、17 日ごと、18 日ごと、19 日ごと、20 日ごと、21 日ごと、22 日ごと、23 日ごと、24 日ごと、25 日ごと、26 日ごと、27 日ごと、または 28 日ごとに投与することを含む。いくつかの実施形態では、この方法は、本開示の医薬組成物を対象に 4 週ごと、5 週ごと、6 週ごと、7 週ごと、8 週ごと、9 週ごと、10 週ごと、11 週ごと、または 12 週ごとに 1 回投与することを含む。いくつかの実施形態では、この方法は、本開示の医薬組成物を対象に 1 か月ごと、2 か月ごと、3 か月ごと、4 か月ごと、5 か月ごと、6 か月ごと、7 か月ごと、8 か月ごと、9 か月ごと、10 か月ごと、11 か月ごと、または 12 か月ごとに 1 回投与することを含む。

10

20

30

40

50

【0589】

いくつかの実施形態では、本開示は、本開示の L N P またはその医薬組成物を対象に投与することを含む、対象に L N P を送達する方法を提供し、この方法は、複数投与を含む。いくつかの実施形態では、この方法の第 2 及び／または後続の投与後の対象における L N P の血清半減期は、第 1 の投与後の L N P の血清半減期の少なくとも 40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、85 %、90 %、または 95 % である。

【0590】

いくつかの実施形態では、L N P は、繰り返し投薬後に、先行投薬後の A U C の少なくとも 30 %、少なくとも 40 %、少なくとも 50 %、少なくとも 60 %、少なくとも 70 %、少なくとも 80 %、少なくとも 90 %、または少なくとも 100 % である A U C を有する。いくつかの実施形態では、L N P は、先行投薬後の A U C の少なくとも 60 % である A U C を有する。いくつかの実施形態では、繰り返し投薬後、L N P の A U C は、先行投薬後の A U C と比較して 70 % 未満、60 % 未満、60 % 未満、40 % 未満、30 % 未満、20 % 未満、10 % 未満、または 5 % 未満減少する。いくつかの実施形態では、繰り返し投薬後、L N P の A U C は、先行投薬後の A U C と比較して 40 % 未満減少する。

【0591】

いくつかの実施形態では、本開示は、本開示の L N P またはその医薬組成物を対象に投与することを含む、対象に L N P を送達する方法を提供し、L N P は、腫瘍溶解性ウイルスのウイルスゲノムをコードする核酸分子を含み、対象は腫瘍を有し、L N P の投与により、核酸分子が腫瘍細胞中に送達される。いくつかの実施形態では、L N P の投与は、腫瘍細胞における腫瘍溶解性ウイルスの複製をもたらす。いくつかの実施形態では、L N P

の投与は、正常細胞と比較して、腫瘍細胞における腫瘍溶解性ウイルスの選択的複製をもたらす。

【0592】

いくつかの実施形態では、本開示は、本開示のLNPまたはその医薬組成物を対象に投与することを含む、対象にLNPを送達する方法を提供し、腫瘍を有する対象へのLNPの投与は、腫瘍の成長を阻害する。いくつかの実施形態では、この方法は、少なくとも1週間、少なくとも1か月、少なくとも2か月、少なくとも3か月、少なくとも4か月、少なくとも6か月、少なくとも9か月、少なくとも12か月、少なくとも2年、またはそれ以上にわたって腫瘍の成長を阻害する。いくつかの実施形態では、腫瘍の成長の阻害は、規定期間にわたって医薬組成物の投与直前の腫瘍のサイズの100%以内に腫瘍のサイズを制御することを意味する。いくつかの実施形態では、腫瘍の成長の阻害は、医薬組成物の投与直前の腫瘍のサイズの110%以内、120%以内、130%以内、140%以内、または150%以内に腫瘍のサイズを制御することを意味する。

10

【0593】

いくつかの実施形態では、本開示は、本開示のLNPまたはその医薬組成物を対象に投与することを含む、対象にLNPを送達する方法を提供し、腫瘍を有する対象へのLNPの投与は、腫瘍の縮小または消失につながる。いくつかの実施形態では、この方法は、少なくとも1週間、少なくとも1か月、少なくとも2か月、少なくとも3か月、少なくとも4か月、少なくとも6か月、少なくとも9か月、少なくとも12か月、少なくとも2年、またはそれ以上にわたる腫瘍の縮小または消失をもたらす。いくつかの実施形態では、この方法は、1週間以内、2週間以内、3週間以内、4週間以内、1か月以内、2か月以内、3か月以内、4か月以内、6か月以内、9か月以内、12か月以内、または2年以内に腫瘍の縮小または消失をもたらす。いくつかの実施形態では、腫瘍の縮小は、腫瘍のサイズを、医薬組成物の投与直前の腫瘍のサイズと比較して少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、または少なくとも95%低減させることを意味する。いくつかの実施形態では、腫瘍の縮小は、腫瘍のサイズを、医薬組成物の投与直前の腫瘍のサイズと比較して少なくとも30%低減させることを意味する。

20

【0594】

いくつかの実施形態では、本開示は、本開示のLNPまたはその医薬組成物を対象に投与することを含む、対象にLNPを送達する方法を提供し、腫瘍を有する対象へのLNPの投与は、がんの転移を阻害する。

30

【0595】

いくつかの実施形態では、対象は哺乳動物である。いくつかの実施形態では、対象はヒトである。いくつかの実施形態では、対象はがんを有し、この方法は、がんの成長及び／または転移を阻害または緩徐化する。

【0596】

いくつかの実施形態では、本開示は、LNPまたはその医薬組成物を全身投与することを含む、対象にLNPを送達する方法を提供する。いくつかの実施形態では、投与は、静脈内、動脈内、腹腔内、筋肉内、皮内、皮下、鼻腔内、経口、またはそれらの組み合わせである。

40

【0597】

いくつかの実施形態では、本開示は、LNPまたはその医薬組成物を局所投与することを含む、対象にLNPを送達する方法を提供する。いくつかの実施形態では、投与は、腫瘍内である。

【0598】

がん

いくつかの実施形態では、本開示は、本開示の脂質ナノ粒子、組換えRNA分子、または組成物にがん性細胞を曝露させることを含む、がん性細胞を殺傷する方法を提供する。いくつかの実施形態では、がん性細胞は、粒子／組換えRNA分子／組成物を前記がん性

50

細胞に細胞内送達するのに十分な条件下で曝露され、カプセル化ポリヌクレオチドによって産生される複製可能なウイルスが、がん性細胞の殺傷をもたらす。

【0599】

いくつかの実施形態では、本開示は、対象のがんを処置する方法であって、がん罹患している対象に、有効量の本開示の粒子、組換えRNA分子、またはそれらの組成物を投与することを含む、方法を提供する。

【0600】

本明細書における「がん」は、制御されない細胞成長によって典型的に特徴付けられる哺乳動物の生理学的状態を指すか、または表す。がんの例は、限定されるものではないが、癌腫、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫（脂肪肉腫、骨肉腫、血管肉腫、内皮肉腫、平滑筋肉腫、脊索腫、リンパ管肉腫、リンパ管内皮肉腫、横紋筋肉腫、線維肉腫、粘液肉腫、及び軟骨肉腫を含む）、神経内分泌腫瘍、中皮腫、滑膜肉腫、神経鞘腫、髄膜腫、腺癌、メラノーマ、及び白血病またはリンパ性悪性腫瘍を含む。かかるがんのより詳細な例には、扁平上皮癌（例えば、上皮扁平上皮癌）、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺腺癌腫、及び肺扁平上皮癌腫を含む肺癌、小細胞肺癌腫、腹膜癌、肝細胞癌、消化器癌を含む胃癌（g a s t r i c）または胃癌（s t o m a c h）、脾臓癌、膠芽腫、子宮頸癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、肝細胞腫、乳癌、結腸癌、直腸癌、大腸癌、子宮内膜癌または子宮癌、唾液腺癌、腎臓癌または腎癌、前立腺癌、外陰癌、甲状腺癌、肝癌、肛門癌、陰茎癌、精巣癌、食道癌、胆道腫瘍、ユーイング腫瘍、基底細胞癌腫、腺癌腫、汗腺癌腫、皮脂腺癌腫、乳頭癌腫、乳頭腺癌腫、嚢胞腺癌腫、髄様癌腫、気管支原性癌腫、腎細胞癌、肝細胞癌腫、胆管癌腫、絨毛癌腫、セミノーマ、胚性癌腫、ウィルムス腫瘍、精巣腫瘍、肺癌腫、膀胱癌腫、上皮癌腫、神経膠腫、星状細胞腫、髄芽腫、頭蓋咽頭腫、上衣腫、松果体腫瘍、血管芽腫、聴神経腫、乏突起膠腫、髄膜腫、メラノーマ、神経芽細胞腫、網膜芽細胞腫、白血病、リンパ腫、多発性骨髄腫、ワルデンストレームマクログロブリン血症、骨髓異形成疾患、重鎖病、神経内分泌腫瘍、神経鞘腫、及び他の癌腫、ならびに頭頸部癌が含まれる。いくつかの実施形態では、がんは、神経内分泌癌である。さらに、良性前立腺肥大症（B P H）、髄膜腫、神経鞘腫、神経線維腫症、ケロイド、筋腫及び子宮筋腫などを含む、良性（すなわち、非がん性）の過剰増殖性疾患、障害及び状態もまた、本明細書に開示される開示を使用して処置され得る。いくつかの実施形態では、がんは、小細胞肺癌（S C L C）、小細胞膀胱癌、大細胞神経内分泌癌（L C N E C）、去勢抵抗性小細胞神経内分泌前立腺癌（C R P C - N E）、カルチノイド（例えば、肺カルチノイド）、及び多形神経膠芽腫 I D H 変異型（G B M - I D H 変異型）から選択される。

【0601】

いくつかの実施形態では、がんは、転移性がんである。いくつかの実施形態では、がんは、転移している。いくつかの実施形態では、がんは、非転移性がんである。

【0602】

いくつかの実施形態では、がんは、肺癌、乳癌、結腸癌、脾臓癌、膀胱癌、腎細胞癌、卵巣癌、胃癌、及び肝臓癌からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、がんは、腎細胞癌、肺癌、または肝臓癌である。いくつかの実施形態では、肺癌は、N S C L C（非小細胞肺癌）である。いくつかの実施形態では、肝臓癌は、H C C（肝細胞癌）である。いくつかの実施形態では、肝臓癌は、転移性である。いくつかの実施形態では、乳癌は、T N B C（トリプルネガティブ乳癌）である。いくつかの実施形態では、膀胱癌は、尿路上皮癌である。いくつかの実施形態では、がんは、乳癌、食道癌、胃癌、肺癌、腎臓癌、及び皮膚癌からなる群から選択され、がんは、肝臓に転移している。いくつかの実施形態では、がんは、肝臓の転移がんであり、がんは、乳癌、食道癌、胃癌、肺癌、腎臓癌、及び皮膚癌からなる群に起因する。いくつかの実施形態では、がんは、血液癌である。いくつかの実施形態では、血液癌は多発性骨髄腫である（例えば、内容の全体が参照により組み込まれるBradley, et al., Oncolytic Virotherapy, 2014: 347-55を参照されたい）。いくつかの実施形態では、血液癌は、白血病またはリンパ腫である。

10

20

30

40

50

【0603】

いくつかの実施形態では、粒子、組換えRNA分子、またはそれらの組成物は、肺癌（例えば、NSCLC）、乳癌、結腸癌、または膵臓癌のがんの処置またはがん細胞の殺傷のためのCVA21-KY株に由来するポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、がんは、肺癌（例えば、NSCLC）である。

【0604】

いくつかの実施形態では、粒子、組換えRNA分子、またはそれらの組成物は、膀胱癌、腎細胞癌、卵巣癌、胃癌、または肝臓癌（例えば、HCC）のがんの処置またはがん細胞の殺傷のためのCVA21-EF株に由来するポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、がんは、腎細胞癌である。いくつかの実施形態では、がんは、肝臓癌（例えば、HCC）である。いくつかの実施形態では、肝臓癌は、転移性である。

10

【0605】

いくつかの実施形態では、粒子、組換えRNA分子、またはそれらの組成物は、肺癌、肝臓癌、前立腺癌、膀胱癌、膵臓癌、結腸癌、胃癌、乳癌、神経芽細胞腫、腎細胞癌、卵巣癌、横紋筋肉腫、髄芽腫、神経内分泌癌、メルケル細胞癌（MCC）、またはメラノーマのがんの処置またはがん細胞の殺傷のためのSVV（例えば、SVV-IRES-2キメラウイルス）に由来するポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、がんは、小細胞肺癌（SCLC）である。いくつかの実施形態では、がんは、神経芽細胞腫である。いくつかの実施形態では、がんは、神経内分泌癌である。いくつかの実施形態では、がんは、横紋筋肉腫である。いくつかの実施形態では、がんは、神経内分泌表現型を伴う去勢抵抗性前立腺癌（CRPC-NE）である。いくつかの実施形態では、がんは、メルケル細胞癌（MCC）である。

20

【0606】

いくつかの実施形態では、本開示は、対象のがんを処置する方法であって、がん罹患している対象に、（i）有効量の本開示の粒子（例えば、LNP）、組換えRNA分子、またはそれらの組成物、及び（ii）有効量の免疫チェックポイント阻害剤を投与することを含む、方法を提供する。いくつかの実施形態では、免疫チェックポイント阻害剤は、抗体またはその抗原結合断片である。いくつかの実施形態では、免疫チェックポイント阻害剤は、PD-1に結合する（例えば、阻害剤は、抗PD-1抗体である）。抗PD1抗体は当技術分野で公知であり、例えば、ニボルマブ、ペムブロリズマブ、ランプロリズマブ、ピディリズマブ（Pidilizumab）、セミプリマブ、及びAMP-224（AstraZeneca/MedImmune及びGlaxoSmithKline）、Jounce TherapeuticsによるJTX-4014、スパルタリズマブ（PD001、Novartis）、カムレリズマブ（SHR1210、Jiangsu HengRui Medicine Co., Ltd）、シンチリマブ（IBI308、Innovent及びEli Lilly）、チスレリズマブ（BGB-A317）、トリパリマブ（JS001）、ドスタリマブ（TSR-042、WBP-285、GlaxoSmithKline）、INCMGA00012（MGA012、Incyte及びMacroGenics）、ならびにAMP-514（MED10680、AstraZeneca）である。いくつかの実施形態では、免疫チェックポイント阻害剤は、PD-L1に結合する（例えば、阻害剤は、抗PD-L1抗体である）。抗PD-L1抗体は当技術分野で公知であり、例えば、MED1-4736、MPDL3280A、アテゾリズマブ（Tecentriq、Roche Genentech）、アベルマブ（Bavencio、Merck Serono及びPfizer）、及びデュルバルマブ（Imfinzi、AstraZeneca）である。いくつかの実施形態では、免疫チェックポイント阻害剤は、CTLA4に結合する（例えば、阻害剤は、抗CTLA4抗体である）。抗CTLA4抗体は当技術分野で公知であり、例えば、イピルムマブ（ipilimumab）、トレメリマブ、またはWO2014/207063で開示されている抗体のいずれかである。いくつかの実施形態では、免疫チェックポイント阻害剤は、抗TIGIT抗体またはその断片である。抗TIGIT抗体は当技術分野で公知であり、例えば、

30

40

50

チラゴルマブ (Roche)、EOS-448 (iTeos Therapeutics)、ビボストリマブ (Merck)、ドムバナリマブ (Arcus、Gilead)、BMS-986207 (BMS)、エチギリマブ (Mereo)、COM902 (Compugen)、ASP8374 (Astellas)、SEA-TGT (Seattle Genetics) BGB-A1217 (BeiGene)、IBI-939 (Innovent)、及びM6223 (EMD Serono)である。

【0607】

いくつかの実施形態では、1) 粒子、組換えRNA分子、またはそれらの組成物と、2) 免疫チェックポイント阻害剤との両方が、同時に投与される。いくつかの実施形態では、これら2つの治療成分は、順次投与される。いくつかの実施形態では、一方または両方の治療成分が、複数回投与される。いくつかの実施形態では、粒子、組換えRNA分子、またはそれらの組成物は、SVV (例えば、SVV-IRE5-2キメラウイルス) に由来するポリヌクレオチド配列を含み、免疫チェックポイント阻害剤は、PD-1に結合する。

【0608】

いくつかの実施形態では、本開示は、対象のがんを処置する方法であって、がん罹患している対象に、(i) 有効量の本開示の粒子 (例えば、LNP)、組換えRNA分子、またはそれらの組成物、及び(ii) 「エンジニアリングされた抗原受容体」を含む有効量のエンジニアリングされた免疫細胞を投与することを含む、方法を提供する。エンジニアリングされた抗原受容体は、キメラ抗原受容体 (CAR) または組換えT細胞受容体 (TCR) など、天然に存在しない抗原特異的受容体を指す。いくつかの実施形態では、エンジニアリングされた抗原受容体は、シグナル伝達ドメインを含む細胞質ドメインにヒンジ及び膜貫通ドメインを介して融合した細胞外抗原結合ドメインを含むCARである。いくつかの実施形態では、CAR細胞外ドメインは、エンジニアリングされた免疫細胞の活性化及び増殖をもたらすMHC非依存性様式で標的細胞によって発現される抗原に結合する。いくつかの実施形態では、CARの細胞外ドメインは、抗体またはその抗原結合断片に融合したタグを認識する。そのような実施形態では、CARの抗原特異性は、1つの抗体を別のものに置換することにより、単一のCAR構築物を使用して複数の異なる抗原を標的にすることができるように、標識抗体の抗原特異性に依存する (例えば、米国特許第9,233,125号及び同第9,624,279号、米国特許出願公開第20150238631号及び同第20180104354号を参照されたい)。いくつかの実施形態では、CARの細胞外ドメインは、抗体に由来する抗原結合断片を含み得る。本開示で有用な抗原結合ドメインには、例えば、scFv、抗体、抗体の抗原結合領域、重鎖／軽鎖の可変領域、及び単鎖抗体が含まれる。

【0609】

いくつかの実施形態では、CARの細胞内シグナル伝達ドメインは、TCR複合体ゼータ鎖 (CD3 ζ シグナル伝達ドメインなど)、Fc γ RIII、Fc ϵ RI、またはTリンパ球活性化ドメインに由来し得る。いくつかの実施形態では、CARの細胞内シグナル伝達ドメインは、共刺激性ドメイン、例えば4-1BB、CD28、CD40、MyD88、またはCD70ドメインをさらに含む。いくつかの実施形態では、CARの細胞内シグナル伝達ドメインは、2つの共刺激性ドメイン、例えば4-1BB、CD28、CD40、MyD88、またはCD70ドメインのうちのいずれか2つを含む。例示的なCAR構造及び細胞内シグナル伝達ドメインは当技術分野で公知である (例えば、参照により本明細書に組み込まれるWO2009/091826、US20130287748、WO2015/142675、WO2014/055657、及びWO2015/090229を参照されたい)。

【0610】

種々の腫瘍抗原に特異的なCARが当技術分野で公知であり、例えば、CD171特異的CAR (Park et al., Mol Ther (2007) 15 (4): 825-833)、EGFRvIII特異的CAR (Morgan et al., Hum G

10

20

30

40

50

ene Ther (2012) 23 (10) : 1043-1053)、EGF-R特異的CAR (Kobold et al., J Natl Cancer Inst (2014) 107 (1) : 364)、カルボニックアンヒドラーゼK特異的CAR (Lamers et al., Biochem Soc Trans (2016) 44 (3) : 951-959)、FR- α 特異的CAR (Kershaw et al., Clin Cancer Res (2006) 12 (20) : 6106-6015)、HER2特異的CAR (Ahmed et al., J Clin Oncol (2015) 33 (15) 1688-1696、Nakazawa et al., Mol Ther (2011) 19 (12) : 2133-2143、Ahmed et al., Mol Ther (2009) 17 (10) : 1779-1787、Luo et al., Cell Res (2016) 26 (7) : 850-853、Morgan et al., Mol Ther (2010) 18 (4) : 843-851、Grada et al., Mol Ther Nucleic Acids (2013) 9 (2) : 32)、CEA特異的CAR (Katz et al., Clin Cancer Res (2015) 21 (14) : 3149-3159)、IL13R α 2特異的CAR (Brown et al., Clin Cancer Res (2015) 21 (18) : 4062-4072)、GD2特異的CAR (Louis et al., Blood (2011) 118 (23) : 6050-6056、Caruana et al., Nat Med (2015) 21 (5) : 524-529)、ErbB2特異的CAR (Wilkie et al., J Clin Immunol (2012) 32 (5) : 1059-1070)、VEGF-R特異的CAR (Chinnasamy et al., Cancer Res (2016) 22 (2) : 436-447)、FAP特異的CAR (Wang et al., Cancer Immunol Res (2014) 2 (2) : 154-166)、MSLN特異的CAR (Moon et al., Clin Cancer Res (2011) 17 (14) : 4719-30)、NKG2D特異的CAR (VanSeggelen et al., Mol Ther (2015) 23 (10) : 1600-1610)、CD19特異的CAR (アキシカブタゲンシロロイセル (Yescarta (登録商標))、及びチサゲンレクロイセル (Kymriah (登録商標))である。腫瘍特異的CARの臨床試験について概説するLi et al., J Hematol and Oncol (2018) 11 (22) も参照されたい。

10

20

30

40

50

【0611】

いくつかの実施形態では、エンジニアリングされた抗原受容体は、エンジニアリングされたTCRである。エンジニアリングされたTCRは、特定の標的抗原を認識するT細胞集団から単離及びクローニングされたTCR α 及び／またはTCR β 鎖を含む。例えば、TCR α 及び／またはTCR β 遺伝子（すなわち、TRAC及びTRBC）は、特定の悪性腫瘍を有する個体から単離されたT細胞集団、または特定の腫瘍抗原もしくは腫瘍細胞で免疫化されたヒト化マウスから単離されたT細胞集団からクローニングされ得る。エンジニアリングされたTCRは、それらの内因性対応物と同じメカニズムによって（例えば、標的細胞の表面で発現される主要組織適合遺伝子複合体（MHC）タンパク質との関連で提示される同族抗原の認識によって）抗原を認識する。この抗原の関与により、内因性シグナル伝達経路が刺激され、TCRエンジニアリング細胞の活性化及び増殖につながる。

【0612】

腫瘍抗原に特異的なエンジニアリングされたTCRは当技術分野で公知であり、例えば、WT1特異的TCR (JTCR016、Juno Therapeutics；米国特許出願公開第20160083449号に記載のWT1-TCRc4)、MART-1特異的TCR (Morgan et al., Science 314 (2006) 126-129に記載のDMF4Tクローン)、Johnson et al., Blood 114 (2009) 535-546に記載のDMF5Tクローン)、及びvan den Berg et al., Mol. Ther. 23 (2015) 1541-1550に記

載のID3Tクローンを含む)、gp100特異的TCR (Johnson et al., Blood 114 (2009) 535-546)、CEA特異的TCR (Parkhurst et al., Mol Ther. 19 (2011) 620-626)、NY-ESO及びLAGE-1特異的TCR (Robbins et al., J Clin Oncol 26 (2011) 917-924、Robbins et al., Clin Cancer Res 21 (2015) 1019-1027、及びRapoport et al., Nature Medicine 21 (2015) 914-921に記載の1G4Tクローン)、ならびにMAGE-A3特異的TCR (Morgan et al., J Immunother 36 (2013) 133-151) 及びLinette et al., Blood 122 (2013) 227-242) である (Debets et al., Seminars in Immunology 23 (2016) 10-21も参照されたい)。

【0613】

いくつかの実施形態では、エンジニアリングされた抗原受容体は、CD3、CD4、CD8、CD16、CD24、CD25、CD33、CD34、CD45、CD64、CD71、CD78、CD80 (別名B7-1)、CD86 (別名B7-2)、CD96、CD116、CD117、CD123、CD133、及びCD138、CD371 (別名CLL1) などの分化抗原群分子から選択される標的抗原; 腫瘍関連表面抗原、例えば5T4、BCMA (別名CD269及びTNFRSF17、UniProt#Q02223)、がん胎児性抗原 (CEA)、カルボニックアンヒドラーゼ9 (CAIXまたはMN/CAIX)、CD19、CD20、CD22、CD30、CD40、ジシアロガングリオシド、例えばGD2、ELF2M、管上皮ムチン、エフリンB2、上皮細胞接着分子 (EPCAM)、ErbB2 (HER2/neu)、FCRL5 (UniProt#Q68SN8)、FKBP11 (UniProt#Q9NYL4)、神経膠腫関連抗原、スフィンゴ糖脂質、gp36、GPCR5D (UniProt#Q9NZD1)、mut hsp70-2、腸カルボキシルエステラーゼ、IGF-I受容体、ITGA8 (UniProt#P53708)、KAMP3、LAGE-1a、MAGE、メソテリン、好中球エラスターゼ、NKG2D、Nkp30、NY-ESO-1、PAP、プロスターゼ、前立腺癌腫瘍抗原-1 (PCTA-1)、前立腺特異的抗原 (PSA)、PSMA、プロステイン、RAGE-1、ROR1、RU1 (SFMBT1)、RU2 (DCDC2)、SLAMF7 (UniProt#Q9NQ25)、サバイビン、TAG-72、及びテロメラゼ; 腫瘍特異的ペプチドエピトープを提示する主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) 分子; フィブロネクチンのエクストラドメインA (EDA) 及びエクストラドメインB (EDB) などの腫瘍間質抗原; テネイシン-C (TnC A1) のA1ドメイン及び線維芽細胞関連タンパク質 (FAP); サイトカイン受容体、例えば上皮成長因子受容体 (EGFR)、EGFRバリエーションII (EGFRvIII)、TFGβ-R、またはエンドグリンなどのそれらの成分; 主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) 分子; HIV特異的抗原 (例えばHIV gp120) などのウイルス特異的表面抗原; EBV特異的抗原、CMV特異的抗原、HPV特異的抗原、ラッサウイルス特異的抗原、インフルエンザウイルス特異的抗原、ならびにこれらの表面抗原のいずれかの誘導体またはバリエーションに対するものである。

【0614】

さらなる付番された実施形態

本発明のさらなる付番された実施形態が以下のとおり提供される。

【0615】

実施形態1。

腫瘍溶解性コクサッキーウイルスウイルスをコードする合成RNAウイルスゲノムを含む脂質ナノ粒子 (LNP) であって、前記コクサッキーウイルスが、EF株及びKY株から選択されるCVA21株である、前記脂質ナノ粒子 (LNP)。

【0616】

実施形態 1. 1。

腫瘍溶解性コクサッキーウイルスをコードする合成 RNA ウイルスゲノムを含む脂質ナノ粒子 (LNP) であって、前記コクサッキーウイルスが、CVA21 Kykendall 株である、前記脂質ナノ粒子 (LNP)。

【0617】

実施形態 2。

前記コクサッキーウイルスが CVA21-KY 株であり、前記 CVA21-KY 株が、配列番号 5 との少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、または 100% の配列同一性を有するポリヌクレオチド配列を含む、実施形態 1 に記載の LNP。

【0618】

実施形態 3。

前記コクサッキーウイルスが CVA21-EF 株であり、前記 CVA21-EF 株が、配列番号 9 との少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、または 100% の配列同一性を有するポリヌクレオチド配列を含む、実施形態 1 に記載の LNP。

【0619】

実施形態 4。

前記コクサッキーウイルスが、配列番号 6 または 10 との少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、または 100% の配列同一性を有する 5' UTR (IRES) 配列を含む、実施形態 1 に記載の LNP。

【0620】

実施形態 5。

前記コクサッキーウイルスが、配列番号 7 または 11 との少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、または 100% の配列同一性を有する P1 配列を含む、実施形態 1 に記載の LNP。

【0621】

実施形態 6。

前記コクサッキーウイルスが、配列番号 8 または 12 との少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、または 100% の配列同一性を有する 3D 配列を含む、実施形態 1 に記載の LNP。

【0622】

実施形態 7。

前記合成 RNA ウイルスゲノムが、配列番号 1 との 95% 超、90% 超、85% 超、または 80% 超の配列同一性を有するポリヌクレオチド配列を含まない、実施形態 1～6 のいずれか 1 つに記載の LNP。

【0623】

実施形態 8。

腫瘍溶解性セネカバレーウイルス (SVV) をコードする合成 RNA ウイルスゲノムを含む脂質ナノ粒子 (LNP) であって、前記合成 RNA ウイルスゲノムが、配列番号 68 との少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、または 100% の配列同一性を有するポリヌクレオチド配列を含む、前記脂質ナノ粒子 (LNP)。

【0624】

実施形態 9。

前記合成 RNA ウイルスゲノムが、配列番号 68 の核酸 1～670 との少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、または 100% の配列同一性を有する 5' UTR (IRES) 配列を含む、実施形態 8 に記載の LNP。

【0625】

実施形態 10。

前記合成RNAウイルスゲノムが、S177A変異を含むSVV VP2タンパク質をコードする、実施形態8または9に記載のLNP。

【0626】

実施形態11。

前記LNPを細胞に送達すると、前記細胞によるウイルス粒子の産生がもたらされ、前記ウイルス粒子が、感染性及び溶解性である、実施形態1～10のいずれか1つに記載のLNP。

【0627】

実施形態12。

前記合成RNAウイルスゲノムが、外因性ペイロードタンパク質をコードする異種ポリヌクレオチドをさらに含む、実施形態1～11のいずれか1つに記載のLNP。

【0628】

実施形態13。

外因性ペイロードタンパク質をコードする第2の組換えRNA分子をさらに含む、実施形態1～11のいずれか1つに記載のLNP。

【0629】

実施形態14。

前記外因性ペイロードタンパク質が、MLKL 4HBDドメイン、ガスダーミンD N末端断片、ガスダーミンE N末端断片、HMGB1 Box Bドメイン、SMAC/Diablo、メリチン、L-アミノ酸オキシダーゼ(LAAO)、ディスインテグリン、TRAIL(TNFSF10)、ニトロレダクターゼ、レオウイルスFASTタンパク質、レプチン/FOSL2、 α -1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼ、またはアデノシンデアミナーゼ2(ADA2)を含むまたはそれらからなる、実施形態12または13に記載のLNP。

【0630】

実施形態15。

前記ニトロレダクターゼが、NfsBまたはNfsAである、実施形態14に記載のLNP。

【0631】

実施形態16。

前記レオウイルスFASTタンパク質が、ARV p14、BRV p15、またはp14-p15ハイブリッドである、実施形態14に記載のLNP。

【0632】

実施形態17。

前記外因性ペイロードタンパク質が、蛍光タンパク質、酵素タンパク質、サイトカイン、ケモカイン、細胞表面受容体に結合することができる抗原結合分子、または細胞表面受容体のリガンドである、実施形態12または13に記載のLNP。

【0633】

実施形態18。

a) 前記サイトカインが、GM-CSF、IFN γ 、IL-2、IL-7、IL-12、IL-18、IL-21、及びIL-36 γ から選択されるか、

b) 前記細胞表面受容体のリガンドが、Flt3リガンドもしくはTNFSF14であるか、または

c) 前記ケモカインが、CXCL10、CCL4、CCL21、及びCCL5から選択される、

実施形態17に記載のLNP。

【0634】

実施形態19。

前記抗原結合分子が、免疫チェックポイント受容体に結合してそれを阻害することができる、実施形態17に記載のLNP。

【0635】

実施形態20。

前記免疫チェックポイント受容体が、PD-1である、実施形態19に記載のLNP。

【0636】

実施形態21。

前記抗原結合分子が、腫瘍抗原に結合することができる、実施形態17に記載のLNP

。

【0637】

実施形態22。

前記抗原結合分子が、二重特異性T細胞エンゲージャー分子(BiTE)または二重特異性軽量T細胞エンゲージャー分子(LiT E)である、実施形態21に記載のLNP。

10

【0638】

実施形態23。

前記腫瘍抗原が、HBV-コア(B型肝炎コア抗原)、HBV-pol、HbS-Ag、HPV E6、HPV E7、メルケル細胞ポリオーマラージT抗原、及びエプスタイン・バーウイルス抗原EBNA2またはBZLF1から選択されるウイルス抗原である、実施形態21または22に記載のLNP。

【0639】

実施形態24。

前記腫瘍抗原がDLL3またはEpCAMである、実施形態21または22に記載のLNP。

20

【0640】

実施形態25。

前記合成RNAウイルスゲノム及び／または前記組換えRNA分子が、マイクロRNA(miRNA)標的配列(miR-TS)カセットを含み、前記miR-TSカセットが、1つ以上のmiRNA標的配列を含む、実施形態1～24のいずれか1つに記載のLNP。

【0641】

実施形態26。

前記1つ以上のmiRNAが、miR-124、miR-1、miR-143、miR-128、miR-219、miR-219a、miR-122、miR-204、miR-217、miR-137、miR-142、及びmiR-126から選択される、実施形態25に記載のLNP。

30

【0642】

実施形態27。

前記miR-TSカセットが、

a. miR-124標的配列の1つ以上のコピー、miR-1標的配列の1つ以上のコピー、及びmiR-143標的配列の1つ以上のコピー、

b. miR-128標的配列の1つ以上のコピー、miR-219a標的配列の1つ以上のコピー、及びmiR-122標的配列の1つ以上のコピー、

40

c. miR-128標的配列の1つ以上のコピー、miR-204標的配列の1つ以上のコピー、及びmiR-219標的配列の1つ以上のコピー、または

d. miR-217標的配列の1つ以上のコピー、miR-137標的配列の1つ以上のコピー、及びmiR-126標的配列の1つ以上のコピーを含む、

実施形態26に記載のLNP。

【0643】

実施形態28。

前記LNPが、カチオン性脂質、ヘルパー脂質、構造脂質、及びPEG脂質を含む、実施形態1～27のいずれか1つに記載のLNP。

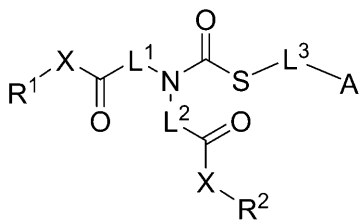
【0644】

50

実施形態 29。

前記カチオン性脂質が、式 (I) の化合物：

【化 56】



式 (I)

10

またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物であり、式中、

A は、 $-N(CH_2R^{N1})(CH_2R^{N2})$ 、または少なくとも 1 つの N を含む 4 ~ 7 員ヘテロシクリル環であり、前記 4 ~ 7 員ヘテロシクリル環は、0 ~ 6 つの R^3 で場合により置換されており、

各 X は、独立的に、 $-O-$ 、 $-N(R^1)-$ 、または $-N(R^2)-$ であり、

R^1 は、場合により置換されている C_1-C_{31} 脂肪族及びステロイジルからなる群から選択され、

20

R^2 は、場合により置換されている C_1-C_{31} 脂肪族及びステロイジルからなる群から選択され、

R^3 は、場合により置換されている C_1-C_6 脂肪族であり、

R^{N1} 及び R^{N2} は、各々独立的に、水素、ヒドロキシ- C_1-C_6 アルキル、 C_2-C_6 アルケニル、または C_3-C_7 シクロアルキルであり、

L^1 は、場合により置換されている C_1-C_{20} アルキレン鎖、及び二価で場合により置換されている C_2-C_{20} アルケニレン鎖からなる群から選択され、

L^2 は、場合により置換されている C_1-C_{20} アルキレン鎖、及び二価で場合により置換されている C_2-C_{20} アルケニレン鎖からなる群から選択され、

L^3 は結合、場合により置換されている C_1-C_6 アルキレン鎖、または二価で場合により置換されている C_3-C_7 シクロアルキレンであるが、

30

ただし、A が $-N(CH_3)(CH_3)$ であり、X が O であるとき、 L^3 は C_1-C_6 アルキレン鎖ではないことを条件とする、

実施形態 28 に記載の LNP。

【0645】

実施形態 30。

チオレートの S と A に含まれる最も近い N との間の炭素原子の数が 2 ~ 4 である、実施形態 29 に記載の LNP。

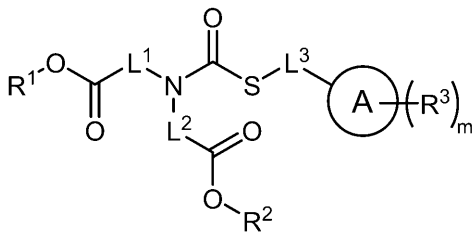
【0646】

実施形態 31。

40

前記カチオン性脂質が、式 (I-a) の化合物：

【化 5 7】



式 (I-a)

10

またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物であり、式中、
mは0、1、2、3、4、5、または6である、
 実施形態29または30に記載のLNP。

【0647】

実施形態32。

Aが、場合により置換されている5～6員ヘテロシクリル環である、実施形態29～31のいずれか1つに記載のLNP。

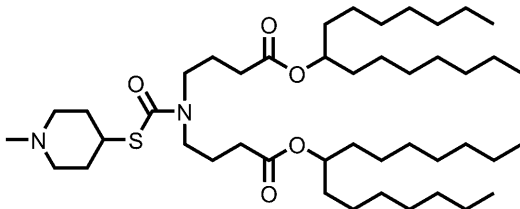
【0648】

実施形態33。

20

前記カチオン性脂質が、

【化 5 8】



30

またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物である、実施形態29に記載のLNP。

【0649】

実施形態34。

前記カチオン性脂質が、DLinDMA、DLin-KC2-DMA、DLin-MC3-DMA (MC3)、COATSOME (登録商標) SS-LC (旧名: SS-18/4PE-13)、COATSOME (登録商標) SS-EC (旧名: SS-33/4PE-15)、COATSOME (登録商標) SS-OC、COATSOME (登録商標) SS-OP、ジ((Z)-ノナ-2-エン-1-イル)9-((4-ジメチルアミノ)ブタノイル)オキシ)ヘプタデカンジオエート(L-319)、またはN-(2,3-ジオレオイルオキシ)プロピル)-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド(DOTAP)から選択される、実施形態28に記載のLNP。

40

【0650】

実施形態35。

前記ヘルパー脂質が、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DSPC)、1,2-ジラウロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン(DLPE)、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DOPC)、及び1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン(DOPE)から選択される、実施形態28～34のいずれか1つに記載のLNP。

【0651】

50

実施形態 36。

前記カチオン性脂質が、1,2-ジオレオイル-3-トリメチルアンモニウム-プロパン(DOTAP)であり、前記ヘルパー脂質が、1,2-ジラウロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン(DLPE)または1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン(DOPE)である、実施形態 28 に記載の LNP。

【0652】

実施形態 37。

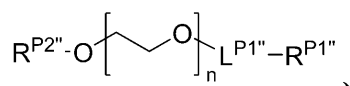
前記構造脂質がコレステロールである、実施形態 28～36 のいずれか 1 つに記載の LNP。

【0653】

実施形態 38。

前記PEG脂質が、式(A'')の化合物：

【化59】



式(A'')

またはその薬学的に許容される塩であり、式中、

nは、すべての端点を含む10～200の整数であり、

L^{P1''}は結合、-[(CH₂)₀₋₃-C(O)O]₁₋₃-、-(CH₂)₀₋₃-C(O)O-(CH₂)₁₋₃-OC(O)-、または-C(O)N(H)-であり、

R^{P1''}は、C₅-C₂₅アルキルまたはC₅-C₂₅アルケニルであり、

R^{P2''}は水素または-CH₃であり、

前記LNPが、約0.001%～約5%のPEG脂質のモル比を有する、

実施形態 28～37 のいずれか 1 つに記載の LNP。

【0654】

実施形態 39。

L^{P1''}は結合、-CH₂C(O)O-、-CH₂CH₂C(O)O-、-CH₂C(O)OCH₂C(O)O-、-CH₂C(O)OCH₂CH₂OC(O)-、または-C(O)N(H)-である、実施形態 38 に記載の LNP。

【0655】

実施形態 40。

L^{P1''}は結合である、実施形態 38 に記載の LNP。

【0656】

実施形態 41。

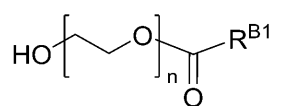
R^{P2''}は水素である、実施形態 38～40 のいずれか 1 つに記載の LNP。

【0657】

実施形態 42。

前記PEG脂質が、式(B)の化合物：

【化60】



式(B)

またはその薬学的に許容される塩であり、式中、

nは、すべての端点を含む10～200の整数であり、

10

20

30

40

50

R^{B1} は、 $C_5 - C_{25}$ アルキルまたは $C_5 - C_{25}$ アルケニルであり、
前記 LNP が、約 0.001% ~ 約 5% の PEG 脂質のモル比を有する、
実施形態 28 ~ 37 のいずれか 1 つに記載の LNP。

【0658】

実施形態 43。

前記 PEG 脂質が、1, 2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノール
アミン-N-[アミノ(ポリエチレングリコール)] (DSPE-PEG)、1, 2-ジ
パルミトイル-rac-グリセロールメトキシポリエチレングリコール (DPG-PEG)
)、1, 2-ジステアロイル-rac-グリセロ-3-メチルポリオキシエチレン (DS
G-PEG)、1, 2-ジステアロイル-rac-グリセロ-3-メチルポリオキシエチ
レン (DSG-PEG)、1, 2-ジミリストイル-rac-グリセロ-3-メチルポリ
オキシエチレン (DMG-PEG)、及び 1, 2-ジミリストイル-rac-グリセロ-
3-メチルポリオキシエチレン (DMG-PEG)、または 1, 2-ジステアロイル-s
n-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[アミノ(ポリエチレングリコール)
] (DSPE-PEG-アミン) から選択される、実施形態 28 ~ 37 のいずれか 1 つに
記載の LNP。

10

【0659】

実施形態 44。

前記 PEG 脂質が、1, 2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノール
アミン-N-[アミノ(ポリエチレングリコール)-5000] (DSPE-PEG5K
)、1, 2-ジパルミトイル-rac-グリセロールメトキシポリエチレングリコール-
2000 (DPG-PEG2K)、1, 2-ジステアロイル-rac-グリセロ-3-メ
チルポリオキシエチレン-5000 (DSG-PEG5K)、1, 2-ジステアロイル-
rac-グリセロ-3-メチルポリオキシエチレン-2000 (DSG-PEG2K)、
1, 2-ジミリストイル-rac-グリセロ-3-メチルポリオキシエチレン-5000
(DMG-PEG5K)、及び 1, 2-ジミリストイル-rac-グリセロ-3-メチル
ポリオキシエチレン-2000 (DMG-PEG2K) から選択される、実施形態 28 ~
37 のいずれか 1 つに記載の LNP。

20

【0660】

実施形態 45。

前記カチオン性脂質が COATSOME (登録商標) SS-OC を含み、前記ヘルパー
脂質が DSPC を含み、前記構造脂質がコレステロール (Chol) を含み、前記 PEG
脂質が DPG-PEG2000 を含む、実施形態 28 に記載の LNP。

30

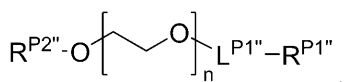
【0661】

実施形態 46。

前記カチオン性脂質が COATSOME (登録商標) SS-OC を含み、前記ヘルパー
脂質が DSPC を含み、前記構造脂質がコレステロール (Chol) を含み、前記 PEG
脂質が、式 (A'') の化合物：

【化 61】

40



式 (A'')

またはその薬学的に許容される塩であり、式中、

n は、すべての端点を含む 10 ~ 200 の整数であり、

$L^{P1''}$ は結合であり、

$R^{P1''}$ は、 $C_5 - C_{25}$ アルキルまたは $C_5 - C_{25}$ アルケニルであり、

$R^{P2''}$ は水素であり、

50

前記 L N P が、約 0.001%～約 5% の P E G 脂質のモル比を有する、
実施形態 28 に記載の L N P。

【0662】

実施形態 47。

前記 P E G 脂質が、B R I J (商標) S 100、B R I J (商標) S 20、B R I J (商標) O 20、及び B R I J (商標) C 20 からなる群から選択される、実施形態 28～37 及び 46 のいずれか 1 つに記載の L N P。

【0663】

実施形態 48。

前記 P E G 脂質が B R I J (商標) S 100 である、実施形態 28～37 及び 46 のいずれか 1 つに記載の L N P。 10

【0664】

実施形態 49。

S S - O C : D S P C : C h o l : P E G 脂質の比率 (総脂質含有量に占めるパーセンテージとして) が A : B : C : D であり、 $A + B + C + D = 100\%$ であり、

a. $A = 40\% \sim 60\%$ 、 $B = 10\% \sim 25\%$ 、 $C = 20\% \sim 30\%$ 、及び $D = 0.01\% \sim 3\%$ 、

b. $A = 45\% \sim 50\%$ 、 $B = 20\% \sim 25\%$ 、 $C = 25\% \sim 30\%$ 、及び $D = 0.01\% \sim 1\%$ 、または

c. $A = \text{約 } 49\%$ 、 $B = \text{約 } 22\%$ 、 $C = \text{約 } 28\%$ 、及び $D = \text{約 } 0.5\%$ である、 20

実施形態 45～48 のいずれか 1 つに記載の L N P。

【0665】

実施形態 50。

S S - O C : D S P C : C h o l : P E G 脂質の比率 (総脂質含有量に占めるパーセンテージとして) が A : B : C : D であり、 $A + B + C + D = 100\%$ であり、

a. $A = 40\% \sim 60\%$ 、 $B = 10\% \sim 30\%$ 、 $C = 20\% \sim 45\%$ 、及び $D = 0\% \sim 3\%$ 、

b. $A = 40\% \sim 60\%$ 、 $B = 10\% \sim 30\%$ 、 $C = 25\% \sim 45\%$ 、及び $D = 0.01\% \sim 3\%$ 、

c. $A = 45\% \sim 55\%$ 、 $B = 10\% \sim 20\%$ 、 $C = 30\% \sim 40\%$ 、及び $D = 1\% \sim 2\%$ 、 30

d. $A = 45\% \sim 50\%$ 、 $B = 10\% \sim 15\%$ 、 $C = 35\% \sim 40\%$ 、及び $D = 1\% \sim 2\%$ 、または

e. $A = \text{約 } 49\%$ 、 $B = \text{約 } 11\%$ 、 $C = \text{約 } 38\%$ 、及び $D = \text{約 } 1.5\%$ である、

