(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2024-521444
(P2024-521444A)
(43)公表日　令和6年5月31日(2024.5.31)

| (51)国際特許分類 | | FI | | | テーマコード（参考） |
|---|---|---|---|---|---|
| *Ｃ１２Ｎ* | *15/11 (2006.01)* | Ｃ１２Ｎ | 15/11 | Ｚ ＺＮＡ | ４Ｂ０６５ |
| *Ｃ１２Ｎ* | *5/10 (2006.01)* | Ｃ１２Ｎ | 5/10 | | ４Ｃ０７６ |
| *Ｃ１２Ｎ* | *15/10 (2006.01)* | Ｃ１２Ｎ | 15/10 | １１０Ｚ | ４Ｃ０８４ |
| *Ａ６１Ｋ* | *9/14 (2006.01)* | Ｃ１２Ｎ | 15/10 | １２０Ｚ | ４Ｃ０８６ |
| *Ａ６１Ｋ* | *9/127(2006.01)* | Ａ６１Ｋ | 9/14 | | |

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全713頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2023-576064(P2023-576064)
(86)(22)出願日　令和4年6月10日(2022.6.10)
(85)翻訳文提出日　令和5年12月7日(2023.12.7)
(86)国際出願番号　PCT/US2022/033091
(87)国際公開番号　WO2022/261490
(87)国際公開日　令和4年12月15日(2022.12.15)
(31)優先権主張番号　63/209,271
(32)優先日　令和3年6月10日(2021.6.10)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/311,923
(32)優先日　令和4年2月18日(2022.2.18)
(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
最終頁に続く

(71)出願人　523462608
オーナ セラピューティクス， インコーポレイテッド
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２４７２， ウォータータウン， フォージ ロード ５００
(74)代理人　100078282
弁理士　山本 秀策
(74)代理人　100113413
弁理士　森下 夏樹
(74)代理人　100181674
弁理士　飯田 貴敏
(74)代理人　100181641
弁理士　石川 大輔
(74)代理人　230113332
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　環状ＲＮＡ組成物及び方法

(57)【要約】
環状ＲＮＡが、関連する組成物及び方法とともに本明細書に記載される。いくつかの実施形態では、本発明の環状ＲＮＡは、グループＩイントロン断片、スペーサー、ＩＲＥＳ、二重鎖形成領域、及び発現配列を含む。いくつかの実施形態では、発現配列は、抗原をコードする。いくつかの実施形態では、本発明の環状ＲＮＡは、直鎖状ＲＮＡと比較した場合に、改善された発現、機能安定性、免疫原性、製造容易性、及び／または半減期を有する。いくつかの実施形態では、本発明の方法及び構築物は、既存のＲＮＡ環状化アプローチと比較した場合に、改善された環状化効率、スプライシング効率及び／または純度をもたらす。
【選択図】図８８

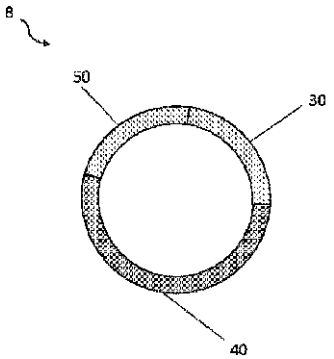


FIG. 88

【特許請求の範囲】
【請求項１】
ＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチドであって、以下の順序で、
ａ．５’増強イントロン要素と、
ｂ．５’増強エクソン要素と、
ｃ．コア機能要素と、
ｄ．３’増強エクソン要素と、
ｅ．３’増強イントロン要素と、を含み、
前記コア機能要素が、以下の順序で、
ｉ．翻訳開始要素（ＴＩＥ）と、
ｉｉ．コード要素と、
ｉｉｉ．任意に、終止コドンまたは終止カセットと、を含む、前記ＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。
【請求項２】
ＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチドであって、以下の順序で、
ａ．５’増強イントロン要素と、
ｂ．５’増強エクソン要素と、
ｃ．コア機能要素と、
ｄ．３’増強エクソン要素と、
ｅ．３’増強イントロン要素と、を含み、
前記コア機能要素が、以下の順序で、
ｉ．コード領域と、
ｉｉ．任意に、終止コドンまたは終止カセットと、
ｉｉｉ．翻訳開始要素（ＴＩＥ）と、を含む、前記ＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。
【請求項３】
ＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチドであって、以下の順序で、
ａ．５’増強イントロン要素と、
ｂ．５’増強エクソン要素と、
ｃ．コア機能要素と、
ｄ．３’増強エクソン要素と、
ｅ．３’増強イントロン要素と、を含み、
前記コア機能要素が、非コード要素を含む、前記ＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。
【請求項４】
前記ＴＩＥが、非翻訳領域（ＵＴＲ）もしくはその断片、アプタマー複合体もしくはその断片、またはそれらの組み合わせを含む、請求項１または２に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。
【請求項５】
前記ＵＴＲまたはその断片が、ウイルスまたは真核生物メッセンジャーＲＮＡに由来する、請求項４に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。
【請求項６】
前記ＵＴＲまたはその断片が、ウイルス配列内リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ）または真核生物ＩＲＥＳを含む、請求項５に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。
【請求項７】
前記コア機能要素が、２つ以上の配列内リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ）を含む、請求項１または２に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。
【請求項８】
前記コア機能要素が、ＴＩＥ、コード要素、終結配列、任意にスペーサー、ＴＩＥ、コード配列、及び終結配列を含み、前記ＴＩＥが、ＩＲＥＳを含む、請求項７に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。
【請求項９】

前記ＩＲＥＳが、配列番号１～２９８３及び３２８２～３２８７から選択される配列、またはその断片を含む、請求項６～８のいずれか１項に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。

【請求項１０】

前記ＩＲＥＳが、配列番号７５、７７、１３７、５３２、５６６、５８２、６４８、６８０、６９３、７５２、７８５、７８７、７９１、７９３、８２０、８２３、８３９、８４０、８４３、８５２、８５７、８６１、８６２、８６３、８６４、８７１、８７４、８７６、９２２、９５９、９８３、９８４、１０１５、１０１７、１０２３、１０２６、１０３１、１０４１、１０４７、１０５９、１０６８、１１３４、１１６８、１１６９、１１７１、１１７７、１１７８、１１７９、１１８０、１１８９、１１９２、１１９３、１１９８、１２１６、１２１８、１２３０、１２６３、１２７６、１２８０、１２８２、１２８４、１２８７、１３４６、１３５４、１３６４、１３６７、１３７０、１４３２、１４３８、１４４０、２２８５、２４６５、２６０１、２６１５、２６１６、２６１７、２６１８、２６２７、２６６７、２６８１、２７４２、２７４６、２７５８、２７７７、２７７８、３２８２、３２８３、３２８６、及び３２８７から選択される配列、またはその断片を含む、請求項６～９のいずれか１項に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。

【請求項１１】

前記ＩＲＥＳが、野生型ウイルスＩＲＥＳまたは真核生物ＩＲＥＳと比較して、１つ以上の修飾ヌクレオチドを含む、請求項６～８のいずれか１項に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。

【請求項１２】

前記ＩＲＥＳが、細胞内で、前記ＲＮＡ前駆体によってコードされるタンパク質の発現を促進することができる、請求項６～１１のいずれか１項に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。

【請求項１３】

前記ＩＲＥＳが、前記タンパク質の発現レベルが、対照ＩＲＥＳが使用される場合と同等またはそれ以上であるように、前記タンパク質の発現を促進することができる、請求項１２に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。

【請求項１４】

前記対照ＩＲＥＳが、配列番号３２８２の配列を含む、請求項１３に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。

【請求項１５】

前記ＩＲＥＳが、エンテロウイルス、コブウイルス、パレコウイルス、またはカルジオウイルスに由来する、請求項１２～１４のいずれか１項に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。

【請求項１６】

前記ＩＲＥＳが、エンテロウイルスまたはコブウイルスに由来する、請求項１２～１５のいずれか１項に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。

【請求項１７】

前記細胞が、筋管である、請求項１２～１４のいずれか１項に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。

【請求項１８】

前記ＩＲＥＳが、ボピウイルス、オシウイルス、ハニウイルス、パセリウイルス、ミスシウイルス、コブウイルス、エンテロウイルス、カルジオウイルス、サリウイルス、ラボウイルス、パレコウイルス、ガリウイルス、またはシシニウイルスに由来する、請求項１７に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。

【請求項１９】

前記ＩＲＥＳが、ハニウイルス、パセリウイルス、コブウイルス、ボピウイルス、またはエンテロウイルスに由来する、請求項１７に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。

【請求項２０】

前記ＩＲＥＳが、エンテロウイルスＩ、エンテロウイルスＦ、エンテロウイルスＥ、エンテロウイルスＪ、エンテロウイルスＣ、エンテロウイルスＡ、エンテロウイルスＢ、アイチウイルスＢ、パレコウイルスＡ、カルジオウイルスＦ、カルジオウイルスＢ、またはカルジオウイルスＥに由来する、請求項１７に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。

【請求項２１】

前記ＩＲＥＳが、配列番号１３７、５８０、７８５、７９１、８２０、９２２、１０４１、１０４７、１０６８、１１６８、１１６９、１１７１、１１７７、１１７８、１１７９、１１８０、１１８９、１１９２、１２６３、１２７６、１２８０、１２８２、１２８４、１２８７、１３５４、１３５６、１４３２、１４３６、１４３９、１４４０、２２８５、２６６７、２７４６、２７７７、２７７８、３２８３、及び３２８４から選択される配列を含む、請求項１７に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。

【請求項２２】

前記細胞が、肝細胞である、請求項１２～１４のいずれか１項に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。

【請求項２３】

前記ＩＲＥＳが、エンテロウイルス、ボピウイルス、ミスシウイルス、ガリウイルス、オシウイルス、カルジオウイルス、コブウイルス、ラボウイルス、サリウイルス、パレコウイルス、ハニウイルス、トットリウイルス、パセリウイルス、コサウイルス、またはシシニウイルスに由来する、請求項２２に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。

【請求項２４】

前記ＩＲＥＳが、エンテロウイルス、ミスシウイルス、コブウイルス、ボピウイルス、またはガリウイルスに由来する、請求項２３に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。

【請求項２５】

前記ＩＲＥＳが、エンテロウイルスＢ、エンテロウイルスＡ、エンテロウイルスＤ、エンテロウイルスＪ、エンテロウイルスＣ、ライノウイルスＢ、エンテロウイルスＨ、エンテロウイルスＩ、エンテロウイルスＥ、エンテロウイルスＦ、アイチウイルスＢ、アイチウイルスＡ、パレコウイルスＡ、カルジオウイルスＦ、カルジオウイルスＥ、またはカルジオウイルスＢに由来する、請求項２３に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。

【請求項２６】

前記ＩＲＥＳが、配列番号１３７、５８０、６４８、６９３、７５２、７８５、７９１、７９３、８２０、８２３、８３９、８４０、８６１、８６２、８６３、８７６、９２２、９５９、９８３、９８４、１０１５、１０１７、１０２３、１０２６、１０３１、１０４１、１０４７、１０５９、１０６８、１１３４、１１６８、１１６９、１１７１、１１７７、１１７８、１１７９、１１８０、１１８９、１１９２、１１９３、１１９８、１２１６、１２６３、１２７６、１２８０、１２８２、１２８４、１２８７、１３４６、１３５４、１３５６、１４３２、１４３６、１４３８、１４３９、１４４０、２２８５、２７７７、２７７８、３２８３、及び３２８４から選択される配列を含む、請求項２２に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。

【請求項２７】

前記細胞が、Ｔ細胞である、請求項１２～１４のいずれか１項に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。

【請求項２８】

前記ＩＲＥＳが、パセリウイルス、ボピウイルス、ハニウイルス、ミスシウイルス、エンテロウイルス、コブウイルス、ラボウイルス、トットリウイルス、サリウイルス、カルジオウイルス、パレコウイルス、メグリウイルス、アレキシウイルス、オシウイルス、またはシャンバウイルスに由来する、請求項２７に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。

【請求項２９】

前記ＩＲＥＳが、パセリウイルス、ハニウイルス、ミスシウイルス、エンテロウイルス、またはコブウイルスに由来する、請求項２８に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。

【請求項３０】

前記ＩＲＥＳが、エンテロウイルスＩ、エンテロウイルスＤ、エンテロウイルスＣ、エンテロウイルスＡ、エンテロウイルスＪ、エンテロウイルスＨ、アイチウイルスＢ、パレコウイルスＡ、またはカルジオウイルスＢに由来する、請求項２８に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。

【請求項３１】

ＩＲＥＳが、配列番号７７、７８７、７９３、８２０、８３９、８４０、８４３、８５２、８５７、８６１、８６２、８６３、８６４、８７１、８７４、８７６、９５９、１１９３、１２１６、１２８４、１２８７、１３４６、１３５６、１３６４、１４３２、１４３８、１４４０、２６６７、２６８１、２７４２、２７４６、２７５８、３２８３、及び３２８４から選択される配列を含む、請求項２７に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。

【請求項３２】

前記アプタマー複合体またはその断片が、天然または合成のアプタマー配列を含む、請求項４に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。

【請求項３３】

前記アプタマー複合体またはその断片が、配列番号３２６６～３２６８から選択される配列を含む、請求項４に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。

【請求項３４】

前記アプタマー複合体またはその断片が、１つを超えるアプタマーを含む、請求項４に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。

【請求項３５】

前記ＴＩＥが、ＵＴＲ及びアプタマー複合体を含む、請求項１または２に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。

【請求項３６】

前記ＵＴＲが、前記アプタマー複合体の上流に位置する、請求項３５に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。

【請求項３７】

前記ＴＩＥが、アクセサリ要素をさらに含む、請求項１または２に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。

【請求項３８】

前記アクセサリ要素が、ｍｉＲＮＡ結合部位もしくはその断片、制限部位もしくはその断片、ＲＮＡ編集モチーフもしくはその断片、ＺＩＰコード要素もしくはその断片、ＲＮＡ輸送要素もしくはその断片、またはそれらの組み合わせを含む、請求項３７に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。

【請求項３９】

前記アクセサリ要素が、ＩＲＥＳトランス活性化因子（ＩＴＡＦ）との結合ドメインを含む、請求項３７に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。

【請求項４０】

前記結合ドメインが、ポリＡ領域、ポリＣ領域、ポリＡＣ領域、ポリピリミジントラクト、またはそれらの組み合わせもしくはバリアントを含む、請求項３９に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。

【請求項４１】

前記ＩＴＡＦが、ポリ（ｒＣ）結合タンパク質１（ＰＣＢＰ１）、ＰＣＢＰ２、ＰＣＢＰ３、ＰＣＢＰ４、ポリ（Ａ）結合タンパク質１（ＰＡＢＰ１）、ポリピリミジントラクト結合タンパク質（ＰＴＢ）、アルゴノートタンパク質ファミリーメンバー、ＨＮＲＮＰＫ（ヘテロ核リボヌクレオタンパク質Ｋ）、またはＬａタンパク質、あるいはその断片もしくは組み合わせを含む、請求項３９に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。

【請求項４２】

前記コード要素が、治療用タンパク質をコードする配列を含む、請求項１または２に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。

【請求項４３】
前記治療用タンパク質が、キメラタンパク質を含む、請求項４２に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。
【請求項４４】
前記キメラタンパク質が、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）、Ｂ細胞受容体（ＢＣＲ）、免疫細胞活性化もしくは阻害性受容体、組換え融合タンパク質、キメラ変異タンパク質、または融合タンパク質、あるいはそれらの組み合わせを含む、請求項４３に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。
【請求項４５】
前記治療用タンパク質が、抗体、ナノボディ、非抗体タンパク質、免疫調節リガンド、受容体、構造タンパク質、成長因子リガンドもしくは受容体、ホルモンもしくはホルモン受容体、転写因子、チェックポイント阻害剤もしくはアゴニスト、Ｆｃ融合タンパク質、抗凝固剤、血液凝固因子、シャペロンタンパク質、抗菌タンパク質、構造タンパク質、生化学酵素、タイトジャンクション構成タンパク質、ミトコンドリアストレス応答、細胞骨格タンパク質、金属結合タンパク質、または低分子を含む、請求項４２に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。
【請求項４６】
前記免疫調節リガンドが、インターフェロン、サイトカイン、ケモカイン、またはインターロイキンを含む、請求項４５に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。
【請求項４７】
前記構造タンパク質が、チャネルタンパク質または核孔タンパク質である、請求項４５に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。
【請求項４８】
前記非コード要素が、１つを超える非コード要素を含む、請求項３に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。
【請求項４９】
前記非コード要素が、５０～１５，０００ヌクレオチド長を含む、請求項３または４８に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。
【請求項５０】
前記コア機能要素が、終結配列を含む、請求項１または２に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。
【請求項５１】
前記終結配列が、前記３’増強エクソン要素の５’末端に位置する、請求項５０に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。
【請求項５２】
前記終結配列が、終止コドンである、請求項５０に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。
【請求項５３】
前記終結配列が、終止カセットである、請求項５０に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。
【請求項５４】
前記終止カセットが、１つ以上のフレーム内に１つ以上の終止コドンを含む、請求項５３に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。
【請求項５５】
各フレームが、終止コドンを含む、請求項５４に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。
【請求項５６】
各フレームが、２つ以上の終止コドンを含む、請求項５４に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。
【請求項５７】

前記５’増強イントロン要素が、３’イントロン断片を含む、請求項１～３のいずれか１項に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。
【請求項５８】
前記３’イントロン断片が、３’グループＩイントロンスプライス部位ジヌクレオチドの第１のヌクレオチド、または第１及び第２のヌクレオチドをさらに含む、請求項５７に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。
【請求項５９】
前記３’イントロン断片が、前記５’増強イントロン要素の３’末端に位置する、請求項５８に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。
【請求項６０】
前記グループＩイントロンが、細菌ファージ、ウイルスベクター、オルガネラゲノム、核ｒＤＮＡ遺伝子に由来するものを含む、請求項５８に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。
【請求項６１】
前記核ｒＤＮＡ遺伝子が、真菌、植物、もしくは藻類に由来する核ｒＤＮＡ遺伝子、またはその断片を含む、請求項６０に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。
【請求項６２】
前記５’増強イントロン要素が、前記５’末端に位置する先導非翻訳配列を含む、請求項１～３のいずれか１項に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。
【請求項６３】
前記先導非翻訳配列が、スペーサーを含む、請求項６２に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。
【請求項６４】
前記先導非翻訳配列が、転写開始部位の最後のヌクレオチドを含む、請求項６２に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。
【請求項６５】
前記先導非翻訳配列が、１～１００の追加のヌクレオチドを含む、請求項６４に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。
【請求項６６】
前記５’増強イントロン要素が、５’親和性配列を含む、請求項１～３のいずれか１項に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。
【請求項６７】
前記５’親和性配列が、ポリＡ、ポリＡＣ、またはポリピリミジン配列を含む、請求項６６に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。
【請求項６８】
前記５’親和性配列が、１０～１００ヌクレオチドを含む、請求項６７に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。
【請求項６９】
前記５’増強イントロン要素が、５’外部スペーサー配列を含む、請求項１～３または５７～６８のいずれか１項に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。
【請求項７０】
前記５’外部スペーサー配列が、前記５’親和性配列と前記３’イントロン断片との間に位置する、請求項６９に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。
【請求項７１】
前記５’外部スペーサー配列が、約６～６０ヌクレオチドの長さを有する、請求項６９に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。
【請求項７２】
前記５’外部スペーサー配列が、配列番号３０９４～３１５２から選択される配列を含むか、またはそれからなる、請求項６９に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。
【請求項７３】

前記５’増強イントロン要素が、以下の順序で、
ａ．先導非翻訳配列と、
ｂ．５’親和性配列と、
ｃ．５’外部スペーサー配列と、
ｄ．３’グループＩイントロンスプライス部位の第１のヌクレオチドを含む３’イントロン断片と、を含み、
前記先導非翻訳配列が、転写開始部位の最後のヌクレオチド及び１～１００ヌクレオチドを含む、請求項１～３のいずれか１項に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。
【請求項７４】
前記５’増強イントロン要素が、以下の順序で、
ａ．先導非翻訳配列と、
ｂ．５’外部スペーサー配列と、
ｃ．５’親和性配列と、
ｄ．３’グループＩスプライス部位の第１のヌクレオチドを含む３’イントロン断片と、を含み、
前記先導非翻訳配列が、転写開始部位の最後のヌクレオチド及び１～１００ヌクレオチドを含む、請求項１～３のいずれか１項に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。
【請求項７５】
前記５’増強イントロン要素が、以下の順序で、
ａ．先導非翻訳配列と、
ｂ．５’親和性配列と、
ｃ．５’外部スペーサー配列と、
ｄ．３’グループＩイントロンスプライス部位の前記第１及び第２のヌクレオチドを含む３’イントロン断片と、を含み、
前記先導非翻訳配列が、転写開始部位の最後のヌクレオチド及び１～１００ヌクレオチドを含み、前記５’増強エクソン要素が、３’グループＩスプライス部位ジヌクレオチドの第２のヌクレオチドを欠く３’エクソン断片を含む、請求項１～３のいずれか１項に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。
【請求項７６】
前記５’増強イントロン要素が、以下の順序で、
ａ．先導非翻訳配列と、
ｂ．５’外部スペーサー配列と、
ｃ．５’親和性配列と、
ｄ．３’グループＩスプライス部位の前記第１及び第２のヌクレオチドを含む３’イントロン断片と、を含み、
前記先導非翻訳配列が、転写開始部位の最後のヌクレオチド及び１～１００ヌクレオチドを含み、前記５’増強エクソン要素が、３’グループＩスプライス部位ジヌクレオチドの第２のヌクレオチドを欠く３’エクソン断片を含む、請求項１～３のいずれか１項に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。
【請求項７７】
前記５’増強エクソン要素が、３’エクソン断片を含む、請求項１～３のいずれか１項に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。
【請求項７８】
前記３’エクソン断片が、３’グループＩイントロンスプライス部位ジヌクレオチドの第２のヌクレオチドをさらに含む、請求項７８に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。
【請求項７９】
前記３’エクソン断片が、天然エクソンに由来する１～１００の天然ヌクレオチドを含む、請求項７８に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。
【請求項８０】
前記天然エクソンが、グループＩイントロン含有遺伝子またはその断片に由来する、請

求項７９に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。
【請求項８１】
前記天然エクソンが、Ａｎａｂａｅｎａ細菌、Ｔ４ファージウイルス、Ｔｗｏｒｔバクテリオファージ、Ｔｅｔｒａｈｙｍｅｎａ、またはＡｚｏａｒｃｕｓ細菌に由来する、請求項７９に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。
【請求項８２】
前記５’増強エクソン要素が、前記３’エクソン断片の下流に位置する５’内部スペーサー配列を含む、請求項１～３のいずれかに記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。
【請求項８３】
前記５’内部スペーサー配列が、約６～６０ヌクレオチド長である、請求項８２に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。
【請求項８４】
前記５’内部スペーサー配列が、配列番号３０９４～３１５２から選択される配列を含むか、またはそれからなる、請求項８３に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。
【請求項８５】
前記５’増強エクソン要素が、以下の順序で、
ａ．３’グループＩイントロンスプライス部位ジヌクレオチドの第２のヌクレオチドを含む３’エクソン断片と、
ｂ．５’内部スペーサー配列と、を含み、
前記３’エクソン断片が、天然エクソンに由来する１～１００の天然ヌクレオチドを含む、請求項１～３のいずれか１項に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。
【請求項８６】
前記５’増強エクソン要素が、以下の順序で、
ａ．３’エクソン断片と、
ｂ．５’内部スペーサー配列と、を含み、
前記３’エクソン断片が、天然エクソンに由来する１～１００の天然ヌクレオチドを含み、前記５’増強イントロン要素が、３’グループＩスプライス部位ジヌクレオチドの前記第１及び第２のヌクレオチドを含む３’イントロン断片を含む、請求項１～３のいずれか１項に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。
【請求項８７】
前記３’増強エクソン要素が、５’エクソン断片を含む、請求項１～３のいずれか１項に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。
【請求項８８】
前記５’エクソン断片が、５’グループＩイントロン断片の第１のヌクレオチドを含む、請求項８７に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。
【請求項８９】
前記５’エクソン断片が、天然エクソンに由来する１～１００ヌクレオチドをさらに含む、請求項８７に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。
【請求項９０】
前記天然エクソンが、グループＩイントロン含有遺伝子またはその断片に由来する、請求項８７に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。
【請求項９１】
前記３’増強エクソン要素が、３’内部スペーサー配列を含む、請求項１～３または８７のいずれか１項に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。
【請求項９２】
前記３’内部スペーサー配列が、前記終結配列と前記５’エクソン断片との間に位置する、請求項９１に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。
【請求項９３】
前記３’内部スペーサーが、約６～６０ヌクレオチド長である、請求項９１に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。

【請求項９４】
前記３’内部スペーサーが、配列番号３０９４～３１５２から選択される配列を含むか、またはそれからなる、請求項９１に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。
【請求項９５】
前記３’増強エクソン要素が、
ａ．３’内部スペーサー配列と、
ｂ．５’グループＩイントロンスプライス部位ジヌクレオチドの第１のヌクレオチドを含む５’エクソン断片と、を含み、
前記５’エクソン断片が、天然エクソンに由来する１～１００ヌクレオチドを含む、請求項１～３のいずれか１項に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。
【請求項９６】
前記３’増強エクソン要素が、
ａ．３’内部スペーサー配列と、
ｂ．５’エクソン断片と、を含み、
前記５’エクソン断片が、天然エクソンに由来する１～１００のヌクレオチドを含み、前記３’増強イントロン要素が、５’グループＩイントロンスプライス部位ジヌクレオチドの前記第１及び第２のヌクレオチドを含む５’イントロン断片を含む、請求項１～３のいずれか１項に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。
【請求項９７】
前記３’増強イントロン要素が、５’イントロン断片を含む、請求項１～３のいずれか１項に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。
【請求項９８】
前記５’イントロン断片が、５’グループＩイントロンスプライス部位ジヌクレオチドの第２のヌクレオチドを含む、請求項９７に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。
【請求項９９】
前記３’増強イントロン要素が、前記５’イントロンの３’末端に位置する後端非翻訳配列を含む、請求項１～３または９６～９８のいずれか１項に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。
【請求項１００】
前記後端非翻訳配列が、３～１２ヌクレオチドを含む、請求項９９に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。
【請求項１０１】
前記３’増強イントロン断片が、３’外部スペーサー配列を含む、請求項１～３または９６～１００のいずれかに記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。
【請求項１０２】
前記３’外部スペーサー配列が、前記５’イントロン断片と後端非翻訳配列との間に位置する、請求項１０１に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。
【請求項１０３】
前記３’外部スペーサー配列が、６～６０ヌクレオチド長の長さを有する、請求項１０１に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。
【請求項１０４】
前記３’外部スペーサー配列が、配列番号３０９４～３１５２から選択される配列を含むか、またはそれからなる、請求項１０１のいずれかに記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。
【請求項１０５】
前記３’増強イントロン要素が、３’親和性配列を含む、請求項１～３のいずれかに記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。
【請求項１０６】
前記３’親和性配列が、前記３’外部スペーサー配列と前記後端非翻訳配列との間に位置する、請求項１０５に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。

【請求項１０７】
前記３’親和性配列が、ポリＡ、ポリＡＣ、またはポリピリミジン配列を含む、請求項１０５に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。
【請求項１０８】
前記親和性配列が、１０～１００ヌクレオチドを含む、請求項１０５に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。
【請求項１０９】
前記５’増強イントロン要素が、５’外部二重鎖配列をさらに含み、前記３’増強イントロン要素が、３’外部二重鎖配列をさらに含む、請求項１～３のいずれか１項に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。
【請求項１１０】
前記５’外部二重鎖配列及び３’外部二重鎖配列が、互いに完全にまたは部分的に相補的である、請求項１０９に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。
【請求項１１１】
前記５’外部二重鎖配列が、完全合成または部分合成ヌクレオチドを含む、請求項１０９に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。
【請求項１１２】
前記３’外部二重鎖配列が、完全合成または部分合成ヌクレオチドを含む、請求項１０９に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。
【請求項１１３】
前記３’外部二重鎖配列が、約６～約５０ヌクレオチドである、請求項１０９に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。
【請求項１１４】
前記５’外部二重鎖配列が、約６～約５０ヌクレオチドである、請求項１０９に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。
【請求項１１５】
前記５’増強エクソン要素が、５’内部二重鎖配列をさらに含み、前記３’増強エクソン要素が、３’内部二重鎖配列をさらに含む、請求項１～３のいずれか１項に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。
【請求項１１６】
前記５’内部二重鎖配列及び３’内部二重鎖配列が、互いに完全にまたは部分的に相補的である、請求項１１５に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。
【請求項１１７】
前記５’内部二重鎖配列が、完全合成または部分合成ヌクレオチドを含む、請求項１１５に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。
【請求項１１８】
前記３’内部二重鎖配列が、完全合成または部分合成ヌクレオチドを含む、請求項１１５に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。
【請求項１１９】
前記３’内部二重鎖配列が、約６～約１９ヌクレオチドである、請求項１１５に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。
【請求項１２０】
前記５’内部二重鎖配列が、約６～約１９ヌクレオチドである、請求項１１５に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。
【請求項１２１】
前記３’増強イントロン断片が、以下の順序で、
ａ．５’グループＩイントロンスプライス部位ジヌクレオチドの第２のヌクレオチドを含む５’イントロン断片と、
ｂ．３’外部スペーサー配列と、
ｃ．３’親和性配列と、を含む、請求項１～３のいずれか１項に記載のＲＮＡ前駆体ポ

リヌクレオチド。
【請求項１２２】
前記３’増強イントロン断片が、以下の順序で、
ａ．５’グループＩイントロンスプライス部位ジヌクレオチドの前記第１及び第２のヌクレオチドを含む５’イントロン断片と、
ｂ．３’外部スペーサー配列と、
ｃ．３’親和性配列と、を含み、
前記３’増強エクソン要素が、５’グループＩイントロンスプライス部位ジヌクレオチドの前記第１のヌクレオチドを欠く５’エクソン断片を含む、請求項１～３のいずれか１項に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。
【請求項１２３】
以下の順序で、
ａ．先導非翻訳配列と、
ｂ．５’親和性配列と、
ｃ．５’外部二重鎖配列と、
ｄ．５’スペーサー配列と、
ｅ．３’イントロン断片と、
ｆ．３’エクソン断片と、
ｇ．５’内部二重鎖配列と、
ｈ．５’内部スペーサー配列と、
ｉ．翻訳開始要素と、
ｊ．コード要素と、
ｋ．終結配列と、
ｌ．３’内部スペーサー配列と、
ｍ．３’内部二重鎖配列と、
ｎ．５’エクソン断片と、
ｏ．５’イントロン断片と、
ｐ．３’外部二重鎖配列と、
ｑ．３’親和性配列と、
ｒ．後端非翻訳配列と、を含む、請求項１または２に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。
【請求項１２４】
以下の順序で、
ａ．先導非翻訳配列と、
ｂ．５’親和性配列と、
ｃ．５’外部スペーサー配列と、
ｄ．３’イントロン断片と、
ｅ．３’エクソン断片と、
ｆ．５’内部二重鎖配列と、
ｇ．５’内部スペーサー配列と、
ｈ．非コード要素と、
ｉ．３’内部スペーサー配列と、
ｊ．３’内部二重鎖配列と、
ｋ．５’エクソン断片と、
ｌ．５’イントロン断片と、
ｍ．３’外部スペーサー配列と、
ｎ．３’親和性配列と、
ｏ．後端非翻訳配列と、を含む、請求項３に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。
【請求項１２５】
以下の順序で、

ａ．先導非翻訳配列と、
ｂ．５’親和性配列と、
ｃ．５’外部スペーサー配列と、
ｄ．３’イントロン断片と、
ｅ．３’エクソン断片と、
ｆ．５’内部二重鎖配列と、
ｇ．５’内部スペーサー配列と、
ｈ．翻訳開始要素と、
ｉ．コード要素と、
ｊ．終結配列と、
ｋ．３’内部スペーサー配列と、
ｌ．３’内部二重鎖配列と、
ｍ．５’エクソン断片と、
ｎ．５’イントロン断片と、
ｏ．３’外部スペーサー配列と、
ｐ．３’親和性配列と、を含む、請求項１または２に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。

【請求項１２６】
以下の順序で、
ａ．先導非翻訳配列と、
ｂ．５’親和性配列と、
ｃ．５’外部スペーサー配列と、
ｄ．３’イントロン断片と、
ｅ．３’エクソン断片と、
ｆ．５’内部スペーサー配列と、
ｇ．翻訳開始要素と、
ｈ．コード要素と、
ｉ．終結配列と、
ｊ．３’内部スペーサー配列と、
ｋ．５’エクソン断片と、
ｌ．５’イントロン断片と、
ｍ．３’外部スペーサー配列と、
ｎ．３’親和性配列と、を含む、請求項１または２に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。

【請求項１２７】
以下の順序で、
ａ．先導非翻訳配列と、
ｂ．５’親和性配列と、
ｃ．５’外部スペーサー配列と、
ｄ．３’イントロン断片と、
ｅ．３’エクソン断片と、
ｆ．５’内部スペーサー配列と、
ｇ．非コード要素と、
ｈ．３’内部スペーサー配列と、
ｉ．５’エクソン断片と、
ｊ．５’イントロン断片と、
ｋ．３’外部スペーサー配列と、
ｌ．３’親和性配列と、
ｍ．後端非翻訳配列と、を含む、請求項３に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。

【請求項１２８】

以下の順序で、
ａ．先導非翻訳配列と、
ｂ．５’親和性配列と、
ｃ．５’外部二重鎖配列と、
ｄ．５’スペーサー配列と、
ｅ．３’イントロン断片と、
ｆ．３’エクソン断片と、
ｇ．５’内部二重鎖配列と、
ｈ．５’内部スペーサー配列と、
ｉ．終結配列と、
ｊ．コード要素と、
ｋ．翻訳開始要素と、
ｌ．３’内部スペーサー配列と、
ｍ．３’内部二重鎖配列と、
ｎ．５’エクソン断片と、
ｏ．５’イントロン断片と、
ｐ．３’外部二重鎖配列と、
ｑ．３’親和性配列と、
ｒ．後端非翻訳配列と、を含む、請求項３に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。

【請求項１２９】
前記コード要素が、２つ以上のタンパク質コード領域を含む、請求項１または２に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。

【請求項１３０】
第１発現配列と第２発現配列との間のタンパク質切断部位またはリボソームスタッタリング要素をコードするポリヌクレオチド配列を含む、請求項１２９に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。

【請求項１３１】
前記リボソームスタッタリング要素が、自己切断スペーサーである、請求項１３０に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。

【請求項１３２】
２Ａリボソームスタッタリングペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含む、請求項１２９に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド。

【請求項１３３】
請求項１～８のいずれか１項に記載のＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチドから産生される、環状ＲＮＡポリヌクレオチド。

【請求項１３４】
天然ヌクレオチドからなる、請求項１３３に記載の環状ＲＮＡポリヌクレオチド。

【請求項１３５】
前記タンパク質コード配列または非コード配列が、コドン最適化される、請求項１３４に記載の環状ＲＮＡポリヌクレオチド。

【請求項１３６】
前記環状ＲＮＡポリヌクレオチドが、約０．１～約１５キロベース長である、請求項１３３～１３５のいずれか１項に記載の環状ＲＮＡポリヌクレオチド。

【請求項１３７】
同等の最適化前ポリヌクレオチドに存在する少なくとも１つのマイクロＲＮＡ結合部位を欠くように最適化される、請求項１３３～１３６のいずれか１項に記載の環状ＲＮＡポリヌクレオチド。

【請求項１３８】
同等の最適化前ポリヌクレオチドに存在する少なくとも１つのＲＮＡ編集感受性部位を欠くように最適化される、請求項１３３～１３７のいずれか１項に記載の環状ＲＮＡポリ

ヌクレオチド。
【請求項１３９】
少なくとも２０時間のヒトにおけるインビボでの治療効果の持続期間を有する、請求項１３３～１３８のいずれか１項に記載の環状ＲＮＡポリヌクレオチド。
【請求項１４０】
少なくとも６時間の機能的半減期を有する、請求項１３３～１３９のいずれか１項に記載の環状ＲＮＡポリヌクレオチド。
【請求項１４１】
同じ発現配列を含む同等の直鎖状ＲＮＡポリヌクレオチドよりも長いまたは同等のヒト細胞における治療効果の持続期間を有する、請求項１３３～１４０に記載の環状ＲＮＡポリヌクレオチド。
【請求項１４２】
同じ発現配列を有する同等の直鎖状ＲＮＡポリヌクレオチドよりも長いヒトにおけるインビボでの治療効果の持続期間を有する、請求項１３３～１４１に記載の環状ＲＮＡポリヌクレオチド。
【請求項１４３】
前記ＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチドが、ＰＣＲ産物、直鎖状プラスミド、非直鎖状プラスミド、直鎖状ミニサークル、非直鎖状ミニサークル、ウイルスベクター、コスミド、ｃｅＤＮＡ、もしくは人工染色体を含む、ベクターまたはＤＮＡから転写される、請求項１３３～１４２のいずれか１項に記載の環状ＲＮＡポリヌクレオチド。
【請求項１４４】
翻訳開始要素（ＴＩＥ）を作製する方法であって、
ａ．ウイルス非翻訳領域（ＵＴＲ）を取得することと、
ｂ．配列を徐々に欠失させることによって、開始因子と結合することができる、及び／または翻訳を開始することができる、前記ＵＴＲの機能単位を決定することと、
ｃ．前記ＵＴＲの非機能単位を除去することと、
ｄ．任意で、前記ＵＴＲの末端を修飾することと、を含む、前記方法。
【請求項１４５】
前記ＵＴＲの前記末端の前記修飾が、前記ウイルスＵＴＲの約１％～７５％である、請求項１４４に記載の方法。
【請求項１４６】
ＵＴＲの前記機能単位が、重要な領域を識別するために、前記ＵＴＲの前記５’及び３’末端からの欠失スキャンまたは前記ＵＴＲの長さにわたる変異スキャンによって決定される、請求項１４４または１４５に記載の方法。
【請求項１４７】
薬学的組成物であって、請求項１３３～１４３のいずれか１項に記載の環状ＲＮＡポリヌクレオチド、ナノ粒子、及び任意に、前記ナノ粒子と作動可能に接続された標的化部分を含む、前記薬学的組成物。
【請求項１４８】
前記ナノ粒子が、脂質ナノ粒子、コア・シェルナノ粒子、生分解性ナノ粒子、生分解性脂質ナノ粒子、ポリマーナノ粒子、ポリプレックス、または生分解性ポリマーナノ粒子である、請求項１４７に記載の薬学的組成物。
【請求項１４９】
標的化部分を含み、前記標的化部分が、細胞単離または精製の非存在下で選択された細胞集団または組織の選択された細胞への受容体媒介エンドサイトーシス、エンドソーム融合、または直接融合を媒介する、請求項１４７または１４８に記載の薬学的組成物。
【請求項１５０】
前記ナノ粒子と作動可能に接続された標的化部分を含む、請求項１４７～１４９のいずれか１項に記載の薬学的組成物。
【請求項１５１】

前記標的化部分が、低分子、ｓｃＦｖ、ナノボディ、ペプチド、環状ペプチド、二環状もしくは三環状ペプチド、ミニボディ、ポリヌクレオチドアプタマー、操作足場タンパク質、重鎖可変領域、軽鎖可変領域、またはそれらの断片である、請求項１４７～１５０のいずれか１項に記載の薬学的組成物。

【請求項１５２】

前記組成物における前記ポリヌクレオチドの１重量％未満が、二本鎖ＲＮＡ、ＤＮＡスプリント、ＤＮＡ鋳型、または三リン酸化ＲＮＡである、請求項１４７～１５１のいずれか１項に記載の薬学的組成物。

【請求項１５３】

前記薬学的組成物における前記ポリヌクレオチド及びタンパク質の１重量％未満が、二本鎖ＲＮＡ、ＤＮＡスプリント、ＤＮＡ鋳型、三リン酸化ＲＮＡ、ホスファターゼタンパク質、プロテインリガーゼ、ＲＮＡポリメラーゼ、及びキャッピング酵素である、請求１４７～１５２のいずれか１項に記載の薬学的組成物。

【請求項１５４】

薬学的組成物であって、請求項１３３～１４３のいずれか１項に記載の環状ＲＮＡポリヌクレオチドと、リポソーム、デンドリマー、炭水化物担体、グリカンナノ材料、フソーム、エクソソーム、またはそれらの組み合わせとを含む、前記薬学的組成物。

【請求項１５５】

薬学的組成物であって、請求項１３３～１４３のいずれか１項に記載の環状ＲＮＡポリヌクレオチドと、薬学的塩、緩衝液、希釈剤、またはそれらの組み合わせと、を含む、前記薬学的組成物。

【請求項１５６】

処置を必要とする対象を処置する方法であって、請求項１４７～１５５のいずれか１項に記載の環状ＲＮＡポリヌクレオチド、ナノ粒子、及び任意に、前記ナノ粒子と作動可能に接続された標的化部分を含む治療的有効量の組成物を投与することを含む、前記方法。

【請求項１５７】

前記標的化部分が、低分子、ｓｃＦｖ、ナノボディ、ペプチド、環状ペプチド、二環状もしくは三環状ペプチド、ミニボディ、重鎖可変領域、操作足場タンパク質、軽鎖可変領域、またはそれらの断片である、請求項１５６に記載の方法。

【請求項１５８】

前記ナノ粒子が、脂質ナノ粒子、コア・シェルナノ粒子、または生分解性ナノ粒子である、請求項１５６～１５７のいずれか１項に記載の方法。

【請求項１５９】

前記ナノ粒子が、１つ以上のカチオン性脂質、イオン化可能脂質、またはポリβ－アミノエステルを含む、請求項１５６～１５８のいずれか１項に記載の方法。

【請求項１６０】

前記ナノ粒子が、１つ以上の非カチオン性脂質を含む、請求項１５６～１５９のいずれか１項に記載の方法。

【請求項１６１】

前記ナノ粒子が、１つ以上のＰＥＧ修飾脂質、ポリグルタミン酸脂質、またはヒアルロン酸脂質を含む、請求項１５６～１６０のいずれか１項に記載の方法。

【請求項１６２】

前記ナノ粒子が、コレステロールを含む、請求項１５６～１６１のいずれか１項に記載の方法。

【請求項１６３】

前記ナノ粒子が、アラキドン酸、ロイコトリエン、またはオレイン酸を含む、請求項１５６～１６２のいずれか１項に記載の方法。

【請求項１６４】

前記組成物が、標的化部分を含み、前記標的化部分が、細胞選択または精製の非存在下で選択された細胞集団の細胞への受容体媒介エンドサイトーシスを選択的に媒介する、請

求項１５６～１６３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１６５】
前記ナノ粒子が、１つを超える環状ＲＮＡポリヌクレオチドを含む、請求項１５６～１６４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１６６】
前記対象が、急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）、胞状横紋筋肉腫、Ｂ細胞悪性腫瘍、膀胱癌（例えば、膀胱癌腫）、骨癌、脳癌（例えば、髄芽腫及び多形神経膠芽腫）、乳癌、肛門、肛門管、または肛門直腸の癌、眼の癌、肝内胆管の癌、関節の癌、首の癌、胆嚢癌、胸膜癌、鼻、鼻腔、または中耳の癌、口腔の癌、外陰の癌、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性癌、結腸癌、食道癌、子宮頸癌、線維肉腫、消化管カルチノイド腫瘍、頭頸部癌（例えば、頭頸部扁平上皮癌）、ホジキンリンパ腫、下咽頭癌、腎臓癌、喉頭癌、白血病、液体腫瘍、脂肪腫、肝臓癌、肺癌（例えば、非小細胞肺癌、肺腺癌、及び小細胞肺癌）、リンパ腫、中皮腫、肥満細胞腫、黒色腫、多発性骨髄腫、上咽頭癌、非ホジキンリンパ腫、Ｂ慢性リンパ球性白血病、有毛細胞白血病、バーキットリンパ腫、卵巣癌、膵臓癌、腹膜癌、大網の癌、腸間膜癌、咽頭癌、前立腺癌、直腸癌、腎癌、皮膚癌、小腸癌、軟部組織癌、固形腫瘍、滑膜肉腫、胃癌、奇形腫、精巣癌、甲状腺癌、ならびに尿管癌からなる群から選択されるがんを有する、請求項１５６～１６５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１６７】
前記対象が、強皮症、バセドウ病、クローン病、シェーグレン病、多発性硬化症、橋本病、乾癬、重症筋無力症、自己免疫性多腺性内分泌不全症候群、Ｉ型糖尿病（ＴＩＤＭ）、自己免疫性胃炎、自己免疫性ブドウ膜網膜炎、多発性筋炎、大腸炎、甲状腺炎、及びヒトループスによって典型的に表される全身性自己免疫疾患から選択される自己免疫障害を有する、請求項１５６～１６６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１６８】
請求項１３３～１４３のいずれかに記載の環状ＲＮＡポリヌクレオチド、または請求項１４７～１５５のいずれか１項に記載の薬学的組成物を含む、真核細胞。
【請求項１６９】
前記真核細胞が、ヒト細胞である、請求項１６８に記載の真核細胞。
【請求項１７０】
前記真核細胞が、免疫細胞である、請求項１６９に記載の真核細胞。
【請求項１７１】
前記真核細胞が、Ｔ細胞、樹状細胞、マクロファージ、Ｂ細胞、好中球、または好塩基球である、請求項１７０に記載の真核細胞。
【請求項１７２】
請求項１３３～１４３のいずれかに記載の環状ＲＮＡポリヌクレオチドを含む、原核細胞。
【請求項１７３】
環状ＲＮＡを精製する方法であって、親和性配列を用いて固体表面とコンジュゲートしたオリゴヌクレオチドをハイブリダイズすることを含む、前記方法。
【請求項１７４】
前記親和性配列の１つ以上のコピーが、ＲＮＡ前駆体中に存在する、請求項１７３に記載の方法。
【請求項１７５】
前記ＲＮＡ前駆体が、請求項４４～５４、８３～８６、または１０３～１１０のいずれか１項に記載のＲＮＡ前駆体である、請求項１７４に記載の方法。
【請求項１７６】
前記環状ＲＮＡが、請求項１１７～１２７のいずれか１項に記載の環状ＲＮＡである、請求項１７３～１７５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１７７】
前記親和性配列が、前記環状ＲＮＡの形成中に除去される、請求項１７３～１７６のい

ずれか１項に記載の方法。
【請求項１７８】
前記ＲＮＡ前駆体から前記環状ＲＮＡを分離することを含む、請求項１７３～１７７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１７９】
前記親和性配列が、ポリＡ配列を含む、請求項１７３～１７８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１８０】
前記親和性配列とハイブリダイズする前記オリゴヌクレオチドが、デオキシチミジンオリゴヌクレオチドである、請求項１７９に記載の方法。
【請求項１８１】
前記親和性配列が、専用結合部位（ＤＢＳ）を含む、請求項１７３～１７８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１８２】
前記ＤＢＳが、ＴＡＴＡＡＴＴＣＴＡＣＣＣＴＡＴＴＧＡＧＧＣＡＴＴＧＡＣＴＡ（配列番号３２６９）のヌクレオチド配列を含む、請求項１８１に記載の方法。
【請求項１８３】
前記親和性配列とハイブリダイズする前記オリゴヌクレオチドが、前記ＤＢＳと相補的な配列を含む、請求項１８１または１８２に記載の方法。
【請求項１８４】
環状ＲＮＡを精製する方法であって、
ａ．直鎖状ＲＮＡ及び環状ＲＮＡを含む組成物を、前記環状ＲＮＡよりも前記直鎖状ＲＮＡと優先的に結合する結合剤と接触させることと、
ｂ．前記結合剤と結合したＲＮＡを、前記結合剤と結合していないＲＮＡから分離することと、を含む、前記方法。
【請求項１８５】
前記結合剤が、固体支持体とコンジュゲートされる、請求項１８４に記載の方法。
【請求項１８６】
前記固体支持体が、アガロース、アガロース由来樹脂、セルロース、セルロース繊維、磁気ビーズ、ハイスループットマイクロタイタープレート、非アガロース樹脂、ガラス表面、ポリマー表面、またはそれらの組み合わせを含む、請求項１８５に記載の方法。
【請求項１８７】
前記固体支持体が、アガロースまたはセルロースを含む、請求項１８５または１８６に記載の方法。
【請求項１８８】
前記結合剤が、前記直鎖状ＲＮＡに存在し、前記環状ＲＮＡには存在しない配列と相補的であるオリゴヌクレオチドを含む、請求項１８４～１８７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１８９】
前記結合剤が、前記直鎖状ＲＮＡに存在し、前記環状ＲＮＡには存在しない配列と１００％相補的であるオリゴヌクレオチドを含む、請求項１８４～１８８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１９０】
前記直鎖状ＲＮＡに存在し、前記環状ＲＮＡには存在しない前記配列が、親和性配列である、請求項１８８または１８９に記載の方法。
【請求項１９１】
前記直鎖状ＲＮＡに存在し、前記環状ＲＮＡには存在しない前記配列が、ポリＡ配列を含む、請求項１８８～１９０のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１９２】
前記結合剤が、ポリデオキシチミジン配列を含むオリゴヌクレオチドを含む、請求項１

８４～１９１のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１９３】
前記直鎖状ＲＮＡに存在し、前記環状ＲＮＡには存在しない前記配列が、ＤＢＳ配列を含む、請求項１８８～１９２のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１９４】
前記ＤＢＳ配列が、ＴＡＴＡＡＴＴＣＴＡＣＣＣＴＡＴＴＧＡＧＧＣＡＴＴＧＡＣＴＡ（配列番号３２６９）のヌクレオチド配列を含む、請求項１９３に記載の方法。
【請求項１９５】
前記直鎖状ＲＮＡに存在し、前記環状ＲＮＡには存在しない前記配列が、１０～１５０ヌクレオチド長である、請求項１８８～１９４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１９６】
前記直鎖状ＲＮＡに存在し、前記環状ＲＮＡには存在しない前記配列が、１０～７０ヌクレオチド長である、請求項１８８～１９４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１９７】
前記直鎖状ＲＮＡに存在し、前記環状ＲＮＡには存在しない前記配列が、２０～３０ヌクレオチド長である、請求項１８８～１９４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１９８】
前記直鎖状ＲＮＡに存在し、前記環状ＲＮＡには存在しない前記配列が、前記直鎖状ＲＮＡ中の２つの位置に存在する、請求項１８８～１９７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１９９】
前記直鎖状ＲＮＡに存在し、前記環状ＲＮＡには存在しない前記配列が、前記直鎖状ＲＮＡの転写中に前記直鎖状ＲＮＡにコードされる、請求項１８８～１９８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２００】
前記直鎖状ＲＮＡに存在し、前記環状ＲＮＡには存在しない前記配列が、前記直鎖状ＲＮＡに酵素的に付加される、請求項１８８～１９８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２０１】
前記直鎖状ＲＮＡが、メチルグアニル酸キャップを含まない、請求項１８４～２００のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２０２】
前記直鎖状ＲＮＡが、ＲＮＡ前駆体またはその断片を含む、請求項１８４～２０１のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２０３】
前記ＲＮＡ前駆体が、請求項４４～５４、８３～８６、もしくは１０３～１１０のいずれか１項に記載のＲＮＡ前駆体、またはその断片である、請求項２０２に記載の方法。
【請求項２０４】
前記ＲＮＡ前駆体が、インビトロ転写（ＩＶＴ）を使用して産生される、請求項２０２または２０３に記載の方法。
【請求項２０５】
前記断片が、イントロンを含む、請求項２０２または２０３に記載の方法。
【請求項２０６】
前記直鎖状ＲＮＡが、早期終結ＲＮＡまたは不完全な転写によって形成されたＲＮＡを含む、請求項２０４または２０５に記載の方法。
【請求項２０７】
前記環状ＲＮＡが、請求項１１７～１２７のいずれか１項に記載の環状ＲＮＡを含む、請求項１８４～２０６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２０８】
前記環状ＲＮＡが、前記ＲＮＡ前駆体をスプライシングすることを含む方法を使用して産生される、請求項１８４～２０７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２０９】

前記直鎖状ＲＮＡには存在し、前記環状ＲＮＡには存在しない前記配列が、前記スプライシング中に切除される、請求項２０８に記載の方法。
【請求項２１０】
前記環状ＲＮＡが、６キロベース未満のサイズである、請求項１８４～２０９のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２１１】
前記分離することが、前記固体支持体から前記非結合ＲＮＡを除去することを含む、請求項１８４～２１０のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２１２】
前記除去することが、前記固体支持体から前記非結合ＲＮＡを溶出することを含む、請求項２１１に記載の方法。
【請求項２１３】
前記組成物を加熱することを含む、請求項１８４～２１２のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２１４】
緩衝液交換を含む、請求項１８４～２１３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２１５】
緩衝液交換が、前記接触することの前に実施される、請求項２１４に記載の方法。
【請求項２１６】
緩衝液交換が、前記分離することの後に実施される、請求項２１４または２１５に記載の方法。
【請求項２１７】
緩衝液交換が、前記接触することの前に実施され、得られる緩衝液が、１ｍＭを超える一価塩を含む、請求項２１４～２１６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２１８】
前記一価塩が、ＮａＣｌまたはＫＣｌである、請求項２１７に記載の方法。
【請求項２１９】
前記得られる緩衝液が、Ｔｒｉｓを含む、請求項２１７または２１８に記載の方法。
【請求項２２０】
前記得られる緩衝液が、ＥＤＴＡを含む、請求項２１７～２１９のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２２１】
緩衝液交換が、保存緩衝液に前記分離することの後に実施され、前記保存緩衝液が、１ｍＭクエン酸ナトリウム、ｐＨ６．５を含む、請求項２１４～２２０のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２２２】
前記分離することの後に前記環状ＲＮＡを濾過することを含む、請求項１８４～２２１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６月１０日に提出された米国仮出願第６３／２０９，２７１号、及び２０２２年２月１８日に出願された米国仮出願第６３／３１１，９２３号に対する利益及び優先権を主張し、それぞれの内容は全ての目的で参照により完全に組み込まれる。
【０００２】
配列表
本出願は、ＡＳＣＩＩ形式で電子的に提出された配列表を含み、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。２０２２年６月９日に作成された該ＡＳＣＩＩコピーは、ＯＢＳ＿０１７＿ＳＬ．ｔｘｔと名付けられ、サイズは３，３７０，６２４バイトである。

【背景技術】
【０００３】
従来の遺伝子療法は、宿主細胞に所望の遺伝子情報を挿入するためのＤＮＡの使用を伴う。細胞へと導入されたＤＮＡは通常、１つ以上のトランスフェクトされた細胞のゲノムへとある程度組み込まれ、宿主内での導入された遺伝物質の長期的な作用を可能にする。かかる持続的な作用には実質的な利点があり得る一方で、外因性ＤＮＡの宿主ゲノムへの組み込みは、多くの有害な作用も有し得る。例えば、導入されたＤＮＡがインタクトな遺伝子へと挿入され、内因性遺伝子の機能を妨げるまたさらには完全に排除する変異をもたらすことになる可能性がある。ゆえに、ＤＮＡを用いた遺伝子療法は、処置される宿主において、致命的な遺伝子機能の障害、例えば、必須酵素の産生の排除もしくは有害な低下、または細胞成長の制御に決定的に重要な遺伝子の妨害をもたらす可能性があり、非制御または癌性細胞増殖をもたらし得る。加えて、従来のＤＮＡベースの遺伝子療法では、所望の遺伝子産物の効果的な発現のためには強力なプロモーター配列を含める必要があり、これもまた、細胞内の正常な遺伝子発現の制御において望ましくない変化をもたらし得る。また、ＤＮＡベースの遺伝物質が望ましくない抗ＤＮＡ抗体の誘導をもたらし、それが致命的となり得る免疫応答を誘発し得る可能性もある。ウイルスベクターを使用する遺伝子療法アプローチも、有害な免疫応答をもたらし得る。いくつかの状況では、ウイルスベクターが宿主ゲノムに組み込まれることさえある。加えて、臨床グレードのウイルスベクターの産生は、費用も時間もかかる。ウイルスベクターを使用した導入遺伝物質の標的化送達も、制御が難しくあり得る。ゆえに、ＤＮＡベースの遺伝子療法は、ウイルスベクターを使用する分泌タンパク質の送達に関して評価されてきたが（米国特許第６，０６６，６２６号；米国公開第２００４／０１１０７０９号）、これらのアプローチは、これらの様々な理由で制限され得る。
【０００４】
ＤＮＡとは対照的に、遺伝子療法剤としてのＲＮＡの使用は、ＲＮＡがトランスフェクトされた細胞のゲノムへと安定して組み込まれることのリスクを伴わないため、実質的により安全であり、ゆえに導入遺伝物質が必須遺伝子の正常な機能を妨害する、または有害もしくは発癌効果をもたらす変異を引き起こす懸念を排除し、外来プロモーター配列は、コードされたタンパク質の効果的な翻訳のために必要とされず、再度、起こり得る有害な副作用を回避する。加えて、ｍＲＮＡは、その機能を実行するために核に入る必要がないが、ＤＮＡはこの大きな障壁を克服しなければならない。
【０００５】
環状ＲＮＡは、安定した形態のＲＮＡの設計及び産生に役立つ。ＲＮＡ分子の環状化は、特に、不活性なコンフォメーションで折り畳まれやすい分子の場合、ＲＮＡ構造及び機能の研究に利点を提供する（Ｗａｎｇ　ａｎｄ　Ｒｕｆｆｎｅｒ，１９９８）。環状ＲＮＡはまた、特に、タンパク質置換療法及びワクチン接種を含む、遺伝子発現及び治療剤のＲＮＡベースの制御の研究分野において、特に興味深く、インビボ用途に有用であり得る。
本発明の前に、インビトロで環状化ＲＮＡを作製するための３つの主要な技術があった：スプリントを介した方法、順列置換イントロン－エクソン法、及びＲＮＡリガーゼを介した方法。ただし、既存の方法論は、環状化できるＲＮＡのサイズによって制限されるため、その治療用途が制限される。本発明は、ＤＮＡ鋳型、直鎖状ＲＮＡ前駆体、及び最終的には環状ＲＮＡの配列の操作を介した環状ＲＮＡの製造及び最適化のための方法及び組成物、ならびに発明された環状ＲＮＡを使用して必要とする対象を処置する方法を提供することによって、この必要性に対処する。
【先行技術文献】
【特許文献】
【０００６】
【特許文献１】米国特許第６，０６６，６２６号明細書
【特許文献２】米国特許出願公開第２００４／０１１０７０９号明細書

【発明の概要】
【０００７】
ＲＮＡ前駆体、環状ＲＮＡ、及び関連する組成物ならびに方法が本明細書に記載される。
【０００８】
一態様では、本明細書に提供されるのは、ＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチドであって、以下の順序で、ａ．５’増強イントロン要素と、ｂ．５’増強エクソン要素と、ｃ．コア機能要素と、ｄ．３’増強エクソン要素と、ｅ．３’増強イントロン要素と、を含み、コア機能要素が、以下の順序で、ｉ．翻訳開始要素（ＴＩＥ）と、ｉｉ．コード要素と、ｉｉｉ．任意に、終止コドンまたは終止カセットと、を含む、ＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチドである。
【０００９】
一態様では、本明細書に提供されるのは、ＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチドであって、以下の順序で、ａ．５’増強イントロン要素と、ｂ．５’増強エクソン要素と、ｃ．コア機能要素と、ｄ．３’増強エクソン要素と、ｅ．３’増強イントロン要素と、を含み、コア機能要素が、以下の順序で、ｉ．コード領域と、ｉｉ．任意に、終止コドンまたは終止カセットと、ｉｉｉ．翻訳開始要素（ＴＩＥ）と、を含む、ＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチドである。
【００１０】
一態様では、本明細書に提供されるのは、ＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチドであって、以下の順序で、ａ．５’増強イントロン要素と、ｂ．５’増強エクソン要素と、ｃ．コア機能要素と、ｄ．３’増強エクソン要素と、ｅ．３’増強イントロン要素と、を含み、コア機能要素が、非コード要素を含む、ＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチドである。
【００１１】
いくつかの実施形態では、ＴＩＥは、非翻訳領域（ＵＴＲ）もしくはその断片、アプタマー複合体もしくはその断片、またはそれらの組み合わせを含む。
【００１２】
いくつかの実施形態では、ＵＴＲまたはその断片は、ウイルスまたは真核生物メッセンジャーＲＮＡに由来する。いくつかの実施形態では、ＵＴＲまたはその断片は、ウイルス配列内リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ）または真核生物ＩＲＥＳを含む。いくつかの実施形態では、コア機能要素は、２つ以上のＩＲＥＳを含む。いくつかの実施形態では、コア機能要素は、ＴＩＥ、コード要素、終結配列、任意にスペーサー、ＴＩＥ、コード要素、及び終結配列を含み、ＴＩＥは、ＩＲＥＳを含む。いくつかの実施形態では、ＩＲＥＳは、配列番号１～２９８３及び３２８２～３２８７から選択される配列、またはその断片を含む。いくつかの実施形態では、ＩＲＥＳは、配列番号７５、７７、１３７、５３２、５６６、５８２、６４８、６８０、６９３、７５２、７８５、７８７、７９１、７９３、８２０、８２３、８３９、８４０、８４３、８５２、８５７、８６１、８６２、８６３、８６４、８７１、８７４、８７６、９２２、９５９、９８３、９８４、１０１５、１０１７、１０２３、１０２６、１０３１、１０４１、１０４７、１０５９、１０６８、１１３４、１１６８、１１６９、１１７１、１１７７、１１７８、１１７９、１１８０、１１８９、１１９２、１１９３、１１９８、１２１６、１２１８、１２３０、１２６３、１２７６、１２８０、１２８２、１２８４、１２８７、１３４６、１３５４、１３６４、１３６７、１３７０、１４３２、１４３８、１４４０、２２８５、２４６５、２６０１、２６１５、２６１６、２６１７、２６１８、２６２７、２６６７、２６８１、２７４２、２７４６、２７５８、２７７７、２７７８、３２８２、３２８３、３２８６、及び３２８７から選択される配列、またはその断片を含む。いくつかの実施形態では、ＩＲＥＳは、野生型ウイルスＩＲＥＳまたは真核生物ＩＲＥＳと比較して、１つ以上の修飾ヌクレオチドを含む。
【００１３】
いくつかの実施形態では、ＩＲＥＳは、細胞内で、ＲＮＡ前駆体によってコードされる

タンパク質の発現を促進することができる。いくつかの実施形態では、ＩＲＥＳは、タンパク質の発現レベルが、対照ＩＲＥＳが使用される場合と同等またはそれ以上であるように、タンパク質の発現を促進することができる。いくつかの実施形態では、対照ＩＲＥＳは、配列番号３２８２の配列を含む。いくつかの実施形態では、ＩＲＥＳは、エンテロウイルス、コブウイルス、パレコウイルス、またはカルジオウイルスに由来する。いくつかの実施形態では、ＩＲＥＳは、エンテロウイルスまたはコブウイルスに由来する。

【００１４】

いくつかの実施形態では、細胞は、筋管である。いくつかの実施形態では、ＩＲＥＳは、ボピウイルス、オシウイルス、ハニウイルス、パセリウイルス、ミスシウイルス、コブウイルス、エンテロウイルス、カルジオウイルス、サリウイルス、ラボウイルス、パレコウイルス、ガリウイルス、またはシシニウイルスに由来する。いくつかの実施形態では、ＩＲＥＳは、ハニウイルス、パセリウイルス、コブウイルス、ボピウイルス、またはエンテロウイルスに由来する。いくつかの実施形態では、ＩＲＥＳは、エンテロウイルスＩ、エンテロウイルスＦ、エンテロウイルスＥ、エンテロウイルスＪ、エンテロウイルスＣ、エンテロウイルスＡ、エンテロウイルスＢ、アイチウイルスＢ（Ａｉｃｈｉｖｉｒｕｓ Ｂ）、パレコウイルスＡ、カルジオウイルスＦ、カルジオウイルスＢ、またはカルジオウイルスＥに由来する。いくつかの実施形態では、ＩＲＥＳは、配列番号１３７、５８０、７８５、７９１、８２０、９２２、１０４１、１０４７、１０６８、１１６８、１１６９、１１７１、１１７７、１１７８、１１７９、１１８０、１１８９、１１９２、１２６３、１２７６、１２８０、１２８２、１２８４、１２８７、１３５４、１３５６、１４３２、１４３６、１４３９、１４４０、２２８５、２６６７、２７４６、２７７７、２７７８、３２８３、及び３２８４から選択される配列を含む。

【００１５】

いくつかの実施形態では、細胞は、肝細胞である。いくつかの実施形態では、ＩＲＥＳは、エンテロウイルス、ボピウイルス、ミスシウイルス、ガリウイルス、オシウイルス、カルジオウイルス、コブウイルス、ラボウイルス、サリウイルス、パレコウイルス、ハニウイルス、トットリウイルス（Ｔｏｔｔｏｒｉｖｉｒｕｓ）、パセリウイルス、コサウイルス（Ｃｏｓａｖｉｒｕｓ）、またはシシニウイルスに由来する。いくつかの実施形態では、ＩＲＥＳは、エンテロウイルス、ミスシウイルス、コブウイルス、ボピウイルス、またはガリウイルスに由来する。いくつかの実施形態では、ＩＲＥＳは、エンテロウイルスＢ、エンテロウイルスＡ、エンテロウイルスＤ、エンテロウイルスＪ、エンテロウイルスＣ、ライノウイルスＢ、エンテロウイルスＨ、エンテロウイルスＩ、エンテロウイルスＥ、エンテロウイルスＦ、アイチウイルスＢ、アイチウイルスＡ、パレコウイルスＡ、カルジオウイルスＦ、カルジオウイルスＥ、またはカルジオウイルスＢに由来する。いくつかの実施形態では、ＩＲＥＳは、配列番号１３７、５８０、６４８、６９３、７５２、７８５、７９１、７９３、８２０、８２３、８３９、８４０、８６１、８６２、８６３、８７６、９２２、９５９、９８３、９８４、１０１５、１０１７、１０２３、１０２６、１０３１、１０４１、１０４７、１０５９、１０６８、１１３４、１１６８、１１６９、１１７１、１１７７、１１７８、１１７９、１１８０、１１８９、１１９２、１１９３、１１９８、１２１６、１２６３、１２７６、１２８０、１２８２、１２８４、１２８７、１３４６、１３５４、１３５６、１４３２、１４３６、１４３８、１４３９、１４４０、２２８５、２７７７、２７７８、３２８３、及び３２８４から選択される配列を含む。

【００１６】

いくつかの実施形態では、細胞は、Ｔ細胞である。いくつかの実施形態では、ＩＲＥＳは、パセリウイルス、ボピウイルス、ハニウイルス、ミスシウイルス、エンテロウイルス、コブウイルス、ラボウイルス、トットリウイルス、サリウイルス、カルジオウイルス、パレコウイルス、メグリウイルス（Ｍｅｇｒｉｖｉｒｕｓ）、アレキシウイルス（Ａｌｌｅｘｉｖｉｒｕｓ）、オシウイルス、またはシャンバウイルス（Ｓｈａｎｂａｖｉｒｕｓ）に由来する。いくつかの実施形態では、ＩＲＥＳは、パセリウイルス、ハニウイルス、ミスシウイルス、エンテロウイルス、またはコブウイルスに由来する。いくつかの実施形

態では、ＩＲＥＳは、エンテロウイルスＩ、エンテロウイルスＤ、エンテロウイルスＣ、エンテロウイルスＡ、エンテロウイルスＪ、エンテロウイルスＨ、アイチウイルスＢ、パレコウイルスＡ、またはカルジオウイルスＢに由来する。いくつかの実施形態では、ＩＲＥＳは、配列番号７７、７８７、７９３、８２０、８３９、８４０、８４３、８５２、８５７、８６１、８６２、８６３、８６４、８７１、８７４、８７６、９５９、１１９３、１２１６、１２８４、１２８７、１３４６、１３５６、１３６４、１４３２、１４３８、１４４０、２６６７、２６８１、２７４２、２７４６、２７５８、３２８３、及び３２８４から選択される配列を含む。

【００１７】

いくつかの実施形態では、アプタマー複合体またはその断片は、天然または合成のアプタマー配列を含む。いくつかの実施形態では、アプタマー複合体またはその断片は、配列番号３２６６～３２６８から選択される配列を含む。いくつかの実施形態では、アプタマー複合体またはその断片は、１つを超えるアプタマーを含む。

【００１８】

いくつかの実施形態では、ＴＩＥは、ＵＴＲ及びアプタマー複合体を含む。いくつかの実施形態では、ＵＴＲは、アプタマー複合体の上流に位置する。いくつかの実施形態では、ＴＩＥは、アクセサリ要素をさらに含む。いくつかの実施形態では、アクセサリ要素は、ｍｉＲＮＡ結合部位もしくはその断片、制限部位もしくはその断片、ＲＮＡ編集モチーフもしくはその断片、ＺＩＰコード要素もしくはその断片、ＲＮＡ輸送要素もしくはその断片、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、アクセサリ要素は、ＩＲＥＳトランス活性化因子（ＩＴＡＦ）との結合ドメインを含む。いくつかの実施形態では、結合ドメインは、ポリＡ領域、ポリＣ領域、ポリＡＣ領域、ポリピリミジントラクト、またはそれらの組み合わせもしくはバリアントを含む。いくつかの実施形態では、ＩＴＡＦは、ポリ（ｒＣ）結合タンパク質１（ＰＣＢＰ１）、ＰＣＢＰ２、ＰＣＢＰ３、ＰＣＢＰ４、ポリ（Ａ）結合タンパク質１（ＰＡＢＰ１）、ポリピリミジントラクト結合タンパク質（ＰＴＢ）、アルゴノートタンパク質ファミリーメンバー、ＨＮＲＮＰＫ（ヘテロ核リボヌクレオタンパク質Ｋ）、またはＬａタンパク質、あるいはその断片もしくは組み合わせを含む。

【００１９】

いくつかの実施形態では、コード要素は、治療用タンパク質をコードする配列を含む。いくつかの実施形態では、治療用タンパク質は、キメラタンパク質を含む。いくつかの実施形態では、キメラタンパク質は、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）、Ｂ細胞受容体（ＢＣＲ）、免疫細胞活性化もしくは阻害性受容体、組換え融合タンパク質、キメラ変異タンパク質、または融合タンパク質、あるいはそれらの組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、治療用タンパク質は、抗体、ナノボディ、非抗体タンパク質、免疫調節リガンド、受容体、構造タンパク質、成長因子リガンドもしくは受容体、ホルモンもしくはホルモン受容体、転写因子、チェックポイント阻害剤もしくはアゴニスト、Ｆｃ融合タンパク質、抗凝固剤、血液凝固因子、シャペロンタンパク質、抗菌タンパク質、構造タンパク質、生化学酵素、タイトジャンクション構成タンパク質、ミトコンドリアストレス応答、細胞骨格タンパク質、金属結合タンパク質、または低分子を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節リガンドは、インターフェロン、サイトカイン、ケモカイン、またはインターロイキンを含む。いくつかの実施形態では、構造タンパク質は、チャネルタンパク質または核孔タンパク質である。

【００２０】

いくつかの実施形態では、非コード要素は、１つを超える非コード要素を含む。いくつかの実施形態では、非コード要素は、５０～１５，０００ヌクレオチド長を含む。

【００２１】

いくつかの実施形態では、コア機能要素は、終結配列を含む。いくつかの実施形態では、終結配列は、３’増強エクソン要素の５’末端に位置する。いくつかの実施形態では、終結配列は、終止コドンである。いくつかの実施形態では、終結配列は、終止カセットであ

る。いくつかの実施形態では、終止カセットは、１つ以上のフレーム内に１つ以上の終止コドンを含む。いくつかの実施形態では、各フレームは、終止コドンを含む。いくつかの実施形態では、各フレームは、２つ以上の終止コドンを含む。

【００２２】

いくつかの実施形態では、５’増強イントロン要素は、３’イントロン断片を含む。いくつかの実施形態では、３’イントロン断片は、３’グループＩイントロンスプライス部位ジヌクレオチドの第１のヌクレオチド、または第１及び第２のヌクレオチドをさらに含む。いくつかの実施形態では、３’イントロン断片は、５’増強イントロン要素の３’末端に位置する。いくつかの実施形態では、グループＩイントロンは、細菌ファージ、ウイルスベクター、オルガネラゲノム、核ｒＤＮＡ遺伝子に由来するものを含む。いくつかの実施形態では、核ｒＤＮＡ遺伝子は、真菌、植物、もしくは藻類に由来する核ｒＤＮＡ遺伝子、またはその断片を含む。

【００２３】

いくつかの実施形態では、５’増強イントロン要素は、５’末端に位置する先導非翻訳配列を含む。いくつかの実施形態では、先導非翻訳配列は、スペーサーを含む。いくつかの実施形態では、先導非翻訳配列は、転写開始部位の最後のヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、先導非翻訳配列は、１～１００の追加のヌクレオチドを含む。

【００２４】

いくつかの実施形態では、５’増強イントロン要素は、５’親和性配列を含む。いくつかの実施形態では、５’親和性配列は、ポリＡ、ポリＡ　Ｃ、またはポリピリミジン配列を含む。いくつかの実施形態では、５’親和性配列は、１０～１００ヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、５’増強イントロン要素は、５’外部スペーサー配列を含む。いくつかの実施形態では、５’外部スペーサー配列は、５’親和性配列と３’イントロン断片との間に位置する。いくつかの実施形態では、５’外部スペーサー配列は、約６～６０ヌクレオチドの長さを有する。いくつかの実施形態では、５’外部スペーサー配列は、配列番号３０９４～３１５２から選択される配列を含むか、またはそれからなる。

【００２５】

いくつかの実施形態では、５’増強イントロン要素は、以下の順序で、ａ．先導非翻訳配列と、ｂ．５’親和性配列と、ｃ．５’外部スペーサー配列と、ｄ．３’グループＩイントロンスプライス部位の第１のヌクレオチドを含む３’イントロン断片と、を含み、先導非翻訳配列は、転写開始部位の最後のヌクレオチド及び１～１００ヌクレオチドを含む。

【００２６】

いくつかの実施形態では、５’増強イントロン要素は、以下の順序で、ａ．先導非翻訳配列と、ｂ．５’外部スペーサー配列と、ｃ．５’親和性配列と、ｄ．３’グループＩイントロンスプライス部位の第１のヌクレオチドを含む３’イントロン断片と、を含み、先導非翻訳配列は、転写開始部位の最後のヌクレオチド及び１～１００ヌクレオチドを含む。

【００２７】

いくつかの実施形態では、５’増強イントロン要素は、以下の順序で、ａ．先導非翻訳配列と、ｂ．５’親和性配列と、ｃ．５’外部スペーサー配列と、ｄ．３’グループＩイントロンスプライス部位の第１及び第２のヌクレオチドを含む３’イントロン断片と、を含み、先導非翻訳配列は、転写開始部位の最後のヌクレオチド及び１～１００ヌクレオチドを含み、５’増強エクソン要素は、３’グループＩスプライス部位ジヌクレオチドの第２のヌクレオチドを欠く３’エクソン断片を含む。

【００２８】

いくつかの実施形態では、５’増強イントロン要素は、以下の順序で、ａ．先導非翻訳配列と、ｂ．５’外部スペーサー配列と、ｃ．５’親和性配列と、ｄ．３’グループＩスプライス部位の第１及び第２のヌクレオチドを含む３’イントロン断片と、を含み、先導非翻訳配列は、転写開始部位の最後のヌクレオチド及び１～１００ヌクレオチドを含み、５’増強エクソン要素は、３’グループＩスプライス部位ジヌクレオチドの第２のヌクレオチドを欠く３’エクソン断片を含む。

【００２９】
いくつかの実施形態では、５’増強エクソン要素は、３’エクソン断片を含む。いくつかの実施形態では、３’エクソン断片は、３’グループＩイントロンスプライス部位ジヌクレオチドの第２のヌクレオチドをさらに含む。いくつかの実施形態では、３’エクソン断片は、天然エクソンに由来する１～１００の天然ヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、天然エクソンは、グループＩイントロン含有遺伝子またはその断片に由来する。いくつかの実施形態では、天然エクソンは、Ａｎａｂａｅｎａ細菌、Ｔ４ファージウイルス、Ｔｗｏｒｔバクテリオファージ、Ｔｅｔｒａｈｙｍｅｎａ、またはＡｚｏａｒｃｕｓ細菌に由来する。
【００３０】
いくつかの実施形態では、５’増強エクソン要素は、３’エクソン断片の下流に位置する５’内部スペーサー配列を含む。いくつかの実施形態では、５’内部スペーサー配列は、約６～６０ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、５’内部スペーサー配列は、配列番号３０９４～３１５２から選択される配列を含むか、またはそれからなる。
【００３１】
いくつかの実施形態では、５’増強エクソン要素は、以下の順序で、ａ．３’グループＩイントロンスプライス部位ジヌクレオチドの第２のヌクレオチドを含む３’エクソン断片と、ｂ．５’内部スペーサー配列と、を含み、３’エクソン断片は、天然エクソンに由来する１～１００の天然ヌクレオチドを含む。
【００３２】
いくつかの実施形態では、５’増強エクソン要素は、以下の順序で、ａ．３’エクソン断片と、ｂ．５’内部スペーサー配列と、を含み、３’エクソン断片は、天然エクソンに由来する１～１００の天然ヌクレオチドを含み、５’増強イントロン要素は、３’グループＩスプライス部位ジヌクレオチドの第１及び第２のヌクレオチドを含む３’イントロン断片を含む。
【００３３】
いくつかの実施形態では、３’増強エクソン要素は、５’エクソン断片を含む。いくつかの実施形態では、５’エクソン断片は、５’グループＩイントロン断片の第１のヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、５’エクソン断片は、天然エクソンに由来する１～１００ヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、天然エクソンは、グループＩイントロン含有遺伝子またはその断片に由来する。
【００３４】
いくつかの実施形態では、３’増強エクソン要素は、３’内部スペーサー配列を含むいくつかの実施形態では、３’内部スペーサー配列は、終結配列と５’エクソン断片との間に位置する。いくつかの実施形態では、３’内部スペーサーは、約６～６０ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、３’内部スペーサーは、配列番号３０９４～３１５２から選択される配列を含むか、またはそれからなる。
【００３５】
いくつかの実施形態では、３’増強エクソン要素は、ａ．３’内部スペーサー配列と、ｂ．５’グループＩイントロンスプライス部位ジヌクレオチドの第１のヌクレオチドを含む５’エクソン断片と、を含み、５’エクソン断片は、天然エクソンに由来する１～１００ヌクレオチドを含む。
【００３６】
いくつかの実施形態では、３’増強エクソン要素は、ａ．３’内部スペーサー配列と、ｂ．５’エクソン断片と、を含み、５’エクソン断片は、天然エクソンに由来する１～１００のヌクレオチドを含み、３’増強イントロン要素は、５’グループＩイントロンスプライス部位ジヌクレオチドの第１及び第２のヌクレオチドを含む５’イントロン断片を含む。
【００３７】
いくつかの実施形態では、３’増強イントロン要素は、５’イントロン断片を含む。いくつかの実施形態では、５’イントロン断片は、５’グループＩイントロンスプライス部位ジ

ヌクレオチドの第２のヌクレオチドを含む。
【００３８】
いくつかの実施形態では、３’増強イントロン要素は、５’イントロンの３’末端に位置する後端非翻訳配列を含む。いくつかの実施形態では、後端非翻訳配列は、３～１２ヌクレオチドを含む。
【００３９】
いくつかの実施形態では、３’増強イントロン断片は、３’外部スペーサー配列を含む。いくつかの実施形態では、３’外部スペーサー配列は、５’イントロン断片と後端非翻訳配列との間に位置する。いくつかの実施形態では、３’外部スペーサー配列が、６～６０ヌクレオチド長の長さを有する。いくつかの実施形態では、３’外部スペーサー配列は、配列番号３０９４～３１５２から選択される配列を含むか、またはそれからなる。
【００４０】
いくつかの実施形態では、３’増強イントロン要素は、３’親和性配列を含む。いくつかの実施形態では、３’親和性配列は、３’外部スペーサー配列と後端非翻訳配列との間に位置する。いくつかの実施形態では、３’親和性配列は、ポリＡ、ポリＡＣ、またはポリピリミジン配列を含む。いくつかの実施形態では、親和性配列は、１０～１００ヌクレオチドを含む。
【００４１】
いくつかの実施形態では、５’増強イントロン要素は、５’外部二重鎖配列をさらに含み、３’増強イントロン要素は、３’外部二重鎖配列をさらに含む。いくつかの実施形態では、５’外部二重鎖配列及び３’外部二重鎖配列は、互いに完全にまたは部分的に相補的である。いくつかの実施形態では、５’外部二重鎖配列は、完全合成または部分合成ヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、３’外部二重鎖配列は、完全合成または部分合成ヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、３’外部二重鎖配列は、約６～約５０ヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、５’外部二重鎖配列は、約６～約５０ヌクレオチドである。
【００４２】
いくつかの実施形態では、５’増強エクソン要素は、５’内部二重鎖配列をさらに含み、３’増強エクソン要素は、３’内部二重鎖配列をさらに含む。いくつかの実施形態では、５’内部二重鎖配列及び３’内部二重鎖配列が、互いに完全にまたは部分的に相補的である。いくつかの実施形態では、５’内部二重鎖配列が、完全合成または部分合成ヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、３’内部二重鎖配列が、完全合成または部分合成ヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、３’内部二重鎖配列は、約６～約１９ヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、５’内部二重鎖配列は、約６～約１９ヌクレオチドである。
【００４３】
いくつかの実施形態では、３’増強イントロン断片は、以下の順序で、ａ．５’グループＩイントロンスプライス部位ジヌクレオチドの第２のヌクレオチドを含む５’イントロン断片と、ｂ．３’外部スペーサー配列と、ｃ．３’親和性配列と、を含む。
【００４４】
いくつかの実施形態では、３’増強イントロン断片は、以下の順序で、ａ．５’グループＩイントロンスプライス部位ジヌクレオチドの第１及び第２のヌクレオチドを含む５’イントロン断片と、ｂ．３’外部スペーサー配列と、ｃ．３’親和性配列と、を含み、３’増強エクソン要素は、５’グループＩイントロンスプライス部位ジヌクレオチドの第１のヌクレオチドを欠く５’エクソン断片を含む。
【００４５】
いくつかの実施形態では、提供されるＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチドは、以下の順序で、ａ．先導非翻訳配列と、ｂ．５’親和性配列と、ｃ．５’外部二重鎖配列と、ｄ．５’スペーサー配列と、ｅ．３’イントロン断片と、ｆ．３’エクソン断片と、ｇ．５’内部二重鎖配列と、ｈ．５’内部スペーサー配列と、ｉ．翻訳開始要素と、ｊ．コード要素と、ｋ

．終結配列と、ｌ．３’内部スペーサー配列と、ｍ．３’内部二重鎖配列と、ｎ．５’エクソン断片と、ｏ．５’イントロン断片と、ｐ．３’外部二重鎖配列と、ｑ．３’親和性配列と、ｒ．後端非翻訳配列と、を含む。

【００４６】

いくつかの実施形態では、提供されるＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチドは、以下の順序で、ａ．先導非翻訳配列と、ｂ．５’親和性配列と、ｃ．５’外部スペーサー配列と、ｄ．３’イントロン断片と、ｅ．３’エクソン断片と、ｆ．５’内部二重鎖配列と、ｇ．５’内部スペーサー配列と、ｈ．非コード要素と、ｉ．３’内部スペーサー配列と、ｊ．３’内部二重鎖配列と、ｋ．５’エクソン断片と、ｌ．５’イントロン断片と、ｍ．３’外部スペーサー配列と、ｎ．３’親和性配列と、ｏ．後端非翻訳配列と、を含む。

【００４７】

いくつかの実施形態では、提供されるＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチドは、以下の順序で、ａ．先導非翻訳配列と、ｂ．５’親和性配列と、ｃ．５’外部スペーサー配列と、ｄ．３’イントロン断片と、ｅ．３’エクソン断片と、ｆ．５’内部二重鎖配列と、ｇ．５’内部スペーサー配列と、ｈ．翻訳開始要素と、ｉ．コード要素と、ｊ．終結配列と、ｋ．３’内部スペーサー配列と、ｌ．３’内部二重鎖配列と、ｍ．５’エクソン断片と、ｎ．５’イントロン断片と、ｏ．３’外部スペーサー配列と、ｐ．３’親和性配列と、を含む。

【００４８】

いくつかの実施形態では、提供されるＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチドは、以下の順序で、ａ．先導非翻訳配列と、ｂ．５’親和性配列と、ｃ．５’外部スペーサー配列と、ｄ．３’イントロン断片と、ｅ．３’エクソン断片と、ｆ．５’内部スペーサー配列と、ｇ．翻訳開始要素と、ｈ．コード要素と、ｉ．終結配列と、ｊ．３’内部スペーサー配列と、ｋ．５’エクソン断片と、ｌ．５’イントロン断片と、ｍ．３’外部スペーサー配列と、ｎ．３’親和性配列と、を含む。

【００４９】

いくつかの実施形態では、提供されるＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチドは、以下の順序で、ａ．先導非翻訳配列と、ｂ．５’親和性配列と、ｃ．５’外部スペーサー配列と、ｄ．３’イントロン断片と、ｅ．３’エクソン断片と、ｆ．５’内部スペーサー配列と、ｇ．非コード要素と、ｈ．３’内部スペーサー配列と、ｉ．５’エクソン断片と、ｊ．５’イントロン断片と、ｋ．３’外部スペーサー配列と、ｌ．３’親和性配列と、ｍ．後端非翻訳配列と、を含む。

【００５０】

いくつかの実施形態では、提供されるＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチドは、以下の順序で、ａ．先導非翻訳配列と、ｂ．５’親和性配列と、ｃ．５’外部二重鎖配列と、ｄ．５’スペーサー配列と、ｅ．３’イントロン断片と、ｆ．３’エクソン断片と、ｇ．５’内部二重鎖配列と、ｈ．５’内部スペーサー配列と、ｉ．終結配列と、ｊ．コード要素と、ｋ．翻訳開始要素と、ｌ．３’内部スペーサー配列と、ｍ．３’内部二重鎖配列と、ｎ．５’エクソン断片と、ｏ．５’イントロン断片と、ｐ．３’外部二重鎖配列と、ｑ．３’親和性配列と、ｒ．後端非翻訳配列と、を含む。

【００５１】

いくつかの実施形態では、コード要素は、２つ以上のタンパク質コード領域を含む。いくつかの実施形態では、ＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチドは、第１発現配列と第２発現配列との間のタンパク質切断部位またはリボソームスタッタリング要素をコード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、リボソームスタッタリング要素が、自己切断スペーサーである。いくつかの実施形態では、ＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチドは、２Ａリボソームスタッタリングペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含む。

【００５２】

いくつかの実施形態では、コア機能要素は、２つ以上の配列内リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ）を含む。いくつかの実施形態では、コア機能要素は、ＴＩＥ、コード要素、終結配列、任意にスペーサー、ＴＩＥ、コード配列、及び終結配列を含み、ＴＩＥは、ＩＲＥ

Ｓを含む。

【００５３】

また、本明細書では、本明細書で提供される前駆体ＲＮＡポリヌクレオチドから生成される環状ＲＮＡポリヌクレオチドも提供される。いくつかの実施形態では、ＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチドは、ＰＣＲ産物、直鎖状プラスミド、非直鎖状プラスミド、直鎖状ミニサークル、非直鎖状ミニサークル、ウイルスベクター、コスミド、ｃｅＤＮＡ、もしくは人工染色体を含む、ベクターまたはＤＮＡから転写される。いくつかの実施形態では、環状ＲＮＡポリヌクレオチドは、天然ヌクレオチドからなる。いくつかの実施形態では、タンパク質コード配列または非コード配列は、コドン最適化される。いくつかの実施形態では、環状ＲＮＡポリヌクレオチドは、約０．１～約１５キロベース長である。いくつかの実施形態では、環状ＲＮＡポリヌクレオチドは、同等の最適化前ポリヌクレオチドに存在する少なくとも１つのマイクロＲＮＡ結合部位を欠くように最適化される。いくつかの実施形態では、環状ＲＮＡポリヌクレオチドは、同等の最適化前ポリヌクレオチドに存在する少なくとも１つのＲＮＡ編集感受性部位を欠くように最適化される。いくつかの実施形態では、環状ＲＮＡポリヌクレオチドは、ヒトにおいて少なくとも２０時間のインビボでの治療効果の持続期間を有する。いくつかの実施形態では、環状ＲＮＡポリヌクレオチドは、少なくとも６時間の機能的半減期を有する。いくつかの実施形態では、環状ＲＮＡポリヌクレオチドは、同じ発現配列を含む同等の直鎖状ＲＮＡポリヌクレオチドよりも長いまたは同等のヒト細胞における治療効果の持続期間を有する。いくつかの実施形態では、環状ＲＮＡポリヌクレオチは、同じ発現配列を有する同等の直鎖状ＲＮＡポリヌクレオチドのものよりも長いヒトにおける治療効果のインビボ持続期間を有する。

【００５４】

また、本明細書に提供されるのは、翻訳開始要素（ＴＩＥ）を作製する方法であって、ａ．ウイルス非翻訳領域（ＵＴＲ）を取得することと、ｂ．配列を徐々に欠失させることによって、開始因子と結合することができる、及び／または翻訳を開始することができる、ＵＴＲの機能単位を決定することと、ｃ．ＵＴＲの非機能単位を除去することと、ｄ．任意で、ＵＴＲの末端を修飾することと、を含む、方法である。いくつかの実施形態では、ＵＴＲの末端の修飾は、ウイルスＵＴＲの約１％～７５％である。いくつかの実施形態では、ＵＴＲの機能単位が、重要な領域を識別するために、ＵＴＲの５’及び３’末端からの欠失スキャンまたはＵＴＲの長さにわたる変異スキャンによって決定される。

【００５５】

また、本明細書では、本明細書に提供される環状ＲＮＡポリヌクレオチド、ナノ粒子、及び任意に、ナノ粒子と作動可能に接続された標的化部分を含む、薬学的組成物が本明細書に提供される。いくつかの実施形態では、ナノ粒子は、脂質ナノ粒子、コア・シェルナノ粒子、生分解性ナノ粒子、生分解性脂質ナノ粒子、ポリマーナノ粒子、ポリプレックス、または生分解性ポリマーナノ粒子である。いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、標的化部分を含み、標的化部分は、細胞単離または精製の非存在下で選択された細胞集団または組織の選択された細胞への受容体媒介エンドサイトーシス、エンドソーム融合、または直接融合を媒介する。いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、ナノ粒子と作動可能に接続された標的化部分を含む。いくつかの実施形態では、標的化部分は、低分子、ｓｃＦｖ、ナノボディ、ペプチド、環状ペプチド、二環状もしくは三環状ペプチド、ミニボディ、ポリヌクレオチドアプタマー、操作足場タンパク質、重鎖可変領域、軽鎖可変領域、またはそれらの断片である。いくつかの実施形態では、組成物におけるポリヌクレオチドの１重量％未満が、二本鎖ＲＮＡ、ＤＮＡスプリント、ＤＮＡ鋳型、または三リン酸化ＲＮＡである。いくつかの実施形態では、薬学的組成物におけるポリヌクレオチド及びタンパク質の１重量％未満が、二本鎖ＲＮＡ、ＤＮＡスプリント、ＤＮＡ鋳型、三リン酸化ＲＮＡ、ホスファターゼタンパク質、プロテインリガーゼ、ＲＮＡポリメラーゼ、及びキャッピング酵素である。

【００５６】

また、本明細書に提供されるのは、薬学的組成物であって、本明細書に提供される環状

ＲＮＡポリヌクレオチドと、リポソーム、デンドリマー、炭水化物担体、グリカンナノ材料、フソーム、エクソソーム、またはそれらの組み合わせとを含む、薬学的組成物である。

【００５７】

また、本明細書に提供されるのは、薬学的組成物であって、本明細書に提供される環状ＲＮＡポリヌクレオチドと、薬学的塩、緩衝液、希釈剤、またはそれらの組み合わせと、を含む、薬学的組成物である。

【００５８】

また、本明細書に提供されるのは、処置を必要とする対象を処置する方法であって、本明細書に提供される環状ＲＮＡポリヌクレオチド、ナノ粒子、及び任意に、ナノ粒子と作動可能に接続された標的化部分を含む治療的有効量の組成物を投与することを含む、方法である。いくつかの実施形態では、標的化部分は、低分子、ｓｃＦｖ、ナノボディ、ペプチド、環状ペプチド、二環状もしくは三環状ペプチド、ミニボディ、重鎖可変領域、操作足場タンパク質、軽鎖可変領域、またはそれらの断片である。いくつかの実施形態では、ナノ粒子は、脂質ナノ粒子、コア・シェルナノ粒子、または生分解性ナノ粒子である。いくつかの実施形態では、ナノ粒子は、１つ以上のカチオン性脂質、イオン化可能脂質、またはポリβ－アミノエステルを含む。いくつかの実施形態では、ナノ粒子は、１つ以上の非カチオン性脂質を含む。いくつかの実施形態では、ナノ粒子は、１つ以上のＰＥＧ修飾脂質、ポリグルタミン酸脂質、またはヒアルロン酸脂質を含む。いくつかの実施形態では、ナノ粒子は、コレステロールを含む。いくつかの実施形態では、ナノ粒子は、アラキドン酸、ロイコトリエン、またはオレイン酸を含む。いくつかの実施形態では、組成物が、標的化部分を含み、標的化部分が、細胞選択または精製の非存在下で選択された細胞集団の細胞へ選択的に受容体媒介エンドサイトーシスを媒介する。いくつかの実施形態では、提供されるナノ粒子は、１つを超える環状ＲＮＡポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、対象は、急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）、胞状横紋筋肉腫、Ｂ細胞悪性腫瘍、膀胱癌（例えば、膀胱癌腫）、骨癌、脳癌（例えば、髄芽腫及び多形神経膠芽腫）、乳癌、肛門、肛門管、または肛門直腸の癌、眼の癌、肝内胆管の癌、関節の癌、首の癌、胆嚢癌、胸膜癌、鼻、鼻腔、または中耳の癌、口腔の癌、外陰の癌、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性癌、結腸癌、食道癌、子宮頸癌、線維肉腫、消化管カルチノイド腫瘍、頭頸部癌（例えば、頭頸部扁平上皮癌）、ホジキンリンパ腫、下咽頭癌、腎臓癌、喉頭癌、白血病、液体腫瘍、脂肪腫、肝臓癌、肺癌（例えば、非小細胞肺癌、肺腺癌、及び小細胞肺癌）、リンパ腫、中皮腫、肥満細胞腫、黒色腫、多発性骨髄腫、上咽頭癌、非ホジキンリンパ腫、Ｂ慢性リンパ球性白血病、有毛細胞白血病、バーキットリンパ腫、卵巣癌、膵臓癌、腹膜癌、大網の癌、腸間膜癌、咽頭癌、前立腺癌、直腸癌、腎癌、皮膚癌、小腸癌、軟部組織癌、固形腫瘍、滑膜肉腫、胃癌、奇形腫、精巣癌、甲状腺癌、ならびに尿管癌からなる群から選択されるがんを有する。いくつかの実施形態では、対象が、強皮症、バセドウ病、クローン病、シェールゲン病、多発性硬化症、橋本病、乾癬、重症筋無力症、自己免疫性多腺性内分泌不全症候群、Ｉ型糖尿病（ＴＩＤＭ）、自己免疫性胃炎、自己免疫性ブドウ膜網膜炎、多発性筋炎、大腸炎、甲状腺炎、ヒトループスによって典型的に表される全身性自己免疫疾患から選択される自己免疫障害を有する。

【００５９】

また、本明細書に提供されるのは、本明細書に提供される環状ＲＮＡポリヌクレオチドまたは薬学的組成物を含む真核細胞である。いくつかの実施形態では、真核細胞は、ヒト細胞である。いくつかの実施形態では、真核細胞は、免疫細胞である。いくつかの実施形態では、真核細胞は、Ｔ細胞、樹状細胞、マクロファージ、Ｂ細胞、好中球、または好塩基球である。

【００６０】

また、本明細書に提供されるのは、本明細書に提供される環状ＲＮＡポリヌクレオチドを含む原核細胞である。

【００６１】

別の態様では、本明細書に提供されるのは、環状ＲＮＡを精製する方法であって、親和性配列を用いて固体表面とコンジュゲートしたオリゴヌクレオチドをハイブリダイズすることを含む、方法である。

【００６２】

いくつかの実施形態では、親和性配列の１つ以上のコピーは、ＲＮＡ前駆体中に存在する。いくつかの実施形態では、ＲＮＡ前駆体は、本明細書に記載の前駆体である。いくつかの実施形態では、環状ＲＮＡは、本明細書に記載の環状ＲＮＡである。いくつかの実施形態では、親和性配列は、環状ＲＮＡの形成中に除去される。いくつかの実施形態では、方法は、環状ＲＮＡをＲＮＡ前駆体から分離することを含む。

【００６３】

いくつかの実施形態では、親和性配列は、ポリＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、親和性配列にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドは、デオキシチミジンオリゴヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、親和性配列は、専用結合部位（ＤＢＳ）を含む。いくつかの実施形態では、ＤＢＳは、ＴＡＴＡＡＴＴＣＴＡＣＣＣＴＡＴＴＧＡＧＧＣＡＴＴＧＡＣＴＡ（配列番号３２６９）のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、親和性配列とハイブリダイズするオリゴヌクレオチドは、ＤＢＳと相補的な配列を含む。

【００６４】

別の態様では、本明細書に提供されるのは、環状ＲＮＡを精製する方法であって、ａ．直鎖状ＲＮＡ及び環状ＲＮＡを含む組成物を、環状ＲＮＡよりも直鎖状ＲＮＡと優先的に結合する結合剤と接触させることと、ｂ．結合剤と結合したＲＮＡを、結合剤と結合していないＲＮＡから分離することと、を含む、方法である。

【００６５】

いくつかの実施形態では、結合剤は、固体支持体とコンジュゲートされる。いくつかの実施形態では、固体支持体は、アガロース、アガロース由来樹脂、セルロース、セルロース繊維、磁気ビーズ、ハイスループットマイクロタイタープレート、非アガロース樹脂、ガラス表面、ポリマー表面、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、固体支持体は、アガロースまたはセルロースを含む。

【００６６】

いくつかの実施形態では、結合剤は、直鎖状ＲＮＡに存在し、環状ＲＮＡには存在しない配列と相補的であるオリゴヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、結合剤は、直鎖状ＲＮＡに存在し、環状ＲＮＡには存在しない配列と１００％相補的であるオリゴヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、直鎖状ＲＮＡに存在し、環状ＲＮＡには存在しない配列は、親和性配列である。いくつかの実施形態では、直鎖状ＲＮＡに存在し、環状ＲＮＡには存在しない配列は、ポリＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、結合剤は、ポリデオキシチミジン配列を含むオリゴヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、直鎖状ＲＮＡに存在し、環状ＲＮＡには存在しない配列は、ＤＢＳ配列を含む。いくつかの実施形態では、ＤＢＳ配列は、ＴＡＴＡＡＴＴＣＴＡＣＣＣＴＡＴＴＧＡＧＧＣＡＴＴＧＡＣＴＡ（配列番号３２６９）のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、直鎖状ＲＮＡに存在し、環状ＲＮＡには存在しない配列は、１０～１５０ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、直鎖状ＲＮＡに存在し、環状ＲＮＡには存在しない配列は、１０～７０ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、直鎖状ＲＮＡに存在し、環状ＲＮＡには存在しない配列は、２０～３０ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、直鎖状ＲＮＡに存在し、環状ＲＮＡには存在しない配列は、直鎖状ＲＮＡ中の２つの位置に存在する。いくつかの実施形態では、直鎖状ＲＮＡに存在し、環状ＲＮＡには存在しない配列は、直鎖状ＲＮＡの転写中に直鎖状ＲＮＡにコードされる。いくつかの実施形態では、直鎖状ＲＮＡに存在し、環状ＲＮＡには存在しない配列は、直鎖状ＲＮＡに酵素的に付加される。いくつかの実施形態では、直鎖状ＲＮＡは、メチルグアニル酸キャップを含まない。いくつかの実施形態では、直鎖状ＲＮＡは、ＲＮＡ前駆体またはその断片を含む。

【００６７】
いくつかの実施形態では、ＲＮＡ前駆体は、本明細書に記載のＲＮＡ前駆体またはその断片である。いくつかの実施形態では、ＲＮＡ前駆体は、インビトロ転写（ＩＶＴ）を使用して産生される。いくつかの実施形態では、断片は、イントロンを含む。いくつかの実施形態では、直鎖状ＲＮＡは、早期終結ＲＮＡまたは不完全な転写によって形成されたＲＮＡを含む。
【００６８】
いくつかの実施形態では、環状ＲＮＡは、本明細書に記載の環状ＲＮＡを含む。いくつかの実施形態では、環状ＲＮＡは、ＲＮＡ前駆体をスプライシングすることを含む方法を使用して産生される。いくつかの実施形態では、直鎖状ＲＮＡには存在し、環状ＲＮＡには存在しない配列は、スプライシング中に切除される。いくつかの実施形態では、環状ＲＮＡは、６キロベース未満のサイズである。
【００６９】
いくつかの実施形態では、分離することは、固体支持体から非結合ＲＮＡを除去することを含む。いくつかの実施形態では、除去することは、固体支持体から非結合ＲＮＡを溶出することを含む。
【００７０】
いくつかの実施形態では、方法は、組成物を加熱することを含む。いくつかの実施形態では、方法は、緩衝液交換を含む。いくつかの実施形態では、緩衝液交換は、接触することの前に実施される。いくつかの実施形態では、緩衝液交換は、分離することの後に実施される。いくつかの実施形態では、緩衝液交換は、接触することの前に実施され、得られる緩衝液は、１ｍＭを超える一価塩を含む。いくつかの実施形態では、一価塩は、ＮａＣｌまたはＫＣｌである。いくつかの実施形態では、得られる緩衝液は、Ｔｒｉｓを含む。いくつかの実施形態では、得られる緩衝液は、ＥＤＴＡを含む。いくつかの実施形態では、緩衝液交換は、保存緩衝液に分離することの後に実施され、保存緩衝液は、１ｍＭクエン酸ナトリウム、ｐＨ６．５を含む。いくつかの実施形態では、方法は、分離することの後に環状ＲＮＡを濾過することを含む。
【図面の簡単な説明】
【００７１】
【図１Ａ】ガウシアルシフェラーゼ発現配列及び様々なＩＲＥＳ配列を含む環状ＲＮＡを用いたトランスフェクションから２４時間後のＨＥＫ２９３細胞の上清における発光を示す。
【図１Ｂ】ガウシアルシフェラーゼ発現配列及び様々なＩＲＥＳ配列を含む環状ＲＮＡを用いたトランスフェクションから２４時間後のＨｅｐＧ２細胞の上清における発光を示す。
【図１Ｃ】ガウシアルシフェラーゼ発現配列及び様々なＩＲＥＳ配列を含む環状ＲＮＡを用いたトランスフェクションから２４時間後の１Ｃ１Ｃ７細胞の上清における発光を示す。
【図１Ｄ】ガウシアルシフェラーゼ発現配列及び様々なＩＲＥＳ配列を含む環状ＲＮＡを用いたトランスフェクションから２４時間後のＨＥＫ２９３細胞の上清における発光を示す。
【図１Ｅ】ガウシアルシフェラーゼ発現配列及び様々なＩＲＥＳ配列を含む環状ＲＮＡを用いたトランスフェクションから２４時間後のＨＥＫ２９３細胞の上清における発光を示す。
【図２】ガウシアルシフェラーゼ発現配列及び異なる長さを有する様々なＩＲＥＳ配列を含む環状ＲＮＡを用いたトランスフェクションから２４時間後のＨＥＫ２９３（Ａ）、ＨｅｐＧ２（Ｂ）、または１Ｃ１Ｃ７（Ｃ）細胞の上清における発光を示す。
【図３】発光によって測定された、３日間にわたるＨｅｐＧ２（Ａ）または１Ｃ１Ｃ７（Ｂ）細胞における選択されたＩＲＥＳ構築物の安定性を示す。
【図４】細胞上清中の分泌されたガウシアルシフェラーゼからの発光によって測定された

、Ｊｕｒｋａｔ細胞における選択されたＩＲＥＳ構築物からのタンパク質発現を示す。
【図５】発光によって測定された、３日間にわたるＪｕｒｋａｔ細胞における選択されたＩＲＥＳ構築物の安定性を示す。
【図６Ａ】ガウシアルシフェラーゼをコードする修飾直鎖状、未精製環状、または精製環状ＲＮＡの２４時間発光の比較を示す。
【図６Ｂ】ガウシアルシフェラーゼをコードする修飾直鎖状、未精製環状、または精製環状ＲＮＡの３日間にわたる相対発光の比較を示す。
【図７Ａ】修飾直鎖状、未精製環状、または精製環状ＲＮＡを用いたＪｕｒｋａｔ細胞のエレクトロポレーション後の、ＩＦＮγの転写産物誘導を示す。
【図７Ｂ】修飾直鎖状、未精製環状、または精製環状ＲＮＡを用いたＪｕｒｋａｔ細胞のエレクトロポレーション後の、ＩＬ－６の転写産物誘導を示す。
【図７Ｃ】修飾直鎖状、未精製環状、または精製環状ＲＮＡを用いたＪｕｒｋａｔ細胞のエレクトロポレーション後の、ＩＬ－２の転写産物誘導を示す。
【図７Ｄ】修飾直鎖状、未精製環状、または精製環状ＲＮＡを用いたＪｕｒｋａｔ細胞のエレクトロポレーション後の、ＲＩＧ－Ｉの転写産物誘導を示す。
【図７Ｅ】修飾直鎖状、未精製環状、または精製環状ＲＮＡを用いたＪｕｒｋａｔ細胞のエレクトロポレーション後の、ＩＦＮ－β１の転写産物誘導を示す。
【図７Ｆ】修飾直鎖状、未精製環状、または精製環状ＲＮＡを用いたＪｕｒｋａｔ細胞のエレクトロポレーション後の、ＴＮＦαの転写産物誘導を示す。
【図８Ａ】ヒト初代単球におけるガウシアルシフェラーゼをコードする環状ＲＮＡ及び修飾直鎖状ＲＮＡの発光の比較を示す。
【図８Ｂ】マクロファージにおけるガウシアルシフェラーゼをコードする環状ＲＮＡ及び修飾直鎖状ＲＮＡの発光の比較を示す。
【図８Ｃ】マクロファージにおけるガウシアルシフェラーゼをコードする環状ＲＮＡ及び修飾直鎖状ＲＮＡの発光の比較を示す。
【図９】ガウシアルシフェラーゼ発現配列及び様々なＩＲＥＳ配列を含む環状ＲＮＡを用いた形質導入後の初代Ｔ細胞の上清における３日間にわたる相対発光（Ａ）または２４時間発光（Ｂ）を示す。
【図１０Ａ】ガウシアルシフェラーゼ発現配列を含む環状ＲＮＡまたは修飾直鎖状ＲＮＡを用いた形質導入後の初代Ｔ細胞の上清における２４時間発光を示す。
【図１０Ｂ】ガウシアルシフェラーゼ発現配列を含む環状ＲＮＡまたは修飾直鎖状ＲＮＡを用いた形質導入後の初代Ｔ細胞の上清における３日間にわたる相対発光を示す。
【図１０Ｃ】ガウシアルシフェラーゼ発現配列を含む環状ＲＮＡまたは修飾直鎖状ＲＮＡを用いた形質導入後の初代Ｔ細胞のＰＢＭＣにおける２４時間発光を示す。
【図１１】異なる順列置換部位を有するＲＮＡ構築物のＨＰＬＣクロマトグラム（Ａ）及び環状化効率（Ｂ）を示す。
【図１２】異なるイントロン及び／または順列置換部位を有するＲＮＡ構築物のＨＰＬＣクロマトグラム（Ａ）及び環状化効率（Ｂ）を示す。
【図１３Ａ】相同性アームを伴うまたは伴わない３つのＲＮＡ構築物のＨＰＬＣクロマトグラムを示す。
【図１３Ｂ】相同性アームを伴うまたは伴わない３つのＲＮＡ構築物の環状化効率を示す。
【図１４】相同アームを伴わない、または様々な長さ及びＧＣ含量を有する相同アームを伴う３つのＲＮＡ構築物の環状化効率を示す。
【図１５Ａ】スプライシング効率の改善に対する強い相同アームの寄与、選択された構築物における環状化効率とニッキングとの間の関係、ならびに環状化効率の改善を示すと仮定された順列置換部位及び相同アームの組み合わせを示すＨＰＬＣクロマトグラムを示す。
【図１５Ｂ】スプライシング効率の改善に対する強い相同アームの寄与、選択された構築物における環状化効率とニッキングとの間の関係、ならびに環状化効率の改善を示すと仮

定された順列置換部位及び相同アームの組み合わせを示すＨＰＬＣクロマトグラムを示す。
【図１６】ＧＦＰ及びホタルルシフェラーゼを発現するＲａｊｉ細胞と共培養した、モックエレクトロポレーションした（左）またはＣＡＲをコードする環状ＲＮＡでエレクトロポレーションした（右）Ｔ細胞の蛍光画像を示す。
【図１７】モックエレクトロポレーションした（上）またはＣＡＲをコードする環状ＲＮＡでエレクトロポレーション（下）し、ＧＦＰ及びホタルルシフェラーゼを発現するＲａｊｉ細胞と共培養したＴ細胞の明視野（左）、蛍光（中心）、及びオーバーレイ（右）画像を示す。
【図１８】モックエレクトロポレーションした、または異なるＣＡＲ配列をコードする環状ＲＮＡでエレクトロポレーションしたＴ細胞によるＲａｊｉ標的細胞の特異的溶解を示す。
【図１９】ガウシアルシフェラーゼ発現配列及び様々なＩＲＥＳ配列を含む直鎖状または環状ＲＮＡを用いた形質導入から２４時間後のＪｕｒｋａｔ細胞（左）または休止初代ヒトＣＤ３＋Ｔ細胞（右）の上清における発光（Ａ）、及び３日間にわたる相対発光（Ｂ）を示す。
【図２０Ａ】修飾直鎖状、未精製環状、または精製環状ＲＮＡを用いたヒトＣＤ３＋Ｔ細胞のエレクトロポレーション後のＩＦＮ－β１の転写産物誘導を示す。
【図２０Ｂ】修飾直鎖状、未精製環状、または精製環状ＲＮＡを用いたヒトＣＤ３＋Ｔ細胞のエレクトロポレーション後のＲＩＧ－Ｉの転写産物誘導を示す。
【図２０Ｃ】修飾直鎖状、未精製環状、または精製環状ＲＮＡを用いたヒトＣＤ３＋Ｔ細胞のエレクトロポレーション後のＩＬ－２の転写産物誘導を示す。
【図２０Ｄ】修飾直鎖状、未精製環状、または精製環状ＲＮＡを用いたヒトＣＤ３＋Ｔ細胞のエレクトロポレーション後のＩＬ－６の転写産物誘導を示す。
【図２０Ｅ】修飾直鎖状、未精製環状、または精製環状ＲＮＡを用いたヒトＣＤ３＋Ｔ細胞のエレクトロポレーション後のＩＦＮγの転写産物誘導を示す。
【図２０Ｆ】修飾直鎖状、未精製環状、または精製環状ＲＮＡを用いたヒトＣＤ３＋Ｔ細胞のエレクトロポレーション後のＴＮＦαの転写産物誘導を示す。
【図２１Ａ】ホタル発光の検出によって決定した、ＣＡＲをコードするｃｉｒｃＲＮＡでエレクトロポレーションしたヒト初代ＣＤ３＋Ｔ細胞によるＲａｊｉ標的細胞の特異的溶解を示す。
【図２１Ｂ】ＣＡＲ配列をコードする異なる量の環状または直鎖状ＲＮＡを用いたエレクトロポレーションの２４時間後のＩＦＮγ転写産物誘導を示す。
【図２２】ホタルの発光の検出によって決定した、異なるＥ：Ｔ比（Ａ及びＢ）にてＣＡＲをコードする環状または直鎖状ＲＮＡでエレクトロポレーションしたヒト初代ＣＤ３＋Ｔ細胞による標的細胞または非標的細胞の特異的溶解を示す。
【図２３】エレクトロポレーションの１、３、５、及び７日後での、ＣＡＲをコードするＲＮＡでエレクトロポレーションしたヒトＣＤ３＋Ｔ細胞による標的細胞の特異的溶解を示す。
【図２４】ＣＤ１９またはＢＣＭＡ標的ＣＡＲをコードする環状ＲＮＡでエレクトロポレーションしたヒトＣＤ３＋Ｔ細胞による標的細胞の特異的溶解を示す。
【図２５】ＦＬｕｃをコードし、５０％脂質１０ｂ－１５、１０％ＤＳＰＣ、１．５％ＰＥＧ－ＤＭＧ、及び３８．５％コレステロールで製剤化された環状ＲＮＡが投薬されたＣＤ－１マウスから採取された器官の総フラックスを示す。
【図２６】ＦＬｕｃをコードし、５０％脂質１０ｂ－１５、１０％ＤＳＰＣ、１．５％ＰＥＧ－ＤＭＧ、及び３８．５％コレステロールで製剤化された環状ＲＮＡが投薬されたＣＤ－１マウスから採取された器官の発光を強調する画像を示す。
【図２７Ａ】脂質１０ａ－２６及び１０ａ－２７の分子特徴評価を示す。脂質１０ａ－２６のプロトン核磁気共鳴（ＮＭＲ）スペクトルを示す。
【図２７Ｂ】脂質１０ａ－２６及び１０ａ－２７の分子特徴評価を示す。液体クロマトグ

ラフィー質量分析法（ＬＣ－ＭＳ）によって測定された脂質１０ａ－２６の保持時間を示す。
【図２７Ｃ】脂質１０ａ－２６及び１０ａ－２７の分子特徴評価を示す。脂質１０ａ－２６の質量スペクトルを示す。
【図２７Ｄ】脂質１０ａ－２６及び１０ａ－２７の分子特徴評価を示す。脂質１０ａ－２７のプロトンＮＭＲスペクトルを示す。
【図２７Ｅ】脂質１０ａ－２６及び１０ａ－２７の分子特徴評価を示す。ＬＣ－ＭＳによって測定された脂質１０ａ－２７の保持時間を示す。
【図２７Ｆ】脂質１０ａ－２６及び１０ａ－２７の分子特徴評価を示す。脂質１０ａ－２７の質量スペクトルを示す。
【図２８Ａ】脂質２２－Ｓ１４及びその合成中間体の分子特徴評価を示す。２－（テトラデシルチオ）エタン－１－オールのＮＭＲスペクトルを示す。
【図２８Ｂ】脂質２２－Ｓ１４及びその合成中間体の分子特徴評価を示す。２－（テトラデシルチオ）エチルアクリレートのＮＭＲスペクトルを示す。
【図２８Ｃ】脂質２２－Ｓ１４及びその合成中間体の分子特徴評価を示す。ビス（２－（テトラデシルチオ）エチル）３，３’－（（３－（２－メチル－１Ｈ－イミダゾール－１－イル）プロピル）アザネジル）ジプロピオネート（脂質２２－Ｓ１４）のＮＭＲスペクトルを示す。
【図２９】ビス（２－（テトラデシルチオ）エチル）３，３’－（（３－（１Ｈ－イミダゾール－１－イル）プロピル）アザネジル）ジプロピオネート（脂質９３－Ｓ１４）のＮＭＲスペクトルを示す。
【図３０Ａ】ヘプタデカン－９－イル８－（（３－（２－メチル－１Ｈ－イミダゾール－１－イル）プロピル）（８－（ノニルオキシ）－８－オキソオクチル）アミノ）オクタノエート（脂質１０ａ－５４）の分子特徴評価を示す。脂質１０ａ－５４のプロトンＮＭＲスペクトルを示す。
【図３０Ｂ】ヘプタデカン－９－イル８－（（３－（２－メチル－１Ｈ－イミダゾール－１－イル）プロピル）（８－（ノニルオキシ）－８－オキソオクチル）アミノ）オクタノエート（脂質１０ａ－５４）の分子特徴評価を示す。ＬＣ－ＭＳによって測定された脂質１０ａ－５４の保持時間を示す。
【図３０Ｃ】ヘプタデカン－９－イル８－（（３－（２－メチル－１Ｈ－イミダゾール－１－イル）プロピル）（８－（ノニルオキシ）－８－オキソオクチル）アミノ）オクタノエート（脂質１０ａ－５４）の分子特徴評価を示す。脂質１０ａ－５４の質量スペクトルを示す。
【図３１Ａ】ヘプタデカン－９－イル８－（（３－（１Ｈ－イミダゾール－１－イル）プロピル）（８－（ノニルオキシ）－８－オキソオクチル）アミノ）オクタノエート（脂質１０ａ－５３）の分子特徴評価を示す。脂質１０ａ－５３のプロトンＮＭＲスペクトルを示す。
【図３１Ｂ】ヘプタデカン－９－イル８－（（３－（１Ｈ－イミダゾール－１－イル）プロピル）（８－（ノニルオキシ）－８－オキソオクチル）アミノ）オクタノエート（脂質１０ａ－５３）の分子特徴評価を示す。ＬＣ－ＭＳによって測定された脂質１０ａ－５３の保持時間を示す。
【図３１Ｃ】ヘプタデカン－９－イル８－（（３－（１Ｈ－イミダゾール－１－イル）プロピル）（８－（ノニルオキシ）－８－オキソオクチル）アミノ）オクタノエート（脂質１０ａ－５３）の分子特徴評価を示す。脂質１０ａ－５３の質量スペクトルを示す。
【図３２】Ａは、ホタルルシフェラーゼ（ＦＬｕｃ）をコードし、目的のイオン化可能脂質、ＤＳＰＣ、コレステロール、及びＤＳＰＥ－ＰＥＧ ２０００（Ａｖａｎｔｉ Ｐｏｌａｒ Ｌｉｐｉｄｓ Ｉｎｃ．）で１６：１：４：１の重量比または６２：４：３３：１のモル比で製剤化された環状ＲＮＡが投薬されたＣＤ－１マウスから採取された脾臓及び肝臓の総フラックスを示す。Ｂは、タンパク質発現の生体内分布についての平均輝度を示す。