実施形態 45～48 のいずれか 1 つに記載の L N P。

【0666】

実施形態 51。

S S - O C : D S P C : C h o l : P E G 脂質の比率 (総脂質含有量に占めるパーセンテージとして) が約 A : B : C : D であり、 $A + B + C + D = 100\%$ であり、

a. $A = 45\% \sim 65\%$ 、 $B = 5\% \sim 20\%$ 、 $C = 20\% \sim 45\%$ 、及び $D = 0\% \sim 3\%$ 、 40

b. $A = 50\% \sim 60\%$ 、 $B = 5\% \sim 15\%$ 、 $C = 30\% \sim 45\%$ 、及び $D = 0.01\% \sim 3\%$ 、

c. $A = 55\% \sim 60\%$ 、 $B = 5\% \sim 15\%$ 、 $C = 30\% \sim 40\%$ 、及び $D = 1\% \sim 2\%$ 、

d. $A = 55\% \sim 60\%$ 、 $B = 5\% \sim 10\%$ 、 $C = 30\% \sim 35\%$ 、及び $D = 1\% \sim 2\%$ 、または

e. $A = \text{約 } 58\%$ 、 $B = \text{約 } 7\%$ 、 $C = \text{約 } 33\%$ 、及び $D = \text{約 } 1.5\%$ である、

実施形態 45～48 のいずれか 1 つに記載の L N P。

【0667】

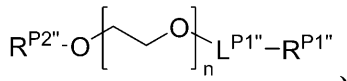
実施形態 5 2。

脂質ナノ粒子 (LNP) であって、

a. セネカバレーウイルス (SVV) をコードする合成 RNA ウイルスゲノム、ならびに

b. カチオン性脂質、ヘルパー脂質、構造脂質、及び PEG 脂質を含み、前記 PEG 脂質が、式 (A'') の化合物：

【化 6 2】



10

式 (A'')

またはその薬学的に許容される塩であり、式中、

n は、すべての端点を含む 10 ~ 200 の整数であり、

$L^{P1''}$ は結合、 $\text{---}[(\text{CH}_2)_0\text{---}3\text{---C}(\text{O})\text{O}]_{1\text{---}3}\text{---}$ 、 $\text{---}(\text{CH}_2)_0\text{---}3\text{---C}(\text{O})\text{O}\text{---}(\text{CH}_2)_1\text{---}3\text{---OC}(\text{O})\text{---}$ 、または $\text{---C}(\text{O})\text{N}(\text{H})\text{---}$ であり、

$R^{P1''}$ は、 $\text{C}_5\text{---}\text{C}_{25}$ アルキルまたは $\text{C}_5\text{---}\text{C}_{25}$ アルケニルであり、

$R^{P2''}$ は水素または ---CH_3 であり、

前記 LNP が、約 0.001 % ~ 約 5 % の PEG 脂質のモル比を有する、

前記脂質ナノ粒子 (LNP)。

20

【0668】

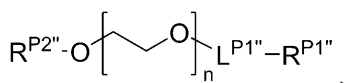
実施形態 5 3。

脂質ナノ粒子 (LNP) であって、

a. コクサッキーウイルスをコードする合成 RNA ウイルスゲノム、ならびに

b. カチオン性脂質、ヘルパー脂質、構造脂質、及び PEG 脂質を含み、前記 PEG 脂質が、式 (A'') の化合物：

【化 6 3】



30

式 (A'')

またはその薬学的に許容される塩であり、式中、

n は、すべての端点を含む 10 ~ 200 の整数であり、

$L^{P1''}$ は結合、 $\text{---}[(\text{CH}_2)_0\text{---}3\text{---C}(\text{O})\text{O}]_{1\text{---}3}\text{---}$ 、 $\text{---}(\text{CH}_2)_0\text{---}3\text{---C}(\text{O})\text{O}\text{---}(\text{CH}_2)_1\text{---}3\text{---OC}(\text{O})\text{---}$ 、または $\text{---C}(\text{O})\text{N}(\text{H})\text{---}$ であり、

$R^{P1''}$ は、 $\text{C}_5\text{---}\text{C}_{25}$ アルキルまたは $\text{C}_5\text{---}\text{C}_{25}$ アルケニルであり、

$R^{P2''}$ は水素または ---CH_3 であり、

前記 LNP が、約 0.001 % ~ 約 5 % の PEG 脂質のモル比を有する、

前記脂質ナノ粒子 (LNP)。

40

【0669】

実施形態 5 4。

R^1 は、 $\text{C}_{16}\text{---}\text{C}_{18}$ アルキルまたは $\text{C}_{16}\text{---}\text{C}_{18}$ アルケニルである、実施形態 5 2 または 5 3 に記載の LNP。

【0670】

実施形態 5 5。

$L^{P1''}$ は結合、 $\text{---CH}_2\text{C}(\text{O})\text{O}\text{---}$ 、 $\text{---CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{O}\text{---}$ 、 $\text{---CH}_2\text{C}(\text{O})\text{OCH}_2\text{C}(\text{O})\text{O}\text{---}$ 、 $\text{---CH}_2\text{C}(\text{O})\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})\text{---}$ 、または $\text{---C}(\text{O})\text{N}(\text{H})\text{---}$ であり、

50

○) N (H) -である、実施形態 5 2 ~ 5 4 のいずれか 1 つに記載の L N P。

【 0 6 7 1 】

実施形態 5 6。

L^{P 1} は結合である、実施形態 5 2 ~ 5 4 のいずれか 1 つに記載の L N P。

【 0 6 7 2 】

実施形態 5 7。

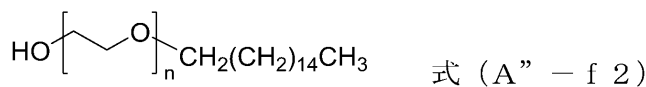
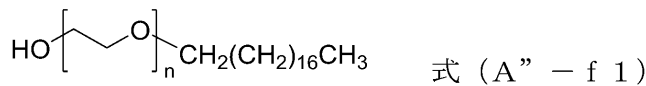
R^{P 2} は水素である、実施形態 5 2 ~ 5 6 のいずれか 1 つに記載の L N P。

【 0 6 7 3 】

実施形態 5 8。

前記 P E G 脂質は、式 (A'' - f 1)、式 (A'' - f 2)、もしくは式 (A'' - f 3) の 10
化合物：

【化 6 4】



20

またはその薬学的に許容される塩である、実施形態 5 2 または 5 3 に記載の L N P。

【 0 6 7 4 】

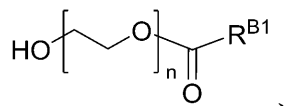
実施形態 5 9。

脂質ナノ粒子 (L N P) であって、

a. セネカバレーウイルス (S V V) をコードする合成 R N A ウイルスゲノム、なら
びに

b. カチオン性脂質、ヘルパー脂質、構造脂質、及び P E G 脂質を含み、前記 P E G 30
脂質が、式 (B) の化合物：

【化 6 5】



式 (B)

またはその薬学的に許容される塩であり、式中、

n は、すべての端点を含む 1 0 ~ 2 0 0 の整数であり、

R^{B 1} は、C₅ - C₂₅ アルキルまたは C₅ - C₂₅ アルケニルであり、

前記 L N P が、約 0 . 0 0 1 % ~ 約 5 % の P E G 脂質のモル比を有する、

前記脂質ナノ粒子 (L N P) 。

【 0 6 7 5 】

実施形態 6 0。

脂質ナノ粒子 (L N P) であって、

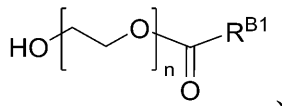
a. コクサッキーウイルスをコードする合成 R N A ウイルスゲノム、ならびに

b. カチオン性脂質、ヘルパー脂質、構造脂質、及び P E G 脂質を含み、前記 P E G
脂質が、式 (B) の化合物：

40

50

【化 6 6】



式 (B)

またはその薬学的に許容される塩であり、式中、

n は、すべての端点を含む 10～200 の整数であり、

$\text{R}^{\text{B}1}$ は、 $\text{C}_5 - \text{C}_{25}$ アルキルまたは $\text{C}_5 - \text{C}_{25}$ アルケニルであり、

前記 LNP が、約 0.001%～約 5% の PEG 脂質のモル比を有する、

前記脂質ナノ粒子 (LNP)。

10

【0676】

実施形態 61。

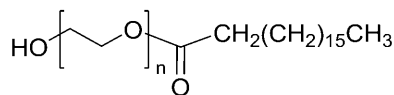
R^1 は、 $\text{C}_{15} - \text{C}_{17}$ アルキルまたは $\text{C}_{15} - \text{C}_{17}$ アルケニルである、実施形態 59 または 60 に記載の LNP。

【0677】

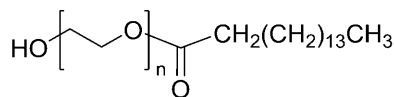
実施形態 62。

前記 PEG 脂質は、式 (B-a) もしくは式 (B-b) の化合物：

【化 6 7】



式 (B-a)



式 (B-b)

20

またはその薬学的に許容される塩である、実施形態 59 または 60 に記載の LNP。

【0678】

実施形態 63。

n は、平均で約 20、約 40、約 50、または約 100 である、実施形態 52～62 のいずれか 1 つに記載の LNP。

30

【0679】

実施形態 64。

n は、平均で約 100 である、実施形態 52～62 のいずれか 1 つに記載の LNP。

【0680】

実施形態 65。

前記 PEG 脂質が、約 200 ダルトン～約 10,000 ダルトン、約 500 ダルトン～約 7,000 ダルトン、または約 800 ダルトン～約 6,000 ダルトンの平均分子量を有する PEG 部分を含む、実施形態 52～64 のいずれか 1 つに記載の LNP。

40

【0681】

実施形態 66。

前記 PEG 脂質が、 $\text{HO}-\text{PEG}100-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{16}\text{CH}_3$ 、 $\text{HO}-\text{PEG}20-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{16}\text{CH}_3$ 、 $\text{HO}-\text{PEG}20-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_3$ 、 $\text{HO}-\text{PEG}20-\text{C}_{18}\text{H}_{35}$ 、 $\text{HO}-\text{PEG}100-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_3$ 、 $\text{HO}-\text{PEG}50-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_3$ 、 $\text{HO}-\text{PEG}40-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_3$ 、 $\text{HO}-\text{PEG}100-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{15}\text{CH}_3$ 、 $\text{HO}-\text{PEG}40-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{15}\text{CH}_3$ 、及び $\text{HO}-\text{PEG}50-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{15}\text{CH}_3$ からなる群から選択される、実施形態

50

52～65のいずれか1つに記載のLNP。

【0682】

実施形態67。

前記LNPが、前記式(A'')のPEG脂質及び／または式(I)のイオン化可能な脂質を欠いている対照LNPと比較して低減した免疫応答を*in vivo*で誘導し、場合により、前記対照LNP中のPEG脂質はPEG2K-DPGまたはPEG2K-DMGである、実施形態52～66のいずれか1つに記載のLNP。

【0683】

実施形態68。

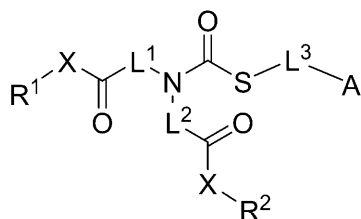
前記免疫応答が、前記LNPの加速血液クリアランス(ABC)及び／または抗PEG IgM応答である、実施形態67に記載のLNP。

【0684】

実施形態69。

前記カチオン性脂質が、式(I)の化合物：

【化68】



式(I)

またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物であり、式中、

Aは、 $-N(CH_2R^{N1})(CH_2R^{N2})$ 、または少なくとも1つのNを含む4～7員ヘテロシクリル環であり、前記4～7員ヘテロシクリル環は、0～6つの R^3 で場合により置換されており、

各Xは、独立的に、 $-O-$ 、 $-N(R^1)-$ 、または $-N(R^2)-$ であり、

R^1 は、場合により置換されている C_{1-31} 脂肪族及びステロイジルからなる群から選択され、

R^2 は、場合により置換されている C_{1-31} 脂肪族及びステロイジルからなる群から選択され、

R^3 は、場合により置換されている C_{1-6} 脂肪族であり、

R^{N1} 及び R^{N2} は、各々独立的に、水素、ヒドロキシ- C_{1-6} アルキル、 C_{2-6} アルケニル、または C_{3-7} シクロアルキルであり、

L^1 は、場合により置換されている C_{1-20} アルキレン鎖、及び二価で場合により置換されている C_{2-20} アルケニレン鎖からなる群から選択され、

L^2 は、場合により置換されている C_{1-20} アルキレン鎖、及び二価で場合により置換されている C_{2-20} アルケニレン鎖からなる群から選択され、

L^3 は結合、場合により置換されている C_{1-6} アルキレン鎖、または二価で場合により置換されている C_{3-7} シクロアルキレン鎖であるが、

ただし、Aが $-N(CH_3)(CH_3)$ であり、XがOであるとき、 L^3 は C_{1-6} アルキレン鎖ではないことを条件とする、

実施形態52～68のいずれか1つに記載のLNP。

【0685】

実施形態70。

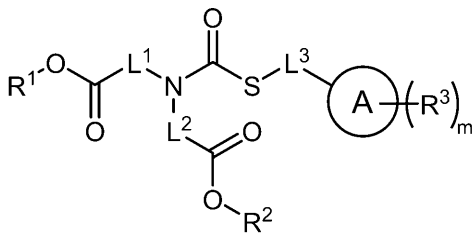
チオレートのSとAに含まれる最も近いNとの間の炭素原子の数が2～4である、実施形態69に記載のLNP。

【0686】

実施形態 7 1。

前記カチオン性脂質が、式 (I-a) の化合物：

【化 6 9】



10

式 (I-a)

またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物であり、式中、

m は 0、1、2、3、4、5、または 6 である、

実施形態 6 9 または 7 0 に記載の LNP。

【0 6 8 7】

実施形態 7 2。

A が、場合により置換されている 5 ～ 6 員ヘテロシクリル環である、実施形態 6 9 ～ 7 1 のいずれか 1 つに記載の LNP。

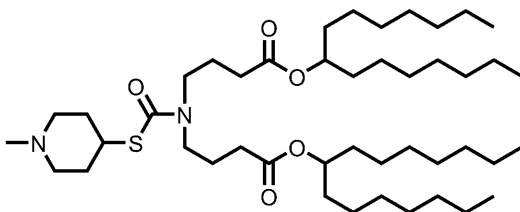
20

【0 6 8 8】

実施形態 7 3。

前記カチオン性脂質が、

【化 7 0】



30

またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物である、実施形態 6 9 に記載の LNP。

【0 6 8 9】

実施形態 7 4。

前記カチオン性脂質が、DLinDMA、DLin-KC2-DMA、DLin-MC3-DMA (MC3)、COATSOME (登録商標) SS-LC (旧名：SS-18 / 4PE-13)、COATSOME (登録商標) SS-EC (旧名：SS-33 / 4PE-15)、COATSOME (登録商標) SS-OC、COATSOME (登録商標) SS-OP、ジ((Z)-ノナ-2-エン-1-イル)9-((4-ジメチルアミノ)ブタノイル)オキシ)ヘプタデカンジオエート(L-319)、N-(2,3-ジオレオイルオキシ)プロピル)-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド(DOTAP)、またはそれらの混合物から選択される、実施形態 5 2 ～ 6 8 のいずれか 1 つに記載の LNP。

40

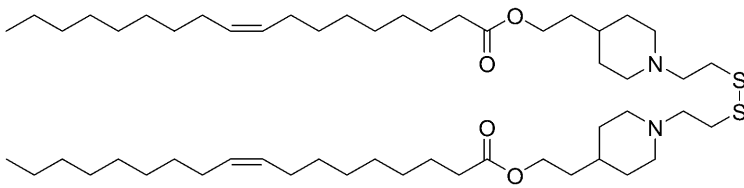
【0 6 9 0】

実施形態 7 5。

前記カチオン性脂質が、式 (II-1a) の化合物：

50

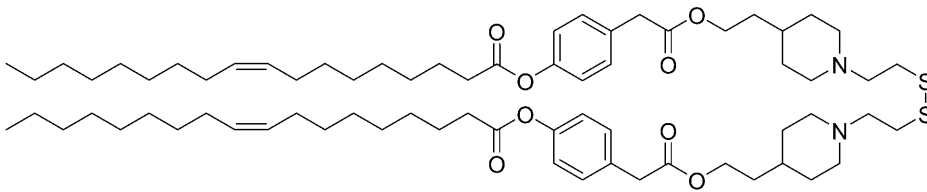
【化 7 1】



式 (I I - 1 a) 、

または式 (I I - 2 a) の化合物：

【化 7 2】



式 (I I - 2 a)

である、実施形態 5 2 ~ 6 8 のいずれか 1 つに記載の L N P。

【 0 6 9 1】

実施形態 7 6。

前記カチオン性脂質が式 (I I - 1 a) の化合物であり、前記構造脂質がコレステロールであり、前記ヘルパー脂質が D S P C であり、前記 P E G 脂質が B R I J (商標) S 1 0 0 である、実施形態 5 2 ~ 7 5 のいずれか 1 つに記載の L N P。

【 0 6 9 2】

実施形態 7 7。

前記カチオン性脂質が式 (I I - 1 a) の化合物であり、前記構造脂質がコレステロールであり、前記ヘルパー脂質が D S P C であり、前記 P E G 脂質が M Y R J (商標) S 1 0 0、M Y R J (商標) S 5 0、または M Y R J (商標) S 4 0 である、実施形態 5 2 ~ 7 5 のいずれか 1 つに記載の L N P。

【 0 6 9 3】

実施形態 7 8。

前記 L N P が、約 0 . 1 % ~ 約 2 % のモル比の P E G 脂質、例えば約 0 . 2 % ~ 約 0 . 8 m o l %、約 0 . 4 % ~ 約 0 . 6 m o l %、約 0 . 7 % ~ 約 1 . 3 %、または約 1 . 2 % ~ 約 1 . 8 % の P E G 脂質を含む、実施形態 5 2 ~ 7 7 のいずれか 1 つに記載の L N P。

【 0 6 9 4】

実施形態 7 9。

前記 L N P が、約 0 . 2 % ~ 約 0 . 8 %、または約 0 . 5 % のモル比の P E G 脂質を含む、実施形態 5 2 ~ 7 8 のいずれか 1 つに記載の L N P。

【 0 6 9 5】

実施形態 8 0。

前記 L N P が、約 1 . 2 % ~ 約 1 . 8 %、または約 1 . 5 % のモル比の P E G 脂質を含む、実施形態 5 2 ~ 7 8 のいずれか 1 つに記載の L N P。

【 0 6 9 6】

実施形態 8 1。

前記 L N P が、約 4 4 % ~ 約 5 4 % のカチオン性脂質、約 1 9 % ~ 約 2 5 % のヘルパー脂質、約 2 4 % ~ 約 3 3 % の構造脂質、及び約 0 . 2 % ~ 約 0 . 8 % の P E G 脂質のモル比を有する、実施形態 5 2 ~ 8 0 のいずれか 1 つに記載の L N P。

【0697】

実施形態82。

前記LNPが、式(II-1a)の化合物と、コレステロールと、DSPCと、HO-PEG100-CH₂(CH₂)₁₆CH₃、HO-PEG20-CH₂(CH₂)₁₆CH₃、HO-PEG20-CH₂(CH₂)₁₄CH₃、HO-PEG20-C₁₈H₃₅、HO-PEG100-C(O)-CH₂(CH₂)₁₃CH₃、HO-PEG50-C(O)-CH₂(CH₂)₁₃CH₃、HO-PEG40-C(O)-CH₂(CH₂)₁₃CH₃、HO-PEG100-C(O)-CH₂(CH₂)₁₅CH₃、HO-PEG40-C(O)-CH₂(CH₂)₁₅CH₃、及びHO-PEG50-C(O)-CH₂(CH₂)₁₅CH₃から選択されるPEG脂質とを含み、式(II-1a)の化合物：コレステロール：DSPC：PEG脂質のモル比が、49：28.5：22：0.5である、実施形態52～81のいずれか1つに記載のLNP。

10

【0698】

実施形態83。

前記LNPが、式(II-1a)の化合物と、コレステロールと、DSPCと、HO-PEG100-CH₂(CH₂)₁₆CH₃、HO-PEG20-CH₂(CH₂)₁₆CH₃、HO-PEG20-CH₂(CH₂)₁₄CH₃、HO-PEG20-C₁₈H₃₅、HO-PEG100-C(O)-CH₂(CH₂)₁₃CH₃、HO-PEG50-C(O)-CH₂(CH₂)₁₃CH₃、HO-PEG40-C(O)-CH₂(CH₂)₁₃CH₃、HO-PEG100-C(O)-CH₂(CH₂)₁₅CH₃、HO-PEG40-C(O)-CH₂(CH₂)₁₅CH₃、及びHO-PEG50-C(O)-CH₂(CH₂)₁₅CH₃から選択されるPEG脂質とを含み、式(II-1a)の化合物：コレステロール：DSPC：PEG脂質のモル比が、49：27.5：22：1.5である、実施形態52～81のいずれか1つに記載のLNP。

20

【0699】

実施形態84。

前記LNPが、式(II-1a)の化合物と、コレステロールと、DSPCと、HO-PEG100-CH₂(CH₂)₁₆CH₃、HO-PEG20-CH₂(CH₂)₁₆CH₃、HO-PEG20-CH₂(CH₂)₁₄CH₃、HO-PEG20-C₁₈H₃₅、HO-PEG100-C(O)-CH₂(CH₂)₁₃CH₃、HO-PEG50-C(O)-CH₂(CH₂)₁₃CH₃、HO-PEG40-C(O)-CH₂(CH₂)₁₃CH₃、HO-PEG100-C(O)-CH₂(CH₂)₁₅CH₃、HO-PEG40-C(O)-CH₂(CH₂)₁₅CH₃、及びHO-PEG50-C(O)-CH₂(CH₂)₁₅CH₃から選択されるPEG脂質とを含み、式(II-1a)の化合物：コレステロール：DSPC：PEG脂質のモル比が、49：38.5：11：1.5である、実施形態52～81のいずれか1つに記載のLNP。

30

【0700】

実施形態85。

前記LNPが、約1～約25の脂質窒素対リン酸(N:P)比を有する、実施形態52～84のいずれか1つに記載のLNP。

40

【0701】

実施形態86。

前記LNPが、約14のN:P比を有する、実施形態52～85のいずれか1つに記載のLNP。

【0702】

実施形態87。

ヒアルロナンが、前記LNPの表面にコンジュゲートされている、実施形態1～86のいずれか1つに記載のLNP。

【0703】

実施形態88。

50

実施形態 1～87 のいずれか 1 つに記載の複数の脂質ナノ粒子を含む医薬組成物。

【0704】

実施形態 89。

前記複数の LNP が、約 50 nm～約 500 nm、約 150 nm～約 500 nm、約 200 nm～約 500 nm、約 300 nm～約 500 nm、約 350 nm～約 500 nm、約 400 nm～約 500 nm、約 425 nm～約 500 nm、約 450 nm～約 500 nm、または約 475 nm～約 500 nm の平均直径を有する、実施形態 88 に記載の医薬組成物。

【0705】

実施形態 90。

前記複数の LNP が、約 50 nm～約 120 nm の平均直径を有する、実施形態 88 に記載の医薬組成物。

【0706】

実施形態 91。

前記複数の LNP が、約 50 nm、60 nm、70 nm、80 nm、90 nm、100 nm、110 nm、または約 120 nm の平均直径を有する、実施形態 88 に記載の医薬組成物。

【0707】

実施形態 92。

前記複数の LNP が、約 100 nm の平均直径を有する、実施形態 88 に記載の医薬組成物。

【0708】

実施形態 93。

前記複数の LNP が、約 40 mV～約 -40 mV、約 20 mV～約 -20 mV、約 10 mV～約 -10 mV、約 5 mV～約 -5 mV、または約 20 mV～約 -40 mV の平均ゼータ電位を有する、実施形態 88～92 のいずれか 1 つに記載の医薬組成物。

【0709】

実施形態 94。

前記複数の LNP が、約 5 mV 未満、約 0 mV 未満、約 -5 mV 未満、約 -10 mV 未満、約 -20 mV 未満、約 -30 mV 未満、約 -35 mV 未満、または約 -40 mV 未満の平均ゼータ電位を有する、実施形態 88～92 のいずれか 1 つに記載の医薬組成物。

【0710】

実施形態 95。

前記複数の LNP が、約 -50 mV～約 -20 mV、約 -40 mV～約 -20 mV、約 -30 mV～約 -10 mV、約 -20 mV～約 0 mV、約 -15 mV～約 5 mV、または約 -10 mV～約 10 mV の平均ゼータ電位を有する、実施形態 88～92 のいずれか 1 つに記載の医薬組成物。

【0711】

実施形態 96。

前記複数の LNP が、約 -30 mV、約 -31 mV、約 -32 mV、約 -33 mV、約 -34 mV、約 -35 mV、約 -36 mV、約 -37 mV、約 -38 mV、約 -39 mV、または約 -40 mV の平均ゼータ電位を有する、実施形態 94 または 95 に記載の医薬組成物。

【0712】

実施形態 97。

前記医薬組成物を対象に投与すると、組換え RNA ポリヌクレオチドが前記対象の標的細胞に送達され、前記組換え RNA ポリヌクレオチドが、前記対象の前記標的細胞を溶解することができる感染性腫瘍溶解性ウイルスを産生する、実施形態 88～96 のいずれか 1 つに記載の医薬組成物。

【0713】

実施形態 98。

前記標的細胞が、がん性細胞である、実施形態 97 に記載の医薬組成物。

【0714】

実施形態 99。

前記組成物が、静脈内及び／または腫瘍内送達用に製剤化されている、実施形態 88～98 のいずれか 1 つに記載の医薬組成物。

【0715】

実施形態 100。

前記組成物が、前記式 (A'') の PEG 脂質及び／または式 (I) のイオン化可能な脂質を欠いている組成物のものよりも長い *in vivo* 治療効果持続期間を有する、実施形態 88～99 のいずれか 1 つに記載の医薬組成物。

10

【0716】

実施形態 101。

前記組成物が、約 1 時間以上、約 2 時間以上、約 3 時間以上、約 4 時間以上、約 5 時間以上、約 6 時間以上、約 7 時間以上、約 8 時間以上、約 9 時間以上、約 10 時間以上、約 12 時間以上、約 14 時間以上、約 16 時間以上、約 18 時間以上、約 20 時間以上、約 25 時間以上、約 30 時間以上、約 35 時間以上、約 40 時間以上、約 45 時間以上、または約 50 時間以上の *in vivo* 治療効果持続期間を有する、実施形態 99 または 100 に記載の医薬組成物。

【0717】

実施形態 102。

前記組成物が、所定の閾値を超えるまたはそれと等しい *in vivo* の半減期及び／または AUC を有する、実施形態 99 または 100 に記載の医薬組成物。

20

【0718】

実施形態 103。

前記 LNP による前記合成 RNA ウイルスゲノムのカプセル化効率が、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 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、または 100 % である、実施形態 88～102 のいずれか 1 つに記載の医薬組成物。

30

【0719】

実施形態 104。

前記組成物が、約 10 mM、約 20 mM、約 30 mM、約 40 mM、または約 50 mM の総脂質濃度を有する、実施形態 88～103 のいずれか 1 つに記載の医薬組成物。

【0720】

実施形態 105。

前記組成物が、約 2.5、約 3、約 3.5、約 4、約 4.5、約 5、約 5.5、または約 6 の pH で製剤化されている、実施形態 88～104 のいずれか 1 つに記載の医薬組成物。

【0721】

実施形態 106。

前記組成物が複数投与用に製剤化されている、実施形態 88～105 のいずれか 1 つに記載の医薬組成物。

40

【0722】

実施形態 107。

後続投与が、第 1 の投与の少なくとも 3 日後、少なくとも 5 日後、少なくとも 7 日後、少なくとも 9 日後、少なくとも 11 日後、少なくとも 14 日後、または少なくとも 21 日後に投与される、実施形態 106 に記載の医薬組成物。

【0723】

実施形態 108。

50

薬学的に許容される担体をさらに含む、実施形態 88～107 のいずれか 1 つに記載の医薬組成物。

【0724】

実施形態 109。

腫瘍溶解性コクサッキーウイルスウイルスをコードする合成 RNA ウイルスゲノムを含む組換え RNA 分子であって、前記コクサッキーウイルスが、EF 株及び KY 株から選択される CVA21 株である、前記組換え RNA 分子。

【0725】

実施形態 109.1。

腫瘍溶解性コクサッキーウイルスウイルスをコードする合成 RNA ウイルスゲノムを含む組換え RNA 分子であって、前記コクサッキーウイルスが、CVA21 Kuykendall 株である、前記組換え RNA 分子。

【0726】

実施形態 110。

前記コクサッキーウイルスが CVA21-KY 株であり、前記 CVA21-KY 株が、配列番号 5 による少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、または 100% の配列同一性を有するポリヌクレオチド配列を含む、実施形態 109 に記載の組換え RNA 分子。

【0727】

実施形態 111。

前記コクサッキーウイルスが CVA21-EF 株であり、前記 CVA21-EF 株が、配列番号 9 による少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、または 100% の配列同一性を有するポリヌクレオチド配列を含む、実施形態 109 に記載の組換え RNA 分子。

【0728】

実施形態 112。

前記コクサッキーウイルスが、配列番号 6 または 10 による少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、または 100% の配列同一性を有する 5' UTR (IRES) 配列を含む、実施形態 109 に記載の組換え RNA 分子。

【0729】

実施形態 113。

前記コクサッキーウイルスが、配列番号 7 または 11 による少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、または 100% の配列同一性を有する P1 配列を含む、実施形態 109 に記載の組換え RNA 分子。

【0730】

実施形態 114。

前記コクサッキーウイルスが、配列番号 8 または 12 による少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、または 100% の配列同一性を有する 3D 配列を含む、実施形態 109 に記載の組換え RNA 分子。

【0731】

実施形態 115。

前記合成 RNA ウイルスゲノムが、配列番号 1 による 95% 超、90% 超、85% 超、または 80% 超の配列同一性を有するポリヌクレオチド配列を含まない、実施形態 109～114 のいずれか 1 つに記載の組換え RNA 分子。

【0732】

実施形態 116。

前記組換え RNA 分子が、野生型コクサッキーウイルスウイルスのものとの 100% の配列同一性を有する RNA ウイルスゲノムを含まない、実施形態 109～115 のいずれか 1 つに記載の組換え RNA 分子。

【0733】

10

20

30

40

50

実施形態 117。

セネカバレーウイルス (SVV) をコードする合成 RNA ウイルスゲノムを含む組換え RNA 分子であって、前記 SVV が、キメラ SVV を含み、前記合成 RNA ウイルスゲノムが、配列番号 68 との少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、または 100 % の配列同一性を有するポリヌクレオチド配列を含む、前記組換え RNA 分子。

【0734】

実施形態 118。

前記腫瘍溶解性ウイルスをコードする前記ポリヌクレオチド配列に挿入されたマイクロ RNA (miRNA) 標的配列 (miR-TS) カセットをさらに含み、前記 miR-TS カセットが、1つ以上の miRNA 標的配列を含み、細胞内の対応する前記 miRNA のうちの 1つ以上の発現が、前記細胞内の前記コードされたウイルスの複製を阻害する、実施形態 109 ~ 117 のいずれか 1つに記載の組換え RNA 分子。

【0735】

実施形態 119。

前記 1つ以上の miRNA が、miR-124、miR-1、miR-143、miR-128、miR-219、miR-219a、miR-122、miR-204、miR-217、miR-137、miR-142、及び miR-126 から選択される、実施形態 118 に記載の組換え RNA 分子。

【0736】

実施形態 120。

前記 miR-TS カセットが、

- a. miR-124 標的配列の 1つ以上のコピー、miR-1 標的配列の 1つ以上のコピー、及び miR-143 標的配列の 1つ以上のコピー、
- b. miR-128 標的配列の 1つ以上のコピー、miR-219a 標的配列の 1つ以上のコピー、及び miR-122 標的配列の 1つ以上のコピー、
- c. miR-128 標的配列の 1つ以上のコピー、miR-204 標的配列の 1つ以上のコピー、及び miR-219 標的配列の 1つ以上のコピー、または
- d. miR-217 標的配列の 1つ以上のコピー、miR-137 標的配列の 1つ以上のコピー、及び miR-126 標的配列の 1つ以上のコピーを含む、

実施形態 119 に記載の組換え RNA 分子。

【0737】

実施形態 121。

前記組換え RNA 分子が、非ウイルス送達ビヒクルによって細胞に導入されると、複製可能な腫瘍溶解性ウイルスを産生することができる、実施形態 109 ~ 120 のいずれか 1つに記載の組換え RNA 分子。

【0738】

実施形態 122。

前記細胞が、哺乳動物細胞である、実施形態 121 に記載の組換え RNA 分子。

【0739】

実施形態 123。

前記細胞が、哺乳動物対象に存在する哺乳動物細胞である、実施形態 122 に記載の組換え RNA 分子。

【0740】

実施形態 124。

前記 1つ以上の miR-TS カセットが、1つ以上のウイルス遺伝子の 5' 非翻訳領域 (UTR) または 3' UTR に組み込まれている、実施形態 118 ~ 123 のいずれか 1つに記載の組換え RNA 分子。

【0741】

実施形態 125。

前記1つ以上のmiR-TSカセットが、1つ以上のウイルス遺伝子のオープンリーディングフレーム(ORF)、5'非翻訳領域(UTR)、または3'UTRに組み込まれている、実施形態118~123のいずれか1つに記載の組換えRNA分子。

【0742】

実施形態126。

前記組換えRNA分子が、核酸ベクターに挿入されている、実施形態109~125のいずれかに記載の組換えRNA分子。

【0743】

実施形態127。

前記核酸ベクターがレプリコンである、実施形態126に記載の組換えRNA分子。

【0744】

実施形態128。

前記合成RNAウイルスゲノムが、外因性ペイロードタンパク質をコードする異種ポリヌクレオチドをさらに含む、実施形態109~127に記載の組換えRNA分子。

【0745】

実施形態129。

前記外因性ペイロードタンパク質が、MLKL 4HBDドメイン、ガスダーミンDN末端断片、ガスダーミンEN末端断片、HMGB1 Box Bドメイン、SMAC/Diablo、メリチン、L-アミノ酸オキシダーゼ(LAAO)、ディスインテグリン、TRAIL(TNFSF10)、ニトロレダクターゼ、レオウイルスFASTタンパク質、レプチン/FOSL2、 α -1, 3-ガラクトシルトランスフェラーゼ、またはアデノシンデアミナーゼ2(ADA2)を含むまたはそれらからなる、実施形態128に記載の組換えRNA分子。

【0746】

実施形態130。

前記ニトロレダクターゼが、NfsBまたはNfsAである、実施形態129に記載のLNP。

【0747】

実施形態131。

前記レオウイルスFASTタンパク質が、ARV p14、BRV p15、またはp14-p15ハイブリッドである、実施形態129に記載のLNP。

【0748】

実施形態132。

前記外因性ペイロードタンパク質が、蛍光タンパク質、酵素タンパク質、サイトカイン、ケモカイン、細胞表面受容体に結合することができる抗原結合分子、または細胞表面受容体に結合することができるリガンドである、実施形態128に記載の組換えRNA分子。

【0749】

実施形態133。

a) 前記サイトカインが、GM-CSF、IFN γ 、IL-2、IL-7、IL-12、IL-18、IL-21、及びIL-36 γ から選択される、

b) 前記細胞表面受容体のリガンドが、Flt3リガンドもしくはTNFSF14である、

c) 前記ケモカインが、CXCL10、CCL4、CCL21、及びCCL5から選択される、

実施形態132に記載の組換えRNA分子。

【0750】

実施形態134。

前記抗原結合分子が、免疫チェックポイント受容体に結合してそれを阻害することができる、実施形態132に記載の組換えRNA分子。

【0751】

実施形態135。

前記免疫チェックポイント受容体が、PD-1である、実施形態134に記載の組換えRNA分子。

【0752】

実施形態136。

前記抗原結合分子が、腫瘍抗原に結合することができる、実施形態132に記載の組換えRNA分子。

【0753】

実施形態137。

前記抗原結合分子が、二重特異性T細胞エンゲージャー分子（BiTE）または二重特異性軽量T細胞エンゲージャー分子（LiTE）である、実施形態136に記載の組換えRNA分子。

【0754】

実施形態138。

前記腫瘍抗原が、HBV-コア（B型肝炎コア抗原）、HBV-pol、HBsAg、HPV E6、HPV E7、メルケル細胞ポリオマラージT抗原、及びエプスタイン・バーウイルス抗原EBNA2またはBZLF1から選択されるウイルス抗原である、実施形態136または137に記載の組換えRNA分子。

【0755】

実施形態139。

前記腫瘍抗原がDLL3またはEpCAMである、実施形態136または137に記載の組換えRNA分子。

【0756】

実施形態140。

5'から3'に、プロモーター配列、5'接合部切断配列、合成RNAウイルスゲノムを含むRNA分子をコードするポリヌクレオチド配列、ポリA尾部、及び3'接合部切断配列を含む組換えDNA鑄型。

【0757】

実施形態141。

5'から3'に、プロモーター配列、5'接合部切断配列、合成RNAウイルスゲノムを含むRNA分子をコードするポリヌクレオチド配列、ポリA尾部、及び3'接合部切断配列を含む組換えDNA分子であって、前記RNA分子が、実施形態109～139のいずれか1つから選択される、前記組換えDNA分子。

【0758】

実施形態142。

前記プロモーター配列と前記5'接合部切断配列との間にリーダー配列を含む、実施形態140または141に記載の組換えDNA分子。

【0759】

実施形態143。

5'から3'に、プロモーター配列、リーダー配列、5'接合部切断配列、合成RNAウイルスゲノムを含む組換えRNA分子をコードするポリヌクレオチド配列、ポリA尾部、及び3'接合部切断配列を含む組換えDNA分子。

【0760】

実施形態144。

前記リーダー配列が、100bp未満の長さである、実施形態142または143に記載の組換えDNA分子。

【0761】

実施形態145。

前記プロモーター配列が、T7プロモーター配列である、実施形態140～144のい

10

20

30

40

50

ずれか 1 つに記載の組換え DNA 分子。

【0762】

実施形態 146。

前記ポリ A 尾部が、約 50～90 bp の長さまたは約 65～75 bp の長さである、実施形態 140～145 のいずれか 1 つに記載の組換え DNA 分子。

【0763】

実施形態 147。

前記ポリ A 尾部が、約 70 bp の長さである、実施形態 145 に記載の組換え DNA 分子。

【0764】

実施形態 148。

前記ポリ A 尾部が、約 10～50 bp、または 25～35 bp の長さである、実施形態 140～145 のいずれか 1 つに記載の組換え DNA 分子。

【0765】

実施形態 149。

前記 5' 接合部切断配列が、リボザイム配列を含むかまたはそれからなり、前記 3' 接合部切断配列が、リボザイム配列を含むかまたはそれからなる、実施形態 140～148 のいずれか 1 つに記載の組換え DNA 分子。

【0766】

実施形態 150。

前記 5' リボザイム配列が、ハンマーヘッド型リボザイム配列であり、前記 3' リボザイム配列が、デルタ肝炎ウイルスリボザイム配列である、実施形態 149 に記載の組換え DNA 分子。

【0767】

実施形態 151。

前記 5' 接合部切断配列が、RNAse H プライマー結合配列を含むかまたはそれからなり、前記 3' 接合部切断配列が、制限酵素認識配列を含むかまたはそれからなる、実施形態 140～148 のいずれか 1 つに記載の組換え DNA 分子。

【0768】

実施形態 152。

前記 5' 接合部切断配列が、リボザイム配列を含むかまたはそれからなり、前記 3' 接合部切断配列が、制限酵素認識配列を含むかまたはそれからなる、実施形態 140～148 のいずれか 1 つに記載の組換え DNA 分子。

【0769】

実施形態 153。

前記 5' リボザイム配列が、ハンマーヘッド型リボザイム配列、ピストル型リボザイム配列、または修飾されたピストル型リボザイム配列を含むかまたはそれからなる、実施形態 152 に記載の組換え DNA 分子。

【0770】

実施形態 154。

前記 3' 接合部切断配列が、IIS 型制限酵素認識配列を含むかまたはそれからなる、実施形態 140～153 のいずれか 1 つに記載の組換え DNA 分子。

【0771】

実施形態 155。

前記 RNA 分子が、コクサッキーウイルス (CVA) の RNA ウイルスゲノムをコードする、実施形態 140～154 のいずれか 1 つに記載の組換え DNA 分子。

【0772】

実施形態 156。

前記コクサッキーウイルスが CVA 21 株である、実施形態 155 に記載の組換え DNA 分子。

10

20

30

40

50

【0773】

実施形態157。

前記リーダー配列が、配列番号14または15による少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、または100%の配列同一性を有するポリヌクレオチド配列を含むかまたはそれからなる、実施形態155または156に記載の組換えDNA分子。

【0774】

実施形態158。

前記5'接合部切断配列が、配列番号18との少なくとも80%、少なくとも90%、または100%の配列同一性を有するピストル型リボザイム配列を含むかまたはそれからなり、前記5'リボザイム配列のP2モチーフが、「TTTT」のポリヌクレオチド配列を有する、実施形態155～157のいずれか1つに記載の組換えDNA分子。

【0775】

実施形態159。

前記5'接合部切断配列が、配列番号17との少なくとも80%、少なくとも90%、または100%の配列同一性を有するピストル型リボザイム配列を含むかまたはそれからなり、前記5'リボザイム配列のP2モチーフが、「TTTA」のポリヌクレオチド配列を有する、実施形態155～157のいずれか1つに記載の組換えDNA分子。

【0776】

実施形態160。

前記3'接合部切断配列が、BsmBI認識配列を含むかまたはそれからなる、実施形態155～159のいずれか1つに記載の組換えDNA分子。

【0777】

実施形態161。

前記3'接合部切断配列が、BsaI認識配列を含むかまたはそれからなる、実施形態155～159のいずれか1つに記載の組換えDNA分子。

【0778】

実施形態162。

前記プロモーター配列が、T7プロモーター配列であり、前記リーダー配列が、配列番号15によるポリヌクレオチド配列からなり、前記5'接合部切断配列が、配列番号18によるピストル型リボザイム配列を含むかまたはそれからなり、前記ポリA尾部が、約70bpの長さであり、前記3'接合部切断配列が、BsmBI認識配列を含むかまたはそれからなる、実施形態156に記載の組換えDNA分子。

【0779】

実施形態163。

前記プロモーター配列が、T7プロモーター配列であり、前記リーダー配列が、配列番号15によるポリヌクレオチド配列からなり、前記5'接合部切断配列が、配列番号18によるピストル型リボザイム配列を含むかまたはそれからなり、前記ポリA尾部が、約70bpの長さであり、前記3'接合部切断配列が、BsaI認識配列を含むかまたはそれからなる、実施形態156に記載の組換えDNA分子。

【0780】

実施形態164。

前記RNA分子が、セネカバレーウイルス(SVV)のRNAウイルスゲノムをコードする、実施形態140～154のいずれか1つに記載の組換えDNA分子。

【0781】

実施形態165。

前記リーダー配列が、配列番号53～63のいずれか1つによる少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、または100%の配列同一性を有するポリヌクレオチド配列を含むかまたはそれからなる、実施形態164に記載の組換えDNA分子。

【0782】

実施形態166。

前記リーダー配列が、配列番号58による少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、または100%の配列同一性を有するポリヌクレオチド配列を含むかまたはそれからなる、実施形態164に記載の組換えDNA分子。

【0783】

実施形態167。

前記5'リボザイム配列が、配列番号64または65との少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または100%の配列同一性を有するピストル型リボザイム配列であり、前記5'リボザイム配列のP2モチーフが、「TCAA」または「TTAA」のポリヌクレオチド配列を有する、実施形態164～166のいずれか1つに記載の組換えDNA分子。

10

【0784】

実施形態168。

前記RNAウイルスゲノムが、配列番号68の核酸1～670との少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または100%の配列同一性を有する5'UTR(IRES)配列を含む、実施形態164～167のいずれか1つに記載の組換えDNA分子。

【0785】

実施形態169。

前記3'接合部切断配列が、SapI認識配列を含むかまたはそれからなる、実施形態164～168のいずれか1つに記載の組換えDNA分子。

20

【0786】

実施形態170。

前記プロモーター配列が、T7プロモーター配列であり、前記リーダー配列が、配列番号53によるポリヌクレオチド配列からなり、前記5'接合部切断配列が、配列番号64によるピストル型リボザイム配列を含むかまたはそれからなり、前記ポリA尾部が、約70bpの長さであり、前記3'接合部切断配列が、SapI認識配列を含むかまたはそれからなる、実施形態164に記載の組換えDNA分子。

【0787】

実施形態171。

前記プロモーター配列が、T7プロモーター配列であり、前記リーダー配列が、配列番号58によるポリヌクレオチド配列からなり、前記5'接合部切断配列が、配列番号64によるピストル型リボザイム配列を含むかまたはそれからなり、前記ポリA尾部が、約70bpの長さであり、前記3'接合部切断配列が、SapI認識配列を含むかまたはそれからなる、実施形態164に記載の組換えDNA分子。