【図３３】Ａは、ＦＬｕｃをコードし、イオン化可能脂質２２－Ｓ１４、ＤＳＰＣ、コレステロール、及びＤＳＰＥ－ＰＥＧ　２０００（Ａｖａｎｔｉ　Ｐｏｌａｒ　Ｌｉｐｉｄｓ　Ｉｎｃ．）で１６：１：４：１の重量比または６２：４：３３：１のモル比で製剤化された環状ＲＮＡが投薬されたＣＤ－１マウスから採取された器官の発光を強調する画像を示す。Ｂは、ＦＬｕｃをコードし、イオン化可能脂質２２－Ｓ１４、ＤＳＰＣ、コレステロール、及びＤＳＰＥ－ＰＥＧ　２０００（Ａｖａｎｔｉ　Ｐｏｌａｒ　Ｌｉｐｉｄｓ　Ｉｎｃ．）で１６：１：４：１の重量比または６２：４：３３：１のモル比で製剤化された環状ＲＮＡが投薬されたＣＤ－１マウスの全身ＩＶＩＳ画像を示す。

【図３４】Ａは、ＦＬｕｃをコードし、イオン化可能脂質９３－Ｓ１４、ＤＳＰＣ、コレステロール、及びＤＳＰＥ－ＰＥＧ　２０００（Ａｖａｎｔｉ　Ｐｏｌａｒ　Ｌｉｐｉｄｓ　Ｉｎｃ．）で１６：１：４：１の重量比または６２：４：３３：１のモル比で製剤化された環状ＲＮＡが投薬されたＣＤ－１マウスから採取された器官の発光を強調する画像を示す。Ｂは、ＦＬｕｃをコードし、イオン化可能脂質９３－Ｓ１４、ＤＳＰＣ、コレステロール、及びＤＳＰＥ－ＰＥＧ　２０００（Ａｖａｎｔｉ　Ｐｏｌａｒ　Ｌｉｐｉｄｓ　Ｉｎｃ．）で１６：１：４：１の重量比または６２：４：３３：１のモル比で製剤化された環状ＲＮＡが投薬されたＣＤ－１マウスの全身ＩＶＩＳ画像を示す。

【図３５】Ａは、ＦＬｕｃをコードし、イオン化可能脂質１０ａ－２６、ＤＳＰＣ、コレステロール、及びＤＳＰＥ－ＰＥＧ　２０００（Ａｖａｎｔｉ　Ｐｏｌａｒ　Ｌｉｐｉｄｓ　Ｉｎｃ．）で１６：１：４：１の重量比または６２：４：３３：１のモル比で製剤化された環状ＲＮＡが投薬されたＣＤ－１マウスから採取された器官の発光を強調する画像を示す。Ｂは、ＦＬｕｃをコードし、イオン化可能脂質１０ａ－２６、ＤＳＰＣ、コレステロール、及びＤＳＰＥ－ＰＥＧ　２０００（Ａｖａｎｔｉ　Ｐｏｌａｒ　Ｌｉｐｉｄｓ　Ｉｎｃ．）で１６：１：４：１の重量比または６２：４：３３：１のモル比で製剤化された環状ＲＮＡが投薬されたＣＤ－１マウスの全身ＩＶＩＳ画像を示す。

【図３６Ａ】ＦＬｕｃをコードし、脂質１０ｂ－１５（Ａ）、脂質１０ａ－５３（Ｂ）、または脂質１０ａ－５４（Ｃ）で形成された脂質ナノ粒子に封入された環状ＲＮＡが投薬されたｃ５７ＢＬ／６Ｊマウスから採取された器官の発光を強調する画像を示す。ＰＢＳを対照として使用した（Ｄ）。

【図３６Ｂ】ＦＬｕｃをコードし、脂質１０ｂ－１５（Ａ）、脂質１０ａ－５３（Ｂ）、または脂質１０ａ－５４（Ｃ）で形成された脂質ナノ粒子に封入された環状ＲＮＡが投薬されたｃ５７ＢＬ／６Ｊマウスから採取された器官の発光を強調する画像を示す。ＰＢＳを対照として使用した（Ｄ）。

【図３６Ｃ】ＦＬｕｃをコードし、脂質１０ｂ－１５（Ａ）、脂質１０ａ－５３（Ｂ）、または脂質１０ａ－５４（Ｃ）で形成された脂質ナノ粒子に封入された環状ＲＮＡが投薬されたｃ５７ＢＬ／６Ｊマウスから採取された器官の発光を強調する画像を示す。ＰＢＳを対照として使用した（Ｄ）。

【図３６Ｄ】ＦＬｕｃをコードし、脂質１０ｂ－１５（Ａ）、脂質１０ａ－５３（Ｂ）、または脂質１０ａ－５４（Ｃ）で形成された脂質ナノ粒子に封入された環状ＲＮＡが投薬されたｃ５７ＢＬ／６Ｊマウスから採取された器官の発光を強調する画像を示す。ＰＢＳを対照として使用した（Ｄ）。

【図３７】ホタルルシフェラーゼをコードする環状ＲＮＡを含有する試験用脂質ナノ粒子との２４時間のインキュベーション後のヒトＰＢＭＣの溶解物における相対的発光を示す。

【図３８】ＧＦＰまたはＣＤ１９　ＣＡＲのいずれかをコードする環状ＲＮＡを含有する試験用脂質ナノ粒子とインキュベートした後のヒトＰＢＭＣにおけるＧＦＰ（Ａ）及びＣＤ１９　ＣＡＲ（Ｂ）の発現を示す。

【図３９】抗ネズミＣＤ１９　ＣＡＲ発現配列及び様々なＩＲＥＳ配列を含む環状ＲＮＡでリポトランスフェクトされた１Ｃ１Ｃ７細胞における抗ネズミＣＤ１９　ＣＡＲの発現を示す。

【図４０】ネズミＴ細胞に対する抗ネズミＣＤ１９　ＣＡＲの細胞傷害を示す。ＣＤ１９

ＣＡＲは、ネズミＴ細胞にエレクトロポレーションされた環状ＲＮＡによってコードされ、発現する。
【図４１Ａ】抗ネズミＣＤ１９　ＣＡＲをコードする環状ＲＮＡを封入している試験用脂質ナノ粒子が１日おきに注射されたＣ５７ＢＬ／６Ｊマウスにおける末梢血におけるＢ細胞数を示す。
【図４１Ｂ】抗ネズミＣＤ１９　ＣＡＲをコードする環状ＲＮＡを封入している試験用脂質ナノ粒子が１日おきに注射されたＣ５７ＢＬ／６Ｊマウスにおける末梢血におけるＢ細胞数を示す。
【図４１Ｃ】抗ネズミＣＤ１９　ＣＡＲをコードする環状ＲＮＡを封入している試験用脂質ナノ粒子が１日おきに注射されたＣ５７ＢＬ／６Ｊマウスにおける脾臓におけるＢ細胞数を示す。
【図４２】環状ＲＮＡから発現した抗ヒトＣＤ１９　ＣＡＲの発現レベルを直鎖状ｍＲＮＡから発現したものと比較している。
【図４３】環状ＲＮＡから発現した抗ヒトＣＤ１９　ＣＡＲの細胞傷害効果を直鎖状ｍＲＮＡから発現したものと比較している。
【図４４】Ｔ細胞において単一の環状ＲＮＡから発現した２つのＣＡＲ（抗ヒトＣＤ１９ ＣＡＲ及び抗ヒトＢＣＭＡ　ＣＡＲ）の細胞傷害を示す。
【図４５Ａ】脂質１０ａ－２７または１０ａ－２６または脂質１０ｂ－１５で形成されたＬＮＰでの処置後の様々な脾臓免疫細胞サブセットにおけるｔｄＴｏｍａｔｏ発現の頻度とともに代表的なＦＡＣＳプロットを示す。
【図４５Ｂ】Ｃｒｅ環状ＲＮＡで成功裏にトランスフェクトされた各細胞集団の割合と同等な、ｔｄＴｏｍａｔｏを発現する骨髄細胞、Ｂ細胞、及びＴ細胞の割合の定量を示す（平均＋標準偏差、ｎ＝３）。
【図４５Ｃ】脂質２７及び２６での処置後にｔｄＴｏｍａｔｏを発現するＮＫ細胞、古典的単球、非古典的単球、好中球、及び樹状細胞を含む追加の脾臓免疫細胞集団の割合を示す（平均＋標準偏差、ｎ＝３）。
【図４６Ａ】イントロンにビルトインポリＡ配列を有する例示的なＲＮＡ構築物設計を示す。
【図４６Ｂ】未精製環状ＲＮＡのクロマトグラフィートレースを示す。
【図４６Ｃ】親和性精製された環状ＲＮＡのクロマトグラフィートレースを示す。
【図４６Ｄ】様々なインビトロ転写（ＩＶＴ）条件及び精製方法で調製された環状ＲＮＡの免疫原性を示す。（市販＝市販ＩＶＴミックス；カスタム＝カスタマイズされたＩＶＴミックス；Ａｆｆ＝親和性精製；Ｅｎｚ＝酵素精製；ＧＭＰ：ＧＴＰ比＝８、１２．５、または１３．７５）。
【図４７】Ａは、ハイブリダイゼーション精製のためのポリＡの代替手段として、ＴＡＴＡＡＴＴＣＴＡＣＣＣＴＡＴＴＧＡＧＧＣＡＴＴＧＡＣＴＡ（配列番号３２６９）の専用結合配列を有する例示的なＲＮＡ構築物設計を示す。Ｂは、未精製環状ＲＮＡのクロマトグラフィートレースを示す。Ｃは、親和性精製された環状ＲＮＡのクロマトグラフィートレースを示す。
【図４８】Ａは、ジストロフィンをコードする未精製環状ＲＮＡのクロマトグラフィートレースを示す。Ｂは、ジストロフィンをコードする酵素精製された環状ＲＮＡのクロマトグラフィートレースを示す。
【図４９】Ｊｕｒｋａｔ細胞における３’イントロン断片／５’内部二重鎖領域とＩＲＥＳとの間に異なる５’スペーサーを有する精製されたｃｉｒｃＲＮＡの発現（Ａ）及び安定性（Ｂ）を比較している。（ＡＣ＝Ａ及びＣのみがスペーサー配列において使用された；ＵＣ＝Ｕ及びＣのみがスペーサー配列において使用された）。
【図５０】示されたオリジナルのまたは修飾ＩＲＥＳ要素を含有する環状ＲＮＡからの初代Ｔ細胞における発光発現レベル及び発現の安定性を示す。
【図５１】示されたオリジナルのまたは修飾されたＩＲＥＳ要素を含有する環状ＲＮＡからのＨｅｐＧ２細胞における発光発現レベル及び発現の安定性を示す。

【図５２】示されたオリジナルのまたは修飾ＩＲＥＳ要素を含有する環状ＲＮＡからの１Ｃ１Ｃ７細胞における発光発現レベル及び発現の安定性を示す。
【図５３】挿入された非翻訳領域（ＵＴＲ）を有するＩＲＥＳ要素またはハイブリッドＩＲＥＳ要素を含有する環状ＲＮＡからのＨｅｐＧ２細胞における発光発現レベル及び発現の安定性を示す。「Ｓｃｒ」は、対照として使用されたスクランブルを意味する。
【図５４】ガウシアルシフェラーゼをコードする配列に作動可能に連結されたＩＲＥＳ及び可変終止コドンカセットを含有する環状ＲＮＡからの１Ｃ１Ｃ７細胞における発光発現レベル及び発現の安定性を示す。
【図５５】ガウシアルシフェラーゼをコードする配列の開始コドンの前に挿入されたＩＲＥＳ及び可変非翻訳領域（ＵＴＲ）を含有する環状ＲＮＡからの１Ｃ１Ｃ７細胞における発光発現レベル及び発現の安定性を示す。
【図５６】ｈＥＰＯをコードする配列の下流に２つのｍｉＲ－１２２標的部位を含有する環状ＲＮＡからのＨｕｈ７細胞におけるヒトエリスロポエチン（ｈＥＰＯ）の発現レベルを示す。
【図５７】インビトロでホタルルシフェラーゼをコードする環状ＲＮＡをトランスフェクトしたＬＮＰからのＳｕｐＴ１細胞（ヒトＴ細胞腫瘍株由来）及びＭＶ４－１１細胞（ヒトマクロファージ株由来）における発光発現レベルを示す。
【図５８】異なるヘルパー脂質、ＰＥＧ脂質、及びイオン化可能な脂質：リン酸比率製剤に基づく、環状ＲＮＡを含むトランスフェクトした初代ヒトＴ細胞ＬＮＰのＡｐｏＥ依存性の比較を示す。
【図５９】ＡｐｏＥ３の補助を伴うまたは伴わずに、ｅＧＦＰをコードする環状ＲＮＡを含むＬＮＰの、活性化された初代ヒトＴ細胞への取り込みを示す。
【図６０】Ｃｒｅレポーターマウスモデルにおける Ｃｒｅ蛍光タンパク質をコードする環状ＲＮＡを含むＬＮＰからの免疫細胞発現を示す。
【図６１】ｍＯＸ４０Ｌをコードする環状ＲＮＡでトランスフェクトしたＬＮＰの静脈内注射後の、野生型マウスにおけるｍＯＸ４０Ｌの免疫細胞発現を示す。
【図６２Ａ】ｍＯＸ４０Ｌを発現することができる環状ＲＮＡでトランスフェクトしたＬＮＰにおけるｍＯＸ４０Ｌの単一用量を示す。脾臓Ｔ細胞、ＣＤ４＋Ｔ細胞、ＣＤ８＋Ｔ細胞、Ｂ細胞、ＮＫ細胞、樹状細胞、及び他のミロイド細胞におけるｍＯＸ４０Ｌ発現のパーセントを提供する。
【図６２Ｂ】ｍＯＸ４０Ｌを発現することができる環状ＲＮＡでトランスフェクトしたＬＮＰにおけるｍＯＸ４０Ｌの単一用量を示す。脾臓Ｔ細胞、ＣＤ４＋Ｔ細胞、ＣＤ８＋Ｔ細胞、Ｂ細胞、ＮＫ細胞、樹状細胞、及び他のミロイド細胞におけるｍＯＸ４０Ｌ発現のパーセントを提供する。
【図６２Ｃ】ｍＯＸ４０Ｌを発現することができる環状ＲＮＡでトランスフェクトしたＬＮＰにおけるｍＯＸ４０Ｌの単一用量を示す。トランスフェクション２４時間後のマウスの体重変化を示す。
【図６３】マウスにおいて環状ＲＮＡを静脈内にトランスフェクトしたＬＮＰのＢ細胞枯渇を示す。Ａは、生ＣＤ４５＋免疫細胞のＢ２２０＋Ｂ細胞によるＢ細胞枯渇を定量化し、Ｂは、ルシフェラーゼ発現環状ＲＮＡと比較した、生ＣＤ４５＋免疫細胞のＢ２２０＋Ｂ細胞のＢ細胞枯渇を比較する。Ｃは、トランスフェクトした細胞のＢ細胞重量増加を示す。
【図６４】抗ＣＤ１９　ＣＡＲを発現する環状ＲＮＡを封入したＬＮＰで処理した場合の末梢血（Ａ）及び脾臓（Ｂ）におけるＣＡＲ発現レベルを示す。抗ＣＤ２０（ａＣＤ２０）及びルシフェラーゼをコードする環状ＲＮＡ（ｏＬｕｃ）を比較のために使用した。
【図６５】抗ＣＤ１９　ＣＡＲ発現の全体的な頻度、細胞表面上の抗ＣＤ１９　ＣＡＲ発現の頻度、及びＴ細胞上の抗ＣＤ１９　ＣＡＲをコードするＩＲＥＳ特異的環状ＲＮＡの抗腫瘍応答への影響を示す。Ａは、抗ＣＤ１９　ＣＡＲの幾何平均蛍光強度を示し、Ｂは、抗ＣＤ１９　ＣＡＲ発現のパーセンテージを示し、Ｃは、抗ＣＤ１９　ＣＡＲによって実施された標的細胞溶解のパーセンテージを示す。（ＣＫ＝ヤギコブウイルス；ＡＰ＝ア

ポデムスピコルナウイルス；ＣＫ＊＝コドン最適化されたヤギコブウイルス；ＰＶ＝パラボウイルス；ＳＶ＝サリウイルス）。
【図６６】ＩＲＥＳ特異的環状ＲＮＡ構築物で処理した場合のＡ２０　ＦＬｕｃ標的細胞のＣＡＲ発現レベルを示す。
【図６７】初代ヒトＴ細胞における環状ＲＮＡからの細胞質（Ａ）及び表面（Ｂ）タンパク質の発光発現レベルを示す。
【図６８Ａ】ＩＲＥＳ特異的環状構築物で処理した場合のヒトＴ細胞における発光発現を示す。環状ＲＮＡ構築物における発現を直鎖状ｍＲＮＡと比較した。複数ドナー細胞におけるガウシアルシフェラーゼ発現を提供する。
【図６８Ｂ】ＩＲＥＳ特異的環状構築物で処理した場合のヒトＴ細胞における発光発現を示す。環状ＲＮＡ構築物における発現を直鎖状ｍＲＮＡと比較した。複数ドナー細胞におけるガウシアルシフェラーゼ発現を提供する。
【図６８Ｃ】ＩＲＥＳ特異的環状構築物で処理した場合のヒトＴ細胞における発光発現を示す。環状ＲＮＡ構築物における発現を直鎖状ｍＲＮＡと比較した。複数ドナー細胞におけるホタルルシフェラーゼ発現を提供する。
【図６８Ｄ】ＩＲＥＳ特異的環状構築物で処理した場合のヒトＴ細胞における発光発現を示す。環状ＲＮＡ構築物における発現を直鎖状ｍＲＮＡと比較した。複数ドナー細胞におけるホタルルシフェラーゼ発現を提供する。
【図６８Ｅ】ＩＲＥＳ特異的環状構築物で処理した場合のヒトＴ細胞における発光発現を示す。環状ＲＮＡ構築物における発現を直鎖状ｍＲＮＡと比較した。複数ドナー細胞におけるホタルルシフェラーゼ発現を提供する。
【図６８Ｆ】ＩＲＥＳ特異的環状構築物で処理した場合のヒトＴ細胞における発光発現を示す。環状ＲＮＡ構築物における発現を直鎖状ｍＲＮＡと比較した。複数ドナー細胞におけるホタルルシフェラーゼ発現を提供する。
【図６８Ｇ】ＩＲＥＳ特異的環状構築物で処理した場合のヒトＴ細胞における発光発現を示す。環状ＲＮＡ構築物における発現を直鎖状ｍＲＮＡと比較した。複数ドナー細胞におけるガウシアルシフェラーゼ発現を提供する。
【図６９】ホタルルシフェラーゼを発現するＫ５６２細胞に対して、抗ＣＤ１９または抗ＢＣＭＡ　ＣＡＲのいずれかをコードする環状ＲＮＡを含む脂質ナノ粒子処理後のヒトＴ細胞における抗ＣＤ１９　ＣＡＲ（Ａ及びＢ）及び抗ＢＣＭＡ　ＣＡＲ（Ｂ）の発現を示す。
【図７０】特異的抗原依存的様式に抗ＣＤ１９　ＣＡＲをコードする環状ＲＮＡのインビトロにおけるエレクトロポレーションによる送達から生じる抗ＣＤ１９　ＣＡＲ発現レベルを示す。Ａは、抗ＣＤ１９　ＣＡＲによるＮａｌｍ６細胞溶解を示す。Ｂは、抗ＣＤ１９　ＣＡＲによるＫ５６２細胞溶解を示す。
【図７１Ａ】緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）を発現するＬＮＰ及び環状ＲＮＡを含む溶液中でのＡｐｏＥ３の使用を介したＬＮＰのトランスフェクションを示す。生死の結果を示した。
【図７１Ｂ】緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）を発現するＬＮＰ及び環状ＲＮＡを含む溶液中でのＡｐｏＥ３の使用を介したＬＮＰのトランスフェクションを示す。複数ドナーの発現頻度を提供する。
【図７１Ｃ】緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）を発現するＬＮＰ及び環状ＲＮＡを含む溶液中でのＡｐｏＥ３の使用を介したＬＮＰのトランスフェクションを示す。複数ドナーの発現頻度を提供する。
【図７１Ｄ】緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）を発現するＬＮＰ及び環状ＲＮＡを含む溶液中でのＡｐｏＥ３の使用を介したＬＮＰのトランスフェクションを示す。複数ドナーの発現頻度を提供する。
【図７１Ｅ】緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）を発現するＬＮＰ及び環状ＲＮＡを含む溶液中でのＡｐｏＥ３の使用を介したＬＮＰのトランスフェクションを示す。複数ドナーの発現頻度を提供する。

【図７２Ａ】様々な脂質製剤の総フラックス及び発現率示す。実施例７４を参照されたい。
【図７２Ｂ】様々な脂質製剤の総フラックス及び発現率示す。実施例７４を参照されたい。
【図７２Ｃ】様々な脂質製剤の総フラックス及び発現率示す。実施例７４を参照されたい。
【図７２Ｄ】様々な脂質製剤の総フラックス及び発現率示す。実施例７４を参照されたい。
【図７２Ｅ】様々な脂質製剤の総フラックス及び発現率示す。実施例７４を参照されたい。
【図７２Ｆ】様々な脂質製剤の総フラックス及び発現率示す。実施例７４を参照されたい。
【図７２Ｇ】様々な脂質製剤の総フラックス及び発現率示す。実施例７４を参照されたい。
【図７２Ｈ】様々な脂質製剤の総フラックス及び発現率示す。実施例７４を参照されたい。
【図７２Ｉ】様々な脂質製剤の総フラックス及び発現率示す。実施例７４を参照されたい。
【図７２Ｊ】様々な脂質製剤の総フラックス及び発現率示す。実施例７４を参照されたい。
【図７２Ｋ】様々な脂質製剤の総フラックス及び発現率示す。実施例７４を参照されたい。
【図７２Ｌ】様々な脂質製剤の総フラックス及び発現率示す。実施例７４を参照されたい。
【図７３Ａ】安定化した（二重プロリン変異体）ＳＡＲＳ－ＣｏＶ２スパイクタンパク質をコードするＲＮＡ分子の環状化効率を示す。約４．５ｋｂのＳＡＲＳ－ＣｏＶ２スパイクをコードするｃｉｒｃＲＮＡのインビトロ転写産物を示す。
【図７３Ｂ】安定化した（二重プロリン変異体）ＳＡＲＳ－ＣｏＶ２スパイクタンパク質をコードするＲＮＡ分子の環状化効率を示す。２９３細胞へのスパイクをコードするｃｉｒｃＲＮＡのトランスフェクション後のフローサイトメトリーによるスパイクタンパク質表面発現のヒストグラムを示す。トランスフェクトした２９３細胞は、トランスフェクトした２４時間後にＣＲ３０２２一次抗体及びＡＰＣ標識二次抗体で染色した。
【図７３Ｃ】安定化した（二重プロリン変異体）ＳＡＲＳ－ＣｏＶ２スパイクタンパク質をコードするＲＮＡ分子の環状化効率を示す。スパイクコードｃｒｉｃＲＮＡのトランスフェクション後の２９３細胞上のスパイクタンパク質表面発現のフローサイトメトリープロットを示す。トランスフェクトした２９３細胞は、トランスフェクトした２４時間後にＣＲ３０２２一次抗体及びＡＰＣ標識二次抗体で染色した。
【図７４】複数の制御されたアジュバント戦略を提供する。図に示されているＣｉｒｃＲＮＡは、インビトロでＧＴＰを指標分子として使用する未精製センス環状ＲＮＡスプライシング反応を伴う。３ｐ－ｃｉｒｃＲＮＡは、精製されたセンス環状ＲＮＡ、ならびに三リン酸化５’末端を含む混合され精製されたアンチセンス環状ＲＮＡを伴う。Ａは、野生型及びＭＡＶＳノックアウトＡ５４９細胞におけるインビトロでのＩＦＮ－β誘導を示し、Ｂは、示された戦略を使用して生成された製剤化されたｃｉｒｃＲＮＡに対するインビボサイトカイン応答を示す。
【図７５Ａ】環状ＲＮＡ構築物を含むＬＮＰの筋肉内送達を示す。１μｇ用量のＬＮＰ環状ＲＮＡ構築物の６時間後の生全身ＩＶＩＳを提供する。
【図７５Ｂ】環状ＲＮＡ構築物を含むＬＮＰの筋肉内送達を示す。６時間後の全身ＩＶＩＳを提供する。
【図７５Ｃ】環状ＲＮＡ構築物を含むＬＮＰの筋肉内送達を示す。２４時間にわたるエクスビボ発現分布を提供する。

【図７６】単一の脂質製剤からの複数の環状ＲＮＡの発現を示す。Ａは、環状ＲＮＡ構築物を含むＬＮＰの単一及び混合セットからのｈＥＰＯ力価を提供し、Ｂは、環状ＲＮＡ構築物を含むＬＮＰの単一または混合セットからの生物発光発現の総フラックスを提供する。

【図７７Ａ】スパイクＳＡＲＳ－ＣｏＶ２タンパク質をコードする環状ＲＮＡのＳＡＲＳ－ＣｏＶ２スパイクタンパク質発現を示す。スパイクＣｏＶ２発現の頻度を示す。

【図７７Ｂ】スパイクＳＡＲＳ－ＣｏＶ２タンパク質をコードする環状ＲＮＡのＳＡＲＳ－ＣｏＶ２スパイクタンパク質発現を示す。スパイクＣｏＶ２発現の幾何平均蛍光強度（ｇＭＦＩ）を示す。

【図７７Ｃ】スパイクＳＡＲＳ－ＣｏＶ２タンパク質をコードする環状ＲＮＡのＳＡＲＳ－ＣｏＶ２スパイクタンパク質発現を示す。構築物のｇＭＦＩ発現と発現頻度とを比較する。

【図７８】直鎖状ＲＮＡポリヌクレオチド前駆体（１０）の一般的な配列構築物を示す。提供される配列は、５’増強イントロン要素（２０）、５’増強エクソン要素（３０）、コア機能要素（４０）、３’増強エクソン要素（５０）、及び３’増強イントロン要素（６０）を５’から３’の順序で示す。

【図７９】５’増強エクソン要素（２０）の様々な例示的な反復を示す。図示されるように、５’増強エクソン要素（２０）の１つの反復は、５’から３’の順序で、以下の順序で、先導非翻訳配列（２１）、５’親和性タグ（２２）、５’外部二重鎖領域（２４）、５’外部スペーサー（２６）、及び３’イントロン断片（２８）を含む。

【図８０】５’増強エクソン要素（３０）の様々な例示的な反復を示す。図示されるように、５’増強エクソン要素（３０）の１つの反復は、５’から３’の順序で、３’エクソン断片（３２）、５’内部二重鎖領域（３４）、及び５’内部スペーサー（３６）を含む。

【図８１】コア機能要素（４０）の様々な例示的な反復を示す。図示されるように、コア機能要素（４０）の１つの反復は、ＴＩＥ（４２）、コード領域（４６）、及び停止領域（例えば、停止コドンまたは停止カセット）（４８）を含む。非コード領域（４７）を含むコア機能要素（４７）を示すために、別の反復が示されている。

【図８２】３’増強エクソン要素（５０）の様々な例示的な反復を示す。図示されるように、３’増強エクソン要素（５０）の１つの反復は、以下を５’から３’の順序で、３’内部スペーサー（５２）、３’内部二重鎖領域（５４）、及び５’エクソン断片（５６）を含む。

【図８３】３’増強イントロン要素（６０）の様々な例示的な反復を示す。図示されるように、３’増強イントロン要素（６０）の１つ反復は、以下の順序で、５’イントロン断片（６２）、３’外部スペーサー（６４）、３’外部二重鎖領域（６６）、３’親和性タグ（６８）、及び末端非翻訳配列（６９）を含む。

【図８４】翻訳開始要素（ＴＩＥ）（４２）の様々な例示的な反復を示す。１つの反復で例示されるようなＴＩＥ（４２）配列は、ＩＲＥＳ（４３）のみである。別の反復では、ＴＩＥ（４２）は、アプタマー（４４）である。２つの異なる反復では、ＴＩＥ（４２）は、アプタマー（４４）及びＩＲＥＳ（４３）の組み合わせである。別の反復では、ＴＩＥ（４２）は、アプタマー複合体（４５）である。

【図８５】以下を５’から３’の順序で、先導非翻訳配列（２１）、５’親和性タグ（２２）、５’外部二重鎖領域（２４）、５’外部スペーサー（２６）、３’イントロン断片（２８）、３’エクソン断片（３２）、５’内部二重鎖領域（３４）、５’内部スペーサー（３６）、ＴＩＥ（４２）、コード要素（４６）、停止領域（４８）、３’内部スペーサー（５２）、３’内部二重鎖領域（５４）、５’エクソン断片（５６）、５’イントロン断片（６２）、３’外部スペーサー（６４）、３’外部二重鎖領域（６６）、３’親和性タグ（６８）、及び末端非翻訳配列（６９）を含む、直鎖状ＲＮＡポリヌクレオチド前駆体（１０）の例を示す。

【図８６】以下を５’から３’の順序で、先導非翻訳配列（２１）、５’親和性タグ（２２）、５’外部二重鎖領域（２４）、５’外部スペーサー（２６）、３’イントロン断片（２

８）、３’エクソン断片（３２）、５’内部二重鎖領域（３４）、５’内部スペーサー（３６）、コード要素（４６）、停止領域（４８）、ＴＩＥ（４２）、３’内部スペーサー（５２）、３’内部二重鎖領域（５４）、５’エクソン断片（５６）、５’イントロン断片（６２）、３’外部スペーサー（６４）、３’外部二重鎖領域（６６）、３’親和性タグ（６８）、及び末端非翻訳配列（６９）を含む、直鎖状ＲＮＡポリヌクレオチド前駆体（１０）の例を示す。

【図８７】以下を５’から３’の順序で、先導非翻訳配列（２１）、５’親和性タグ（２２）、５’外部二重鎖領域（２４）、５’外部スペーサー（２６）、３’イントロン断片（２８）、３’エクソン断片（３２）、５’内部二重鎖領域（３４）、５’内部スペーサー（３６）、非コード要素（４７）、３’内部スペーサー（５２）、３’内部二重鎖領域（５４）、５’エクソン断片（５６）、５’イントロン断片（６２）、３’外部スペーサー（６４）、３’外部二重鎖領域（６６）、３’親和性タグ（６８）、及び末端非翻訳配列（６９）を含む、直鎖状ＲＮＡポリヌクレオチド前駆体（１０）の例を示す。

【図８８】スプライシング後に形成される一般的な環状ＲＮＡ（８）構造を示す。示される環状ＲＮＡは、５’エクソン要素（３０）、コア機能要素（４０）、及び３’エクソン要素（５０）を含む。

【図８９Ａ】アクセサリ要素（７０）（例えば、ｍｉＲＮＡ結合部位）が直鎖状ＲＮＡポリヌクレオチドに含まれ得る様々な方法を例示する。スペーサー領域にアクセサリ要素（７０）を含む直鎖状ＲＮＡポリヌクレオチドを示す。

【図８９Ｂ】アクセサリ要素（７０）（例えば、ｍｉＲＮＡ結合部位）が直鎖状ＲＮＡポリヌクレオチドに含まれ得る様々な方法を例示する。外部二重鎖領域の各々とエクソン断片との間に位置するアクセサリ要素（７０）を含む直鎖状ＲＮＡポリヌクレオチドを示す。

【図８９Ｃ】アクセサリ要素（７０）（例えば、ｍｉＲＮＡ結合部位）が直鎖状ＲＮＡポリヌクレオチドに含まれ得る様々な方法を例示する。スペーサー内のアクセサリ要素（７０）を示す。

【図８９Ｄ】アクセサリ要素（７０）（例えば、ｍｉＲＮＡ結合部位）が直鎖状ＲＮＡポリヌクレオチドに含まれ得る様々な方法を例示する。コア機能要素内に位置するアクセサリ要素（７０）の様々な反復を示す。

【図８９Ｅ】アクセサリ要素（７０）（例えば、ｍｉＲＮＡ結合部位）が直鎖状ＲＮＡポリヌクレオチドに含まれ得る様々な方法を例示する。配列内リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ）内に位置するアクセサリ要素（７０）を示す。

【図９０Ａ】初代ヒト肝細胞における、ホタルルシフェラーゼをコードし、ＴＩＥを有する環状ＲＮＡで製剤化したＬＮＰの、インビトロでの様々な用量でのスクリーニングを示す。

【図９０Ｂ】マウス肝細胞における、ホタルルシフェラーゼをコードし、ＴＩＥを有する環状ＲＮＡで製剤化したＬＮＰの、インビトロでの様々な用量でのスクリーニングを示す。

【図９０Ｃ】カニクイザル肝細胞における、ホタルルシフェラーゼをコードし、ＴＩＥを有する環状ＲＮＡで製剤化したＬＮＰの、インビトロでの様々な用量でのスクリーニングを示す。

【図９１Ａ】３人の異なるドナーからの初代ヒト肝細胞における、ホタルルシフェラーゼをコードし、ＴＩＥを有する環状ＲＮＡで製剤化したＬＮＰの、インビトロでの様々な用量でのスクリーニングを示す。

【図９１Ｂ】３人の異なるドナーからの初代ヒト肝細胞における、ホタルルシフェラーゼをコードし、ＴＩＥを有する環状ＲＮＡで製剤化したＬＮＰの、インビトロでの様々な用量でのスクリーニングを示す。

【図９１Ｃ】３人の異なるドナーからの初代ヒト肝細胞における、ホタルルシフェラーゼをコードし、ＴＩＥを有する環状ＲＮＡで製剤化したＬＮＰの、インビトロでの様々な用量でのスクリーニングを示す。

【図９２】ＨｅＬａ、ＨＥＫ２９３、及びＨＵＨ７ヒト細胞モデルにおける、ＧＦＰをコードし、ＴＩＥを有する環状ＲＮＡで製剤化したＬＮＰの、インビトロでの発現を示す。
【図９３】初代ヒト肝細胞における、ＧＦＯタンパク質をコードし、ＴＩＥを有する環状ＲＮＡで製剤化したＬＮＰの、インビトロでの発現を示す。
【図９４Ａ】マウス筋芽細胞における、ホタルルシフェラーゼをコードし、ＴＩＥを有する環状ＲＮＡの、インビトロでの発現を示す。
【図９４Ｂ】初代ヒト筋芽細胞における、ホタルルシフェラーゼをコードし、ＴＩＥを有する環状ＲＮＡの、インビトロでの発現を示す。
【図９５Ａ】筋芽細胞及び分化した初代ヒト骨格筋筋管において、ホタルルシフェラーゼをコードし、ＴＩＥを有する環状ＲＮＡの、インビトロでの発現を示す。ヒトドナー１から取得した細胞に関連するデータを提供する。
【図９５Ｂ】筋芽細胞及び分化した初代ヒト骨格筋筋管において、ホタルルシフェラーゼをコードし、ＴＩＥを有する環状ＲＮＡの、インビトロでの発現を示す。ヒトドナー２から取得した細胞に関連するデータを提供する。
【図９６Ａ】可変サイズの環状ＲＮＡの無細胞インビトロ翻訳を示す。ホタルルシフェラーゼをコードする環状ＲＮＡ及びホタルルシフェラーゼをコードする直鎖状ｍＲＮＡの発現を試験した。
【図９６Ｂ】可変サイズの環状ＲＮＡの無細胞インビトロ翻訳を示す。ヒト及びマウスの細胞に、ＡＴＰ７Ｂタンパク質をコードする環状ＲＮＡを付与した。試験した環状ＲＮＡのうちのいくつかを、コドン最適化した。ホタルルシフェラーゼを発現する環状ＲＮＡを比較のために使用した。
【図９７Ａ】例示的なＲＮＡ環状化プロセスを示す。示される概略図は、自己触媒的環状化プロセスを示す。簡潔に述べると、環状化効率を増強するイントロンセグメント及びアクセサリ要素を含むＲＮＡ前駆体分子は、スプライシングを受け、合成環状ＲＮＡ及び２つの切除されたイントロン／アクセサリ配列セグメント（イントロンセグメント／断片をスプライシングした）をもたらす。一部の環状ＲＮＡ（ｏＲＮＡ）は、合成中にニックが入る。
【図９７Ｂ】例示的なＲＮＡ環状化プロセスを示す。サイズ排除ＨＰＬＣ分析後の異なる種のピーク滞留を示す例示的なクロマトグラムを示す。
【図９８】ｏＲＮＡなどの環状ＲＮＡ分子の例示的なネガティブセレクション精製方法を示す。ＲＮＡ前駆体（イントロンセグメントまたは外部アクセサリ領域など）に存在するが、ｏＲＮＡは存在しない配列に相補的なオリゴヌクレオチドは、ビーズなどの固体支持体と結合される。ｏＲＮＡ調製物は、ビーズ上で洗浄され、ＲＮＡ前駆体、部分的にスプライシングされたＲＮＡ、不完全な転写物、及びスプライシング後のイントロンセグメントは、特定の緩衝液条件下でオリゴヌクレオチドと結合する一方で、ｏＲＮＡ及びニックの入ったｏＲＮＡは通過する。フロースルーは、さらなる処理のために収集される。
【図９９Ａ】ｏＲＮＡなどの環状ＲＮＡ分子の例示的なネガティブセレクション精製方法を示す。示される概略図は、ｏＲＮＡ及び直鎖状ＲＮＡを含むインビトロ転写反応生成物の酵素的ポリアデニル化を示し、直鎖ＲＮＡのみのポリアデニル化をもたらす。直鎖状及び環状ＲＮＡの混合物を、特定の緩衝液条件下で、デオキシチミジンオリゴヌクレオチド（「オリゴｄＴ」）とコンジュゲートされたビーズ上で洗浄される。ポリアデニル化直鎖状ＲＮＡはビーズにアニールし、一方で、ｏＲＮＡは収集のために通過する。
【図９９Ｂ】ｏＲＮＡなどの環状ＲＮＡ分子の例示的なネガティブセレクション精製方法を示す。ポリアデニル化及び精製前のインビトロ転写（ＩＶＴ）反応生成物（左パネル）、ならびにＥ．ｃｏｌｉポリＡポリメラーゼを使用したポリアデニル化及び結合緩衝液中でのオリゴｄＴビーズによる精製後の溶離液（右パネル）の例示的なＳＥＣ－ＨＰＬＣクロマトグラムを示す。
【図１００Ａ】例示的な環状ＲＮＡ酵素精製方法を示す。この方法では、ｏＲＮＡは、過剰ＧＭＰの存在下でＩＶＴによって合成され、プロセス中に自己触媒的にスプライシングされる。得られた反応生成物を、Ｘｒｎ１（５’末端モノリン酸を必要とする５’から３’

エキソヌクレアーゼ）及びＲＮａｓｅＲ（３’から５’エキソヌクレアーゼ）で消化して、非環状ＲＮＡ分子を除去する。直鎖状ＲＮＡのかかるＸｒｎ１及びＲＮａｓｅＲ消化を示す。

【図１００Ｂ】例示的な環状ＲＮＡ酵素精製方法を示す。この方法では、ｏＲＮＡは、過剰ＧＭＰの存在下でＩＶＴによって合成され、プロセス中に自己触媒的にスプライシングされる。得られた反応生成物を、Ｘｒｎ１（５’末端モノリン酸を必要とする５’から３’エキソヌクレアーゼ）及びＲＮａｓｅＲ（３’から５’エキソヌクレアーゼ）で消化して、非環状ＲＮＡ分子を除去する。酵素消化前のＩＶＴ反応生成物（左パネル）及び最終の酵素精製物質（右パネル）の例示的なＳＥＣ－ＨＰＬＣクロマトグラムを示す。

【図１０１】示される様々なＲＮＡ調製物で細胞をトランスフェクションした後の、免疫刺激のマーカーであるＲＩＧ－１及びＩＦＮＢ１　ＲＮＡの発現の誘導を示す。市販されている３ｐｈｐＲＮＡを除く全てのＲＮＡ調製物は、Ａｎａｂａｅｎａ置換イントロン、ＧＬｕｃリーディングフレーム、強い相同性アーム、５’及び３’スペーサー、ならびにＣＶＢ３　ＩＲＥＳを含むＲＮＡのインビトロ転写及び環状化を使用して産生された。ＲＩＧ－１及びＩＦＮＢ１　ＲＮＡの発現を、ＲＴ－ｑＰＣＲを使用して測定した。「ＩＶＴ」は、未精製の反応混合物を示し、「＋ＧＭＰ」は、インビトロ転写が、ＧＴＰに対して１２．５倍のＧＭＰの存在下で行われた未精製の反応混合物を示し「＋ＨＰＬＣ」は、ＨＰＬＣによって精製された反応混合物を示し、「＋ＨＰＬＣ／ＧＭＰ」は、インビトロ転写が、ＧＴＰに対して１２．５倍のＧＭＰの存在下で行われたＨＰＬＣによって精製された反応混合物を示し、「３ｐｈｐＲＮＡ」は、三リン酸ヘアピンＲＮＡ（ｔｌｒｌ－ｈｐｒｎａ、Ｉｎｖｉｖｏｇｅｎ）を含む陽性対照を示し、「モック」は、ＲＮＡを含まない調製物を示す。Ａは、ＨｅＬａ細胞の免疫刺激を示し、Ｂは、Ａ５９４細胞の免疫刺激を示す。

【図１０２Ａ】ヒトＴ細胞におけるキメラ抗原受容体をコードする様々な環状ＲＮＡのエレクトロポレーションを介したインビトロ送達から生じる抗ＣＤ１９　ＣＡＲ発現レベルを示す。ＣＤ１９－４１ＢＢζ、ＣＤ１９－ＣＤ２８ζ、ＨＥＲ２－４１ＢＢζ、及びＨＥＲ２－ＣＤ２８ζ　ＣＡＲのヒトＴ細胞発現のＦＡＣ分析からの代表的なドットプロットを提供する。

【図１０２Ｂ】ヒトＴ細胞におけるキメラ抗原受容体をコードする様々な環状ＲＮＡのエレクトロポレーションを介したインビトロ送達から生じる抗ＣＤ１９　ＣＡＲ発現レベルを示す。蛍光活性化細胞選別（ＦＡＣＳ）を介して収集された、ＣＤ１９－４１ＢＢζ、ＣＤ１９－ＣＤ２８ζ、ＨＥＲ２－４１ＢＢζ、及びＨＥＲ２－ＣＤ２８ζ発現のＭＦＩについての累積データを示す。

【図１０３Ａ】ＣＤ１９－４１ＢＢζ及びｂＣＤ１９－ＣＤ２８ζをコードする環状ＲＮＡによるＴ細胞のエレクトロポレーション、及びその後の腫瘍細胞との共培養時の腫瘍細胞に対する細胞傷害性応答を示す。ｍＯＸ４０Ｌをコードする環状ＲＮＡを発現するＴ細胞と比較した、ＣＤ１９－４１ＢＢζ、ＣＤ１９－ＣＤ２８ζ、ＨＥＲ２－４１ＢＢζ、及びＨＥＲ２－ＣＤ２８ζ　ＣＡＲをコードするｏＲＮＡを発現するＴ細胞との共培養後の腫瘍細胞の特異的溶解％を提供する。

【図１０３Ｂ】ＣＤ１９－４１ＢＢζ及びｂＣＤ１９－ＣＤ２８ζをコードする環状ＲＮＡによるＴ細胞のエレクトロポレーション、及びその後の腫瘍細胞との共培養時の腫瘍細胞に対する細胞傷害性応答を示す。腫瘍細胞と共培養した後のｍＯＸ４０Ｌをコードする環状ＲＮＡと比較した、列挙されたｏＲＮＡを発現するＴ細胞によって分泌されたＩＦＮ－γサイトカインをｐｇ／ｍＬで示す。

【図１０３Ｃ】ＣＤ１９－４１ＢＢζ及びｂＣＤ１９－ＣＤ２８ζをコードする環状ＲＮＡによるＴ細胞のエレクトロポレーション、及びその後の腫瘍細胞との共培養時の腫瘍細胞に対する細胞傷害性応答を示す。腫瘍細胞と共培養した後のｍＯＸ４０Ｌをコードする環状ＲＮＡと比較した、列挙されたｏＲＮＡを発現するＴ細胞によって分泌されたＩＬ－２サイトカインをｐｇ／ｍＬで示す。

【図１０４Ａ】ｍＯＸ４０Ｌをコードする環状ＲＮＡを製剤化したＬＮＰの静脈内投与後

の、ヒト化マウスの脾臓及び末梢血Ｔ細胞におけるインビボｍＯＸ４０Ｌ発現を示す。ＬＮＰは、ＰＢＳ（該図において「ビヒクル」として示される）、または脂質１０ｂ－１５（表１０ｂ、脂質１５）、１０ａ－２７（表１０ａ、脂質２７）、または１０ａ－２６（表１０ａ、脂質２６）で製剤化されたＬＮＰ－ｏＲＮＡ構築物のいずれかと製剤化した。ヒト化マウスの脾臓におけるＴ細胞におけるｍＯＸ４０Ｌの検出を示す。

【図１０４Ｂ】ｍＯＸ４０Ｌをコードする環状ＲＮＡを製剤化したＬＮＰの静脈内投与後の、ヒト化マウスの脾臓及び末梢血Ｔ細胞におけるインビボｍＯＸ４０Ｌ発現を示す。ＬＮＰは、ＰＢＳ（該図において「ビヒクル」として示される）、または脂質１０ｂ－１５（表１０ｂ、脂質１５）、１０ａ－２７（表１０ａ、脂質２７）、または１０ａ－２６（表１０ａ、脂質２６）で製剤化されたＬＮＰ－ｏＲＮＡ構築物のいずれかと製剤化した。ヒト化マウスの末梢血中のＴ細胞におけるｍＯＸ４０Ｌの検出を示す。

【図１０５】抗ＣＤ１９キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）をコードする環状ＲＮＡで製剤化されたＬＮＰの静脈内投与後のヒト化マウスにおけるＢ細胞無形成を示す。未処置動物（左）及び処置動物（右）の末梢血からの代表的なＦＡＣＳドットプロットは、静脈内投与から６日後のＢ細胞の割合を示す。

【図１０６】ＣＡＲまたは対照をコードするＬＮＰ－ｏＲＮＡとの共培養後のＮａｌｍ６腫瘍細胞の殺傷％（Ａ）、及びＣＤ１９－４１ＢＢζまたはＣＤ１９－ＣＤ２８ζ　ＣＡＲをコードするＬＮＰ－環状ＲＮＡ（ｏＲＮＡ）のインビトロトランスフェクション後のキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）表面発現（Ｂ）を示す。Ａは、ＨＥＲ２－４１ＢＢｚ、ＨＥＲ２－ＣＤ２８ｚ、または対照ＬＮＰ－ｏＲＮＡ　ｍＯＸ４０Ｌとともに、ＣＤ１９－４１ＢＢζ及びＣＤ１９－ＣＤ２８ζ　ＣＡＲのＣＡＲをコードするＬＮＰ－ｏＲＮＡ構築物でトランスフェクトしたＴ細胞の共培養後のＮａｌｍ６腫瘍細胞の殺傷を示す。Ｂは、ＬＮＰ－ｏＲＮＡ　ＣＡＲ構築物で処理したＴ細胞上のＣＡＲ表面発現の平均蛍光強度（ＭＦＩ）を示す。

【図１０７】ＰＢＳ、ＰＢＭＣ、ｍＯｘ４０ＬをコードするＬＮＰ－ｏＲＮＡ、ＣＤ１９－４１ＢＢζをコードするＬＮＰ－ｏＲＮＡ（「ＣＤ１９－４１ＢＢζ　ｉｓＣＡＲ」）、ＣＤ１９－ＣＤ２８ζをコードするｏＲＮＡ（「ＣＤ１９－ＣＤ２８ζ　ｉｓＣＡＲ」）、ＨＥＲ２－４１ＢＢｚ　ＣＡＲをコードするＬＮＰ－ｏＲＮＡ（「ＨＥＲ２－４１ＢＢｚ　ｉｓＣＡＲ」）、またはＨＥＲ２－ＣＤ２８ｚ　ＣＡＲをコードするＬＮＰ－ｏＲＮＡ（「ＨＥＲ２－ＣＤ２８ｚ　ｉｓＣＡＲ」）のいずれかを用いた投与後の総フラックス（光子／秒）によって測定される抗原依存性腫瘍退縮を示す。ｏＲＮＡを欠くＰＢＳ及びＰＢＭＣ溶液を陰性対照として使用した。

【図１０８Ａ】筋管及び肝細胞または筋管及びＴ細胞におけるＩＲＥＳ活性の間の相関を示す。各データポイントは、ガウシアルシフェラーゼコード領域の前にＩＲＥＳを含む環状ＲＮＡの平均発現値を示し、各ＩＲＥＳは、配列番号１～２９８３及び３２８２～３２８７から選択される配列またはその断片を含む。ＩＲＥＳを含む環状ＲＮＡをアレイ形式で合成し、ＬＮＰに製剤化した後に、活性化された初代ヒトＴ細胞、初代ヒト筋管、及び初代ヒト肝細胞にトランスフェクトした。全てのデータポイントを、陽性対照ＩＲＥＳ（配列番号３２８２）に対して正規化した。

【図１０８Ｂ】筋管及び肝細胞または筋管及びＴ細胞におけるＩＲＥＳ活性の間の相関を示す。各データポイントは、ガウシアルシフェラーゼコード領域の前にＩＲＥＳを含む環状ＲＮＡの平均発現値を示し、各ＩＲＥＳは、配列番号１～２９８３及び３２８２～３２８７から選択される配列またはその断片を含む。ＩＲＥＳを含む環状ＲＮＡをアレイ形式で合成し、ＬＮＰに製剤化した後に、活性化された初代ヒトＴ細胞、初代ヒト筋管、及び初代ヒト肝細胞にトランスフェクトした。全てのデータポイントを、陽性対照ＩＲＥＳ（配列番号３２８２）に対して正規化した。

【図１０８Ｃ】筋管及び肝細胞または筋管及びＴ細胞におけるＩＲＥＳ活性の間の相関を示す。各データポイントは、ガウシアルシフェラーゼコード領域の前にＩＲＥＳを含む環状ＲＮＡの平均発現値を示し、各ＩＲＥＳは、配列番号１～２９８３及び３２８２～３２８７から選択される配列またはその断片を含む。ＩＲＥＳを含む環状ＲＮＡをアレイ形式

で合成し、ＬＮＰに製剤化した後に、活性化された初代ヒトＴ細胞、初代ヒト筋管、及び初代ヒト肝細胞にトランスフェクトした。全てのデータポイントを、陽性対照ＩＲＥＳ（配列番号３２８２）に対して正規化した。

【図１０９Ａ】一般に使用されるＩＲＥＳ（ＥＭＣＶ、ＣＶＢ３）と比較した、肝細胞におけるＩＲＥＳ活性を示す。各データポイントは、ガウシアルシフェラーゼコード領域の前にＩＲＥＳを含む環状ＲＮＡの平均発現値を示し、各ＩＲＥＳは、配列番号１～２９８３及び３２８２～３２８７から選択される配列またはその断片を含む。ＩＲＥＳを含む環状ＲＮＡをアレイ形式で合成し、ＬＮＰに製剤化した後に、活性化された初代ヒトＴ細胞、初代ヒト筋管、及び初代ヒト肝細胞にトランスフェクトした。全てのデータポイントを、陽性対照ＩＲＥＳ（配列番号３２８２）に対して正規化した。

【図１０９Ｂ】一般に使用されるＩＲＥＳ（ＥＭＣＶ、ＣＶＢ３）と比較した、筋管におけるＩＲＥＳ活性を示す。各データポイントは、ガウシアルシフェラーゼコード領域の前にＩＲＥＳを含む環状ＲＮＡの平均発現値を示し、各ＩＲＥＳは、配列番号１～２９８３及び３２８２～３２８７から選択される配列またはその断片を含む。ＩＲＥＳを含む環状ＲＮＡをアレイ形式で合成し、ＬＮＰに製剤化した後に、活性化された初代ヒトＴ細胞、初代ヒト筋管、及び初代ヒト肝細胞にトランスフェクトした。全てのデータポイントを、陽性対照ＩＲＥＳ（配列番号３２８２）に対して正規化した。

【図１０９Ｃ】一般に使用されるＩＲＥＳ（ＥＭＣＶ、ＣＶＢ３）と比較した、Ｔ細胞におけるＩＲＥＳ活性を示す。各データポイントは、ガウシアルシフェラーゼコード領域の前にＩＲＥＳを含む環状ＲＮＡの平均発現値を示し、各ＩＲＥＳは、配列番号１～２９８３及び３２８２～３２８７から選択される配列またはその断片を含む。ＩＲＥＳを含む環状ＲＮＡをアレイ形式で合成し、ＬＮＰに製剤化した後に、活性化された初代ヒトＴ細胞、初代ヒト筋管、及び初代ヒト肝細胞にトランスフェクトした。全てのデータポイントを、陽性対照ＩＲＥＳ（配列番号３２８２）に対して正規化した。

【発明を実施するための形態】

【００７２】

本発明は、とりわけ、環状ＲＮＡ療法に基づいて自己免疫障害、欠乏性疾患、またはがんを処置するための方法及び組成物を提供する。特に、本発明は、治療を必要とする対象に、関連する疾患もしくは障害の少なくとも１つの症状または特徴が、強度、重症度、または頻度において減少するか、あるいは発症が遅延されるような有効用量及び投与間隔で、少なくとも１つの治療用タンパク質をコードする環状ＲＮＡを含む組成物を投与することによって、自己免疫障害、欠乏性疾患、またはがんを処置する方法を提供する。

【００７３】

本明細書に開示されるように、改善された環状ＲＮＡ療法は、関連する組成物及び方法とともに、とりわけ、環状ＲＮＡの安定性、発現の増加、及び半減期の延長を可能にする。いくつかの実施形態では、本発明の環状ＲＮＡは、増強イントロン要素、増強エクソン要素、及びコア機能要素を含む直鎖状ＲＮＡポリヌクレオチド構築物から転写される。いくつかの実施形態では、増強イントロン要素は、スプライシング後のグループＩイントロン断片、スペーサー、二重鎖配列、親和性配列、及び最適な環状化を可能にする独自の非翻訳配列を含む。いくつかの実施形態では、増強エクソン要素は、環状化プロセスを補助し、環状化後の環状ＲＮＡの安定性を維持するために、エクソン断片、スペーサー、及び二重鎖配列を含む。同じ実施形態内で、コア機能要素は、翻訳開始要素（ＴＩＥ）、コードまたは非コード要素、及び終結配列（例えば、終止コドンまたは終止カセット）のタンパク質翻訳のための必須要素を含む。増強イントロン要素、増強エクソン要素、及びコード要素を含むコア機能要素は一緒に、治療用タンパク質をコードするための最適な環状ＲＮＡポリヌクレオチドを提供する。一実施形態では、増強イントロン要素、増強エクソン要素、及び非コード要素を含むコア機能要素は、アジュバントとして免疫系を誘発するための最適な環状ＲＮＡポリヌクレオチドを提供する。

【００７４】

また、環状ＲＮＡを作製するためのＤＮＡ鋳型（例えば、ベクター）を本明細書に開示

する。いくつかの実施形態では、ＤＮＡ鋳型は、３’増強イントロン断片、３’増強エクソン断片、コア機能要素、５’増強エクソン断片、及び５’増強イントロン断片を含む。いくつかの実施形態では、これらの要素は、上記の順序でＤＮＡ鋳型内に配置される。

【００７５】

さらなる実施形態には、本明細書で提供されるＤＮＡ鋳型を使用して作製される環状ＲＮＡポリヌクレオチド（例えば、３’増強エクソン要素、コア機能要素、及び５’増強エクソン要素を含む環状ＲＮＡ）を含む環状ＲＮＡポリヌクレオチド、かかる環状ＲＮＡを含む組成物、かかる環状ＲＮＡを含む細胞、かかるＤＮＡ鋳型、環状ＲＮＡ、組成物及び細胞を使用するならびに作製する方法が含まれる。

【００７６】

いくつかの実施形態では、治療または有用なタンパク質の産生のために、本明細書で提供される環状ＲＮＡポリヌクレオチドを細胞に投与することを含む方法が本明細書で提供される。いくつかの実施形態では、本方法は、リボヌクレアーゼに対し環状ＲＮＡが耐性であるために、直鎖状ＲＮＡよりも長い半減期を伴う真核細胞内での所望のポリペプチドの産生を提供することにおいて有利である。

【００７７】

環状ＲＮＡポリヌクレオチドは、エキソヌクレアーゼを介した分解に必要な遊離端を欠いているため、同等の直鎖状ＲＮＡと比較した場合、ＲＮＡ分解のいくつかのメカニズムに対して耐性がもたらされ、半減期が長くなる。環状化により、一般に半減期が短いＲＮＡポリヌクレオチドの安定化が可能になり得、様々な用途において外因性ｍＲＮＡの全体的な有効性が改善し得る。ある実施形態では、タンパク質合成によって評価される真核細胞（例えば、ヒト細胞などの哺乳動物細胞）における本明細書で提供される環状ＲＮＡポリヌクレオチドの機能的半減期は、少なくとも２０時間（例えば、少なくとも８０時間）である。

【００７８】

本発明の様々な態様は、以下のセクションで詳細に説明される。セクションの使用は、本発明を限定することを意味するものではない。各セクションは、本発明の任意の態様に適用することができる。本出願では、「または」の使用は、別段の定めがない限り、「及び／または」を意味する。

【００７９】

１．定義

直鎖状核酸分子は、核酸ホスホジエステル連結が置換基モノヌクレオチドの糖部分の５’炭素及び３’炭素で発生するため、「５’末端（５’－ｔｅｒｍｉｎｕｓ）」（または「５’末端（５’ｅｎｄ）」）及び「３’末端（３’－ｔｅｒｍｉｎｕｓ）」（または「３’末端（３’ｅｎｄ）」）を有すると言われている。新しい連結が５’炭素にあるポリヌクレオチドの端ヌクレオチドは、その５’末端ヌクレオチドである。新しい連結が３’炭素にあるポリヌクレオチドの端ヌクレオチドは、その３’末端ヌクレオチドである。本明細書で使用する場合、「末端ヌクレオチド」は、３’または５’末端の端位置にあるヌクレオチドである。

【００８０】

本明細書で使用する場合、「３’グループＩイントロン断片」という用語は、スプライス部位ジヌクレオチド及び任意で天然エクソン配列のストレッチを含む天然グループＩイントロンの３’近位端と７５％以上の類似性を有する配列を指す。本明細書で使用する場合、「５’グループＩイントロン断片」という用語は、スプライス部位ジヌクレオチド及び任意で天然エクソン配列のストレッチを含む天然グループＩイントロンの５’近位端と７５％以上の類似性を有する配列を指す。本明細書で使用する場合、「順列置換部位」という用語は、イントロンの順列置換の前に切断が行われるグループＩイントロン内の部位を指す。この切断により、３’及び５’グループＩイントロン断片が生成され、これらは、環状化されるＲＮＡ前駆体のストレッチのいずれかの側に順列置換される。

【００８１】

本明細書で使用される場合、単数形「ａ」、「ａｎ」、及び「ｔｈｅ」は、内容が明確に別様に指示しない限り、複数の指示対象を含む。ゆえに、例えば、「細胞」への言及は、２つ以上の細胞の組み合わせ、または細胞の培養物全体を含む；「ポリヌクレオチド」への言及は、実際問題として、そのポリヌクレオチドの多くのコピーを含む。