30

【0788】

実施形態172。

前記組換えDNA分子が、前記プロモーター配列及び前記3'接合部切断配列にわたる領域内に追加の核酸を含まない、実施形態140～171のいずれか1つに記載の組換えDNA分子。

40

【0789】

実施形態173。

実施形態140～172のいずれか1つに記載のDNA分子の*in vitro*転写、及び得られる組換えRNA分子の精製を含む、組換えRNA分子を産生する方法。

【0790】

実施形態174。

前記組換えRNA分子が、前記合成RNAウイルスゲノムによってコードされる前記腫瘍溶解性ウイルスにとって天然である5'末端及び3'末端を含む、実施形態173に記載の方法。

50

【0791】

実施形態175。

有効量の実施形態109～139のいずれか1つに記載の組換えRNA分子、及び哺乳動物対象への投与に好適な担体を含む組成物。

【0792】

実施形態176。

実施形態109～139のいずれか1つに記載の組換えRNA分子を含む粒子。

【0793】

実施形態177。

前記粒子が生分解性である、実施形態176に記載の粒子。

10

【0794】

実施形態178。

前記粒子が、ナノ粒子、エクソソーム、リボソーム、及びリポプレックスからなる群から選択される、実施形態177に記載の粒子。

【0795】

実施形態179。

前記エクソソームが、無傷エクソソームまたは空のエクソソームに由来する修飾エクソソームである、実施形態178に記載の粒子。

【0796】

実施形態180。

20

実施形態176～179のいずれか1つに記載の複数の粒子を含む医薬組成物。

【0797】

実施形態181。

前記複数の粒子が、約50nm～約500nm、約150nm～約500nm、約200nm～約500nm、約300nm～約500nm、約350nm～約500nm、約400nm～約500nm、約425nm～約500nm、約450nm～約500nm、または約475nm～約500nmの平均サイズを有する、実施形態180に記載の医薬組成物。

【0798】

実施形態182。

30

前記複数の粒子が、約50nm～約120nmの平均サイズを有する、実施形態180に記載の医薬組成物。

【0799】

実施形態183。

前記複数の粒子が、約50nm、60nm、70nm、80nm、90nm、100nm、110nm、または約120nmの平均サイズを有する、実施形態180に記載の医薬組成物。

【0800】

実施形態184。

前記複数の粒子が、約100nmの平均サイズを有する、実施形態180に記載の医薬組成物。

40

【0801】

実施形態185。

前記複数の粒子が、約40mV～約-40mV、約20mV～約-20mV、約10mV～約-10mV、約5mV～約-5mV、または約20mV～約-40mVの平均ゼータ電位を有する、実施形態180～184のいずれか1つに記載の医薬組成物。

【0802】

実施形態186。

前記複数の粒子が、約5mV未満、約0mV未満、約-5mV未満、約-10mV未満、約-20mV未満、約-30mV未満、約-35mV未満、または約-40mV未満の

50

平均ゼータ電位を有する、実施形態 180～184 のいずれか 1 つに記載の医薬組成物。

【0803】

実施形態 187。

前記複数の粒子が、約 -50 mV ～約 -20 mV 、約 -40 mV ～約 -20 mV 、約 -30 mV ～約 -10 mV 、約 -20 mV ～約 0 mV 、約 -15 mV ～約 5 mV 、または約 -10 mV ～約 10 mV の平均ゼータ電位を有する、実施形態 180～186 のいずれか 1 つに記載の医薬組成物。

【0804】

実施形態 188。

前記複数の粒子が、約 -30 mV 、約 -31 mV 、約 -32 mV 、約 -33 mV 、約 -34 mV 、約 -35 mV 、約 -36 mV 、約 -37 mV 、約 -38 mV 、約 -39 mV 、または約 -40 mV の平均ゼータ電位を有する、実施形態 180～186 のいずれか 1 つに記載の医薬組成物。

【0805】

実施形態 189。

前記組成物を対象に送達すると、カプセル化された組換え RNA 分子が標的細胞に送達され、前記カプセル化された組換え RNA 分子が、前記標的細胞を溶解することができる感染性ウイルスを産生する、実施形態 180～188 のいずれか 1 つに記載の医薬組成物。

【0806】

実施形態 190。

実施形態 109～139 のいずれか 1 つに記載の組換え RNA 分子を含む無機粒子。

【0807】

実施形態 191。

前記無機粒子が、金ナノ粒子 (GNP)、金ナノロッド (GNR)、磁性ナノ粒子 (MNP)、磁性ナノチューブ (MNT)、カーボンナノホーン (CNH)、カーボンフラーレン、カーボンナノチューブ (CNT)、リン酸カルシウムナノ粒子 (CPNP)、メソポーラスシリカナノ粒子 (MSN)、シリカナノチューブ (SNT)、または星状中空シリカナノ粒子 (SHNP) からなる群から選択される、実施形態 190 に記載の無機粒子。

【0808】

実施形態 192。

実施形態 190 または 191 に記載の無機粒子を含む組成物であって、前記粒子の平均直径が、約 500 nm 未満であるか、約 50 nm ～ 500 nm であるか、約 250 nm ～約 500 nm であるか、または約 350 nm である、前記組成物。

【0809】

実施形態 193。

ペイロード分子をコードする第 2 の組換え RNA 分子をさらに含む、実施形態 1～87 のいずれか 1 つに記載の LNP、実施形態 176～179 のいずれか 1 つに記載の粒子、または実施形態 190 もしくは 191 に記載の無機粒子。

【0810】

実施形態 194。

前記第 2 の組換え RNA 分子がレプリコンである、実施形態 193 に記載の LNP、粒子、または無機粒子。

【0811】

実施形態 195。

実施形態 1～87 のいずれか 1 つに記載の LNP、実施形態 176～179 のいずれか 1 つに記載の粒子、または実施形態 190 もしくは 191 に記載の無機粒子を含む医薬組成物であって、前記組成物が静脈内及び／または腫瘍内送達用に製剤化されている、前記医薬組成物。

【0812】

実施形態196。

前記LNP、前記粒子、または前記無機粒子の前記標的細胞が、がん性細胞である、実施形態195に記載の医薬組成物。

【0813】

実施形態197。

がん性細胞を殺傷する方法であって、前記がん性細胞を、実施形態1～87、176～179、または190もしくは191のいずれか1つに記載の粒子、実施形態109～139のいずれか1つに記載の組換えRNA分子、あるいはそれらの組成物に、前記粒子を前記がん性細胞に細胞内送達するのに十分な条件下で曝露することを含み、カプセル化ポリヌクレオチドによって産生される前記複製可能なウイルスが、前記がん性細胞の殺傷をもたらす、前記方法。

10

【0814】

実施形態198。

前記複製可能なウイルスが、非がん性細胞で産生されない、実施形態197に記載の方法。

【0815】

実施形態199。

前記方法が、*in vivo*、*in vitro*、または*ex vivo*で行われる、実施形態197または198に記載の方法。

20

【0816】

実施形態200。

対象のがんを処置する方法であって、前記がん罹患している対象に、有効量の実施形態1～87、176～179、または190もしくは191のいずれか1つに記載の粒子、実施形態109～139のいずれか1つに記載の組換えRNA分子、あるいはそれらの組成物を投与することを含む、前記方法。

【0817】

実施形態201。

前記粒子またはその組成物が、静脈内に、鼻腔内に、腫瘍内に、腹腔内に、または吸入剤として投与される、実施形態200に記載の方法。

30

【0818】

実施形態202。

前記粒子またはその組成物が、腫瘍内及び／または静脈内に投与される、実施形態200に記載の方法。

【0819】

実施形態203。

前記粒子またはその組成物が、前記対象に繰り返し投与される、実施形態200～202のいずれか1つに記載の方法。

【0820】

実施形態204。

前記対象が、マウス、ラット、ウサギ、ネコ、イヌ、ウマ、非ヒト霊長類、またはヒトである、実施形態200～203のいずれか1つに記載の方法。

40

【0821】

実施形態205。

前記がんが、肺癌、乳癌、結腸癌、または膵臓癌であり、前記合成RNAウイルスゲノムが、KY株に由来するポリヌクレオチド配列を含む、実施形態200～204のいずれかに記載の方法。

【0822】

実施形態206。

前記がんが、膀胱癌、腎細胞癌、卵巣癌、胃癌または肝臓癌であり、前記合成RNAウ

50

イルスゲノムが、E F株に由来するポリヌクレオチド配列を含む、実施形態200～204のいずれかに記載の方法。

【0823】

実施形態207。

前記がんが、肺癌、乳癌、卵巣癌、子宮頸癌、前立腺癌、精巣癌、大腸癌、結腸癌、膵臓癌、肝臓癌、腎細胞癌、胃癌、頭頸部癌、甲状腺癌、悪性神経膠腫、膠芽腫、メラノーマ、B細胞慢性リンパ球性白血病、多発性骨髄腫、意義不明の単クローン性高ガンマグロブリン血症(MGUS)、メルケル細胞癌、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫(DLBCL)、肉腫、神経芽細胞腫、神経内分泌癌、横紋筋肉腫、髓芽腫、膀胱癌、及び辺縁帯リンパ腫(MZL)から選択される、実施形態197～204のいずれか1つに記載の方法。

10

【0824】

実施形態208。

前記がんが、肺癌、乳癌、結腸癌、膵臓癌、膀胱癌、腎細胞癌、卵巣癌、胃癌、及び肝臓癌からなる群から選択される、実施形態197～204のいずれかに記載の方法。

【0825】

実施形態209。

前記がんが、腎細胞癌、肺癌、または肝臓癌である、実施形態197～204のいずれかに記載の方法。

【0826】

実施形態210。

前記肺癌が、小細胞肺癌または非小細胞肺癌(例えば、肺扁平上皮癌または肺腺癌)である、実施形態205、207、または208に記載の方法。

20

【0827】

実施形態211。

前記肝臓癌が、肝細胞癌(HCC)(例えば、B型肝炎ウイルス関連HCC)である、実施形態206、207、及び208のいずれかに記載の方法。

【0828】

実施形態212。

前記前立腺癌が、処置下で発現した神経内分泌前立腺癌である、実施形態207に記載の方法。

30

【0829】

実施形態213。

前記がんが、肺癌、肝臓癌、前立腺癌(例えば、CRPC-NE)、膀胱癌、膵臓癌、結腸癌、胃癌、乳癌、神経芽細胞腫、腎細胞癌、卵巣癌、横紋筋肉腫、髓芽腫、神経内分泌癌、メルケル細胞癌、またはメラノーマである、実施形態197～204のいずれか1つに記載の方法。

【0830】

実施形態214。

前記がんが、小細胞肺癌(SCLC)または神経芽細胞腫である、実施形態197～204のいずれか1つに記載の方法。

40

【0831】

実施形態215。

がんの処置を必要とする対象においてそれを行う方法であって、有効量のCVA21-EFウイルスを前記対象に投与することを含む、前記方法。

【0832】

実施形態216。

がんの処置を必要とする対象においてそれを行う方法であって、有効量のCVA21-KYウイルスを前記対象に投与することを含む、前記方法。

【0833】

50

実施形態 217。

がんの処置を必要とする対象においてそれを行う方法であって、有効量の CVA21-Kuykendall ウイルスを前記対象に投与することを含む、前記方法。

【0834】

実施形態 218。

前記ウイルスが、腫瘍内及び／または静脈内に投与される、実施形態 215～217 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0835】

実施形態 219。

免疫チェックポイント阻害剤を前記対象に投与することをさらに含む、実施形態 197～218 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0836】

実施形態 220。

前記免疫チェックポイント阻害剤が、PD-1 の阻害剤である、実施形態 219 に記載の方法。

【0837】

実施形態 221。

エンジニアリングされた抗原受容体を含むエンジニアリングされた免疫細胞を投与することをさらに含む、実施形態 197～218 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0838】

実施形態 222。

がんの処置を必要とする対象においてそれを行う方法であって、治療有効量の、腫瘍溶解性コクサッキーウイルスであって、CVA21 株である前記コクサッキーウイルス、または前記 CVA21 をコードするポリヌクレオチドを前記対象に投与することを含み、前記がんが、ICAM-1 の発現及び／または ICAM-1 陽性がん細胞のパーセンテージに基づいて CVA21 感染感受性と分類される、前記方法。

【0839】

実施形態 223。

がんの処置を必要とする対象においてそれを行う方法であって、

(a) 前記がんにおける ICAM1 の発現レベル及び／または ICAM-1 陽性がん細胞のパーセンテージを決定すること、

(b) 前記がんを、(a) で決定された ICAM-1 の前記発現及び／または ICAM-1 陽性がん細胞の前記パーセンテージに基づいて、コクサッキーウイルス 21 (CVA21) 感染感受性と分類すること、ならびに

(c) 前記がんがステップ (b) で CVA21 感染感受性と分類された場合、治療有効量の CVA21 または前記 CVA21 をコードするポリヌクレオチドを前記対象に投与すること

を含む、前記方法。

【0840】

実施形態 224。

コクサッキーウイルス 21 (CVA21) または前記 CVA21 をコードするポリヌクレオチドによる処置のために、がんに罹患している対象を選択する方法であって、

(a) 前記がんにおける ICAM-1 の発現レベル及び／または ICAM-1 陽性がん細胞のパーセンテージを決定すること、

(b) 前記がんを、(a) で決定された ICAM-1 の前記発現レベル及び／または ICAM1 陽性がん細胞の前記パーセンテージに基づいて、CVA21 感染感受性と分類すること、

(c) 前記がんが (b) で CVA21 感染感受性と分類された場合、前記 CVA21 または前記 CVA21 をコードする前記ポリヌクレオチドによる処置のために前記対象を選択すること、ならびに

10

20

30

40

50

(d) 前記選択された対象に、前記 C V A 2 1 または前記 C V A 2 1 をコードする前記ポリヌクレオチドを投与することを含む、前記方法。

【0841】

実施形態 225。

前記 C V A 2 1 株が C V A 2 1 - K Y である、実施形態 222 ~ 224 のいずれか 1 つに記載の方法。

【実施例】

【0842】

以下の実施例は、本開示の様々な実施形態を説明する目的で与えられており、いかなるかたちでも本開示を限定することを意味するものではない。本実施例は、本明細書に記載の方法と共に、現時点で好ましい実施形態を代表するものであり、例示的であり、開示の範囲を制限することを意図したものではない。特許請求の範囲によって定義される開示の精神に包括される実施例中の変更及び他の使用が、当業者には想定されるであろう。

【0843】

実施例 1：組換え RNA 分子からの感染性ピコルナウイルスウイルスの産生

組換え RNA 分子から感染性 C V A 2 1 ウイルスを産生する能力を評価するために実験を行った。簡単に説明すると、C V A 2 1 ウイルスゲノムを含む RNA ポリヌクレオチドを *in vitro* で T7 転写によって生成し、Lipofectamine RNAi Max 中で 1 μ g の C V A 2 1 - RNA 構築物を 4 時間にわたって 293T 細胞にトランスフェクトし、細胞を洗浄し、完全培地を各ウェルに加えた。トランスフェクトした 293T からの上清を 72 時間後に収集し、0.45 μ M フィルターでシリンジ濾過し、NCI-H1299 細胞に対して段階的に希釈した。48 時間後、上清を NCI-H1299 培養物から除去し、細胞をクリスタルバイオレットで染色してウイルス感染力を評価した。C V A 2 1 ウイルスゲノムを含む RNA 分子は、活性のある溶解性ウイルスを産生した（データは示さない）。

【0844】

さらに、1 μ g の C V A 2 1 - RNA 脂質、C V A 2 1 プラスミド DNA、または C V A 2 1 陰性 pDNA 対照で処理した NCI-H1299 細胞の上清を 72 時間後に収集し、非感染 NCI-H1299 細胞に対して段階的に希釈した。標準的プロトコルに従って細胞生存率アッセイを行った。C V A 2 1 - RNA / LNP は、*in vitro* で腫瘍細胞溶解をもたらす感染性ウイルスを産生することができる（データは示さない）。

【0845】

実施例 2：C V A 2 1 をコードする RNA の静脈内送達のための脂質ナノ粒子の製剤

in vivo での RNA の送達のために、C V A 2 1 ゲノムを含む組換え RNA 分子を脂質ナノ粒子に配合した。

【0846】

脂質ナノ粒子の産生：

以下の脂質を脂質ナノ粒子の製剤において使用した：

(a) D-Lin-MC3-DMA (MC3)、

(b) N-(2,3-ジオレオイルオキシ)プロピル)-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド (DOTAP)

(c) COATSOME (登録商標) SS-LC (旧名：SS-18 / 4PE-13)

、

(d) COATSOME (登録商標) SS-EC (旧名：SS-33 / 4PE-15)

、

(e) COATSOME (登録商標) SS-OC、

(f) COATSOME (登録商標) SS-OP、

(g) ジ((Z)-ノナ-2-エン-1-イル)9-((4-ジメチルアミノ)ブタノイル)オキシ)ヘプタデカンジオエート (L-319)

10

20

30

40

50

- (h) コレステロール；
- (i) 1, 2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (DSPC)、
- (j) 1, 2-ジラウロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン (DLEP E)、
- (k) 1, 2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (DOPC)、
- (l) 1, 2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン (DOP E)、
- (m) 1, 2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[アミノ (ポリエチレングリコール) -5000] (DSPE-PEG5K)、
- (n) 1, 2-ジパルミトイル-rac-グリセロールメトキシポリエチレングリコール-2000 (DPG-PEG2K)、
- (o) 1, 2-ジステアロイル-rac-グリセロ-3-メチルポリオキシエチレン-2000 (DSG-PEG2K)、
- (p) 1, 2-ジミリストイル-rac-グリセロ-3-メチルポリオキシエチレン-2000 (DMG-PEG2K)
- (q) ポリオキシエチレン (100) ステアリルエーテル (BRIJ (商標) S100、CAS 番号: 9005-00-9)、
- (r) ポリオキシエチレン (20) ステアリルエーテル (BRIJ (商標) S20、CAS 番号: 9005-00-9)、
- (s) ポリオキシエチレン (20) オレイルエーテル (BRIJ (商標) O20、CAS 番号: 9004-98-2)、
- (t) ポリオキシエチレン (20) セチルエーテル (BRIJ (商標) C20、CAS 番号: 9004-95-9)、
- (u) ポリオキシエチレン (40) ステアレート (MYRJ (商標) S40、CAS 番号: 9004-99-3)。

10

20

30

40

50

【0847】

エタノール中、様々な比で脂質を調製した。次いで、マイクロ流体マイクロ混合物 (Precision NanoSystems, Vancouver, BC) を使用して、2 mL / 分の合計流量 (エタノール、脂質混合物については 0.5 mL / 分、水性緩衝液、RNA については 1.5 mL / 分) で RNA 脂質ナノ粒子を生成した。得られた粒子を、Ca 及び Mg を含む PBS を用いたタンジェンシャルフロー濾過によって洗浄した。

【0848】

脂質ナノ粒子の物理的特徴の分析：

脂質ナノ粒子の物理的特徴をタンジェンシャルフロー濾過の前後に評価した。粒径分布及びゼータ電位の測定値を、Malvern Nano-ZS Zetasizer (Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, UK) を使用した光散乱によって決定した。サイズ測定を pH 7.4 の HBS で行い、ゼータ電位測定を pH 7.4 の 0.01 M HBS で行った。RNA 封入のパーセンテージは Ribogreen アッセイによって測定した。80 パーセントを超える RNA 封入を示した脂質ナノ粒子を *in vivo* で試験した。

【0849】

実施例 3：メラノーマにおける CVA21 コード RNA 脂質ナノ粒子の *In vivo* 有効性

CVA21 コード RNA 分子を含む脂質ナノ粒子が *in vivo* で感染性ウイルスを産生してメラノーマ腫瘍成長を阻害できるかを決定するために、実験を行った。CVA21 RNA 脂質ナノ粒子の産生、製剤、及び分析については、実施例 2 に記載されている。

【0850】

SK-MEL28 異種移植モデルを使用して、腫瘍成長を阻害する CVA21 RNA 脂質ナノ粒子の能力を評価した。簡単に説明すると、SK-MEL28 細胞 (無血清 PBS 及び Matrigel (登録商標) の 1:1 混合物中、 1×10^6 細胞 / 0.1 mL)

を、8週齢の雌の胸腺欠損ヌードマウス (Charles River Laboratories) の右側腹部に皮下接種した。腫瘍サイズ中央値がおおよそ 150mm^3 ($120\sim 180\text{mm}^3$ の範囲) に達したとき、マウスの腫瘍内に PBS、もしくは Lipofectamine RNAiMAX ($1\mu\text{g}$) と共に製剤化された CVA21 コード RNA を投与したか、または静脈内に CVA21 コード RNA 脂質ナノ粒子 (製剤 ID: 70032-6C、 $5\mu\text{g}$) を投与した。マウスには、1日目及び5日目に腫瘍内処置を行ったか、または1日目、6日目、11日目、及び16日目に静脈内処置を行った。電子ノギスを使用して腫瘍体積を週に3回測定した。

【0851】

図1に示すように、CVA21 Kuykendall株 RNA 分子を含む LNP (製剤 ID: 70032-6C; MC3: Chol: DSPC: DPG-PEG5K は約 49:39.8:11:0.2 mol% である) での静脈内処置、または Lipofectamine と共に製剤化された CVA21-Kuykendall 株 RNA 分子の腫瘍内処置は、PBS で処置されたマウスと比較して、腫瘍担持マウスにおける腫瘍成長を防止した (二元配置 ANOVA、 $p < 0.001$)。集合的に、これらの結果は、CVA21 RNA 分子を含む脂質ナノ粒子がメラノーマの処置のための有効な治療戦略であることを示唆している。

【0852】

実施例4: CVA21の個別の3'末端の生成のための戦略

上述のように、本明細書に記載される合成ゲノムは、合成ゲノムから複製可能かつ感染性のウイルスを産生するために、ウイルスにとって天然である個別の3'末端及び5'末端を必要とする。in vitro で T7 RNA ポリメラーゼによって産生される RNA 転写物は、哺乳動物の5'及び3' UTR を含み、したがって、感染性 ssRNA ウイルスの産生に必要な個別の天然末端を含まない。

【0853】

感染性 CVA21 に必要な個別の3'末端を生成するために、3'制限酵素認識配列を使用する戦略を用いた。IIS型制限認識配列 (例えば、BsmBI、BsaI、または SapI 認識配列) を DNA 鋳型の3'末端で挿入した。対応する制限酵素 (例えば、BsmBI、BsaI、または SapI) は、その認識部位の5'を切断して、ウイルスにとって天然な個別のウイルスポリアデニル化部位を生成するために適切な長さのポリチミジンの区間を生成する。このプロセスは図2Aに示されている。

【0854】

BsaI-HF (登録商標) v2 及び BsmBI-v2 (New England Biolabs) の両方を、DNA 鋳型の個別の3'末端を生成する効率について試験した。BsmBI 認識配列または BsaI 認識配列のいずれかを含む DNA 鋳型を構築し、製品マニュアルに提示されている適切な条件で対応する酵素による消化に供した。図2B (上のゲル画像) に示すように、BsmBI は、1 酵素単位 / μg DNA 濃度で対応する DNA 構築物の完全な消化を達成したが、より低い濃度の BsmBI は、不完全な消化をもたらした。その一方で、図2B (下のゲル画像) に示すように、BsaI は、より低い 0.015 酵素単位 / μg DNA の濃度で対応する DNA 構築物の消化の完了を達成した。これは、ポリA尾部領域の後に BsaI 認識配列を組み込み、対応する BsaI 制限酵素を使用することにより、RNA ウイルスゲノムのための in vitro DNA 鋳型の個別の3'末端を効率的に生成できることを示唆している。

【0855】

実施例5: CVA21の個別の5'末端の生成のためのRNaseH戦略

CVA21にとって天然な個別の5'末端を生成するために、RNaseH戦略を用いた。T7リーダーは、ウイルスの真の末端を生成するために除去されなければならない。図3に示されているのは、in vitro 転写 (IVT) 及び5'リーダープロセシング手法の図である。IVT 鋳型が上部に示され、得られる RNA 転写物が中央に示されている。この CVA21 + ssRNA 転写物は、次いで相補的 dsDNA オリゴ (

破線の枠) にアニーリングされ、この部分が RNase H によって加水分解される。適正な 5' 末端を有する最終的なウイルス ssRNA 産物が最下部に示されている。

【0856】

この戦略は、3' 制限酵素戦略との組み合わせで、感染性 CVA21 の産生に必要な個別の 5' 末端及び 3' 末端を有する最終的な合成 CVA21 ゲノムを産生する。

【0857】

実施例 6：CVA21 の個別の 5' 末端の生成のためのリボザイム戦略

CVA21 にとって天然な個別の 5' 末端を生成するために、リボザイム戦略を用いた。この手法の概略は、ピコルナウイルスの 5' 末端で切断するリボザイムの設計を示す図 4 に示されている。示されている 2 つのリボザイムはハンマーヘッド及びピストル型リボザイムであるが、これに関連して特異的に切断するように複数の他のリボザイムを適合させることができる。

【0858】

この戦略における実施態様のためのハンマーヘッド及びピストル型リボザイムの修飾については、図 5 及び図 6 にそれぞれ示す。図 5 A には、CVA21 の 5' 末端にアニーリングして切断する最小限のハンマーヘッド型リボザイム (HHR) の構造モデルが示されている (このリボザイムは、矢印によって示される部位で 5' 末端を切断する)。図 5 B には、CVA21 5' 末端の切断のための安定化ステム I (STBL) を有するハンマーヘッド型リボザイムの構造モデルが示されている (このリボザイムは、矢印によって示される部位で 5' 末端を切断する)。図 6 A は、野生で見出されるピストル型リボザイムの特徴の概略図を示す (ピストル WT)。図 6 B は、P3 鎖を融合させるためにテトラループが付加された、mFOLD によってモデル化された P. Polymyxa 由来のピストル型リボザイムを示す。破線の枠内の核酸は、ウイルス配列との関連でリボザイムのフォールドを保持するように変異誘発した。破線の枠内に示される WT の「GUC」配列を「UCA」に変異させてピストル 1 を生成し、「GUC」配列を「TTA」に変異させてピストル 2 を生成した。

【0859】

実施例 7：コクサッキーウイルスをコードする RNA 分子の最適化

組換え RNA 分子から感染性コクサッキーウイルス A21 (CVA21) を産生する能力を評価するために実験を行った。簡単に説明すると、CVA21 ウイルスゲノムを含む RNA ポリヌクレオチドを、既報の CVA21 ゲノム配列 (Newcombe et al., Cellular receptor interactions of Coxsackieviruses Journal of General Virology (2003), 84, 3041-3050 を参照されたい。GenBank 受入番号 AF465515) に基づいて、in vitro で T7 転写によって生成した。Lipofectamine RNAiMax 中で 1 µg の CVA21 Kuykendall 株 RNA 構築物を 4 時間にわたって SK-MEL-28 細胞にトランスフェクトし、この時点でウェルを洗浄し、完全培地を各ウェルに加えた。48 時間後、上清を SK-MEL-28 培養物から除去し、細胞をクリスタルバイオレットで染色してウイルス感染力を評価した。図 7 A (左のパネル) に示すように、Newcombe CVA21 配列 (GenBank 受入番号 AF465515) によるウイルスゲノム配列を有する CVA21 Kuykendall 株を含む RNA 分子は、活性のある溶解性ウイルスを産生しなかった (溶解されていない SK-MEL-28 細胞のクリスタルバイオレット染色によって示される)。

【0860】

驚くべきことに、組換え RNA 分子から感染性 CVA21 を産生するには、5' UTR への改変が必要であった。図 7 A (右のパネル) に示すように、Brown et al. によって説明された 5' UTR 配列 (Journal of Virology, (2003) 77:16, p. 8973-8984。GenBank 受入番号 AF54670

2) の、Newcombeによって説明されたCVA21ゲノム配列への組み込み (GenBank受入番号AF546702によるウイルスゲノム配列を有するCVA21 Kuykendall株;以降CVA21-Brown) は、複数の独立したクローンでのクリスタルバイオレット染色の欠如によって示されるように、感染性CVA21ウイルスの産生及びウイルス細胞溶解をもたらした。2つの異なるCVA21-BrownクローンをトランスフェクトしたSK-MEL-28細胞からの上清を72時間後に収集し、0.45 μ Mフィルターでシリンジ濾過し、新鮮なSK-MEL-28細胞に対して段階的に希釈した。48時間後、上清をSK-MEL-28培養物から除去し、細胞をクリスタルバイオレットで染色してウイルス感染力を評価した。図7Bに示すように、Brown 5' UTR配列を含むCVA21コードRNA分子 (UTR配列-配列番号2、修飾されたCVA21 Kuykendall株配列-配列番号1) は、細胞溶解を媒介する上清単独の能力によって示されるように、感染性CVA21を産生させて、トランスフェクト細胞の上清中に放出させた。

10

【0861】

実施例8: CVA21-RNAの*in vivo*有効性

LNPカプセル化CVA21 Kuykendallゲノムの*in vivo*有効性を評価するために実験を行った。簡単に説明すると、メラノーマのSK-MEL-28モデルを使用した。8~12週齢のNU/NUヌード雌マウスの右側腹部に、100 μ LのMatrigel中の $5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 個の生存腫瘍細胞を皮下注射した。腫瘍が $150 \pm 30 \text{ mm}^3$ の既定体積に達したときに処置を開始した。合成CVA21-LNPを1日目及び8日目に0.2 mg/kgまたは0.05 mg/kgで静脈内投与した。0.05 mg/kgの低さの用量レベルで完全な腫瘍退縮が観察された (図8A)。安定な体重 (図8B) 及び有害な臨床徴候の欠如によって示されたように、両方の用量が良好に忍容された。

20

【0862】

CVA21ウイルス侵入及びICAM-1発現:

CVA21ウイルス侵入のための細胞上のICAM-1及び崩壊促進因子(DAF)の発現のための要件を評価するために、実験を行った。簡単に説明すると、H1299細胞を修飾して、ICAM-1及び/またはDAF発現をノックアウトした。修飾された細胞をCVA21-KYに72時間感染させた。図8Cに示すように、CVA21媒介性細胞溶解にはICAM-1発現が必要であった (ICAM-1+条件下の細胞単層の非存在によって証明された)。

30

【0863】

次いで、130のヒト細胞系をmRNAによるICAM-1発現及びタンパク質発現について分析した。次いで、CVA感染に対する細胞系の感受性とICAM-1発現レベルを相関付けた。TCID50が<0.5であれば、細胞系をCVA21-KY感染感受性と分類した。TCID50が>0.5であれば、細胞系をCVA21-KY感染抵抗性と分類した。図8Dに示すように、感受性細胞系は、抵抗性細胞系と比較して有意に増加したICAM-1発現を示し、ICAM-1発現は、CVA21-KY感染と相関した (図8E)。NSCLC、RCC、HCC、メラノーマ、HNSCC、TNBC、及び膀胱癌を含む7つの異なる疾患適応症からのヒト腫瘍マイクロアレイ組織を、潜在的な疾患適応症の選択のために、免疫組織化学によってヒトICAM-1発現についてさらに評価した (以下の表19)。結果は、これらの腫瘍組織のほとんどがCVA21感染に対して許容状態となることを示した。

40

【表 19】

表 19：7つの疾患適応症に対する腫瘍マイクロアレイ及びIHCを使用したヒトICAM-1発現の分析

疾患適応症	試験した コア腫瘍 試料数(N)	有病率	腫瘍部陽性	Hスコア*
		陽性コア率: ICAM-1+ $\geq$ 1%	ICAM1+ $\geq$ 1%コ アの腫瘍細胞の平 均率(中央値)	ICAM1+ $\geq$ 1%コ アの平均 H スコア (中央値)
NSCLC	97	72%	39% (30%)	92 (60)
RCC (明細胞)	67	79%	40% (40%)	83 (50)
HCC	69	72%	40% (25%)	86 (48)
メラノーマ	26	77%	31% (23%)	67 (60)
TNBC	46	52%	8% (3%)	21 (4)
頭頸部癌	60	70%	7% (2%)	14 (4)
膀胱(尿路上皮癌)	37	24%	24% (3%)	50 (9)

*Hスコアは発現強度の尺度(+1、+2、+3)であり、腫瘍部%=[1×(%細胞 1+)+2×(%細胞 2+)+3×(%細胞 3+)]である。

【0864】

実施例 9：CVA21 株の選択

3つのCVA21株：Kuykendall株、EF株、及びKY株のうちの1つに由来する合成腫瘍溶解性RNAの細胞トロピズム及び治療有効性における差異を決定するために、実験を行った。図32は、3つのCVA21株（EF、KY、及びKuykendall）のRNAウイルスゲノムのドメイン構成の概略及び選択的領域の核酸開始／終了位置を示す。

【0865】

評価基準には以下が含まれた：

- (a) *in vitro*及び *in vivo*のトロピズムの幅及びがん細胞殺傷能力の効力、
- (b) 細胞の抗ウイルス応答に対するウイルス感受性（例えば、インターフェロン感受性）、
- (c) 株安定性（例えば、複製忠実度、組換え頻度）、
- (d) *in vivo*の安全性及び有効性。

【0866】

全体として、結果は、KY及びEF株の両方が明らかに実験室株Kuykendall（KuyK）より優れた性能を持つことを示す。これらの実験の結果は、図12A～28Bに提供されており、以下のようにまとめられる。

【0867】

*in vitro*でのトロピズム及び効力：

細胞傷害性スクリーン及び定量的ウエスタンブロッティングを行って、3つのCVA21株のトロピズム及び効力を比較した。図12A及び図12Bに示すように、目的の細胞

系のうちの個々の株を比較すると、EF及びKYは、KX（図示せず）及びKuykendall株より優れた性能を持ち、両方ともより幅広い細胞系を殺傷した（すなわち、より広いトロピズム）。AUC値<200を感受性のカットオフとして使用した場合、Kuykendall実験室株に対しては131中82の被験細胞系が抵抗性であったが、KY株に対しては131中59の細胞系のみが抵抗性であり、EF株に対しては131中65の細胞系のみが抵抗性であった（図12A）。

【0868】

図13に示すように、KY及びEF株は、Kuykendall実験室株と比較すると、より広いトロピズム及び／または複数の適応症に対する増加した効力を呈する。

【0869】

図14に示すように、KY株は、NSCLC細胞系を含む肺癌細胞系においてより有利なトロピズムを示した。in vitro細胞傷害性スクリーンの結果は、EF及びKY株のAUC値の比としてプロットした。値が1を超える細胞系はEFに有利であり（濃灰色のバー）、値が1未満の細胞系はKYに有利である（薄灰色のバー）。KYが有利なトロピズムを示した追加の適応症が、図15に示されている（図15Aの乳腺細胞系、図15Bの結腸／GI系、及び図15Cの脾臓細胞系）。図15において、濃灰色はEFに有利なトロピズムを表し、薄灰色はKYに有利なトロピズムを表す。

【0870】

図16に示すように、KY株はNSCLC／腺癌in vitroモデルにおいてより腫瘍溶解性がある。ヒトNSCLC腫瘍マイクロアレイ（n=97）を免疫組織化学によってICAM-1発現について試験した（図16A参照）。EF及びKY株の腫瘍溶解有効性についても、これらの細胞系モデル全体で比較した。図16Bに示すように、KY株は、複数のNSCLC／腺癌細胞系において、EF株と比較してより低いIC50で腫瘍細胞溶解を示した（図16B参照。ここで、KY株のIC50は、11／15のNSCLC／腺癌細胞系においてより低い）。図16Cは、KY株が大細胞癌細胞系においてより低いIC50を示したことも示す（左のパネル）。

【0871】

EF株は、膀胱（図17A）、腎臓（図17B）、肝臓（図17C）、卵巣（図17D）、及びGBM（図17E）の細胞系において、より有利なトロピズムを示した。

【0872】

KY及びEF株は、乳癌in vitroモデルで同様の腫瘍溶解有効性を示した（図18A）。腎細胞癌（RCC）及び肝細胞癌（HCC）のin vitroモデルでは、EF株がKY株よりも低い平均IC50値を有し、このことは、EF株がHCC及びRCCにおいてより良好な腫瘍溶解有効性を有することを示している。図17B、図17C、図18B、及び図18Cを参照されたい。

【0873】

EF株は、hICAM-1同系腫瘍モデルにおいてより強力である：細胞系を形質導入し、hICAM-1の発現について選択した。CVA21のKY及びEF株による感染への感受性について、細胞系をTCID50によって分析した。図19に示すように、EF株は、すべての被験マウス系でKY株より優れた性能を持ち、唯一のKY許容性BALB／c系はM109であった。

【0874】

さらに、EF及びKY株は、ヒトの解離腫瘍細胞において同程度に複製する。NSCLC凍結解離腫瘍細胞（DTC）を0.1MOIでKY及びEFに感染させた。RNAを感染細胞から単離し、マイナス鎖CVA21-qPCRのために使用して、24時間及び72時間でのウイルス複製を比較した。3名のドナーからの結果を図20A及び図20Bに示す。

【0875】

in vivo有効性：

マウス異種移植モデルを使用して、これらのCVA21株（EF、KY、及びKuyk

10

20

30

40

50

e n d a l l (K u)) の抗腫瘍有効性を i n v i v o で評価した。これらの実験では、49:22:28.5:0.5mol%のモル比のSS-OC:DSPC:Chol:BRIJ(商標)S100を含むLNPに、各株のRNAウイルスゲノムをカプセル化した。対照群には、PBS緩衝液、及びSVV-negウイルスゲノムをカプセル化するLNPを使用した。対照に比した処置群における腫瘍体積変化率(%)を比較することにより、腫瘍成長阻害(TGI)パーセンテージを計算した。%TGIは、 $(1 - (\text{処置された腫瘍の平均体積}) / (\text{対照腫瘍の平均体積})) \times 100\%$ として定義される。

【0876】

NSCLCのNCI-H1299異種移植モデルにおけるEF及びKY株の有効性を図21に示す。両方の株が、Kuykendall株及びSVV-neg合成RNA脂質ナノ粒子と比較して、腫瘍サイズの有意な低減をもたらした。EF株は、NCI-H1299異種移植モデルにおいてKY株よりも良好に機能するように見受けられた。EF株は、KY株での8匹中1匹の動物における完全応答と比較して、8匹中3匹の動物において完全応答をもたらした。NSCLCのNCI-H2122異種移植モデルにおけるEF及びKY株の有効性を図22に示す。KY株は、Kuykendall株、EF株、及びSVV-neg合成RNA脂質ナノ粒子と比較して、腫瘍サイズの有意な低減をもたらした。

10

【0877】

前立腺癌のPC3異種移植モデルにおけるEF及びKY株の有効性を図23に示す。EF株は、Kuykendall株、KY株、及びSVV合成RNA脂質ナノ粒子と比較して、腫瘍サイズの有意な低減をもたらした。

20

【0878】

株忍容性：

hICAM-1トランスジェニックマウスモデルを使用して、これらのCVA21株(EF、KY、及びKuykendall(Ku))の忍容性についてもi n v i v o で評価した。忍容性研究は、1mg/kgの単回静脈内投与量で、図24に示すようにRNAウイルスゲノムを含むLNPをマウスに投薬することによって行った。投薬後48時間及び7日目に剖検検査を行った。被験薬剤のすべてで、一時的な体重減少を除き、生存中の臨床毒性徴候は観察されなかった(図24、上のパネル)。生体の化学変化はごく僅かであった(図24、下のパネル)。

30

【0879】

CVA21処置に関連する肉眼または顕微鏡による病理学的所見は、Kuy、KY、及びEF CVA21株を含む脳、脊髄、肝臓、腎臓、肺、心臓、及び筋肉に認められなかった(データは示さない)。クーパー細胞の有糸分裂の増加など、軽度かつ散発的な顕微鏡所見が主に肝臓で観察されたが、同じ所見がLNP vRNA陰性対照(SVV-neg/LNP)でも観察されたため、これはLNPに起因している(データは示さない)。他の軽微な散発的所見はすべて、死戦期もしくは死後の手順に続発したものか、またはLNP-RNAウイルスゲノムの投与に関連しないものと考えられた(データは示さない)。全体として、これらの結果は、合成EF、KY、及びKuykendall CVA21が感受性hICAM-1トランスジェニックマウスにおいて等しく良好に忍容されたことを示す。

40

【0880】

ウイルスクリアランス：

ウイルスゲノムのマイナス鎖及びプラス鎖のRT-qPCR、ならびにウイルスブランクアッセイにより、48時間及び7日の時点でウイルス複製を調べた(図25A~図26)。感染48時間後、Kuykendall株は、脾臓、肝臓、心臓、及び腎臓において最も高いマイナス鎖RNA力価まで複製し、CVA21ウイルスはすべての株で検出された(図25A)。これに対し、マイナス鎖の検出の欠如がウイルス複製の欠如を示す図25Bに示されるように、これらのウイルスはすべて、感染後7日目までに組織からほとんど排除されている。ウイルスブランクアッセイの結果はこの結論を裏付ける。EF株のみが、4匹中2匹の動物の心臓において、7日目時点でのブランク力価によって検出可能な

50

状態を保っていた（図 26）。その一方、7日目時点の血漿で検出された（+）鎖ウイルス RNA の存在（図 25 C）は、7日後の血液における LNP の循環を示唆している。

【0881】

インターフェロン（IFN）抵抗性：

NSCLC 細胞系 NCI-H1299（図 27 A）及び NCI-H2122（図 27 B）ならびに HFF（ヒト包皮線維芽細胞、図 27 C）を IFN β または IFN γ で前処理してから CVA21 EF、KY、または Kuykendall 株に感染させ、細胞生存率を IFN 前処理の濃度に対してプロットした。結果は図 27 A～図 27 C にまとめられており、EF 及び KY 株が同様のインターフェロン（IFN）抵抗性を示すことを示している。

10

【0882】

忠実度及び組換え率：

NCI-H1299 細胞をリバビリンで 4 時間前処理した後、KYI、EF、Kuykendall、及び Kuykendall G64S（高忠実度 Kuyk バリエーション）を含む CVA21 株に 0.1 MOI で感染させることにより、株の忠実度を試験した。処理 24 時間後に細胞を採取し、力価測定した。結果は図 28 A に示されており、KY 株は、200 μ M のリバビリンに対して高忠実度 Kuykendall G64S 株と同様の抵抗性を示した。組換え率を試験するために、完全ウイルス（WT）、カプシドタンパク質が欠如したもの（ Δ cap）、及び不活性ポリメラーゼを含むもの（ Δ GDD）として、EF 株または KY 株の 3D pol を含む CVA21 株 Kuyk を作製した。KY または EF 株の 3D pol を含む 2 つの不活性型（ Δ cap 及び Δ GDD）の Kuyk キメラウイルスを、Kuyk 非許容性 293TME に一緒にトランスフェクトした。次いで、72 時間後に回収された、組換えられた生存ウイルスを力価測定した。結果を図 28 B にまとめる。KY-3D 条件では組換えアッセイでのウイルス回収量が約 80 分の 1 であったことから、KY 株の 3D pol は、EF 株の対応する 3D pol よりも大幅に低い組換え率を示した。全体として、KY 株は、EF 株よりも高いベースライン忠実度及び低い組換えを呈する。

20

【0883】

実施例 10：CVA21 のリーダー配列の選択

CVA21 の *in vitro* 転写鑄型の 5' 接合部切断配列領域におけるリボザイム配列の正確かつ完全な切断を促進するリーダー配列を決定するために、実験を行った。Vienna fold プログラムを使用して、リボザイムフォールディングと競合し得る二次構造を形成しないと予測されたリーダー配列のライブラリを生成した。図 29 A に示すように、鑄型構築物に挿入されたリーダー配列を含む DNA ライブラリを生成した。次いでこの DNA ライブラリを *in vitro* 転写に供し、各構築物の RNA 産物を精製し、2.5% TBE アガロースゲル上にロードして、リボザイム切断の結果を調べた。図 29 B は、CVA21-L4（配列番号 13）、CVA21-L5（配列番号 14）、及び CVA21-L6（配列番号 15）を含む 3 つの新しいリーダー配列の結果を、陰性対照（ApwL）と共に示す。切断産物（リーダー+リボザイム断片及びウイルス起点断片）のバンドのみが対応するレーンで視認できたため、CVA21-L5 及び CVA21-L6 の両方のリーダー配列が、リボザイム配列の正確かつ完全な切断を示す。

30

40

【0884】

実施例 11：CVA21 の 5' リボザイム配列の最適化

CVA21 の *in vitro* 転写鑄型の 5' 接合部切断配列領域におけるリボザイム配列を最適化するために、実験を行った。P. polymyx A 由来のピストル型リボザイムに基づくリボザイムバリエーション配列のライブラリをスクリーニングした。これらのバリエーション配列は、配列番号 17 の核酸 27～30 位に対応する核酸位置で異なっていた。P2 ステムにおけるウイルス配列の起点に相補的なランダム配列を用い、*In vitro* 転写（IVT）鑄型を生成した。IVT を行い、切断されたセグメントを単離し、低分子 RNA-seq を行って、高頻度で切断されたエレメントの配列組成を決定した。

50

【0885】

初回スクリーニング結果は、配列番号17の27～30位にヌクレオチド「TTTTA」を含む配列番号17と比較すると、2つのバリエントリボザイム配列がより高い頻度で表されることを示した。一方は、対応する位置に「TTTT」を含む配列番号18であり、他方は、対応する位置に「TTGT」を含む配列番号19である。