【００８２】

具体的に述べられるまたは文脈から明らかでない限り、本明細書で使用する場合、「約」という用語は、当該技術分野における通常の許容範囲内、例えば、平均の２標準偏差内にあるものと理解される。「約」は、記載される値の１０％、９％、８％、７％、６％、５％、４％、３％、２％、１％、０．９％、０．８％、０．７％、０．６％、０．５％、０．４％、０．３％、０．２％、０．１％、０．０９％、０．０８％、０．０７％、０．０６％、０．０５％、０．０４％、０．０３％、０．０２％、または０．０１％内であると理解され得る。文脈から別様に明確でない限り、本明細書に提供する全ての数値は、「約」という用語によって修飾される。

【００８３】

本明細書で使用する場合、「親和性配列」または「親和性タグ」は、ポリヌクレオチド配列の精製を補助する目的で、ヌクレオチドの反復セットを含む、１（１）ヌクレオチドから数百または数千ヌクレオチドの範囲のポリヌクレオチド配列の領域である。例えば、親和性配列は、ポリＡ配列またはポリＡＣ配列を含み得るが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、親和性タグは、本明細書で「親和性精製」と称される精製方法で使用され、親和性タグを含む分子との結合剤の選択的結合は、親和性タグを含まない分子からの分離を容易にする。いくつかの実施形態では、親和性精製方法は、「ネガティブセレクション」精製方法であり、直鎖状ＲＮＡなどの望ましくない種が選択的に結合及び除去され、環状ＲＮＡなどの望ましい種が溶出され、望ましくない種から分離される。

【００８４】

本明細書で使用する場合、「抗腫瘍効果」は、腫瘍体積の減少、腫瘍細胞数の減少、腫瘍細胞増殖の減少、転移数の減少、全生存期間または無増悪生存期間の増加、寿命の増加、または腫瘍に関連する様々な生理学的症状の改善として現れ得る生物学的効果を指す。抗腫瘍効果はまた、腫瘍の発生の予防、例えばワクチンを指すこともある。

【００８５】

「抗原」は、免疫応答を誘発するか、または抗体もしくは抗原結合分子によって結合されることができる任意の分子を指す。免疫応答は、抗体の産生、特定の免疫適格細胞の活性化、またはその両方に関与し得る。当業者は、事実上全てのタンパク質またはペプチドを含む任意の巨大分子が抗原として機能し得ることを容易に理解するであろう。抗原は、内因的に発現され得、すなわち、ゲノムＤＮＡによって発現され得る、または組換え的に発現され得る。抗原は、がん細胞などの特定の組織に特異的であってもよく、またはそれは広く発現されてもよい。加えて、より大きな分子の断片は、抗原として作用し得る。いくつかの実施形態では、抗原は、腫瘍抗原である。

【００８６】

「抗原結合分子」、「抗原結合部分」、または「抗体断片」は、所望の抗原と特異的に結合する任意の分子を指す。いくつかの実施形態では、抗原結合分子は、抗体または抗体様分子の抗原結合部分（例えば、ＣＤＲ）を含む。抗原結合分子は、抗原相補性決定領域（ＣＤＲ）を含み得る。抗体断片の例には、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）２、Ｆｖ断片、ｄＡｂ、直鎖状抗体、ｓｃＦｖ抗体、及び抗原結合分子から形成される多重特異性抗体が含まれるが、これらに限定されない。ペプチボディ（すなわち、ペプチド結合ドメインを含むＦｃ融合分子）は、好適な抗原結合分子の別の例である。いくつかの実施形態では、抗原結合分子は、腫瘍細胞上の抗原と結合する。いくつかの実施形態では、抗原結合分子は、過剰増殖性疾患に関与する細胞上の抗原、またはウイルスまたは細菌抗原と結合する。いくつかの実施形態では、抗原結合分子は、ＢＣＭＡと結合する。さらなる実施形態では、抗原結合分子は、抗原と特異的に結合する、その相補性決定領域（ＣＤＲ）の１つ以上を含む抗体断片である。さらなる実施形態では、抗原結合分子は、単鎖可変断片（ｓ

ｃＦｖ）である。いくつかの実施形態では、抗原結合分子は、アビマーを含むか、またはそれからなる。

【００８７】

「抗体」（Ａｂ）という用語には、限定されないが、抗原と特異的に結合する糖タンパク質免疫グロブリンが含まれる。概して、抗体は、ジスルフィド結合によって相互接続された少なくとも２つの重（Ｈ）鎖及び２つの軽（Ｌ）鎖、またはその抗原結合分子を含み得る。各Ｈ鎖は、重鎖可変領域（本明細書ではＶＨと略される）及び重鎖定常領域を含み得る。重鎖定常領域は、３つの定常ドメイン、ＣＨ１、ＣＨ２、及びＣＨ３を含むことができる。各軽鎖は、軽鎖可変領域（本明細書ではＶＬと略される）及び軽鎖定常領域を含むことができる。軽鎖定常領域は、１つの定常ドメインＣＬを含むことができる。ＶＨ及びＶＬ領域は、フレームワーク領域（ＦＲ）と称されるより保存された領域が散在する、相補性決定領域（ＣＤＲ）と称される超可変性の領域にさらに細分され得る。各ＶＨ及びＶＬは、以下の順序：ＦＲ１、ＣＤＲ１、ＦＲ２、ＣＤＲ２、ＦＲ３、ＣＤＲ３、及びＦＲ４でアミノ末端からカルボキシ末端に配置された３つのＣＤＲ及び４つのＦＲを含み得る。重鎖及び軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含む。Ａｂの定常領域は、免疫系の様々な細胞（例えば、エフェクター細胞）及び古典的補体系の第１の成分を含む、宿主組織または因子への免疫グロブリンの結合を媒介し得る。抗体には、例えば、モノクローナル抗体、組換え産生抗体、単一特異性抗体、多重特異性抗体（二重特異性抗体を含む）、ヒト抗体、操作抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、免疫グロブリン、合成抗体、２つの重鎖分子及び２つの軽鎖分子を含む四量体抗体、抗体軽鎖単量体、抗体重鎖単量体、抗体軽鎖二量体、抗体重鎖二量体、抗体軽鎖－抗体重鎖対、イントラボディ、抗体融合体（本明細書では「抗体複合体」と呼ばれることもある）、ヘテロ複合抗体、単一ドメイン抗体、一価抗体、単鎖抗体または単鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、ラクダ化抗体、アフィボディ、Ｆａｂ断片、Ｆ（ａｂ’）２断片、ジスルフィド結合可変断片（ｓｄＦｖ）、抗イディオタイプ（ａｎｔｉ－ｉｄ）抗体（例えば、抗抗Ｉｄ抗体を含む）、ミニボディ、ドメイン抗体、合成抗体（本明細書では「抗体模倣物」と呼ばれることもある）、及び上記のいずれかの抗原結合断片が含まれ得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗体は、ポリクローナル抗体集団を指す。

【００８８】

免疫グロブリンは、ＩｇＡ、分泌型ＩｇＡ、ＩｇＧ、及びＩｇＭを含むがこれらに限定されない、一般に知られているアイソタイプのいずれかに由来し得る。ＩｇＧサブクラスも当業者に周知であり、ヒトＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、及びＩｇＧ４を含むがこれらに限定されない。「アイソタイプ」は、重鎖定常領域遺伝子によってコードされるＡｂクラスまたはサブクラス（例えば、ＩｇＭまたはＩｇＧ１）を指す。「抗体」という用語は、例として、天然に存在する及び天然に存在しないＡｂの両方、モノクローナル及びポリクローナルＡｂ、キメラ及びヒト化Ａｂ、ヒトまたは非ヒトＡｂ、完全合成Ａｂ、ならびに一本鎖Ａｂを含む。非ヒトＡｂは、ヒトにおけるその免疫原性を低減するために、組換え方法によってヒト化され得る。明示的に記載されない場合、及び文脈上別段の指示がない限り、「抗体」という用語は、前述の免疫グロブリンのいずれかの抗原結合断片または抗原結合部分も含み、一価及び二価断片または部分、ならびに一本鎖Ａｂを含む。

【００８９】

ＣＤＲのいくつかの定義は、Ｋａｂａｔ番号付け、Ｃｈｏｔｈｉａ番号付け、ＡｂＭ番号付け、またはコンタクト番号付けで一般に使用される。ＡｂＭの定義は、ＯｘｆｏｒｄＭｏｌｅｃｕｌａｒのＡｂＭ抗体モデリングソフトウェアによって使用される２つの間の中間物である。コンタクトの定義は、利用可能な複合結晶構造の分析に基づく。「Ｋａｂａｔ番号付け」という用語及び同様の用語は、当該技術分野において認識されており、抗体またはその抗原結合分子の重鎖及び軽鎖可変領域における番号付けアミノ酸残基のシステムを指す。特定の態様では、抗体のＣＤＲは、Ｋａｂａｔ番号付けシステムに従って決定され得る（例えば、Ｋａｂａｔ ＥＡ ＆ Ｗｕ ＴＴ（１９７１）Ａｎｎ ＮＹ Ａｃａｄ Ｓｃｉ １９０：３８２－３９１及びＫａｂａｔ ＥＡ ｅｔ ａｌ．，（１９

９１）Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，Ｆｉｆｔｈ Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｕ．Ｓ．Ｄｅｐａｒｔｍｅｎｔ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ ａｎｄ Ｈｕｍａｎ Ｓｅｒｖｉｃｅｓ、ＮＩＨ公開第９１－３２４２号を参照されたい）。Ｋａｂａｔ番号付けシステムを使用して、抗体重鎖分子内のＣＤＲは、典型的には、アミノ酸位置３１～３５に存在し、これは、任意に、３５（Ｋａｂａｔ番号付けスキームでは３５Ａ及び３５Ｂと呼ばれる）（ＣＤＲ１）、アミノ酸位置５０～６５（ＣＤＲ２）、及びアミノ酸位置９５～１０２（ＣＤＲ３）に続く、１つまたは２つの追加のアミノ酸を含み得る。Ｋａｂａｔ番号付けシステムを使用して、抗体軽鎖分子内のＣＤＲは、典型的には、アミノ酸位置２４～３４（ＣＤＲ１）、アミノ酸位置５０～５６（ＣＤＲ２）、及びアミノ酸位置８９～９７（ＣＤＲ３）に存在する。特定の実施形態では、本明細書に記載の抗体のＣＤＲは、Ｋａｂａｔ番号付けスキームに従って決定される。ある特定の態様では、抗体のＣＤＲは、Ｃｈｏｔｈｉａ番号付けスキームに従って決定され得、これは、免疫グロブリン構造ループの位置を指す（例えば、Ｃｈｏｔｈｉａ Ｃ ＆ Ｌｅｓｋ ＡＭ，（１９８７），Ｊ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ １９６：９０１－９１７、Ａｌ－Ｌａｚｉｋａｎｉ Ｂ ｅｔ ａｌ，（１９９７）Ｊ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ ２７３：９２７－９４８、Ｃｈｏｔｈｉａ Ｃ ｅｔ ａｌ．，（１９９２）Ｊ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ ２２７：７９９－８１７、Ｔｒａｍｏｎｔａｎｏ Ａ ｅｔ ａｌ，（１９９０）Ｊ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ ２１５（１）：１７５－８２、及び米国特許第７，７０９，２２６号を参照されたい）。典型的には、Ｋａｂａｔ番号付け規則を使用する場合、Ｃｈｏｔｈｉａ ＣＤＲ－Ｈ１ループは、重鎖アミノ酸２６～３２、３３、または３４に存在し、Ｃｈｏｔｈｉａ ＣＤＲ－Ｈ２ループは、重鎖アミノ酸５２～５６に存在し、Ｃｈｏｔｈｉａ ＣＤＲ－Ｈ３ループは、重鎖アミノ酸９５～１０２に存在し、一方でＣｈｏｔｈｉａ ＣＤＲ－Ｌ１ループは、軽鎖アミノ酸２４～３４に存在し、Ｃｈｏｔｈｉａ ＣＤＲ－Ｌ２ループは、軽鎖アミノ酸５０～５６に存在し、Ｃｈｏｔｈｉａ ＣＤＲ－Ｌ３ループは、軽鎖アミノ酸８９～９７に存在する。Ｋａｂａｔ番号付け規則を使用して番号付けされた場合のＣｈｏｔｈｉａ ＣＤＲ－ＨＩループの終了は、ループの長さに応じてＨ３２とＨ３４との間で変化する（これは、Ｋａｂａｔ番号付けスキームが挿入をＨ３５Ａ及びＨ３５Ｂに配置するためであり、３５Ａ及び３５Ｂが存在しない場合、ループは３２で終了し、３５Ａのみが存在する場合、ループは３３で終了し、３５Ａ及び３５Ｂの両方が存在する場合、ループは３４で終了する）。特定の実施形態では、本明細書に記載の抗体のＣＤＲは、Ｃｈｏｔｈｉａ番号付けスキームに従って決定される。

【００９０】

本明細書で使用する場合、「可変領域」または「可変ドメイン」という用語は、互換的に使用され、当該技術分野において一般的である。可変領域は、典型的には、抗体の一部、一般に、軽鎖または重鎖の一部、典型的には、成熟重鎖におけるアミノ末端１１０～１２０アミノ酸、及び成熟軽鎖における約９０～１１５アミノ酸を指し、これらは、抗体間で配列が大きく異なり、特定の抗体の特定の抗原に対する結合及び特異性に使用される。配列の可変性は、相補性決定領域（ＣＤＲ）と呼ばれるそれらの領域に集中し、可変ドメイン内のより高度に保存された領域は、フレームワーク領域（ＦＲ）と呼ばれる。いかなる特定のメカニズムまたは理論に拘束されることを望まないが、軽鎖及び重鎖のＣＤＲは、抗体と抗原との相互作用及び特異性に主に関与すると考えられる。いくつかの実施形態では、可変領域は、ヒト可変領域である。いくつかの実施形態では、可変領域は、げっ歯類またはマウスＣＤＲ及びヒトフレームワーク領域（ＦＲ）を含む。特定の実施形態では、可変領域は、霊長類（例えば、非ヒト霊長類）可変領域である。いくつかの実施形態では、可変領域は、げっ歯類またはマウスＣＤＲ及び霊長類（例えば、非ヒト霊長類）フレームワーク領域（ＦＲ）を含む。「ＶＬ」及び「ＶＬドメイン」という用語は、抗体またはその抗原結合分子の軽鎖可変領域を指すために互換的に使用される。「ＶＨ」及び「ＶＨドメイン」という用語は、抗体またはその抗原結合分子の重鎖可変領域を指すために互換的に使用される。

【００９１】

本明細書で使用する場合、「定常領域」及び「定常ドメイン」という用語は、互換的であり、当該技術分野で一般的な意味を有する。定常領域は、抗体部分、例えば、抗原への抗体の結合に直接関与しないが、Ｆｃ受容体との相互作用などの様々なエフェクター機能を示し得る、軽鎖及び／または重鎖のカルボキシル末端部分である。免疫グロブリン分子の定常領域は、一般に、免疫グロブリン可変ドメインと比較して、より保存されたアミノ酸配列を有する。

【００９２】

本明細書で使用する場合、「アプタマー」は、一般に、単一の定義された配列のオリゴヌクレオチドまたは該ヌクレオチドの混合物のいずれかを指し、混合物は、標的分子（例えば、真核生物開始因子、４０Ｓリボソーム、ポリＣ結合タンパク質、ポリＡ結合タンパク質、ポリピリミジントラクト結合タンパク質、アルゴノートタンパク質ファミリー、ヘテロ核リボヌクレオタンパク質Ｋ及びＬａ、ならびに関連するＲＮＡ結合タンパク質）と特異的に結合する特性を保持する。したがって、本明細書で使用する場合、「アプタマー」は、上記で定義するヌクレオチドの単数及び複数の配列の両方を示す。「アプタマー」という用語は、タンパク質または他の分子に結合することができる一本鎖または二本鎖核酸を指すことを意味する。一般に、アプタマーは、好ましくは約１０～約１００ヌクレオチド、好ましくは約１５～約４０ヌクレオチド、より好ましくは約２０～約４０ヌクレオチドを含み、これらの範囲内にある長さのオリゴヌクレオチドは、従来の技術によって容易に調製される。任意に、アプタマーは、特異的結合を達成するために必要な、少なくとも約６ヌクレオチド、好ましくは１０ヌクレオチド、より好ましくは１４、または１５ヌクレオチドをさらに含むことができる。

【００９３】

本明細書で使用する場合、「自己免疫」は、哺乳動物及びヒト内に侵入及び持続する細菌、ウイルス、真菌、または寄生生物由来の感染性非自己抗原とは異なる、非感染性自己抗原に対する持続性及び進行性の免疫反応として定義される。自己免疫疾患には、強皮症、バセドウ病、クローン病、シェールゲン病、多発性硬化症、橋本病、乾癬、重症筋無力症、自己免疫性多腺性内分泌不全症候群、Ｉ型糖尿病（ＴＩＤＭ）、自己免疫性胃炎、自己免疫性ブドウ膜網膜炎、多発性筋炎、大腸炎、及び甲状腺炎、ならびにヒトループスによって典型的に表される全身性自己免疫疾患が含まれる。本明細書で使用される「自己抗原（Ａｕｔｏａｎｔｉｇｅｎ）」または「自己抗原（ｓｅｌｆ－ａｎｔｉｇｅｎ）」は、哺乳動物に固有であり、当該哺乳動物において免疫原性である抗原またはエピトープを指す。

【００９４】

「自己」という用語は、それが後に再導入される同じ個体に由来する任意の物質を指す。例えば、本明細書に記載の操作自己細胞療法（ｅＡＣＴ（商標））方法は、患者からのリンパ球の収集を伴い、次に、例えば、ＣＡＲ構築物を発現するように操作され、次に、同じ患者に投与される。「同種異系」という用語は、ある個体に由来し、次に、同種の別の個体に導入される任意の物質、例えば、同種異系Ｔ細胞移植を指す。

【００９５】

「結合親和性」は、一般に、分子（例えば、抗体）の単一結合部位とその結合パートナー（例えば、抗原）との間の非共有相互作用の合計の強度を指す。別段の指示がない限り、本明細書で使用する場合、「結合親和性」は、結合対のメンバー（例えば、抗体及び抗原）間の１：１の相互作用を反映する固有の結合親和性を指す。そのパートナーＹに対する分子Ｘの親和性は、一般に、解離定数（$K_D$または$K_d$）によって表すことができる。親和性は、平衡解離定数（$K_D$）及び平衡会合定数$K_A$または$K_a$）を含むがこれらに限定されない、当技術分野で即知の多くの方法で測定及び／または表現することができる。$K_D$は$k_{off}$／$k_{on}$の商から計算され、$K_A$は$k_{on}$／$k_{off}$の商から計算される。$k_{on}$は、例えば、抗原に対する抗体の会合速度定数を指し、$k_{off}$は、例えば、抗原に対する抗体の解離を指す。$k_{on}$及び$k_{off}$は、ＢＩＡＣＯＲＥ（登録商標）またはＫｉＮＥｘＡなどの当業者に即知の技術によって決定され得る。

【００９６】
本明細書で使用する場合、「免疫特異的に結合する」、「免疫特異的に認識する」、「特異的に結合する」、及び「特異的に認識する」という用語は、抗体の文脈における類似の用語であり、かかる結合が当業者によって理解されるように、抗原（例えば、エピトープまたは免疫複合体）と結合する分子を指す。例えば、抗原と特異的に結合する分子は、一般に、例えば、免疫アッセイ、ＢＩＡＣＯＲＥ（登録商標）、ＫｉｎＥｘＡ ３０００機器（Ｓａｐｉｄｙｎｅ Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ、Ｂｏｉｓｅ、ＩＤ）、または当該技術分野で即知の他のアッセイによって決定されるより低い親和性で、他のペプチドまたはポリペプチドと結合し得る。特定の実施形態では、抗原に特異的に結合する分子は、分子が別の抗原に結合する場合に、$K_A$よりも少なくとも２ｌｏｇ、２．５ｌｏｇ、３ｌｏｇ、４ｌｏｇまたはそれ以上である$K_A$で抗原と結合する。

【００９７】
本明細書で使用する場合、「バイシストロン性ＲＮＡ」は、２つの異なるタンパク質をコードする２つの発現配列を含むポリヌクレオチドを指す。これらの発現配列は、プロテアーゼ切断部位などの切断可能なペプチドをコードするヌクレオチド配列によって分離され得る。それらは、リボソームスキッピング要素断によって分離され得る。

【００９８】
「がん」は、体内の異常細胞の制御不能な成長を特徴とする様々な疾患の広範なグループを指す。非制御細胞分裂及び成長は、隣接組織に侵入する悪性腫瘍の形成をもたらし、また、リンパ系または血流を介して身体の遠位部に転移し得る。「がん」または「がん組織」は、腫瘍を含み得る。本明細書に開示される方法によって治療され得るがんの例には、リンパ腫、白血病、骨髄腫、及び他の白血球悪性腫瘍を含む免疫系のがんが含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される方法は、例えば、骨癌、膵臓癌、皮膚癌、頭頸部癌、皮膚または眼内悪性黒色腫、子宮癌、卵巣癌、直腸癌、肛門部の癌、胃癌、精巣癌、子宮癌、多発性骨髄腫、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）、原発性縦隔大細胞型Ｂ細胞リンパ腫（ＰＭＢＣ）、びまん性大細胞型Ｂ細胞リンパ腫（ＤＬＢＣＬ）、濾胞性リンパ腫（ＦＬ）、形質転換濾胞性リンパ腫、脾辺縁帯リンパ腫（ＳＭＺＬ）、食道の癌、小腸の癌、内分泌系の癌、甲状腺の癌、副甲状腺の癌、副腎の癌、尿道の癌、陰茎の癌、慢性または急性白血病、急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、急性リンパ性白血病（ＡＬＬ）（非Ｔ細胞ＡＬＬを含む）、慢性リンパ性白血病（ＣＬＬ）、小児の固形腫瘍、リンパ球性リンパ腫、膀胱の癌、腎臓または尿管の癌、中枢神経系（ＣＮＳ）の新生物、原発性ＣＮＳリンパ腫、腫瘍血管新生、脊髄軸腫瘍、脳幹神経膠腫、下垂体腺腫、類表皮癌、扁平上皮癌、Ｔ細胞リンパ腫、アスベストによって誘導されるものを含む環境誘発性の癌、他のＢ細胞悪性腫瘍、及びこれらのがんの組み合わせに由来する腫瘍の腫瘍サイズを低減するために使用され得る。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される方法は、例えば、肉腫及び癌腫、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨原性肉腫、カポジ肉腫、軟部肉腫、他の肉腫、滑膜腫、中皮腫、ユーイング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、結腸癌、膵臓癌、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、肝細胞癌、肺癌、結腸直腸癌、扁平上皮癌、基底細胞癌、腺癌（例えば、膵臓、結腸、卵巣、肺、乳房、胃、前立腺、子宮頸部、または食道の腺癌）、汗腺癌、皮脂腺癌、乳頭癌、乳頭状腺癌、髄様癌、気管支癌、腎細胞癌、肝癌、胆管癌、絨毛癌、ウィルムス腫瘍、子宮頸癌、精巣腫瘍、膀胱癌、卵管の癌、子宮内膜の癌、子宮頸の癌、膣の癌、外陰の癌、腎盂の癌、ＣＮＳ腫瘍（神経膠腫、星状細胞腫、髄芽腫、頭蓋咽頭腫、上衣腫、松果体腫、血管芽腫、聴神経腫、乏突起膠腫、髄膜腫、黒色腫、神経芽細胞腫、網膜芽細胞腫など）に由来する腫瘍の腫瘍サイズを低減するために使用され得る。特定のがんは、化学療法または放射線療法に応答し得るか、またはがんは、難治性であり得る。難治性癌は、外科的介入に適しておらず、がんが化学療法または放射線療法に最初に応答しないか、またはがんが経時的に応答しなくなるがんを指す。

【００９９】
本明細書で使用する場合、「ｃｉｒｃＲＮＡ」、「環状ポリリボヌクレオチド」、「環

状ＲＮＡ」、「環状化ＲＮＡ」、及び「ｏＲＮＡ」という用語は、互換可能に使用され、共有結合を通して環状構造を形成するポリリボヌクレオチドを指す。本明細書で使用する場合、そのような用語は、ｃｉｒｃＲＮＡを含む調製物も含む。

【０１００】

本明細書で使用する場合、「環状化効率」という用語は、その直鎖状出発物質と比較した、得られる環状ポリリボヌクレオチドの量の形成速度の測定値を指す。

【０１０１】

ポリヌクレオチド構築物中の発現配列は、発現配列によってコードされるポリペプチドが翻訳されると、細胞によって別々に発現されることを可能にする「切断部位」配列によって分離され得る。「自己切断ペプチド」とは、２つの隣接するアミノ酸間のペプチド結合なしで翻訳されるか、またはタンパク質及び自己切断ペプチドを含むポリペプチドが産生されるときに、いかなる外部切断活性も必要なく、すぐに切断または別個の第１及び第２のポリペプチドに分離されるように機能するペプチドを指す。

【０１０２】

本明細書で使用する場合、「コード要素」、「コード配列」、「コード核酸」、または「コード領域」は、発現配列内に位置し、１つ以上のタンパク質またはポリペプチド（例えば、治療用タンパク質）をコードする領域である。本明細書で使用する場合、「非コード要素」、「非コード配列」、「非コード核酸」、または「非コード核酸」は、発現配列内に位置する領域である。この配列は、それ自体は、タンパク質またはポリペプチドをコードしないが、限定されないが、全体のポリヌクレオチドが特定の細胞に対するバイオマーカーまたはアジュバントとして機能することを可能にすることを含む、他の調節機能を有し得る。

【０１０３】

本明細書で使用する場合、「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が同様の側鎖を有するアミノ酸残基で置き換えられたものである。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーが、当該技術分野で定義されている。これらのファミリーは、塩基性側鎖（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸など）、非荷電極性側鎖（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン、トリプトファン）、非極性側鎖（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン）、ベータ分岐側鎖（例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン）、及び芳香族側鎖（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）を有するアミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、ＣＤＲ（複数可）内または抗体またはその抗原結合分子のフレームワーク領域（複数可）内の１つ以上のアミノ酸残基は、類似の側鎖を有するアミノ酸残基で置き換えられ得る。

【０１０４】

本明細書で使用される「共刺激リガンド」には、Ｔ細胞上の同族共刺激分子と特異的に結合する抗原提示細胞上の分子が含まれる。共刺激リガンドの結合は、増殖、活性化、分化などを含むがこれらに限定されないＴ細胞応答を媒介するシグナルを提供する。共刺激リガンドは、例えば、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）／ＣＤ３複合体とペプチドを負荷した主要組織適合性複合体（ＭＨＣ）分子との結合によって、刺激分子によって提供される一次シグナルに加えてシグナルを誘導する。共刺激リガンドには、Ｔｏｌｌ様受容体、Ｂ７－１（ＣＤ８０）、Ｂ７－２（ＣＤ８６）、ＣＤ３０リガンド、ＣＤ４０、ＣＤ７、ＣＤ７０、ＣＤ８３、ヘルペスウイルス侵入メディエーター（ＨＶＥＭ）、ヒト白血球抗原Ｇ（ＨＬＡ－Ｇ）、ＩＬＴ４、免疫グロブリン様転写物（ＩＬＴ）３、誘導共刺激リガンド（ＩＣＯＳ－Ｌ）、細胞間接着分子（ＩＣＡＭ）、Ｂ７－Ｈ３と特異的に結合するリガンド、リンホトキシンベータ受容体、ＭＨＣクラスＩ鎖関連タンパク質Ａ（ＭＩＣＡ）、ＭＨＣクラスＩ鎖関連タンパク質Ｂ（ＭＩＣＢ）、ＯＸ４０リガンド、ＰＤ－Ｌ２、またはプログラム死（ＰＤ）ＬＩと結合する３／ＴＲ６、４－ＩＢＢリガンド、アゴニスト、または抗体が含まれるが、これらに限定されない。共刺激リガンドには、Ｔ細胞上に存在する共

刺激分子と特異的に結合する抗体、例えば、４－１ＢＢ、Ｂ７－Ｈ３、ＣＤ２、ＣＤ２７、ＣＤ２８、ＣＤ３０、ＣＤ４０、ＣＤ７、ＩＣＯＳ、ＣＤ８３と特異的に結合するリガンド、リンパ球機能関連抗原－１（ＬＦＡ－１）、ナチュラルキラー細胞受容体Ｃ（ＮＫＧ２Ｃ）、ＯＸ４０、ＰＤ－１、または腫瘍壊死因子スーパーファミリーメンバー１４（ＴＮＦＳＦ１４またはＬＩＧＨＴ）が含まれるが、これに限定されない。

【０１０５】

「共刺激分子」は、共刺激リガンドと特異的に結合するＴ細胞上の同族結合パートナーであり、それによって、増殖などのＴ細胞による共刺激応答を媒介するが、これらに限定されない。共刺激分子には、４－１ＢＢ／ＣＤ１３７、Ｂ７－Ｈ３、ＢＡＦＦＲ、ＢＬＡＭＥ（ＳＬＡＭＦ８）、ＢＴＬＡ、ＣＤ３３、ＣＤ４５、ＣＤ１００（ＳＥＭＡ４Ｄ）、ＣＤ１０３、ＣＤ１３４、ＣＤ１３７、ＣＤ１５４、ＣＤ１６、ＣＤ１６０（ＢＹ５５）、ＣＤ１８、ＣＤ１９、ＣＤ１９ａ、ＣＤ２、ＣＤ２２、ＣＤ２４７、ＣＤ２７、ＣＤ２７６（Ｂ７－Ｈ３）、ＣＤ２８、ＣＤ２９、ＣＤ３（アルファ、ベータ、デルタ、イプシロン、ガンマ、ゼータ）、ＣＤ３０、ＣＤ３７、ＣＤ４、ＣＤ４、ＣＤ４０、ＣＤ４９ａ、ＣＤ４９Ｄ、ＣＤ４９ｆ、ＣＤ５、ＣＤ６４、ＣＤ６９、ＣＤ７、ＣＤ８０、ＣＤ８３ｌｉｇａｎｄ、ＣＤ８４、ＣＤ８６、ＣＤ８アルファ、ＣＤ８ベータ、ＣＤ９、ＣＤ９６（Ｔａｃｔｉｌｅ）、ＣＤ１－ｌａ、ＣＤｌ－ｌｂ、ＣＤｌ－ｌｃ、ＣＤｌ－ｌｄ、ＣＤＳ、ＣＥＡＣＡＭ１、ＣＲＴ　ＡＭ、ＤＡＰ－１０、ＤＮＡＭ１（ＣＤ２２６）、Ｆｃガンマ受容体、ＧＡＤＳ、ＧＩＴＲ、ＨＶＥＭ（ＬＩＧＨＴＲ）、ＩＡ４、ＩＣＡＭ－１、ＩＣＡＭ－１、ＩＣＯＳ、Ｉｇアルファ（ＣＤ７９ａ）、ＩＬ２Ｒベータ、ＩＬ２Ｒガンマ、ＩＬ７Ｒアルファ、インテグリン、ＩＴＧＡ４、ＩＴＧＡ４、ＩＴＧＡ６、ＩＴ　ＧＡＤ、ＩＴＧＡＥ、ＩＴＧＡＬ、ＩＴＧＡＭ、ＩＴＧＡＸ、ＩＴＧＢ２、ＩＴＧＢ７、ＩＴＧＢ１、ＫＩＲＤＳ２、ＬＡＴ、ＬＦＡ－１、ＬＦＡ－１、ＬＩＧＨＴ、ＬＩＧＨＴ（腫瘍壊死因子スーパーファミリーメンバー１４；ＴＮＦＳＦ１４）、ＬＴＢＲ、Ｌｙ９（ＣＤ２２９）、リンパ球機能関連抗原－１（ＬＦＡ－１（ＣＤ１　ｌａ／ＣＤ１８）、ＭＨＣクラスＩ分子、ＮＫＧ２Ｃ、ＮＫＧ２Ｄ、ＮＫｐ３０、ＮＫｐ４４、ＮＫｐ４６、ＮＫｐ８０（ＫＬＲＦ１）、ＯＸ４０、ＰＡＧ／Ｃｂｐ、ＰＤ－１、ＰＳＧＬ１、ＳＥＬＰＬＧ（ＣＤ１６２）、シグナル伝達リンパ球活性化分子、ＳＬＡＭ（ＳＬＡＭＦ１；ＣＤ１５０；ＩＰＯ－３）、ＳＬＡＭＦ４（ＣＤ２４４；２Ｂ４）、ＳＬＡＭＦ６（ＮＴＢ－Ａ；Ｌｙｌ０８）、ＳＬＡＭＦ７、ＳＬＰ－７６、ＴＮＦ、ＴＮＦｒ、ＴＮＦＲ２、Ｔｏｌｌリガンド受容体、ＴＲＡＮＣＥ／ＲＡＮＫＬ、ＶＬＡ１、もしくはＶＬＡ－６、またはそれらの断片、トランケーション体、もしくは組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。

【０１０６】

本明細書で使用される「共刺激シグナル」は、ＴＣＲ／ＣＤ３ライゲーションなどの一次シグナルと組み合わせて、鍵分子の増殖及び／または上方制御または下方制御などのＴ細胞応答をもたらすシグナルを指すが、これらに限定されない。

【０１０７】

本明細書で使用する場合、抗原と第１の結合分子、抗体、またはそれらの抗原結合分子との間の相互作用が、参照結合分子、参照抗体、またはそれらの抗原結合分子の抗原と相互作用する能力を遮断、制限、阻害、またはその他の方法で低減する場合、抗原結合分子、抗体、またはそれらの抗原結合分子は、参照抗体またはそれらの抗原結合分子と「交差競合」する。交差競合は、完全であり得、例えば、結合分子の抗原との結合は、参照結合分子が抗原に結合する能力を完全に遮断するか、または部分的であり得、例えば、結合分子の抗原との結合は、参照結合分子が抗原に結合する能力を低減させる。いくつかの実施形態では、参照抗原結合分子と競合する抗原結合分子は、参照抗原結合分子と同じまたは重複するエピトープと結合する。他の実施形態では、参照抗原結合分子と交差競合する抗原結合分子は、参照抗原結合分子とは異なるエピトープと結合する。１つの抗原結合分子が別の抗原結合分子と競合するかどうかを決定するために、例えば、固相直接または間接ラジオイムノアッセイ（ＲＩＡ）、固相直接または間接酵素免疫測定法（ＥＩＡ）、サン

ドイッチ競争アッセイ（Ｓｔａｈｌｉ ｅｔ ａｌ．，１９８３，Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ ９：２４２－２５３）、固相直接ビオチン－アビジンＥＩＡ（Ｋｉｒｋｌａｎｄ ｅｔ ａｌ．，１９８６，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１３７：３６１４－３６１９）、固相直接標識アッセイ、固相直接標識サンドイッチアッセイ（Ｈａｒｌｏｗ ａｎｄ Ｌａｎｅ，１９８８，Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ，Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｐｒｅｓｓ）、１－１２５標識を用いた固相直接標識ＲＩＡ（Ｍｏｒｅｌ ｅｔ ａｌ．，１９８８，Ｍｏｌｅｃ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２５：７－１５）、固相直接ビオチン－アビジンＥＩＡ（Ｃｈｅｕｎｇ，ｅｔ ａｌ．，１９９０，Ｖｉｒｏｌｏｇｙ １７６：５４６－５５２）、及び直接標識ＲＩＡ（Ｍｏｌｄｅｎｈａｕｅｒ ｅｔ ａｌ．，１９９０，Ｓｃａｎｄ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．３２：７７－８２）など多数の種類の競合結合アッセイを使用できる。

【０１０８】

本明細書で使用される「サイトカイン」は、特定の抗原との接触に応答して１つの細胞によって放出される非抗体タンパク質を指し、サイトカインは、第２の細胞と相互作用して、第２の細胞における応答を媒介する。サイトカインは、細胞によって内因的に発現され得るか、または対象に投与され得る。サイトカインは、免疫応答を伝播するために、マクロファージ、Ｂ細胞、Ｔ細胞、好中球、樹状細胞、好酸球、及び肥満細胞を含む免疫細胞によって放出され得る。サイトカインは、レシピエント細胞における様々な応答を誘導し得る。サイトカインは、恒常性サイトカイン、ケモカイン、炎症促進性サイトカイン、エフェクター、及び急性期タンパク質を含み得る。例えば、インターロイキン（ＩＬ）７及びＩＬ－１５を含む恒常性サイトカインは、免疫細胞の生存及び増殖を促進し、炎症促進性サイトカインは、炎症反応を促進し得る。恒常性サイトカインの例には、ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２ｐ４０、ＩＬ－１２ｐ７０、ＩＬ－１５、及びインターフェロン（ＩＦＮ）ガンマが含まれるが、これらに限定されない。炎症促進性サイトカインの例にはＩＬ－ｌａ、ＩＬ－ｌｂ、ＩＬ－６、ＩＬ－１３、ＩＬ－１７ａ、ＩＬ－２３、ＩＬ－２７、腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）－アルファ、ＴＮＦ－ベータ、線維芽細胞増殖因子（ＦＧＦ）２、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）、可溶性細胞間接着分子１（ｓＩＣＡＭ－１）、可溶性血管接着分子１（ｓＶＣＡＭ－１）、血管内皮増殖因子（ＶＥＧＦ）、ＶＥＧＦ－Ｃ、ＶＥＧＦ－Ｄ、及び胎盤増殖因子（ＰＬＧＦ）が含まれるが、これらに限定されない。エフェクターの例には、グランザイムＡ、グランザイムＢ、可溶性Ｆａｓリガンド（ｓＦａｓＬ）、ＴＧＦ－ベータ、ＩＬ－３５、及びパーフォリンが含まれるが、これらに限定されない。急性期タンパク質の例には、Ｃ反応性タンパク質（ＣＲＰ）及び血清アミロイドＡ（ＳＡＡ）が含まれるが、これらに限定されない。

【０１０９】

「共投与」とは、本明細書に提供する治療剤を、１つ以上の追加の治療剤と併せて、本明細書に提供する治療剤が１つ以上の追加の治療剤の効果を向上することができるように、またはその逆であるように、十分に近い時間で投与することを意味する。

【０１１０】

本明細書で使用する場合、「共製剤」という用語は、２つ以上の核酸または核酸及び他の活性薬物を含むナノ粒子製剤を指す。典型的には、比率は等モルである、または２つ以上の核酸もしくは核酸及び他の活性薬物の比率計測量で定義される。

【０１１１】

本明細書で使用する場合、「デオキシリボ核酸」及び「ＤＮＡ」という用語は、デオキシリボヌクレオチドから構成されるポリマーを意味する。本明細書で使用する場合、「リボ核酸」及び「ＲＮＡ」という用語は、リボヌクレオチドから構成されるポリマーを意味する。

【０１１２】

本明細書で使用する場合、「ＤＮＡ鋳型」という用語は、直鎖状ＲＮＡポリヌクレオチドを転写することができるＤＮＡ配列を指す。例えば、限定することを意図するものでは

ないが、ＤＮＡ鋳型は、ＤＮＡベクター、ＰＣＲ産物、またはプラスミドを含み得る。

【０１１３】

本明細書で使用する場合、「二重鎖」、「二本鎖」、及び「ハイブリダイズ」という用語は、互換的に使用され、相補的配列を含む核酸の２つの一本鎖のハイブリダイゼーションによって形成される二本鎖核酸を指す。２つの一本鎖核酸の配列は、完全に相補的または部分的に相補的であることができる。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される核酸は、完全に二本鎖であっても、部分的に二本鎖であってもよい。ほとんどの場合、ゲノムＤＮＡは二本鎖である。

【０１１４】

本明細書で使用される場合、２つの「二重鎖配列」、「二重鎖形成配列」、「二重鎖領域」、「二重鎖形成領域」、「相同アーム」、または「相同領域」は、２つの領域がハイブリダイゼーション反応の基質として作用するために、互いの逆相補性に対して十分なレベルの配列同一性を共有する場合、互いに相補的であるか、または完全もしくは部分的に相補的である。いくつかの実施形態では、２つの二重鎖形成配列は、配列特異的相互作用において交差対になるために熱力学的に好ましい。本明細書で使用する場合、ポリヌクレオチド配列は、それらが逆相補体または「相補的」配列に対して同一であるまたは配列同一性を共有する場合、「相同性」を有する。相同領域と対応する相同領域の逆相補体との間の配列同一性パーセントは、ハイブリダイゼーションの発生を可能にする任意の配列同一性の任意のパーセントであり得る。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるポリヌクレオチドの内部二重鎖形成領域は、別の内部二重鎖形成領域と二重鎖を形成することができ、外部二重鎖形成領域とは二重鎖を形成しない。

【０１１５】

本明細書で使用する場合、「コードする」という用語は、ポリマー巨大分子の情報を使用して、第１の分子とは異なる第２の分子の生成を指示する任意のプロセスを広く指す。第２の分子は、第１の分子の化学的性質とは異なる化学構造を有し得る。例えば、ＤＮＡ鋳型（例えば、ＤＮＡベクター）は、ＲＮＡポリヌクレオチドをコードしてもよく、ＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド（例えば、直鎖状ＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド）は、成熟ＲＮＡポリヌクレオチド（例えば、環状ＲＮＡポリヌクレオチド）をコードしてもよい。

【０１１６】

本明細書で使用する場合、「内因性」とは、生体系（例えば、生物、組織、または細胞）に固有の、すなわち、自然に由来する物質を意味する。例えば、いくつかの実施形態では、「内因性ポリヌクレオチド」は、通常、細胞または組織中で発現される。いくつかの実施形態では、転写もしくは翻訳を活性化するプロモーターまたはエンハンサー配列などの制御配列が組換え技術によって改変されている場合でも、ポリヌクレオチドは依然として内因性であるとみなされる。本明細書で使用される「異種」という用語は、天然に存在する配列以外の任意の供給源に由来することを意味する。

【０１１７】

本明細書で使用する場合、「エンドヌクレアーゼ部位」は、エンドヌクレアーゼタンパク質によって認識及び切断されることができるポリヌクレオチド内のヌクレオチドのストレッチを指す。

【０１１８】

「真核生物開始因子」または「ｅＩＦ」は、真核生物翻訳の開始に必要なイニシエータｔＲＮＡ、４０Ｓ及び６０Ｓリボソームサブユニットの組み立てに使用されるタンパク質またはタンパク質複合体を指す。

【０１１９】

本明細書で使用する場合、「エピトープ」は、当該技術分野における用語であり、抗体が特異的に結合し得る抗原の局所領域を指す。エピトープは、例えば、ポリペプチドの連続アミノ酸（直鎖状または連続したエピトープ）であり得るか、またはエピトープは、例えば、ポリペプチドまたはポリペプチドの２つ以上の非連続領域（立体構造、非直鎖状、不連続、または非連続エピトープ）から一緒になり得る。いくつかの実施形態では、抗体

が結合するエピトープは、例えば、ＮＭＲ分光法、Ｘ線回折結晶学的研究、ＥＬＩＳＡアッセイ、質量分析と組み合わせた水素／重水素交換（例えば、液体クロマトグラフィーエレクトロスプレー質量分析）、アレイベースのオリゴペプチド走査アッセイ、及び／または変異誘発マッピング（例えば、部位特異的変異誘発マッピング）によって決定され得る。Ｘ線結晶学については、結晶化は、当該技術分野における既知の方法（例えば、Ｇｉｅｇｅ Ｒ ｅｔ ａｌ．，（１９９４）Ａｃｔａ Ｃｒｙｓｔａｌｌｏｇｒ Ｄ Ｂｉｏｌ Ｃｒｙｓｔａｌｌｏｇｒ ５０（Ｐｔ ４）：３３９－３５０、ＭｃＰｈｅｒｓｏｎ Ａ（１９９０）Ｅｕｒ Ｊ Ｂｉｏｃｈｅｍ １８９：１－２３、Ｃｈａｙｅｎ ＮＥ（１９９７）Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ ５：１２６９－１２７４、ＭｃＰｈｅｒｓｏｎ Ａ（１９７６）Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ ２５１：６３００－６３０３）のいずれかを使用して達成され得る。抗体：抗原結晶は、周知のＸ線回折技術を使用して研究することができ、Ｘ－ＰＬＯＲ（Ｙａｌｅ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ，１９９２、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｓｉｍｕｌａｔｉｏｎｓ，Ｉｎｃ．によって普及された；例えば、Ｍｅｔｈ Ｅｎｚｙｍｏｌ（１９８５）ｖｏｌｕｍｅｓ １１４ ＆ １１５，ｅｄｓ Ｗｙｃｋｏｆｆ ＨＷ ｅｔ ａｌ．、米国特許公開第２００４／００１４１９４号）、及びＢＵＳＴＥＲ（Ｂｒｉｃｏｇｎｅ Ｇ（１９９３）Ａｃｔａ Ｃｒｙｓｔａｌｌｏｇｒ Ｄ Ｂｉｏｌ Ｃｒｙｓｔａｌｌｏｇｒ ４９（Ｐｔ １）：３７－６０、Ｂｒｉｃｏｇｎｅ Ｇ（１９９７）Ｍｅｔｈ Ｅｎｚｙｍｏｌ ２７６Ａ：３６１－４２３，ｅｄ Ｃａｒｔｅｒ ＣＷ、Ｒｏｖｅｒｓｉ Ｐ ｅｔ ａｌ．，（２０００）Ａｃｔａ Ｃｒｙｓｔａｌｌｏｇｒ Ｄ Ｂｉｏｌ Ｃｒｙｓｔａｌｌｏｇｒ ５６（Ｐｔ １０）：１３１６－１３２３）などのコンピューターソフトウェアを使用して精製することができる。

【０１２０】

本明細書で使用する場合、「発現配列」という用語は、産物、例えばペプチドまたはポリペプチド、調節核酸、または非コード核酸をコードする核酸配列を指す。ペプチドまたはポリペプチドをコードする例示的な発現配列は、複数のヌクレオチドトライアドを含むことができ、そのそれぞれは、アミノ酸をコードすることができ、「コドン」と称される。

【０１２１】

本明細書で使用する場合、「融合タンパク質」は、単一のペプチドを転写するために連結された別個の遺伝子によってコードされる少なくとも２つのドメインを有するタンパク質である。

【０１２２】

「遺伝子操作」または「操作」という用語は、コードもしくは非コード領域またはその一部を欠失させること、またはコード領域もしくはその一部を挿入することを含むがこれらに限定されない、細胞のゲノムを修飾する方法を指す。いくつかの実施形態では、修飾される細胞は、患者またはドナーのいずれかから得ることができるリンパ球、例えばＴ細胞である。細胞は、細胞のゲノムに組み込まれる、例えば、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）またはＴ細胞受容体（ＴＣＲ）などの外因性構築物を発現するように修飾され得る。

【０１２３】

「免疫応答」とは、侵入病原体、病原体に感染した細胞もしくは組織、がん細胞もしくは他の異常細胞、または自己免疫もしくは病的炎症の場合は正常なヒト細胞もしくは組織の選択的標的化、結合、損傷、破壊、及び／または脊椎動物の体からの排除をもたらす、免疫系の細胞（例えば、Ｔリンパ球、Ｂリンパ球、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞、マクロファージ、好酸球、肥満細胞、樹状細胞、及び好中球）とこれらの細胞または肝臓のいずれかによって生成される可溶性高分子（Ａｂ、サイトカイン、補体を含む）の作用を指す。

【０１２４】

本明細書で使用される場合、「免疫原性」または「免疫刺激性」という用語は、物質に対する免疫応答を誘導する可能性を指す。免疫応答を誘導する可能性を指す免疫応答は、生物の免疫系またはある特定のタイプの免疫細胞が免疫原性物質に曝露された場合に誘導

され得る。「非免疫原性」という用語は、物質に対する検出可能な閾値を超える。免疫応答の欠如または非存在を指す免疫応答は、生物の免疫系またはある特定のタイプの免疫細胞が非免疫原性物質に曝露した場合には検出されない。いくつかの実施形態では、本明細書に提供するような非免疫原性環状ポリリボヌクレオチドは、免疫原性アッセイによって測定された場合、所定の閾値を超える免疫応答を誘導しない。いくつかの実施形態では、自然免疫応答は、生物の免疫系または特定のタイプの免疫細胞が本明細書に提供するような非免疫原性環状ポリリボヌクレオチドに曝露された場合には、検出されない。いくつかの実施形態では、適応免疫応答は、生物の免疫系または特定のタイプの免疫細胞が本明細書に提供するような非免疫原性環状ポリリボヌクレオチドに曝露された場合には、検出されない。

【０１２５】

本明細書で使用する場合、「配列内リボソーム進入部位」または「ＩＲＥＳ」は、典型的なＲＮＡキャップ構造の非存在下でポリペプチドの翻訳を開始することができる、１０ｎｔ～１０００ｎｔ以上のサイズ範囲のＲＮＡ配列または構造要素を指す。ＩＲＥＳは典型的には、約５００ｎｔ～約７００ｎｔの長さである。

【０１２６】

「単離された」または「精製された」は、一般に、物質（例えば、いくつかの実施形態では、化合物、ポリヌクレオチド、タンパク質、ポリペプチド、ポリヌクレオチド組成物、またはポリペプチド組成物）が、それが存在する試料のかなりのパーセント（例えば、１％を超える、２％を超える、５％を超える、１０％を超える、２０％を超える、５０％を超える、またはそれ以上、通常は最大約９０％～１００％）を構成するような、物質の単離を指す。特定の実施形態では、実質的に精製された成分は、試料の少なくとも５０、６０、７０、７５、８０、８５、９０、９５、９６、９７、９８、または９９％を構成する。さらなる実施形態では、実質的に精製された成分は、サンプルの約８０％～８５％、または９０％～９５％、９５～９９％、９６～９９％、９７～９９％、または９５～１００％を構成する。目的のポリヌクレオチド及びポリペプチドを精製するための技術は当該技術分野で周知であり、例えば、イオン交換クロマトグラフィー、親和性クロマトグラフィー、及び密度に応じた沈降が含まれる。一般に、物質は、試料の他の成分と比較して、自然に見られる量よりも多い量で試料に存在する場合に精製される。

【０１２７】

本明細書で使用する場合、「先導非翻訳配列」は、ポリヌクレオチド配列の最上部の５’末端に位置する、１ヌクレオチドから数百ヌクレオチドの範囲のポリヌクレオチド配列の領域である。配列は定義することができるまたは無作為であることもできる。先導非翻訳配列は、非コードである。本明細書で使用する場合、「末端非翻訳配列」は、ポリヌクレオチド配列の最下部の３’末端に位置する、１ヌクレオチドから数百ヌクレオチドの範囲のポリヌクレオチド配列の領域である。配列は定義することができるまたは無作為であることもできる。末端非翻訳配列は、非コードである。

【０１２８】

本明細書で使用される「リンパ球」という用語には、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞、Ｔ細胞、またはＢ細胞が含まれる。ＮＫ細胞は、自然免疫系の主要な構成要素である細胞傷害性（細胞傷害性）リンパ球の一種である。ＮＫ細胞は、腫瘍及びウイルスに感染した細胞を拒絶する。それは、アポトーシスまたはプログラムされた細胞死のプロセスを通じて機能する。それらは、細胞を殺すために活性化を必要としないため、「ナチュラルキラー」と呼ばれた。Ｔ細胞は、細胞媒介性免疫において主要な役割を果たす（抗体の関与はない）。Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）は、Ｔ細胞を他のリンパ球型と区別する。免疫系の特殊な器官である胸腺は、Ｔ細胞成熟のための主要な部位である。ヘルパーＴ細胞（例えば、ＣＤ４＋細胞）、細胞傷害性Ｔ細胞（ＴＣ、細胞傷害性Ｔリンパ球、ＣＴＬ、Ｔキラー細胞、細胞溶解性Ｔ細胞、ＣＤ８＋Ｔ細胞またはキラーＴ細胞としても知られる）、メモリーＴ細胞（（ｉ）幹メモリー細胞（ＴＳＣＭ）は、ナイーブ細胞と同様に、ＣＤ４５ＲＯ－、ＣＣＲ７＋、ＣＤ４５ＲＡ＋、ＣＤ６２Ｌ＋（Ｌ－セレクチン）、ＣＤ２７＋、ＣＤ

２８＋、及びＩＬ－７Ｒａ＋であるが、ＣＤ９５、ＩＬ－２Ｒ、ＣＸＣＲ３、ＬＦＡ－１も大量に発現し、メモリー細胞に特有の多くの機能的属性を示す）、（ｉｉ）セントラルメモリー細胞（ＴＣＭ）は、Ｌ－セレクチン及びＣＣＲ７を発現し、ＩＬ－２を分泌するが、ＩＦＮγまたはＩＬ－４は分泌しない、（ｉｉｉ）しかしながら、エフェクターメモリー細胞（ＴＥＭ）は、Ｌ－セレクチンまたはＣＣＲ７を発現しないが、ＩＦＮγ及びＩＬ－４などのエフェクターサイトカインを産生する）、制御性Ｔ細胞（Ｔｒｅｇ、サプレッサーＴ細胞、またはＣＤ４＋ＣＤ２５＋もしくはＣＤ４＋ＦｏｘＰ３＋制御性Ｔ細胞）、ナチュラルキラーＴ細胞（ＮＫＴ）、及びガンマデルタＴ細胞を含む多くの種類のＴ細胞が存在する。一方、Ｂ細胞は、体液性免疫において主な役割を果たす（抗体関与を伴う）。Ｂ細胞は、抗体を作製し、抗原提示細胞（ＡＰＣ）として機能し、抗原相互作用によって活性化された後、短命及び長寿の両方で、メモリーＢ細胞及び形質細胞に変わることができる。哺乳動物では、未熟なＢ細胞は骨髄で形成される。

【０１２９】

本明細書で使用する場合、「ｍｉＲＮＡ部位」は、少なくとも８ヌクレオチドの天然ｍｉＲＮＡ配列と二重鎖を形成することができるポリヌクレオチド内のヌクレオチドのストレッチを指す。

【０１３０】

本明細書で使用する場合、「新生抗原」は、発現タンパク質における腫瘍特異的変異から生じる腫瘍抗原のクラスを指す。

【０１３１】

「ヌクレオチド」という用語は、リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド、その修飾形態、またはその類似体を指す。ヌクレオチドには、プリン、例えば、アデニン、ヒポキサンチン、グアニン、ならびにその誘導体及び類似体、ならびにピリミジン、例えば、シトシン、ウラシル、チミン、ならびにその誘導体及び類似体を含む種が含まれる。ヌクレオチド類似体には、塩基、糖及び／またはリン酸の化学構造に修飾を有するヌクレオチドが含まれ、それには、５’位ピリミジン修飾、８’位プリン修飾、シトシン環外アミンでの修飾、及び５－ブロモ－ウラシルの置換；ならびに２’位糖修飾、例えば限定されないが、２’－ＯＨがＨ、ＯＲ、Ｒ、ハロ、ＳＨ、ＳＲ、$NH_2$、ＮＨＲ、$NR_2$、またはＣＮ（ここで、Ｒは、本明細書で定義するようなアルキル部分である）などの基によって置換されている糖修飾リボヌクレオチドが含まれるが、これに限定されない。ヌクレオチド類似体はまた、塩基、例えばイノシン、クエオシン、キサンチン；糖、例えば２’－メチルリボース；非天然ホスホジエステル連結、例えばメチルホスホン酸、ホスホロチオエート及びペプチド連結を伴うヌクレオチドを含むことを意図する。ヌクレオチド類似体には、５－メトキシウリジン、１－メチルシュードウリジン、及び６－メチルアデノシンが含まれる。

【０１３２】

本明細書に開示する全てのヌクレオチド配列は、ＲＮＡ配列または対応するＤＮＡ配列を表し得る。ＤＮＡにおけるデオキシチミジン（ｄＴまたはＴ）は、ＲＮＡにおけるウリジン（Ｕ）に転写されることが理解される。このように、「Ｔ」及び「Ｕ」は、本明細書でヌクレオチド配列において互換的に使用される。

【０１３３】

「核酸」及び「ポリヌクレオチド」という用語は、本明細書において互換可能に使用され、任意の長さ、例えば、約２塩基を超える、約１０塩基を超える、約１００塩基を超える、約５００塩基を超える、１０００塩基を超える、または最大で約１０，０００塩基以上の、ヌクレオチド、例えば、デオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドから構成されるポリマーを説明し、酵素的または合成的に産生され得（例えば、米国特許第５，９４８，９０２号及びそこに引用される参考文献に記載されるとおりである）、これは２つの天然に存在する核酸のものに類似した配列特異的様式で天然に存在する核酸とハイブリダイズする、例えば、ワトソン－クリック塩基対形成相互作用に参加することができる。「オリゴヌクレオチド」は、１０００ヌクレオチド未満を含むポリヌクレオチド、例え

ば、５００ヌクレオチド未満または１００ヌクレオチド未満を含むポリヌクレオチドである。天然に存在する核酸は、グアニン、シトシン、アデニン、チミン、及びウラシルを含むヌクレオチド（それぞれ、Ｇ、Ｃ、Ａ、Ｔ、及びＵ）を含むヌクレオチドから構成される。本明細書で使用する場合、「ポリＡ」は、アデニンを含むヌクレオチドからなるポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの一部を意味する。本明細書で使用する場合、「ポリＴ」は、チミンを含むヌクレオチドからなるポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの一部を意味する。本明細書で使用する場合、「ポリＡＣ」は、アデニンまたはシトシンを含むヌクレオチドからなるポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの一部を意味する。

【０１３４】

本明細書で使用する場合、「リボソームスキッピング要素」という用語は、１つのＲＮＡ分子の翻訳から２つのペプチド鎖の生成を引き起こすことが可能な短いペプチド配列をコードするヌクレオチド配列を指す。理論に拘束されることは望まないが、リボソームスキッピング要素は、（１）第１のペプチド鎖の翻訳を終結させ、第２のペプチド鎖の翻訳を再開すること、または（２）コードされるペプチドの固有のプロテアーゼ活性による、または環境（例えば、サイトゾル）における別のプロテアーゼによる、リボソームスキッピング要素によってコードされるペプチド配列におけるペプチド結合の切断によって機能すると仮定される。

【０１３５】

本明細書で使用する「配列同一性」という用語は、比較ウィンドウにわたって配列がヌクレオチドごとまたはアミノ酸ごとに同一である程度を指す。ゆえに、「配列同一性のパーセンテージ」は、２つの最適に整列された配列を比較ウィンドウにわたって比較し、一致する位置の数を得るために両配列において同一の核酸塩基（例えば、Ａ、Ｔ、Ｃ、Ｇ、Ｉ）または同一アミノ酸残基（例えば、Ａｌａ、Ｐｒｏ、Ｓｅｒ、Ｔｈｒ、Ｇｌｙ、Ｖａｌ、Ｌｅｕ、Ｉｌｅ、Ｐｈｅ、Ｔｙｒ、Ｔｒｐ、Ｌｙｓ、Ａｒｇ、Ｈｉｓ、Ａｓｐ、Ｇｌｕ、Ａｓｎ、Ｇｌｎ、Ｃｙｓ及びＭｅｔ）が存在する位置の数を決定し、一致する位置の数を比較ウィンドウ内の位置の総数（すなわち、ウィンドウサイズ）で割り、その結果に１００を掛けることにより算出され得て、配列同一性のパーセンテージが得られる。本明細書に記載の参照配列のいずれかに対して、少なくとも約５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％配列同一性を有するヌクレオチド及びポリペプチドが含まれ、典型的にはポリペプチドバリアントは、参照ポリペプチドの少なくとも１つの生物学的活性を維持する。

【０１３６】

本明細書で使用する場合、「スペーサー」は、ポリヌクレオチド配列に沿って２つの他の要素を分離する１ヌクレオチドから数百または数千ヌクレオチドの範囲のポリヌクレオチド配列の領域を指す。配列は定義することができるまたは無作為であることもできる。スペーサーは典型的には、非コードである。いくつかの実施形態では、スペーサーは、二重領域を含む。

【０１３７】

本明細書で使用する場合、「スプライス部位」という用語は、グループＩイントロンに部分的または完全に含まれ、その間でＲＮＡ環状化中にホスホジエステル結合が切断されるジヌクレオチドを指す。

【０１３８】

本明細書で使用する場合、ＲＮＡに関して「構造化」とは、ＲＮＡＦｏｌｄソフトウェアまたは同様の予測ツールによって、それ自体または同じＲＮＡ分子内の他の配列と構造（例えば、ヘアピンループ）を形成すると予測されるＲＮＡ配列を指す。本明細書で使用する場合、ＲＮＡに関して「非構造化」とは、それ自体または同じＲＮＡ分子内の他の配列と構造（例えば、ヘアピンループ）を形成することがＲＮＡ構造予測ツールによって予測されないＲＮＡ配列を指す。いくつかの実施形態では、非構造化ＲＮＡは、ヌクレアー

ゼ保護アッセイを使用して機能的に特徴評価することができる。

【０１３９】

本明細書で使用する場合、「治療用タンパク質」という用語は、対象に、翻訳された核酸の形態で直接または間接的に投与された場合に、治療的、診断的、及び／または予防効果を有する、及び／または望ましい生物学的及び／または薬理学的効果を引き出す、任意のタンパク質を指す。

【０１４０】

「転写」は、ＤＮＡ分子をテンプレートとして使用するＲＮＡポリメラーゼによるＲＮＡ分子の形成または合成を意味する。本発明は、転写に使用されるＲＮＡポリメラーゼに関して制限されない。例えば、いくつかの実施形態では、Ｔ７型ＲＮＡポリメラーゼを使用することができる。

【０１４１】

「翻訳」は、ＲＮＡテンプレートに基づくリボソームによるポリペプチド分子の形成を意味する。本明細書で使用する場合、「翻訳効率」という用語は、リボヌクレオチド転写産物からのタンパク質またはペプチド産生の速度または量を指す。いくつかの実施形態では、翻訳効率は、タンパク質またはペプチドをコードする転写産物の所与の量当たりに産生されるタンパク質またはペプチドの量として表すことができる。

【０１４２】

本明細書で使用する場合、「トランスフェクトする」または「トランスフェクション」という用語は、１つ以上の封入された物質（例えば、核酸及び／またはポリヌクレオチド）の、細胞への、または好ましくは標的細胞への細胞内導入を指す。「トランスフェクション効率」という用語は、トランスフェクションの対象となる標的細胞によって取り込まれる、標的細胞へと導入される及び／または標的細胞によって発現されるかかる封入された物質（例えば、ポリヌクレオチド）の相対量を指す。いくつかの実施形態では、トランスフェクション効率は、トランスフェクション後に標的細胞によって産生されるレポーターポリヌクレオチド産物の量によって推定され得る。いくつかの実施形態では、輸送ビヒクルは、高いトランスフェクション効率を有する。いくつかの実施形態では、輸送ビヒクルは、少なくとも約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、または９０％のトランスフェクション効率を有する。

【０１４３】

本明細書で使用する場合、「輸送ビヒクル」は、核酸を含む生物学的に活性な作用物質の投与に関連して使用することを一般に意図する標準的な医薬担体、希釈剤、賦形剤などのいずれかを含む。本発明の特定の実施形態では、輸送ビヒクル（例えば、脂質ナノ粒子）は、１つ以上の物質または治療剤（例えば、ｃｉｒｃＲＮＡ）を封入するように調製される。所望の治療剤（例えば、ｃｉｒｃＲＮＡ）を輸送ビヒクルに組み込むプロセスは、本明細書では、「ロードする」または「封入する」と称する（Ｌａｓｉｃ，ｅｔ　ａｌ．，ＦＥＢＳ　Ｌｅｔｔ．，３１２：２５５－２５８，１９９２）。輸送ビヒクルにロードされた、または封入された物質（例えば、ｃｉｒｃＲＮＡ）は、完全にまたは部分的に、輸送ビヒクルの内部空間に、輸送ビヒクルの二重層膜内に、または輸送ビヒクルの外面に付随して配置され得る。

【０１４４】

本明細書で使用する場合、「処置する」及び「予防する」という用語、ならびにそれらに由来する単語は、必ずしも１００％または完全な処置または予防を意味するものではない。むしろ、当業者が潜在的な利益または治療効果を有すると認識する処置または予防の程度は様々である本明細書に開示する方法によって提供される。処置または予防は、疾患の１つ以上の状態または症状の処置または予防を含むことができる。また、本明細書の目的のために、「予防」は、疾患、またはその症状もしくは状態の発症を遅らせることを包含することができる。

【０１４５】

αβ　ＴＣＲのα鎖及びβ鎖は、一般に、各々、２つのドメインまたは領域、すなわち

、可変ドメイン及び定常ドメイン／領域を有するとみなされる。可変ドメインは、可変領域及び結合領域の連結からなる。したがって、本明細書及び特許請求の範囲では、「ＴＣＲアルファ可変ドメイン」という用語は、ＴＲＡＶ及びＴＲＡＪ領域の連結を指し、ＴＣＲアルファ定常ドメインという用語は、細胞外ＴＲＡＣ領域またはＣ末端切断ＴＲＡＣ配列を指す。同様に、「ＴＣＲベータ可変ドメイン」という用語は、ＴＲＢＶ及びＴＲＢＤ／ＴＲＢＪ領域の連結を指し、ＴＣＲベータ定常ドメインという用語は、細胞外ＴＲＢＣ領域またはＣ末端切断ＴＲＢＣ配列を指す。

【０１４６】

本明細書で使用する場合、「上流」及び「下流」という用語は、ポリヌクレオチド配列における遺伝コード、例えば、ヌクレオチド、配列要素の相対位置を指す。いくつかの実施形態では、ＲＮＡポリヌクレオチドにおいて、上流はポリヌクレオチドの５’末端に向かい、下流は３’末端に向かう。いくつかの実施形態では、ＤＮＡポリヌクレオチドにおいて、上流は問題の遺伝子のコード鎖の５’末端に向かい、下流は３’末端に向かう。

【０１４７】

本明細書で使用する場合、「ワクチン」は、疾患の予防及び／または治療のための免疫を生成するための組成物を指す。したがって、ワクチンは、抗原を含み、ヒトまたは動物への投与時に特異的な防御物質及び保護物質を生成するためにヒトまたは動物で使用されることが意図される薬剤である。

【０１４８】

Ａ．脂質の定義

本明細書で使用する場合、「生分解性脂質」または「分解性脂質」という語句は、宿主環境で数分、数時間、または数日ほどで分解され、理想的には毒性が低くなる及び宿主内に経時的に蓄積する可能性が低くなる、多くの脂質種のいずれかを指す。脂質への一般的な修飾には、エステル結合、及びなかでもジスルフィド結合を含み、脂質の生分解性を高める。

【０１４９】

本明細書で使用する場合、「生分解性ＰＥＧ脂質」または「分解性ＰＥＧ脂質」という語句は、ＰＥＧ分子が、宿主環境で数分、数時間、または数日ほどで脂質から切断され、理想的には免疫原性が低くなる、多くの脂質種のいずれかを指す。ＰＥＧ脂質への一般的な修飾には、エステル結合、及びなかでもジスルフィド結合を含み、脂質の生分解性を高める。

【０１５０】

本明細書で使用する場合、「カチオン性脂質」または「イオン化可能脂質」という用語は、生理学的ｐＨ４などの選択されたｐＨで正味正電荷を持ち、生理学的ｐＨ７などの他のｐＨで中性電荷を持つ多くの脂質種のいずれかを指す。

【０１５１】

本明細書で使用する場合、「ＰＥＧ」という用語は、任意のポリエチレングリコールまたは他のポリアルキレンエーテルポリマーを意味する。

【０１５２】

本明細書で一般に定義する場合、「ＰＥＧ－ＯＨ脂質」（本明細書では「ヒドロキシ－ＰＥＧ化脂質」とも称する）は、脂質上に１つ以上のヒドロキシル（－ＯＨ）基を有するＰＥＧ化脂質である。

【０１５３】

本明細書で使用する場合、「リン脂質」は、リン酸部分及び１つ以上の炭素鎖、例えば不飽和脂肪酸鎖を含む脂質である。

【０１５４】

本明細書で使用する場合、「構造脂質」という用語は、ステロールを指す、及びステロール部分を含有する脂質も指す。本明細書で定義する場合、「ステロール」は、ステロイドアルコールからなるステロイドのサブグループである。

【０１５５】

「頭部基」及び「尾部基」という用語は、本発明の化合物（例えば、脂質）、特にかかる化合物に含まれる官能基を説明するために本明細書で使用される場合、かかる化合物または他の官能基に対する１つ以上の官能基の配向を説明するために参照を容易にするために使用される。例えば、特定の実施形態では、親水性頭部基（例えば、グアニジニウム）は、（例えば、水素結合、ファンデルワールス力、イオン相互作用及び共有結合のうちの１つ以上によって）切断可能な官能基（例えば、ジスルフィド基）に結合し、これは次に親水性尾部基（例えば、コレステロール）に結合する。特定の実施形態では、本明細書に開示する化合物は、例えば、少なくとも１つの親水性頭部基及び少なくとも１つの疎水性尾部基を含み、それぞれが少なくとも１つの切断可能基に結合し、それによってかかる化合物を両親媒性にする。

【０１５６】

本明細書で使用する場合、「両親媒性」という用語は、極性（例えば、水）及び非極性（例えば、脂質）環境の両方に溶解する能力を意味する。例えば、特定の実施形態では、本明細書に開示する化合物（例えば、脂質）は、少なくとも１つの親油性尾部基（例えば、コレステロールまたは$C_6-C_{20}$アルキル）及び少なくとも１つの親水性頭部基（例えば、イミダゾール）を含み、それぞれ切断可能基（例えば、ジスルフィド）に結合している。

【０１５７】

本明細書で使用する場合、「親水性」という用語は、官能基が水を好み、典型的にはかかる基が水溶性であることを定性的に示すために使用される。例えば、１つ以上の親水性基（例えば、親水性頭部基）と結合した切断可能基（例えば、ジスルフィド（Ｓ－Ｓ）基）を含む化合物（例えば、イオン化脂質）を本明細書に開示し、かかる親水性基は、イミダゾール、グアニジニウム、アミノ、イミン、エナミン、任意に置換されるアルキルアミノ（例えば、ジメチルアミノなどのアルキルアミノ）及びピリジルからなる群を含む、またはこれから選択される。

【０１５８】

本明細書で使用する場合、「疎水性」という用語は、官能基が水を嫌い、典型的にはかかる基が水溶性でないことを定性的に示すために使用される。特定の実施形態では、本明細書に開示する化合物を含む部分の官能基の少なくとも１つは、本質的に疎水性である（例えば、コレステロールなどの天然に存在する脂質を含む疎水性尾部基）。例えば、１つ以上の疎水性基に結合した切断可能な官能基（例えば、ジスルフィド（Ｓ－Ｓ）基）を含む化合物（例えば、イオン化可能脂質）を本明細書に開示し、かかる疎水性基は、１つ以上の天然に存在する脂質、例えばコレステロール、任意に置換される、可変飽和もしくは不飽和$C_6-C_{20}$アルキル、及び／または任意に置換される、可変飽和もしくは不飽和$C_6-C_{20}$アシルを含んでもよく、またはそれらから選択されてもよい。

【０１５９】

本明細書で使用する場合、「リポソーム」という用語は、一般に、１つ以上の球状二重層に配置された脂質（例えば、両親媒性脂質）から構成されるベシクルを指す。かかるリポソームは、親油性物質から形成された膜、ならびに１つ以上の標的細胞、組織、及び器官に送達される封入されたｃｉｒｃＲＮＡを含有する水性内部を有する単層または多層ベシクルであり得る。

【０１６０】

本明細書で使用する場合、「脂質ナノ粒子」という語句は、１つ以上のカチオン性またはイオン化可能脂質、安定化脂質、構造脂質、及びヘルパー脂質を含む輸送ビヒクルを指す。

【０１６１】

特定の実施形態では、本明細書に記載の組成物は、１つ以上のリポソームまたは脂質ナノ粒子を含む。企図されるリポソーム及び脂質ナノ粒子を形成するために使用され得る好適な脂質（例えば、イオン化可能脂質）の例としては、本明細書に開示する化合物のうちの１つ以上が挙げられる（例えば、ＨＧＴ４００１、ＨＧＴ４００２、ＨＧＴ４００３、

ＨＧＴ４００４及び／またはＨＧＴ４００５）。かかるリポソーム及び脂質ナノ粒子は、追加のイオン化可能脂質、例えばＣ１２－２００、ＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡ、及び／またはＨＧＴ５００１、ヘルパー脂質、構造脂質、ＰＥＧ修飾脂質、ＭＣ３、ＤＬｉｎＤＭＡ、ＤＬｉｎｋＣ２ＤＭＡ、ｃＫＫ－Ｅ１２、ＩＣＥ、ＨＧＴ５０００、ＤＯＤＡＣ、ＤＤＡＢ、ＤＭＲＩＥ、ＤＯＳＰＡ、ＤＯＧＳ、ＤＯＤＡＰ、ＤＯＤＭＡ、ＤＭＤＭＡ、ＤＯＤＡＣ、ＤＬｅｎＤＭＡ、ＤＭＲＩＥ、ＣＬｉｎＤＭＡ、ＣｐＬｉｎＤＭＡ、ＤＭＯＢＡ、ＤＯｃａｒｂＤＡＰ、ＤＬｉｎＤＡＰ、ＤＬｉｎｃａｒｂＤＡＰ、ＤＬｉｎＣＤＡＰ、ＫＬｉｎ－Ｋ－ＤＭＡ、ＤＬｉｎ－Ｋ－ＸＴＣ２－ＤＭＡ、ＨＧＴ４００３、及びその組み合わせも含み得る。

【０１６２】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示する脂質、例えば、イオン化可能脂質は、１つ以上の切断可能基を含む。「切断」及び「切断可能」という用語は、本明細書で使用する場合、対象の官能基内またはそれに隣接する原子間の１つ以上の化学結合（例えば、共有結合、水素結合、ファンデルワールス力及び／またはイオン相互作用のうちの１つ以上）が、壊れる（例えば、加水分解される）、または選択された条件への曝露時に（例えば、酵素条件への曝露時に）壊れることが可能であることを意味する。特定の実施形態では、切断可能基は、ジスルフィド官能基であり、特定の実施形態は、選択された生物学的条件（例えば、細胞内条件）への曝露時に切断されることができるジスルフィド基である。特定の実施形態では、切断可能基は、選択された生物学的条件への曝露時に切断されることができるエステル官能基である。例えば、ジスルフィド基は、酵素的に、または加水分解、酸化もしくは還元反応によって切断され得る。かかるジスルフィド官能基の切断時に、それに結合している１つ以上の官能部分または基（例えば、頭部基及び／または尾部基のうちの１つ以上）は、遊離し得る。例示的な切断可能基には、ジスルフィド基、エステル基、エーテル基、及びその任意の誘導体（例えば、アルキル及びアリールエステル）が含まれ得るが、これに限定されない。特定の実施形態では、切断可能基は、エステル基またはエーテル基ではない。いくつかの実施形態では、切断可能基は、１つ以上の官能部分または基（例えば、少なくとも１つの頭部基及び少なくとも１つの尾部基）に結合している（例えば、水素結合、ファンデルワールス力、イオン相互作用及び共有結合のうちの１つ以上によって結合している）。特定の実施形態では、官能部分または基の少なくとも１つは、親水性である（例えば、イミダゾール、グアニジニウム、アミノ、イミン、エナミン、任意に置換されるアルキルアミノ及びピリジルのうちの１つ以上を含む親水性頭部基）。

【０１６３】

Ｂ．化学的定義

化合物及びその薬学的に許容可能な塩、かかる化合物を含有する薬学的組成物ならびにかかる化合物及び組成物を使用する方法を含み得る本発明を説明する場合、以下の用語は、存在する場合、別段示されない限り、以下の意味を有する。本明細書に記載される際に、以下に定義される部分のうちのいずれかが様々な置換基で置換され得ること、及びそれぞれの定義が以下に述べられるそれらの範囲内にかかる置換された部分を含むように意図されることも理解されたい。別段明記しない限り、「置換された」という用語は、以下に述べられるように定義される。「基」及び「ラジカル」という用語は、本明細書で使用される際に、交換可能であるとみなされ得ることを、さらに理解されたい。

【０１６４】

本明細書に記載の化合物はまた、１つ以上の同位体置換を含み得る。例えば、Ｈは、$^{1}$Ｈ、$^{2}$Ｈ（Ｄまたは重水素）、及び$^{3}$Ｈ（Ｔまたはトリチウム）を含む、任意の同位体形態であり得；Ｃは、$^{12}$Ｃ、$^{13}$Ｃ、及び$^{14}$Ｃを含む、任意の同位体形態であり得；Ｏは、$^{16}$Ｏ及び$^{18}$Ｏを含む、任意の同位体形態であり得；Ｆは、$^{18}$Ｆ及び$^{19}$Ｆを含む、任意の同位体形態であり得る。

【０１６５】

値の範囲が列挙される際、範囲内の各値及びサブ範囲を包含することが、意図される。

例えば、「$C_{1-6}$アルキル」は、$C_1$、$C_2$、$C_3$、$C_4$、$C_5$、$C_6$、$C_{1-6}$、$C_{1-5}$、$C_{1-4}$、$C_{1-3}$、$C_{1-2}$、$C_{2-6}$、$C_{2-5}$、$C_{2-4}$、$C_{2-3}$、$C_{3-6}$、$C_{3-5}$、$C_{3-4}$、$C_{4-6}$、$C_{4-5}$、及び$C_{5-6}$アルキルを包含することが意図される。

【０１６６】

本明細書で使用する場合、「アルキル」という用語は、直鎖及び分岐鎖の両方の$C_{1-40}$炭化水素（例えば、$C_{6-20}$炭化水素）を指し、飽和及び不飽和の両方の炭化水素を含む。特定の実施形態では、アルキルは、１つ以上の環状アルキル及び／または１つ以上のヘテロ原子、例えば、酸素、窒素、または硫黄を含み得、置換基（例えば、アルキル、ハロ、アルコキシル、ヒドロキシ、アミノ、アリール、エーテル、エステルまたはアミドのうちの１つ以上）で任意で置換され得る。特定の実施形態では、企図されるアルキルは、（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエンを含む。例えば、「$C_{6-20}$」などの名称の使用は、記述された範囲の炭素原子を有するアルキル（例えば、直鎖または分岐鎖であり、アルケン及びアルキルを含む）を指すことが意図されている。いくつかの実施形態では、アルキル基は、１～１０個の炭素原子を有する（「$C_{1-10}$アルキル」）。いくつかの実施形態では、アルキル基は、１～９個の炭素原子を有する（「$C_{1-9}$アルキル」）。いくつかの実施形態では、アルキル基は、１～８個の炭素原子を有する（「$C_{1-8}$アルキル」）。いくつかの実施形態では、アルキル基は、１～７個の炭素原子を有する（「$C_{1-7}$アルキル」）。いくつかの実施形態では、アルキル基は、１～６個の炭素原子を有する（「$C_{1-6}$アルキル」）。いくつかの実施形態では、アルキル基は、１～５個の炭素原子を有する（「$C_{1-5}$アルキル」）。いくつかの実施形態では、アルキル基は、１～４個の炭素原子を有する（「$C_{1-4}$アルキル」）。いくつかの実施形態では、アルキル基は、１～３個の炭素原子を有する（「$C_{1-3}$アルキル」）。いくつかの実施形態では、アルキル基は、１～２個の炭素原子を有する（「$C_{1-2}$アルキル」）。いくつかの実施形態では、アルキル基は、１個の炭素原子を有する（「$C_1$アルキル」）。$C_{1-6}$アルキル基の例には、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、ペンチル、ヘキシルなどが含まれる。

【０１６７】

本明細書で使用する場合、「アルケニル」は、２～２０個の炭素原子、１つ以上の炭素－炭素二重結合（例えば、１、２、３、または４個の炭素－炭素二重結合）、及び任意で１つ以上の炭素－炭素三重結合（例えば、１、２、３、または４個の炭素－炭素三重結合）を有する直鎖または分岐状炭化水素基のラジカルを指す（「$C_{2-20}$アルケニル」）。特定の実施形態では、アルケニルは、いかなる三重結合も含有しない。いくつかの実施形態では、アルケニルは、２～１０個の炭素原子を有する（「$C_{2-10}$アルケニル」）。いくつかの実施形態では、アルケニル基は、２～９個の炭素原子を有する（「$C_{2-9}$アルケニル」）。いくつかの実施形態では、アルケニル基は、２～８個の炭素原子を有する（「$C_{2-8}$アルケニル」）。いくつかの実施形態では、アルケニル基は、２～７個の炭素原子を有する（「$C_{2-7}$アルケニル」）。いくつかの実施形態では、アルケニル基は、２～６個の炭素原子を有する（「$C_{2-6}$アルケニル」）。いくつかの実施形態では、アルケニル基は、２～５個の炭素原子を有する（「$C_{2-5}$アルケニル」）。いくつかの実施形態では、アルケニル基は、２～４個の炭素原子を有する（「$C_{2-4}$アルケニル」）。いくつかの実施形態では、アルケニル基は、２～３個の炭素原子を有する（「$C_{2-3}$アルケニル」）。いくつかの実施形態では、アルケニル基は、２個の炭素原子を有する（「$C_2$アルケニル」）。１つ以上の炭素－炭素二重結合は、内部（２－ブテニルにおけるものなど）または末端（１－ブテニルにおけるものなど）であり得る。$C_{2-4}$アルケニル基の例には、エテニル（$C_2$）、１－プロペニル（$C_3$）、２－プロペニル（$C_3$）、１－ブテニル（$C_4$）、２－ブテニル（$C_4$）、ブタジエニル（$C_4$）などが含まれる。$C_{2-6}$アルケニル基の例には、前述した$C_{2-4}$アルケニル基ならびにペンテニル（$C_5$）、ペンタジエニル（$C_5$）、ヘキセニル（$C_6$）などが含まれる。アルケニルの追加の例には、ヘプテニル（$C_7$）、オクテニル（$C_8$）、オクタトリエニル（$C_8$）な

どが含まれる。

【０１６８】

本明細書で使用する場合、「アルキニル」は、２～２０個の炭素原子、１つ以上の炭素－炭素三重結合（例えば、１、２、３、または４個の炭素－炭素三重結合）、及び任意で１つ以上の炭素－炭素二重結合（例えば、１、２、３、または４個の炭素－炭素二重結合）を有する直鎖または分岐状炭化水素基のラジカルを指す（「$C_{2-20}$アルキニル」）。特定の実施形態では、アルキニルは、いかなる二重結合も含有しない。いくつかの実施形態では、アルキニル基は、２～１０個の炭素原子を有する（「$C_{2-10}$アルキニル」）。いくつかの実施形態では、アルキニル基は、２～９個の炭素原子を有する（「$C_{2-9}$アルキニル」）。いくつかの実施形態では、アルキニル基は、２～８個の炭素原子を有する（「$C_{2-8}$アルキニル」）。いくつかの実施形態では、アルキニル基は、２～７個の炭素原子を有する（「$C_{2-7}$アルキニル」）。いくつかの実施形態では、アルキニル基は、２～６個の炭素原子を有する（「$C_{2-6}$アルキニル」）。いくつかの実施形態では、アルキニル基は、２～５個の炭素原子を有する（「$C_{2-5}$アルキニル」）。いくつかの実施形態では、アルキニル基は、２～４個の炭素原子を有する（「$C_{2-4}$アルキニル」）。いくつかの実施形態では、アルキニル基は、２～３個の炭素原子を有する（「$C_{2-3}$アルキニル」）。いくつかの実施形態では、アルキニル基は、２個の炭素原子を有する（「$C_2$アルキニル」）。１つ以上の炭素－炭素三重結合は、内部（２－ブチニルにおけるものなど）または末端（１－ブチニルにおけるものなど）であり得る。$C_{2-4}$アルキニル基の例には、限定されないが、エチニル（$C_2$）、１－プロピニル（$C_3$）、２－プロピニル（$C_3$）、１－ブチニル（$C_4$）、２－ブチニル（$C_4$）などが含まれる。$C_{2-6}$アルケニル基の例には、前述した$C_{2-4}$アルキニル基ならびにペンチニル（$C_5$）、ヘキシニル（$C_6$）などが含まれる。アルキニルの追加の例には、ヘプチニル（$C_7$）、オクチニル（$C_8$）などが含まれる。

【０１６９】

本明細書で使用する場合、「アルキレン」、「アルケニレン」、及び「アルキニレン」は、それぞれ、アルキル、アルケニル、及びアルキニル基の二価ラジカルを指す。炭素の範囲または数が、特定の「アルキレン」、「アルケニレン」、または「アルキニレン」基に提供される場合、範囲または数は、直鎖状炭素二価鎖中の炭素の範囲または数を指すことが理解される。「アルキレン」、「アルケニレン」、及び「アルキニレン」基は、本明細書に記載される１つ以上の置換基で置換されていてもよく、または置換されていなくてもよい。

【０１７０】

本明細書で使用する場合、「アルコキシ」という用語は、酸素原子を介して別の部分に結合したアルキル基を指す（－Ｏ（アルキル））。非限定的な例は、例えば、メトキシ、エトキシ、プロポキシ、及びブトキシを含む。

【０１７１】

本明細書で使用する場合、「アリール」という用語は、環部分において６～１０個の炭素を含有する芳香族基（例えば、単環式、二環式及び三環式構造）を指す。アリール基は、利用可能な炭素原子を介して任意で置換されていてもよく、特定の実施形態では、酸素、窒素または硫黄などの１つ以上のヘテロ原子を含み得る。いくつかの実施形態では、アリール基は、６個の環炭素原子を有する（「$C_6$アリール」、例えば、フェニル）。いくつかの実施形態では、アリール基は、１０個の環炭素原子を有する（「$C_{10}$アリール」、例えば、ナフチル、例えば、１－ナフチル及び２－ナフチル）。

【０１７２】

「シクロアルキル」という用語は、３～１２、３～８、４～８、または４～６個の炭素の一価飽和環状、二環式、または架橋環状（例えば、アダマンチル）炭化水素基を指し、本明細書では、例えば、シクロアルカンに由来する「$C_{4-8}$シクロアルキル」と称される。例示的なシクロアルキル基には、シクロヘキサン、シクロペンタン、シクロブタン、及びシクロプロパンが含まれるがこれらに限定されない。

【０１７３】
本明細書で使用する場合、「シアノ」は、－ＣＮを指す。
【０１７４】
本明細書で使用する場合、「ヘテロアリール」は、芳香族環系に提供される環炭素原子及び１～４個の環ヘテロ原子を有する５～１０員単環式または二環式４ｎ＋２芳香族環系（例えば、環状配列で共有された６または１０個の電子を有する）のラジカルを指し、各ヘテロ原子は、独立して、窒素、酸素、及び硫黄から選択される（「５～１０員ヘテロアリール」）。１つ以上の窒素原子を含有するヘテロアリール基において、結合点は、原子価が許す限り、炭素または窒素原子であり得る。ヘテロアリール二環式環系は、一方または両方の環において１つ以上のヘテロ原子を含み得る。「ヘテロアリール」は、環系を含み、上で定義されたヘテロアリール環は１つ以上のカルボシクリルまたはヘテロシクリル基と縮合し、結合点はヘテロアリール環上にあり、かかる例では、環員の数は、ヘテロアリール環系における環員の数を指定することを続ける。「ヘテロアリール」はまた、環系を含み、上で定義されたヘテロアリール環は１つ以上のアリール基と縮合し、結合点はアリールまたはヘテロアリール環上のいずれかにあり、かかる例では、環員の数は、縮合（アリール／ヘテロアリール）環系における環員の数を指定する。１つの環がヘテロ原子（例えば、インドリル、キノリニル、カルバゾリルなど）を含まない二環式ヘテロアリール基は、結合点は、いずれかの環、すなわち、ヘテロ原子を有する環（例えば、２－インドリル）またはヘテロ原子を含まない環（例えば、５－インドリル）のいずれかにあり得る。
【０１７５】
本明細書で使用する場合、「ヘテロシクリル」または「複素環式」は、環炭素原子及び１～４環ヘテロ原子を有する３～１０員の非芳香族環系のラジカルを指し、各ヘテロ原子は、独立して、窒素、酸素、硫黄、ホウ素、リン、及びケイ素から選択される（「３～１０員ヘテロシクリル」）。１つ以上の窒素原子を含むヘテロシクリル基は、結合点は、原子価が許す限り、炭素または窒素原子であり得る。ヘテロシクリル基は、単環式（「単環式ヘテロシクリル」）または二環式系（「二環式ヘテロシクリル」）などの縮合、架橋もしくはスピロ環系のいずれかであり得、飽和または部分的に不飽和であり得る。ヘテロシクリル二環式環系は、一方または両方の環に１つ以上のヘテロ原子を含み得る。「ヘテロシクリル」はまた、環系を含み、上で定義されたヘテロシクリル環は、１つ以上のカルボシクリル基と縮合し、結合点はカルボシクリルもしくはヘテロシクリル環または環系上のいずれかにあり、または上で定義されたヘテロシクリル環は、１つ以上のアリールまたはヘテロアリール基と縮合し、結合点はヘテロシクリル環上にあり、かかる例では、環員の数は、ヘテロシクリル環系における環員の数を指定することを続ける。「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、交換可能に使用され得る。
【０１７６】
本明細書で使用される用語「ハロ」及び「ハロゲン」は、フッ素（フルオロ、Ｆ）、塩素（クロロ、Ｃｌ）、臭素（ブロモ、Ｂｒ）、及びヨウ素（ヨード、Ｉ）から選択される原子を指す。特定の実施形態では、ハロ基は、フルオロまたはクロロのいずれかである。
【０１７７】
本明細書で使用する場合、「オキソ」は、－Ｃ＝Ｏを指す。
【０１７８】
一般に、「置換」という用語は、「任意に」という用語が先行するどうかにかかわらず、基（例えば、炭素または窒素原子）に存在する少なくとも１つの水素が、許容される置換基、例えば、置換時に、安定な化合物、例えば、転位、環状化、脱離、または他の反応などによって自発的に変換を受けない化合物を生じる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、「置換」基は、基の１つ以上の置換可能な位置で置換基を有し、任意の所与の構造の１つより多い位置が置換される際に、置換基は、各位置で同じかまたは異なるかのいずれかである。

【０１７９】
本明細書で使用する場合、「薬学的に許容可能な塩」は、妥当な医学的判断の範囲内で、過度の毒性、刺激性、アレルギー応答などを伴わずに、ヒト及び下等動物の組織と接触させた使用に好適であり、合理的な利益／リスク比と釣り合うそれらの塩を指す。薬学的に許容可能な塩は、当該技術分野でよく知られている。例えば、Ｂｅｒｇｅ ｅｔ ａｌ．，は、Ｊ．Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ（１９７７）６６：１－１９において薬学的に許容可能な塩を詳細に記載している。本発明の化合物の薬学的に許容可能な塩には、好適な無機及び有機酸ならびに塩基から誘導されるものが含まれる。薬学的に許容可能な非毒性の酸付加塩の例は、塩酸、臭化水素酸、リン酸、硫酸及び過塩素酸などの無機酸を用いて、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などの有機酸を用いて、あるいはイオン交換などの当該技術分野において使用され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。他の薬学的に許容可能な塩には、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、ヘキサン酸塩、ヨウ化水素酸塩、２－ヒドロキシ－エタンスルホン酸塩、ラクトビオン酸塩、乳酸塩、ラウリン酸塩、ラウリル硫酸塩、リンゴ酸塩、マレイン酸塩、マロン酸塩、メタンスルホン酸塩、２－ナフタレンスルホン酸塩、ニコチン酸塩、硝酸塩、オレイン酸塩、シュウ酸塩、パルミチン酸塩、パモ酸塩、ペクチン酸塩、過硫酸塩、３－フェニルプロピオン酸塩、リン酸塩、ピクリン酸塩、ピバリン酸塩、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、吉草酸塩などが含まれる。適切な塩基に由来する薬学的に許容可能な塩には、アルカリ金属、アルカリ土類金属、アンモニウム及びＮ＋（Ｃ１－４アルキル）４塩が含まれる。代表的なアルカリまたはアルカリ土類金属塩には、ナトリウム、リチウム、カリウム、カルシウム、マグネシウムなどが含まれる。さらなる薬学的に許容可能な塩には、適切な場合、ハライド、水酸化物、カルボン酸塩、硫酸塩、リン酸塩、硝酸塩、低級アルキルスルホン酸塩、及びアリールスルホン酸塩などの対イオンを使用して形成される非毒性アンモニウム、四級アンモニウム、ならびにアミンカチオンが含まれる。

【０１８０】
典型的な実施形態では、本発明は、本明細書に開示する化合物、ならびにかかる化合物の薬学的に許容可能な塩、薬学的に許容可能なエステル、互変異性形態、多形体、及びプロドラッグを包含することが意図される。いくつかの実施形態では、本発明は、本明細書に記載の化合物の薬学的に許容可能な付加塩、薬学的に許容可能なエステル、付加塩の溶媒和物（例えば、水和物）、互変異性形態、多形体、エナンチオマー、エナンチオマーの混合物、立体異性体または立体異性体の混合物（純粋またはラセミもしくは非ラセミ混合物として）を含む。

【０１８１】
本明細書に記載の化合物は、１つ以上の不斉中心を含み得、よって、様々な異性体形態、例えば、エナンチオマー及び／またはジアステレオマーで存在し得る。例えば、本明細書に記載の化合物は、個々のエナンチオマー、ジアステレオマーもしくは幾何異性体の形態であり得、またはラセミ混合物及び１つ以上の立体異性体に富む混合物を含む立体異性体の混合物の形態であり得る。異性体は、キラル高圧液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）ならびにキラル塩の形成及び結晶化を含む、当業者に既知の方法によって混合物から単離され得、または好ましい異性体は、非対称合成によって調製され得る。例えば、Ｊａｃｑｕｅｓ ｅｔ ａｌ．，Ｅｎａｎｔｉｏｍｅｒｓ，Ｒａｃｅｍａｔｅｓ ａｎｄ Ｒｅｓｏｌｕｔｉｏｎｓ（Ｗｉｌｅｙ Ｉｎｔｅｒｓｃｉｅｎｃｅ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，１９８１）；Ｗｉｌｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ ３３：２７２５（１９７７）；Ｅｌｉｅｌ，Ｓｔｅｒｅｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ｏｆ Ｃａｒｂｏｎ Ｃｏｍｐｏ

ｕｎｄｓ（ＭｃＧｒａｗ－Ｈｉｌｌ，ＮＹ，１９６２）；及びＷｉｌｅｎ，Ｔａｂｌｅｓ ｏｆ Ｒｅｓｏｌｖｉｎｇ Ａｇｅｎｔｓ ａｎｄ Ｏｐｔｉｃａｌ Ｒｅｓｏｌｕｔｉｏｎｓ ｐ．２６８（Ｅ．Ｌ．Ｅｌｉｅｌ，Ｅｄ．，Ｕｎｉｖ．ｏｆ Ｎｏｔｒｅ Ｄａｍｅ Ｐｒｅｓｓ，Ｎｏｔｒｅ Ｄａｍｅ，ＩＮ １９７２）を参照されたい。本発明は、追加的に、他の異性体を実質的に含まない個々の異性体として、また、代替的に、様々な異性体の混合物として、本明細書に記載の化合物を包含する。

【０１８２】

特定の実施形態では、化合物（例えば、イオン化可能脂質）及びかかる化合物が成分である輸送ビヒクル（例えば、脂質ナノ粒子）は、１つ以上の標的細胞をトランスフェクトする能力の向上（例えば、増加）を呈する。したがって、１つ以上の標的細胞をトランスフェクトする方法も本明細書に提供する。かかる方法は、一般に、１つ以上の標的細胞がその中に封入された環状ＲＮＡでトランスフェクトされるように、１つ以上の標的細胞を、本明細書に開示する化合物及び／または薬学的組成物と接触させるステップを含む。

【０１８３】

本明細書において使用される用語は、単に特定の実施形態を説明することを目的とし、制限することを意図しないことを理解されたい。具体的に述べられるまたは文脈から明らかでない限り、本明細書で使用する場合、「または」という用語は、包括的であると理解される。本明細書及び下の残りの本明細書において定義されない限り、本明細書において使用される全ての技術的及び科学的用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般に理解されるものと同じ意味を有する。

【０１８４】

２．ＤＮＡ鋳型、ＲＮＡ前駆体、及び環状ＲＮＡ

本発明によれば、本明細書に提供されるＤＮＡ鋳型（例えば、３’増強イントロン要素、３’増強エクソン要素、コア機能要素、５’増強エクソン要素、及び５’増強されたイントロン要素を含む）の転写は、環状化することができる前駆体直鎖状ＲＮＡポリヌクレオチドの形成をもたらす。いくつかの実施形態では、このＤＮＡ鋳型は、ベクター、ＰＣＲ産物、プラスミド、ミニサークルＤＮＡ、コスミド、人工染色体、相補的ＤＮＡ（ｃＤＮＡ）、染色体外ＤＮＡ（ｅｃＤＮＡ）、またはその中の断片を含む。特定の実施形態では、ミニサークルＤＮＡは、直鎖状または非直鎖状であってもよい。特定の実施形態では、プラスミドは、直鎖状または非直鎖状であってもよい。いくつかの実施形態では、ＤＮＡ鋳型は、一本鎖であり得る。他の実施形態では、ＤＮＡ鋳型は、二本鎖であり得る。いくつかの実施形態では、ＤＮＡテンプレートは、全体的にまたは部分的に、ウイルス、細菌、または真核生物ベクターからなる。

【０１８５】

本発明は、本明細書に提供されるように、直鎖状ＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチドがスプライシングされる前に、直鎖状ＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチドと同じ配列を共有するＤＮＡ鋳型（例えば、３’増強イントロン要素、３’増強エクソン要素、コア機能要素、及び５’増強エクソン要素、５’増強イントロン要素）を含む。いくつかの実施形態では、該直鎖状ＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチドは、環状化のプロセス中に３’増強イントロン要素及び５’増強イントロン要素の除去につながるスプライシングを受ける。いくつかの実施形態では、得られる環状ＲＮＡポリヌクレオチドは、３’増強イントロン断片及び５’増強イントロン断片を欠くが、３’増強エクソン断片、コア機能要素、及び５’増強エクソン要素を維持する。

【０１８６】

いくつかの実施形態では、直鎖状ＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチドは、１つ以上のグアノシンヌクレオチドまたはヌクレオシド（例えば、ＧＴＰ）及び二価陽イオン（例えば、$Mg^{2+}$）の存在下でインキュベートすると環状化する。いくつかの実施形態では、３’増強エクソン要素、５’増強エクソン要素、及び／またはコア機能要素は、全体的にまたは部分的に、直鎖状ＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチドの環状化を促進し、本明細書に提供する環状ＲＮＡポリヌクレオチドを形成する。

【０１８７】
特定の実施形態では、本明細書に提供する環状ＲＮＡは、細胞の内側で産生される。いくつかの実施形態では、ＲＮＡ前駆体は、バクテリオファージＲＮＡポリメラーゼによって細胞質中で、または宿主ＲＮＡポリメラーゼＩＩによって核内で、ＤＮＡテンプレートを使用して（例えば、いくつかの実施形態では、本明細書に提供するベクターを使用して）転写され、次に環状化される。
【０１８８】
特定の実施形態では、本明細書に提供する環状ＲＮＡは、環状ＲＮＡ分子によってコードされるポリペプチドが動物の内側で発現されるように、動物（例えば、ヒト）に注射される。
【０１８９】
いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるＤＮＡ（例えば、ベクター）、直鎖状ＲＮＡ（例えば、ＲＮＡ前駆体）、及び／または環状ＲＮＡポリヌクレオチドは、３００～１００００、４００～９０００、５００～８０００、６００～７０００、７００～６０００、８００～５０００、９００～５０００、１０００～５０００、１１００～５０００、１２００～５０００、１３００～５０００、１４００～５０００、及び／または１５００～５０００ヌクレオチドの長さである。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、少なくとも３００ｎｔ、４００ｎｔ、５００ｎｔ、６００ｎｔ、７００ｎｔ、８００ｎｔ、９００ｎｔ、１０００ｎｔ、１１００ｎｔ、１２００ｎｔ、１３００ｎｔ、１４００ｎｔ、１５００ｎｔ、２０００ｎｔ、２５００ｎｔ、３０００ｎｔ、３５００ｎｔ、４０００ｎｔ、４５００ｎｔ、または５０００ｎｔの長さである。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、３０００ｎｔ、３５００ｎｔ、４０００ｎｔ、４５００ｎｔ、５０００ｎｔ、６０００ｎｔ、７０００ｎｔ、８０００ｎｔ、９０００ｎｔ、または１００００ｎｔ以下の長さである。いくつかの実施形態では、本明細書に提供するＤＮＡ、直鎖状ＲＮＡ、及び／または環状ＲＮＡポリヌクレオチドの長さは、約３００ｎｔ、４００ｎｔ、５００ｎｔ、６００ｎｔ、７００ｎｔ、８００ｎｔ、９００ｎｔ、１０００ｎｔ、１１００ｎｔ、１２００ｎｔ、１３００ｎｔ、１４００ｎｔ、１５００ｎｔ、２０００ｎｔ、２５００ｎｔ、３０００ｎｔ、３５００ｎｔ、４０００ｎｔ、４５００ｎｔ、５０００ｎｔ、６０００ｎｔ、７０００ｎｔ、８０００ｎｔ、９０００ｎｔ、または１００００ｎｔである。
【０１９０】
いくつかの実施形態では、本明細書に提供する環状ＲＮＡは、同じ発現配列を含むｍＲＮＡよりも高い機能安定性を有する。いくつかの実施形態では、本明細書に提供する環状ＲＮＡは、同じ発現配列、５ｍｏＵ修飾、最適化ＵＴＲ、キャップ、及び／またはポリＡテールを含むｍＲＮＡよりも高い機能安定性を有する。
【０１９１】
いくつかの実施形態では、本明細書に提供する環状ＲＮＡポリヌクレオチドは、少なくとも５時間、１０時間、１５時間、２０時間、３０時間、４０時間、５０時間、６０時間、７０時間または８０時間の機能的半減期を有する。いくつかの実施形態では、本明細書に提供する環状ＲＮＡポリヌクレオチドは、５～８０、１０～７０、１５～６０、及び／または２０～５０時間の機能的半減期を有する。いくつかの実施形態では、本明細書に提供する環状ＲＮＡポリヌクレオチドは、同じタンパク質をコードする同等の直鎖状ＲＮＡポリヌクレオチドよりも長い（例えば、少なくとも１．５倍長い、少なくとも２倍長い）機能的半減期を有する。いくつかの実施形態では、機能的半減期は、機能的タンパク質合成の検出を通して評価することができる。
【０１９２】
いくつかの実施形態では、本明細書に提供する環状ＲＮＡポリヌクレオチドは、少なくとも５時間、１０時間、１５時間、２０時間、３０時間、４０時間、５０時間、６０時間、７０時間または８０時間の半減期を有する。いくつかの実施形態では、本明細書に提供する環状ＲＮＡポリヌクレオチドは、５～８０、１０～７０、１５～６０、及び／または

２０～５０時間の半減期を有する。いくつかの実施形態では、本明細書に提供する環状ＲＮＡポリヌクレオチドは、同じタンパク質をコードする同等の直鎖状ＲＮＡポリヌクレオチドよりも長い（例えば、少なくとも１．５倍長い、少なくとも２倍長い）半減期を有する。いくつかの実施形態では、環状ＲＮＡポリヌクレオチド、またはその薬学的組成物は、既定の閾値のものよりも長いまたは同等のヒト細胞における機能的半減期を有する。いくつかの実施形態では機能的半減期は、機能的タンパク質アッセイによって決定される。例えば、いくつかの実施形態では、機能的半減期は、インビトロルシフェラーゼアッセイによって決定され、その場合、ガウシアルシフェラーゼ（ＧＬｕｃ）の活性が、１、２、３、４、５、６、７、または１４日にわたって１、２、６、１２、または２４時間毎に環状ＲＮＡポリヌクレオチドを発現するヒト細胞（例えば、ＨｅｐＧ２）の培地において測定される。他の実施形態では、機能的半減期は、インビボアッセイによって決定され、その場合、環状ＲＮＡポリヌクレオチドの発現配列によってコードされるタンパク質のレベルが、１、２、３、４、５、６、７、または１４日にわたって１、２、６、１２、または２４時間毎に患者血清または組織試料において測定される。いくつかの実施形態では、既定の閾値は、環状ＲＮＡポリヌクレオチドと同じ発現配列を含む参照直鎖状ＲＮＡポリヌクレオチドの機能的半減期である。

【０１９３】

いくつかの実施形態では、本明細書に提供する環状ＲＮＡは、同等の直鎖状ｍＲＮＡよりも高い程度の発現、例えば、細胞へのＲＮＡの投与２４時間後により高い程度の発現を有し得る。いくつかの実施形態では、本明細書に提供する環状ＲＮＡは、同じ発現配列、５ｍｏＵ修飾、最適化ＵＴＲ、キャップ、及び／またはポリＡテールを含むｍＲＮＡよりも高い程度の発現を有する。

【０１９４】

いくつかの実施形態では、本明細書に提供する環状ＲＮＡは、生物の免疫系またはある特定のタイプの免疫細胞に曝露された場合、同等のｍＲＮＡよりも免疫原性が低くあり得る。いくつかの実施形態では、本明細書に提供する環状ＲＮＡは、生物の免疫系またはある特定のタイプの免疫細胞に曝露された場合、サイトカインの産生の調節に関連している。例えば、いくつかの実施形態では、本明細書に提供する環状ＲＮＡは、生物の免疫系またはある特定のタイプの免疫細胞に曝露された場合、同じ発現配列を含むｍＲＮＡと比較して、ＩＦＮ－β１、ＲＩＧ－１、ＩＬ－２、ＩＬ－６、ＩＦＮγ、及び／またはＴＮＦαの産生の低下に関連している。いくつかの実施形態では、本明細書に提供する環状ＲＮＡは、生物の免疫系またはある特定のタイプの免疫細胞に曝露された場合、同じ発現配列を含むｍＲＮＡと比較して、より少ないＩＦＮ－β１、ＲＩＧ－Ｉ、ＩＬ－２、ＩＬ－６、ＩＦＮγ、及び／またはＴＮＦαの転写産物誘導に関連している。いくつかの実施形態では、本明細書に提供する環状ＲＮＡは、同じ発現配列を含むｍＲＮＡよりも免疫原性が低い。いくつかの実施形態では、本明細書に提供する環状ＲＮＡは、同じ発現配列、５ｍｏＵ修飾、最適化ＵＴＲ、キャップ、及び／またはポリＡテールを含むｍＲＮＡよりも免疫原性が低い。

【０１９５】

特定の実施形態では、本明細書に提供する環状ＲＮＡは、そのまま細胞へとトランスフェクトすることができる、またはＤＮＡベクターの形でトランスフェクトされて細胞内で転写されることができる。トランスフェクトされたＤＮＡベクターからの環状ＲＮＡの転写は、追加のポリメラーゼまたは細胞にトランスフェクトされた核酸によってコードされるポリメラーゼを介する、または好ましくは内因性ポリメラーゼを介することができる。

【０１９６】

Ａ．増強イントロン要素及び増強エクソン要素

本明細書で提供するポリヌクレオチドは、１つ以上の増強イントロン要素及び／または１つ以上の増強エクソン要素を含み得る。いくつかの実施形態では、増強イントロン要素及び増強エクソン要素は、スペーサー、二重鎖領域、親和性配列、イントロン断片、エクソン断片、及び／または様々な非翻訳要素を含んでもよい。増強イントロン要素または増

強エクソン要素内のこれらの配列は、環状化またはタンパク質発現を最適化するように配置される。

【０１９７】

ａ．スペーサー

いくつかの実施形態では、提供されるポリヌクレオチド（例えば、ＤＮＡ鋳型、ＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド、または環状ＲＮＡポリヌクレオチド）は、１つ以上のスペーサーを含む。特定の実施形態では、ポリヌクレオチドは、第１（５’）及び／または第２（３’）スペーサーを含む。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチド（例えば、ＤＮＡ鋳型または直鎖状ＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド）は、増強イントロン要素に１つ以上のスペーサーを含む。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチド（例えば、ＤＮＡ鋳型、直鎖状ＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド、または環状ＲＮＡポリヌクレオチド）は、増強エクソン要素に１つ以上のスペーサーを含む。特定の実施形態では、ポリヌクレオチドは、３’増強イントロン断片にスペーサー及び５’増強イントロン断片にスペーサーを含む。特定の実施形態では、ポリヌクレオチドは、３’増強エクソン断片にスペーサー及び５’増強エクソン断片に別のスペーサーを含み、全体の配列で生成される対称性に起因する環状化またはタンパク質発現を補助する。

【０１９８】

いくつかの実施形態では、３’グループＩイントロン断片とコア機能要素との間にスペーサーを含むことは、それらが相互作用するのを防ぎ、ゆえにスプライシング効率を増加させることによって、それらの領域における二次構造を保存し得る。いくつかの実施形態では、第１（３’グループＩイントロン断片とコア機能要素との間）及び第２（２つの発現配列とコア機能要素との間）のスペーサーは、互いに塩基対形成し、第１及び第２の二重鎖領域ではないと予測される追加の塩基対形成領域を含む。他の実施形態では、第１（３’グループＩイントロン断片とコア機能要素との間）及び第２（コア機能要素の１つと５’グループＩイントロン断片との間）のスペーサーは、互いに塩基対形成し、第１及び第２の二重鎖領域ではないと予測される追加の塩基対形成領域を含む。いくつかの実施形態では、かかるスペーサー塩基対形成は、グループＩイントロン断片を互いに近接させ、スプライシング効率をさらに増加させる。加えて、いくつかの実施形態では、第１と第２の二重鎖領域との間の塩基対形成、及び別個に、第１と第２のスペーサーとの間の塩基対形成の組み合わせは、塩基対形成の隣接領域に接するグループＩイントロン断片を含有するスプライシングバブルの形成を促進する。典型的なスペーサーは、以下の質：１）近位構造、例えば、ＩＲＥＳ、発現配列、アプタマー、またはイントロンとの干渉を回避すると予測される；２）少なくとも７ｎｔ長であり、１００ｎｔ以下である；３）３’イントロン断片の後及びこれに近接している及び／または５’イントロン断片の前及びこれに近接している位置にある；ならびに４）以下：ａ）少なくとも５ｎｔ長の非構造化領域、ｂ）別のスペーサーを含む遠位配列に少なくとも５ｎｔ長の塩基対形成の領域、及びｃ）スペーサーの配列に範囲が限定された少なくとも７ｎｔ長の構造化領域のうちの１つ以上を含有する、のうちの１つ以上を伴う連続した配列である。スペーサーは、非構造化領域、塩基対形成領域、ヘアピン／構造化領域、及びその組み合わせを含む、いくつかの領域を有し得る。ある実施形態では、スペーサーは、高いＧＣ含量を伴う構造化領域を有する。ある実施形態では、スペーサー塩基内の領域は、同じスペーサー内の別の領域と対を形成する。ある実施形態では、スペーサー塩基内の領域は、別のスペーサー内の領域と対を形成する。ある実施形態では、スペーサーは、１つ以上のヘアピン構造を含む。ある実施形態では、スペーサーは、４～１２ヌクレオチドのステム及び２～１０ヌクレオチドのループを伴う１つ以上のヘアピン構造を含む。一実施形態では、３’グループＩイントロン断片とコア機能要素との間に追加のスペーサーが存在する。一実施形態では、この追加のスペーサーは、ＩＲＥＳまたはＴＩＥのアプタマーの構造化領域が３’グループＩイントロン断片の折り畳みを干渉するのを防止するか、またはこれが生じる程度を低減する。いくつかの実施形態では、５’スペーサー配列は、少なくとも７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２５または３０ヌクレオチドの長

さである。いくつかの実施形態では、５’スペーサー配列は、１００、９０、８０、７０、６０、５０、４５、４０、３５または３０ヌクレオチド以下の長さである。いくつかの実施形態では、５’スペーサー配列は、５及び５０、１０及び５０、２０及び５０、２０及び４０、及び／または２５及び３５ヌクレオチド間の長さである。特定の実施形態では、５’スペーサー配列は、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または５０ヌクレオチドの長さである。一実施形態では、５’スペーサー配列は、ポリＡ配列である。別の実施形態では、５’スペーサー配列は、ポリＡＣ配列である。一実施形態では、スペーサーは、約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、または１００％ポリＡＣ含量を含む。一実施形態では、スペーサーは、約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、または１００％ポリピリミジン（Ｃ／ＴまたはＣ／Ｕ）含量を含む。

【０１９９】

ｂ．二重鎖領域

いくつかの実施形態では、本明細書に提供されるポリヌクレオチド（例えば、本明細書に提供されるＤＮＡ鋳型、直鎖状ＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド、または環状ＲＮＡポリヌクレオチド）は、１つ以上二重鎖領域を含む。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、第１（５’）二重鎖領域及び第２（３’）二重鎖領域を含む。特定の実施形態では、ポリヌクレオチドは、３’増強イントロン断片内に位置する５’外部二重鎖領域、及び５’増強イントロン断片内に位置する３’外部二重鎖領域を含む。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、３’増強エクソン断片内に位置する５’内部二重鎖領域、及び５’増強エクソン断片内に位置する３’内部二重鎖領域を含む。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、５’外部二重鎖領域、５’内部二重鎖領域、３’内部二重鎖領域、及び３’外部二重鎖領域を含む。

【０２００】

特定の実施形態では、第１及び第２の二重鎖領域は、完全または不完全な二重鎖を形成し得る。ゆえに、特定の実施形態では、第１及び第２の二重鎖領域の少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％が、互いに塩基対形成し得る。いくつかの実施形態では、二重鎖領域は、ＲＮＡ内の意図しない配列（例えば、非二重鎖領域配列）と５０％未満（例えば、４５％未満、４０％未満、３５％未満、３０％未満、２５％未満）の塩基対形成を有すると予測される。かかる二重鎖領域をＲＮＡ前駆体鎖の端に含み、グループＩイントロン断片に隣接するまたは非常に近接するいくつかの実施形態では、グループＩイントロン断片を互いに近接させ、スプライシング効率を増加させる。いくつかの実施形態では、二重鎖領域は、３～１００ヌクレオチドの長さ（例えば、３～７５ヌクレオチドの長さ、３～５０ヌクレオチドの長さ、２０～５０ヌクレオチドの長さ、３５～５０ヌクレオチドの長さ、５～２５ヌクレオチドの長さ、９～１９ヌクレオチドの長さ）である。いくつかの実施形態では、二重鎖領域は、約３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９または５０ヌクレオチドの長さである。いくつかの実施形態では、二重鎖領域は、約９～約５０ヌクレオチドの長さを有する。いくつかの実施形態では、二重鎖領域は、約９～約１９ヌクレオチドの長さを有する。いくつかの実施形態では、二重鎖領域は、約２０～約４０ヌクレオチドの長さを有する。特定の実施形態では、二重鎖領域は、約３０ヌクレオチドの長さを有する。

【０２０１】

他の実施形態では、ポリヌクレオチドは、翻訳または環状化を最適化するための二重鎖領域を含まない。

【０２０２】

ｃ．親和性配列

本明細書に提供されるように、提供されるポリヌクレオチド（例えば、ＤＮＡ鋳型、直鎖状ＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド、または環状ＲＮＡポリヌクレオチド）は、親和性配列（または親和性タグ）を含み得る。いくつかの実施形態では、親和性タグは、３’増強イントロン要素に位置する。いくつかの実施形態では、親和性タグは、５’増強イントロン要素に位置する。いくつかの実施形態では、（３’及び５’）増強イントロン要素の両方は、それぞれ、親和性タグを含む。一実施形態では、３’増強イントロン要素の親和性タグは、５’増強イントロン要素における親和性タグとしての長さである。いくつかの実施形態では、３’増強イントロン要素の親和性タグは、５’増強イントロン要素における親和性タグと同じ配列である。いくつかの実施形態では、親和性配列は、オリゴ－ｄＴ精製を最適化するように配置される。

【０２０３】

いくつかの実施形態では、直鎖状ＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチドに存在する１つ以上の親和性タグは、環状化時に除去される。例えば、図９７Ａ及び図９７Ｂを参照されたい。いくつかの実施形態では、ＲＮＡの環状化が行われた後、親和性タグが残りの直鎖状ＲＮＡに付加される。いくつかのそのような実施形態では、親和性タグは、直鎖状ＲＮＡに酵素的に付加される。直鎖状ＲＮＡには１つ以上の親和性タグが存在し、環状ＲＮＡには親和性タグが存在しないため、環状ＲＮＡの精製が容易であり得る。いくつかの実施形態では、かかる精製は、ネガティブセレクションまたは親和性精製方法を使用して実施される。いくつかの実施形態では、かかる精製は、親和性タグと優先的または特異的に結合する結合剤を使用して実施される。

【０２０４】

いくつかの実施形態では、親和性タグは、ポリＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、ポリＡ配列は、少なくとも１５、３０、または６０ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、ポリＡ配列を含む親和性タグは、直鎖状ＲＮＡ前駆体内の２つの場所に存在する。いくつかの実施形態では、一方または両方のポリＡ配列は、１５～５０ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、一方または両方のポリＡ配列は、２０～２５ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、ポリＡ配列は、環状化の際に除去される。ゆえに、固体表面（例えば、樹脂）にコンジュゲートされるデオキシチミジンオリゴヌクレオチド（オリゴ（ｄＴ））などの、ポリＡ配列とハイブリダイズするオリゴヌクレオチドは、環状ＲＮＡをそのＲＮＡ前駆体から分離するために使用され得る。

【０２０５】

いくつかの実施形態では、親和性タグは、環状ＲＮＡ産物に存在しない配列を含む。いくつかのかかる実施形態では、環状ＲＮＡ産物に存在しない配列は、専用結合部位（ＤＢＳ）である。いくつかの実施形態では、ＤＢＳは、非構造化配列、すなわち、ヘアピンループ、連続したｄｓＲＮＡ領域、または三重らせんなどの定義された構造要素を形成しない配列である。いくつかの実施形態では、ＤＢＳ配列は、ランダムコイルを形成する。いくつかの実施形態では、ＤＢＳは、少なくとも２５％のＧＣ含量、少なくとも５０％のＧＣ含量、少なくとも７５％のＧＣ含量、または少なくとも１００％のＧＣ含量を含む。いくつかの実施形態では、ＤＢＳは、少なくとも２５％のＡＣ含量、少なくとも５０％のＡＣ含量、少なくとも７５％のＡＣ含量、または１００％のＡＣ含量を含む。いくつかの実施形態では、ＤＢＳは、少なくとも１５、３０、または６０ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、ＤＢＳを含む親和性タグは、直鎖状ＲＮＡ前駆体内の２つの場所に存在する。いくつかの実施形態では、ＤＢＳ配列は、各々、独立して、１５～５０ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、ＤＢＳ配列は、各々、独立して、２０～２５ヌクレオチド長である。