【0886】

上記の実施例10のものと同様の鋳型構築物設計及び*in vitro*転写実験セットアップを使用して、これらの配列の接合部切断効率を試験した。図30は、4つの設計：(1)配列番号17によるリボザイム配列及び代替的なリーダー配列を含むPPWL、(2)リーダー配列L6及び配列番号17によるリボザイム配列を含むPPWL6、(3)リーダー配列L6及び配列番号18によるリボザイム配列を含むPP-TWL6、ならびに(4)リーダー配列L6及び配列番号19によるリボザイム配列を含むPP-GWL6の結果を示す。結果が示したところによれば、PP-TWL6設計は100%に近い切断効率を有し、これはPPWL6設計と同様またはそれよりも良好であり、PP-GWL6設計よりも大幅に高く、したがって、この実験セットアップでは配列番号18が配列番号19よりも優れている。これらの結果は、完全なCVA21-KY株ウイルスゲノムをコードする組換えDNA鋳型との関連で同じ設計を試験したときに繰り返された。

【0887】

CVA21発現構築物設計の非限定的な例、ならびに5'及び3'に正確な末端を有する合成RNAウイルスゲノムを生成するための対応する*in vitro*転写プロセスの一般的概略が、図33に提供されている。

【0888】

実施例12：ポリA尾部配列の最適化

CVA21ウイルスゲノムまたはSVVウイルスゲノムに付加されるポリA尾部の長さを最適化するために、実験を行った。

【0889】

4つの異なる長さのポリA尾部(30pA、50pA、70pA、及び90pA)を、CVA21またはSVVウイルスゲノムをコードする組換えDNA分子の対応する領域にクローニングすることによって評価した。精製アッセイを行って、流量：1mL/分、負荷濃度：0.1mg/mL、結合条件：500mM NaClの条件で、得られたRNAウイルスゲノムの精製効率及び回収率をモノリス型オリゴ-dTクロマトグラフィーで評価した。

【0890】

以下の表15Aに示すように、より長いポリA尾部(>30pA)は、より高い結合能力、及び溶出後のCVA21 RNAウイルスゲノム分子のより高い回収率をもたらしたが、70pAを超えてポリA尾部の長さを伸ばすことによる精製効率のさらなる改善はごく僅かであった。代表的なクロマトグラフィープロファイルを図54Aに示す。

【表15A】

表15A：長さの異なるポリA尾部を有するCVA21-RNAのオリゴ-dTクロマトグラフィー

ポリA尾部の長さ	溶出後の回収率%	結合能力(mg/mL)
30 pA	44.5	3
50 pA	47.3	3.77
70 pA	49.5	4.24
90 pA	50.3	4.24

10

20

30

40

50

【0891】

同様の実験を行って、流量：1 mL／分、負荷濃度：0.1 mg／mL、結合条件：500 mM NaClの条件で、長さの異なるポリA尾部を有するSVV RNAウイルスゲノム分子の精製効率及び回収率を評価した。30 pAの尾部を有するSVV-RNA分子のマイナス鎖対照も、追加の対照として含めた。

【0892】

以下の表15Bに示すように、より長いポリA尾部は、より高い結合能力、及び溶出後のSVV RNAウイルスゲノム分子のより高い回収率をもたらしたが、70 pAを超えてポリA尾部の長さを伸ばすことによる精製効率のさらなる改善はごく僅かであった。代表的なクロマトグラフィープロファイルを図54Bに示す。

【表15B】

表15B：長さの異なるポリA尾部を有するSVV-RNAのオリゴ-dTクロマトグラフィー

ポリA尾部の長さ	溶出後の回収率%	結合能力(mg/mL)
30 pA	33.1	該当なし
50 pA	52	3.41
70 pA	56.3	3.9
90 pA	57.7	4.12
30 pA (マイナス鎖)	32.4	該当なし

【0893】

70 pAの長さのポリA尾部を有する合成RNAウイルスゲノムは、オリゴ-dTクロマトグラフィーカラムでの結合能力及び回収量の増加を示した。

【0894】

次いで、30 pAのポリA尾部に対して70 pAのポリA尾部、及び配列番号17に対して配列番号18のリボザイム配列を含んで産生された合成CVA21-EF株ウイルスゲノムの抗腫瘍有効性を比較した。NCI-H1299細胞に基づくマウス肺癌モデルを使用した。図31A及び図31Bに示すように、70 pAのポリA尾部及び配列番号18による5'リボザイム配列を含んで産生されたCVA21-EF株ウイルスゲノムは、他のウイルスゲノム設計と比較して同様の、またはさらにはより良好な抗腫瘍有効性を示した。

【0895】

実施例13：キメラSVVの構築及びそれらの腫瘍溶解効力の試験

CVA21について上記の実施例1に記載したものと同様の手順に従い、組換えSVV RNAウイルスゲノムを含むSVVウイルスを産生した。上記の実施例6に記載したものと同様の手順に従い、5'ハンマーヘッド型リボザイム配列または5'ピストル型リボザイム配列を使用して、SVV RNAウイルスゲノムの個別の5'末端を生成した。上記の実施例4に記載したものと同様の手順に従い、3'デルタ肝炎ウイルスリボザイム配列（同時転写切断を介して）、または3'制限酵素認識配列（例えばSapI、in vitro転写前の鑄型切断を介して）を使用して、SVV RNAウイルスゲノムの個別の3'末端を生成した。

【0896】

SVVキメラウイルスの生成：

SVV-001ウイルス（親、配列番号25）を利用して、図34に記載されるように、IRES、P1、またはP3領域を異なるSVV株の対応する領域と取り換えることにより、キメラウイルスを構築した。SVV株は次のものを含む：

(a) SVVウイルス#1。SVA/BRA/MG2/2015 (GenBank: KR063108.1)

(b) SVVウイルス#2。SVA/Canada/MB/NCFAD-104/2015 (GenBank: KY486156.1)

(c) SVVウイルス#3。SVV-MN15-308 (GenBank: KU359214.1)

【0897】

新しいSVV-GFP-pDNA構築物（配列番号41～50）をH1299細胞に個別にトランスフェクトして、GFP発現に基づく腫瘍溶解活性を評価した。上清からビリオンを収集し、さらなる特性解析のために使用した。キメラウイルスは、「取り換えられた領域—置き換えられた配列のウイルス番号」に基づいて命名した。例えば、「IRES-2」は、SVV-001親ウイルスのIRES領域が、SVVウイルス#2（SVA/Canada/MB/NCFAD-104/2015）の対応するIRES領域で置き換えられたことを示し、「P1-1」は、SVV-001親ウイルスのP1領域が、SVVウイルス#1（SVA/BRA/MG2/2015）の対応するP1領域で置き換えられたことを示す。

【0898】

SVV-IRESキメラウイルスの腫瘍溶解効力：

清澄化したビリオンを使用してNCI-H69AR細胞に感染させた。MOI0.1での感染から12時間後にGFPの強度を測定した。図35に示すように、SVV-IRES-1キメラウイルス（配列番号28）は腫瘍溶解性であるが、GFPを発現しない。SVV-IRES-2キメラウイルス（配列番号29、SVV-001親ゲノムのIRES領域に入れ換えられたSVA/Canada/MB/NCFAD-104からのIRES配列を含む）は、よりロバストな腫瘍溶解、及びより強いGFP発現を示す。SVV-IRES-3キメラウイルス（配列番号30）は、SVV-001親（配列番号27）よりも少ないGFP発現を示した。まとめると、結果は、SVV-IRES-2が、SVV-001親ウイルスよりもロバストな腫瘍溶解活性を有する改善された腫瘍溶解性ウイルスであることを示す。

【0899】

インターフェロナルファ（IFN α ）への感受性について、SVV-IRES-2キメラウイルスをさらに試験した。感受性（NCI-H69AR）SCLC細胞系と、部分的抵抗性（NCI-H69）SCLC細胞系との両方で、ウイルス複製及びIFN α 抵抗性を試験した。細胞を100U/mLのIFN α で2時間前処理した後、MOI0.1でSVVに感染させた。SVVウイルスを細胞に加え、GFP強度を計算した。図36に示すように、SVV-IRES-2キメラウイルスは、両方の細胞系でウイルス複製及びIFN α 抵抗性における増加を示した。したがって、このキメラウイルスは、SVV-001親ウイルスよりもロバストであり、IFN α 抵抗性が高い。

【0900】

SVV-P1キメラウイルスの腫瘍溶解効力。

清澄化したビリオンを使用してNCI-H69AR細胞に感染させた。MOI0.1での感染から12時間後にGFP強度を測定した。試験したキメラウイルスは、SVV-P1-1（配列番号31）、SVV-P1-2（配列番号32）、及びSVV-P1-3（配列番号33）であった。図37に示すように、新しいSVV-P1キメラウイルスはいずれも、SVV-001親と比較して増加した腫瘍溶解効力を示さなかった。

【0901】

SVV-P3キメラウイルスの腫瘍溶解効力。

図38Aでは、清澄化したビリオンを使用してNCI-H69AR細胞に感染させた。MOI0.1での感染から48時間後にGFP強度を測定した。P3-1キメラウイルス（配列番号34）はより低いGFP発現を示し、P3-3キメラウイルス（配列番号36）はSVV-001親ウイルスと同様のGFP発現を示した。図38Bでは、清澄化した

10

20

30

40

50

ビリオンを使用してNCI-H69AR細胞に感染させた。MOI 0.1での感染から12時間後にGFP強度を測定した。SVV-P3-2キメラウイルス（配列番号35）は、SVV-001親と比較して減少した腫瘍溶解効力を示した。したがって、これらのSVV-P3キメラウイルスはいずれも、SVV-001親ウイルスと比較して増加した腫瘍溶解効力を示さない。

【0902】

実施例14：SVVのリーダー配列の選択

SVVの*in vitro*転写鑄型の5'接合部切断配列領域におけるピストル1リボザイム配列（配列番号64）の正確かつ完全な切断を促進するリーダー配列を決定するために、実験を行った。Vienna foldプログラムを使用して、リボザイムフォールディングと競合し得る二次構造を形成しないと予測されたリーダー配列のライブラリを生成した。図39Aに示すように、鑄型構築物に挿入されたリード配列を含む複数の構築物を生成した。次いでこれらの構築物を*in vitro*転写に供し、各構築物のRNA産物を精製し、2.5%TBEアガロースゲル上にロードして、リボザイム切断の結果を調べた。図39Bは、SVV-L0（配列番号53）、SVV-L1（配列番号54）、SVV-L2（配列番号55）、SVV-L3（配列番号56）、SVV-L4（配列番号57）、SVV-L5（配列番号58）、SVV-L6（配列番号59）、SVV-L7（配列番号60）、SVV-L8（配列番号61）、SVV-L9（配列番号62）、及びSVV-L10（配列番号63）を含む、試験した11個のリーダー配列の結果を示す。切断産物（リーダー+リボザイム断片及びウイルス起点断片）のバンドのみがそれらの対応するレーンで視認できるため、SVV-L8を除き、試験した他のすべてのリーダー配列が、5'リボザイム配列の正確かつ完全な切断を促進する。

【0903】

SVV-L0、SVV-L1、SVV-L2、SVV-L5、SVV-L9、またはSVV-L10のリーダー配列を含むSVV DNA鑄型を*in vitro*転写のために使用し、各DNA鑄型から得られたSVV RNAウイルス分子を、*in vitro*ウイルスキックオフアッセイで感染性ウイルス粒子を生成する能力について試験した。1 µgの転写された各ウイルスRNAをH1299細胞にトランスフェクトし、トランスフェクションの12時間後及び48時間後にプラーク力価を分析した。図39C及び表17に示すように、異なるリーダー配列を含むDNA鑄型の各々から生成されたSVV RNA転写物について、ウイルス力価は同様であった。

【0904】

上記のDNA鑄型の各々を*in vitro*転写効率について試験した。

【0905】

これらのDNA鑄型の各々について、*in vitro*転写反応を37℃で2.5時間にわたり3 mLの体積で行い、その後30分間のDNase I処理を行った。図39Dに示すように、RP-HPLCを使用して、*in vitro*転写産物を分析した。結果は、SVV-L1、SVV-L2、及びSVV-L5リーダー配列が元のSVV-L0リーダー配列と同様の*in vitro*転写収率をもたらすのに対し、SVV-L9及びSVV-L10リーダー配列はその収率の約半分しかもたらさないことを示した。

【0906】

以前に、1000を超える候補リーダー配列が生成され、対応するDNA鑄型の転写収率がConrad, T. et al. Commun Biol 3, 439 (2020)に従って予測され、ランク付けされた（以下の表16に示すとおり）。とりわけ、リーダー配列SVV-L5は、予測におけるランクは低かったが、実際の*in vitro*転写実験では予想外にロバストな収率を示した。

10

20

30

40

50

【表 1 6】

表 1 6 — リーダー配列を有する SVV DNA 鋳型の予測される転写効率

リーダー配列	Conrad, T. et al の予測に従う T7 プロモーターのランク
SVV-L1	7
SVV-L2	20
SVV-L10	99
SVV-L9	658
SVV-L0	659
SVV-L5	817

10

【0907】

5' リボザイム切断後、リーダー配列ーリボザイム断片は、転写された SVV RNA ウイルスゲノムと非特異的に相互作用して、オリゴ d T カラムでの RNA ウイルスゲノムの精製効率を低下させる可能性がある。最適化されたリーダー配列は、理想的には、精製中のそのような非特異的相互作用を最小限に抑えるべきである。特定のリーダー配列を含むこれらの DNA 鋳型の各々について、転写産物を 80℃ の変性温度でのオリゴ d T クロマトグラフィー精製に供し、オリゴ d T クロマトグラフィーから溶出した RNA 産物を、リボザイム断片の存在及び RNA ウイルスゲノムの純度について分析した。以下の表 1 7 に示すように、SVV-L5、SVV-L9、または SVV-L10 リーダー配列を含む切断された 5' リボザイム断片は、SVV-L0、SVV-L1、または SVV-L2 リーダー配列を含む切断された 5' リボザイム断片よりも大幅に効果的にオリゴ d T クロマトグラフィーによって除去された。

20

【表 1 7】

表 1 7 — 変性オリゴ d T クロマトグラフィー後の SVV RNA ウイルスゲノムの純度

30

DNA 鋳型中のリーダー配列	リボザイム断片 [%]	RNA ウイルスゲノムの純度 [%]
SVV-L0	2.31	86.9
SVV-L1	2.42	84.6
SVV-L2	0.49	87
SVV-L5	0.15	85.1
SVV-L9	0.12	83.5
SVV-L10	0.07	84.5

40

【0908】

したがって、試験した他のリーダー配列と比較すると、SVV-L5 リーダー配列は、DNA 鋳型に組み込まれた場合に優れた *in vitro* 転写収率を示す。さらに、SVV-L5 リーダー配列はまた、対応する 5' リボザイム切断産物と RNA ウイルスゲノムとの間の非特異的相互作用を最小限に抑え、クロマトグラフィー精製中の 5' リボザイム切断産物の効果的な除去をもたらす。

50

【0909】

実施例15：Brij及びSVVウイルスRNAを含むLNPは、動物モデルにおいて高い抗腫瘍有効性を示す

様々な動物モデルを使用して、Brij分子（PEG脂質として）及びSVV RNA ウイルスゲノムを含む脂質ナノ粒子（LNP）の抗腫瘍有効性を試験した。かかるSVV / LNPは、上記の実施例2に記載したものと同様の手順に従って産生した。

【0910】

この実施例で使用したLNP製剤を表10に提示する。

【表10】

表10 — SVV-RNA LNP製剤

製剤ID	カチオン性脂質	コレステロール	DSPC	PEG脂質
96062-1	SS-OC - 49%	28.5%	22%	BRIJ(商標)S100 - 0.5%
96062-2	SS-OP - 49%	28.5%	22%	BRIJ(商標)S100 - 0.5%
96062-3	SS-OP - 49%	27.5%	22%	BRIJ(商標)S100 - 1.5%
80097-2	SS-OC - 49%	28.5%	22%	PEG2k-DPG - 0.5%

【0911】

SVV / LNPの抗腫瘍有効性をNCI-H466 SCLC異種移植モデルで試験した。雌の胸腺欠損ヌードマウスに、NCI-H446細胞（無血清PBS及びMatrigel（登録商標）の1：1混合物中、 5×10^6 細胞 / 0.1 mL）を注射し、右側腹部の皮下に移植した。腫瘍サイズ中央値がおおよそ 150 mm^3 （ $120 \sim 180 \text{ mm}^3$ の範囲）のとき、マウスを処置群ごとに7匹のコホート群に分けた。SVV RNAを含むLNPで1日目及び8日目にマウスを2回処置した。図40Aは、カチオン性脂質としてのSS-OC、及びPEG脂質としての0.5 mol %のBRIJ（商標）S100を含む、SVV / LNP（製剤#96062-1）の用量滴定を示す。試験した用量は $0.025 \text{ mg/kg} \sim 0.2 \text{ mg/kg}$ の範囲であった。試験したすべての用量が、PBS陰性対照と比較すると有意な腫瘍成長阻害を示した（二元配置ANOVA、テューキー検定、 $p < 0.0001$ ；図中の「mpd」は「mg/kg」を表す）。 0.1 mg/kg 用量を使用して、NCI-H446腫瘍担持マウスにおけるSVV-RNAの単回IV投与後のウイルス複製の動態を特性解析した。腫瘍を複数の時点で採取し、RT-qPCR及びFISHによって分析した。ウイルスのマイナス鎖は、早くも処置後1日目にRT-qPCRによって検出され、ほとんどの腫瘍で処置後7日目にプラトーに達した。持続的なSVV複製が、単回低用量のSVV-RNAを投与した後21日目まで検出された（図40B）。これらの所見は、SVVのマイナス鎖及びプラス鎖のFISH検出で大部分が繰り返され、FISHシグナルは10日目までに最大に増加し、このことは、ウイルスがこの時点で腫瘍床全体に広がっていたことを示している（図40C）。

【0912】

図41は、異なるカチオン性脂質及び様々な量のBRIJ（商標）S100分子を含むSVV / LNPの抗腫瘍エフェクターを示す。表10に記載するように、LNP製剤中のカチオン性脂質及びBRIJ（商標）S100の量の3つの異なる組み合わせを試験した。

【0913】

試験したすべての用量が、PBS陰性対照と比較すると有意な腫瘍成長阻害を示した（二元配置ANOVA、テューキー検定、 $p < 0.0001$ ；図中の「mpd」は「mg/kg」を表す）。まとめると、結果は、SS-OCまたはSS-OPのいずれも、様々な用量で、カプセル化合成RNAウイルスゲノムを標的細胞に効果的に送達して腫瘍成長阻害を達成するLNPを製剤化する際にカチオン性脂質として使用され得ることを示唆して

いる。

【0914】

図42は、NCI-H466を用いたSCLCモデルにおける、Brjを含むSVV/LNP製剤の長期にわたる抗腫瘍有効性を示す。ここで使用したLNPは、カチオン性脂質としてのSS-OCと、PEG脂質としての0.5mol%のBRIJ（商標）S100とを含む（製剤96062-1）。雌の胸腺欠損ヌードマウスの右側腹部の皮下に、NCI-H446細胞（無血清PBS及びMatrigel（登録商標）の1:1混合物中、 5×10^6 細胞/0.1mL）を移植した。腫瘍サイズ中央値がおおよそ150mm³（120～180mm³の範囲）のとき、マウスを処置群ごとに7匹のコホート群に分けた。1日目及び8日目に2回、SVV/LNPを0.2mg/kgでマウスに投薬した。陰性対照（PBS）と比較すると、SVV/LNP組成物は、50日を超える持続期間にわたり、有意な腫瘍阻害効果を示した（二元配置ANOVA、チューキー検定 $p < 0.001$ ）。

10

【0915】

図43は、抗SVV中和抗体の存在が、SCLC腫瘍モデル（NCI-H446）におけるSVV/LNP有効性を阻害しないことを示す。雌の胸腺欠損ヌードマウスの右側腹部の皮下に、NCI-H446細胞（無血清PBS及びMatrigel（登録商標）の1:1混合物中、 5×10^6 細胞/0.1mL）を移植した。腫瘍サイズ中央値がおおよそ150mm³（120～180mm³の範囲）のとき、マウスを処置群ごとに10匹のコホート群に分けた。0日目及び7日目にマウスの腹腔内に抗SVV中和抗体（ μ SVV-a b）を含むウサギ血清またはウサギ対照血清（血清単独）を投与し（受動的免疫化）、1日目及び8日目にSVV/LNPまたはSVVビリオンで処置した。ここで使用したLNPは、カチオン性脂質としてのSS-OCと、PEG脂質としての0.5mol%のBRIJ（商標）S100とを含む（製剤96062-1）。PBS、SVVビリオン、またはSVV/LNPの静脈内投与後のH446腫瘍担持マウスにおける腫瘍体積をモニターした。SVV/LNP組成物の腫瘍阻害効果は抗SVV中和抗体の存在による影響を受けなかったが、SVVビリオンの腫瘍阻害効果は抗SVV中和抗体の存在によって完全に打ち消された。****PBSに対して有意なTGI（二元配置ANOVA、チューキー検定 $p < 0.0001$ ）。

20

【0916】

図44は、NCI-H82細胞を使用したSCLCモデルにおけるSVV/LNPの抗腫瘍有効性を示す。ここで使用したLNPは、カチオン性脂質としてのSS-OCと、PEG脂質としての0.5mol%のPEG2k-DPGとを含む（80097-2）。雌の胸腺欠損ヌードマウスに、NCI-H82細胞（無血清PBS及びMatrigel（登録商標）の1:1混合物中、 5×10^6 細胞/0.1mL）を注射し、右側腹部の皮下に移植した。腫瘍サイズ中央値がおおよそ160mm³（130～180mm³の範囲）のとき、マウスを処置群ごとに7匹のコホート群に分けた。1日目及び6日目に2回、SVV/LNPを0.2mg/kgでマウスに投薬した。陰性対照（SVV-Neg/LNPまたはPBS）と比較すると、SVV/LNP組成物は、有意な腫瘍成長阻害を示した（二元配置ANOVA、チューキー検定 $p < 0.0001$ ）。

30

40

【0917】

図45は、SCLC同所性腫瘍モデル（NCI-H82）の生存の延長におけるSVV/LNPの全身投与の効果を示す。胸腺欠損ヌードマウスの肺内に、無血清DPBS及びMatrigel（1:1v/v）の混合物中0.05mLで生存H82腫瘍細胞が90%を超える単個細胞浮遊液を接種し（ 5×10^6 細胞を右肺に注入）、腫瘍を発達させた。腫瘍移植後15日目及び22日目に、マウスの静脈内に（IV）、PBSか、カチオン性脂質としてのSS-OCと、PEG脂質としての0.5mol%のBRIJ（商標）S100とを含む1mpkのSVV-vRNA/LNP（製剤96076-2）（脂質組成は96062-1と同じ）を投薬した。陰性対照（SVV-Neg/LNPまたはPBS）と比較すると、SVV/LNP組成物は、このSCLC同所性腫瘍モデルにおけるマウ

50

スの生存期間を有意に延長した。腫瘍移植後15日目及び22日目に投与したSVV-RNAは、対照群に対して有意な治療効果をもたらし、このモデルにおける生存期間のほぼ2倍である100日の中央値までマウスが生存した。記載されているようにマウスのコホートを処置し、SVV-RNA処置マウスの肺を第2の処置の10日後にIHCのために採取した。hDLL3 IHCは、腫瘍量のマーカーとして使用され、IHC数量化は、SVV-NegまたはPBS対照に比した腫瘍量の有意な低減を示した(図46A及び図46B)。SVV-RNA処置マウスは、広範囲の腫瘍中心壊死を示した(図46B)。

【0918】

図47Aは、SCLC PDXモデルにおけるSVV/LNPの抗腫瘍有効性を示す。ここで使用したLNPは、カチオン性脂質としてのSS-OCと、PEG脂質としての0.5mol%のBRIJ(商標)S100とを含む(製剤96062-1)。NOD-SCID雌マウスに、右側腹部の皮下に移植したSCLC PDX細胞(100ulの無血清培地中の断片12×2)を注射した。腫瘍サイズ中央値がおおよそ150mm³(120~180mm³の範囲)のとき、マウスを処置群ごとに8匹のコホート群に分けた。1日目及び8日目に2回、SVV/LNP、または陰性対照SVV-Neg/LNPもしくはPBSを、1mg/kgでマウスに投薬した。SVV/LNPは、陰性対照と比較して有意な腫瘍成長阻害を示した(二元配置ANOVA、テューキー検定 $p < 0.0001$)。RT-qPCRによってSVV複製についても測定したところ、静脈内(IV)に投薬したSVV-RNAは、SVVビリオンITと同様のレベルのウイルス複製を達成したことが示された(図47B)。

【0919】

異なる長さのポリA尾部を有するSVV RNAウイルスゲノムの抗腫瘍効果：

異なる長さのポリA尾部を有するSVV RNAウイルスゲノムを含むSVV/LNPの抗腫瘍有効性についても、SCLCモデルを使用して試験した。2つの異なる長さのポリA尾部を試験した。一方は30ヌクレオチドの長さ(pA30)であり、他方は70ヌクレオチドの長さ(pA70)である。ポリA尾部を有する対応する合成RNAウイルスゲノムが配列番号37及び38に示されており、これらは、SVV-IRES-2キメラウイルスに由来すし、VP2タンパク質S177A変異を含む。両方のRNA分子を、それぞれ配列番号51及び52を含むDNA鋳型構築物に基づいて、*in vitro*で転写した。これらのDNA鋳型構築物の各々は、T7プロモーター配列と、それに続く配列番号53によるリーダー配列と、それに続く配列番号64によるピストル型リボザイム配列と、それに続く示された長さのポリA尾部を有するSVV-IRES-2キメラウイルスゲノムと、それに続くSapI制限酵素認識部位を含み、隣接する成分の間に挿入された追加のヌクレオチドはない。

【0920】

両方のSVV RNAを、カチオン性脂質としてのSS-OCと、PEG脂質としての0.5mol%のBRIJ(商標)S100とを含むLNPに配合した。雌の胸腺欠損ヌードマウスに、NCI-H446細胞(無血清PBS及びMatrigel(登録商標)の1:1混合物中、 5×10^6 細胞/0.1mL)を注射し、右側腹部の皮下に移植した。腫瘍サイズ中央値がおおよそ150mm³(120~180mm³の範囲)のとき、マウスを処置群ごとに8匹のコホート群に分けた。1日目及び8日目に2回、SVV-RNA-pA30/LNPまたはSVV-RNA-pA70/LNPを使用して0.1mg/kgでマウスに投薬した。図48に示すように、SVV-RNA-pA30及びSVV-RNA-pA70の両方が、腫瘍成長の阻害において同様の有効性を示し、これはPBS対照よりも有意に良好である(二元配置ANOVA、テューキー検定 $p < 0.0001$)。

【0921】

実施例16：SVV-LNP及び抗PD-1の併用療法

カチオン性脂質としてのSS-OCと、PEG脂質としての0.5mol%のBRIJ(商標)S100とを含むSVV/LNPを、同系神経芽細胞腫モデルのN1E-115で試験した。A/J雌マウスに、N1E-115細胞(無血清PBS及びMatrigel

L（登録商標）の1：1混合物中、 5×10^5 細胞／0.1 mL）を注射し、右側腹部の皮下に移植した。腫瘍サイズ中央値がおよそ100 mm³になったとき、マウスを処置群ごとに10匹のコホート群に分けた。1日目及び8日目に2回、SVV／LNP、または陰性対照SVV－Neg／LNPを、1 mg／kgでマウスに投薬した。この腫瘍モデルにおいて、合成SVVの投与は、CD8 T細胞の動員ならびに腫瘍中のCD4 T細胞及びNK細胞の傾向の著しい増加をもたらした（図49A）。腫瘍中の制御性T細胞（Treg）の数は増加せず、抗PD－1に対する臨床効果の改善に関連付けられているCD8／Treg比の全体的上昇につながった（図49B）。CD8 T細胞は、CTLA4及びPD－1の上方制御と共に、活性化された表現型を示した（図49C）。短命エフェクター細胞（SLEC）とメモリー前駆エフェクター細胞（MPEC）との両方が、合成SVV処置群では、対照と比較して増加した（図49D）。腫瘍関連マクロファージのプロファイリングも行い、増加したM1（食作用性）／M2（炎症促進性）比が観察された（図49E）。M1マクロファージ（図49F）、及びPD－1リガンドのPD－L1を発現する腫瘍細胞の数も、有意に増加した（図49G）。これらのデータは、合成SVVが、抗腫瘍免疫に資するTME内の変化を促進することを示す。N1E－155腫瘍を担持するマウスをSVV／LNPまたはSVV－Neg－LNPで処置すると、この同系モデルの有意な成長阻害が示された（図50）。とりわけ、PD－1及びPD－L1の両方の発現増加のため、N1E－115モデルにおける合成SVVと抗PD－1抗体の組み合わせの有効性を評価した。単剤療法として投与された両薬剤が、抗PD－1抗体との併用療法として投与すると、各単剤群と比較して有意に増強された中程度の有意な抗腫瘍活性をもたらした（図51）。

10

20

【0922】

実施例17：異なるBr i j分子を使用したSVV／LNP製剤の試験

表11及び表12のように、SVV RNAウイルスゲノムを含む脂質ナノ粒子を調製し、特性解析した。すべてのLNPはSS－OC：コレステロール：DSPC：PEG脂質を用いて製剤化し、PEG脂質はそれぞれPEG2k－DPG、BRIJ（商標）S100、BRIJ（商標）C20、またはBRIJ（商標）S20であった。

【表11】

表11 － SVV－RNA LNPの製剤パラメータ

30

ロット番号	緩衝液	PEG 脂質	SS-OC:Chol:DSPC:PEG 脂質
96047-1	20 mM リンゴ酸、pH3.0	DPG-PEG2K	49:28.5:22:0.5
96047-2	25 mM 酢酸 pH 5.0	BRIJ(商標)S100	49:28.5:22:0.5
96047-3	25 mM 酢酸 pH 5.0	BRIJ(商標)S100	49:27.5:22:1.5
96047-4	25 mM 酢酸 pH 5.0	BRIJ(商標)S100	49:38.5:11:1.5
96047-5	25 mM 酢酸 pH 5.0	BRIJ(商標)C20	49:28.5:22:0.5
96047-6	25 mM 酢酸 pH 5.0	BRIJ(商標)S20	49:28.5:22:0.5

40

50

【表 1 2】

表 1 2 - S V V - R N A L N P の特徴

ロット番号	Z-平均 (d.nm)	PDI	ZP (mV)	EE %
96047-1	88.7	0.10	-3.7	100%
96047-2	107.8	0.12	-0.6	96%
96047-3	91.8	0.14	-2.0	93%
96047-4	81.4	0.14	-0.9	98%
96047-5	108.7	0.14	-8.8	98%
96047-6	100.6	0.11	-6.6	99%

Z-平均=平均直径；PDI-多分散指数；%EE=カプセル化効率；ZP=ゼータ電位

【0 9 2 3】

S V V / L N P 組成物を H 4 4 6 腫瘍動物モデルでの繰り返し投薬 I V マウス有効性スクリーンに使用した。腫瘍体積（図 5 2 A）及び体重（図 5 2 B）を各時点で測定した。結果は、すべての製剤が高い抗腫瘍有効性を示し、良好に忍容されたことを示した。P E G 脂質として B r i j 分子を含む L N P は、P E G 脂質として P E G 2 k - D P G を含む L N P と比較して、有効性及び忍容性が同様であった。

【0 9 2 4】

実施例 1 8：B r i j を含む L N P は、繰り返し投薬した際に改変された i n v i v o の薬物動態特徴を示した

表 1 3 のように、S V V ウイルスゲノムを含む脂質ナノ粒子を調製し、特性解析した。L N P 中の P E G 脂質は、それぞれ P E G 2 k - D P G、P E G 2 k - D M G、または B R I J（商標）S 1 0 0 であった。他の脂質成分は、S S - O C、コレステロール、D S P C、及び場合により b - シトステロールを含む（9 6 0 1 6 6）。追加の特性解析パラメータを表 1 4 に提示する。

【表 1 3】

表 1 3 - S V V - R N A L N P の製剤パラメータ

ロット番号	PEG 脂質	SS-OC:コレステロール:b-シトステロール:DSPC:PEG 脂質 (mol %)	脂質濃度 (mM)	インプット RNA 濃度 (mg/mL)	N:P	流量比
960161	DPG-PEG2K	49:28.5:0:22:0.5	40	0.298	14	3
960164	DMG-PEG2K	49:35.8:0:15:0.2	40	0,298	14	3
960166	DMG-PEG2K	49:29.5:10:11:0.5	40	0,298	14	3
JD-200311-1	BRIJ(商標) S100	49:28.5:0:22:0.5	40	0.298	14	3

10

20

30

40

50

【表 1 4】

表 1 4 — S V V - R N A L N P の特徴

ロット番号	サイズ(nm)	PDI	[RNA] (μg/mL)	% EE	ZP (mv)
960161	94	0.12	380	92	-3.1
960164	114	0.11	382	92	-2.3
960166	129	0.09	360	89	-3.3
JD-200311-1	132	0.11	235	88	-

PDI=多分散指数；%EE=カプセル化効率；ZP=ゼータ電位

10

【0 9 2 5】

B A L B / c 雌マウスにおける繰り返し投薬（2週間の週1回投薬スケジュール、Q 7 x 2）の静脈内（I V）P K 研究において、S V V / L N P 組成物を使用した。各製剤について、用量は0.5 mg / kg であり、投薬量は5 mL / kg であった。投薬後の血清中のRNAのコピー数を、第1の用量後（1日目）及び第2の用量後（8日目）の複数の時点（1時間、4時間、及び24時間）で測定した。結果を図5 3 A 及び図5 3 B に示す。実線は第1の用量の薬物動態プロファイルを示す。破線は第2の用量の薬物動態プロファイルを示す。

【0 9 2 6】

製剤 # 9 6 0 1 6 1 及び # J D - 2 0 0 3 1 1 - 1 はいずれも、S S - O C : コレステロール : D S P C : P E G 脂質（4 9 : 2 8 . 5 : 2 2 : 0 . 5 m o l %）の脂質組成を有し、P E G 脂質は、それぞれD P G - P E G 2 k 及びB R I J（商標）S 1 0 0 である。

20

【0 9 2 7】

結果は、P E G 脂質としてP E G 2 k - D P G を含むL N P が、第1の用量後の長期にわたる循環と、第2の用量後4時間以内の急速なクリアランスを呈することを示した。これに対し、P E G 脂質としてB R I J（商標）S 1 0 0 を含むL N P は、第1の用量後の曝露における中程度の変化を呈したが、第2の用量の際には同様の循環特徴及び排除勾配を維持した。

30

【0 9 2 8】

実施例 1 9 : R N A 酸性化緩衝液の改変はL N P の生物物理学的特性を改善する

この実施例は、クエン酸濃度及びp H の変化がL N P の生物物理学的特性に及ぼす効果を決定するためにR N A 酸性化緩衝液を変更したL N P 製剤への非複製セネカバレーウイルス（S V V）R N A（S V V - N e g）のカプセル化について説明する。この実施例でのL N P は、5 0 : 7 : 4 0 : 3 m o l % のイオン化可能な脂質（C A T）: D S P C : コレステロール : P E G 2 k - D M G の脂質組成物を含む。マイクロ流体デバイス（P r e c i s i o n N a n o S y s t e m s I n c .）を使用して、エタノール中の脂質混合物を、R N A 酸性化緩衝液（例えば、5 0 m M クエン酸、p H 4）中のS V V - N e g と、9 の脂質窒素対リン酸比（N : P）で混合した。総脂質濃度は2 0 m M に設定した。

40

【0 9 2 9】

L N P を5 0 m M リン酸、p H 6 . 0 に対して1 2 ~ 1 6 時間透析し、二次透析を5 0 m M H E P E S、5 0 m M N a C l、2 6 3 m M ショ糖、p H 7 . 3 に対して室温で4 ~ 2 4 時間行った。透析後のL N P を1 0 0 k D a A M I C O N（登録商標）U L T R A C E N T R I F U G A L フィルター（M i l l i p o r e S i g m a）を使用して濃縮し、0 . 2 μ m シリンジフィルターを使用して滅菌濾過した。次いで、試料を特性解析し、必要に応じて希釈した。希釈の際、試料をその後- 2 0 ° C で貯蔵する場合には5 w / v % グリセロールスパイクを加えた。

【0 9 3 0】

50

動的光散乱（DLS）及び多分散指数（PDI）によってLNPの粒径の特性解析を行った。RNA酸性化緩衝液：（１）50nMクエン酸pH4、（２）5mMクエン酸pH3.5、（３）15mMクエン酸pH3.5、（４）30mMクエン酸pH3.5、及び（５）50mMクエン酸pH3.5を用い、CAT4及びCAT5製剤を試験した。図55A、図55B、及び図55Cは、LNPの粒径、PDI、及びカプセル化効率を示す。さらに、5mMクエン酸pH3.5緩衝液を用い、CAT1～CAT3、CAT6～CAT10、及びCAT35のLNP製剤を作製した（図56A、図56B、及び図56C）。

【0931】

結果は、RNA酸性化緩衝液の変化（例えば、塩濃度の低下）が、より小さな粒径及びPDIをもたらすことを示唆した。

【0932】

実施例20：異なるイオン化可能な脂質を含むLNPのIn Vivo研究

LNPにカプセル化されたセネカバレーウイルス（SVV）-RNAのin vivo薬物動力及び抗腫瘍有効性を小細胞肺癌（SCLC）のマウスモデルで評価した。

【0933】

この実施例では、SVVウイルスゲノムをコードするRNA分子及びNanoLucルシフェラーゼ（NLuc）を、以下の表22に記載のように調製したLNPにカプセル化した。NLucは、基質のフリマジンを提供されると発光シグナルを生成するルシフェラーゼ酵素である。LNPを、100mM tris、300mMショ糖、113mM NaCl、pH7.4で、5℃にて一晚透析した。あるいは、LNPを50mMリン酸、pH6.0に対して12～16時間透析し、二次透析を50mM HEPES、50mM NaCl、263mMショ糖、pH7.3に対して室温で4～24時間行った。透析後のLNP製剤を濃縮し、濾過し、特性解析し、場合により希釈した。

【表22-1】

表22. in vivo研究用のLNP製剤

製剤	イオン化可能な脂質	PEG 脂質	イオン化可能な脂質:コレステロール:DSPC:PEG 脂質 (mol %)	酸性化緩衝液	サイズ (nm)	PDI	%EE
CAT1/DMG	CAT1	PEG _{2k} -DMG	50:40:7:3	5mM クエン酸、pH 3.5	75	0.13	97
CAT2/DMG	CAT2	PEG _{2k} -DMG	50:40:7:3	5mM クエン酸、pH 3.5	73	0.18	98
CAT3/DMG	CAT3	PEG _{2k} -DMG	50:40:7:3	5mM クエン酸、pH 3.5	74	0.17	98
CAT4/DMG	CAT4	PEG _{2k} -DMG	50:40:7:3	5mM クエン酸、pH 3.5	80	0.16	97
CAT5/DMG	CAT5	PEG _{2k} -DMG	50:40:7:3	5mM クエン酸、pH 3.5	73	0.18	96
CAT6/DMG	CAT6	PEG _{2k} -DMG	50:40:7:3	5mM クエン酸、pH 3.5	86	0.2	98
CAT7/DMG	CAT7	PEG _{2k} -DMG	50:40:7:3	5mM クエン酸、pH 3.5	72	0.14	97

10

20

30

40

50

【表 2 2 - 2】

CAT8/DMG	CAT8	PEG _{2k} -DMG	50:40:7:3	5mM クエン酸、pH 3.5	120	0.07	90
CAT9/DMG	CAT9	PEG _{2k} -DMG	50:40:7:3	5mM クエン酸、pH 3.5	87	0.19	98
CAT10/DMG	CAT10	PEG _{2k} -DMG	50:40:7:3	5mM クエン酸、pH 3.5	71	0.21	97
CAT11/DMG	CAT11	PEG _{2k} -DMG	50:40:7:3	5mM クエン酸、pH 3.5	81	0.17	96
CAT12/DMG	CAT12	PEG _{2k} -DMG	50:40:7:3	5mM クエン酸、pH 3.5	86	0.33	89
CAT13/DMG	CAT13	PEG _{2k} -DMG	50:40:7:3	5mM クエン酸、pH 3.5	79	0.12	97
CAT14/DMG	CAT14	PEG _{2k} -DMG	50:40:7:3	5mM クエン酸、pH 3.5	81	0.32	91
CAT15/DMG	CAT15	PEG _{2k} -DMG	50:40:7:3	5mM クエン酸、pH 3.5	110	0.24	98
CAT16/DMG	CAT16	PEG _{2k} -DMG	50:40:7:3	5mM クエン酸、pH 3.5	75	0.2	95
CAT17/DMG	CAT17	PEG _{2k} -DMG	50:40:7:3	5mM クエン酸、pH 3.5	73	0.52	97
CAT19/DMG	CAT19	PEG _{2k} -DMG	50:40:7:3	5mM クエン酸、pH 3.5	67	0.21	98%
CAT20/DMG	CAT20	PEG _{2k} -DMG	50:40:7:3	5mM クエン酸、pH 3.5	66	0.21	98%
CAT24/DMG	CAT24	PEG _{2k} -DMG	50:40:7:3	5mM クエン酸、pH 3.5	64	0.37	97%
CAT31/DMG	CAT31	PEG _{2k} -DMG	50:40:7:3	5mM クエン酸、pH 3.5	67	0.17	98%
CAT7/Brij	CAT7	Brij S100	54.5:25:20:0.5	5mM クエン酸、pH 3.5	124	0.14	82%
CAT18/DMG	CAT18	PEG _{2k} -DMG	50:40:7:3	5mM クエン酸、pH 3.5	92	0.19	95
CAT21/DMG	CAT21	PEG _{2k} -DMG	50:40:7:3	5mM クエン酸、pH 3.5	68	0.31	96
CAT22/DMG	CAT22	PEG _{2k} -DMG	50:40:7:3	5mM クエン酸、pH 3.5	65	0.32	96
CAT23/DMG	CAT23	PEG _{2k} -DMG	50:40:7:3	5mM クエン酸、pH 3.5	95	0.16	96

10

20

30

40

50

【表 2 2 - 3】

CAT25/DMG	CAT25	PEG _{2k} -DMG	50:40:7:3	5mM クエン酸、pH 3.5	68	0.4	96
CAT26/DMG	CAT26	PEG _{2k} -DMG	50:40:7:3	5mM クエン酸、pH 3.5	68	0.32	97
CAT27/DMG	CAT27	PEG _{2k} -DMG	50:40:7:3	5mM クエン酸、pH 3.5	62	0.38	95
CAT28/DMG	CAT28	PEG _{2k} -DMG	50:40:7:3	5mM クエン酸、pH 3.5	68	0.21	98
CAT29/DMG	CAT29	PEG _{2k} -DMG	50:40:7:3	5mM クエン酸、pH 3.5	60	0.35	97
CAT30/DMG	CAT30	PEG _{2k} -DMG	50:40:7:3	5mM クエン酸、pH 3.5	64	0.34	97
CAT32/DMG	CAT32	PEG _{2k} -DMG	50:40:7:3	5mM クエン酸、pH 3.5	62	0.23	98
CAT34/DMG	CAT34	PEG _{2k} -DMG	50:40:7:3	5mM クエン酸、pH 3.5	69	0.22	99
CAT7/DMG	CAT7	PEG _{2k} -DMG	50:40:7:3	5mM クエン酸、pH 3.5	72	0.47	99

10

20

【0 9 3 4】

NCI-H446 ヒト SCLC 細胞（無血清 PBS 及び Matrigel（登録商標）の 1:1 混合物中、 5×10^6 細胞 / 0.1 mL）を、8 週齢の雌の胸腺欠損ヌードマウス（Charles River Laboratories）の右側腹部に皮下接種した。腫瘍サイズ中央値がおよそ 150 mm^3 （ $120 \sim 180 \text{ mm}^3$ の範囲）に達したとき、マウスの静脈内に、 $0.2 \text{ mg} / \text{kg}$ の PBS または SVV-RNA を含む LNP を、1 日目または 1 日目及び 8 日目に投与した。投薬 96 時間後に光学イメージング IVIS Lumina（PerkinElmer）を利用して生物発光（BLI）を評価し、分子イメージングソフトウェアを使用してシグナルを数量化した（図 5 8 A ~ 5 8 F）。腫瘍体積及び体重は週に 3 回評価した（図 5 9 A ~ 5 9 E）。

30

【0 9 3 5】

CAT1 ~ CAT5 製剤については 2 回の $0.2 \text{ mg} / \text{kg}$ 用量後に腫瘍退縮が観察され（図 5 9 A、左）、すべての製剤が良好に忍容された（図 5 9 A、右）。CAT6 ~ CAT9、CAT11、CAT16 ~ CAT17、CAT19 ~ CAT24、CAT26、CAT29、CAT32、及び CAT34 製剤については、単回の $0.2 \text{ mg} / \text{kg}$ 用量での腫瘍退縮が観察され（図 5 9 B ~ 5 9 E、左）、すべての製剤が良好に忍容された（図 5 9 B ~ 5 9 E、右）。CAT12 ~ CAT13、CAT15、CAT18、及び CAT28 製剤については腫瘍成長阻害が観察され（図 5 9 B ~ 5 9 E、左）、すべての製剤が良好に忍容された（図 5 9 B ~ 5 9 E、右）。

40

【0 9 3 6】

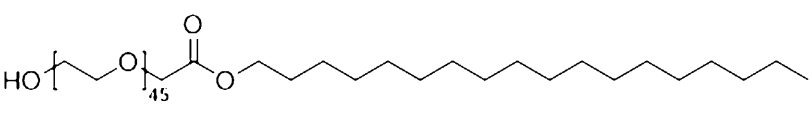
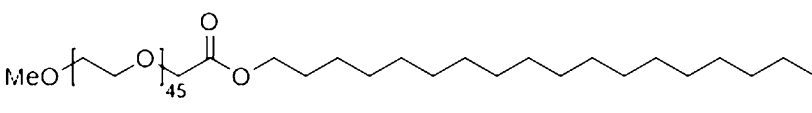
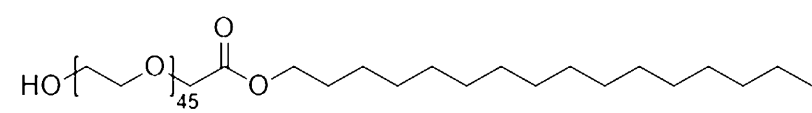
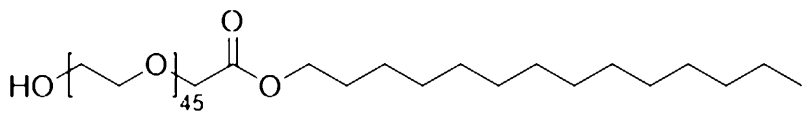
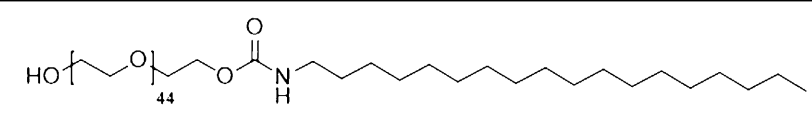
実施例 21: CAT7 及び異なる PEG 脂質を含む LNP の In vivo 研究

この実施例及び以降の実施例で使用した代替的な PEG 脂質を、以下の表 2 8 に列挙する。

50

【表 2 8】

表 2 8 : P E G 脂質

名称	化学名	式
CHM-001	オクタデシル 2-(ポリ(エチレングリコール)2000)-アセテート	
CHM-004	オクタデシル 2-(メチル-ポリ(エチレングリコール)2000)-アセテート	
CHM-005	ヘキサデシル 2-(ポリ(エチレングリコール)2000)-アセテート	
CHM-006	テトラデシル 2-(ポリ(エチレングリコール)2000)-アセテート	
CHM-012	ポリ(エチレングリコール)2000 N-オクタデシルカルバメート	

10

20

30

【0937】

様々な脂質組成のLNPにカプセル化されたSVV-RNAの*in vivo*薬物動力及び抗腫瘍有効性を小細胞肺癌（SCLC）のマウスモデルで評価した。実施例19に記載の同様の手順に従い、SVVウイルスゲノムをコードするRNA分子及びNLucを、以下の表23に従って調製したLNPにカプセル化した。総脂質濃度は20mMに設定し、脂質窒素対リン酸比（N：P）は9であった。

40

50

【表 2 3】

表 2 3. *in vivo* 研究用の LNP 製剤

製剤	イオン化可能な脂質	PEG 脂質	イオン化可能な脂質: コレステロール:DSPC:PEG 脂質 (mol %)	酸性化緩衝液	サイズ(nm)	PDI	%EE
CAT7/DMG_1	CAT7	PEG _{2k} -DMG	50:40:7:3	5mM クエン酸、 pH 3.5	60.4	0.34	98
CAT7/CHM1_1	CAT7	CHM-001	54.6:25.1:20.1:0.25	5mM クエン酸、 pH 3.5	123.3	0.09	97
CAT7/DMG_2	CAT7	PEG _{2k} -DMG	44.5:50:5:0.5	5mM クエン酸、 pH 3.5	116.5	0.12	97
CAT7/DMG_3	CAT7	PEG _{2k} -DMG	40:50:8.75:1.25	5mM クエン酸、 pH 3.5	66.3	0.14	98
CAT7/DMG_4	CAT7	PEG _{2k} -DMG	60:25:14.5:0.5	5mM クエン酸、 pH 3.5	93.5	0.12	97
CAT7/DMG_5	CAT7	PEG _{2k} -DMG	60:34.3:5:0.7	5mM クエン酸、 pH 3.5	117.9	0.16	97
CAT7/CHM6_1	CAT7	CHM-006	50:42.5:7:0.5	5mM クエン酸、 pH 3.5	102.3	0.13	98
CAT7/CHM6_2	CAT7	CHM-006	58:33.5:7:1.5	5mM クエン酸、 pH 3.5	103.3	0.2	96
CAT7/CHM6_3	CAT7	CHM-006	58:34.5:7:0.5	5mM クエン酸、 pH 3.5	117.6	0.17	98

10

20

30

【0938】

S V V - N a n o L u c カプセル化 LNP の薬物動力（生物発光アッセイにより評価）及び腫瘍成長阻害能力を、実施例 20 に記載のように評価した。

【0939】

ナノルシフェラーゼは注射 72 時間後に検出可能であり、持続的な S V V を示している（図 60A）。すべての被験製剤について単回の 0.2 mg / kg 用量で完全な腫瘍退縮が観察され、すべての製剤が良好に忍容された（図 60B）。

【0940】

実施例 22：LNP 製剤の薬物動態評価

コクサッキーウイルス A21（CVA21）- RNA カプセル化 LNP 製剤の薬物動態（PK）をラットで評価した。

40

【0941】

この実施例では、実施例 19 に記載のものと同様の手順に従い、CVA-21 ウイルスゲノムをコードする RNA 分子を、以下の表 24 に従って調製した LNP にカプセル化した。

50

【表 2 4 - 1】

表 2 4 . 薬物動態研究用の L N P 製剤

製剤	イオン化可能な脂質	PEG 脂質	イオン化可能な脂質:DSPC:コレステロール:PEG 脂質 (mol%)	酸性化緩衝液	サイズ (nm)	PDI	%EE	ペイロード	投薬スケジュール (RNA 濃度に基づく)
OC/CHM1	Coatsome SS-OC	CHM-001	49:22:28.5:0.5	25mM 酢酸、pH 5	83	0.25	97	SVV-NEG-RNA	1 mg/kg、Q2W2
OC/CHM4	Coatsome SS-OC	CHM-004	49:22:28.5:0.5	25mM 酢酸、pH 5	77	0.18	98	SVV-NEG-RNA	1 mg/kg、Q2W2
OC/CHM5	Coatsome SS-OC	CHM-005	49:22:28.5:0.5	25mM 酢酸、pH 5	74	0.2	99	SVV-NEG-RNA	1 mg/kg、Q2W2
OC/CHM6	Coatsome SS-OC	CHM-006	49:22:28.5:0.5	25mM 酢酸、pH 5	84	0.2	98	SVV-NEG-RNA	1 mg/kg、Q2W2
OC/CHM12	Coatsome SS-OC	CHM-012	49:22:28.5:0.5	25mM 酢酸、pH 5	73	0.15	99	SVV-NEG-RNA	1 mg/kg、Q2W2
OC/Brij	Coatsome SS-OC	BRIJ(商標)S100	49:22:28.5:0.5	25mM 酢酸、pH 5	69	0.18	98	SVV-NEG-RNA	1 mg/kg、Q1W2; 1 mg/kg、Q2W2
OC/DMG	Coatsome SS-OC	PEG _{2k} -DMG	49:22:28.5:0.5	25mM 酢酸、pH 5	70	0.24	98	SVV-NEG-RNA	1 mg/kg、Q2W2
OC/DPG	Coatsome SS-OC	PEG _{2k} -DPG	49:22:28.5:0.5	25mM 酢酸、pH 5	69	0.21	98	SVV-NEG-RNA	1 mg/kg、Q2W2

10

20

30

40

50

【表 2 4 - 2】

OC/Brij	Coatsome SS-OC	BRIJ(商標)S100	49:22:28.5:0.5	25mM 酢酸、pH 5	142	0.25	94	CVA21-RNA	0.3 mg/kg、Q2W2
CAT7/DMG_6	CAT7	PEG _{2k} -DMG	40:20:39.5:0.5	5mM クエン酸、pH 3.5	90.6	0.10	98	CVA21-RNA	0.3 mg/kg、Q2W2
CAT7/DMG_3	CAT7	PEG _{2k} -DMG	40:8.75:50:1.25	5mM クエン酸、pH 3.5	82.0	0.14	98	CVA21-RNA	0.3 mg/kg、Q2W2
CAT7/DMG_5	CAT7	PEG _{2k} -DMG	60:5:34.3:0.7	5mM クエン酸、pH 3.5	156.7	0.12	97	CVA21-RNA	0.3 mg/kg、Q2W2
CAT7/CHM1_1	CAT7	CHM-001	54.6:20.1:25.1:0.25	5mM クエン酸、pH 3.5	106.9	0.11	97	CVA21-RNA	0.3 mg/kg、Q2W2
CAT7/CHM6_4	CAT7	CHM-006	50.1:7:42.6:0.25	5mM クエン酸、pH 3.5	131.1	0.10	98	CVA21-RNA	0.3 mg/kg、Q2W2
CAT7/Brij	CAT7	BRIJ(商標)S100	54.5:20:25:0.5	5mM クエン酸、pH 3.5	116	0.2	88	CVA21-RNA	0.3 mg/kg、Q2W2
OC/DMG	Coatsome SS-OC	PEG _{2k} -DMG	49:22:28.5:0.5	25mM 酢酸、pH 5	110	0.28	94	CVA21-RNA	0.3 mg/kg、Q2W2
CAT7/CHM6_4	CAT7	CHM-006	50:7:40:3	5mM クエン酸、pH 3.5	102.6	0.37	98	CVA21-RNA	0.3 mg/kg、Q2W2
CAT11/DMG	CAT11	PEG _{2k} -DMG	50:7:40:3	5mM クエン酸、pH 3.5	79.8	0.31	98	CVA21-RNA	0.3 mg/kg、Q2W2
CAT11/Brij	CAT11	BRIJ(商標)S100	54.5:20:25:0.5	5mM クエン酸、pH 3.5	122.9	0.18	85	CVA21-RNA	0.3 mg/kg、Q2W2

【0942】

1日目及び15日目（Q2W2）または1日目及び8日目（Q1W2）に、ナイーブな雌スプラグドーリーJVCラット（12週齢）の静脈内に、LNPに含まれた1または0.3 mg/kgのウイルスゲノムを投与した。血漿試料を所定の時点で収集した。LNPに含まれるイオン化可能な脂質（SS-OC、CAT7、またはCAT11）の血漿中濃度をLC-MSによって測定し（図61A～61D、62A～62F、及び63A～63E）、薬物動態パラメータを計算し、表25-1及び表25-2にまとめた。IgM及びIgGのレベルを酵素結合免疫アッセイ（ELISA）によって分析した（図64A～64B及び図65A～65B）。

【表 2 5 - 1】

表 2 5 - 1. 薬物動態パラメータ

製剤	用量#	用量#	T _{1/2} (h)	T _{max} (h)	AUC _{INF}	AUC _{LAST}	C ₀ (μg/mL)	CL (mL/h/kg)	C _{max} (μg/mL)	V _{ss} (mL/kg)
					(h*μg/mL)					
OC/CHM1	1	1 日目	4.92	0.02	1980.57	1915.72	368.81	6.06	364.94	43.17
	2	15 日目	1.95	0.02	296.06	294.78	182.03	40.53	173.21	160.23
OC/CHM4	1	1 日目	3.51	0.5	2313.35	2284.79	344.1	5.19	401.04	27.54
	2	15 日目	1.87	0.02	456.71	454.71	206.18	26.27	200.34	106.16
OC/CHM5	1	1 日目	4.54	0.02	2565.94	2499.28	404.68	4.68	403.35	30.67
	2	15 日目	4.25	0.02	830.22	705.19	212.04	14.45	208.59	94.25
OC/CHM6	1	1 日目	5.04	0.02	3252.74	3130.05	477.19	3.69	472.62	26.03
	2	15 日目	2.74	0.02	1240.69	1239.1	220.02	9.67	216.1	51.98
OC/CHM12	1	1 日目	4.3	0.02	2753.28	2692.79	431.4	4.36	431.02	26.56
	2	15 日目	5.92	0.02	1459.81	1122.65	282.05	8.22	274.99	43.17
OC/Brij	1	1 日目	6.25	0.02	2016.16	1890.9	306.42	5.95	299.62	51.87
	2	8 日目	1.92	0.02	725.02	717.72	210.78	16.55	209.51	49.68
OC/Brij	1	1 日目	5.89	0.02	2109.85	1998.58	278.63	5.69	276.04	48.38
	2	15 日目	0.95	0.02	383.47	378.75	305.55	31.29	298.73	45.63
OC/DMG	1	1 日目	7.1	0.02	2918.23	2641.81	346.95	4.11	345.08	42.14
	2	15 日目	2.83	0.02	1020.25	783.99	321.7	11.76	318.13	47.55
OC/DPG	1	1 日目	5.91	0.02	1929.25	1815.2	358.99	6.22	353.9	52.8
	2	15 日目	1.96	0.02	140.25	135.55	155.02	85.56	149.29	202.16

10

20

30

40

50

【表 2 5 - 2】

表 2 5 - 2. 薬物動態パラメータ

製剤	イオン化可能な脂質の用量 (mg/kg)	用量#	T _{1/2} (h)	AUC ₀₋₂	AUC _{INF}	CL (mL/h/kg)	V _{ss} (mL/kg)	C _{max} µg/mL
				h*µg/mL				
OC /Brij	3.6	用量 1	2.8	69.01	183.79	19.59	81.85	65.06
	3.6	用量 2	0.6	42.84	48.22	74.65	65.31	73.5
CAT7/DMG_6	6.5	用量 1	2.6	116.08	308.26	20.96	93.47	72.58
	6.5	用量 2	2.2	107.39	263.81	24.5	117.35	74.66
CAT7/DMG_3	6.5	用量 1	0.6	54.21	95.67	67.55	275.46	75.79
	6.5	用量 2	1.8	79.42	181.21	35.66	185.34	73.04
CAT7/DMG_5	6.5	用量 1	0.8	24.98	127.23	50.79	416.32	69.77
	6.5	用量 2	4.2	48.38	166.82	38.74	304.37	65.38
CAT7/CHM1_1	6.5	用量 1	5	135.22	730.39	8.85	68.69	79.67
	6.5	用量 2	2.3	77.67	204.63	31.58	176.45	68.46
CAT7/CHM6_4	6.5	用量 1	0.9	29.79	162.35	39.8	338.16	68.68
	6.5	用量 2	5.5	51.38	246.32	26.23	249.88	61.97
CAT7/Brij	6.5	用量 1	4.55	192.83	834.37	7.74	53.92	128.22
	6.5	用量 2	2.9	103.72	284.41	22.72	111.78	98.63
OC/DMG	3.6	用量 1	3.52	107.34	329.48	10.93	57.26	79.49
	3.6	用量 2	0.32	22.39	22.68	158.73	76.28	43.77
CAT7/CHM6_4	6.5	用量 1	3.91	61.15	101.08	63.93	306.33	93.43
	6.5	用量 2	2.17	67.3	109.03	59.27	242.92	81.12
CAT11/DMG	6.6	用量 1	1.92	0.07	0.11	60435.32	138804.45	0.21
	6.6	用量 2	1.47	0.12	0.13	50064.5	47336.6	0.3
CAT11/Brij	6.6	用量 1	6.76	0.31	1.57	4203.47	38959.22	0.19
	6.6	用量 2	2.58	0.13	0.32	20537.25	82150.98	0.2

【0 9 4 3】

異なる比率及び／または種類の P E G 脂質を含む L N P 製剤は、複数用量後に様々な T_{1/2}、曝露、及びクリアランスを示す。これらのデータは、長い曝露から短い曝露のための様々な治療用ペイロードの必要を満たすように L N P 組成物を適合させることができることを示す。

【0 9 4 4】

L N P 製剤の投薬後の抗 P E G I g M レベルは低く、7日目から 21日目にかけて低下した（図 6 4 A 及び図 6 4 B）。抗 P E G I g G も低く、複数用量で有意に上昇せず、免疫原性の可能性が低いことを示している（図 6 5 A 及び図 6 5 B）。被験製剤の中で、イオン化可能な脂質としての C A T 7 及び P E G 脂質としての C H M - 0 0 6 を含む L N P は、I g M 及び I g G のレベルが最も低いことが観察された。

【0 9 4 5】

実施例 2 3 : m R N A をカプセル化する L N P の製剤

N : P 比が約 8 : 1 ~ 2 0 : 1 の m R N A をカプセル化する S S - O C : コレステロール : D S P C : P E G 脂質 L N P を調製する。P E G 脂質は、P E G 2 k - D P G、P E G 2 k - D M G、または B R I J（商標）S 1 0 0 である。総脂質濃度は約 1 0 ~ 約 6 0 m M である。製剤を混合し、透析し、濃縮する。サイズを動的光散乱によって測定し、カプセル化効率を R i b o G r e e n によって測定する。結果は、B R I J（商標）S 1 0

0 が mRNA LNP 製剤のために PEG 2 k - DPG または PEG 2 k - DMG の代わりに使用され得ることを示す。

【0946】

この実施例の mRNA LNP 製剤を、マウスでの静脈内投与による繰り返し投薬時の薬物動態特徴について試験する。投薬後の血清中の RNA のコピー数を所定の時点で測定する。結果は、BRIJ (商標) S100 を使用して製剤化された LNP が、第 2 の投薬時に、PEG-2 k DPG または PEG 2 k - DMG を使用して製剤化された LNP と比較して低減したクリアランス速度を呈することを示す。

【0947】

実施例 24：mRNA をカプセル化する LNP の製剤

この実施例は、脂質ナノ粒子 (LNP) 製剤中の mRNA のカプセル化について説明する。この実施例の LNP は、54.5 : 20 : 25 : 0.5 mol % の CAT7 : DSPC : コレステロール : CHM-006 の脂質組成物を含む。エタノール中の脂質混合物を、RNA 酸性化緩衝液 (5 mM クエン酸、pH 3.5) 中で、ヒトエリスロポエチン (hEPO) mRNA または二重特異性 T 細胞エンゲージャー (BiTE) をコードする mRNA と混合した。総脂質濃度は 20 mM に設定し、脂質窒素対リン酸比 (N : P) は 9 であった。

【0948】

LNP を 50 mM リン酸、pH 6.0 に対して 12 ~ 16 時間透析し、二次透析を 50 mM HEPES、50 mM NaCl、263 mM ショ糖、pH 7.3 に対して室温で 4 ~ 24 時間行った。透析後の LNP を 100 kDa AMICON (登録商標) ULTRA CENTRIFUGAL フィルター (Millipore Sigma) を使用して濃縮し、次いで、0.2 μm シリンジフィルターを使用して滅菌濃縮した。次いで、試料を特性解析し、必要に応じて希釈した。希釈の際、試料を -20 °C で貯蔵する場合には 5 w / v % グリセロールスパイクを加えた。

【0949】

DLS によって LNP サイズを測定し、蛍光ベースの Ribogreen アッセイを使用してカプセル化有効性を測定した (表 26)。

【表 26】

表 26. LNP に配合された mRNA

mRNA	イオン化可能な脂質 (CAT)	PEG 脂質	CAT:DSPC:コレステロール:PEG _{2k} -DMG (mol %)	サイズ (nm)	PDI	%EE
hEPO	CAT7	CHM-006	54.5:20:25:0.5	85	0.14	97
BiTE	CAT7	CHM-006	54.5:20:25:0.5	86	0.13	97
hEPO	CAT7	CHM-006	54.5:20:25:0.5	87	0.16	97
BiTE	CAT7	CHM-006	54.5:20:25:0.5	88.5	0.13	98

【0950】

実施例 25：LNP に配合された mRNA の薬物動態

mRNA カプセル化 LNP 製剤 (表 26) の PK をマウスで評価した。

【0951】

ナীব雌 Balb / c マウスに 1 mg / kg の LNP を投薬した。3 匹のマウスから所定の各時点で採血し、血漿を後の分析のために -80 °C で凍結した。hEPO 及び BiTE の血漿レベルを Meso Scale Discovery (MSA) 電気化学発光 (ECL) アッセイによって測定した (図 66A 及び図 66B)。高レベルのタンパク質発現及び長期にわたる曝露が観察された。

【0952】

実施例26：様々な長さでLNPに配合されたRNA

実施例24に記載のものと同様の手順に従い、以下の表27に従って、様々な長さのRNAをカプセル化したLNP製剤を調製した。

【表27】

表27. LNP製剤

RNAの長さ(kb)	製剤	イオン化可能な脂質	PEG脂質	イオン化可能な脂質:DSPC:コレステロール:PEG脂質(mol %)	酸性化緩衝液	サイズ(nm)	PDI	%EE
5.9	OC/Brij	Coatsome SS-OC	BRIJ(商標) S100	49:22:28.5:0.5	25mM 酢酸、pH 5	77.9	0.26	98%
14.2	OC/Brij	Coatsome SS-OC	BRIJ(商標) S100	49:22:28.5:0.5	25mM 酢酸、pH 5	93.5	0.23	95%
12.6	OC/Brij	Coatsome SS-OC	BRIJ(商標) S100	49:22:28.5:0.5	25mM 酢酸、pH 5	131.9	0.32	92%
5.9	CAT7/DMG	CAT7	PEG _{2k} -DMG	54.5:20:25:0.5	5mM クエン酸、pH 3.5	80.4	0.05	99%
14.2	CAT7/DMG	CAT7	PEG _{2k} -DMG	54.5:20:25:0.5	5mM クエン酸、pH 3.5	99.8	0.22	93%
12.6	CAT7/DMG	CAT7	PEG _{2k} -DMG	54.5:20:25:0.5	5mM クエン酸、pH 3.5	99.3	0.21	93%

【0953】

このデータは、カプセル化されたRNAの長さが様々なにもかかわらず、LNPが良好な生物物理学的特性（例えば、小さいサイズ及びPDI、高い%EE）を維持したことを示す。

【0954】

実施例27：CAT7を含むLNPの製剤研究及びモデル化

A最適(A-optimal)基準(Jones et al., 2021)を使用して、CAT7を含むLNPの製剤研究を設計し(図67)、20の実験設計(DOE)ランを得た(表29)。総脂質濃度は20mM、N:P比は9に設定した。設計空間は、40~60mol%のイオン化可能な脂質であるCAT7、5~20mol%のヘルパー脂質であるDSPC、25~50mol%の構造脂質であるコレステロール、及び0.25~3%のPEG脂質であるDMG-PEG2000またはCHM-001を含むLNPを試験した。

10

20

30

40

50

【表 2 9】

表 2 9. C A T 7 L N P の実験設計

DOE ラン	組成	Mol %
1	CAT7:DSPC:コレステロール:PEG _{2k} -DMG	50:11.25:36.75:2
2	CAT7:DSPC:コレステロール:PEG _{2k} -DMG	40:20:39.5:0.5
3	CAT7:DSPC:コレステロール:PEG _{2k} -DMG	60:5:32:3
4	CAT7:DSPC:コレステロール:CHM-001	60.9:12.2:25.4:1.5
5	CAT7:DSPC:コレステロール:CHM-001	40.1:9.5:50.1:0.25
6	CAT7:DSPC:コレステロール:PEG _{2k} -DMG	44.5:5:50:0.5
7	CAT7:DSPC:コレステロール:PEG _{2k} -DMG	40:8.75:50:1.25
8	CAT7:DSPC:コレステロール:CHM-001	60.5:5.0:33.5:0.88
9	CAT7:DSPC:コレステロール:PEG _{2k} -DMG	60:14.5:25:0.5
10	CAT7:DSPC:コレステロール:CHM-001	40.4:20.2:38.6:0.83
11	CAT7:DSPC:コレステロール:PEG _{2k} -DMG	52.75:20:25:2.25
12	CAT7:DSPC:コレステロール:CHM-001	42.6:5.1:50.8:1.52
13	CAT7:DSPC:コレステロール:CHM-001	55.7:18.9:25.1:0.25
14	CAT7:DSPC:コレステロール:CHM-001	50.4:11.1:37.2:1.27
15	CAT7:DSPC:コレステロール:PEG _{2k} -DMG	40:7:50:3
16	CAT7:DSPC:コレステロール:CHM-001	60.2:5:34.6:0.25
17	CAT7:DSPC:コレステロール:PEG _{2k} -DMG	40:20:37:3
18	CAT7:DSPC:コレステロール:CHM-001	40.1:9.5:50.1:0.25
19	CAT7:DSPC:コレステロール:PEG _{2k} -DMG	60:5:34.3:0.7
20	CAT7:DSPC:コレステロール:PEG _{2k} -DMG	40.6:20.3:37.6:1.52

10

20

30

【0 9 5 5】

信頼できる設計空間のパラメータ内で、D O E 最適組成物は、5 4 . 5 : 2 0 : 2 5 : 0 . 5 の m o l % 比の C A T 7 : D S P C : コレステロール : P E G 脂質であると決定された。

【0 9 5 6】

様々な組成の L N P の生物物理学的特徴を予測し、様々な所望の結果のために L N P システムを識別及び微調整するためのモデルを策定するために、S V E M (S e l f - V a l i d a t e d E n s e m b l e M o d e l i n g) 法 (L e m k u s e t a l . 2 0 2 1) を使用した。モデルの開発における目標は、P D I (1 の重みが付けられる) 及びサイズ (0 . 1 の重みが付けられる) を最小化することであった。

40

【0 9 5 7】

得られた予測プロファイラーを図 6 8 に示す。C A T 7、D S P C、及びコレステロールについて、二次 (屈曲または非線形) 関係が見られる。C A T 7 組成物は P D I に大きく影響するように見受けられ、増加傾向が最初に 4 0 m o l % から開始し、その後に約 5 5 m o l % で安定化した下降傾向が続いた。より高い D S P C は、P D I 及びサイズの両方の低下に有利であるように見受けられる。コレステロールは、P D I 及びサイズの両方について C A T 7 に酷似するパターンに従うが、このモデルはより低いモル組成を選ぶ。P E G 脂質組成の増加は、観察された P D I における急激な増加に関連している。

50

【0958】

参照による組み込み

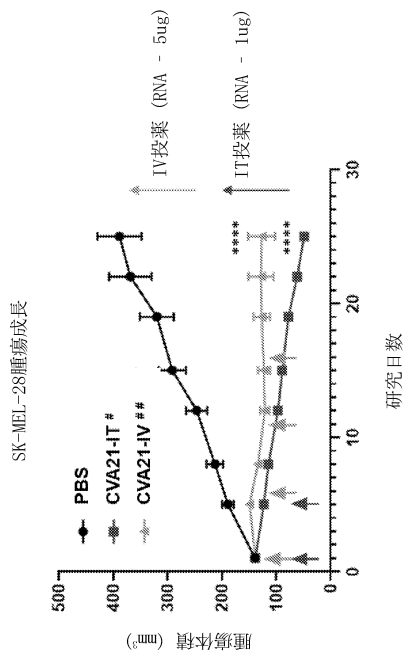
本明細書で引用されるすべての参考文献、論文、刊行物、特許、特許公開、及び特許出願は、あらゆる目的のためにそれらの全体が参照により組み込まれる。しかしながら、本明細書で引用されるいずれの参考文献、論文、刊行物、特許、特許公開、及び特許出願の言及も、それらが有効な先行技術を構成する、または世界のいずれかの国における一般知識の一部を形成するという認識でも、いかなる形態の示唆でもなく、そのように解釈されるべきではない。

【0959】

本開示の好適な実施形態が本明細書に示され記載されたが、そのような実施形態は、ほんの一例として提供されることが当業者に自明であろう。当業者は、多数の変化形、変更、及び置換を本開示から逸脱することなく想定するであろう。本明細書に記載される本開示の実施形態に対する種々の代替手段が、本開示の実施において採用され得ることを理解されたい。以下の特許請求の範囲が本開示の範囲を定義し、これらの特許請求の範囲に含まれる方法及び構造、ならびにそれらの均等物が、それにより包含されることが意図される。