【０２０６】

いくつかの実施形態では、ＤＢＳ配列は、環状化の際に除去される。したがって、ＤＢＳと相補的な配列を含むオリゴヌクレオチドを含む結合剤を使用して、環状ＲＮＡの精製を容易にすることができる。例えば、結合剤は、固体表面（例えば、樹脂）とコンジュゲ

ートされるＤＢＳと相補的なオリゴヌクレオチドを含み得る。
【０２０７】
いくつかの実施形態では、親和性配列またはビオチンなどの他のタイプの親和性ハンドルがライゲーションによって直鎖状ＲＮＡに付加される。いくつかの実施形態では、親和性配列を含むオリゴヌクレオチドが直鎖状ＲＮＡにライゲーションされる。いくつかの実施形態では、親和性ハンドルとコンジュゲートされたオリゴヌクレオチドが直鎖状ＲＮＡにライゲーションされる。いくつかの実施形態では、親和性配列またはハンドルにライゲーションされた直鎖状ＲＮＡと、親和性配列またはハンドルを含まない環状ＲＮＡとを含む溶液を、親和性配列または親和性ハンドルの結合パートナーと相補的なオリゴヌクレオチドとコンジュゲートした固体支持体を含む結合剤と接触させて、直鎖状ＲＮＡが結合剤と結合し、環状ＲＮＡが固体支持体から溶出または分離されるようにする。
【０２０８】
本明細書に記載の環状ＲＮＡの任意の精製方法は、１つ以上の緩衝液交換ステップを含み得る。いくつかの実施形態では、緩衝液交換は、インビトロ転写（ＩＶＴ）の後、及び追加の精製ステップの前に実施される。いくつかのかかる実施形態では、ＩＶＴ反応溶液は、Ｔｒｉｓを含む緩衝液に緩衝液交換させる。いくつかの実施形態では、ＩＶＴ反応溶液は、１ｍＭ超または１０ｍＭ超の１つ以上の一価塩、例えば、ＮａＣｌまたはＫＣｌを含み、任意に、ＥＤＴＡを含む緩衝液に緩衝液交換される。いくつかの実施形態では、緩衝液交換は、環状ＲＮＡの精製が完了した後に実施される。いくつかの実施形態では、緩衝液交換は、ＩＶＴの後、及び環状ＲＮＡの精製後に実施される。いくつかの実施形態では、環状ＲＮＡの精製後に実施される緩衝液交換は、環状ＲＮＡの水または保存緩衝液への交換を含む。いくつかの実施形態では、保存緩衝液は、１ｍＭのクエン酸ナトリウム、ｐＨ６．５を含む。
【０２０９】
特定の実施形態では、３’増強イントロン要素は、先導非翻訳配列を含む。いくつかの実施形態では、先導非翻訳配列は、３’増強イントロン断片の５’末端である。いくつかの実施形態では、先導非翻訳配列は、転写開始部位（ＴＳＳ）の最後のヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、ＴＳＳは、ウイルス、細菌、または真核生物のＤＮＡ鋳型から選択される。一実施形態では、先導非翻訳配列は、ＴＳＳの最後のヌクレオチド及び０～１００の追加のヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、ＴＳＳは、末端スペーサーである。一実施形態では、先導非翻訳配列は、ＲＮＡ　Ｔ７ポリメラーゼの翻訳時に５’末端にグアノシンを含む。
【０２１０】
特定の実施形態では、５’増強イントロン要素は、後端非翻訳配列を含む。いくつかの実施形態では、５’後端非翻訳配列は、５’増強イントロン要素の３’末端に位置する。いくつかの実施形態では、後端非翻訳配列は、部分的な制限消化配列である。一実施形態では、後端非翻訳配列は、全体または部分的に、ＤＮＡ鋳型を直線化するために使用される制限消化部位である。いくつかの実施形態では、制限消化部位は、全体的にまたは部分的に、天然のウイルス、細菌、または真核生物のＤＮＡ鋳型に由来する。いくつかの実施形態では、後端非翻訳配列は、末端制限部位断片である。
【０２１１】
ｄ．増強イントロン断片
いくつかの実施形態では、３’増強イントロン要素及び５’増強イントロン要素は、各々、イントロン断片を含む。特定の実施形態では、３’イントロン断片は、３’スプライス部位ジヌクレオチドを含む天然のグループＩイントロンの３’近位断片に対して少なくとも７５％相同（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％相同）の連続配列である。典型的には、５’イントロン断片は、５’スプライス部位ジヌクレオチドを含む天然のグループＩイントロンの５’近位断片に対して少なくとも７５％相同（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％

、９８％、９９％、または１００％相同）の連続配列である。いくつかの実施形態では、３’イントロン断片は、３’グループＩスプライス部位ジヌクレオチドの第１のヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、５’イントロン断片は、５’グループＩスプライス部位ジヌクレオチドの第１のヌクレオチドを含む。他の実施形態では、３’イントロン断片は、３’グループＩイントロン断片スプライス部位ジヌクレオチドの第１及び第２のヌクレオチドを含み、５’イントロン断片は、３’グループＩイントロン断片ジヌクレオチドの第１及び第２のヌクレオチドを含む。

【０２１２】

ｅ．増強エクソン断片

特定の実施形態では、提供されるポリヌクレオチド（例えば、ＤＮＡ鋳型、直鎖状ＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド、または環状ＲＮＡポリヌクレオチド）は、増強エクソン断片を含む。いくつかの実施形態では、５’から３’の順序に従って、３’増強エクソン要素は、コア機能要素の上流に位置する。いくつかの実施形態では、５’から３’の順序に従って、５’増強イントロン要素は、コア機能要素の下流に位置する。

【０２１３】

本発明によれば、３’増強エクソン要素及び５’増強エクソン要素は、各々、エクソン断片を含む。いくつかの実施形態では、３’増強エクソン要素は、３’エクソン断片を含む。いくつかの実施形態では、５’増強エクソン要素は、５’エクソン断片を含む。特定の実施形態では、本明細書で提供されるように、３’エクソン断片及び５’エクソン断片は、各々、グループＩイントロン断片及び１～１００ヌクレオチドのエクソン配列を含む。特定の実施形態では、３’イントロン断片は、３’スプライス部位ジヌクレオチドを含む天然のグループＩイントロンの３’近位断片に対して少なくとも７５％相同（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％相同）の連続配列である。典型的には、５’グループＩイントロン断片は、５’スプライス部位ジヌクレオチドを含む天然のグループＩイントロンの５’近位断片に対して少なくとも７５％相同（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％相同）の連続配列である。いくつかの実施形態では、３’エクソン断片は、３’グループＩイントロンスプライス部位ジヌクレオチドの第２のヌクレオチド及びエクソン配列の１～１００ヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、５’エクソン断片は、５’グループＩイントロンスプライス部位ジヌクレオチドの第１のヌクレオチド及びエクソン配列の１～１００ヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、エクソン配列は、ウイルス、細菌、または真核生物ＤＮＡベクター由来の天然に存在するエクソン配列から部分的または全体的に構成される。他の実施形態では、エクソン配列は、合成、遺伝的に修飾された（例えば、修飾されたヌクレオチドを含む）、または他の操作されたエクソン配列をさらに含む。

【０２１４】

一実施形態では、３’イントロン断片は、３’グループＩスプライス部位ジヌクレオチドの両方のヌクレオチドを含み、５’イントロン断片は、５’グループＩスプライス部位ジヌクレオチドの両方のヌクレオチドを含み、５’増強エクソン要素及び３’増強エクソン要素内に位置するエクソン断片は、グループＩスプライス部位ジヌクレオチドを含まない。

【０２１５】

ｆ．増強イントロン要素と及び増強エクソン要素の例示的な順列

限定することを意図するものではなく例として、いくつかの実施形態では、３’増強イントロン要素は、以下を５’から３’の順序で、先導非翻訳配列、５’親和性タグ、任意の５’外部二重鎖領域、５’外部スペーサー、及び３’イントロン断片を含む。同じ実施形態では、３’増強エクソン要素は、以下を５’から３’の順序で、３’エクソン断片、任意の５’内部二重鎖領域、任意の５’内部二重鎖領域、及び５’内部スペーサーを含む。同じ実施形態では、５’増強エクソン要素は、以下を５’から３’の順序で、３’内部スペーサー、任意の３’内部二重鎖領域、及び５’エクソン断片を含む。さらに同じ実施形態では、３’増強

イントロン要素は、以下を５’から３’の順序で、５’イントロン断片、３’外部スペーサー、任意の３’外部二重鎖領域、３’親和性タグ、及び後端非翻訳配列を含む。

【０２１６】

Ｂ．コア機能要素

いくつかの実施形態では、提供されるポリヌクレオチド（例えば、ＤＮＡテンプレート、直鎖状ＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド、または環状ＲＮＡポリヌクレオチド）は、コア機能要素を含む。いくつかの実施形態では、コア機能要素は、コード要素または非コード要素を含む。特定の実施形態では、コア機能要素は、コード要素及び非コード要素の両方を含み得る。いくつかの実施形態では、コア機能要素は、コード要素または非コード要素の上流に翻訳開始要素（ＴＩＥ）をさらに含む。いくつかの実施形態では、コア機能要素は、終端要素を含む。いくつかの実施形態では、終端要素は、ＴＩＥ及びコード要素の下流に位置する。いくつかの実施形態では、終端要素は、コード要素の下流であるが、ＴＩＥの上流に位置する。特定の実施形態では、コード要素が非コード領域を含む場合、コア機能要素はＴＩＥ及び／または終結要素を欠く。

【０２１７】

ａ．コード要素または非コード要素

いくつかの実施形態では、本明細書に提供されるポリヌクレオチドは、コード要素もしくは非コード要素、または両方の組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、コード要素は、発現配列を含む。いくつかの実施形態では、コード要素は、少なくとも１つの治療用タンパク質をコードする。

【０２１８】

いくつかの実施形態では、提供される環状ＲＮＡは、２つ以上のポリペプチドをコードする。いくつかの実施形態では、環状ＲＮＡは、バイシストロン性ＲＮＡである。２つ以上のポリペプチドをコードする配列は、リボソームスキッピング要素またはプロテアーゼ切断部位をコードするヌクレオチド配列によって分離され得る。特定の実施形態では、リボソームスキッピング要素は、トセア・アシグナウイルス２Ａペプチド（Ｔ２Ａ）、ブタテシオウイルス－１　２Ａペプチド（Ｐ２Ａ）、口蹄疫ウイルス２Ａペプチド（Ｆ２Ａ）、ウマ鼻炎Ａウイルス２Ａペプチド（Ｅ２Ａ）、細胞質多角体病ウイルス２Ａペプチド（ＢｍＣＰＶ　２Ａ）、またはＢ．ｍｏｒｉ軟化病ウイルス２Ａペプチド（ＢｍＩＦＶ　２Ａ）をコードする。

【０２１９】

ｂ．翻訳開始要素（ＴＩＥ）

いくつかの実施形態において本明細書に提供されるように、コア機能要素は、少なくとも１つの翻訳開始要素（ＴＩＥ）を含む。ＴＩＥを、コードされたタンパク質の翻訳効率を可能にするように設計される。したがって、非コード要素のみを含む最適なコア機能要素には、任意のＴＩＥが欠けている。いくつかの実施形態では、１つ以上のコード要素を含むコア機能要素は、１つ以上のＴＩＥをさらに含む。

【０２２０】

いくつかの実施形態では、ＴＩＥは、非翻訳領域（ＵＴＲ）を含む。特定の実施形態では、本明細書で提供されるＴＩＥは、配列内リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ）を含む。ＩＲＥＳを含めることにより、環状ＲＮＡからの１つ以上のオープンリーディングフレーム（例えば、発現配列を形成するオープンリーディングフレーム）の翻訳が可能になる。ＩＲＥＳ要素は、真核生物のリボソーム翻訳開始複合体を引き付け、翻訳開始を促進する。例えば、Ｋａｕｆｍａｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎｕｃ．Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．（１９９１）１９：４４８５－４４９０；Ｇｕｒｔｕ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍ．（１９９６）２２９：２９５－２９８；Ｒｅｅｓ　ｅｔ　ａｌ．，ＢｉｏＴｅｃｈｎｉｑｕｅｓ（１９９６）２０：１０２－１１０；Ｋｏｂａｙａｓｈｉ　ｅｔ　ａｌ．，ＢｉｏＴｅｃｈｎｉｑｕｅｓ（１９９６）２１：３９９－４０２；及びＭｏｓｓｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，ＢｉｏＴｅｃｈｎｉｑｕｅｓ　１９９７　２２　１５０－１６１）を参照されたい。

【０２２１】
ｉ．天然ＴＩＥ：ウイルス、及び真核生物／細胞内リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ）
多数のＩＲＥＳ配列が利用可能であり、多種多様なウイルスに由来する配列、例えば脳心筋炎ウイルス（ＥＭＣＶ）ＵＴＲなどのピコルナウイルスのリーダー配列（Ｊａｎｇ ｅｔ ａｌ．Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．（１９８９）６３：１６５１－１６６０）、ポリオリーダー配列、Ａ型肝炎ウイルスリーダー、Ｃ型肝炎ウイルスＩＲＥＳ、ヒトライノウイルス２型ＩＲＥＳ（Ｄｏｂｒｉｋｏｖａ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．（２００３）１００（２５）：１５１２５－１５１３０）、口蹄疫ウイルスからのＩＲＥＳ要素（Ｒａｍｅｓｈ ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄ Ｒｅｓ．（１９９６）２４：２６９７－２７００）、ジアルジアウイルスＩＲＥＳ（Ｇａｒｌａｐａｔｉ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．（２００４）２７９（５）：３３８９－３３９７）などが含まれる。

【０２２２】
異なるＩＲＥＳ配列は、タンパク質発現を駆動する様々な能力を有し、直鎖状ｍＲＮＡまたは環状ＲＮＡ構築物からタンパク質発現を駆動する任意の特定の同定されたまたは予測されたＩＲＥＳ配列の能力は、未知であり、予測不可能である。特定の実施形態では、潜在的なＩＲＥＳ配列は、ウイルス配列内の配列位置に基づいて、生物学的に同定することができる。しかしながら、そのような配列の活性は、以前に特徴付けられていない。本明細書に示されるように、そのようなＩＲＥＳ配列は、細胞型、例えば、Ｔ細胞、肝細胞、または筋肉細胞において、異なるタンパク質発現能力を有し得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の新規のＩＲＥＳ配列は、前述のＥＭＣＶ ＩＲＥＳ配列と比較して、特定の細胞型で少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、５０、または１００倍増加した発現を有し得る。

【０２２３】
いくつかの実施形態では、タンパク質発現を駆動するために、提供される環状ＲＮＡは、タンパク質コード配列と作動可能に連結されたＩＲＥＳを含む。いくつかの実施形態では、ＩＲＥＳは、配列番号１～２９８３及び３２８２～３２８７から選択される配列、またはその断片を含む。いくつかの実施形態では、ＩＲＥＳは、配列番号１～２９８３及び３２８２～３２８７から選択される配列と少なくとも８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％同一の配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される環状ＲＮＡは、配列番号１～２９８３及び３２８２～３２８７から選択される配列と少なくとも８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％同一の配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される環状ＲＮＡは、配列番号１～２９８３及び３２８２～３２８７から選択されるＩＲＥＳ配列またはその断片を含む。ＩＲＥＳ及び付属配列の修飾は、例えば、ＩＲＥＳの５’及び／または３’末端を切断すること、ＩＲＥＳに対して５’にスペーサーを付加すること、翻訳開始部位（コザック配列）の５’の６ヌクレオチドを修飾すること、代替翻訳開始部位の修飾、及びキメラ／ハイブリッドＩＲＥＳ配列を生成することによって、ＩＲＥＳ活性を上昇または低下させることが本明細書に開示される。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される環状ＲＮＡにおけるＩＲＥＳ配列は、天然ＩＲＥＳ（例えば、配列番号１～２９８３及び３２８２～３２８７）に対するこれらの修飾の１つ以上を含む。

【０２２４】
いくつかの実施形態では、ＩＲＥＳは、アーリウイルス（Ａａｌｉｖｉｒｕｓ）、アイルリウイルス（Ａｉｌｕｒｉｖｉｒｕｓ）、アンピウイルス（Ａｍｐｉｖｉｒｕｓ）、アナチウイルス（Ａｎａｔｉｖｉｒｕｓ）、アフトウイルス（Ａｐｈｔｈｏｖｉｒｕｓ）、アクアマウイルス（Ａｑｕａｍａｖｉｒｕｓ）、アビヘパトウイルス（Ａｖｉｈｅｐａｔｏｖｉｒｕｓ）、アビジウイルス（Ａｖｉｓｉｖｉｒｕｓ）、ブーセピウイルス（Ｂｏｏｓｅｐｉｖｉｒｕｓ）、ボピウイルス、カエシリウイルス（Ｃａｅｃｉｌｉｖｉｒｕｓ）、カルジオウイルス、コサウイルス、クラヘリウイルス（Ｃｒａｈｅｌｉｖｉｒｕｓ）、

クロヒウイルス（Ｃｒｏｈｉｖｉｒｕｓ）、ダニピウイルス（Ｄａｎｉｐｉｖｉｒｕｓ）、ディシピウイルス（Ｄｉｃｉｐｉｖｉｒｕｓ）、ディレサピウイルス（Ｄｉｒｅｓａｐｉｖｉｒｕｓ）、エンテロウイルス、エルボウイルス（Ｅｒｂｏｖｉｒｕｓ）、フェリピウイルス（Ｆｅｌｉｐｉｖｉｒｕｓ）、フィピウイルス（Ｆｉｐｉｖｉｒｕｓ）、ガリウイルス、グルヘリウイルス（Ｇｒｕｈｅｌｉｖｉｒｕｓ）、グルソピウイルス（Ｇｒｕｓｏｐｉｖｉｒｕｓ）、ハルカウイルス（Ｈａｒｋａｖｉｒｕｓ）、ヘミピウイルス（Ｈｅｍｉｐｉｖｉｒｕｓ）、ヘパトウイルス（Ｈｅｐａｔｏｖｉｒｕｓ）、ハニウイルス、コブウイルス、クンサギウイルス（Ｋｕｎｓａｇｉｖｉｒｕｓ）、リムニピウイルス（Ｌｉｍｎｉｐｉｖｉｒｕｓ）、リブピウイルス（Ｌｉｖｕｐｉｖｉｒｕｓ）、ルドピウイルス（Ｌｕｄｏｐｉｖｉｒｕｓ）、マラガシウイルス（Ｍａｌａｇａｓｉｖｉｒｕｓ）、マルスピウイルス（Ｍａｒｓｕｐｉｖｉｒｕｓ）、メグリウイルス、ミスシウイルス、モサウイルス（Ｍｏｓａｖｉｒｕｓ）、ムピウイルス（Ｍｕｐｉｖｉｒｕｓ）、ミルロピウイルス（Ｍｙｒｒｏｐｉｖｉｒｕｓ）、オリウイルス（Ｏｒｉｖｉｒｕｓ）、オシウイルス、パラボウイルス（Ｐａｒａｂｏｖｉｒｕｓ）、パレコウイルス、パシウイルス（Ｐａｓｉｖｉｒｕｓ）、パセリウイルス、ペマピウイルス（Ｐｅｍａｐｉｖｉｒｕｓ）、ポエシウイルス（Ｐｏｅｃｉｖｉｒｕｓ）、ポタミピウイルス（Ｐｏｔａｍｉｐｉｖｉｒｕｓ）、ピゴセピウイルス（Ｐｙｇｏｓｃｅｐｉｖｉｒｕｓ）、ラボウイルス、ラフィウイルス（Ｒａｆｉｖｉｒｕｓ）、ラジダピウイルス（Ｒａｊｉｄａｐｉｖｉｒｕｓ）、ロヘリウイルス（Ｒｏｈｅｌｉｖｉｒｕｓ）、ロザウイルス（Ｒｏｓａｖｉｒｕｓ）、サコブウイルス（Ｓａｋｏｂｕｖｉｒｕｓ）、サリウイルス、サペロウイルス（Ｓａｐｅｌｏｖｉｒｕｓ）、セネカウイルス（Ｓｅｎｅｃａｖｉｒｕｓ）、シャンバウイルス、シシニウイルス、シンマピウイルス（Ｓｙｍａｐｉｖｉｒｕｓ）、テスコウイルス（Ｔｅｓｃｈｏｖｉｒｕｓ）、トーキウイルス（Ｔｏｒｃｈｉｖｉｒｕｓ）、トットリウイルス、トレモウイルス（Ｔｒｅｍｏｖｉｒｕｓ）、トロピウイルス（Ｔｒｏｐｉｖｉｒｕｓ）、ヘパシウイルス、ペギウイルス、ペスチウイルス、フラビウイルスＩＲＥＳである。

【０２２５】

いくつかの実施形態では、ＩＲＥＳは、タウラ症候群ウイルス、トリアトーマウイルス、タイラー脳脊髄炎ウイルス、シミアンウイルス４０、Ｓｏｌｅｎｏｐｓｉｓ ｉｎｖｉｃｔａウイルス１、Ｒｈｏｐａｌｏｓｉｐｈｕｍ ｐａｄｉウイルス、細網内皮症ウイルス、ヒトポリオウイルス１、Ｐｌａｕｔｉａ ｓｔａｌｉ腸ウイルス、カシミールハチウイルス、ヒトライノウイルス２、Ｈｏｍａｌｏｄｉｓｃａ ｃｏａｇｕｌａｔａウイルス－１、ヒト免疫不全ウイルス１型、ヒメトビＰウイルス、Ｃ型肝炎ウイルス、Ａ型肝炎ウイルス、ＧＢ型肝炎ウイルス、口蹄疫ウイルス、ヒトエンテロウイルス７１、ウマ鼻炎ウイルス、Ｅｃｔｒｏｐｉｓ ｏｂｌｉｑｕａピコルナ様ウイルス、脳心筋炎ウイルス、ショウジョウバエＣウイルス、ヒトコクサッキーウイルスＢ３、アブラナ科トバモウイルス、クリケット麻痺ウイルス、ウシウイルス性下痢ウイルス１、ブラッククイーンセルウイルス、アブラムシ致死麻痺ウイルス、トリ脳脊髄炎ウイルス、急性ミツバチ麻痺ウイルス、ハイビスカスクロロティックリングスポットウイルス、古典的ブタ熱ウイルス、ヒトＦＧＦ２、ヒトＳＦＴＰＡ１、ヒトＡＭＬ１／ＲＵＮＸ１、ショウジョウバエアンテナペディア、ヒトＡＱＰ４、ヒトＡＴ１Ｒ、ヒトＢＡＧ－１、ヒトＢＣＬ２、ヒトＢｉＰ、ヒトｃ－ＩＡＰｌ、ヒトｃ－ｍｙｃ、ヒトｅＩＦ４Ｇ、マウスＮＤＳＴ４Ｌ、ヒトＬＥＦ１、マウスＨＩＦ１アルファ、ヒトｎ．ｍｙｃ、マウスＧｔｘ、ヒトｐ２７ｋｉｐｌ、ヒトＰＤＧＦ２／ｃ－ｓｉｓ、ヒトｐ５３、ヒトＰｉｍ－１、マウスＲｂｍ３、ショウジョウバエｒｅａｐｅｒ、イヌＳｃａｍｐｅｒ、ショウジョウバエＵｂｘ、ヒトＵＮＲ、マウスＵｔｒＡ、ヒトＶＥＧＦ－Ａ、ヒトＸＩＡＰ、ショウジョウバエｈａｉｒｌｅｓｓ、Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ ＴＦＩＩＤ、Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ ＹＡＰ１、タバコエッチウイルス、カブクリンクルウイルス、ＥＭＣＶ－Ａ、ＥＭＣＶ－Ｂ、ＥＭＣＶ－Ｂｆ、ＥＭＣＶ－Ｃｆ、ＥＭＣＶ ｐＥＣ９、ピコビルナウイルス、ＨＣＶ ＱＣ６４、ヒトコサウイルスＥ／Ｄ、ヒトコサウイルスＦ、ヒトコサウイルスＪＭＹ、ライノウイルスＮＡＴ００１、ＨＲＶ１４、ＨＲＶ８９、ＨＲＶＣ－０２、ＨＲＶ－Ａ２１、サリウイルスＡ

ＳＨ１、サリウイルスＦＨＢ、サリウイルスＮＧ－Ｊ１、ヒトパレコウイルス１、クロヒウイルスＢ、Ｙｃ－３、ロザウイルスＭ－７、シャンバウイルスＡ、パシウイルスＡ、パシウイルスＡ　２、エコーウイルスＥ１４、ヒトパレコウイルス５、アイチウイルス、Ａ型肝炎ウイルスＨＡ１６、フォピウイルス、ＣＶＡ１０、エンテロウイルスＣ、エンテロウイルスＤ、エンテロウイルスＪ、ヒトペギウイルス２、ＧＢＶ－Ｃ　ＧＴ１１０、ＧＢＶ－Ｃ　Ｋ１７３７、ＧＢＶ－Ｃ　Ｉｏｗａ、ペギウイルスＡ　１２２０、パシウイルスＡ　３、サペロウイルス、ロザウイルスＢ、バクンサウイルス、トレモウイルスＡ、ブタパシウイルス１、ＰＬＶ－ＣＨＮ、パシウイルスＡ、シシニウイルス、ヘパシウイルスＫ、ヘパシウイルスＡ、ＢＶＤＶ１、ボーダー病ウイルス、ＢＶＤＶ２、ＣＳＦＶ－ＰＫ１５Ｃ、ＳＦ５７３ジシストロウイルス、フーペイピコルナ様ウイルス、ＣＲＰＶ、サリウイルスＡ　ＢＮ５、サリウイルスＡ　ＢＮ２、サリウイルスＡ　０２３９４、サリウイルスＡ　ＧＵＴ、サリウイルスＡ　ＣＨ、サリウイルスＡ　ＳＺ１、サリウイルスＦＨＢ、ＣＶＢ３、ＣＶＢ１、エコーウイルス７、ＣＶＢ５、ＥＶＡ７１、ＣＶＡ３、ＣＶＡ１２、ＥＶ２４、またはｅＩＦ４Ｇに対するアプタマーのＩＲＥＳの配列である。

【０２２６】

いくつかの実施形態では、ＩＲＥＳは、全体的または部分的に、真核生物または細胞のＩＲＥＳに由来するものを含む。特定の実施形態では、ＩＲＥＳは、ヒト遺伝子に由来し、ヒト遺伝子は、ＡＢＣＦ１、ＡＢＣＧ１、ＡＣＡＤ１０、ＡＣＯＴ７、ＡＣＳＳ３、ＡＣＴＧ２、ＡＤＣＹＡＰ１、ＡＤＫ、ＡＧＴＲ１、ＡＨＣＹＬ２、ＡＨＩ１、ＡＫＡＰ８Ｌ、ＡＫＲ１Ａ１、ＡＬＤＨ３Ａ１、ＡＬＤＯＡ、ＡＬＧ１３、ＡＭＭＥＣＲ１Ｌ、ＡＮＧＰＴＬ４、ＡＮＫ３、ＡＯＣ３、ＡＰ４Ｂ１、ＡＰ４Ｅ１、ＡＰＡＦ１、ＡＰＢＢ１、ＡＰＣ、ＡＰＨ１Ａ、ＡＰＯＢＥＣ３Ｄ、ＡＰＯＭ、ＡＰＰ、ＡＱＰ４、ＡＲＨＧＡＰ３６、ＡＲＬ１３Ｂ、ＡＲＭＣ８、ＡＲＭＣＸ６、ＡＲＰＣ１Ａ、ＡＲＰＣ２、ＡＲＲＤＣ３、ＡＳＡＰ１、ＡＳＢ３、ＡＳＢ５、ＡＳＣＬ１、ＡＳＭＴＬ、ＡＴＦ２、ＡＴＦ３、ＡＴＧ４Ａ、ＡＴＰ５Ｂ、ＡＴＰ６Ｖ０Ａ１、ＡＴＸＮ３、ＡＵＲＫＡ、ＡＵＲＫＡ、ＡＵＲＫＡ、ＡＵＲＫＡ、Ｂ３ＧＡＬＮＴ１、Ｂ３ＧＮＴＬ１、Ｂ４ＧＡＬＴ３、ＢＡＡＴ、ＢＡＧ１、ＢＡＩＡＰ２、ＢＡＩＡＰ２Ｌ２、ＢＡＺ２Ａ、ＢＢＸ、ＢＣＡＲ１、ＢＣＬ２、ＢＣＳ１Ｌ、ＢＥＴ１、ＢＩＤ、ＢＩＲＣ２、ＢＰＧＭ、ＢＰＩＦＡ２、ＢＲＩＮＰ２、ＢＳＧ、ＢＴＮ３Ａ２、Ｃ１２ｏｒｆ４３、Ｃ１４ｏｒｆ９３、Ｃ１７ｏｒｆ６２、Ｃ１ｏｒｆ２２６、Ｃ２１ｏｒｆ６２、Ｃ２ｏｒｆ１５、Ｃ４ＢＰＢ、Ｃ４ｏｒｆ２２、Ｃ９ｏｒｆ８４、ＣＡＣＮＡ１Ａ、ＣＡＬＣＯＣＯ２、ＣＡＰＮ１１、ＣＡＳＰ１２、ＣＡＳＰ８ＡＰ２、ＣＡＶ１、ＣＢＸ５、ＣＣＤＣ１２０、ＣＣＤＣ１７、ＣＣＤＣ１８６、ＣＣＤＣ５１、ＣＣＮ１、ＣＣＮＤ１、ＣＣＮＴ１、ＣＤ２ＢＰ２、ＣＤ９、ＣＤＣ２５Ｃ、ＣＤＣ４２、ＣＤＣ７、ＣＤＣＡ７Ｌ、ＣＤＩＰ１、ＣＤＫ１、ＣＤＫ１１Ａ、ＣＤＫＮ１Ｂ、ＣＥＡＣＡＭ７、ＣＥＰ２９５ＮＬ、ＣＦＬＡＲ、ＣＨＣＨＤ７、ＣＨＩＡ、ＣＨＩＣ１、ＣＨＭＰ２Ａ、ＣＨＲＮＡ２、ＣＬＣＮ３、ＣＬＥＣ１２Ａ、ＣＬＥＣ７Ａ、ＣＬＥＣＬ１、ＣＬＲＮ１、ＣＭＳＳ１、ＣＮＩＨ１、ＣＮＲ１、ＣＮＴＮ５、ＣＯＧ４、ＣＯＭＭＤ１、ＣＯＭＭＤ５、ＣＰＥＢ１、ＣＰＳ１、ＣＲＡＣＲ２Ｂ、ＣＲＢＮ、ＣＲＥＭ、ＣＲＹＢＧ１、ＣＳＤＥ１、ＣＳＦ２ＲＡ、ＣＳＮＫ２Ａ１、ＣＳＴＦ３、ＣＴＣＦＬ、ＣＴＨ、ＣＴＮＮＡ３、ＣＴＮＮＢ１、ＣＴＮＮＢ１、ＣＴＮＮＤ１、ＣＴＳＬ、ＣＵＴＡ、ＣＸＣＲ５、ＣＹＢ５Ｒ３、ＣＹＰ２４Ａ１、ＣＹＰ３Ａ５、ＤＡＧ１、ＤＡＰ３、ＤＡＰ５、ＤＡＸＸ、ＤＣＡＦ４、ＤＣＡＦ７、ＤＣＬＲＥ１Ａ、ＤＣＰ１Ａ、ＤＣＴＮ１、ＤＣＴＮ２、ＤＤＸ１９Ｂ、ＤＤＸ４６、ＤＥＦＢ１２３、ＤＧＫＡ、ＤＧＫＤ、ＤＨＲＳ４、ＤＨＸ１５、ＤＩＯ３、ＤＬＧ１、ＤＬＬ４、ＤＭＤ　ＵＴＲ、ＤＭＤ　ｅｘ５、ＤＭＫＮ、ＤＮＡＨ６、ＤＮＡＬ４、ＤＵＳＰ１３、ＤＵＳＰ１９、ＤＹＮＣ１Ｉ２、ＤＹＮＬＲＢ２、ＤＹＲＫ１Ａ、ＥＣＩ２、ＥＣＴ２、ＥＩＦ１ＡＤ、ＥＩＦ２Ｂ４、ＥＩＦ４Ｇ１、ＥＩＦ４Ｇ２、ＥＩＦ４Ｇ３、ＥＬＡＮＥ、ＥＬＯＶＬ６、ＥＬＰ５、ＥＭＣＮ、ＥＮＯ１、ＥＰＢ４１、ＥＲＭＮ、ＥＲＶＶ－１、ＥＳＲＲＧ、ＥＴＦＢ、ＥＴＦＢＫＭＴ、ＥＴＶ１、ＥＴＶ４、ＥＸＤ１、ＥＸＴ１、ＥＺＨ２、ＦＡＭ１１１Ｂ、ＦＡＭ１５７Ａ、ＦＡＭ２１３Ａ、ＦＢＸＯ２５、ＦＢＸＯ９、ＦＢＸＷ７

、ＦＣＭＲ、ＦＧＦ１、ＦＧＦ１、ＦＧＦ１Ａ、ＦＧＦ２、ＦＧＦ２、ＦＧＦ－９、ＦＨＬ５、ＦＭＲ１、ＦＮ１、ＦＯＸＰ１、ＦＴＨ１、ＦＵＢＰ１、Ｇ３ＢＰ１、ＧＡＢＢＲ１、ＧＡＬＣ、ＧＡＲＴ、ＧＡＳ７、ｇａｓｔｒｉｎ、ＧＡＴＡ１、ＧＡＴＡ４、ＧＦＭ２、ＧＨＲ、ＧＪＢ２、ＧＬＩ１、ＧＬＲＡ２、ＧＭＮＮ、ＧＰＡＴ３、ＧＰＡＴＣＨ３、ＧＰＲ１３７、ＧＰＲ３４、ＧＰＲ５５、ＧＰＲ８９Ａ、ＧＰＲＡＳＰ１、ＧＲＡＰ２、ＧＳＤＭＢ、ＧＳＴＯ２、ＧＴＦ２Ｂ、ＧＴＦ２Ｈ４、ＧＵＣＹ１Ｂ２、ＨＡＸ１、ＨＣＳＴ、ＨＩＧＤ１Ａ、ＨＩＧＤ１Ｂ、ＨＩＰＫ１、ＨＩＳＴ１Ｈ１Ｃ、ＨＩＳＴ１Ｈ３Ｈ、ＨＫ１、ＨＬＡ－ＤＲＢ４、ＨＭＢＳ、ＨＭＧＡ１、ＨＮＲＮＰＣ、ＨＯＰＸ、ＨＯＸＡ２、ＨＯＸＡ３、ＨＰＣＡＬ１、ＨＲ、ＨＳＰ９０ＡＢ１、ＨＳＰＡ１Ａ、ＨＳＰＡ４Ｌ、ＨＳＰＡ５、ＨＹＰＫ、ＩＦＦＯ１、ＩＦＴ７４、ＩＦＴ８１、ＩＧＦ１、ＩＧＦ１Ｒ、ＩＧＦ１Ｒ、ＩＧＦ２、ＩＬ１１、ＩＬ１７ＲＥ、ＩＬ１ＲＬ１、ＩＬ１ＲＮ、ＩＬ３２、ＩＬ６、ＩＬＦ２、ＩＬＶＢＬ、ＩＮＳＲ、ＩＮＴＳ１３、ＩＰ６Ｋ１、ＩＴＧＡ４、ＩＴＧＡＥ、ＫＣＮＥ４、ＫＥＲＡ、ＫＩＡＡ０３５５、ＫＩＡＡ０８９５Ｌ、ＫＩＡＡ１３２４、ＫＩＡＡ１５２２、ＫＩＡＡ１６８３、ＫＩＦ２Ｃ、ＫＩＺ、ＫＬＨＬ３１、ＫＬＫ７、ＫＲＲ１、ＫＲＴ１４、ＫＲＴ１７、ＫＲＴ３３Ａ、ＫＲＴ６Ａ、ＫＲＴＡＰ１０－２、ＫＲＴＡＰ１３－３、ＫＲＴＡＰ１３－４、ＫＲＴＡＰ５－１１、ＫＲＴＣＡＰ２、ＬＡＣＲＴ、ＬＡＭＢ１、ＬＡＭＢ３、ＬＡＮＣＬ１、ＬＢＸ２、ＬＣＡＴ、ＬＤＨＡ、ＬＤＨＡＬ６Ａ、ＬＥＦ１、ＬＩＮＣ－ＰＩＮＴ、ＬＭＯ３、ＬＲＲＣ４Ｃ、ＬＲＲＣ７、ＬＲＴＯＭＴ、ＬＳＭ５、ＬＴＢ４Ｒ、ＬＹＲＭ１、ＬＹＲＭ２、ＭＡＧＥＡ１１、ＭＡＧＥＡ８、ＭＡＧＥＢ１、ＭＡＧＥＢ１６、ＭＡＧＥＢ３、ＭＡＰＴ、ＭＡＲＳ、ＭＣ１Ｒ、ＭＣＣＣ１、ＭＥＴＴＬ１２、ＭＥＴＴＬ７Ａ、ＭＧＣ１６０２５、ＭＧＣ１６０２５、ＭＩＡ２、ＭＩＡ２、ＭＩＴＦ、ＭＫＬＮ１、ＭＮＴ、ＭＯＲＦ４Ｌ２、ＭＰＤ６、ＭＲＦＡＰ１、ＭＲＰＬ２１、ＭＲＰＳ１２、ＭＳＩ２、ＭＳＬＮ、ＭＳＮ、ＭＴ２Ａ、ＭＴＦＲ１Ｌ、ＭＴＭＲ２、ＭＴＲＲ、ＭＴＵＳ１、ＭＹＢ、ＭＹＣ、ＭＹＣＬ、ＭＹＣＮ、ＭＹＬ１０、ＭＹＬ３、ＭＹＬＫ、ＭＹＯ１Ａ、ＭＹＴ２、ＭＺＢ１、ＮＡＰ１Ｌ１、ＮＡＶ１、ＮＢＡＳ、ＮＣＦ２、ＮＤＲＧ１、ＮＤＳＴ２、ＮＤＵＦＡ７、ＮＤＵＦＢ１１、ＮＤＵＦＣ１、ＮＤＵＦＳ１、ＮＥＤＤ４Ｌ、ＮＦＡＴ５、ＮＦＥ２Ｌ２、ＮＦＥ２Ｌ２、ＮＦＩＡ、ＮＨＥＪ１、ＮＨＰ２、ＮＩＴ１、ＮＫＲＦ、ＮＭＥ１－ＮＭＥ２、ＮＰＡＴ、ＮＲ３Ｃ１、ＮＲＢＦ２、ＮＲＦ１、ＮＴＲＫ２、ＮＵＤＣＤ１、ＮＸＦ２、ＮＸＴ２、ＯＤＣ１、ＯＤＦ２、ＯＰＴＮ、ＯＲ１０Ｒ２、ＯＲ１１Ｌ１、ＯＲ２Ｍ２、ＯＲ２Ｍ３、ＯＲ２Ｍ５、ＯＲ２Ｔ１０、ＯＲ４Ｃ１５、ＯＲ４Ｆ１７、ＯＲ４Ｆ５、ＯＲ５Ｈ１、ＯＲ５Ｋ１、ＯＲ６Ｃ３、ＯＲ６Ｃ７５、ＯＲ６Ｎ１、ＯＲ７Ｇ２、ｐ５３、Ｐ２ＲＹ４、ＰＡＮ２、ＰＡＱＲ６、ＰＡＲＰ４、ＰＡＲＰ９、ＰＣ、ＰＣＢＰ４、ＰＣＤＨＧＣ３、ＰＣＬＡＦ、ＰＤＧＦＢ、ＰＤＺＲＮ４、ＰＥＬＯ、ＰＥＭＴ、ＰＥＸ２、ＰＦＫＭ、ＰＧＢＤ４、ＰＧＬＹＲＰ３、ＰＨＬＤＡ２、ＰＨＴＦ１、ＰＩ４ＫＢ、ＰＩＧＣ、ＰＩＭ１、ＰＫＤ２Ｌ１、ＰＫＭ、ＰＬＣＢ４、ＰＬＤ３、ＰＬＥＫＨＡ１、ＰＬＥＫＨＢ１、ＰＬＳ３、ＰＭＬ、ＰＮＭＡ５、ＰＮＮ、ＰＯＣ１Ａ、ＰＯＣ１Ｂ、ＰＯＬＤ２、ＰＯＬＤ４、ＰＯＵ５Ｆ１、ＰＰＩＧ、ＰＱＢＰ１、ＰＲＡＭＥ、ＰＲＰＦ４、ＰＲＲ１１、ＰＲＲＴ１、ＰＲＳＳ８、ＰＳＭＡ２、ＰＳＭＡ３、ＰＳＭＡ４、ＰＳＭＤ１１、ＰＳＭＤ４、ＰＳＭＤ６、ＰＳＭＥ３、ＰＳＭＧ３、ＰＴＢＰ３、ＰＴＣＨ１、ＰＴＨＬＨ、ＰＴＰＲＤ、ＰＵＳ７Ｌ、ＰＶＲＩＧ、ＱＰＲＴ、ＲＡＢ２７Ａ、ＲＡＢ７Ｂ、ＲＡＢＧＧＴＢ、ＲＡＥＴ１Ｅ、ＲＡＬＧＤＳ、ＲＡＬＹＬ、ＲＡＲＢ、ＲＣＶＲＮ、ＲＥＧ３Ｇ、ＲＦＣ５、ＲＧＬ４、ＲＧＳ１９、ＲＧＳ３、ＲＨＤ、ＲＩＮＬ、ＲＩＰＯＲ２、ＲＩＴＡ１、ＲＭＤＮ２、ＲＮＡＳＥ１、ＲＮＡＳＥ４、ＲＮＦ４、ＲＰＡ２、ＲＰＬ１７、ＲＰＬ２１、ＲＰＬ２６Ｌ１、ＲＰＬ２８、ＲＰＬ２９、ＲＰＬ４１、ＲＰＬ９、ＲＰＳ１１、ＲＰＳ１３、ＲＰＳ１４、ＲＲＢＰ１、ＲＳＵ１、ＲＴＰ２、ＲＵＮＸ１、ＲＵＮＸ１Ｔ１、ＲＵＮＸ１Ｔ１、ＲＵＮＸ２、ＲＵＳＣ１、ＲＸＲＧ、Ｓ１００Ａ１３、Ｓ１００Ａ４、ＳＡＴ１、ＳＣＨＩＰ１、ＳＣＭＨ１、ＳＥＣ１４Ｌ１、ＳＥＭＡ４Ａ、ＳＥＲＰＩＮＡ１、ＳＥＲＰＩＮＢ４、ＳＥＲＴＡＤ３、ＳＦＴＰＤ、ＳＨ３Ｄ１９、ＳＨＣ１、ＳＨＭＴ１、ＳＨＰＲＨ、ＳＩＭ１、ＳＩＲＴ５、ＳＬＣ１

１Ａ２、ＳＬＣ１２Ａ４、ＳＬＣ１６Ａ１、ＳＬＣ２５Ａ３、ＳＬＣ２６Ａ９、ＳＬＣ５Ａ１１、ＳＬＣ６Ａ１２、ＳＬＣ６Ａ１９、ＳＬＣ７Ａ１、ＳＬＦＮ１１、ＳＬＩＲＰ、ＳＭＡＤ５、ＳＭＡＲＣＡＤ１、ＳＭＮ１、ＳＮＣＡ、ＳＮＲＮＰ２００、ＳＮＲＰＢ２、ＳＮＸ１２、ＳＯＤ１、ＳＯＸ１３、ＳＯＸ５、ＳＰ８、ＳＰＡＲＣＬ１、ＳＰＡＴＡ１２、ＳＰＡＴＡ３１Ｃ２、ＳＰＮ、ＳＰＯＰ、ＳＱＳＴＭ１、ＳＲＢＤ１、ＳＲＣ、ＳＲＥＢＦ１、ＳＲＰＫ２、ＳＳＢ、ＳＳＢ、ＳＳＢＰ１、ＳＴ３ＧＡＬ６、ＳＴＡＢ１、ＳＴＡＭＢＰ、ＳＴＡＵ１、ＳＴＡＵ１、ＳＴＡＵ１、ＳＴＡＵ１、ＳＴＡＵ１、ＳＴＫ１６、ＳＴＫ２４、ＳＴＫ３８、ＳＴＭＮ１、ＳＴＸ７、ＳＵＬＴ２Ｂ１、ＳＹＫ、ＳＹＮＰＲ、ＴＡＦ１Ｃ、ＴＡＧＬＮ、ＴＡＮＫ、ＴＡＳ２Ｒ４０、ＴＢＣ１Ｄ１５、ＴＢＸＡＳ１、ＴＣＦ４、ＴＤＧＦ１、ＴＤＰ２、ＴＤＲＤ３、ＴＤＲＤ５、ＴＥＳＫ２、ＴＨＡＰ６、ＴＨＢＤ、ＴＨＴＰＡ、ＴＩＡＭ２、ＴＫＦＣ、ＴＫＴＬ１、ＴＬＲ１０、ＴＭ９ＳＦ２、ＴＭＣ６、ＴＭＣＯ２、ＴＭＥＤ１０、ＴＭＥＭ１１６、ＴＭＥＭ１２６Ａ、ＴＭＥＭ１５９、ＴＭＥＭ２０８、ＴＭＥＭ２３０、ＴＭＥＭ６７、ＴＭＰＲＳＳ１３、ＴＭＵＢ２、ＴＮＦＳＦ４、ＴＮＩＰ３、ＴＰ５３、ＴＰ５３、ＴＰ７３、ＴＲＡＦ１、ＴＲＡＫ１、ＴＲＩＭ３１、ＴＲＩＭ６、ＴＲＭＴ１、ＴＲＭＴ２Ｂ、ＴＲＰＭ７、ＴＲＰＭ８、ＴＳＰＥＡＲ、ＴＴＣ３９Ｂ、ＴＴＬＬ１１、ＴＵＢＢ６、ＴＸＬＮＢ、ＴＸＮＩＰ、ＴＸＮＬ１、ＴＸＮＲＤ１、ＴＹＲＯＢＰ、Ｕ２ＡＦ１、ＵＢＡ１、ＵＢＥ２Ｄ３、ＵＢＥ２Ｉ、ＵＢＥ２Ｌ３、ＵＢＥ２Ｖ１、ＵＢＥ２Ｖ２、ＵＭＰＳ、ＵＮＧ、ＵＰＰ２、ＵＳＭＧ５、ＵＳＰ１８、ＵＴＰ１４Ａ、ＵＴＲＮ、ＵＴＳ２、ＶＤＲ、ＶＥＧＦＡ、ＶＥＧＦＡ、ＶＥＰＨ１、ＶＩＰＡＳ３９、ＶＰＳ２９、ＶＳＩＧ１０Ｌ、ＷＤＨＤ１、ＷＤＲ１２、ＷＤＲ４、ＷＤＲ４５、ＷＤＹＨＶ１、ＷＲＡＰ５３、ＸＩＡＰ、ＸＰＮＰＥＰ３、ＹＡＰ１、ＹＷＨＡＺ、ＹＹ１ＡＰ１、ＺＢＴＢ３２、ＺＮＦ１４６、ＺＮＦ２５０、ＺＮＦ３８５Ａ、ＺＮＦ４０８、ＺＮＦ４１０、ＺＮＦ４２３、ＺＮＦ４３、ＺＮＦ５０２、ＺＮＦ５１２、ＺＮＦ５１３、ＺＮＦ５８０、ＺＮＦ６０９、ＺＮＦ７０７、またはＺＮＲＤ１である。

【０２２７】

ｉｉ．合成ＴＩＥ：アプタマー複合体、修飾ヌクレオチド、ＩＲＥＳバリアント、及び他の操作された結合

本明細書で企図されるように、特定の実施形態では、翻訳開始要素（ＴＩＥ）は、合成ＴＩＥを含む。いくつかの実施形態では、合成ＴＩＥは、線状ＲＮＡまたは環状ＲＮＡポリヌクレオチドの翻訳を開始することができるアプタマー複合体、合成ＩＲＥＳ、または他の操作されたＴＩＥを含む。

【０２２８】

いくつかの実施形態では、１つ以上のアプタマー配列は、真核生物開始因子の成分と結合して、翻訳を増強するか、または開始することができる。いくつかの実施形態では、アプタマーは、特定の真核生物開始因子（ｅＩＦ）を促進することによって、インビボ及びインビトロで翻訳を増強するために使用され得る（例えば、ＷＯ２０１９／０８１３８３Ａ１のアプタマーは、真核生物開始因子４Ｆ（ｅＩＦ４Ｆ）と結合することができる。いくつかの実施形態では、アプタマーまたはアプタマーの複合体は、ＥＩＦ４Ｇ、ＥＩＦ４Ｅ、ＥＩＦ４Ａ、ＥＩＦ４Ｂ、ＥＩＦ３、ＥＩＦ２、ＥＩＦ５、ＥＩＦ１、ＥＩＦ１Ａ、４０Ｓリボソーム、ＰＣＢＰ１（ポリＣ結合タンパク質）、ＰＣＢＰ２、ＰＣＢＰ３、ＰＣＢＰ４、ＰＡＢＰ１（ポリＡ結合タンパク質）、ＰＴＢ、アルゴノートタンパク質ファミリー、ＨＮＲＮＰＫ（ヘテロ核リボヌクレオタンパク質Ｋ）、またはＬａタンパク質と結合することが可能であり得る。

【０２２９】

ｃ．終結配列

特定の実施形態では、コア機能性要素は、終結配列を含む。いくつかの実施形態では、終結配列は、終止コドンを含む。一実施形態では、終結配列は、終止カセットを含む。いくつかの実施形態では、終止カセットは、少なくとも２つの終止コドンを含む。いくつかの実施形態では、終止カセットは、少なくとも２フレームの終止コドンを含む。同じ実施

形態において、終止カセットにおける終止コドンのフレームは、各々、１、２、またはそれ以上の終止コドンを含む。いくつかの実施形態では、終止カセットは、ＬｏｘＰもしくはＲｏｘＳｔｏｐＲｏｘ、またはｆｒｔ隣接終止カセットを含む。同じ実施形態では、終止カセットは、ｌｏｘ－ｓｔｏｐ－ｌｏｘ終止カセットを含む。

【０２３０】

Ｃ．バリアント

特定の実施形態では、提供するポリヌクレオチド（例えば、ＤＮＡテンプレート、ＲＮＡ前駆体ポリヌクレオチド、または環状ＲＮＡポリヌクレオチド）は、修飾ヌクレオチド及び／または修飾ヌクレオシドを含む。いくつかの実施形態では、修飾ヌクレオシドは、$m^5C$（５－メチルシチジン）である。別の実施形態では、修飾ヌクレオシドは、$m^5U$（５－メチルウリジン）である。別の実施形態では、修飾ヌクレオシドは、$m^6A$（$N^6$－メチルアデノシン）である。別の実施形態では、修飾ヌクレオシドは、$s^2U$（２－チオウリジン）である。別の実施形態では、修飾ヌクレオシドは、Ψ（シュードウリジン）である。別の実施形態では、修飾ヌクレオシドは、Ｕｍ（２’－Ｏ－メチルウリジン）である。他の実施形態では、修飾ヌクレオシドは、$m^1A$（１－メチルアデノシン）；$m^2A$（２－メチルアデノシン）；Ａｍ（２’－Ｏ－メチルアデノシン）；$ms^2m^6A$（２－メチルチオ－$N^6$－メチルアデノシン）；$i^6A$（$N^6$－イソペンテニルアデノシン）；$ms^2i^6A$（２－メチルチオ－$N^6$イソペンテニルアデノシン）；$io^6A$（$N^6$－（ｃｉｓ－ヒドロキシイソペンテニル）アデノシン）；$ms^2io^6A$（２－メチルチオ－$N^6$－（ｃｉｓ－ヒドロキシイソペンテニル）アデノシン）；$g^6A$（$N^6$－グリシニルカルバモイルアデノシン）；$t^6A$（$N^6$－トレオニルカルバモイルアデノシン）；$ms^2t^6A$（２－メチルチオ－$N^6$－トレオニルカルバモイルアデノシン）；$m^6t^6A$（$N^6$－メチル－$N^6$－トレオニルカルバモイルアデノシン）；$hn^6A$（$N^6$－ヒドロキシノルバリルカルバモイルアデノシン）；$ms^2hn^6A$（２－メチルチオ－$N^6$－ヒドロキシノルバリルカルバモイルアデノシン）；Ａｒ（ｐ）（２’－Ｏ－リボシルアデノシン（ホスフェート））；Ｉ（イノシン）；$m^1I$（１－メチルイノシン）；$m^1Im$（１，２’－Ｏ－ジメチルイノシン）；$m^3C$（３－メチルシチジン）；Ｃｍ（２’－Ｏ－メチルシチジン）；$s^2C$（２－チオシチジン）；$ac^4C$（$N^4$－アセチルシチジン）；$f^5C$（５－ホルミルシチジン）；$m^5Cm$（５，２’－Ｏ－ジメチルシチジン）；$ac^4Cm$（$N^4$－アセチル－２’－Ｏ－メチルシチジン）；$k^2C$（リシジン）；$m^1G$（１－メチルグアノシン）；$m^2G$（$N^2$－メチルグアノシン）；$m^7G$（７－メチルグアノシン）；Ｇｍ（２’－Ｏ－メチルグアノシン）；$m^2_2G$（$N^2$，$N^2$－ジメチルグアノシン）；$m^2Gm$（$N^2$，２’－Ｏ－ジメチルグアノシン）；$m^2_2Gm$（$N^2$，$N^2$，２’－Ｏ－トリメチルグアノシン）；Ｇｒ（ｐ）（２’－Ｏ－リボシルグアノシン（ホスフェート））；ｙＷ（ワイブトシン）；$o_2yW$（ペルオキシワイブトシン）；ＯＨｙＷ（ヒドロキシワイブトシン）；ＯＨｙＷ＊（未修飾ヒドロキシワイブトシン）；ｉｍＧ（ワイオシン）；ｍｉｍＧ（メチルワイオシン）；Ｑ（ケウオシン）；ｏＱ（エポキシケウオシン）；ｇａｌＱ（ガラクトシル－ケウオシン）；ｍａｎＱ（マンノシル－ケウオシン）；$preQ_0$（７－シアノ－７－デアザグアノシン）；$preQ_1$（７－アミノメチル－７－デアザグアノシン）；$G^+$（アルカエオシン）；Ｄ（ジヒドロウリジン）；$m^5Um$（５，２’－Ｏ－ジメチルウリジン）；$s^4U$（４－チオウリジン）；$m^5s^2U$（５－メチル－２－チオウリジン）；$s^2Um$（２－チオ－２’－Ｏ－メチルウリジン）；$acp^3U$（３－（３－アミノ－３－カルボキシプロピル）ウリジン）；$ho^5U$（５－ヒドロキシウリジン）；$mo^5U$（５－メトキシウリジン）；$cmo^5U$（ウリジン５－オキシ酢酸）；$mcmo^5U$（ウリジン５－オキシ酢酸メチルエステル）；$chm^5U$（５－（カルボキシヒドロキシメチル）ウリジン））；$mchm^5U$（５－（カルボキシヒドロキシメチル）ウリジンメチルエステル）；$mcm^5U$（５－メトキシカルボニルメチルウリジン）；$mcm^5Um$（５－メトキシカルボニルメチル－２’－Ｏ－メチルウリジン）；$mcm^5s^2U$（５－メトキシカルボニルメチル－２－チオウリジン）；$nm^5S^2U$（５－アミノメチル－２－チオウリジン）；$mnm^5U$（５－メチルアミノメチルウリジン）

；ｍｎｍ$^{5}$ｓ$^{2}$Ｕ（５－メチルアミノメチル－２－チオウリジン）；ｍｎｍ$^{5}$ｓｅ$^{2}$Ｕ（５－メチルアミノメチル－２－セレノウリジン）；ｎｃｍ$^{5}$Ｕ（５－カルバモイルメチルウリジン）；ｎｃｍ$^{5}$Ｕｍ（５－カルバモイルメチル－２’－Ｏ－メチルウリジン）；ｃｍｎｍ$^{5}$Ｕ（５－カルボキシメチルアミノメチルウリジン）；ｃｍｎｍ$^{5}$Ｕｍ（５－カルボキシメチルアミノメチル－２’－Ｏ－メチルウリジン）；ｃｍｎｍ$^{5}$ｓ$^{2}$Ｕ（５－カルボキシメチルアミノメチル－２－チオウリジン）；ｍ$^{6}{}_{2}$Ａ（Ｎ$^{6}$，Ｎ$^{6}$－ジメチルアデノシン）；Ｉｍ（２’－Ｏ－メチルイノシン）；ｍ$^{4}$Ｃ（Ｎ$^{4}$－メチルシチジン）；ｍ$^{4}$Ｃｍ（Ｎ$^{4}$，２’－Ｏ－ジメチルシチジン）；ｈｍ$^{5}$Ｃ（５－ヒドロキシメチルシチジン）；ｍ$^{3}$Ｕ（３－メチルウリジン）；ｃｍ$^{5}$Ｕ（５－カルボキシメチルウリジン）；ｍ$^{6}$Ａｍ（Ｎ$^{6}$，２’－Ｏ－ジメチルアデノシン）；ｍ$^{6}{}_{2}$Ａｍ（Ｎ$^{6}$，Ｎ$^{6}$，Ｏ－２’－トリメチルアデノシン）；ｍ$^{2,7}$Ｇ（Ｎ$^{2}$，７－ジメチルグアノシン）；ｍ$^{2,2,7}$Ｇ（Ｎ$^{2}$，Ｎ$^{2}$，７－トリメチルグアノシン）；ｍ$^{3}$Ｕｍ（３，２’－Ｏ－ジメチルウリジン）；ｍ$^{5}$Ｄ（５－メチルジヒドロウリジン）；ｆ$^{5}$Ｃｍ（５－ホルミル－２’－Ｏ－メチルシチジン）；ｍ$^{1}$Ｇｍ（１，２’－Ｏ－ジメチルグアノシン）；ｍ$^{1}$Ａｍ（１，２’－Ｏ－ジメチルアデノシン）；τｍ$^{5}$Ｕ（５－タウリノメチルウリジン）；τｍ$^{5}$ｓ$^{2}$Ｕ（５－タウリノメチル－２－チオウリジン））；ｉｍＧ－１４（４－デメチルワイオシン）；ｉｍＧ２（イソワイオシン）；またはａｃ$^{6}$Ａ（Ｎ$^{6}$－アセチルアデノシン）である。