【図面】

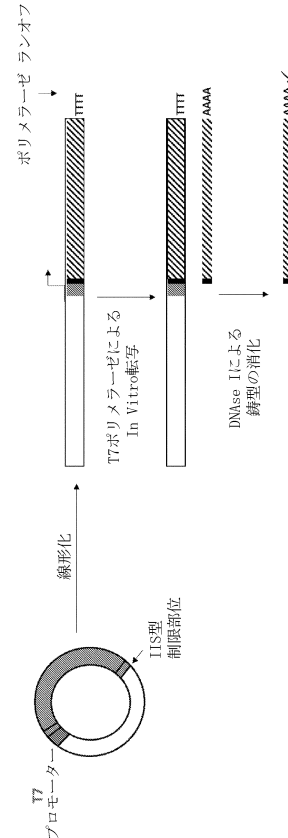
【図1】



****二元配置ANOVA、フェューキー検定 $p < 0.0001$

Lipofectamineと共に製剤化されたCVA21コードRNA (陽性対照)
CVA21 LNP製剤 # 70032-6, C

【図2A】



10

20

30

40

50

10

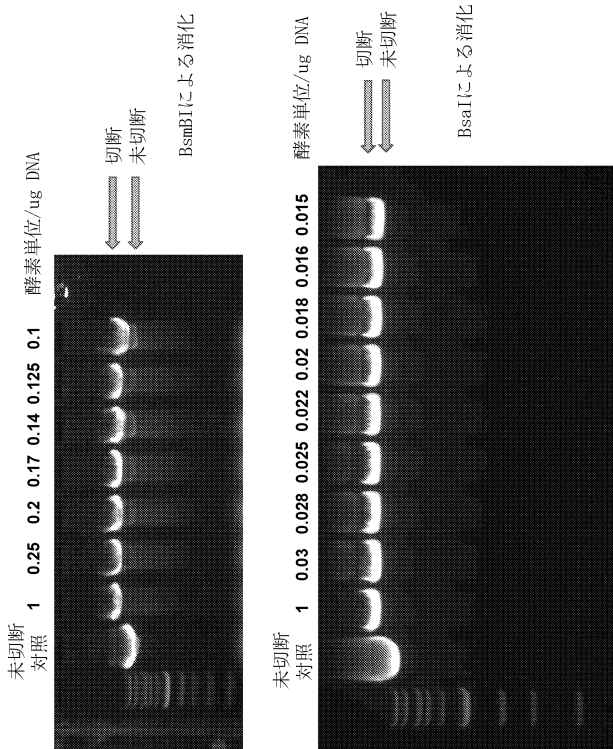
20

30

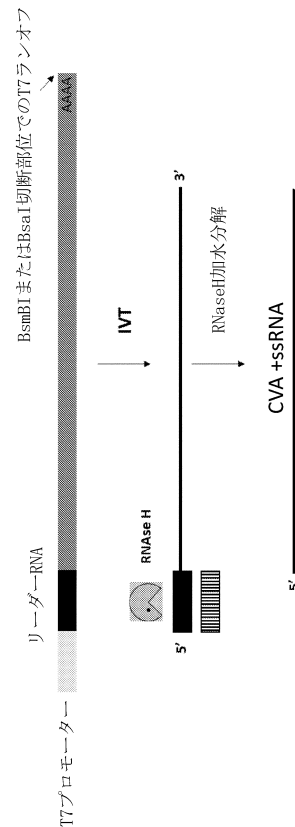
40

50

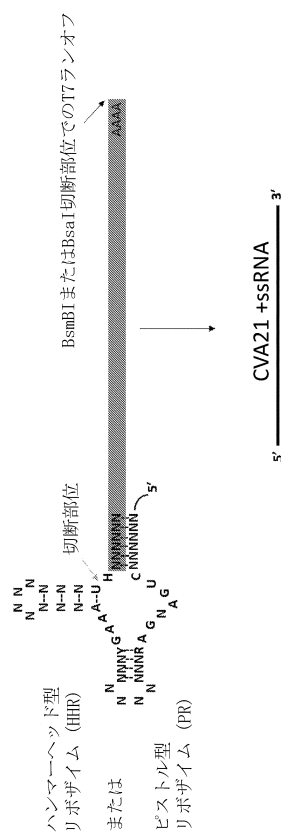
【図 2 B】



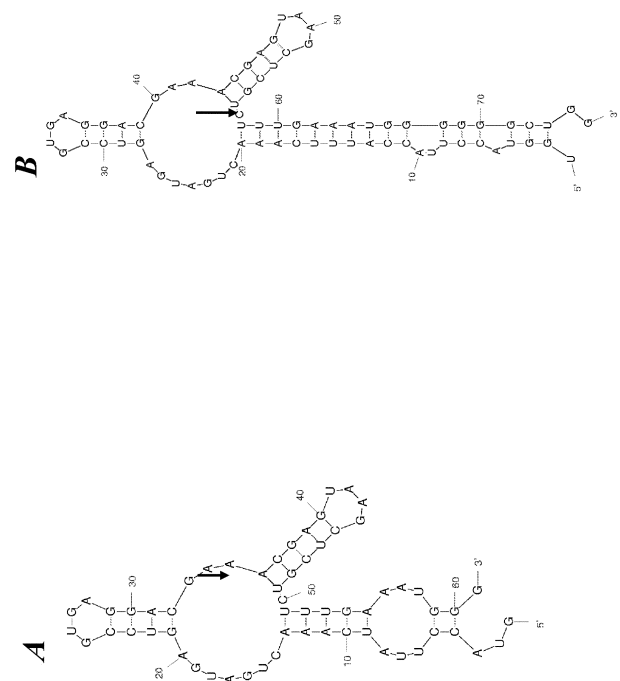
【図 3】



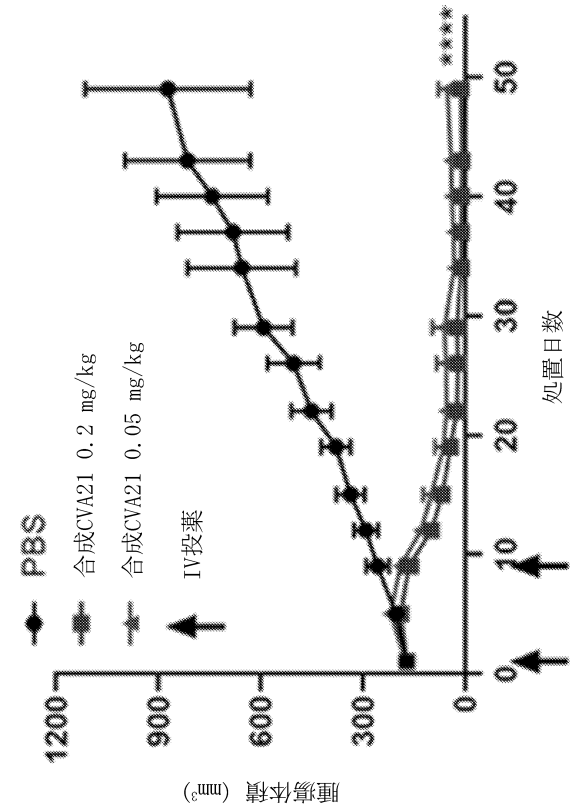
【図 4】



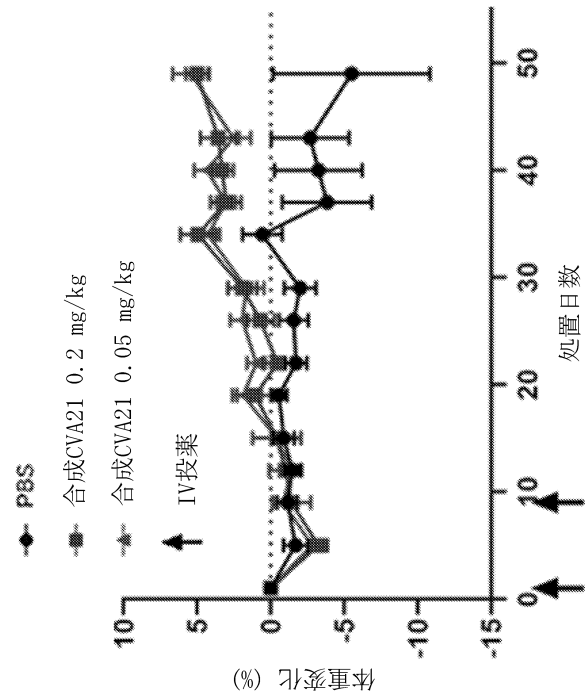
【図 5】



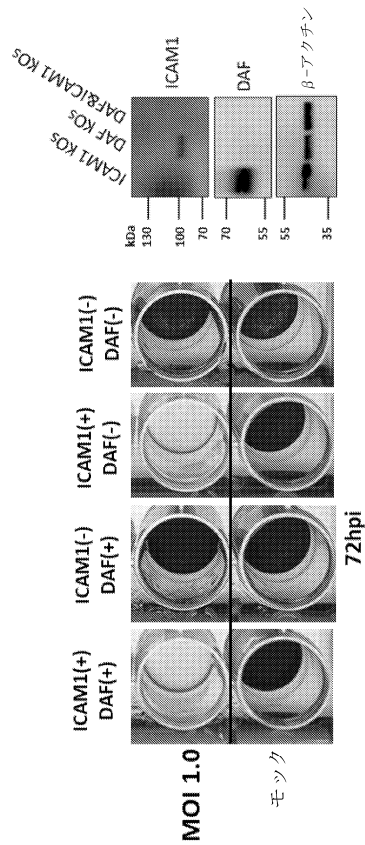
【図 8 A】



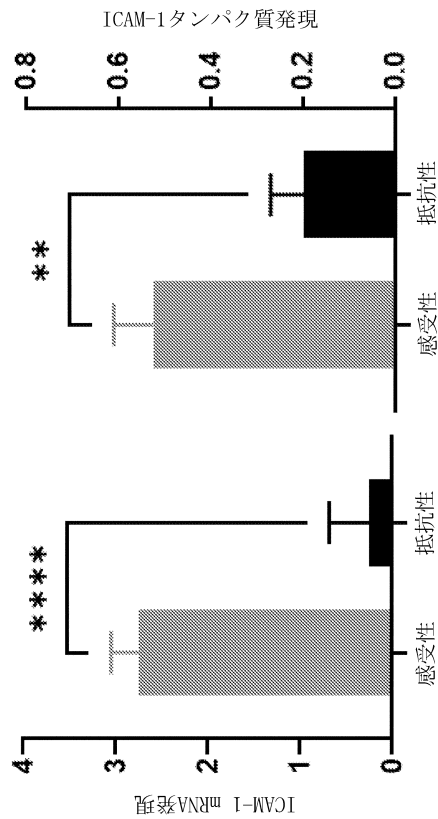
【図 8 B】



【図 8 C】



【図 8 D】



10

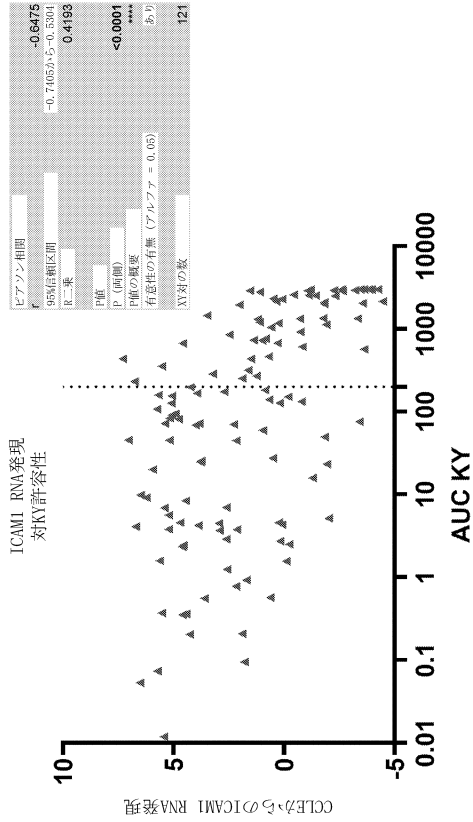
20

30

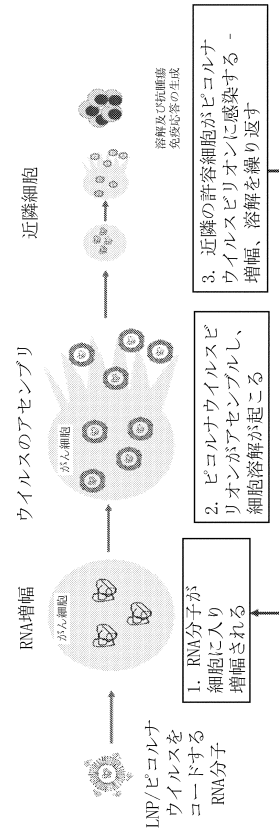
40

50

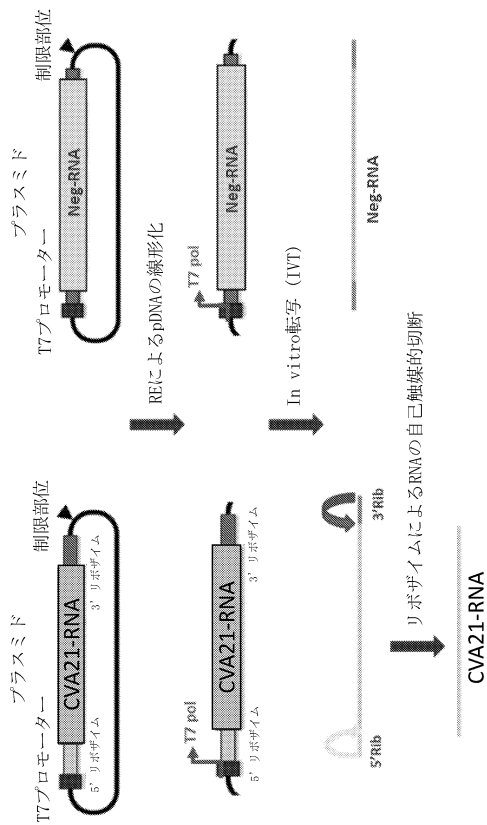
【図 8 E】



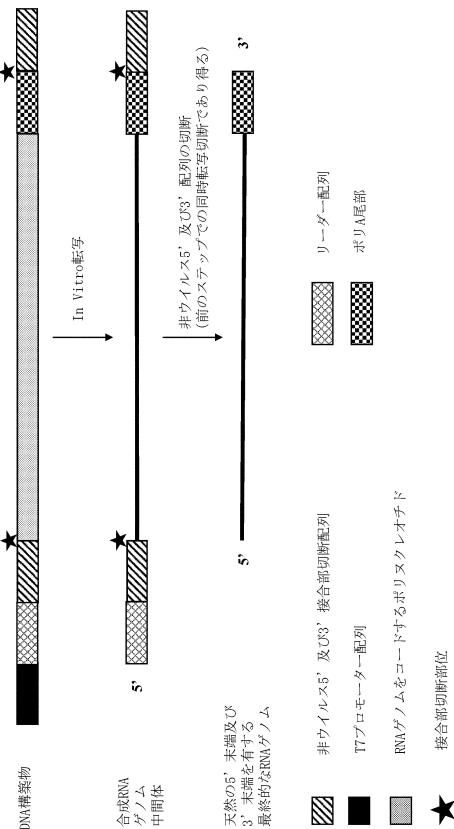
【圖 9】



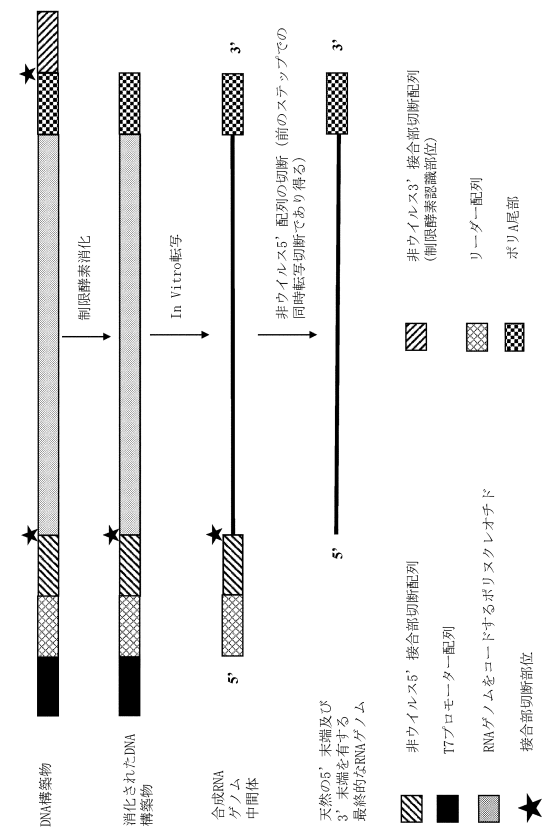
【図 10】



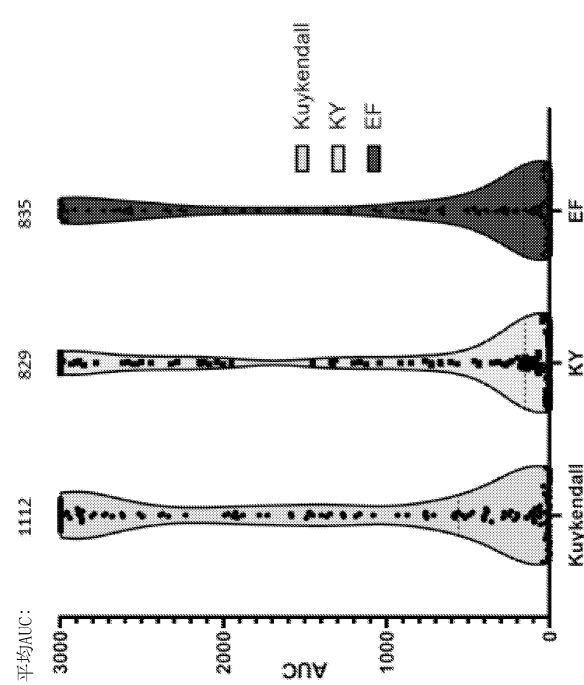
【図 1 1 A】



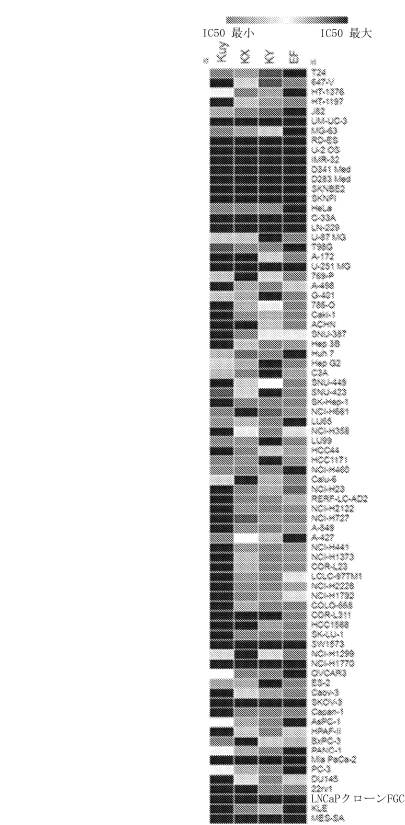
【図 1 1 B】



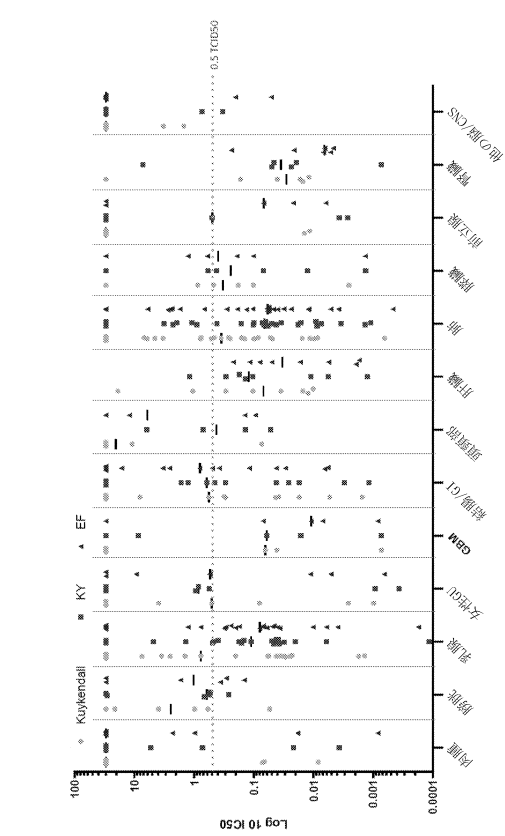
【図 1 2 A】



【図 1 2 B】



【図 1 3】



10

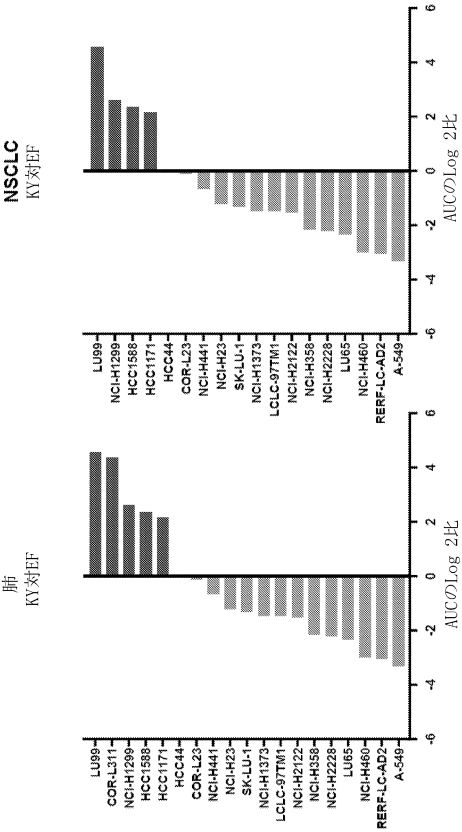
20

30

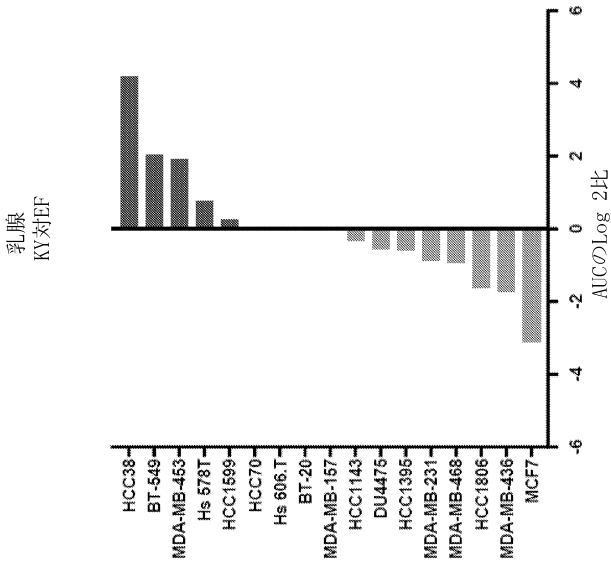
40

50

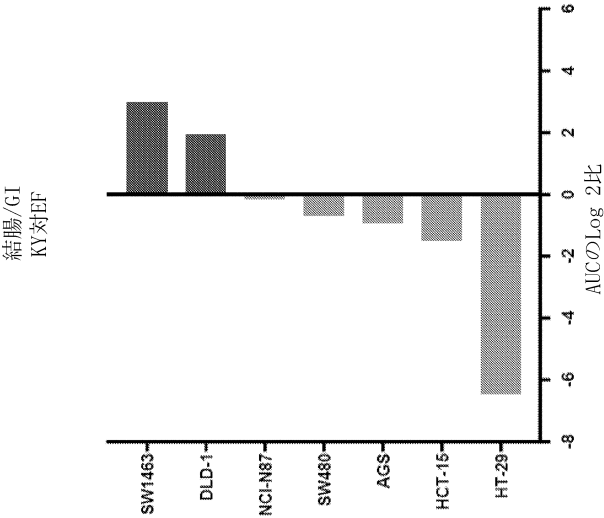
【図 1 4】



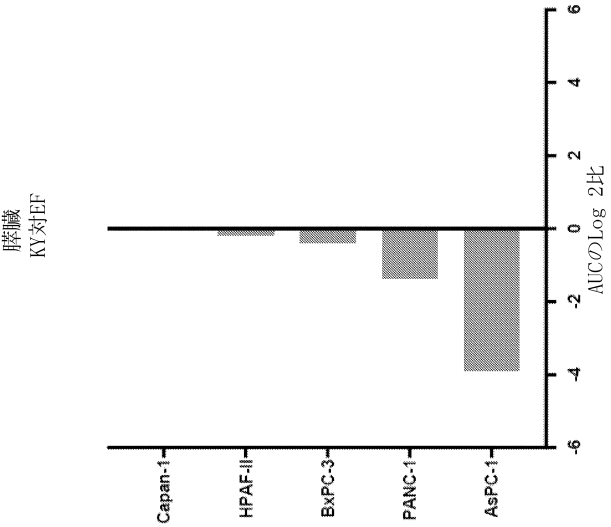
【図 1 5 A】



【図 1 5 B】



【図 1 5 C】



10

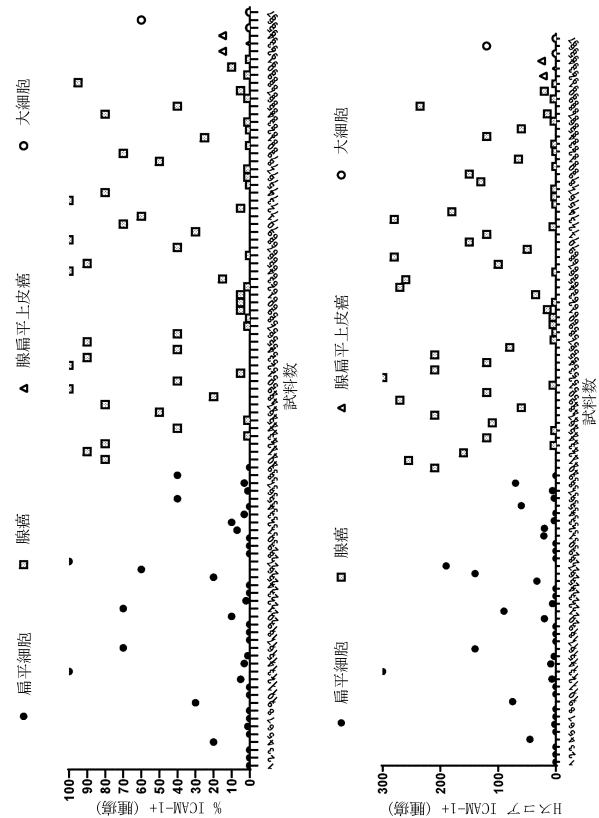
20

30

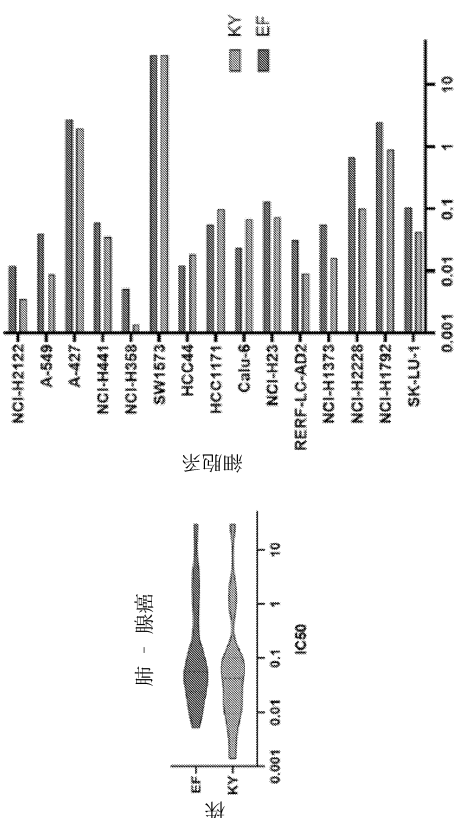
40

50

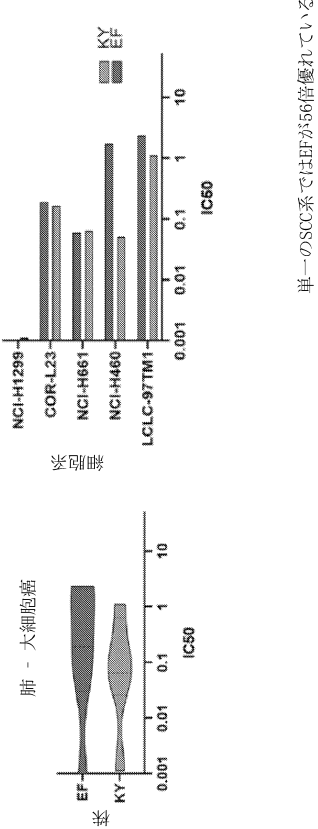
【図 1 6 A】



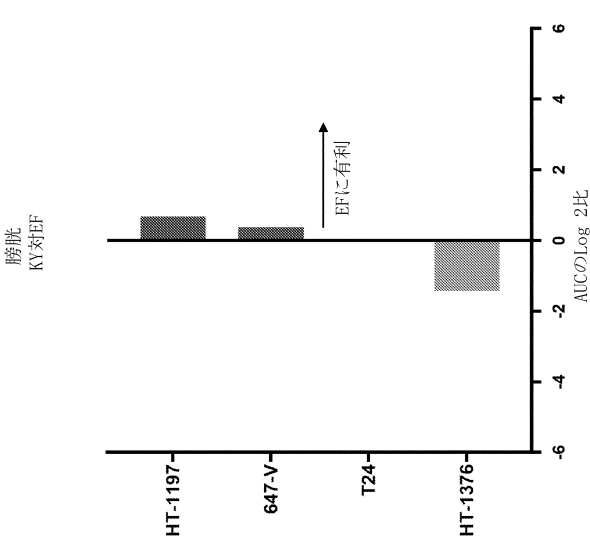
【図 1 6 B】



【図 1 6 C】



【図 1 7 A】



10

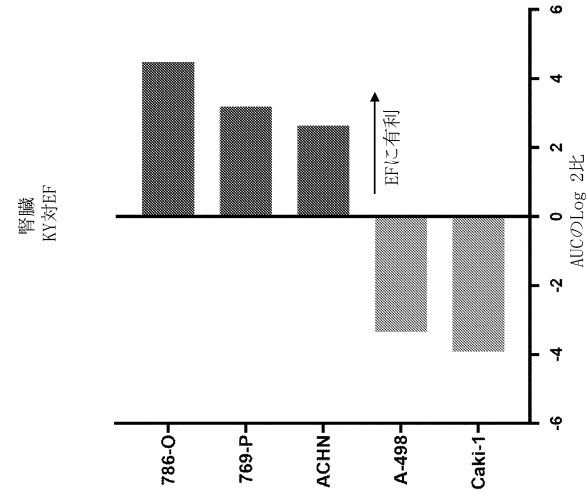
20

30

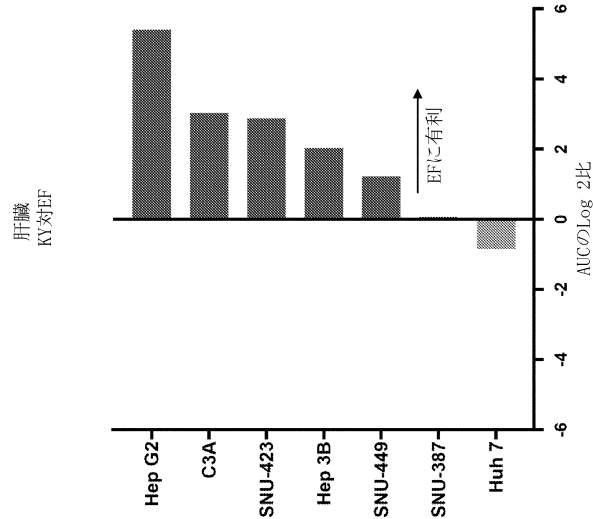
40

50

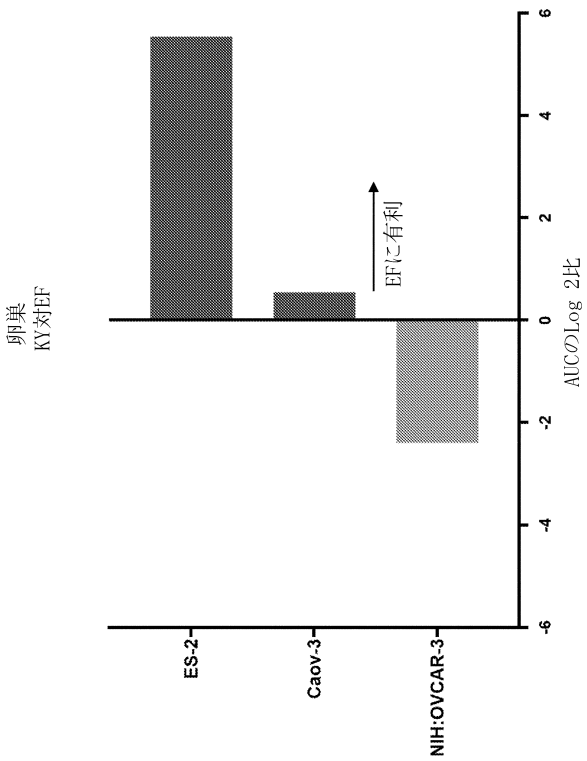
【図 1 7 B】



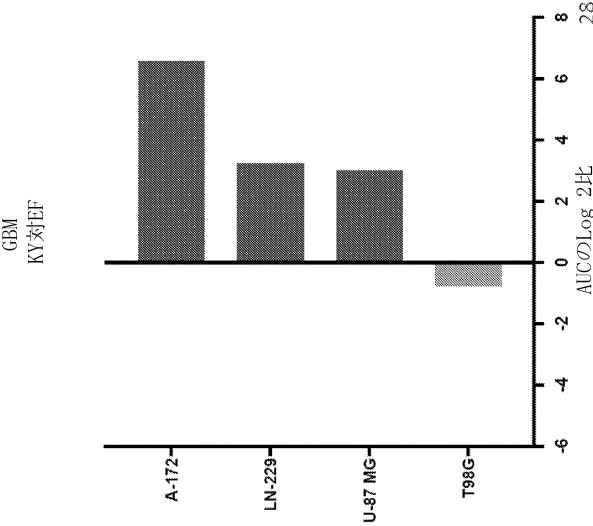
【図 1 7 C】



【図 1 7 D】



【図 1 7 E】



10

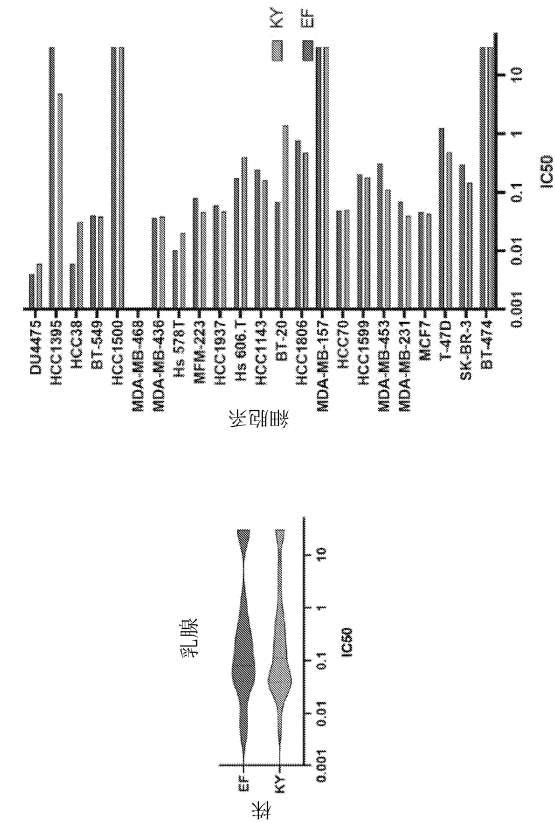
20

30

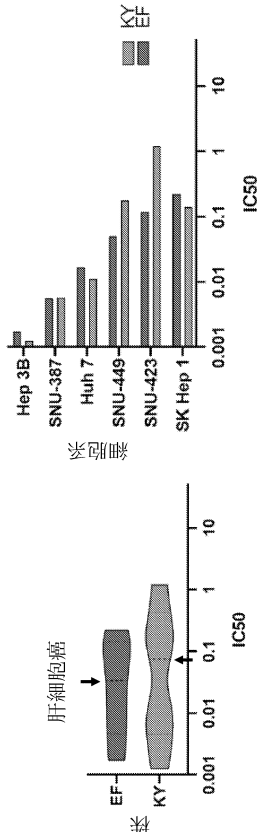
40

50

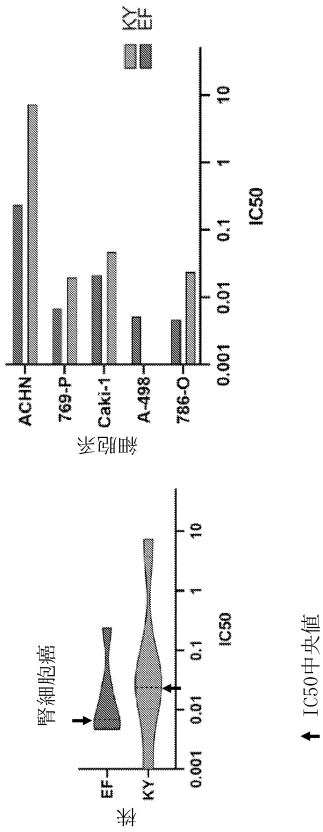
【図 1 8 A】



【図 1 8 B】



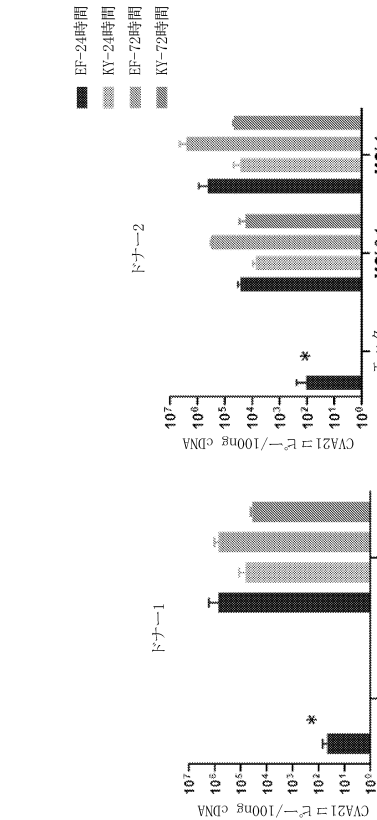
【図 1 8 C】



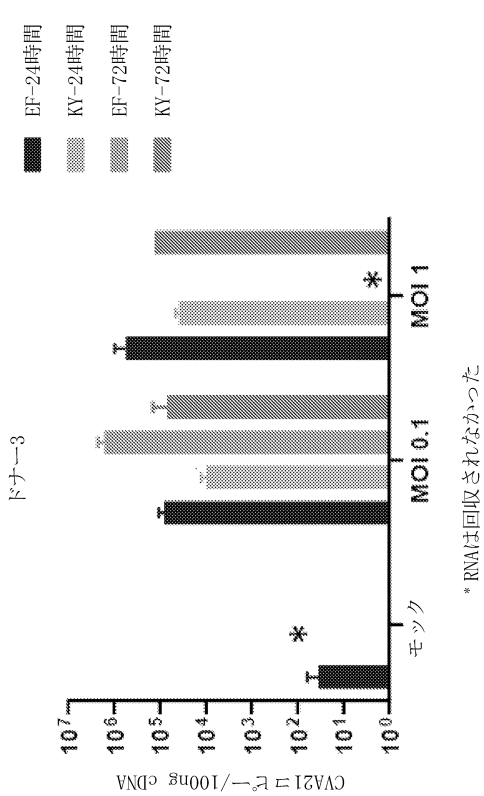
【図 1 9】

hICAM1 細胞系	IC50s	
	KY	EF
CT26 WT	21.80	6.89
CT26 IFNARKO A-8	15.67	0.34
4T1	17.62	0.09
EMT6	19.66	1.11
B16-F10	0.01	0.01
A20	>30	6.30
CT2A	13.11	5.76
M109	1.27	1.22