【０２３１】

いくつかの実施形態では、修飾ヌクレオシドには、ピリジン－４－オンリボヌクレオシド、５－アザ－ウリジン、２－チオ－５－アザ－ウリジン、２－チオウリジン、４－チオ－シュードウリジン、２－チオ－シュードウリジン、５－ヒドロキシウリジン、３－メチルウリジン、５－カルボキシメチル－ウリジン、１－カルボキシメチル－シュードウリジン、５－プロピニル－ウリジン、１－プロピニル－シュードウリジン、５－タウリノメチルウリジン、１－タウリノメチル－シュードウリジン、５－タウリノメチル－２－チオ－ウリジン、１－タウリノメチル－４－チオ－ウリジン、５－メチル－ウリジン、１－メチル－シュードウリジン、４－チオ－１－メチル－シュードウリジン、２－チオ－１－メチル－シュードウリジン、１－メチル－１－デアザ－シュードウリジン、２－チオ－１－メチル－１－デアザ－シュードウリジン、ジヒドロウリジン、ジヒドロシュードウリジン、２－チオ－ジヒドロウリジン、２－チオ－ジヒドロシュードウリジン、２－メトキシウリジン、２－メトキシ－４－チオ－ウリジン、４－メトキシ－シュードウリジン、４－メトキシ－２－チオ－シュードウリジン、５－アザ－シチジン、シュードイソシチジン、３－メチル－シチジン、Ｎ４－アセチルシチジン、５－ホルミルシチジン、Ｎ４－メチルシチジン、５－ヒドロキシメチルシチジン、１－メチル－シュードイソシチジン、ピロロ－シチジン、ピロロ－シュードイソシチジン、２－チオ－シチジン、２－チオ－５－メチル－シチジン、４－チオ－シュードイソシチジン、４－チオ－１－メチル－シュードイソシチジン、４－チオ－１－メチル－１－デアザ－シュードイソシチジン、１－メチル－１－デアザ－シュードイソシチジン、ゼブラリン、５－アザ－ゼブラリン、５－メチル－ゼブラリン、５－アザ－２－チオ－ゼブラリン、２－チオ－ゼブラリン、２－メトキシ－シチジン、２－メトキシ－５－メチル－シチジン、４－メトキシ－シュードイソシチジン、４－メトキシ－１－メチル－シュードイソシチジン、２－アミノプリン、２，６－ジアミノプリン、７－デアザ－アデニン、７－デアザ－８－アザ－アデニン、７－デアザ－２－アミノプリン、７－デアザ－８－アザ－２－アミノプリン、７－デアザ－２，６－ジアミノプリン、７－デアザ－８－アザ－２，６－ジアミノプリン、１－メチルアデノシン、Ｎ６－メチルアデノシン、Ｎ６－イソペンテニルアデノシン、Ｎ６－（ｃｉｓ－ヒドロキシイソペンテニル）アデノシン、２－メチルチオ－Ｎ６－（ｃｉｓ－ヒドロキシイソペンテニル）アデノシン、Ｎ６－グリシニルカルバモイルアデノシン、Ｎ６－トレオニルカルバモイルアデノシン、２－メチルチオ－Ｎ６－トレオニルカルバモイルアデノシン、Ｎ６，Ｎ６－ジメチルアデノシン、７－メチルアデニン、２－メチルチオ－アデニン、２－メトキシ－アデニン、イノシン、１－メチル－イノシン、ワイオシン、ワイブトシン、７－デアザ－グアノシン、７－デアザ－８－アザ－グアノシン、６－チオ－グアノシン、６－チオ－

７－デアザ－グアノシン、６－チオ－７－デアザ－８－アザ－グアノシン、７－メチル－グアノシン、６－チオ－７－メチル－グアノシン、７－メチルイノシン、６－メトキシ－グアノシン、１－メチルグアノシン、Ｎ２－メチルグアノシン、Ｎ２，Ｎ２－ジメチルグアノシン、８－オキソ－グアノシン、７－メチル－８－オキソ－グアノシン、１－メチル－６－チオ－グアノシン、Ｎ２－メチル－６－チオ－グアノシン、及びＮ２，Ｎ２－ジメチル－６－チオ－グアノシンの群から選択される化合物が含まれ得る。別の実施形態では、修飾は、５－メチルシトシン、シュードウリジン及び１－メチルシュードウリジンからなる群から独立して選択される。

【０２３２】

いくつかの実施形態では、修飾リボヌクレオシドは、５－メチルシチジン、５－メトキシウリジン、１－メチル－シュードウリジン、Ｎ６－メチルアデノシン、及び／またはシュードウリジンを含む。いくつかの実施形態では、かかる修飾ヌクレオシドは、さらなる安定性及び免疫活性化に対する耐性を提供する。

【０２３３】

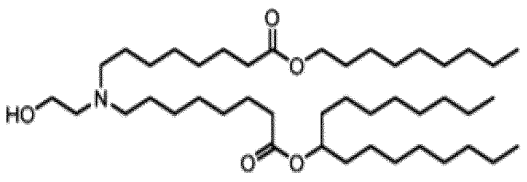
特定の実施形態では、ポリヌクレオチドは、コドン最適化され得る。コドン最適化配列は、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドのコドンが、ポリペプチドの発現、安定性及び／または活性を増加させるために、置換されている配列であり得る。コドン最適化に影響を与える因子には、（ｉ）２つ以上の生物もしくは遺伝子または合成的に構築されたバイアステーブル間のコドンバイアスの変動、（ｉｉ）生物、遺伝子、または遺伝子のセット内のコドンバイアスの程度の変動、（ｉｉｉ）状況を含むコドンの系統的変動、（ｉｖ）それらのデコードｔＲＮＡに従ったコドンの変動、（ｖ）トリプレットの全体的または１つの位置のいずれかで、ＧＣ％に従ったコドンの変動、（ｖｉ）例えば天然に存在する配列のような参照配列に対する類似度の変動、（ｖｉｉ）コドン頻度カットオフの変動、（ｖｉｉｉ）ＤＮＡ配列から転写されたｍＲＮＡの構造特性、（ｉｘ）コドン置換セットの設計に基づくＤＮＡ配列の機能に関する事前知識、及び／または（ｘ）各アミノ酸のコドンセットの系統的変動のうちの１つ以上が含まれるが、これに限定されない。いくつかの実施形態では、コドン最適化ポリヌクレオチドは、リボザイム衝突を最小限に抑え、及び／または発現配列とコア機能要素との間の構造干渉を制限し得る。

【０２３４】

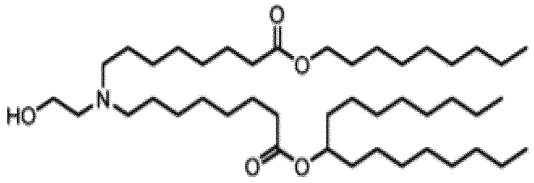
３．ペイロード

いくつかの実施形態では、発現配列は、治療用タンパク質をコードする。いくつかの実施形態では、治療用タンパク質は、以下の表に列挙されるタンパク質から選択される。

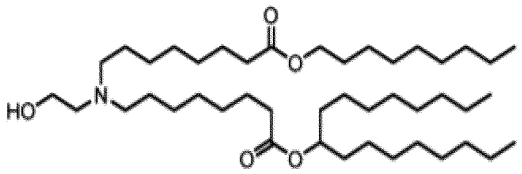
【表１Ａ－１】

| ペイロード | 配列 | 標的細胞/器官 | 好ましい送達製剤 |
|---|---|---|---|
| CD19 CAR | 配列 309~314 のいずれか | T 細胞 |  <br>(50mol%)<br>DSPC(10mol%)<br>ベータシトステロール(28.5%mol%)<br>コレステロール(10mol%)<br>PEG DMG(1.5mol%) |

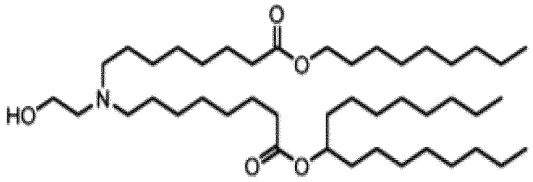
【表１Ａ－２】

| | | | |
|---|---|---|---|
| BCMA CAR* | MALPVTALLLPLALLLHA ARPDIVLTQSPASLAVSLG ERATINCRASESVSVIGAH LIHWYQQKPGQPPKLLIYL ASNLETGVPARFSGSGSGT DFTLTISSLQAEDAAIYYCL QSRIFPRTFGQGTKLEIKGS TSGSGKPGSGEGSTKGQV QLVQSGSELKKPGASVKV SCKASGYTFTDYSINWVR QAPGQGLEWMGWINTETR EPAYAYDFRGRFVFSLDTS VSTAYLQISSLKAEDTAVY YCARDYSYAMDYWGQGT LVTVSSAAATTTPAPRPPT PAPTIASQPLSLRPEACRPA AGGAVHTRGLDFACDIYI WAPLAGTCGVLLLSLVITL YCKRGRKKLLYIFKQPFM RPVQTTQEEDGCSCRFPEE EEGGCELRVKFSRSADAPA YQQGQNQLYNELNLGRRE EYDVLDKRRGRDPEMGGK PRRKNPQEGLYNELQKDK MAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYD ALHMQALPPR(配列番号3270)<br>*BCMA CAR は、米国特許出願第 2021/0128618A1 号に開示されている抗 BCMA CAR のいずれかから選択することができる。 | T細胞 |  <br>(50mol%)<br>DSPC(10mol%)<br>ベータシトステロール(28.5%mol%)<br>コレステロール(10mol%)<br>PEG DMG(1.5mol%) |

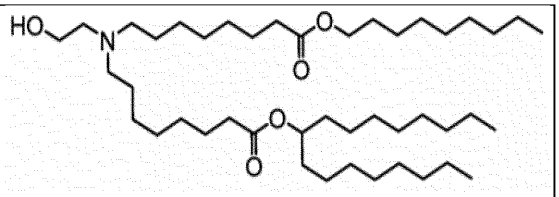
【表１Ａ－３】

| | | | |
|---|---|---|---|
| MAGE-A4 TCR | TCR アルファ鎖:<br>KNQVEQSPQSLIILEGK<br>NCTLQCNYTVSPFSNLR<br>WYKQDTGRGPVSLTIM<br>TFSENTKSNGRYTATLD<br>ADTKQSSLHITASQLSD<br>SASYICVVNHSGGSYIPT<br>FGRGTSLIVHPYIQKPDP<br>AVYQLRDSKSSDKSVC<br>LFTDFDSQTNVSQSKDS<br>DVYITDKTVLDMRSMD<br>FKSNSAVAWSNKSDFA<br>CANAFNNSIIPEDTFFPS<br>PESS(配列番号 3271)<br><br>TCR ベータ鎖:<br>DVKVTQSSRYLVKRTG<br>EKVFLECVQDMDHENM<br>FWYRQDPGLGLRLIYFS<br>YDVKMKEKGDIPEGYS<br>VSREKKERFSLILESAST<br>NQTSMYLCASSFLMTS<br>GDPYEQYFGPGTRLTVT<br>EDLKNVFPPEVAVFEPS<br>EAEISHTQKATLVCLAT<br>GFYPDHVELSWWVNG<br>KEVHSGVSTDPQPLKEQ<br>PALNDSRYCLSSRLRVS<br>ATFWQNPRNHFRCQVQ<br>FYGLSENDEWTQDRAK<br>PVTQIVSAEAWGRAD(配列番号 3272) | T 細胞 |  <br>(50mol%)<br>DSPC(10mol%)<br>ベータシトステロール(28.5%mol%)<br>コレステロール(10mol%)<br>PEG DMG(1.5mol%) |

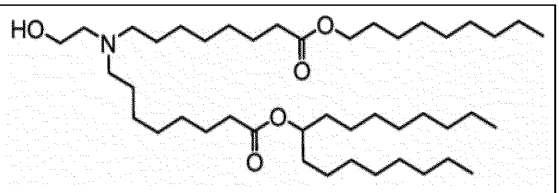
【表１Ａ－４】

| | | | |
|---|---|---|---|
| NY-ESO TCR | TCR アルファ細胞外配列<br>MQEVTQIPAALSVPEGE<br>NLVLNCSFTDSAIYNLQ<br>WFRQDPGKGLTSLLLIQ<br>SSQREQTSGRLNASLDK<br>SSGRSTLYIAASQPGDS<br>ATYLCAVRPTSGGSYIP<br>TFGRGTSLIVHPY(配列番号 3273)<br><br>TCR ベータ細胞外配列<br>MGVTQTPKFQVLKTGQ<br>SMTLQCAQDMNHEYM<br>SWYRQDPGMGLRLIHY<br>SVGAGITDQGEVPNGY<br>NVSRSTTEDFPLRLLSA<br>APSQTSVYFCASSYVGN<br>TGELFFGEGSRLTVL(配列番号 3274) | T 細胞 |  <br>(50mol%)<br>DSPC(10mol%)<br>ベータシトステロール(28.5%mol%)<br>コレステロール(10mol%)<br>PEG DMG(1.5mol%) |
| EPO | APPRLICDSRVLERYLLE<br>AKEAENITTGCAEHCSL<br>NENITVPDTKVNFYAW<br>KRMEVGQQAVEVWQG<br>LALLSEAVLRGQALLV<br>NSSQPWEPLQLHVDKA<br>VSGLRSLTTLLRALGAQ<br>KEAISPPDAASAAPLRTI<br>TADTFRKLFRVYSNFLR<br>GKLKLYTGEACRTGDR(配列番号 3275) | 腎臓または骨髄 | |

【表１Ａ－５】

| | | | |
|---|---|---|---|
| PAH | MSTAVLENPGLGRKLS<br>DFGQETSYIEDNCNQNG<br>AISLIFSLKEEVGALAKV<br>LRLFEENDVNLTHIESRP<br>SRLKKDEYEFFTHLDKR<br>SLPALTNIIKILRHDIGAT<br>VHELSRDKKKDTVPWF<br>PRTIQELDRFANQILSYG<br>AELDADHPGFKDPVYR<br>ARRKQFADIAYNYRHG<br>QPIPRVEYMEEEKKTW<br>GTVFKTLKSLYKTHAC<br>YEYNHIFPLLEKYCGFH<br>EDNIPQLEDVSQFLQTC<br>TGFRLRPVAGLLSSRDF<br>LGGLAFRVFHCTQYIRH<br>GSKPMYTPEPDICHELL<br>GHVPLFSDRSFAQFSQEI<br>GLASLGAPDEYIEKLATI<br>YWFTVEFGLCKQGDSIK<br>AYGAGLLSSFGELQYCL<br>SEKPKLLPLELEKTAIQN<br>YTVTEFQPLYYVAESFN<br>DAKEKVRNFAATIPRPF<br>SVRYDPYTQRIEVLDNT<br>QQLKILADSINSEIGILCS<br>ALQKIK(配列番号 3257) | 肝細胞 |  <br>(50mol%)<br>DSPC(10mol%)<br>コレステロール(38.5%mol%)<br>PEG-DMG (1.5%)<br>または<br>MC3(50mol%)<br>DSPC(10mol%)<br>コレステロール(38.5%mol%)<br>PEG-DMG (1.5%) |

【表１Ａ－６】

| | | | |
|---|---|---|---|
| CPS1 | LSVKAQTAHIVLEDGTKMK<br>GYSFGHPSSVAGEVVFNTGL<br>GGYPEAITDPAYKGQILTMA<br>NPIIGNGGAPDTTALDELGL<br>SKYLESNGIKVSGLLVLDYS<br>KDYNHWLATKSLGQWLQE<br>EKVPAIYGVDTRMLTKIIRD<br>KGTMLGKIEFEGQPVDFVDP<br>NKQNLIAEVSTKDVKVYGK<br>GNPTKVVAVDCGIKNNVIRL<br>LVKRGAEVHLVPWNHDFTK<br>MEYDGILIAGGPGNPALAEP<br>LIQNVRKILESDRKEPLFGIS<br>TGNLITGLAAGAKTYKMSM<br>ANRGQNQPVLNITNKQAFIT<br>AQNHGYALDNTLPAGWKPL<br>FVNVNDQTNEGIMHESKPFF<br>AVQFHPEVTPGPIDTEYLFD<br>SFFSLIKKGKATTITSVLPKP<br>ALVASRVEVSKVLILGSGGL<br>SIGQAGEFDYSGSQAVKAM<br>KEENVKTVLMNPNIASVQT<br>NEVGLKQADTVYFLPITPQF<br>VTEVIKAEQPDGLILGMGGQ<br>TALNCGVELFKRGVLKEYG<br>VKVLGTSVESIMATEDRQLF<br>SDKLNEINEKIAPSFAVESIE<br>DALKAADTIGYPVMIRSAY<br>ALGGLGSGICPNRETLMDLS<br>TKAFAMTNQILVEKSVTGW<br>KEIEYEVVRDA | 肝細胞 |  <br>(50mol%)<br>DSPC(10mol%)<br>コレステロール(38.5%mol%)<br>PEG-DMG (1.5%)<br>または<br>MC3(50mol%)<br>DSPC(10mol%)<br>コレステロール(38.5%mol%)<br>PEG-DMG (1.5%) |

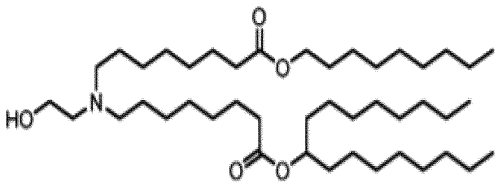
【表１Ａ－７】

| | | | |
|---|---|---|---|
| | DDNCVTVCNMENVDAMGV<br>HTGDSVVVAPAQTLSNAEF<br>QMLRRTSINVVRHLGIVGEC<br>NIQFALHPTSMEYCIIEVNAR<br>LSRSSALASKATGYPLAFIA<br>AKIALGIPLPEIKNVVSGKTS<br>ACFEPSLDYMVTKIPRWDL<br>DRFHGTSSRIGSSMKSVGEV<br>MAIGRTFEESFQKALRMCHP<br>SIEGFTPRLPMNKEWPSNLD<br>LRKELSEPSSTRIYAIAKAID<br>DNMSLDEIEKLTYIDKWFLY<br>KMRDILNMEKTLKGLNSES<br>MTEETLKRAKEIGFSDKQIS<br>KCLGLTEAQTRELRLKKNIH<br>PWVKQIDTLAAEYPSVTNY<br>LYVTYNGQEHDVNFDDHG<br>MMVLGCGPYHIGSSVEFDW<br>CAVSSIRTLRQLGKKTVVVN<br>CNPETVSTDFDECDKLYFEE<br>LSLERILDIYHQEACGGCIIS<br>VGGQIPNNLAVPLYKNGVKI<br>MGTSPLQIDRAEDRSIFSAVL<br>DELKVAQAPWKAVNTLNE<br>ALEFAKSVDYPCLLRPSYVL<br>SGSAMNVVFSEDEMKKFLE<br>EATRVSQEHPVVLTKFVEG<br>AREVEMDAVGKDGRVISHA<br>ISEHVEDAGVHSGDATLMLP<br>TQTISQGAIEKVKDATRKIA<br>KAFAISGPFNV | | |

【表１Ａ－８】

| | | | |
|---|---|---|---|
| | QFLVKGNDVLVIECNLR<br>ASRSFPFVSKTLGVDFID<br>VATKVMIGENVDEKHL<br>PTLDHPIIPADYVAIKAP<br>MFSWPRLRDADPILRCE<br>MASTGEVACFGEGIHTA<br>FLKAMLSTGFKIPQKGI<br>LIGIQQSFRPRFLGVAEQ<br>LHNEGFKLFATEATSD<br>WLNANNVPATPVAWPS<br>QEGQNPSLSSIRKLIRDG<br>SIDLVINLPNNNTKFVH<br>DNYVIRRTAVDSGIPLL<br>TNFQVTKLFAEAVQKS<br>RKVDSKSLFHYRQYSA<br>GKAA(配列番号 3276) | | |

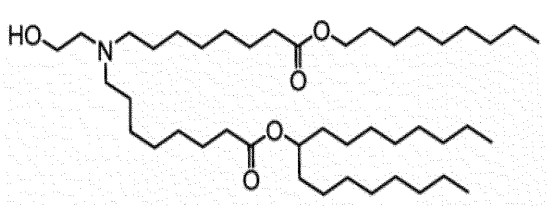
【表１Ａ－９】

| | | | |
|---|---|---|---|
| Cas9 | MKRNYILGLDIGITSVG<br>YGIIDYETRDVIDAGVR<br>LFKEANVENNEGRRSK<br>RGARRLKRRRRHRIQR<br>VKKLLFDYNLLTDHSEL<br>SGINPYEARVKGLSQKL<br>SEEEFSAALLHLAKRRG<br>VHNVNEVEEDTGNELS<br>TKEQISRNSKALEEKYV<br>AELQLERLKKDGEVRG<br>SINRFKTSDYVKEAKQL<br>LKVQKAYHQLDQSFIDT<br>YIDLLETRRTYYEGPGE<br>GSPFGWKDIKEWYEML<br>MGHCTYFPEELRSVKY<br>AYNADLYNALNDLNNL<br>VITRDENEKLEYYEKFQ<br>IIENVFKQKKKPTLKQIA<br>KEILVNEEDIKGYRVTS<br>TGKPEFTNLKVYHDIKD<br>ITARKEIIENAELLDQIA<br>KILTIYQSSEDIQEELTN<br>LNSELTQEEIEQISNLKG<br>YTGTHNLSLKAINLILD<br>ELWHTNDNQIAIFNRLK<br>LVPKKVDLSQQKEIPTT<br>LVDDFILSPVVKRSFIQS<br>IKVINAIIKKYGLPNDIII<br>ELAREKNSKDAQKMIN<br>EMQKRNRQTNERIEEIIR<br>TTGKENAKYLIEKIKLH<br>DMQEGKCLYSLEAIPLE<br>DLLNNPFNYEVDHIIPRS<br>VSFDNSFNNKVLVKQE<br>ENSKKGNRTPFQYLSSS<br>DSKISYETFKKHILNLA | 免疫細胞 |  <br>(50mol%)<br>DSPC(10mol%)<br>ベータシトステロール(28.5%mol%)<br>コレステロール(10mol%)<br>PEG DMG(1.5mol%) |

【表１Ａ－１０】

| | | | |
|---|---|---|---|
| | KGKGRISKTKKEYLLEE<br>RDINRFSVQKDFINRNL<br>VDTRYATRGLMNLLRS<br>YFRVNNLDVKVKSING<br>GFTSFLRRKWKFKKER<br>NKGYKHHAEDALIIAN<br>ADFIFKEWKKLDKAKK<br>VMENQMFEEKQAESMP<br>EIETEQEYKEIFITPHQIK<br>HIKDFKDYKYSHRVDK<br>KPNRELINDTLYSTRKD<br>DKGNTLIVNNLNGLYD<br>KDNDKLKKLINKSPEKL<br>LMYHHDPQTYQKLKLI<br>MEQYGDEKNPLYKYYE<br>ETGNYLTKYSKKDNGP<br>VIKKIKYYGNKLNAHL<br>DITDDYPNSRNKVVKLS<br>LKPYRFDVYLDNGVYK<br>FVTVKNLDVIKKENYY<br>EVNSKCYEEAKKLKKIS<br>NQAEFIASFYNNDLIKIN<br>GELYRVIGVNNDLLNRI<br>EVNMIDITYREYLENMN<br>DKRPPRIIKTIASKTQSIK<br>KYSTDILGNLYEVKSKK<br>HPQIIKKG(配列番号<br>3277) | | |

【表１Ａ－１１】

| | | | |
|---|---|---|---|
| ADA<br>MTS1<br>3 | AAGGILHLELLVAVGPD<br>VFQAHQEDTERYVLTN<br>LNIGAELLRDPSLGAQF<br>RVHLVKMVILTEPEGAP<br>NITANLTSSLLSVCGWS<br>QTINPEDDTDPGHADLV<br>LYITRFDLELPDGNRQV<br>RGVTQLGGACSPTWSC<br>LITEDTGFDLGVTIAHEI<br>GHSFGLEHDGAPGSGC<br>GPSGHVMASDGAAPRA<br>GLAWSPCSRRQLLSLLS<br>AGRARCVWDPPRPQPG<br>SAGHPPDAQPGLYYSA<br>NEQCRVAFGPKAVACT<br>FAREHLDMCQALSCHT<br>DPLDQSSCSRLLVPLLD<br>GTECGVEKWCSKGRCR<br>SLVELTPIAAVHGRWSS<br>WGPRSPCSRSCGGGVV<br>TRRRQCNNPRPAFGGR<br>ACVGADLQAEMCNTQ<br>ACEKTQLEFMSQQCAR<br>TDGQPLRSSPGGASFYH<br>WGAAVPHSQGDALCRH<br>MCRAIGESFIMKRGDSF<br>LDGTRCMPSGPREDGTL<br>SLCVSGSCRTFGCDGR<br>MDSQQVWDRCQVCGG<br>DNSTCSPRKGSFTAGRA<br>REYVTFLTVTPNLTSVY<br>IANHRPLFTHLAVRIGG<br>RYVVAGKMSISPNTTYP<br>SLLEDGRVEYRVALTED | 肝細胞 |  <br>(50mol%)<br>DSPC(10mol%)<br>コレステロール(38.5%mol%)<br>PEG-DMG (1.5%)<br>または<br>MC3(50mol%)<br>DSPC(10mol%)<br>コレステロール(38.5%mol%)<br>PEG-DMG (1.5%) |

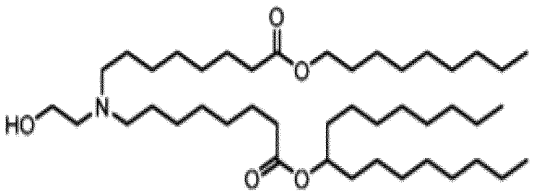
【表１Ａ－１２】

| | | | |
|---|---|---|---|
| | RLPRLEEIRIWGPLQED<br>ADIQVYRRYGEEYGNL<br>TRPDITFTYFQPKPRQA<br>WVWAAVRGPCSVSCG<br>AGLRWVNYSCLDQARK<br>ELVETVQCQGSQQPPA<br>WPEACVLEPCPPYWAV<br>GDFGPCSASCGGGLRER<br>PVRCVEAQGSLLKTLPP<br>ARCRAGAQQPAVALET<br>CNPQPCPARWEVSEPSS<br>CTSAGGAGLALENETC<br>VPGADGLEAPVTEGPGS<br>VDEKLPAPEPCVGMSCP<br>PGWGHLDATSAGEKAP<br>SPWGSIRTGAQAAHVW<br>TPAAGSCSVSCGRGLM<br>ELRFLCMDSALRVPVQE<br>ELCGLASKPGSRREVCQ<br>AVPCPARWQYKLAACS<br>VSCGRGVVRRILYCAR<br>AHGEDDGEEILLDTQCQ<br>GLPRPEPQEACSLEPCPP<br>RWKVMSLGPCSASCGL<br>GTARRSVACVQLDQGQ<br>DVEVDEAACAALVRPE<br>ASVPCLIADCTYRWHV<br>GTWMECSVSCGDGIQR<br>RRDTCLGPQAQAPVPA<br>DFCQHLPKPVTVRGCW<br>AGPCVGQGTPSLVPHEE<br>AAAPGRTTATPAGASLE<br>WSQARGLLFSPAPQPRR<br>LLPGPQENSVQSSACGR<br>QHLEPTGTIDMRGPGQA | | |

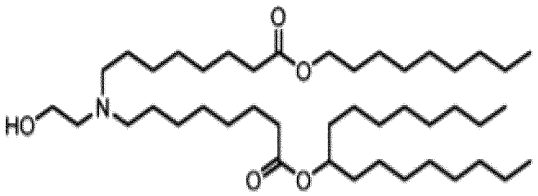
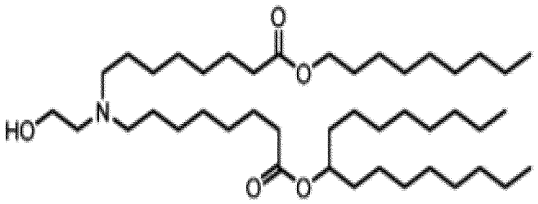
【表１Ａ－１３】

| | | | |
|---|---|---|---|
| | DCAVAIGRPLGEVVTLR<br>VLESSLNCSAGDMLLL<br>WGRLTWRKMCRKLLD<br>MTFSSKTNTLVVRQRC<br>GRPGGGVLLRYGSQLA<br>PETFYRECDMQLFGPW<br>GEIVSPSLSPATSNAGGC<br>RLFINVAPHARIAIHALA<br>TNMGAGTEGANASYILI<br>RDTHSLRTTAFHGQQV<br>LYWESESSQAEMEFSEG<br>FLKAQASLRGQYWTLQ<br>SWVPEMQDPQSWKGK<br>EGT(配列番号 3278) | | |

【表１Ａ－１４】

| | | | |
|---|---|---|---|
| FOXP3 | MPNPRPGKPSAPSLALG<br>PSPGASPSWRAAPKASD<br>LLGARGPGGTFQGRDL<br>RGGAHASSSSLNPMPPS<br>QLQLPTLPLVMVAPSGA<br>RLGPLPHLQALLQDRPH<br>FMHQLSTVDAHARTPV<br>LQVHPLESPAMISLTPPT<br>TATGVFSLKARPGLPPG<br>INVASLEWVSREPALLC<br>TFPNPSAPRKDSTLSAV<br>PQSSYPLLANGVCKWP<br>GCEKVFEEPEDFLKHCQ<br>ADHLLDEKGRAQCLLQ<br>REMVQSLEQQLVLEKE<br>KLSAMQAHLAGKMAL<br>TKASSVASSDKGSCCIV<br>AAGSQGPVVPAWSGPR<br>EAPDSLFAVRRHLWGS<br>HGNSTFPEFLHNMDYF<br>KFHNMRPPFTYATLIRW<br>AILEAPEKQRTLNEIYH<br>WFTRMFAFFRNHPATW<br>KNAIRHNLSLHKCFVRV<br>ESEKGAVWTVDELEFR<br>KKRSQRPSRCSNPTPGP(配列番号 3187) | 免疫細胞 |  <br>(50mol%)<br>DSPC(10mol%)<br>ベータシトステロール(28.5%mol%)<br>コレステロール(10mol%)<br>PEG DMG(1.5mol%) |

【表１Ａ－１５】

| | | | |
|---|---|---|---|
| IL-10 | SPGQGTQSENSCTHFP GNLPNMLRDLRDAFS RVKTFFQMKDQLDNL LLKESLLEDFKGYLGC QALSEMIQFYLEEVMP QAENQDPDIKAHVNSL GENLKTLRLRLRRCHR FLPCENKSKAVEQVK NAFNKLQEKGIYKAM SEFDIFINYIEAYMTMK IRN(配列番号 3181) | 免疫細胞 |  <br>(50mol%)<br>DSPC(10mol%)<br>ベータシトステロール(28.5%mol%)<br>コレステロール(10mol%)<br>PEG DMG(1.5mol%) |
| IL-2 | APTSSSTKKTQLQLEH LLLDLQMILNGINNYK NPKLTRMLTFKFYMP KKATELKHLQCLEEEL KPLEEVLNLAQSKNFH LRPRDLISNINVIVLEL KGSETTFMCEYADET ATIVEFLNRWITFCQSII STLT(配列番号 3177) | 免疫細胞 |  <br>(50mol%)<br>DSPC(10mol%)<br>ベータシトステロール(28.5%mol%)<br>コレステロール(10mol%)<br>PEG DMG(1.5mol%) |

【０２３５】

いくつかの実施形態では、発現配列は、治療用タンパク質をコードする。いくつかの実施形態では、発現配列は、サイトカイン、例えば、ＩＬ－１２ｐ７０、ＩＬ－１５、ＩＬ－２、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、ＩＦＮ－α、ＩＦＮ－β、ＩＬ－１０、ＴＧＦ－ベータ、ＩＬ－４、またはＩＬ－３５、またはその機能的断片をコードする。いくつかの実施形態では、発現配列は、免疫チェックポイント阻害剤をコードする。いくつかの実施形態では、発現配列は、アゴニスト（例えば、ＴＮＦＲファミリーメンバー、例えば、ＣＤ１３７Ｌ、ＯＸ４０Ｌ、ＩＣＯＳＬ、ＬＩＧＨＴ、またはＣＤ７０）をコードする。いくつかの実施形態では、発現配列は、キメラ抗原受容体をコードする。いくつかの実施形態では、発現配列は、阻害性受容体アゴニスト（例えば、ＰＤＬ１、ＰＤＬ２、ガレクチン－９、ＶＩＳＴＡ、Ｂ７Ｈ４、またはＭＨＣＩＩ）または阻害性受容体（例えば、ＰＤ１、ＣＴＬＡ４、ＴＩＧＩＴ、ＬＡＧ３、またはＴＩＭ３）をコードする。いくつかの実施形態では、発現配列は、阻害性受容体アンタゴニストをコードする。いくつかの実施形態では、発現配列は、１つ以上のＴＣＲ鎖（アルファ及びベータ鎖またはガンマ及びデルタ鎖）をコードする。いくつかの実施形態では、発現配列は、分泌Ｔ細胞または免疫細胞エンゲージャー（例えば、ＣＤ３、ＣＤ１３７、またはＣＤ２８及び腫瘍発現タンパク質、例えば、ＣＤ１９、ＣＤ２０、またはＢＣＭＡなどを標的とするＢｉＴＥなどの二重特異性抗体）をコードする。いくつかの実施形態では、発現配列は、転写因子（例えば、ＦＯＸＰ３、ＨＥＬＩＯＳ、ＴＯＸ１、またはＴＯＸ２）をコードする。いくつかの実施形態では、発現配列は、免疫抑制性酵素（例えば、ＩＤＯまたはＣＤ３９／ＣＤ７３）をコードする。いくつかの実施形態では、発現配列は、ＧｖＨＤ（例えば、抗ＨＬＡ－Ａ２　ＣＡＲ－Ｔｒｅｇ）をコードする。

【０２３６】

いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、１つを超える遺伝子によってコードされるサブユニットから構成されるタンパク質をコードする。例えば、タンパク質は、タンパク質の各鎖またはサブユニットが別個の遺伝子によってコードされているヘテロダイマーであり得る。１つを超えるｃｉｒｃＲＮＡ分子が輸送ビヒクルにて送達され、各ｃｉｒｃＲＮＡがタンパク質の別個のサブユニットをコードすることが可能である。代替的に、単一のｃｉｒｃＲＮＡを操作して、１つより多いサブユニットをコードし得る。特定の実施形態では、個々のサブユニットをコードする別個のｃｉｒｃＲＮＡ分子は、別個の輸送ビヒクルにて投与され得る。

【０２３７】

Ａ．抗原再形成受容体

ａ．キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）

いくつかの実施形態では、提供されるＲＮＡポリヌクレオチドは、１つ以上のキメラ抗原受容体（ＣＡＲまたはＣＡＲ－Ｔ）をコードする。ＣＡＲは、遺伝子操作された受容体である。これらの操作された受容体は、本明細書に記載するような環状ＲＮＡを介してＴ細胞を含む免疫細胞に挿入され得る及び免疫細胞によって発現され得る。ＣＡＲを使用すると、単一の受容体をプログラムして、両方が特定の抗原を認識し、その抗原に結合すると、免疫細胞を活性化してその抗原を持つ細胞を攻撃及び破壊することができる。これらの抗原が腫瘍細胞上に存在する場合、ＣＡＲを発現する免疫細胞は、腫瘍細胞を標的とし、殺傷し得る。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドによってコードされるＣＡＲは、（ｉ）標的抗原に特異的に結合する抗原結合分子、（ｉｉ）ヒンジドメイン、膜貫通ドメイン、及び細胞内ドメイン、ならびに（ｉｉｉ）活性化ドメインを含む。

【０２３８】

いくつかの実施形態では、本開示に従うＣＡＲの配向は、抗原結合ドメイン（ｓｃＦｖなど）を共刺激ドメイン及び活性化ドメインとタンデムに含む。共刺激ドメインは、細胞外部分、膜貫通部分、及び細胞内部分のうちの１つ以上を含み得る。他の実施形態では、複数の共刺激ドメインをタンデムで利用し得る。

【０２３９】

ｉ．抗原結合ドメイン

ＣＡＲは、標的抗原と相互作用する抗原結合分子を組み込むことによって、抗原（細胞表面抗原など）に結合するように操作され得る。いくつかの実施形態では、抗原結合分子は、その抗体断片、例えば、１つ以上の一本鎖抗体断片（ｓｃＦｖ）である。ｓｃＦｖは、互いに連結した抗体の重鎖及び軽鎖の可変領域を有する一本鎖抗体断片である。米国特許第７，７４１，４６５号及び同第６，３１９，４９４号、ならびにＥｓｈｈａｒ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｉｍｍｕｎｏｌ Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｙ（１９９７）４５：１３１－１３６を参照されたい。ｓｃＦｖは、標的抗原と特異的に相互作用する親抗体の能力を保持する。ｓｃＦｖは、他のＣＡＲ構成要素とともに一本鎖の一部として発現するように操作され得るため、キメラ抗原受容体で有用である。Ｉｄ．Ｋｒａｕｓｅ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．，Ｖｏｌｕｍｅ １８８，Ｎｏ．４，１９９８（６１９－６２６）；Ｆｉｎｎｅｙ ｅｔ ａｌ．，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，１９９８，１６１：２７９１－２７９７も参照されたい。抗原結合分子が、典型的には、目的の抗原を認識して結合することができるように、ＣＡＲの細胞外部分内に含有されることが理解されるであろう。二重特異性及び多重特異性ＣＡＲは、本発明の範囲内で企図され、１つより多い目的の標的に対する特異性を伴う。

【０２４０】

いくつかの実施形態では、抗原結合分子は、一本鎖を含み、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域は、リンカーによって接続されている。いくつかの実施形態では、ＶＨはリンカーのＮ末端に位置し、ＶＬはリンカーのＣ末端に位置する。他の実施形態では、ＶＬはリンカーのＮ末端に位置し、ＶＨはリンカーのＣ末端に位置する。いくつかの実施形態では、リンカーは、少なくとも約５、少なくとも約８、少なくとも約１０、少なくとも約１３、少なくとも約１５、少なくとも約１８、少なくとも約２０、少なくとも約２５、少なくとも

約３０、少なくとも約３５、少なくとも約４０、少なくとも約４５、少なくとも約５０、少なくとも約６０、少なくとも約７０、少なくとも約８０、少なくとも約９０、または少なくとも約１００アミノ酸を含む。

【０２４１】

いくつかの実施形態では、抗原結合分子は、ナノボディを含む。いくつかの実施形態では、抗原結合分子は、ＤＡＲＰｉｎを含む。いくつかの実施形態では、抗原結合分子は、標的タンパク質に特異的に結合することが可能なアンチカリンまたは他の合成タンパク質を含む。

【０２４２】

いくつかの実施形態では、ＣＡＲは、群ＣＤ１９、ＣＤ１２３、ＣＤ２２、ＣＤ３０、ＣＤ１７１、ＣＳ－１、Ｃ型レクチン様分子－１、ＣＤ３３、上皮成長因子受容体バリアントＩＩＩ（ＥＧＦＲｖＩＩＩ）、ガングリオシドＧ２（ＧＤ２）、ガングリオシドＧＤ３、ＴＮＦ受容体ファミリーメンバーＢ細胞成熟（ＢＣＭＡ）、Ｔｎ抗原（（Ｔｎ　Ａｇ）または（ＧａＩＮＡｃａ－Ｓｅｒ／Ｔｈｒ））、前立腺特異的膜抗原（ＰＳＭＡ）、受容体チロシンキナーゼ様オーファン受容体１（ＲＯＲ１）、Ｆｍｓ様チロシンキナーゼ３（ＦＬＴ３）、腫瘍関連糖タンパク質７２（ＴＡＧ７２）、ＣＤ３８、ＣＤ４４ｖ６、癌胎児性抗原（ＣＥＡ）、上皮細胞接着分子（ＥＰＣＡＭ）、Ｂ７Ｈ３（ＣＤ２７６）、ＫＩＴ（ＣＤ１１７）、インターロイキン－１３受容体サブユニットアルファ－２、メソセリン、インターロイキン１１受容体アルファ（ＩＬ－１１Ｒａ）、前立腺幹細胞抗原（ＰＳＣＡ）、プロテアーゼセリン２１、血管内皮成長因子受容体２（ＶＥＧＦＲ２）、ルイス（Ｙ）抗原、ＣＤ２４、血小板由来成長因子受容体ベータ（ＰＤＧＦＲ－ベータ）、ステージ特異的胚性抗原－４（ＳＳＥＡ－４）、ＣＤ２０、葉酸受容体アルファ、ＨＥＲ２、ＨＥＲ３、ムチン１、細胞表面関連（ＭＵＣ１）、上皮成長因子受容体（ＥＧＦＲ）、神経細胞接着分子（ＮＣＡＭ）、プロスターゼ、前立腺酸性ホスファターゼ（ＰＡＰ）、伸長因子２変異（ＥＬＦ２Ｍ）、エフリンＢ２、線維芽細胞活性化タンパク質アルファ（ＦＡＰ）、インスリン様成長因子１受容体（ＩＧＦ－Ｉ受容体）、炭酸アンヒドラーゼＩＸ（ＣＡＩＸ）、プロテアソーム（プロソーム、マクロペイン）サブユニット、ベータタイプ、９（ＬＭＰ２）、糖タンパク質１００（ｇｐ１００）、ブレークポイントクラスター領域（ＢＣＲ）及びアベルソンマウス白血病ウイルス癌遺伝子ホモログ１（Ａｂｌ）からなる癌遺伝子融合タンパク質（ｂｃｒ－ａｂｌ）、チロシナーゼ、エフリンＡ型受容体２（ＥｐｈＡ２）、フコシルＧＭ１、シアリルルイス接着分子（ｓＬｅ）、ガングリオシドＧＭ３、トランスグルタミナーゼ５（ＴＧＳ５）、高分子量黒色腫関連抗原（ＨＭＷＭＡＡ）、ｏ－アセチル－ＧＤ２ガングリオシド（ＯＡｃＧＤ２）、葉酸受容体ベータ、腫瘍内皮マーカー１（ＴＥＭ１／ＣＤ２４８）、腫瘍内皮マーカー７関連（ＴＥＭ７Ｒ）、クローディン６（ＣＬＤＮ６）、甲状腺刺激ホルモン受容体（ＴＳＨＲ）、Ｇタンパク質共役型受容体クラスＣグループ５、メンバーＤ（ＧＰＲＣ５Ｄ）、染色体Ｘオープンリーディングフレーム６１（ＣＸＯＲＦ６１）、ＣＤ９７、ＣＤ１７９ａ、未分化リンパ腫キナーゼ（ＡＬＫ）、ポリシアル酸、胎盤特異的１（ＰＬＡＣ１）、ｇｌｏｂｏＨグリコセラミドの六糖部分（ＧｌｏｂｏＨ）、乳腺分化抗原（ＮＹ－ＢＲ－１）、ウロプラキン２（ＵＰＫ２）、Ａ型肝炎ウイルス細胞受容体１（ＨＡＶＣＲ１）、アドレナリン受容体ベータ３（ＡＤＲＢ３）、パネキシン３（ＰＡＮＸ３）、Ｇタンパク質共役型受容体２０（ＧＰＲ２０）、リンパ球抗原６複合体、遺伝子座Ｋ９（ＬＹ６Ｋ）、嗅覚受容体５１Ｅ２（ＯＲ５１Ｅ２）、ＴＣＲガンマ代替リーディングフレームタンパク質（ＴＡＲＰ）、ウィルムス腫瘍タンパク質（ＷＴ１）、がん／精巣抗原１（ＮＹ－ＥＳＯ－１）、がん／精巣抗原２（ＬＡＧＥ－１ａ）、ＭＡＧＥファミリーメンバー（ＭＡＧＥ－Ａ１、ＭＡＧＥ－Ａ３及びＭＡＧＥ－Ａ４を含む）、ＥＴＳ転座バリアント遺伝子６、染色体１２ｐに位置（ＥＴＶ６－ＡＭＬ）、精子タンパク質１７（ＳＰＡ１７）、Ｘ抗原ファミリー、メンバー１Ａ（ＸＡＧＥ１）、アンギオポイエチン結合細胞表面受容体２（Ｔｉｅ　２）、黒色腫癌精巣抗原－１（ＭＡＤ－ＣＴ－１）、黒色腫癌精巣抗原－２（ＭＡＤ－ＣＴ－２）、Ｆｏｓ関連抗原１、腫瘍タンパク質ｐ５３（ｐ５３）、ｐ５３変異体、プロスタイン、

サバイビン、テロメラーゼ、前立腺癌腫瘍抗原－１、Ｔ細胞１によって認識される黒色腫抗原、ラット肉腫（Ｒａｓ）変異体、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素（ｈＴＥＲＴ）、肉腫転座ブレークポイント、アポトーシスの黒色腫阻害因子（ＭＬ－ＩＡＰ）、ＥＲＧ（膜貫通プロテアーゼ、セリン２（ＴＭＰＲＳＳ２）ＥＴＳ融合遺伝子）、Ｎ－アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼＶ（ＮＡ１７）、ペアボックスタンパク質Ｐａｘ－３（ＰＡＸ３）、アンドロゲン受容体、サイクリンＢ１、ｖ－ｍｙｃトリ骨髄細胞腫症ウイルス癌遺伝子神経芽腫由来ホモログ（ＭＹＣＮ）、Ｒａｓホモログファミリーメンバー Ｃ（ＲｈｏＣ）、チロシナーゼ関連タンパク質２（ＴＲＰ－２）、チトクロームＰ４５０　１Ｂ１（ＣＹＰ１Ｂ１）、ＣＣＣＴＣ結合因子（亜鉛フィンガータンパク質）様、Ｔ細胞３により認識される扁平上皮細胞癌抗原（ＳＡＲＴ３）、ペアボックスタンパク質Ｐａｘ－５（ＰＡＸ５）、プロアクロシン結合タンパク質ｓｐ３２（ＯＹ－ＴＥＳ１）、リンパ球特異的タンパク質チロシンキナーゼ（ＬＣＫ）、Ａキナーゼ固定タンパク質４（ＡＫＡＰ－４）、滑膜肉腫、Ｘブレークポイント２（ＳＳＸ２）、進行型糖化末端産物の受容体（ＲＡＧＥ－１）、腎臓ユビキタス１（ＲＵ１）、腎臓ユビキタス２（ＲＵ２）、レグマイン、ヒト乳頭腫ウイルスＥ６（ＨＰＶ　Ｅ６）、ヒト乳頭腫ウイルスＥ７（ＨＰＶ　Ｅ７）、腸カルボキシルエステラーゼ、ヒートショックタンパク質７０－２変異（ｍｕｔ　ｈｓｐ７０－２）、ＣＤ７９ａ、ＣＤ７９ｂ、ＣＤ７２、白血球関連免疫グロブリン様受容体１（ＬＡＩＲ１）、ＩｇＡ受容体のＦｃ断片（ＦＣＡＲまたはＣＤ８９）、白血球免疫グロブリン様受容体サブファミリーＡメンバー２（ＬＩＬＲＡ２）、ＣＤ３００分子様ファミリーメンバーｆ（ＣＤ３００ＬＦ）、Ｃ型レクチンドメインファミリー１２メンバーＡ（ＣＬＥＣ１２Ａ）、骨髄間質細胞抗原２（ＢＳＴ２）、ＥＧＦ様モジュール含有ムチン様ホルモン受容体様２（ＥＭＲ２）、リンパ球抗原７５（ＬＹ７５）、グリピカン－３（ＧＰＣ３）、Ｆｃ受容体様５（ＦＣＲＬ５）、ＭＵＣ１６、５Ｔ４、８Ｈ９、αｖβθインテグリン、αｖβ６インテグリン、アルファフェトプロテイン（ＡＦＰ）、Ｂ７－Ｈ６、ｃａ－１２５、ＣＡ９、ＣＤ４４、ＣＤ４４ｖ７／８、ＣＤ５２、Ｅ－カドヘリン、ＥＭＡ（上皮膜抗原）、上皮糖タンパク質－２（ＥＧＰ－２）、上皮糖タンパク質－４０（ＥＧＰ－４０）、ＥｒｂＢ４、上皮腫瘍抗原（ＥＴＡ）、葉酸結合タンパク質（ＦＢＰ）、キナーゼ挿入ドメイン受容体（ＫＤＲ）、ｋ－軽鎖、Ｌ１細胞接着分子、ＭＵＣ１８、ＮＫＧ２Ｄ、癌胎児性抗原（ｈ５Ｔ４）、腫瘍／精巣抗原１Ｂ、ＧＡＧＥ、ＧＡＧＥ－１、ＢＡＧＥ、ＳＣＰ－１、ＣＴＺ９、ＳＡＧＥ、ＣＡＧＥ、ＣＴ１０、ＭＡＲＴ－１、免疫グロブリンラムダ様ポリペプチド１（ＩＧＬＬ１）、Ｂ型肝炎表面抗原結合タンパク質（ＨＢｓＡｇ）、ウイルスキャプシド抗原（ＶＣＡ）、初期抗原（ＥＡ）、ＥＢＶ核抗原（ＥＢＮＡ）、ＨＨＶ－６　ｐ４１初期抗原、ＨＨＶ－６Ｂ　Ｕ９４潜伏抗原、ＨＨＶ－６Ｂ　ｐ９８後期抗原、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）抗原、ラージＴ抗原、スモールＴ抗原、アデノウイルス抗原、呼吸器合胞体ウイルス（ＲＳＶ）抗原、血球凝集素（ＨＡ）、ノイラミニダーゼ（ＮＡ）、パラインフルエンザ１型抗原、パラインフルエンザ２型抗原、パラインフルエンザ３型抗原、パラインフルエンザ４型抗原、ヒトメタニューモウイルス（ＨＭＰＶ）抗原、Ｃ型肝炎ウイルス（ＨＣＶ）コア抗原、ＨＩＶ　ｐ２４抗原、ＨＴＬＶ－１）抗原、メルケル細胞ポリオーマウイルスモールＴ抗原、メルケル細胞ポリオーマウイルスラージＴ抗原、ならびにカポジ肉腫関連ヘルペスウイルス（ＫＳＨＶ）溶解性核抗原及びＫＳＨＶ潜伏核抗原から選択される抗原に特異的な抗原結合ドメインを含む。いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、配列番号３１６５～３１７６から選択されるアミノ酸配列を含む。

【０２４３】

ｉｉ．ヒンジ／スペーサードメイン

いくつかの実施形態では、本開示のＣＡＲは、ヒンジまたはスペーサードメインを含む。いくつかの実施形態では、ヒンジ／スペーサードメインは、短縮型ヒンジ／スペーサードメイン（ＴＨＤ）を含み得、ＴＨＤドメインは、完全なヒンジ／スペーサードメイン（「ＣＨＤ」）の短縮バージョンである。いくつかの実施形態では、細胞外ドメインは、ＥｒｂＢ２、グリコホリンＡ（ＧｐＡ）、ＣＤ２、ＣＤ３デルタ、ＣＤ３イプシロン、ＣＤ

３ガンマ、ＣＤ４、ＣＤ７、ＣＤ８ａ、ＣＤ８［Ｔ ＣＤｌ １ａ（ＩＴ ＧＡＬ）、ＣＤｌ １ｂ（ＩＴ ＧＡＭ）、ＣＤｌ １ｃ（ＩＴＧＡＸ）、ＣＤｌ １ｄ（ＩＴ ＧＡＤ）、ＣＤ１８（ＩＴＧＢ２）、ＣＤ１９（Ｂ４）、ＣＤ２７（ＴＮＦＲＳＦ７）、ＣＤ２８、ＣＤ２８Ｔ、ＣＤ２９（ＩＴＧＢ１）、ＣＤ３０（ＴＮＦＲＳＦ８）、ＣＤ４０（ＴＮＦＲＳＦ５）、ＣＤ４８（ＳＬＡＭＦ２）、ＣＤ４９ａ（ＩＴＧＡ１）、ＣＤ４９ｄ（ＩＴＧＡ４）、ＣＤ４９ｆ（ＩＴＧＡ６）、ＣＤ６６ａ（ＣＥＡＣＡＭ１）、ＣＤ６６ｂ（ＣＥＡＣＡＭ８）、ＣＤ６６ｃ（ＣＥＡＣＡＭ６）、ＣＤ６６ｄ（ＣＥＡＣＡＭ３）、ＣＤ６６ｅ（ＣＥＡＣＡＭ５）、ＣＤ６９（ＣＬＥＣ２）、ＣＤ７９Ａ（Ｂ細胞抗原受容体複合体関連アルファ鎖）、ＣＤ７９Ｂ（Ｂ細胞抗原受容体複合体関連ベータ鎖）、ＣＤ８４（ＳＬＡＭＦ５）、ＣＤ９６（Ｔａｃｔｉｌｅ）、ＣＤ１００（ＳＥＭＡ４Ｄ）、ＣＤ１０３（ＩＴＧＡＥ）、ＣＤ１３４（０Ｘ４０）、ＣＤ１３７（４－１ＢＢ）、ＣＤ１５０（ＳＬＡＭＦ１）、ＣＤ１５８Ａ（ＫＩＲ２ＤＬ１）、ＣＤ１５８Ｂ１（ＫＩＲ２ＤＬ２）、ＣＤ１５８Ｂ２（ＫＩＲ２ＤＬ３）、ＣＤ１５８Ｃ（ＫＩＲ３ＤＰ１）、ＣＤ１５８Ｄ（ＫＩＲＤＬ４）、ＣＤ１５８Ｆ１（ＫＩＲ２ＤＬ５Ａ）、ＣＤ１５８Ｆ２（ＫＩＲ２ＤＬ５Ｂ）、ＣＤ１５８Ｋ（ＫＩＲ３ＤＬ２）、ＣＤ１６０（ＢＹ５５）、ＣＤ１６２（ＳＥＬＰＬＧ）、ＣＤ２２６（ＤＮＡＭ１）、ＣＤ２２９（ＳＬＡＭＦ３）、ＣＤ２４４（ＳＬＡＭＦ４）、ＣＤ２４７（ＣＤ３－ゼータ）、ＣＤ２５８（ＬＩＧＨＴ）、ＣＤ２６８（ＢＡＦＦＲ）、ＣＤ２７０（ＴＮＦＳＦ１４）、ＣＤ２７２（ＢＴＬＡ）、ＣＤ２７６（Ｂ７－Ｈ３）、ＣＤ２７９（ＰＤ－１）、ＣＤ３１４（ＮＫＧ２Ｄ）、ＣＤ３１９（ＳＬＡＭＦ７）、ＣＤ３３５（ＮＫ－ｐ４６）、ＣＤ３３６（ＮＫ－ｐ４４）、ＣＤ３３７（ＮＫ－ｐ３０）、ＣＤ３５２（ＳＬＡＭＦ６）、ＣＤ３５３（ＳＬＡＭＦ８）、ＣＤ３５５（ＣＲＴ ＡＭ）、ＣＤ３５７（ＴＮＦＲＳＦ１８）、誘導性Ｔ細胞共刺激因子（ＩＣＯＳ）、ＬＦＡ－１（ＣＤｌ １ａ／ＣＤ１８）、ＮＫＧ２Ｃ、ＤＡＰ－１０、ＩＣＡＭ－１、ＮＫｐ８０（ＫＬＲＦ１）、ＩＬ－２Ｒベータ、ＩＬ－２Ｒガンマ、ＩＬ－７Ｒアルファ、ＬＦＡ－１、ＳＬＡＭＦ９、ＬＡＴ、ＧＡＤＳ（ＧｒｐＬ）、ＳＬＰ－７６（ＬＣＰ２）、ＰＡＧ１／ＣＢＰ、ＣＤ８３リガンド、Ｆｃガンマ受容体、ＭＨＣクラス１分子、ＭＨＣクラス２分子、ＴＮＦ受容体タンパク質、免疫グロブリンタンパク質、サイトカイン受容体、インテグリン、活性化ＮＫ細胞受容体、トールリガンド受容体、及びその断片または組み合わせからであるまたはそれに由来する（例えば、その全てまたはその断片を含む）。ヒンジまたはスペーサードメインは、天然源または合成源のいずれかに由来し得る。

【０２４４】

いくつかの実施形態では、ヒンジまたはスペーサードメインは、抗原結合分子（例えば、ｓｃＦｖ）と膜貫通ドメインとの間に配置される。この配向では、ヒンジ／スペーサードメインは、抗原結合分子とＣＡＲが発現される細胞膜の表面との間に距離をもたらす。いくつかの実施形態では、ヒンジまたはスペーサードメインは、免疫グロブリンからであるまたはこれに由来する。いくつかの実施形態では、ヒンジまたはスペーサードメインは、ＩｇＧｌ、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＭまたはその断片のヒンジ／スペーサー領域から選択される。いくつかの実施形態では、ヒンジまたはスペーサードメインは、ＣＤ８アルファのヒンジ／スペーサー領域を含む、からである、またはこれに由来する。いくつかの実施形態では、ヒンジまたはスペーサードメインは、ＣＤ２８のヒンジ／スペーサー領域を含む、からである、またはこれに由来する。いくつかの実施形態では、ヒンジまたはスペーサードメインは、ＣＤ８アルファのヒンジ／スペーサー領域の断片またはＣＤ２８のヒンジ／スペーサー領域の断片を含み、断片は全ヒンジ／スペーサー領域よりも小さい任意のものである。いくつかの実施形態では、ＣＤ８アルファヒンジ／スペーサー領域の断片またはＣＤ２８ヒンジ／スペーサー領域の断片は、少なくとも１、少なくとも２、少なくとも３、少なくとも４、少なくとも５、少なくとも６、少なくとも７、少なくとも８、少なくとも９、少なくとも１０、少なくとも１１、少なくとも１２、少なくとも１３、少なくとも１４、少なくとも１５、少なくとも１６、少なくとも１７、少なくとも１８、少なくとも１９、または少なくとも２０個のアミノ酸

を、ＣＤ８アルファヒンジ／スペーサー領域またはＣＤ２８ヒンジ／スペーサー領域の、Ｎ末端もしくはＣ末端にてまたはその両方にて除外するアミノ酸配列を含む。

【０２４５】

ｉｉｉ．膜貫通ドメイン

本開示のＣＡＲは、膜貫通ドメイン及び／または細胞内シグナル伝達ドメインをさらに含み得る。膜貫通ドメインは、ＣＡＲの細胞外ドメインに融合するように設計され得る。同様に、ＣＡＲの細胞内ドメインに融合し得る。いくつかの実施形態では、ＣＡＲ内のドメインの１つに天然に関連する膜貫通ドメインが使用される。いくつかの例では、膜貫通ドメインは、受容体複合体の他のメンバーとの相互作用を最小限に抑えるために、同じまたは異なる表面膜タンパク質の膜貫通ドメインへのかかるドメインの結合を回避するように選択または（例えば、アミノ酸置換によって）修飾され得る。膜貫通ドメインは、天然源または合成源のいずれかに由来し得る。供給源が天然である場合、ドメインは、任意の膜結合タンパク質または膜貫通タンパク質に由来し得る。