【図 2 0 A】

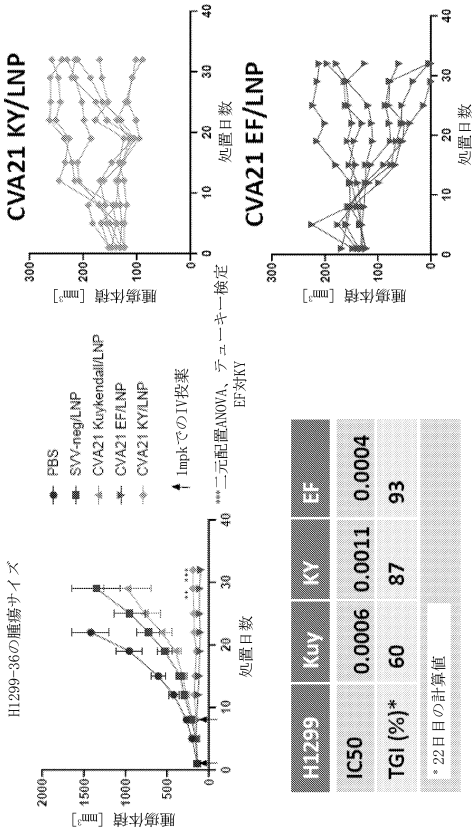


【図 2 0 B】

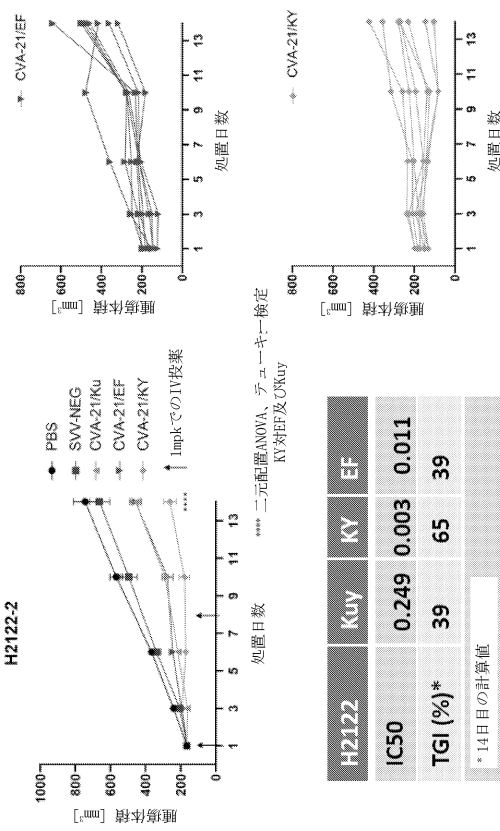


* RNAは回収されなかった

【図 2 1】



【図 2 2】



10

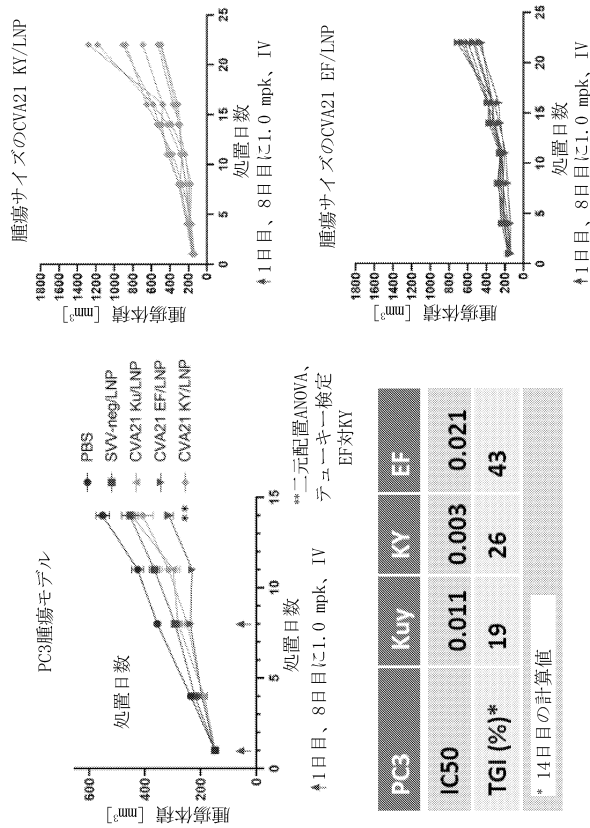
20

30

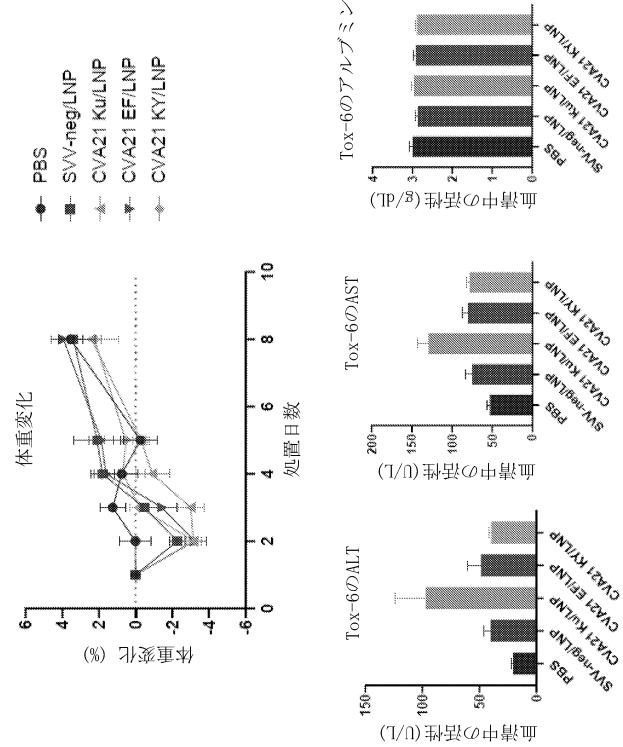
40

50

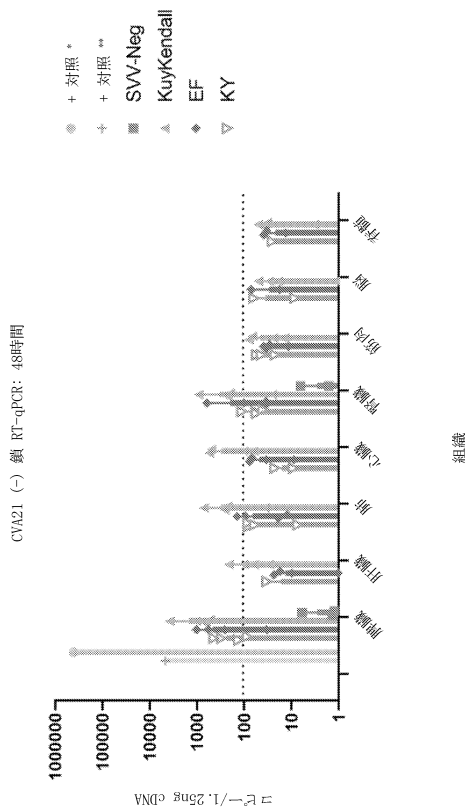
【図 2 3】



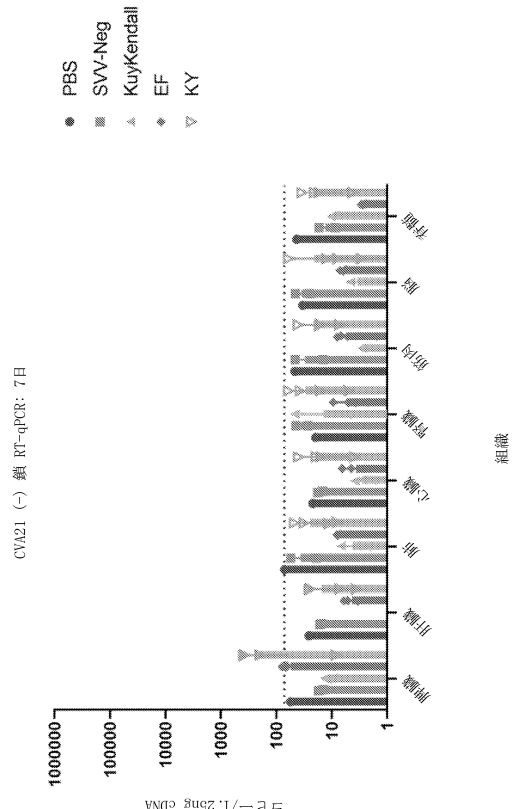
【図 2 4】



【図 2 5 A】



【図 2 5 B】



10

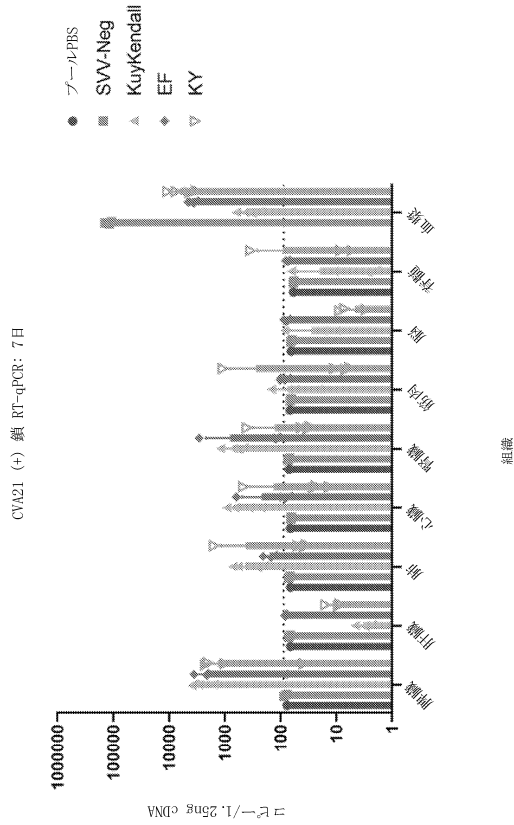
20

30

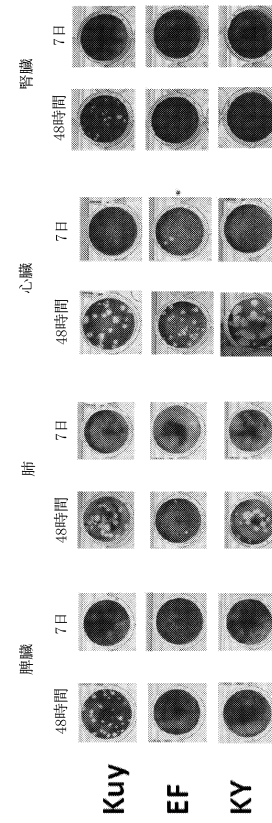
40

50

【図 2 5 C】



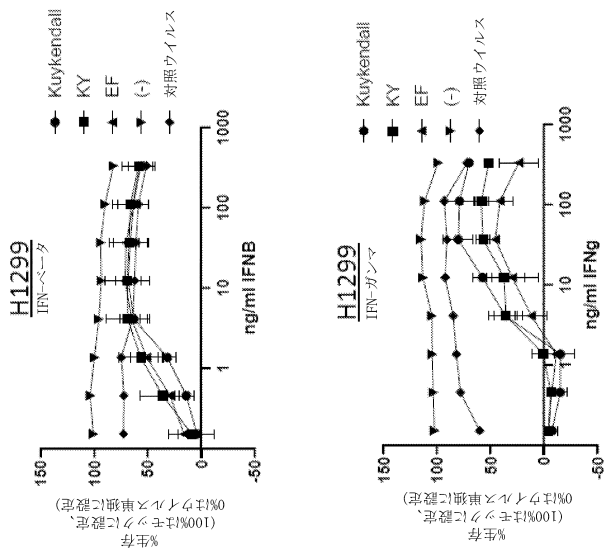
【図 2 6】



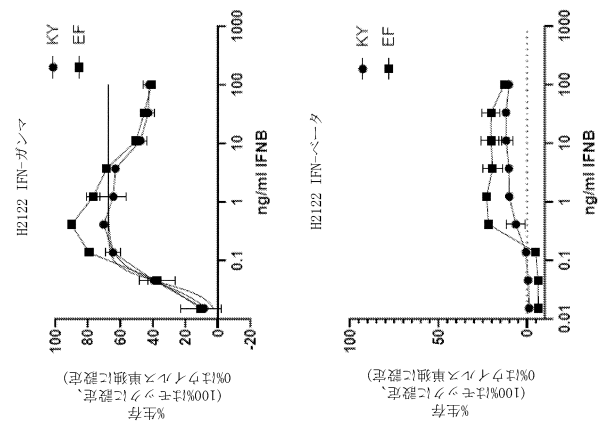
10

20

【図 2 7 A】



【図 2 7 B】

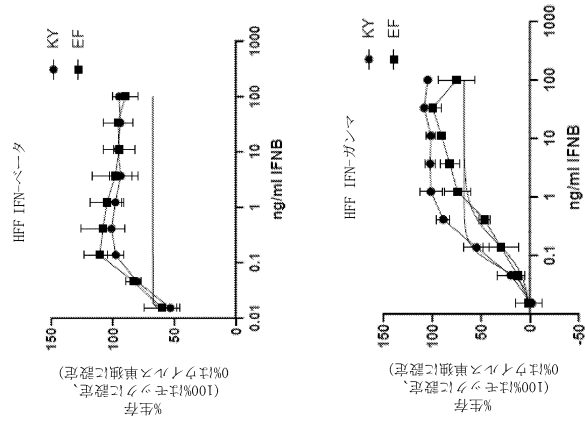


30

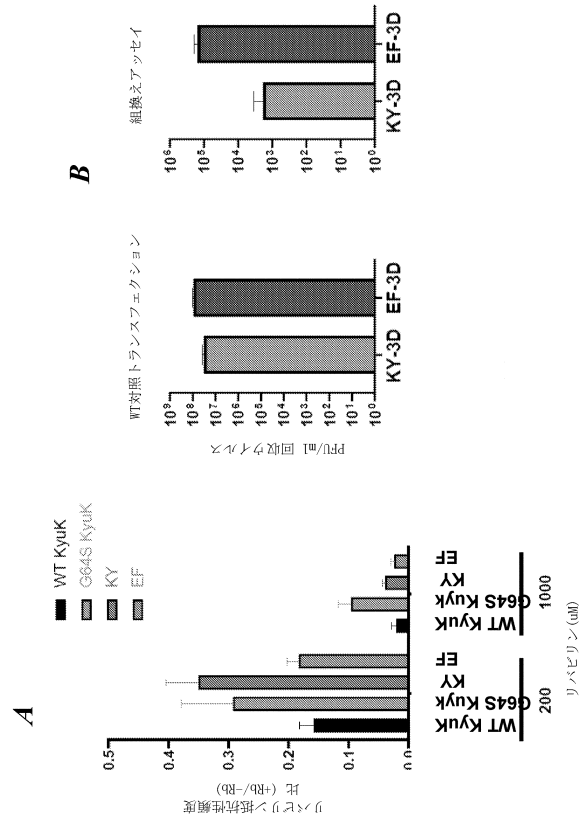
40

50

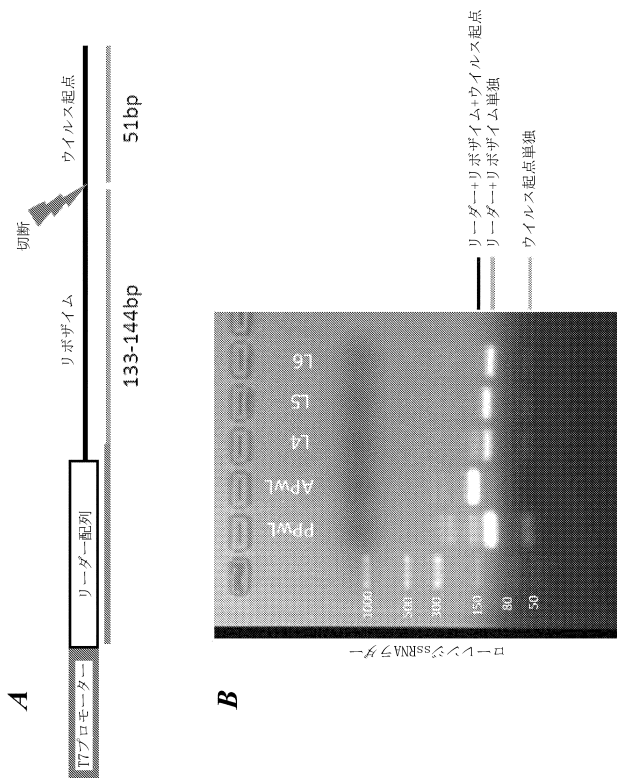
【図 27 C】



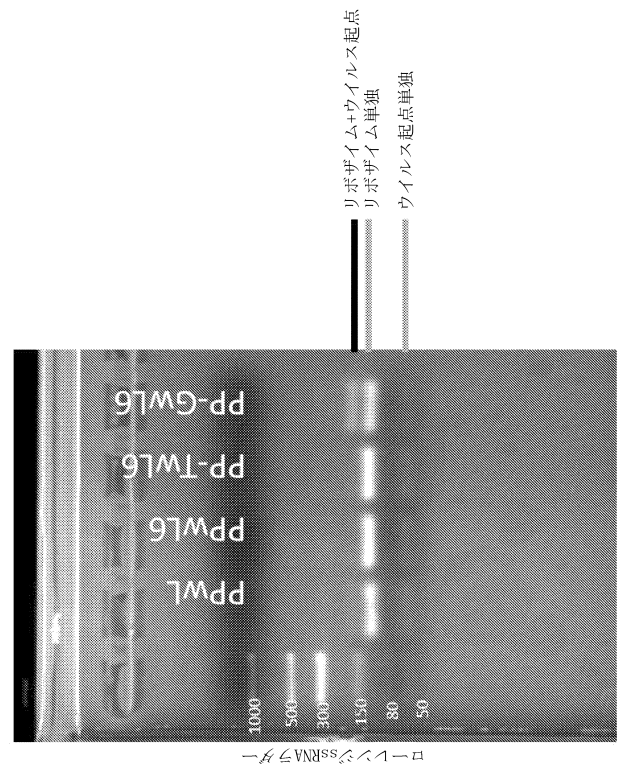
【図 28】



【図 29】



【図 30】



10

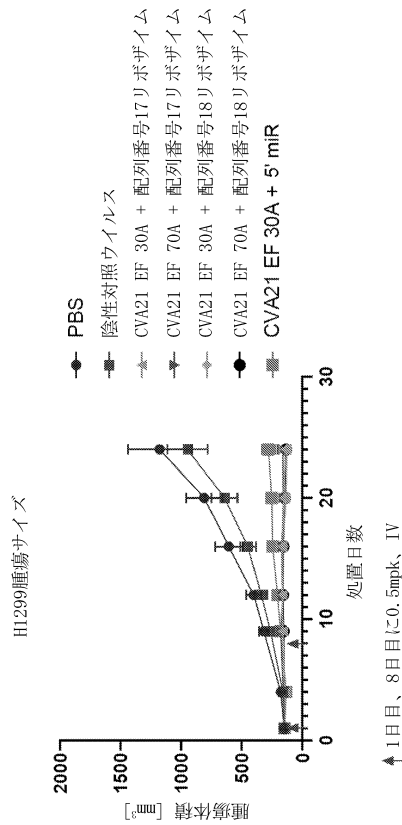
20

30

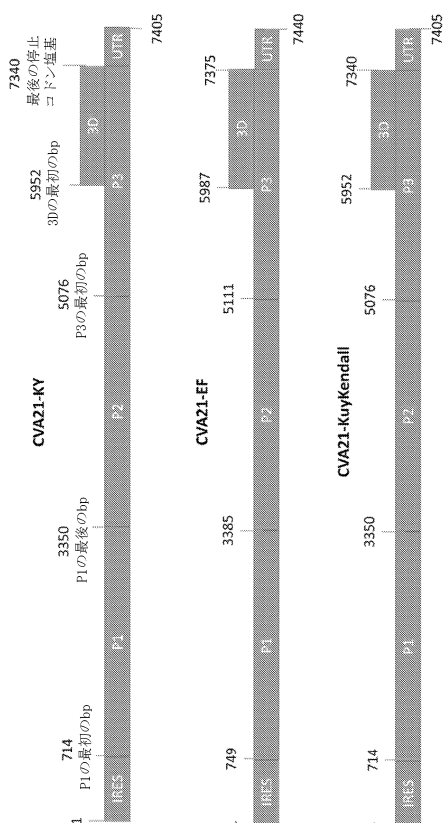
40

50

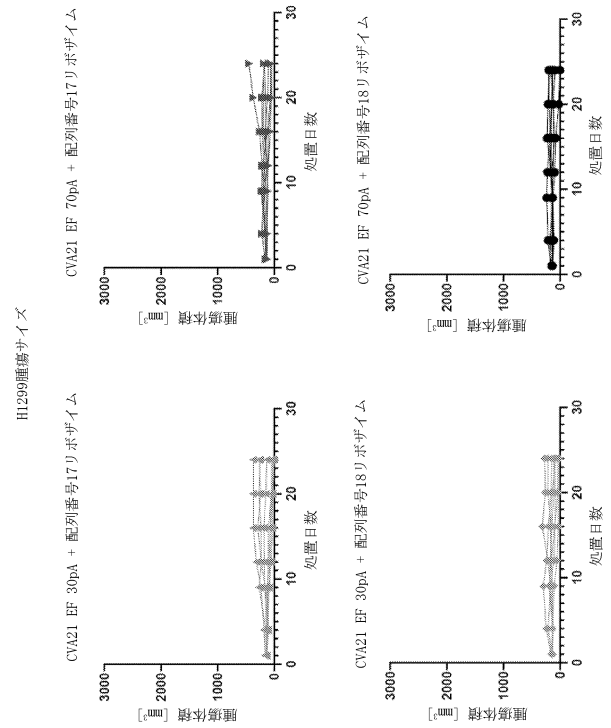
【図 3 1 A】



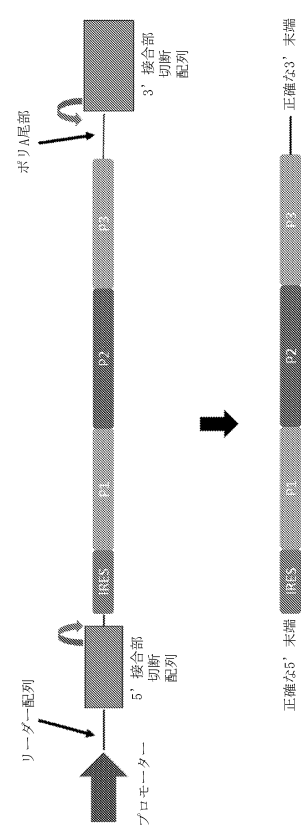
【図 3 2】



【図 3 1 B】



【図 3 3】



10

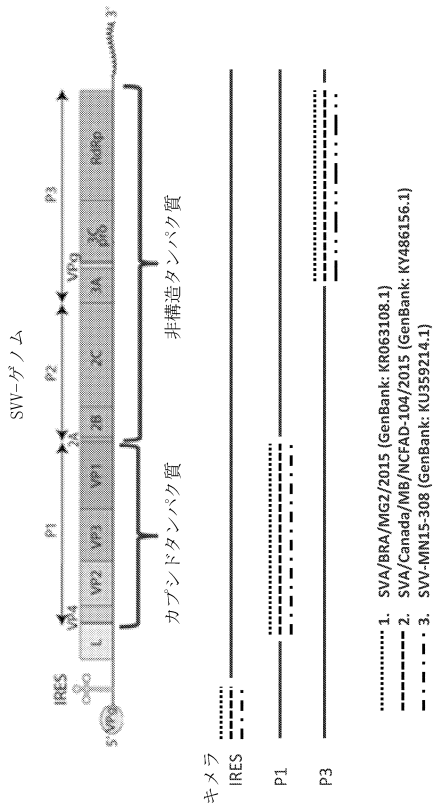
20

30

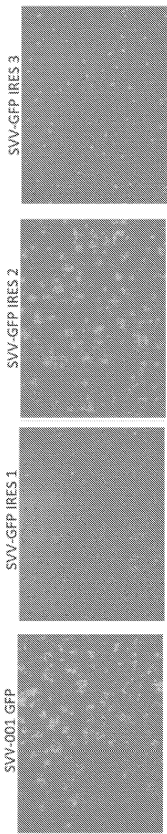
40

50

【図 3 4】



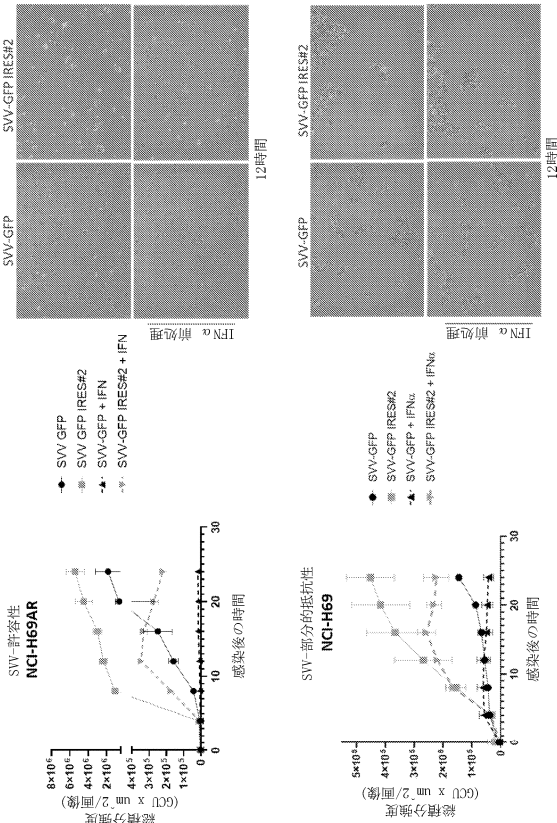
【図 3 5】



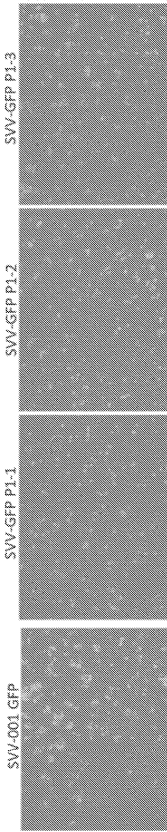
10

20

【図 3 6】



【図 3 7】

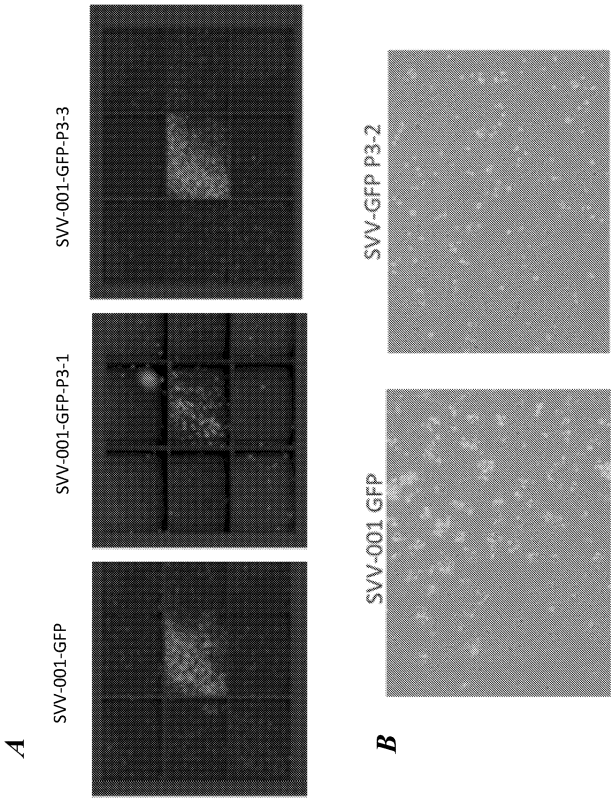


30

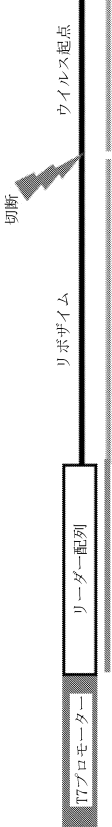
40

50

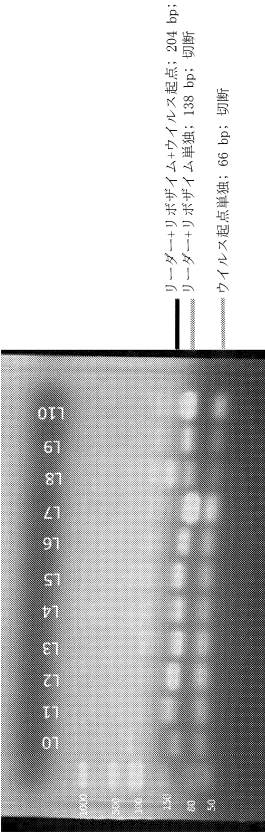
【図 3 8】



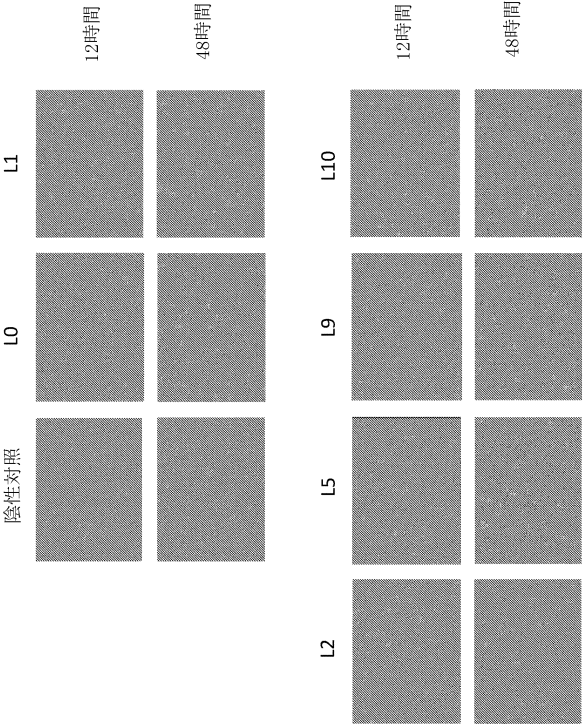
【図 3 9 A】



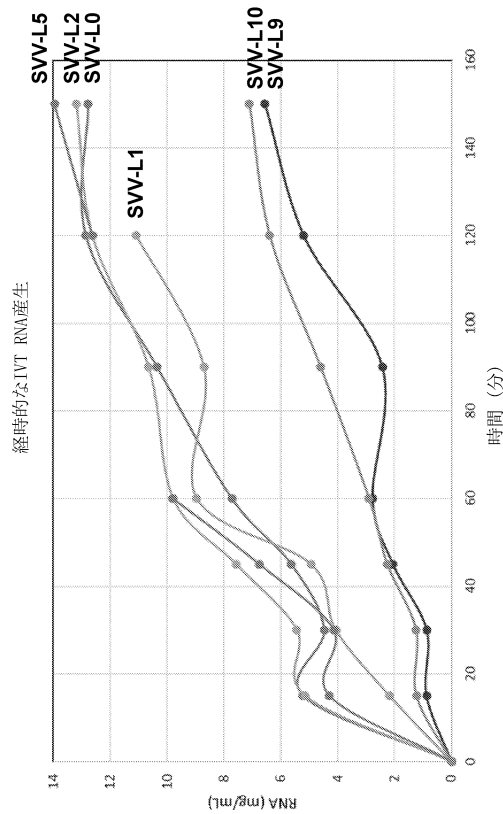
【図 3 9 B】



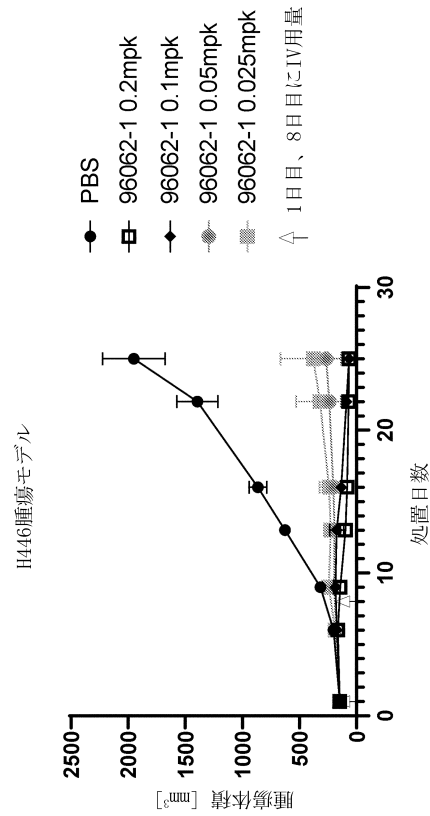
【図 3 9 C】



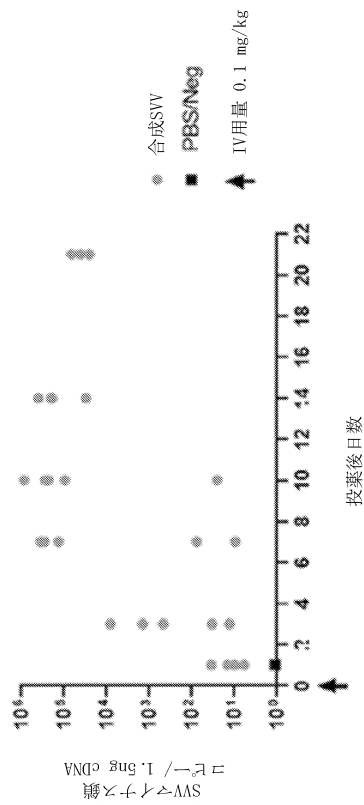
【図 3 9 D】



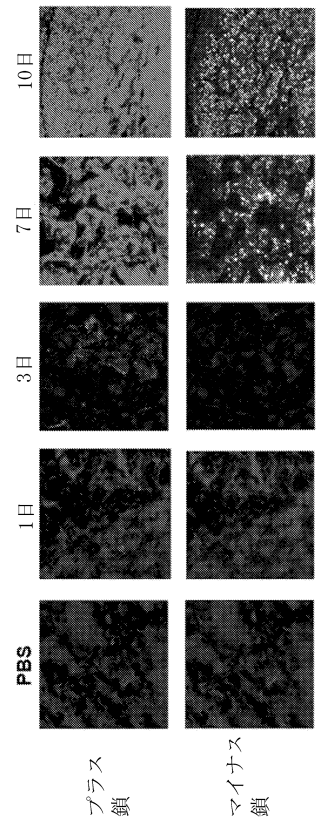
【図 4 0 A】



【図 4 0 B】



【図 4 0 C】



10

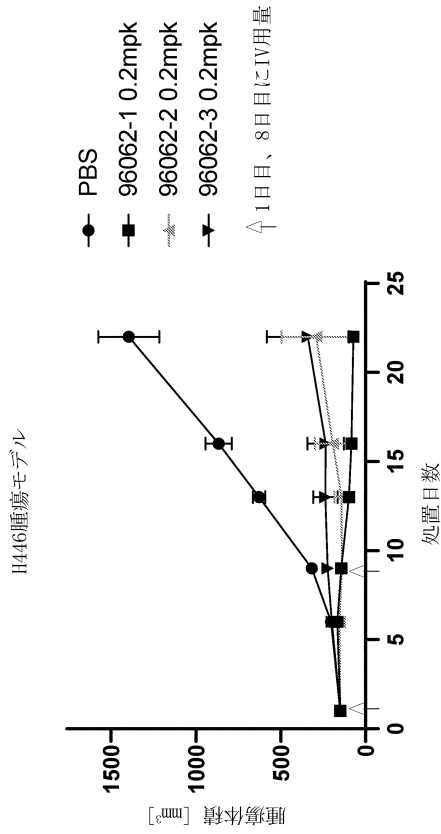
20

30

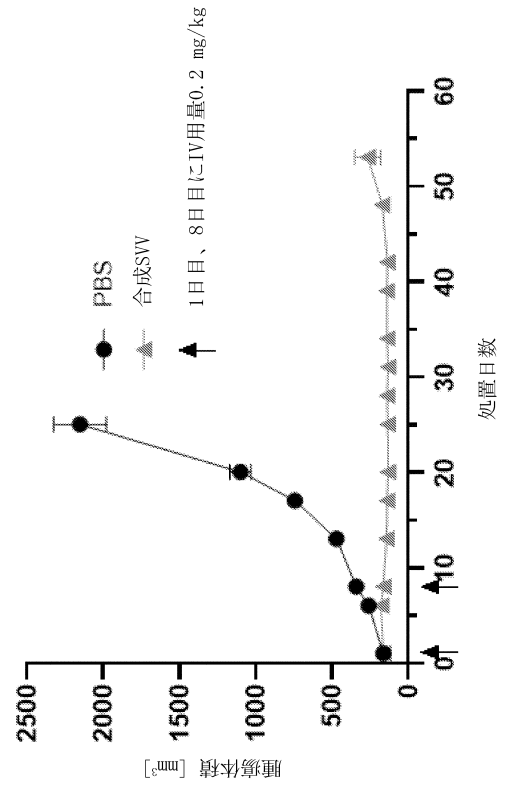
40

50

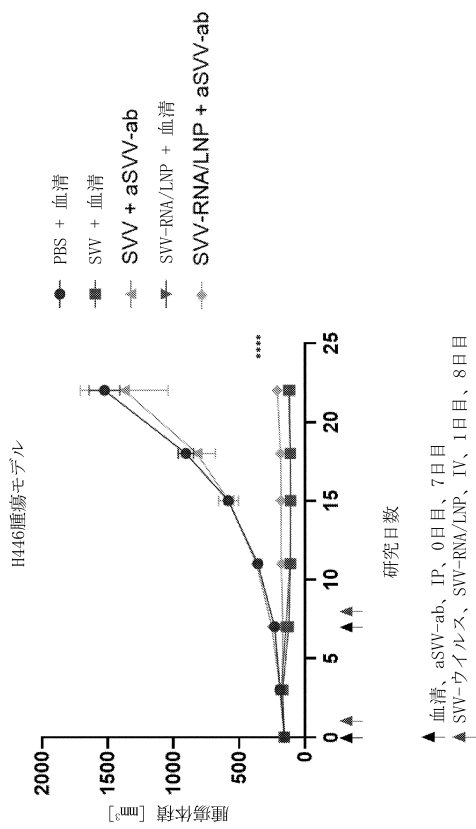
【図 4 1】



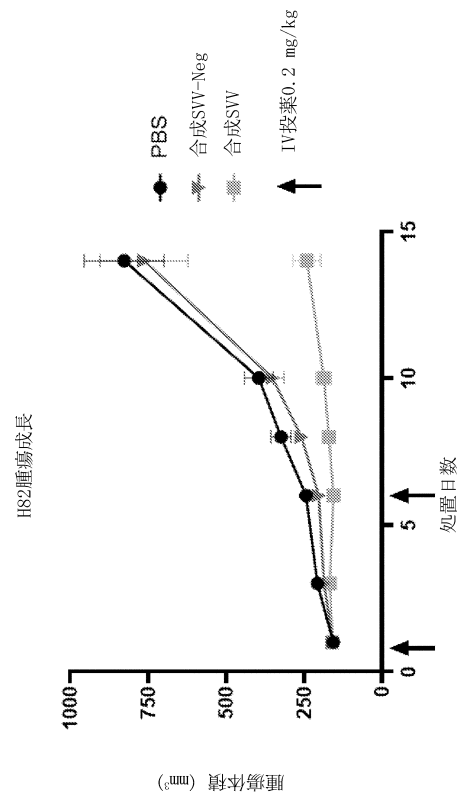
【図 4 2】



【図 4 3】



【図 4 4】



10

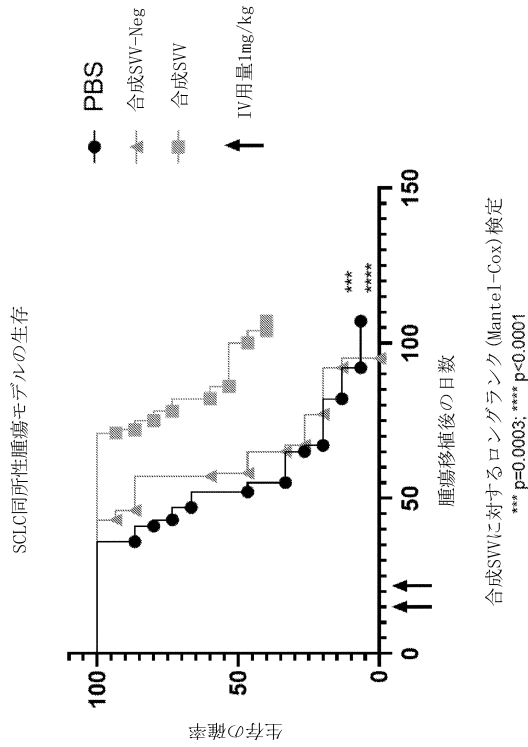
20

30

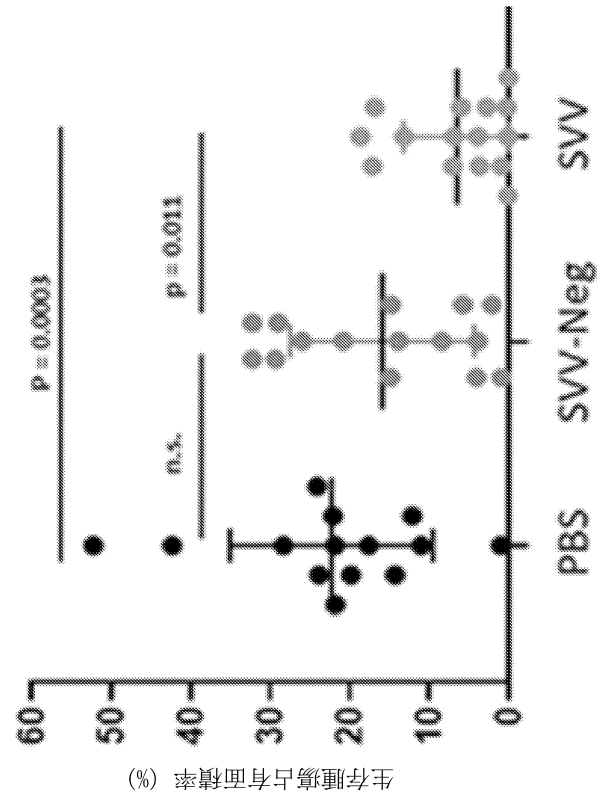
40

50

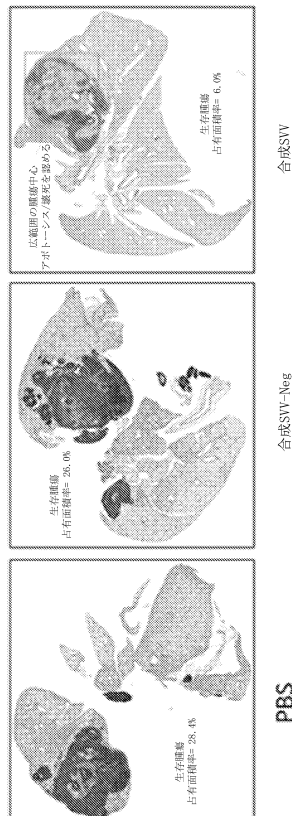
【図 4 5】



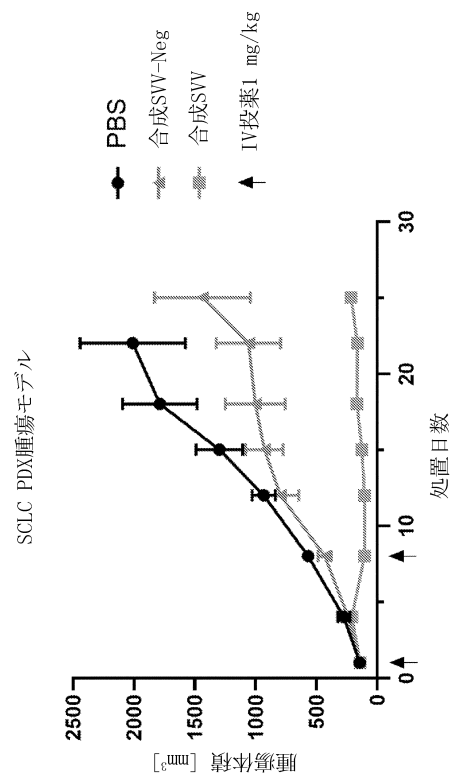
【図 4 6 A】



【図 4 6 B】



【図 4 7 A】



10

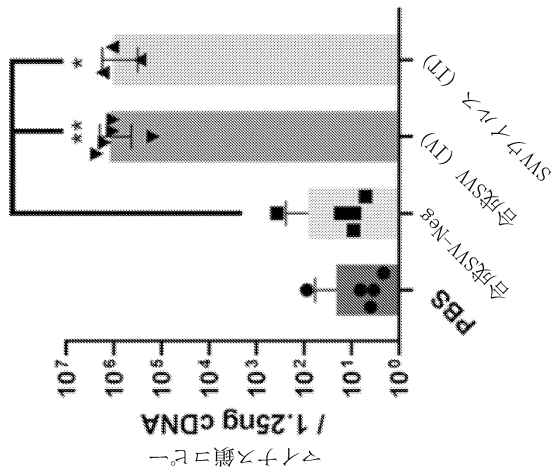
20

30

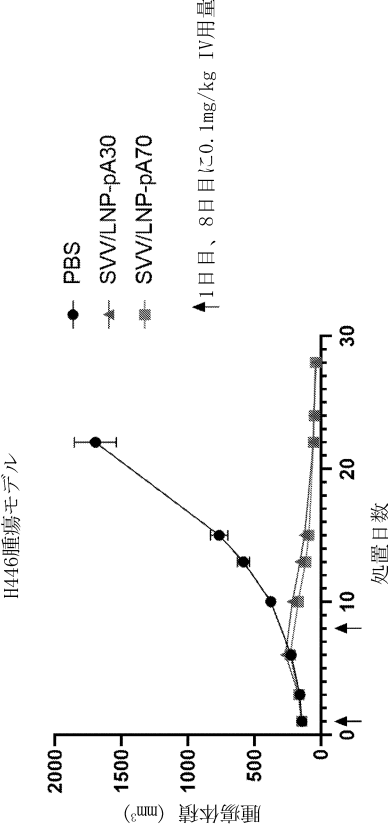
40

50

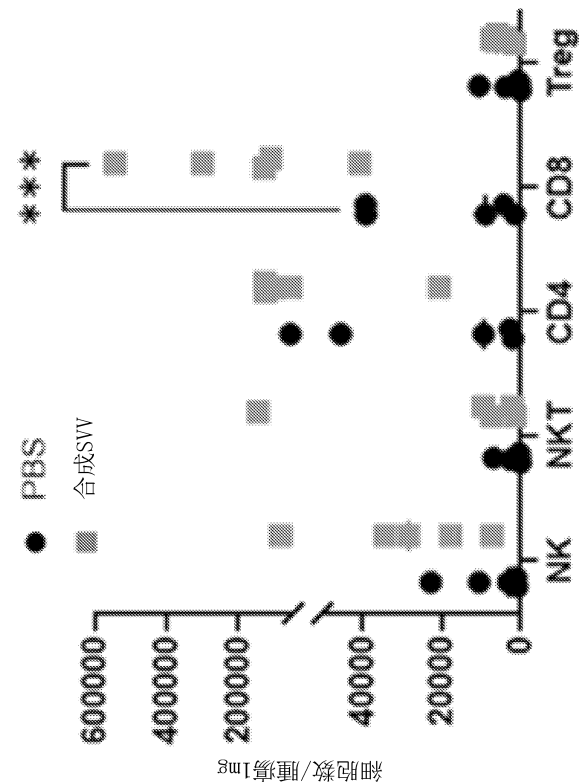
【図 4 7 B】



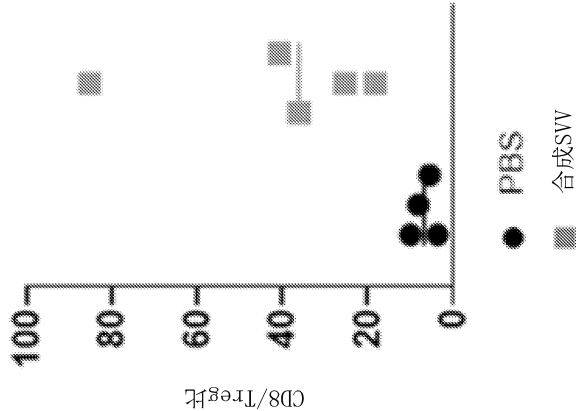
【図 4 8】



【図 4 9 A】



【図 4 9 B】



10

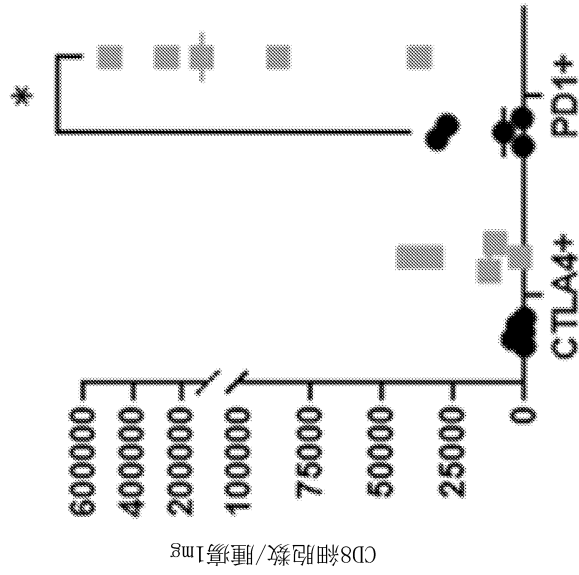
20

30

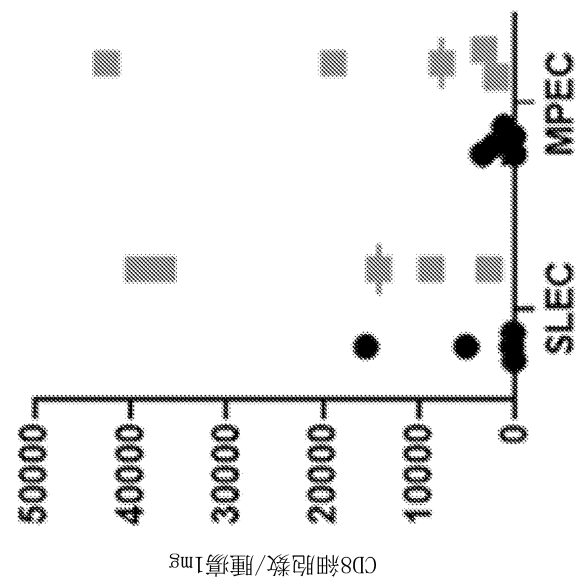
40

50

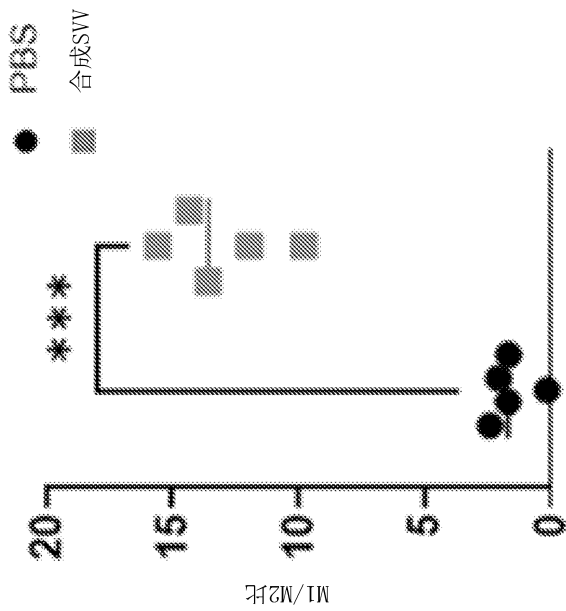
【図 4 9 C】



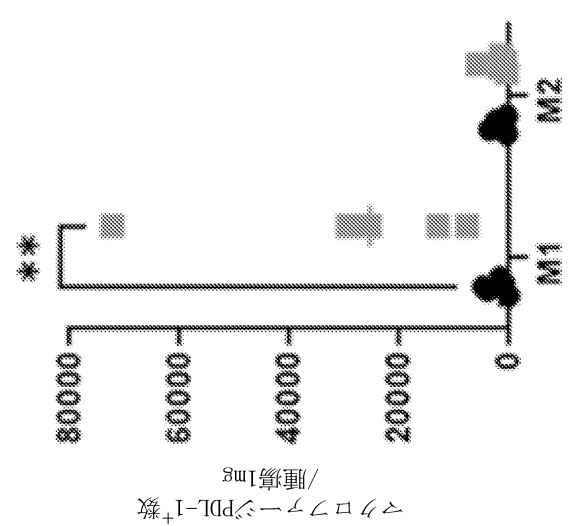
【図 4 9 D】



【図 4 9 E】



【図 4 9 F】



10

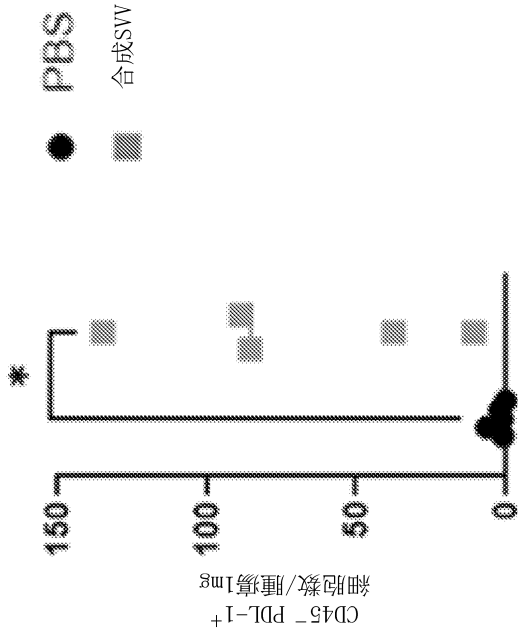
20

30

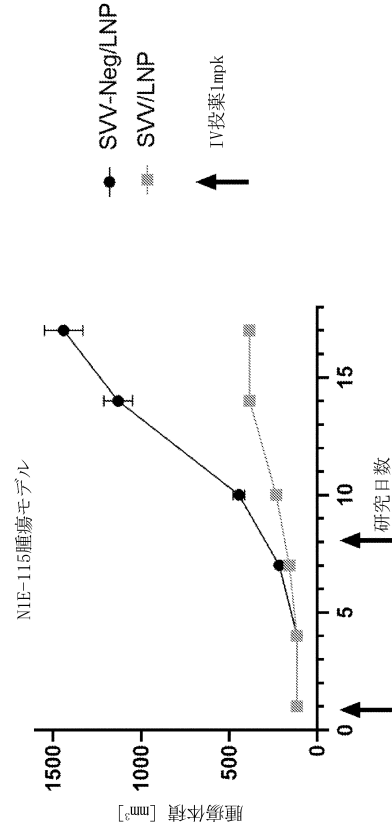
40

50

【図 4 9 G】



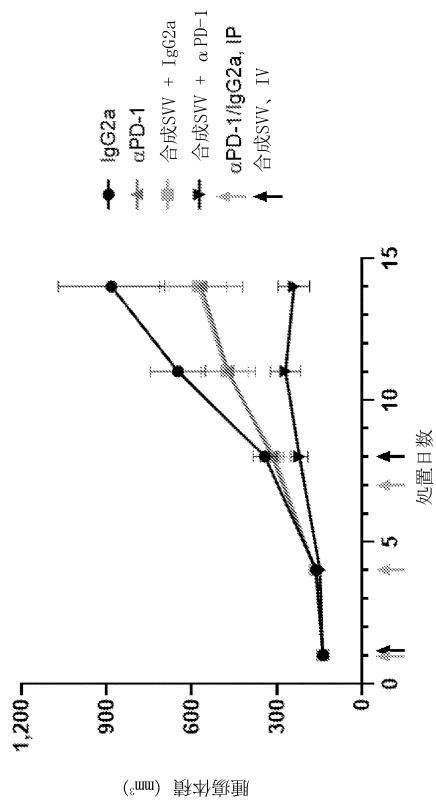
【図 5 0】



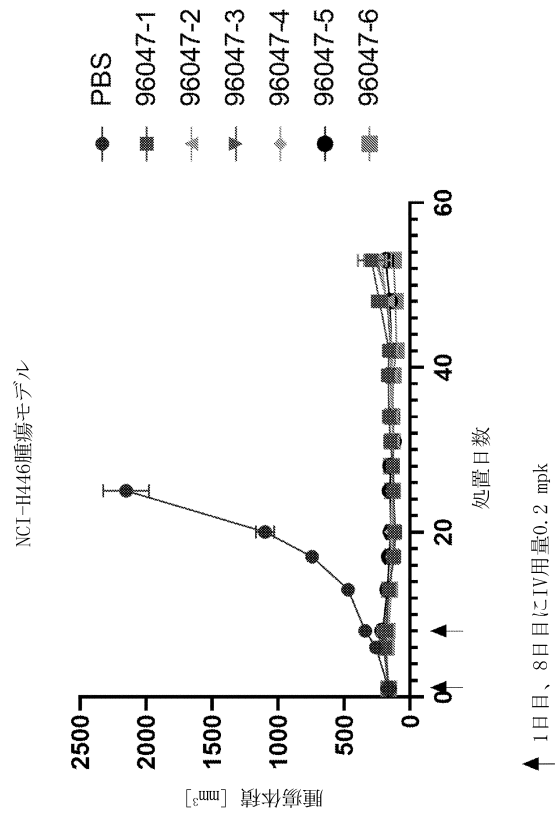
10

20

【図 5 1】



【図 5 2 A】

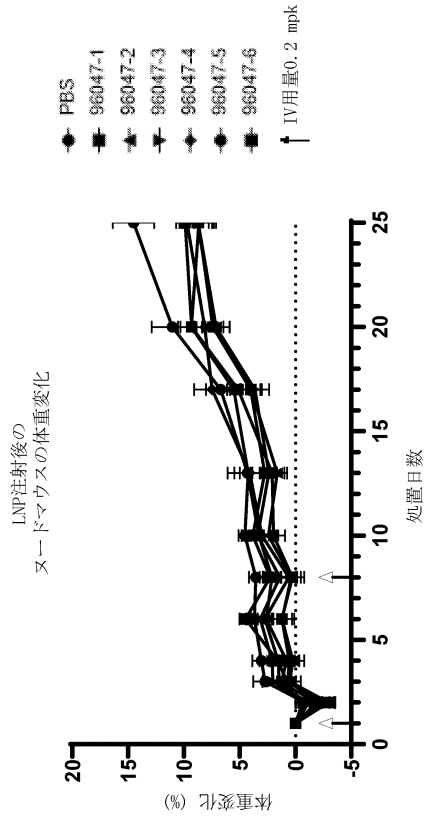


30

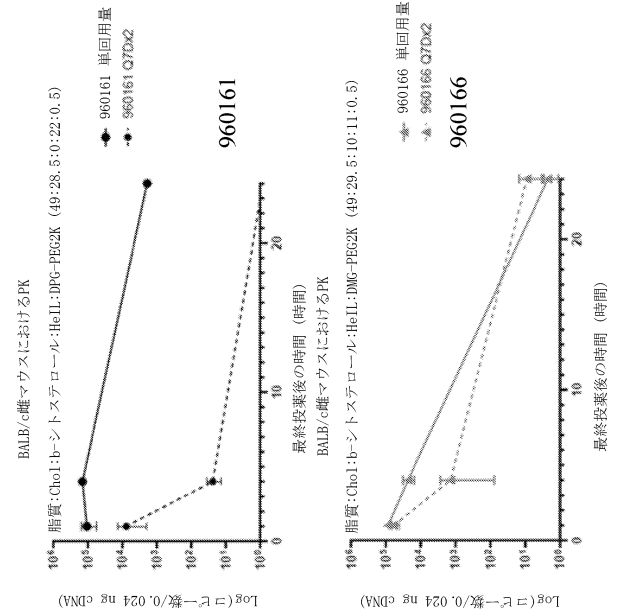
40

50

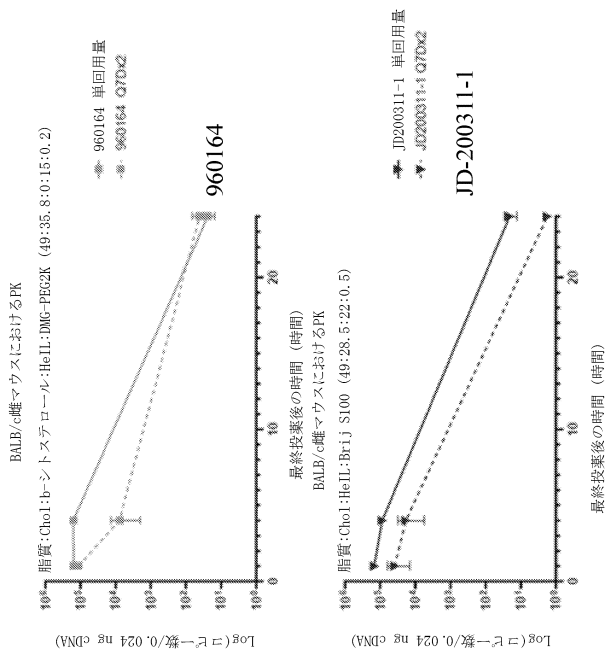
【図 5 2 B】



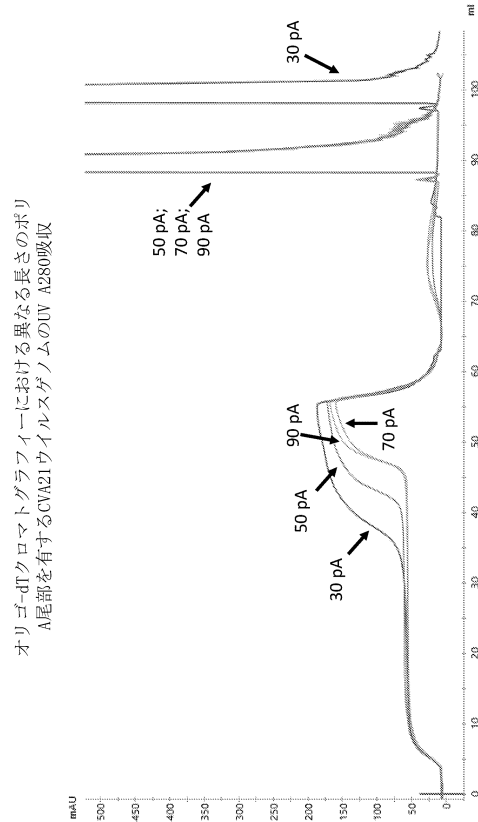
【図 5 3 A】



【図 5 3 B】



【図 5 4 A】



10

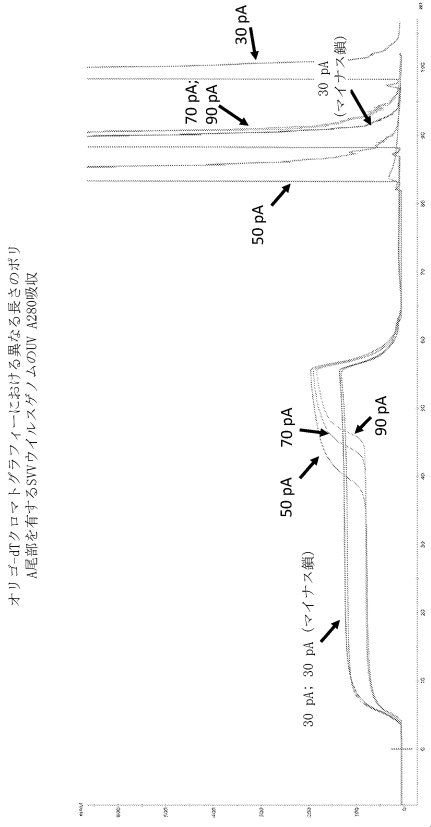
20

30

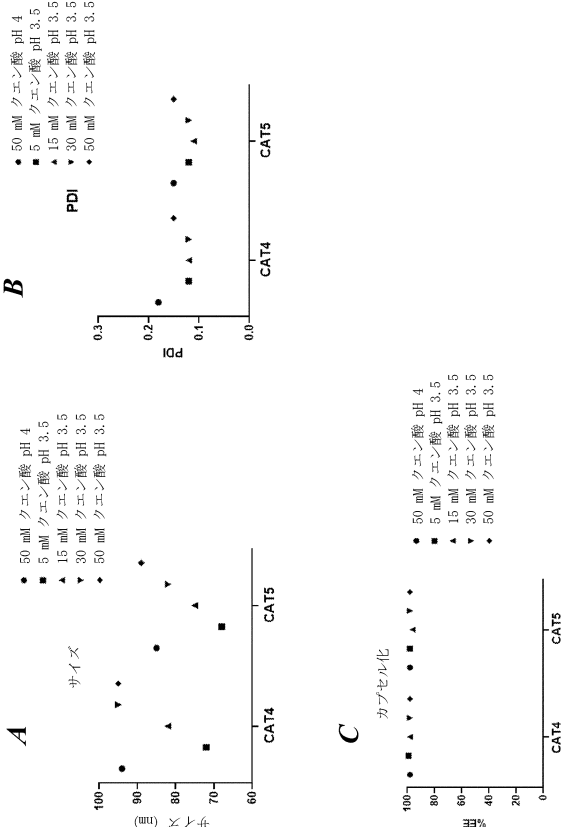
40

50

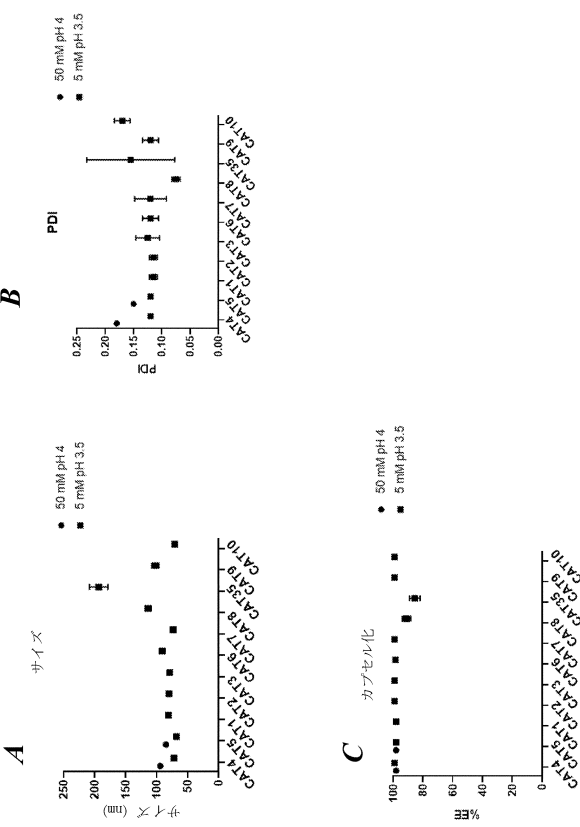
【図 5 4 B】



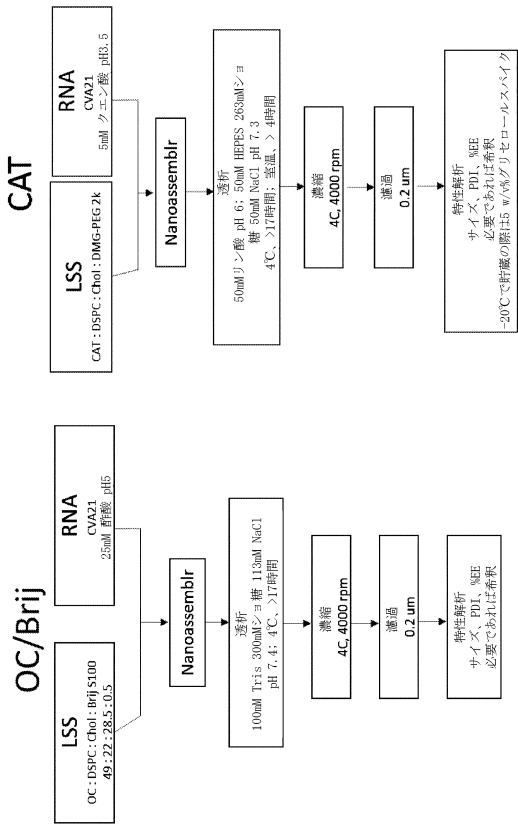
【図 5 5】



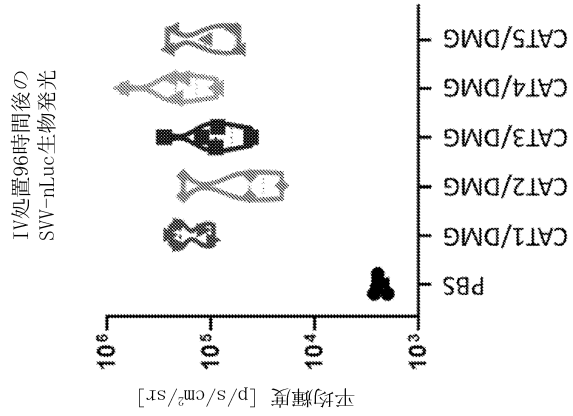
【図 5 6】



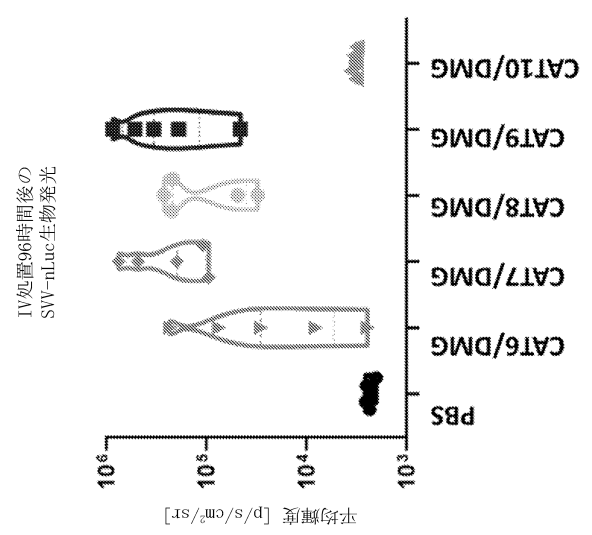
【図 5 7】



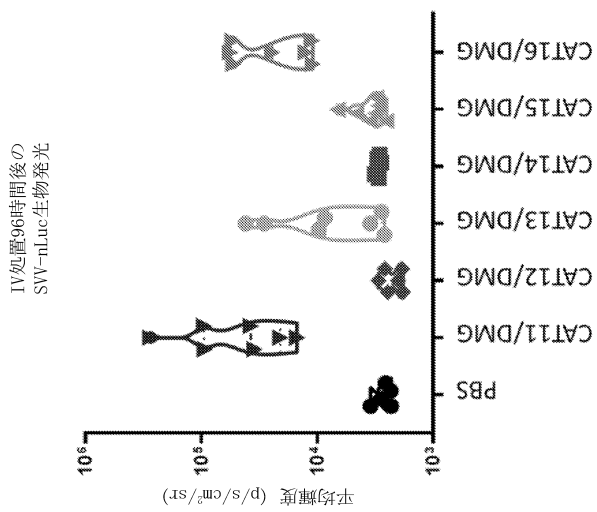
【図 5 8 A】



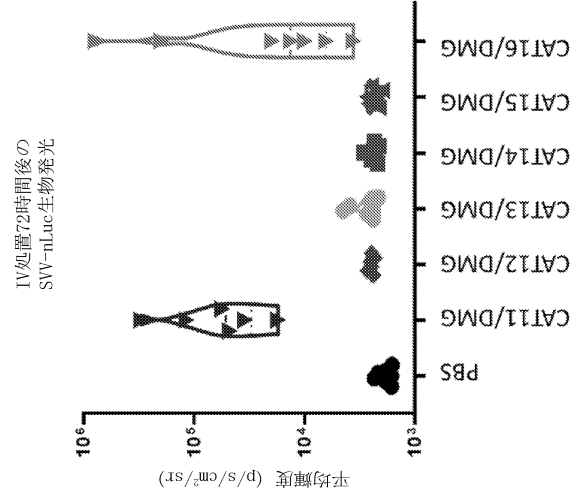
【図 5 8 B】



【図 5 8 C】



【図 5 8 D】



10

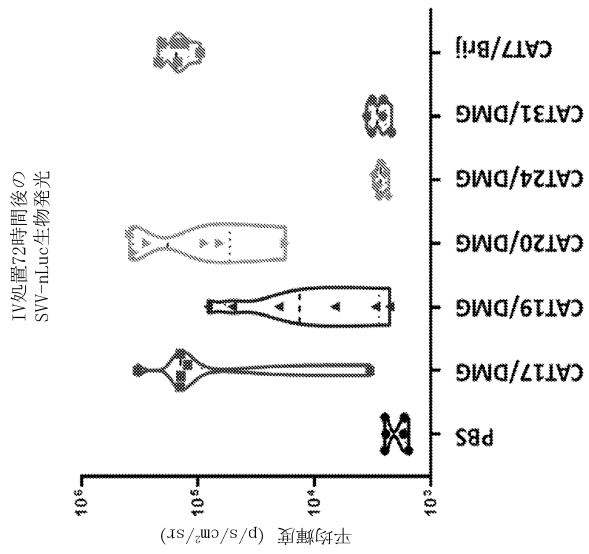
20

30

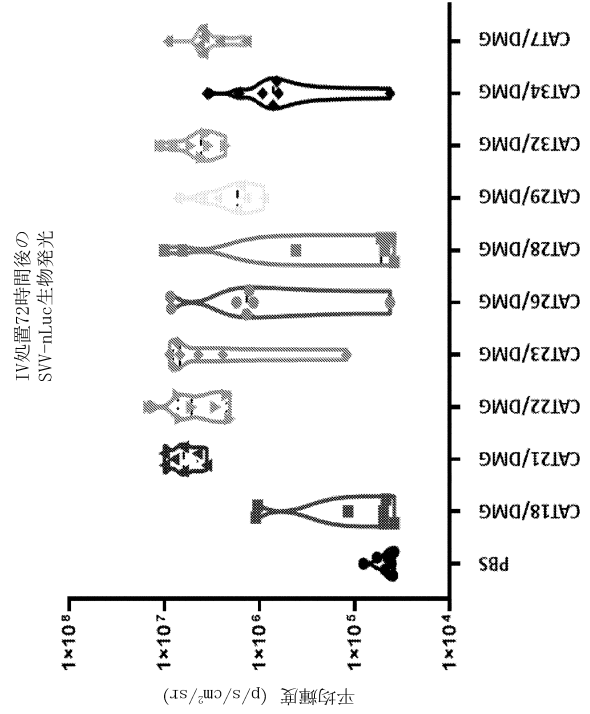
40

50

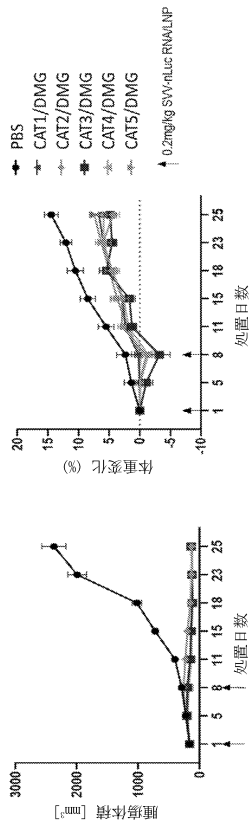
【図 5 8 E】



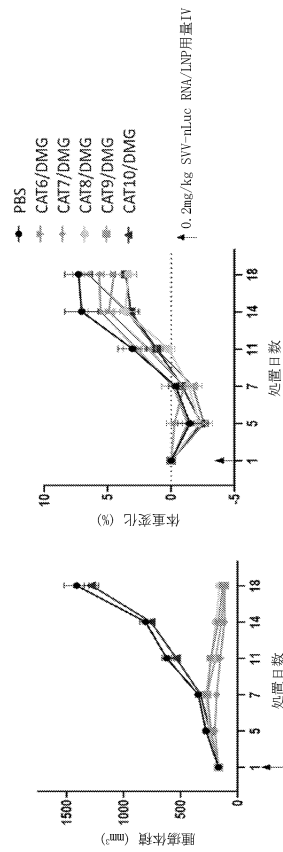
【図 5 8 F】



【図 5 9 A】



【図 5 9 B】



10

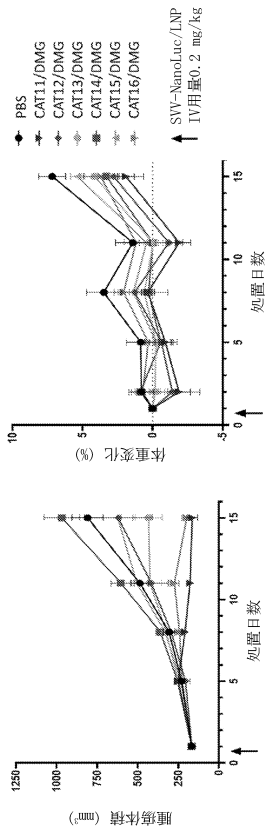
20

30

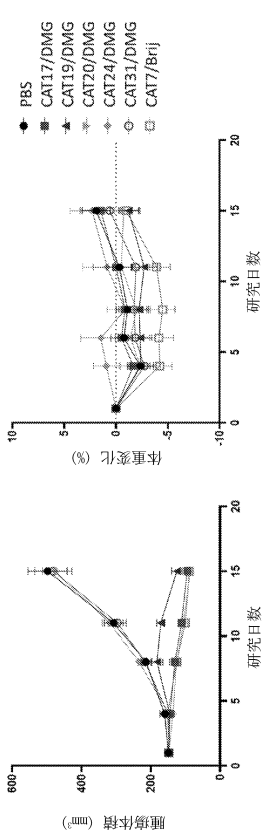
40

50

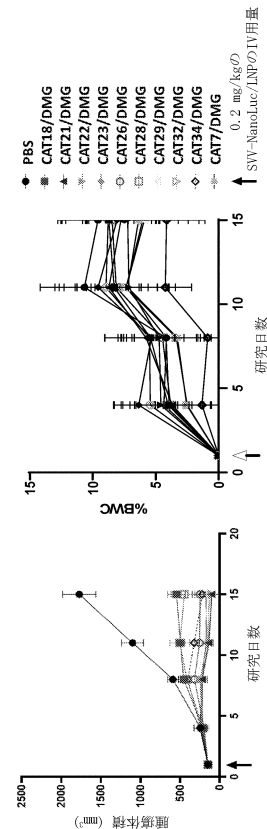
【図 5 9 C】



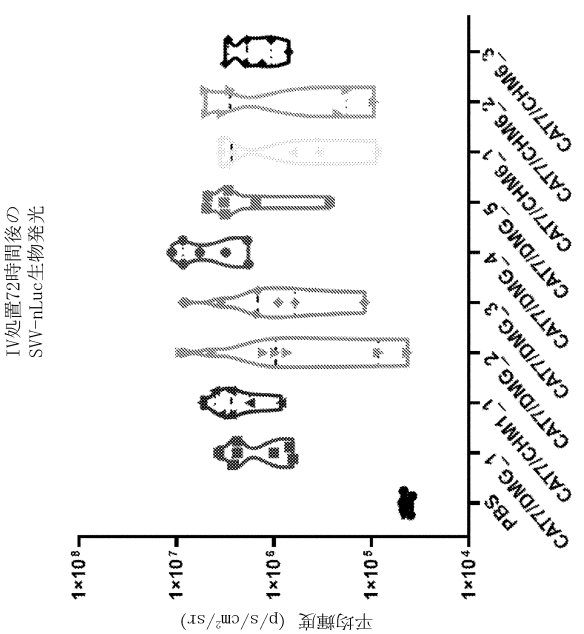
【図 5 9 D】



【図 5 9 E】



【図 6 0 A】



10

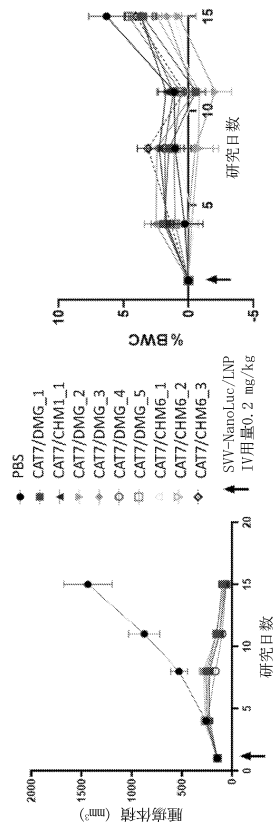
20

30

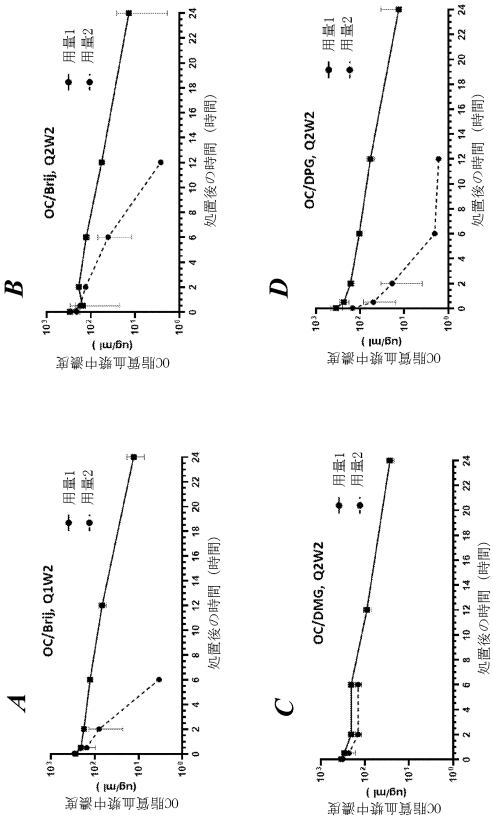
40

50

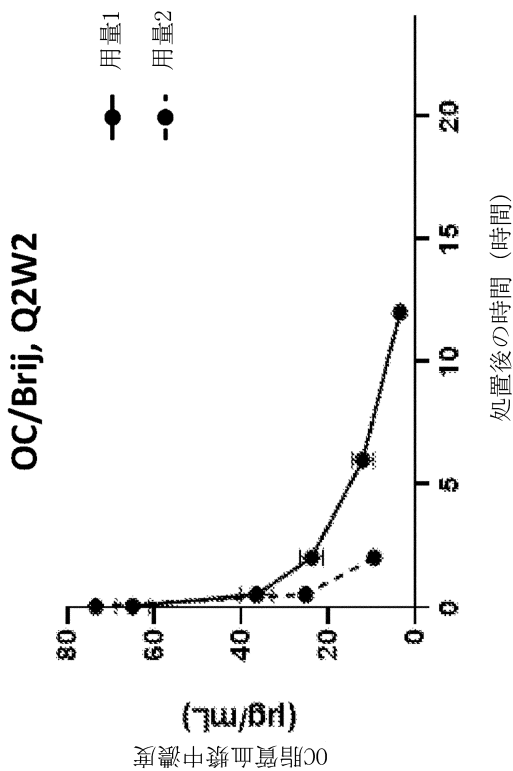
【図 6 0 B】



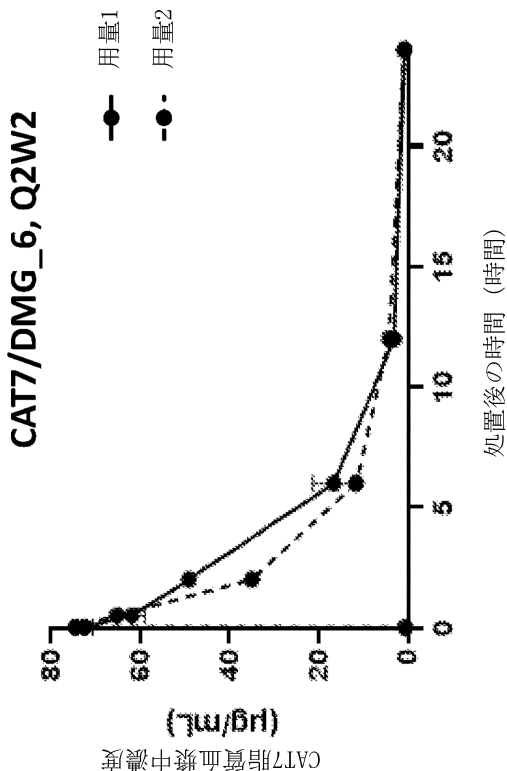
【図 6 1】



【図 6 2 A】



【図 6 2 B】



10

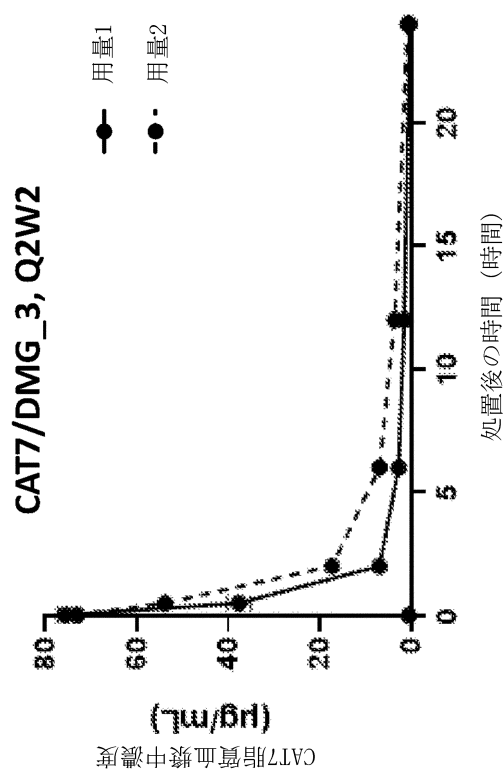
20

30

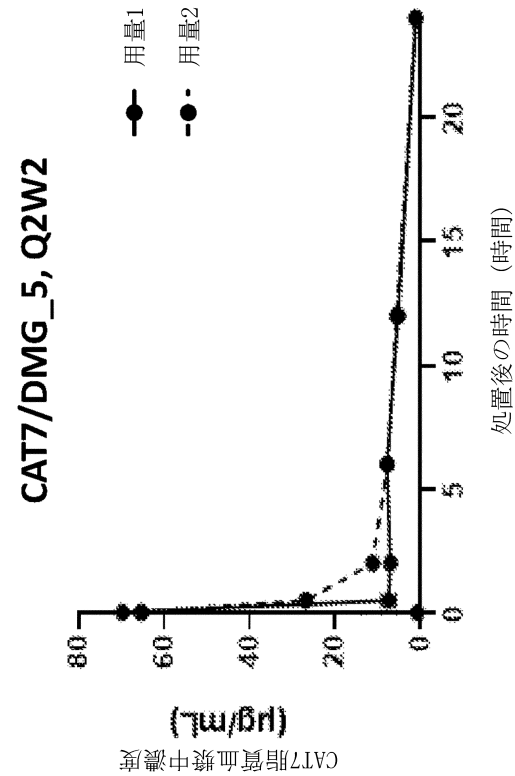
40

50

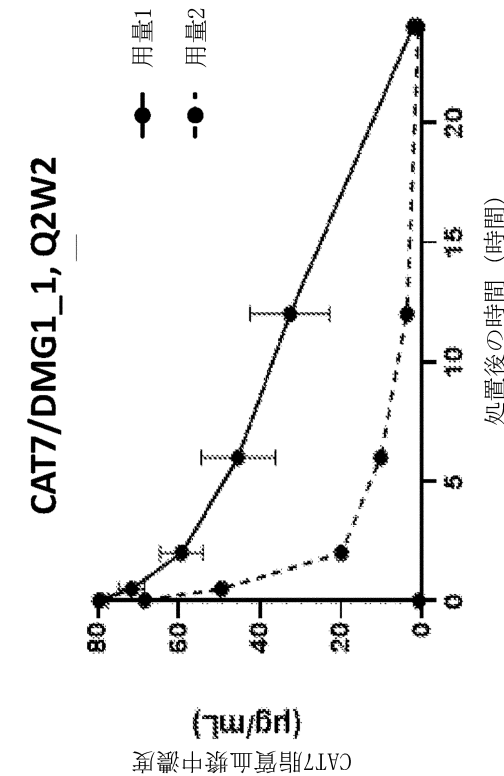
【図 6 2 C】



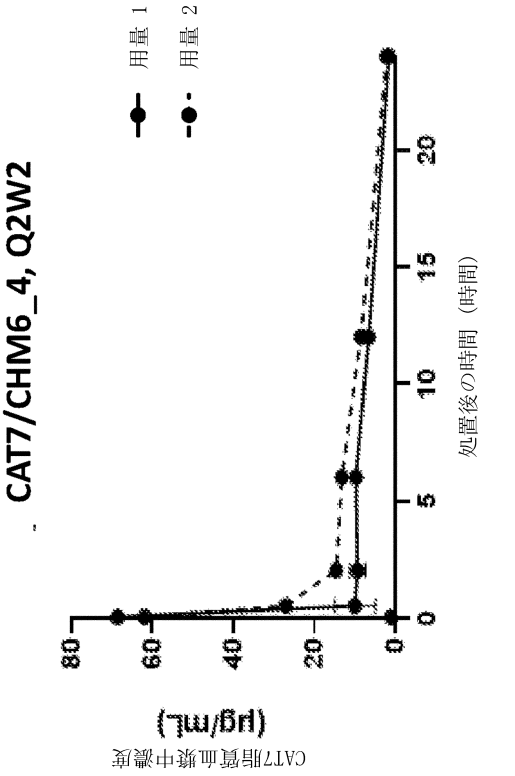
【図 6 2 D】



【図 6 2 E】



【図 6 2 F】



10

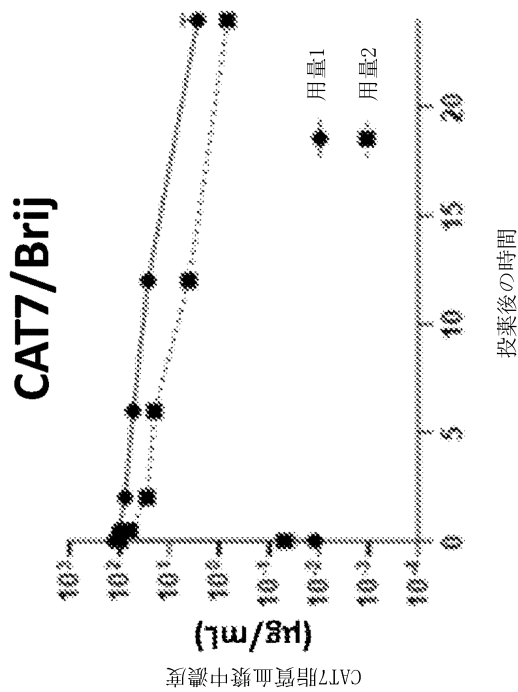
20

30

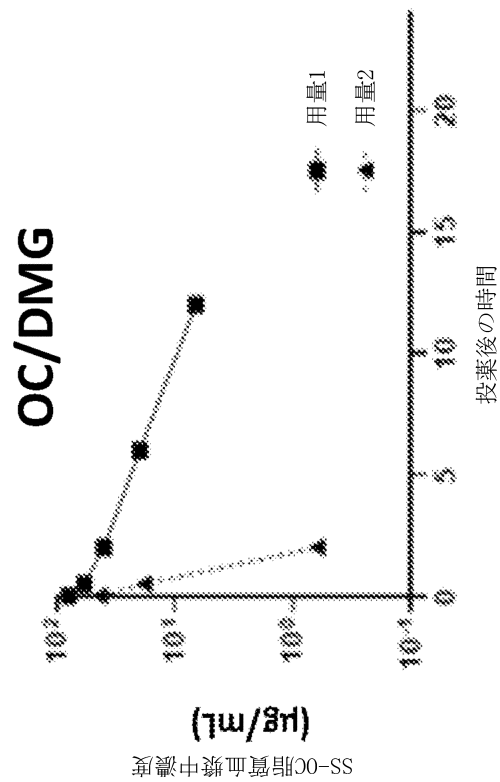
40

50

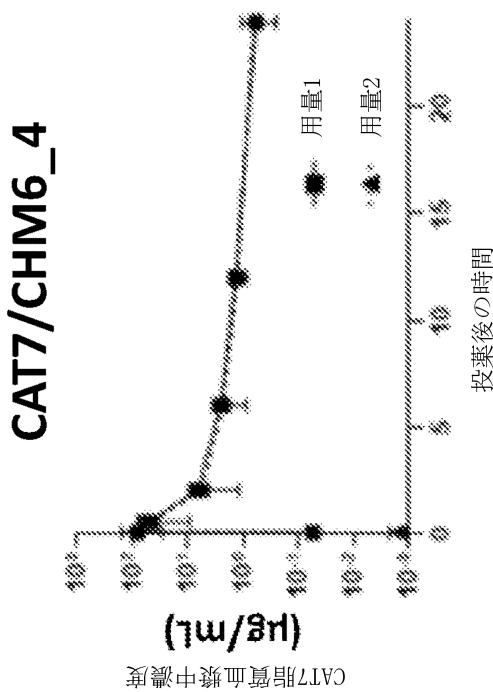
【図 6 3 A】



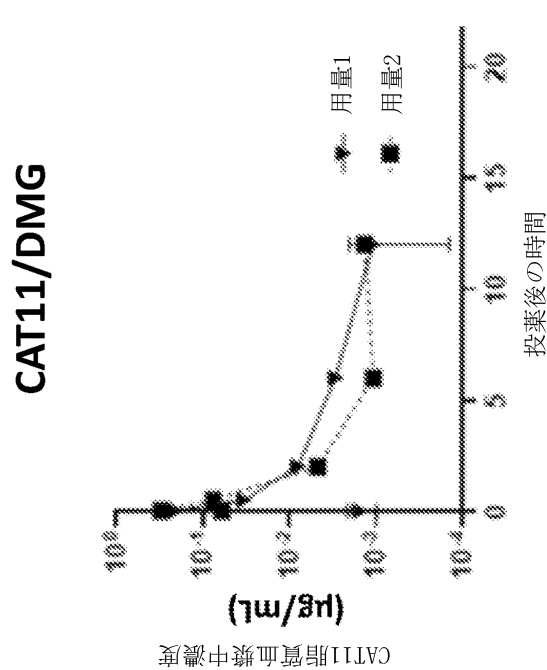
【図 6 3 B】



【図 6 3 C】



【図 6 3 D】



10

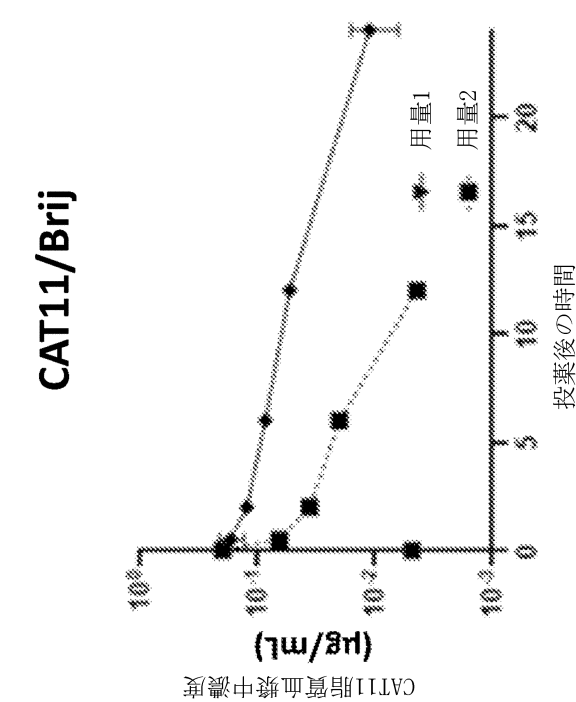
20

30

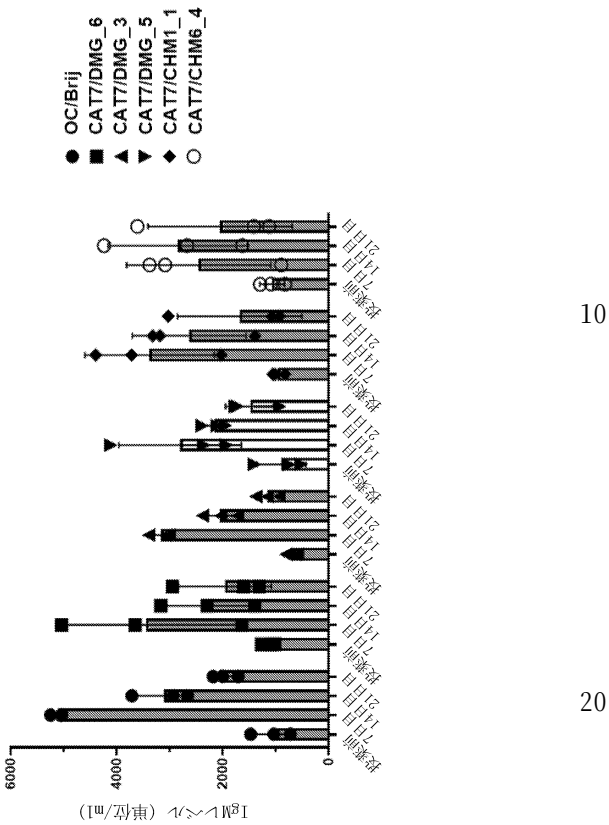
40

50

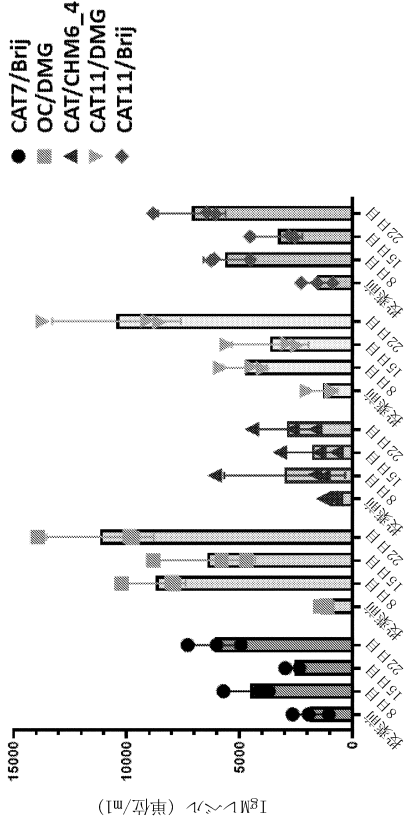
【図 6 3 E】



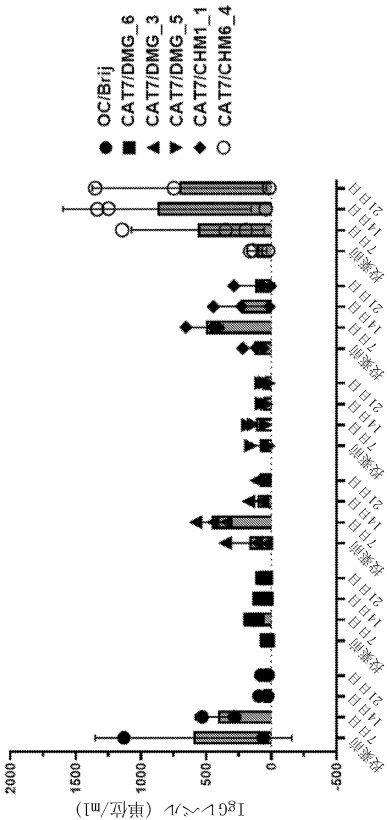
【図 6 4 A】



【図 6 4 B】



【図 6 5 A】



10

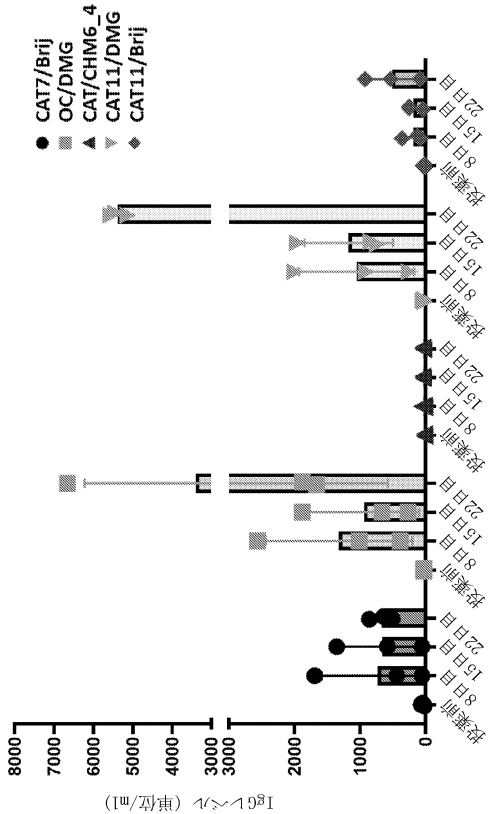
20

30

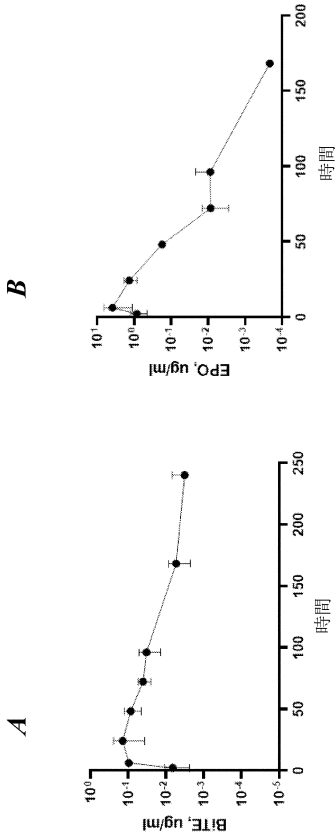
40

50

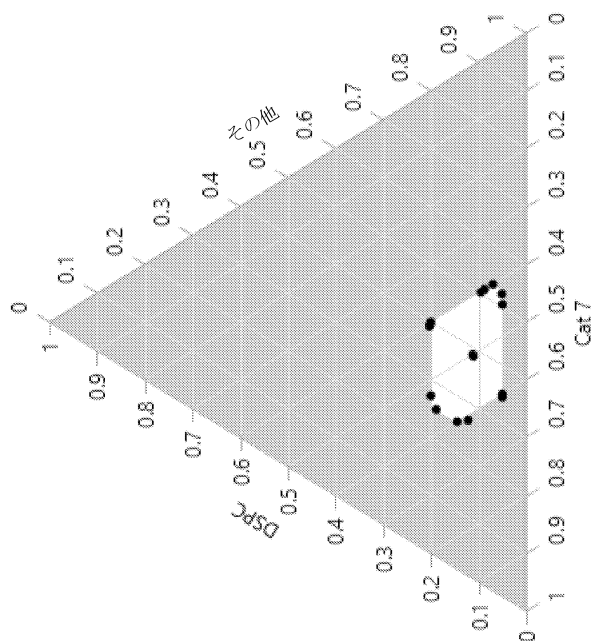
【図 6 5 B】



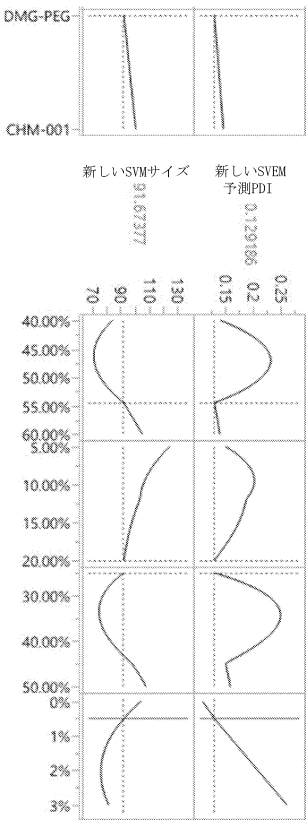
【図 6 6】



【図 6 7】



【図 6 8】



10

20

30

40

50

【配列表】
2024503623000001.app

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 22/11450

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC - A61K 35/76, A61K 35/768, C12N 15/85 (2022.01)

CPC - C12N 7/00, A61K 35/768, A61K 9/127, C12N 15/85, C12N 15/88, C12N 2770/32343

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

See Search History document

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

See Search History document

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

See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — Y	US 2008/0160031 A1 (SHAFREN) 03 July 2008 (03.07.2008) Claim 27, para [0108], [0117], [0128], [0152].	1, 109 ----- 2, 4-6, 7/(1-2, 4-6), 53, 54/53, 58/53, 60, (61-62)/60, 110, 112-114, 115/(109-110, 112-114)
Y	GenBank accession number KY284011.1, Coxsackievirus A21 isolate 16SF042, complete sequence. 15 March 2017 [online]. [Retrieved on 21 March 2022]. Retrieved from the internet: <URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KY284011.1> pg 2-4	2, 4-6, 7/(1-2, 4-6), 110, 112-114, 115/(109-110, 112-114)
Y	US 2018/0147298 A1 (MODERNATX, INC.) 31 May 2018 (31.05.2018) Claim 1, Claim 2, Claim 7, para [0072], [0073], [0074], [0075], [0076], [0079]	53, 54/53, 58/53, 60, (61-62)/60
Y	GenBank accession number AF465515.1, Human coxsackievirus A21 strain Kuykendall, complete genome. 23 October 2003 [online]. [Retrieved on 08 May 2022]. Retrieved from the internet: <URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AF465515.1> pg 2-3	7/(1-2, 46), 115/(109-110, 112-114)

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

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"D" document cited by the applicant in the international application

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

09 May 2022

Date of mailing of the international search report

MAY 23 2022

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer

Kari Rodriguez

Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 22/11450

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

International application No.

PCT/US 22/11450

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 11-51, 55-57, 63-108, 116, 118-139, 141-142, 144-214, 219-221
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

- see extra sheet for Box No. III Observations where unity of invention is lacking -

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-2, 4-6, 7/(1-2, 4-6), 53, 54/53, 58/53, 60, (61-62)/60, 109-110, 112-114, 115/(109-110, 112-114) limited to SEQ ID NOs: 5-8

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 22/11450

Continuation of:

Box No. III. Observations where unity of invention is lacking

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

Groups I+: Claims 1-7, 53, 54/53, 58/53, 60, (61-62)/60, 109-115, drawn to a lipid nanoparticle (LNP) comprising a synthetic RNA viral genome encoding an oncolytic Coxsackievirus virus, CAV21 strain. The composition will be searched to the extent that the CAV21 polynucleotides encompass SEQ ID NOs: 5-8. It is believed that claims 1-2, 4-7, 53, 54/53, (61-62)/60, 109-110, 112-115, encompass this first named invention, and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass SEQ ID NOs: 5-8. Additional CAV21 polynucleotides will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected CAV21 polynucleotides. Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched. An exemplary election would be the CAV21 polynucleotides of SEQ ID NOs: 9-12 (Claims 1, 3-7, 53, 54/53, (61-62)/60, 109, 111-115).

Group II: claims 8-10, 52, 54/52, 58/52, 59, (61-62)/59, 117, drawn to a lipid nanoparticle (LNP) comprising a synthetic RNA viral genome encoding an oncolytic Seneca Valley Virus (SVV).

Group III: claims 140, 143, drawn to a recombinant DNA template comprising from 5' to 3', a promoter sequence, a 5' junctional cleavage sequence, a polynucleotide sequence encoding an RNA molecule comprising a synthetic RNA viral genome, a poly-A tail, and a 3' junctional cleavage sequence.

Group IV: claims 215-218, 222-225, drawn to a method of treating a cancer in a subject in need thereof

The inventions listed as Groups I+ through IV do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special Technical Features

Groups I+, II and III include the special technical feature of a composition which differs from the special technical feature of a method, as disclosed by Group V.

Groups I+ include the special technical feature of a synthetic RNA viral genome encoding an oncolytic Coxsackievirus virus, not required by Group II.

Group II includes the special technical feature of a synthetic RNA viral genome encoding an oncolytic Seneca Valley Virus, not required by Groups I+.

Groups I+ and II include the special technical feature of a LNP, not required by Group III.

Group III includes the special technical feature of junctional cleavage sequences, not required by Groups I+ and II.

No technical features are shared between the polynucleotide sequences of Groups I+ and, accordingly, these groups lack unity a priori.

Common Technical Features

The inventions of Groups I+, II and III share the technical feature of a polynucleotide sequence encoding an RNA molecule.

The inventions of Groups I+ and II and share the technical feature of a LNP.

However, these shared technical features do not represent a contribution over prior art in view of US 2008/0160031 A1 (Shafren).

Shafren teaches a lipid nanoparticle (LNP) comprising a synthetic RNA viral genome (Claim 27, A pharmaceutical composition comprising a nucleic acid molecule comprising an isolated viral polynucleotide sequence derived from a Picornavirus together with a pharmaceutically acceptable vehicle, diluent or carrier.; para [0108], the sequence may be viral RNA directly isolated from the Picornavirus, synthetic RNA, cDNA corresponding to the isolated sequence.; [0117], Synthetic lipid vesicles (liposomes) facilitate the delivery of various molecules, including nucleic acids across the cell membrane.) encoding an oncolytic Coxsackievirus virus, wherein the Coxsackievirus is a CVA21 strain selected from the Kuykendall strain, the EF strain and the KY strain (para [0152], Coxsackievirus A21 (CVA21) prototype strain, Kuykendall.).

----continued on next sheet----

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 22/11450

Continuation of:

Box No. III. Observations where unity of invention is lacking

The inventions of Groups I+ and II share the technical feature of a LNP comprising a cationic lipid, a helper lipid, a structural lipid, and a PEG-lipid, wherein the PEG-lipid is a compound of Formula (A").

However, these shared technical features do not represent a contribution over prior art in view of US 2018/0147298 A1 to ModernaTX, Inc. (hereinafter "ModernaTX").

ModernaTX teaches (instant claim 53) a lipid nanoparticle (LNP), comprising:

b. a cationic lipid, a helper lipid, a structural lipid, and a PEG-lipid (Claim 1, A lipid nanoparticle (LNP) comprising a therapeutic agent, a fast diffusing PEG-lipid, an ionizable lipid, and a helper lipid.; Claim 7, wherein the LNP further comprises a structural lipid.), wherein the PEG-lipid is a compound of Formula (A"), or a pharmaceutically acceptable salt thereof, wherein:

n is an integer between 10 to 200, inclusive of all endpoints;

LP" is a bond, -[(CH₂)(0-3)-C(O)O](1-3)-, -(CH₂)(0-3)-C(O)O-(CH₂)(1-3)-OC(O)-, or C(O)N(H)-;

RP" is C5-C25 alkyl or C5-C25 alkenyl; and

RP2" is hydrogen or -CH₃ (Claim 2, wherein the fast diffusing PEG-lipid is a hydroxy-PEGylated lipid.; para [0072], a PEG lipid.....Formula (V).; [0075], r is an integer between 1 and 100, inclusive.; [0079] Cmpd400), and

wherein the LNP has a molar ratio of about 0.001% to about 5% PEG-lipid (Claim 7, wherein the LNP further comprises a structural lipid and comprises a molar ratio of about 20-60% ionizable lipid: 5-25% helper lipid: 25-55% structural lipid; and 0.5-15% fast diffusing PEG-lipid.).

As said technical features were known in the art at the time of the invention, these cannot be considered special technical features that would otherwise unify the groups.

Groups I+ through IV therefore lack unity under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

Item 4 (continued):

Claims 11-51, 55-57, 63-108, 116, 118-138, 141-142, 144-214, 219-221 are improper multiple dependent claims because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00	
A 6 1 K	31/7105(2006.01)	A 6 1 K	31/7105	
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 K	9/14 (2006.01)	A 6 1 K	9/14	
A 6 1 K	9/51 (2006.01)	A 6 1 K	9/51	
A 6 1 K	47/22 (2006.01)	A 6 1 K	47/22	
A 6 1 K	47/18 (2017.01)	A 6 1 K	47/18	
A 6 1 K	47/24 (2006.01)	A 6 1 K	47/24	
A 6 1 K	47/28 (2006.01)	A 6 1 K	47/28	
A 6 1 K	47/34 (2017.01)	A 6 1 K	47/34	
A 6 1 K	31/711(2006.01)	A 6 1 K	31/711	
A 6 1 K	9/127(2006.01)	A 6 1 K	9/127	
A 6 1 K	47/46 (2006.01)	A 6 1 K	47/46	
A 6 1 K	47/02 (2006.01)	A 6 1 K	47/02	
A 6 1 K	47/04 (2006.01)	A 6 1 K	47/04	
C 1 2 N	15/52 (2006.01)	C 1 2 N	15/52	Z
C 1 2 N	15/12 (2006.01)	C 1 2 N	15/12	
C 1 2 N	15/113 (2010.01)	C 1 2 N	15/113	Z

(32)優先日 令和3年4月29日(2021.4.29)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 63/181,899

(32)優先日 令和3年4月29日(2021.4.29)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 63/181,917

(32)優先日 令和3年4月29日(2021.4.29)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

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

(72)発明者 ラーナー, ロレーナ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02139, ケンブリッジ, ハンプシャー ストリート 50, スイート 401, オンコラス, インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 ケネディ, エドワード エム.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02139, ケンブリッジ, ハンプシャー ストリート 50, スイート 401, オンコラス, インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 クエバ, クリストフ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02139, ケンブリッジ, ハンプシャー ストリート 50, スイート 401, オンコラス, インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 デターリング, ジェシカ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02139, ケンブリッジ, ハンプシャー ストリート 50, スイート 401, オンコラス, インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 ブライアント, ジェフリー デイビッド

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02139, ケンブリッジ, ハンプシャー ストリート 50, スイート 401, オンコラス, インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 フー, チーイン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02139, ケンブリッジ, ハンプシャー ストリート 50, スイート 401, オンコラス, インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 チーマ, トゥーバ エー.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02139, ケンブリッジ, ハンプシャー ストリート 50, スイート 401, オンコラス, インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 エセックス, ショーン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02139, ケンブリッジ, ハンプシャー ストリート 50, スイート 401, オンコラス, インコーポレイテッド 気付

F ターム (参考) 4C076 AA29 AA67 AA95 BB13 BB21 BB25 CC27 DD21 DD29 DD60
DD63 DD70 EE23 FF31 FF63

4C084 AA13 AA19 MA43 MA56 MA59 MA65 MA70 NA05 NA14 ZB261
ZB262 ZC752

4C085 AA14 BB01 CC23 EE01 EE03

4C086 AA01 AA02 FA06 MA03 MA05 MA43 MA56 MA59 MA66 NA13
ZB26

4C087 AA01 AA02 AA03 BC83 CA09 CA12 MA56 MA59 MA66 NA14
ZB26