【０２４６】

膜貫通領域は、受容体チロシンキナーゼ（例えば、ＥｒｂＢ２）、グリコホリンＡ（ＧｐＡ）、４－１ＢＢ／ＣＤ１３７、活性化ＮＫ細胞受容体、免疫グロブリンタンパク質、Ｂ７－Ｈ３、ＢＡＦＦＲ、ＢＦＡＭＥ（ＳＥＡＭＦ８）、ＢＴＥＡ、ＣＤ１００（ＳＥＭＡ４Ｄ）、ＣＤ１０３、ＣＤ１６０（ＢＹ５５）、ＣＤ１８、ＣＤ１９、ＣＤ１９ａ、ＣＤ２、ＣＤ２４７、ＣＤ２７、ＣＤ２７６（Ｂ７－Ｈ３）、ＣＤ２８、ＣＤ２９、ＣＤ３デルタ、ＣＤ３イプシロン、ＣＤ３ガンマ、ＣＤ３０、ＣＤ４、ＣＤ４０、ＣＤ４９ａ、ＣＤ４９Ｄ、ＣＤ４９ｆ、ＣＤ６９、ＣＤ７、ＣＤ８４、ＣＤ８アルファ、ＣＤ８ベータ、ＣＤ９６（Ｔａｃｔｉｌｅ）、ＣＤ１　ｌａ、ＣＤ１　ｌｂ、ＣＤ１　ｌｃ、ＣＤ１　ｌｄ、ＣＤＳ、ＣＥＡＣＡＭ１、ＣＲＴ　ＡＭ、サイトカイン受容体、ＤＡＰ－１０、ＤＮＡＭ１（ＣＤ２２６）、Ｆｃガンマ受容体、ＧＡＤＳ、ＧＩＴＲ、ＨＶＥＭ（ＥＩＧＨＴＲ）、ＩＡ４、ＩＣＡＭ－１、ＩＣＡＭ－１、Ｉｇアルファ（ＣＤ７９ａ）、ＩＥ－２Ｒベータ、ＩＥ－２Ｒガンマ、ＩＥ－７Ｒアルファ、誘導性Ｔ細胞共刺激因子（ＩＣＯＳ）、インテグリン、ＩＴＧＡ４、ＩＴＧＡ４、ＩＴＧＡ６、ＩＴ　ＧＡＤ、ＩＴＧＡＥ、ＩＴＧＡＥ、ＩＴ　ＧＡＭ、ＩＴＧＡＸ、ＩＴＧＢ２、ＩＴＧＢ７、ＩＴＧＢ１、ＫＩＲＤＳ２、ＥＡＴ、ＬＦＡ－１、ＬＦＡ－１、ＣＤ８３と特異的に結合するリガンド、ＬＩＧＨＴ、ＬＩＧＨＴ、ＬＴＢＲ、Ｌｙ９（ＣＤ２２９）、リンパ球機能関連抗原－１（ＬＦＡ－１；ＣＤｌ－１ａ／ＣＤ１８）、ＭＨＣクラス１分子、ＮＫＧ２Ｃ、ＮＫＧ２Ｄ、ＮＫｐ３０、ＮＫｐ４４、ＮＫｐ４６、ＮＫｐ８０（ＫＬＲＦ１）、ＯＸ－４０、ＰＡＧ／Ｃｂｐ、プログラム細胞死－１（ＰＤ－１）、ＰＳＧＬ１、ＳＥＬＰＬＧ（ＣＤ１６２）、シグナル伝達リンパ球活性化分子（ＳＬＡＭタンパク質）、ＳＬＡＭ（ＳＬＡＭＦ１；ＣＤ１５０；ＩＰＯ－３）、ＳＬＡＭＦ４（ＣＤ２４４；２Ｂ４）、ＳＬＡＭＦ６（ＮＴＢ－Ａ；Ｌｙｌ０８）、ＳＬＡＭＦ７、ＳＬＰ－７６、ＴＮＦ受容体タンパク質、ＴＮＦＲ２、ＴＮＦＳＦ１４、トールリガンド受容体、ＴＲＡＮＣＥ／ＲＡＮＫＬ、ＶＬＡ１、もしくはＶＬＡ－６、またはそのフラグメント、トランケーション、もしくは組み合わせに由来し（すなわち、含み）得る。

【０２４７】

いくつかの実施形態では、好適な細胞内シグナル伝達ドメインには、活性化マクロファージ／骨髄細胞受容体ＣＳＦＲ１、ＭＹＤ８８、ＣＤ１４、ＴＩＥ２、ＴＬＲ４、ＣＲ３、ＣＤ６４、ＴＲＥＭ２、ＤＡＰ１０、ＤＡＰ１２、ＣＤ１６９、ＤＥＣＴＩＮ１、ＣＤ２０６、ＣＤ４７、ＣＤ１６３、ＣＤ３６、ＭＡＲＣＯ、ＴＩＭ４、ＭＥＲＴＫ、Ｆ４／８０、ＣＤ９１、Ｃ１ＱＲ、ＬＯＸ－１、ＣＤ６８、ＳＲＡ、ＢＡＩ－１、ＡＢＣＡ７、ＣＤ３６、ＣＤ３１、ラクトフェリン、またはその断片、トランケーション、もしくは組み合わせが含まれるがこれらに限定されない。

【０２４８】

いくつかの実施形態では、受容体チロシンキナーゼは、インスリン受容体（ＩｎｓＲ）、インスリン様成長因子Ｉ受容体（ＩＧＦ１Ｒ）、インスリン受容体関連受容体（ＩＲＲ

）、血小板由来成長因子受容体アルファ（ＰＤＧＦＲａ）、血小板由来成長因子受容体ベータ（ＰＤＧＦＲｆｉ）、ＫＩＴ癌原遺伝子受容体チロシンキナーゼ（Ｋｉｔ）、コロニー刺激因子１受容体（ＣＳＦＲ）、ｆｍｓ関連チロシンキナーゼ３（ＦＬＴ３）、ｆｍｓ関連チロシンキナーゼ１（ＶＥＧＦＲ－１）、キナーゼ挿入ドメイン受容体（ＶＥＧＦＲ－２）、ｆｍｓ関連チロシンキナーゼ４（ＶＥＧＦＲ－３）、線維芽細胞成長因子受容体１（ＦＧＦＲ１）、線維芽細胞成長因子受容体２（ＦＧＦＲ２）、線維芽細胞成長因子受容体３（ＦＧＦＲ３）、線維芽細胞成長因子受容体４（ＦＧＦＲ４）、タンパク質チロシンキナーゼ７（ＣＣＫ４）、神経栄養受容体チロシンキナーゼ１（ｔｒｋＡ）、神経栄養受容体チロシンキナーゼ２（ｔｒｋＢ）、神経栄養受容体チロシンキナーゼ３（ｔｒｋＣ）、受容体チロシンキナーゼ様オーファン受容体１（ＲＯＲ１）、受容体チロシンキナーゼ様オーファン受容体２（ＲＯＲ２）、筋肉関連受容体チロシンキナーゼ（ＭｕＳＫ）、ＭＥＴ癌原遺伝子、受容体チロシンキナーゼ（ＭＥＴ）、マクロファージ刺激１受容体（Ｒｏｎ）、ＡＸＬ受容体チロシンキナーゼ（Ａｘｌ）、ＴＹＲ０３タンパク質チロシンキナーゼ（Ｔｙｒｏ３）、ＭＥＲ癌原遺伝子、チロシンキナーゼ（Ｍｅｒ）、免疫グロブリン様及びＥＧＦ様ドメイン１を伴うチロシンキナーゼ（ＴＩＥ１）、ＴＥＫ受容体チロシンキナーゼ（ＴＩＥ２）、ＥＰＨ受容体Ａ１（ＥｐｈＡｌ）、ＥＰＨ受容体Ａ２（ＥｐｈＡ２）、（ＥＰＨ受容体Ａ３）ＥｐｈＡ３、ＥＰＨ受容体Ａ４（ＥｐｈＡ４）、ＥＰＨ受容体Ａ５（ＥｐｈＡ５）、ＥＰＨ受容体Ａ６（ＥｐｈＡ６）、ＥＰＨ受容体Ａ７（ＥｐｈＡ７）、ＥＰＨ受容体Ａ８（ＥｐｈＡ８）、ＥＰＨ受容体Ａ１０（ＥｐｈＡｌ０）、ＥＰＨ受容体Ｂ１（ＥｐｈＢｌ）、ＥＰＨ受容体Ｂ２（ＥｐｈＢ２）、ＥＰＨ受容体Ｂ３（ＥｐｈＢ３）、ＥＰＨ受容体Ｂ４（ＥｐｈＢ４）、ＥＰＨ受容体Ｂ６（ＥｐｈＢ６）、ｒｅｔプロト腫瘍遺伝子（Ｒｅｔ）、受容体様チロシンキナーゼ（ＲＹＫ）、ディスコイジンドメイン受容体チロシンキナーゼ１（ＤＤＲ１）、ディスコイジンドメイン受容体チロシンキナーゼ２（ＤＤＲ２）、ｃ－ｒｏｓ癌遺伝子１、受容体チロシンキナーゼ（ＲＯＳ）、アポトーシス関連チロシンキナーゼ（Ｌｍｒｌ）、レムールチロシンキナーゼ２（Ｌｍｒ２）、レムールチロシンキナーゼ３（Ｌｍｒ３）、白血球受容体チロシンキナーゼ（ＬＴＫ）、ＡＬＫ受容体チロシンキナーゼ（ＡＬＫ）、またはセリン／スレオニン／チロシンキナーゼ１（ＳＴＹＫ１）に由来し（例えば、含み）得る。

【０２４９】

ｉｖ．共刺激ドメイン

特定の実施形態では、ＣＡＲは、共刺激ドメインを含む。いくつかの実施形態では、共刺激ドメインには、４－１ＢＢ（ＣＤ１３７）、ＣＤ２８、もしくはその両方、及び／または細胞内Ｔ細胞シグナル伝達ドメインが含まれる。好ましい実施形態では、共刺激ドメインは、ヒトＣＤ２８、ヒト４－１ＢＢ、またはその両方であり、細胞内Ｔ細胞シグナル伝達ドメインは、ヒトＣＤ３ゼータ（ζ）である。４－１ＢＢ、ＣＤ２８、ＣＤ３ゼータは、それぞれ４－１ＢＢ、ＣＤ２８、またはＣＤ３ゼータ全体よりも少なく含まれ得る。キメラ抗原受容体は、それらの効力を増加させるために共刺激（シグナル伝達）ドメインを組み込み得る。米国特許第７，７４１，４６５号、及び同第６，３１９，４９４号、ならびにＫｒａｕｓｅ ｅｔ ａｌ．ａｎｄ Ｆｉｎｎｅｙ ｅｔ ａｌ．（上述），Ｓｏｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ １１９：６９６－７０６（２０１２）；Ｋａｌｏｓ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉ Ｔｒａｎｓｌ．Ｍｅｄ．３：９５（２０１１）；Ｐｏｒｔｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｎ．Ｅｎｇｌ．Ｊ．Ｍｅｄ．３６５：７２５－３３（２０１１）、及びＧｒｏｓｓ ｅｔ ａｌ．，Ａｍｕｒ．Ｒｅｖ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｔｏｘｉｃｏｌ．５６：５９－８３（２０１６）を参照されたい。

【０２５０】

いくつかの実施形態では、共刺激ドメインは、配列番号３１６２または３１６４のアミノ酸配列を含む。

【０２５１】

ｖ．細胞内シグナル伝達ドメイン

本明細書に開示する操作されたＴ細胞の細胞内（シグナル伝達）ドメインは、活性化ド

メインへのシグナル伝達を提供し得、これは次に免疫細胞の正常なエフェクター機能の少なくとも１つを活性化する。例えば、Ｔ細胞のエフェクター機能は、細胞溶解活性またはヘルパー活性、例えばサイトカインの分泌であり得る。

【０２５２】

いくつかの実施形態では、好適な細胞内シグナル伝達ドメインは、４－１ＢＢ／ＣＤ１３７、活性化ＮＫ細胞受容体、免疫グロブリンタンパク質、Ｂ７－Ｈ３、ＢＡＦＦＲ、ＢＬＡＭＥ（ＳＬＡＭＦ８）、ＢＴＬＡ、ＣＤ１００（ＳＥＭＡ４Ｄ）、ＣＤ１０３、ＣＤ１６０（ＢＹ５５）、ＣＤ１８、ＣＤ１９、ＣＤ　１９ａ、ＣＤ２、ＣＤ２４７、ＣＤ２７、ＣＤ２７６（Ｂ７－Ｈ３）、ＣＤ２８、ＣＤ２９、ＣＤ３デルタ、ＣＤ３イプシロン、ＣＤ３ガンマ、ＣＤ３０、ＣＤ４、ＣＤ４０、ＣＤ４９ａ、ＣＤ４９Ｄ、ＣＤ４９ｆ、ＣＤ６９、ＣＤ７、ＣＤ８４、ＣＤ８ａｌｐｈａ、ＣＤ８ｂｅｔａ、ＣＤ９６（タクタイル）、ＣＤ１　ｌａ、ＣＤ１　ｌｂ、ＣＤ１　ｌｃ、ＣＤ１　１ｄ、ＣＤＳ、ＣＥＡＣＡＭ１、ＣＲＴ　ＡＭ、サイトカイン受容体、ＤＡＰ－１０、ＤＮＡＭ１（ＣＤ２２６）、Ｆｃガンマ受容体、ＧＡＤＳ、ＧＩＴＲ、ＨＶＥＭ（ＬＩＧＨＴＲ）、ＩＡ４、ＩＣＡＭ－１、Ｉｇアルファ（ＣＤ７９ａ）、ＩＬ－２Ｒベータ、ＩＬ－２Ｒガンマ、ＩＬ－７Ｒアルファ、誘導性Ｔ細胞共刺激因子（ＩＣＯＳ）、インテグリン、ＩＴＧＡ４、ＩＴＧＡ６、ＩＴＧＡＤ、ＩＴＧＡＥ、ＩＴＧＡＬ、ＩＴＧＡＭ、ＩＴＧＡＸ、ＩＴＧＢ２、ＩＴＧＢ７、ＩＴＧＢ１、ＫＩＲＤＳ２、ＬＡＴ、ＬＦＡ－１、ＣＤ８３と特異的に結合するリガンド、ＬＩＧＨＴ、ＬＴＢＲ、Ｌｙ９（ＣＤ２２９）、Ｌｙｌ０８、リンパ球機能関連抗原－１（ＬＦＡ－１；ＣＤｌ－ｌａ／ＣＤ１８）、ＭＨＣクラス１分子、ＮＫＧ２Ｃ、ＮＫＧ２Ｄ、ＮＫｐ３０、ＮＫｐ４４、ＮＫｐ４６、ＮＫｐ８０（ＫＬＲＦ１）、ＯＸ－４０、ＰＡＧ／Ｃｂｐ、プログラム死－１（ＰＤ－１）、ＰＳＧＬ１、ＳＥＬＰＬＧ（ＣＤ１６２）、シグナル伝達リンパ球性活性化分子（ＳＬＡＭタンパク質）、ＳＬＡＭ（ＳＬＡＭＦ１；ＣＤ１５０；ＩＰＯ－３）、ＳＬＡＭＦ４（ＣＤ２４４；２Ｂ４）、ＳＬＡＭＦ６（ＮＴＢ－Ａ）、ＳＬＡＭＦ７、ＳＬＰ－７６、ＴＮＦ受容体タンパク質、ＴＮＦＲ２、ＴＮＦＳＦ１４、トールリガンド受容体、ＴＲＡＮＣＥ／ＲＡＮＫＬ、ＶＬＡ１、またはＶＬＡ－６、またはその断片、トランケーション、もしくは組み合わせが含まれる（ｉｎｃｌｕｄｅ）（例えば、含まれる（ｃｏｍｐｒｉｓｅ））が、これに限定されない。

【０２５３】

ＣＤ３は、ネイティブＴ細胞上のＴ細胞受容体の要素であり、ＣＡＲにおいて重要な細胞内活性化要素であることが示されている。いくつかの実施形態では、ＣＤ３は、ＣＤ３ゼータである。いくつかの実施形態では、活性化ドメインは、配列番号３１６３のポリペプチド配列に対して、少なくとも約６０％、少なくとも約６５％、少なくとも約７０％、少なくとも約７５％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、少なくとも約９９％、または約１００％同一であるアミノ酸配列を含む。

【０２５４】

ｂ．Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）

いくつかの実施形態では、提供される環状ＲＮＡポリヌクレオチドは、Ｔ細胞受容体をコードする。ＴＣＲは、国際免疫遺伝学（Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ　Ｉｍｍｕｎｏｇｅｎｅｔｉｃｓ；ＩＭＧＴ）ＴＣＲ命名法、及びＴＣＲ配列のＩＭＧＴ公共データベースへのリンクを使用して表される。ネイティブアルファ－ベータヘテロ二量体ＴＣＲは、アルファ鎖及びベータ鎖を有する。概して、各鎖は、可変、結合及び定常領域を含み得、ベータ鎖はまた通常、可変領域と結合領域との間に短い多様性領域を含有するが、この多様性領域はしばしば、結合領域の一部とみなされる。各可変領域は、フレームワーク配列に埋め込まれた３つのＣＤＲ（相補性決定領域）を含み得、１つはＣＤＲ３と名づけられた超可変領域である。それらのフレームワーク、ＣＤＲ１及びＣＤＲ２配列によって、及び部分的に定義されるＣＤＲ３配列によって区別されるいくつかのタイプのアルファ鎖可変（Ｖα）領域及びいくつかのタイプのベータ鎖可変（Ｖβ）領域が存在する。Ｖαタイプ

は、ＩＭＧＴ命名法で独自のＴＲＡＶ番号によって称される。ゆえに、「ＴＲＡＶ２１」は、独自のフレームワークならびにＣＤＲ１及びＣＤＲ２配列と、ＴＣＲ間で保存されたアミノ酸配列によって部分的に定義されるがＴＣＲ間で変動するアミノ酸配列も含むＣＤＲ３配列とを有するＴＣＲ　Ｖα領域を定義する。同じように、「ＴＲＢＶ５－１」は、独自のフレームワークならびにＣＤＲ１及びＣＤＲ２配列を有するが、部分的にのみ定義されたＣＤＲ３配列を有するＴＣＲ　Ｖβ領域を定義する。

【０２５５】

ＴＣＲの結合領域は、同様に、独自のＩＭＧＴ　ＴＲＡＪ及びＴＲＢＪ命名法によって定義され、定常領域は、ＩＭＧＴ　ＴＲＡＣ及びＴＲＢＣ命名法によって定義される。

【０２５６】

ベータ鎖多様性領域は、ＩＭＧＴ命名法では、略語ＴＲＢＤと称され、述べたように、連結したＴＲＢＤ／ＴＲＢＪ領域はしばしば、一緒に結合領域とみなされる。

【０２５７】

ＩＭＧＴ命名法によって定義される独自の配列は広く知られており、ＴＣＲの分野で働く人々にとってアクセス可能である。例えば、それらは、ＩＭＧＴ公共データベースで見ることができる。“Ｔ　ｃｅｌｌ　Ｒｅｃｅｐｔｏｒ　Ｆａｃｔｓｂｏｏｋ”，（２００１）ＬｅＦｒａｎｃ　ａｎｄ　ＬｅＦｒａｎｃ，Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓ，ＩＳＢＮ　０－１２－４４１３５２－８もまた、ＩＭＧＴ命名法によって定義された配列を開示しているが、その公開日及び結果として生じるタイムラグのため、その中の情報は、ＩＭＧＴデータベースへの参照によって確認する必要がある。

【０２５８】

ネイティブＴＣＲは、ヘテロ二量体αβまたはγδ形態で存在する。しかしながら、ααまたはββホモ二量体からなる組換えＴＣＲは、ペプチドＭＨＣ分子に結合することが以前に示されている。そのため、本発明のＴＣＲは、ヘテロ二量体αβＴＣＲであり得、またはααもしくはββホモ二量体ＴＣＲであり得る。

【０２５９】

養子療法において使用するため、αβヘテロ二量体ＴＣＲは、例えば、細胞質及び膜貫通ドメインの両方を有する全長鎖としてトランスフェクトされ得る。特定の実施形態では、本発明のＴＣＲは、例えば、ＷＯ２００６／０００８３０に記載されているように、それぞれの定常ドメインの残基間に導入されたジスルフィド結合を有し得る。

【０２６０】

本発明のＴＣＲ、特にアルファ－ベータヘテロ二量体ＴＣＲは、アルファ鎖ＴＲＡＣ定常ドメイン配列及び／またはベータ鎖ＴＲＢＣ１またはＴＲＢＣ２定常ドメイン配列を含み得る。アルファ及びベータ鎖定常ドメイン配列は、ＴＲＡＣのエクソン２のＣｙｓ４とＴＲＢＣ１またはＴＲＢＣ２のエクソン２のＣｙｓ２との間のネイティブジスルフィド結合を欠失させるための切断または置換によって修飾され得る。アルファ及び／またはベータ鎖定常ドメイン配列（複数可）はまた、ＴＲＡＣのＴｈｒ　４８及びＴＲＢＣ１またはＴＲＢＣ２のＳｅｒ５７のシステイン残基での置換によって修飾され得、当該システインは、ＴＣＲのアルファとベータ定常ドメインとの間のジスルフィド結合を形成する。

【０２６１】

結合親和性（平衡定数$K_D$に対して反比例する）及び結合半減期（Ｔ１／２として表される）は、任意の適切な方法によって決定され得る。ＴＣＲの親和性を２倍にすると、$K_D$が半分になることが理解される。Ｔ１／２は、ｌｎ２をオフ率（ｋｏｆｆ）で除算したものとして計算される。そのため、Ｔ１／２を２倍にすると、ｋｏｆｆが半分になる。ＴＣＲについての$K_D$及びｋｏｆｆ値は通常、ＴＣＲの可溶性形態、すなわち、細胞質及び膜貫通ドメイン残基を除去するように切断されたそれらの形態について測定される。そのため、所与のＴＣＲは、そのＴＣＲの可溶性形態が当該特徴を有する場合、親ＴＣＲについて改善した結合親和性、及び／または結合半減期を有することを理解されたい。好ましくは所与のＴＣＲの結合親和性または結合半減期は、同じアッセイプロトコルを使用して数回、例えば、３回またはそれ以上測定され、結果の平均が取得される。

【０２６２】
本発明のＴＣＲは、養子療法における実用性を有するので、本発明は、本発明のＴＣＲを提示する、天然に存在しない及び／または精製された及び／または操作された細胞、特にＴ細胞を含む。本発明のＴＣＲをコードする核酸（ＤＮＡ、ｃＤＮＡまたはＲＮＡなど）でのＴ細胞のトランスフェクションに好適な多数の方法が存在する（例えば、Ｒｏｂｂｉｎｓ ｅｔ ａｌ．，（２００８）Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ．１８０：６１１６－６１３１を参照されたい）。本発明のＴＣＲを発現するＴ細胞は、がん（膵臓及び肝臓のものなど）の養子療法ベースの処置において使用するのに好適である。当業者に知られているように、養子療法が行われ得る多数の好適な方法が存在する（例えば、Ｒｏｓｅｎｂｅｒｇ ｅｔ ａｌ．，（２００８）Ｎａｔ Ｒｅｖ Ｃａｎｃｅｒ ８（４）：２９９－３０８を参照されたい）。

【０２６３】
当該技術分野でよく知られているように、本発明のＴＣＲは、トランスフェクトされた細胞によって発現する場合、翻訳後修飾に供され得る。グリコシル化は、ＴＣＲ鎖における定義されたアミノ酸に対するオリゴ糖部位の共有結合を含み得る、１つのかかる修飾である。例えば、アスパラギン残基、またはセリン／スレオニン残基は、オリゴ糖結合のためのよく知られた位置である。特定のタンパク質のグリコシル化状態は、所定の酵素のタンパク質配列、タンパク質コンフォメーション及び利用可能性を含む多数の要因に依存する。さらに、グリコシル化状態（すなわち、オリゴ糖タイプ、共有結合及び結合の総数）は、タンパク質機能に影響を及ぼし得る。そのため、組換えタンパク質を産生する場合、グリコシル化を制御することがしばしば望ましい。トランスフェクトされたＴＣＲのグリコシル化は、トランスフェクトされた遺伝子の変異によって制御され得る（Ｋｕｂａｌｌ Ｊ ｅｔ ａｌ．（２００９），Ｊ Ｅｘｐ Ｍｅｄ ２０６（２）：４６３－４７５）。かかる変異も本発明に包含される。

【０２６４】
ＴＣＲは、ＭＡＧＥ－Ａ１、ＭＡＧＥ－Ａ２、ＭＡＧＥ－Ａ３、ＭＡＧＥ－Ａ４、ＭＡＧＥ－Ａ５、ＭＡＧＥ－Ａ６、ＭＡＧＥ－Ａ７、ＭＡＧＥ－Ａ８、ＭＡＧＥ－Ａ９、ＭＡＧＥ－Ａ１０、ＭＡＧＥ－Ａ１１、ＭＡＧＥ－Ａ１２、ＭＡＧＥ－Ａ１３、ＧＡＧＥ－１、ＧＡＧＥ－２、ＧＡＧＥ－３、ＧＡＧＥ－４、ＧＡＧＥ－５、ＧＡＧＥ－６、ＧＡＧＥ－７、ＧＡＧＥ－８、ＢＡＧＥ－１、ＲＡＧＥ－１、ＬＢ３３／ＭＵＭ－１、ＰＲＡＭＥ、ＮＡＧ、ＭＡＧＥ－Ｘｐ２（ＭＡＧＥ－Ｂ２）、ＭＡＧＥ－Ｘｐ３（ＭＡＧＥ－Ｂ３）、ＭＡＧＥ－Ｘｐ４（ＡＧＥ－Ｂ４）、チロシナーゼ、脳グリコーゲンホスホリラーゼ、Ｍｅｌａｎ－Ａ、ＭＡＧＥ－Ｃ１、ＭＡＧＥ－Ｃ２、ＮＹ－ＥＳＯ－１、ＬＡＧＥ－１、ＳＳＸ－１、ＳＳＸ－２（ＨＯＭ－ＭＥＬ－４０）、ＳＳＸ－１、ＳＳＸ－４、ＳＳＸ－５、ＳＣＰ－１、ＣＴ－７、アルファ－アクチニン－４、Ｂｃｒ－Ａｂｌ融合タンパク質、Ｃａｓｐ－８、ベーターカテニン、ｃｄｃ２７、ｃｄｋ４、ｃｄｋｎ２ａ、ｃｏａ－１、ｄｅｋ－ｃａｎ融合タンパク質、ＥＦ２、ＥＴＶ６－ＡＭＬ１融合タンパク質、ＬＤＬＲ－フコシルトランスフェラーゼＡＳ融合タンパク質、ＨＬＡ－Ａ２、ＨＬＡ－Ａ１１、ｈｓｐ７０－２、ＫＩＡＡＯ２０５、Ｍａｒｔ２、Ｍｕｍ－２、及び３、ｎｅｏ－ＰＡＰ、ミオシンクラスＩ、ＯＳ－９、ｐｍｌ－ＲＡＲａ融合タンパク質、ＰＴＰＲＫ、Ｋ－ｒａｓ、Ｎ－ｒａｓ、トリオースホスフェートイソメラス、ＧｎＴＶ、Ｈｅｒｖ－Ｋ－ｍｅｌ、Ｌａｇｅ－１、Ｍａｇｅ－Ｃ２、ＮＡ－８８、Ｌａｇｅ－２、ＳＰ１７、及びＴＲＰ２－Ｉｎｔ２、（ＭＡＲＴ－Ｉ）、ｇｐ１００（Ｐｍｅｌ１７）、ＴＲＰ－１、ＴＲＰ－２、ＭＡＧＥ－１、ＭＡＧＥ－３、ｐ１５（５８）、ＣＥＡ、ＮＹ－ＥＳＯ（ＬＡＧＥ）、ＳＣＰ－１、Ｈｏｍ／Ｍｅｌ－４０、ｐ５３、Ｈ－Ｒａｓ、ＨＥＲ－２／ｎｅｕ、ＢＣＲ－ＡＢＬ、Ｅ２Ａ－ＰＲＬ、Ｈ４－ＲＥＴ、ＩＧＨ－ＩＧＫ、ＭＹＬ－ＲＡＲ、エプスタインバーウイルス抗原、ＥＢＮＡ、ヒトパピローマウイルス（ＨＰＶ）抗原Ｅ６及びＥ７、ＴＳＰ－１８０、ＭＡＧＥ－４、ＭＡＧＥ－５、ＭＡＧＥ－６、ｐ１８５ｅｒｂＢ２、ｐ１８０ｅｒｂＢ－３、ｃ－ｍｅｔ、ｎｍ－２３Ｈ１、ＰＳＡ、ＴＡＧ－７２－４、ＣＡ１９－９、ＣＡ７２－４、ＣＡＭ１７．１、ＮｕＭａ、Ｋ－ｒａｓ，．ベータ．－カテ

ニン、ＣＤＫ４、Ｍｕｍ－１、ｐ１６、ＴＡＧＥ、ＰＳＭＡ、ＰＳＣＡ、ＣＴ７、テロメラーゼ、４３－９Ｆ、５Ｔ４、７９１Ｔｇｐ７２、α－フェトプロテイン、１３ＨＣＧ、ＢＣＡ２２５、ＢＴＡＡ、ＣＡ１２５、ＣＡ１５－３（ＣＡ２７．２９＼ＢＣＡＡ）、ＣＡ１９５、ＣＡ２４２、ＣＡ－５０、ＣＡＭ４３、ＣＤ６８＼ＫＰ１、ＣＯ－０２９、ＦＧＦ－５、Ｇ２５０、Ｇａ７３３（ＥｐＣＡＭ）、ＨＴｇｐ－１７５、Ｍ３４４、ＭＡ－５０、ＭＧ７－Ａｇ、ＭＯＶ１８、ＮＢ＼１７０Ｋ、ＮＹ－ＣＯ－１、ＲＣＡＳ１、ＳＤＣＣＡＧ１６、ＴＡ－９０（Ｍａｃ－２結合タンパク質＼シクロフィリンＣ関連タンパク質）、ＴＡＡＬ６、ＴＡＧ７２、ＴＬＰ、及びＴＰＳの群における抗原に特異的であり得る。

【０２６５】

ｃ．Ｂ細胞受容体（ＢＣＲ）

いくつかの実施形態では、提供される環状ＲＮＡポリヌクレオチドは、１つ以上のＢ細胞受容体（ＢＣＲ）をコードする。ＢＣＲ（またはＢ細胞抗原受容体）は、Ｂ細胞の表面にＩ型膜貫通タンパク質を形成する免疫グロブリン分子である。ＢＣＲは、特定の抗原の認識後に活性化シグナルをＢ細胞に伝達することができる。Ｂ細胞が抗原と結合する前に、ＢＣＲは、非刺激または「休止」段階に留まる。ＢＣＲとの抗原の結合は、体液性免疫応答を開始するシグナル伝達をもたらす。

【０２６６】

ＢＣＲは、成熟Ｂ細胞によって発現される。これらのＢ細胞は、病原体の認識及びタグ付けにおいて免疫グロブリン（Ｉｇ）と共に作用する。典型的なＢＣＲは、膜結合免疫グロブリン（例えば、ｍＩｇＡ、ｍＩｇＤ、ｍＩｇＥ、ｍＩｇＧ、及びｍＩｇＭ）、ならびに関連する及びＩｇα／Ｉｇβ（ＣＤ７９ａ／ＣＤ７９ｂ）ヘテロ二量体（α／β）を含む。これらの膜結合免疫グロブリンは、２つの同一の重鎖及び２つの軽鎖からなる四量体である。ＢＣＲ内では、膜結合免疫グロブリンは、Ｂ細胞活性化及びその結果としてのクローン拡大及び特異的抗体産生をもたらす形質膜を介したシグナル伝達によって抗原結合に応答することができる（Ｆｒｉｅｓｓ Ｍ ｅｔ ａｌ．（２０１８），Ｆｒｏｎｔ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２９４７（９））。Ｉｇα／Ｉｇβ ヘテロ二量体は、細胞内部へシグナル伝達することに関与する。

【０２６７】

Ｉｇα／Ｉｇβヘテロ二量体のシグナル伝達は、ヘテロ二量体の細胞質尾部の各々に位置する免疫受容体チロシンベースの活性化モチーフ（ＩＴＡＭ）の存在に依存する。ＩＴＡＭは、９～１２個のアミノ酸（例えば、チロシン、ロイシン、及び／またはバリン）によって分離された２つのチロシン残基を含む。抗原の結合時に、ＢＣＲのＩＴＡＭのチロシンは、ＳｒｃファミリーチロシンキナーゼＢｌｋ、Ｆｙｎ、またはＬｙｎによってリン酸化される（Ｊａｎｅｗａｙ Ｃ ｅｔ ａｌ．，Ｉｍｍｕｎｏｂｉｏｌｏｇｙ：Ｔｈｅ Ｉｍｍｕｎｅ Ｓｙｓｔｅｍ ｉｎ Ｈｅａｌｔｈ ａｎｄ Ｄｉｓｅａｓｅ（Ｇａｒｌａｎｄ Ｓｃｉｅｎｃｅ，５ｔｈ ｅｄ．２００１））。

【０２６８】

ｄ．他のキメラタンパク質

上記で提供されるキメラタンパク質に加えて、環状ＲＮＡポリヌクレオチドは、当該技術分野で利用可能な様々な数の他のキメラタンパク質をコードし得る。キメラタンパク質は、組換え融合タンパク質、キメラ変異タンパク質、または他の融合タンパク質を含み得る。

【０２６９】

Ｂ．免疫調節リガンド

いくつかの実施形態では、環状ＲＮＡポリヌクレオチドは、免疫調節性リガンドをコードする。特定の実施形態では、免疫調節リガンドは、免疫刺激性であり得るが、他の実施形態では、免疫調節リガンドは、免疫抑制性であり得る。

【０２７０】

ａ．サイトカイン：インターフェロン、ケモカイン、インターロイキン、成長因子など

いくつかの実施形態では、環状ＲＮＡポリヌクレオチドは、サイトカインをコードする。いくつかの実施形態では、サイトカインは、ケモカイン、インターフェロン、インターロイキン、リンホカイン、及び腫瘍壊死因子を含む。ケモカインは、急性及び慢性炎症において様々な種類の細胞によって産生され、白血球を動員して活性化する走化性サイトカインである。インターフェロンは、ＴＬＲの刺激を介して特定の細胞外分子に応答して誘導される分泌型αヘリカルサイトカインのファミリーを含む（Ｂｏｒｄｅｎ，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂａｓｉｓ ｏｆ Ｃａｎｃｅｒ（Ｆｏｕｒｔｈ Ｅｄｉｔｉｏｎ）２０１５）。インターロイキンは、白血球によって発現されるサイトカインである。

【０２７１】

ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２７β、ＩＦＮγ、及び／またはＴＧＦβ１の説明及び／またはアミノ酸配列は、本明細書及びｗｗｗ．ｕｎｉｐｒｏｔ．ｏｒｇデータベースにおいてアクセッション番号：Ｐ６０５６８（ＩＬ－２）、Ｐ２９４５９（ＩＬ－１２Ａ）、Ｐ２９４６０（ＩＬ－１２Ｂ）、Ｐ１３２３２（ＩＬ－７）、Ｐ２２３０１（ＩＬ－１０）、Ｐ４０９３３（ＩＬ－１５）、Ｑ１４１１６（ＩＬ－１８）、Ｑ１４２１３（ＩＬ－２７β）、Ｐ０１５７９（ＩＦＮγ）、及び／またはＰ０１１３７（ＴＧＦβ１）で提供される。

【０２７２】

Ｃ．転写因子

制御性Ｔ細胞（Ｔｒｅｇ）は、ホメオスタシスの維持、炎症反応の程度及び継続期間の制御、及び自己免疫性及びアレルギー性反応の防止において重要である。

【０２７３】

通常、Ｔｒｅｇは、主に免疫反応の抑制に関与し、過剰な反応を防ぐための免疫系の「セルフチェック」として部分的に機能すると考えられている。特に、Ｔｒｅｇは、自己抗原、花粉または食品などの無害な物質に対する許容性を維持し、自己免疫疾患を阻止するのに関与する。

【０２７４】

Ｔｒｅｇは、限定されないが、腸、皮膚、肺、及び肝臓を含めて、全身にわたって見られる。また、Ｔｒｅｇ細胞はまた、脾臓、リンパ節、及びさらに脂肪組織などの、外部環境に直接的に曝露されない身体の所定のコンパートメントに見られ得る。これらのＴｒｅｇ細胞集団の各々は、１つ以上の独自の特徴を有することが知られ、または疑われ、追加の情報は、Ｌｅｈｔｉｍａｋｉ ａｎｄ Ｌａｈｅｓｍａａ，Ｒｅｇｕｌａｔｏｒｙ Ｔ ｃｅｌｌｓ ｃｏｎｔｒｏｌ ｉｍｍｕｎｅ ｒｅｓｐｏｎｓｅｓ ｔｈｒｏｕｇｈ ｔｈｅｉｒ ｎｏｎ－ｒｅｄｕｎｄａｎｔ ｔｉｓｓｕｅ ｓｐｅｃｉｆｉｃ ｆｅａｔｕｒｅｓ，２０１３，ＦＲＯＮＴＩＥＲＳ ＩＮ ＩＭＭＵＮＯＬ．，４（２９４）：１－１０で見ることができ、その開示は、その全体が本明細書に組み込まれる。

【０２７５】

典型的には、Ｔｒｅｇは、適切な活性化及び発達のためにＴＧＦ－β及びＩＬ－２を必要とすることが知られている。豊富な量のＩＬ－２受容体（ＩＬ－２Ｒ）を発現するＴｒｅｇは、活性化Ｔ細胞によって産生されるＩＬ－２に依存する。Ｔｒｅｇは、ＩＬ－１０及びＴＧＦ－β（いずれも強力な免疫抑制サイトカインである）の両方を産生することが知られている。また、Ｔｒｅｇは、抗原提示細胞（ＡＰＣ）がＴ細胞を刺激する能力を阻害することが知られている。ＡＰＣ阻害のための１提案されたメカニズムは、Ｆｏｘｐ３＋Ｔｒｅｇによって発現するＣＴＬＡ－４を介するものである。ＣＴＬＡ－４は、ＡＰＣ上のＢ７分子と結合し、これらの分子をブロックし、または内在化を引き起こすことによってそれらを除去することで、Ｂ７の利用可能性を低下させ、免疫反応のための適切な共刺激を提供することができなくなると考えられている。Ｔｒｅｇの起源、分化及び機能に関する追加の論述は、Ｄｈａｍｎｅ ｅｔ ａｌ．，Ｐｅｒｉｐｈｅｒａｌ ａｎｄ ｔｈｙｍｉｃ Ｆｏｘｐ３＋ ｒｅｇｕｌａｔｏｒｙ Ｔ ｃｅｌｌｓ ｉｎ ｓｅａｒｃｈ ｏｆ ｏｒｉｇｉｎ，ｄｉｓｔｉｎｃｔｉｏｎ，ａｎｄ ｆｕｎｃｔｉｏｎ，２０１３，Ｆｒｏｎｔｉｅｒｓ ｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌ．，４（２５３）：１－１１で見ることがで

きる。
【０２７６】
Ｄ．チェックポイント阻害剤及びアゴニスト
本明細書に提供するように、特定の実施形態では、環状ＲＮＡのコード要素は、１つ以上のチェックポイント阻害剤またはアゴニストをコードする。
【０２７７】
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、プログラム死リガンド１（ＰＤ－Ｌ１、Ｂ７－Ｈ１、ＣＤ２７４としても知られる）、プログラム死１（ＰＤ－１）、ＣＴＬＡ－４、ＰＤ－Ｌ２（Ｂ７－ＤＣ、ＣＤ２７３）、ＬＡＧ３、ＴＩＭ３、２Ｂ４、Ａ２ａＲ、Ｂ７Ｈ１、Ｂ７Ｈ３、Ｂ７Ｈ４、ＢＴＬＡ、ＣＤ２、ＣＤ２７、ＣＤ２８、ＣＤ３０、ＣＤ４０、ＣＤ７０、ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＣＤ１３７、ＣＤ１６０、ＣＤ２２６、ＣＤ２７６、ＤＲ３、ＧＡＬ９、ＧＩＴＲ、ＨＡＶＣＲ２、ＨＶＥＭ、ＩＤＯ１、ＩＤＯ２、ＩＣＯＳ（誘導性Ｔ細胞共刺激因子）、ＫＩＲ、ＬＡＩＲ１、ＬＩＧＨＴ、ＭＡＲＣＯ（コラーゲン構造を有するマクロファージ受容体）、ＰＳ（ホスファチジルセリン）、ＯＸ－４０、ＳＬＡＭ、ＴＩＧＨＴ、ＶＩＳＴＡ、ＶＴＣＮ１の阻害剤、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、免疫チェックポイント阻害剤は、ＩＤＯ１、ＣＴＬＡ４、ＰＤ－１、ＬＡＧ３、ＰＤ－Ｌ１、ＴＩＭ３、またはそれらの組み合わせの阻害剤である。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の阻害剤である。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の阻害剤である。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、ＣＴＬＡ－４の阻害剤である。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、ＬＡＧ３の阻害剤である。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、ＴＩＭ３の阻害剤である。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、ＩＤＯ１の阻害剤である。
【０２７８】
本明細書に記載されるように、少なくとも一態様では、本発明は免疫チェックポイントアンタゴニストの使用を包含する。そのような免疫チェックポイントアンタゴニストとしては、細胞傷害性Ｔリンパ球抗原４（ＣＴＬＡ－４）、プログラム細胞死タンパク質１（ＰＤ－１）、プログラム死リガンド１（ＰＤＬ－１）、リンパ球活性化遺伝子３（ＬＡＧ－３）、及びＴ細胞免疫グロブリン及びムチンドメイン３（ＴＩＭ－３）などの免疫チェックポイント分子のアンタゴニストが挙げられる。ＣＴＬＡ－４、ＰＤ－１、ＰＤＬ－１、ＬＡＧ－３、またはＴＩＭ－３のアンタゴニストは、それぞれ、ＣＴＬＡ－４、ＰＤ－１、ＰＤＬ－１、ＬＡＧ－３、またはＴＩＭ－３の機能を妨害する。ＣＴＬＡ－４、ＰＤ－１、ＰＤＬ－１、ＬＡＧ－３、及びＴＩＭ－３のそのようなアンタゴニストは、それぞれ、ＣＴＬＡ－４、ＰＤ－１、ＰＤＬ－１、ＬＡＧ－３、及びＴＩＭ－３と特異的に結合し、生物学的活性及び機能を阻害及び／または遮断する抗体を含むことができる。
【０２７９】
Ｅ．その他
いくつかの実施形態では、１つ以上のコード要素内にコードされるペイロードは、ホルモン、ＦＣ融合タンパク質、抗凝固剤、血液凝固因子、欠乏症及び遺伝病に関連するタンパク質、シャペロンタンパク質、抗菌タンパク質、酵素（例えば、代謝酵素）、構造タンパク質（例えば、チャネルまたは核孔タンパク質）、タンパク質バリアント、小分子、抗体、ナノボディ、操作された非実体抗体、またはそれらの組み合わせである。
【０２８０】
４．追加のアクセサリ要素（配列要素）
本発明に記載されるように、ポリヌクレオチド（例えば、環状ＲＮＡポリヌクレオチド、直鎖状ＲＮＡポリヌクレオチド、及び／またはＤＮＡテンプレート）は、アクセサリ要素をさらに含み得る。特定の実施形態では、これらのアクセサリ要素は、環状化、翻訳、またはその両方を増強するために、環状ＲＮＡ、直鎖状ＲＮＡポリヌクレオチド及び／またはＤＮＡ鋳型の配列内に含まれ得る。アクセサリ要素は、特定の実施形態では、それぞ

れのポリヌクレオチドの増強イントロン要素、増強エクソン要素、またはコア機能要素の間もしくは内部に特異的に位置する配列である。一例として、限定することを意図するものではないが、アクセサリ要素は、ＩＲＥＳトランス活性化因子領域、ｍｉＲＮＡ結合部位、制限部位、ＲＮＡ編集領域、構造もしくは配列要素、顆粒部位、ＺＩＰコード要素、ＲＮＡ輸送要素、または環状ＲＮＡポリヌクレオチド内でコードされるタンパク質の環状化及び／または翻訳を促進する当技術分野で見出される別の特化された配列を含む。

【０２８１】

Ａ．ＩＲＥＳトランス活性化因子

特定の実施形態では、アクセサリ要素は、ＩＲＥＳトランス活性化因子（ＩＴＡＦ）領域を含む。いくつかの実施形態では、ＩＲＥＳトランス活性化因子領域は、ＰＣＢＰ１－ＰＣＢＰ４（ポリＣ結合タンパク質）、ＰＡＢＰ１（ポリＡ結合タンパク質）、ＰＴＢ（ポリピリミジントラクト結合）、アルゴノートタンパク質ファミリー、ＨＮＲＮＰＫ（ヘテロ核リボヌクレオタンパク質Ｋ）、またはＬａタンパク質との結合を通じて翻訳の開始を調節する。いくつかの実施形態では、ＩＲＥＳトランス活性化因子領域は、ポリＡ、ポリＣ、ポリＡＣ、またはポリピリミジントラックを含む。

【０２８２】

いくつかの実施形態では、ＩＴＡＦ領域は、コア機能要素内に位置する。いくつかの実施形態では、ＩＴＡＦ領域は、ＴＩＥ内に位置する。

【０２８３】

Ｂ．ｍｉＲＮＡ結合部位

特定の実施形態では、アクセサリ要素は、ｍｉＲＮＡ結合部位を含む。いくつかの実施形態では、ｍｉＲＮＡ結合部位は、５’増強イントロン要素、５’増強エクソン要素、コア機能要素、３’増強エクソン要素、及び／または３’増強イントロン要素内に位置する。

【０２８４】

いくつかの実施形態では、ｍｉＲＮＡ結合部位は、増強イントロン要素または増強エクソン要素内のスペーサー内に位置する。特定の実施形態では、ｍｉＲＮＡ結合部位は、スペーサー領域全体を含む。

【０２８５】

いくつかの実施形態では、５’増強イントロン要素及び３’増強イントロン要素は、各々、同一のｍｉＲＮＡ結合部位を含む。別の実施形態では、５’増強イントロン要素のｍｉＲＮＡ結合部位は、３’増強イントロン要素とは、長さまたはヌクレオチドが異なるｍｉＲＮＡ結合部位を含む。一実施形態では、５’増強エクソン要素及び３’増強エクソン要素は、同一のｍｉＲＮＡ結合部位を含む。他の実施形態では、５’増強エクソンエレメント及び３’増強エクソンエレメントは、長さまたはヌクレオチドが異なるｍｉＲＮＡ結合部位を含む。

【０２８６】

いくつかの実施形態では、ｍｉＲＮＡ結合部位は、環状ＲＮＡポリヌクレオチド、直鎖状ＲＮＡポリヌクレオチド前駆体、及び／またはＤＮＡ鋳型内で互いに隣接して位置する。特定の実施形態では、ｍｉＲＮＡ結合部位のうちの１つの第１のヌクレオチドが、第２のｍｉＲＮＡ結合部位の第１のヌクレオチドの最後のヌクレオチドに続く。

【０２８７】

いくつかの実施形態では、ｍｉＲＮＡ結合部位は、コア機能要素の翻訳開始要素（ＴＩＥ）内に位置する。一実施形態では、ｍｉＲＮＡ結合部位は、配列内リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ）の前、後方、または内部に位置する。別の実施形態では、ｍｉＲＮＡ結合部位は、アプタマー複合体の前、後方、または内部に位置する。

【０２８８】

環状ＲＮＡ分子内のｍｉＲＮＡ配列の組み込みは、コア機能要素内のコード配列の組織特異的発現を可能にすることができる。例えば、免疫細胞においてタンパク質を発現することを意図した環状ＲＮＡにおいて、肝臓または腎臓などの組織において発現抑制をもたらすｍｉＲＮＡ結合配列が所望され得る。かかるｍｉＲＮＡ結合配列は、ｍｉＲＮＡの細

胞または組織発現に基づいて選択され得る。

【０２８９】

ｍｉＲＮＡ命名法によって定義される独自の配列は広く知られており、ｍｉｃｒｏＲＮＡの分野で働く人々にとってアクセス可能である。例えば、それらは、ｍｉＲＤＢ公共データベースで見ることができる。

【０２９０】

５．ポリヌクレオチドの産生

本明細書に提供されるＤＮＡ鋳型は、分子生物学の標準的な技術を使用して作製することができる。例えば、本明細書に提供するベクターの様々な要素は、組換え法を使用して、例えば細胞からｃＤＮＡ及びゲノムライブラリーをスクリーニングすることによって、またはポリヌクレオチドを含むことが知られているＤＮＡ鋳型からポリヌクレオチドを誘導することによって得ることができる。

【０２９１】

本明細書に提供するＤＮＡ鋳型の様々な要素はまた、既知の配列に基づいて、クローン化されるのではなく、合成的に生成することもできる。完全な配列は、標準的な方法によって調製された重複するオリゴヌクレオチドから組み立て、完全な配列へと組み立てることができる。例えば、Ｅｄｇｅ，Ｎａｔｕｒｅ（１９８１）２９２：７５６；Ｎａｍｂａｉｒ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ（１９８４）２２３：１２９９；及びＪａｙ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．（１９８４）２５９：６３１ １を参照されたい。

【０２９２】

ゆえに、特定のヌクレオチド配列は、所望の配列を抱えるＤＮＡ鋳型から取得する、または完全に、もしくは部分的に、適切な場合には部位特異的変異誘発及びポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）技術などの当該技術分野で公知の様々なオリゴヌクレオチド合成技術を使用して合成することができる。所望のＤＮＡ鋳型要素をコードするヌクレオチド配列を取得する１つの方法は、従来の自動ポリヌクレオチドシンセサイザーで産生された重複する合成オリゴヌクレオチドの相補的セットをアニーリングし、続いて適切なＤＮＡリガーゼでライゲーションし、ＰＣＲを介してライゲーションされたヌクレオチド配列を増幅することによる。例えば、Ｊａｙａｒａｍａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ（１９９１）８８：４０８４－４０８８を参照されたい。加えて、オリゴヌクレオチド特異的合成（Ｊｏｎｅｓ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ（１９８６）５４：７５－８２）、既存のヌクレオチド領域のオリゴヌクレオチド特異的変異誘発（Ｒｉｅｃｈｍａｎｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ（１９８８）３３２：３２３－３２７及びＶｅｒｈｏｅｙｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ（１９８８）２３９：１５３４－１５３６）、及びＴ４ ＤＮＡポリメラーゼを使用するギャップを伴うオリゴヌクレオチドの酵素的充填（Ｑｕｅｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ（１９８９）８６：１００２９－１００３３）を使用することができる。

【０２９３】

本明細書に提供するＲＮＡ前駆体は、本明細書に提供するＤＮＡ鋳型を、ＤＮＡ鋳型によってコードされるＲＮＡ前駆体の転写を許容する条件下で、インキュベートすることによって生成することができる。例えば、いくつかの実施形態では、ＲＮＡ前駆体は、その５’二重鎖配列及び／または発現配列の上流にＲＮＡポリメラーゼプロモーターを含む本明細書に提供するＤＮＡ鋳型を、適合性ＲＮＡポリメラーゼ酵素とインビトロ転写を許容する条件下でインキュベートすることによって合成される。いくつかの実施形態では、ＤＮＡ鋳型は、バクテリオファージＲＮＡポリメラーゼによって細胞の内側で、または宿主ＲＮＡポリメラーゼＩＩによって細胞の核内でインキュベートされる。

【０２９４】

特定の実施形態では、鋳型として本明細書に提供されるベクター（例えば、５’二重鎖領域の上流に配置されたＲＮＡポリメラーゼプロモーターを有する本明細書に提供されるＤＮＡ鋳型）を使用してインビトロ転写を行うことによってＲＮＡ前駆体を生成する方法を本明細書に提供する。

【０２９５】
特定の実施形態では、結果得られたＲＮＡ前駆体を使用して、それをマグネシウムイオン及びグアノシンヌクレオチドまたはヌクレオシド存在下で、ＲＮＡ環状化が生じる温度（例えば、２０℃～６０℃）にてインキュベートすることによって、環状ＲＮＡ（例えば、本明細書に提供する環状ＲＮＡポリヌクレオチド）を生成することができる。
【０２９６】
ゆえに、特定の実施形態では、環状ＲＮＡを作製する方法を本明細書に提供する。特定の実施形態では、方法は、本明細書に提供されるベクター（例えば、５’増強イントロン要素、５’増強エクソン要素、コア機能要素、３’増強エクソン要素、及び３’増強エクソン要素）を鋳型として使用して、転写（例えばランオフ転写）によってＲＮＡ前駆体を合成し、得られたＲＮＡ前駆体を二価カチオン（例えばマグネシウムイオン）及びＧＴＰの存在下でインキュベートし、環状化して環状ＲＮＡを形成することを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示するＲＮＡ前駆体は、マグネシウムイオン及びＧＴＰの非存在下で、及び／またはマグネシウムイオン及びＧＴＰとのインキュベーションのステップを伴わずに、環状化することができる。少なくとも部分的には、ｍＲＮＡが免疫原性５’キャップを含むため、環状ＲＮＡは対応するｍＲＮＡと比較して免疫原性が低減していることが発見されている。ＲＮＡ前駆体を産生するために所定のプロモーター（例えば、Ｔ７プロモーター）からＤＮＡベクターを転写する場合、ＲＮＡ前駆体の５’末端はＧであることが理解される。低レベルの夾雑直鎖状ｍＲＮＡを含有する環状ＲＮＡ組成物の免疫原性を低下させるため、ほとんどの転写産物が、キャップすることができない５’ＧＭＰを含有するように、ＧＴＰに対して過剰のＧＭＰが転写中に提供され得る。そのため、いくつかの実施形態では、転写は、過剰のＧＭＰの存在下で行われる。いくつかの実施形態では、転写は、ＧＭＰ濃度のＧＴＰ濃度に対する比が約３：１～約１５：１の範囲内、例えば、約３：１～約１０：１、約３：１～約５：１、約３：１、約４：１、または約５：１で行われる。
【０２９７】
いくつかの実施形態では、環状ＲＮＡを含む組成物は、精製されている。環状ＲＮＡは、当該技術分野で一般的に使用される任意の公知の方法、例えばカラムクロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、及びサイズ排除クロマトグラフィーによって精製され得る。いくつかの実施形態では、精製は、以下のステップ：ホスファターゼ処理、ＨＰＬＣサイズ排除精製、及びＲＮａｓｅ　Ｒ消化のうちの１つ以上を含む。いくつかの実施形態では、精製は、以下のステップを順序：ＲＮａｓｅ　Ｒ消化、ホスファターゼ処理、及びＨＰＬＣサイズ排除精製で含む。いくつかの実施形態では、精製は、逆相ＨＰＬＣを含む。いくつかの実施形態では、精製された組成物は、未精製ＲＮＡよりも少ない二本鎖ＲＮＡ、ＤＮＡスプリント、三リン酸化ＲＮＡ、ホスファターゼタンパク質、タンパク質リガーゼ、キャッピング酵素及び／またはニックの入ったＲＮＡを含有する。いくつかの実施形態では、環状ＲＮＡの精製は、本明細書に記載の親和性精製またはネガティブセレクション方法を含む。いくつかの実施形態では、環状ＲＮＡの精製は、直鎖状ＲＮＡにおける配列に相補的であるが、環状ＲＮＡにおける配列に相補的ではないオリゴヌクレオチドを使用して、直鎖状ＲＮＡを環状ＲＮＡから分離することを含む。いくつかの実施形態では、精製組成物は、未精製組成物よりも免疫原性が低い。いくつかの実施形態では、精製組成物に曝露された免疫細胞は、未精製組成物に曝露された免疫細胞よりも少ないＴＮＦα、ＲＩＧ－Ｉ、ＩＬ－２、ＩＬ－６、ＩＦＮγ、及び／または１型インターフェロン、例えばＩＦＮ－β１を産生する。
【０２９８】
６．輸送ビヒクル及び他の配送メカニズムの概要
Ａ．イオン化可能脂質
特定の実施形態では、１つ以上の標的細胞への環状ＲＮＡの送達及び放出を、（例えば、かかる標的細胞の脂質膜に浸透するまたはこれと融合することによって）容易にするまたは向上させるために輸送ビヒクルの成分として使用され得るイオン化可能脂質を本明細

書に開示する。特定の実施形態では、イオン化可能脂質は、１つ以上の切断可能な官能基（例えば、ジスルフィド）を含み、これは、例えば、化合物の親水性官能頭部基の親油性官能尾部基からの解離（例えば、酸化的、還元的または酸性条件への曝露の際）を可能にし、それにより、１つ以上の標的細胞の脂質二重層における相転移を容易にする。

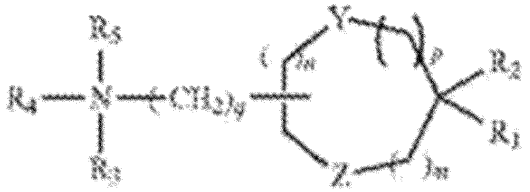
【０２９９】

いくつかの実施形態では、イオン化可能脂質は、国際特許出願第ＰＣＴ／ＵＳ２０１８／０５８５５５号に記載されている脂質である。

【０３００】

いくつかの実施形態では、カチオン性脂質は、以下の式を有し、

【化１】



式中、

$R_1$及び$R_2$は、同じでありまたは異なり、独立して、任意に置換されるＣ１０－Ｃ２４アルキル、任意に置換されるＣ１０－Ｃ２４アルケニル、任意に置換されるＣ１０－Ｃ２４アルキニル、または任意に置換されるＣ１０－Ｃ２４アシルであり、

$R_3$及び$R_4$は、同じでありまたは異なり、独立して、任意に置換されるＣ１－Ｃ６アルキル、任意に置換されるＣ２－Ｃ６アルケニル、または任意に置換されるＣ２－Ｃ６アルキニルであり、または$R_3$及び$R_4$は一緒になって、４～６個の炭素原子ならびに窒素及び酸素から選択される１または２個のヘテロ原子の任意に置換される複素環式環を形成し得、

$R_5$は、非存在でありまたは存在し、存在する場合、水素またはＣ１－Ｃ６アルキルであり；ｍ、ｎ、及びｐは、同じでありまたは異なり、独立して、０または１のいずれかであり、ただし、ｍ、ｎ、及びｐは、同時に０ではなく；ｑは、０、１、２、３、または４であり、

Ｙ及びＺは、同じでありまたは異なり、独立して、Ｏ、Ｓ、またはＮＨである。

【０３０１】

一実施形態では、$R_1$及び$R_2$は、各々、リノレイルであり、アミノ脂質は、ジリノレイルアミノ脂質である。

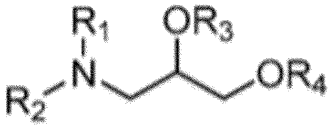
【０３０２】

一実施形態では、アミノ脂質は、ジリノレイルアミノ脂質である。

【０３０３】

様々な他の実施形態では、カチオン性脂質は、以下の構造を有するか、

【化２】



またはその薬学的に許容可能な塩、互変異性体、プロドラッグもしくは立体異性体であり、式中、

$R_1$及び$R_2$は、各々、独立して、Ｈ及びＣ１－Ｃ３アルキルからなる群から選択され、

$R_3$及び$R_4$は、各々、独立して、約１０～約２０個の炭素原子を有するアルキル基で

あり、$R_3$及び$R_4$の少なくとも１つは、少なくとも２つの不飽和部位を含む。

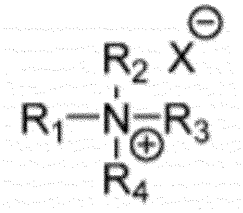
【０３０４】

いくつかの実施形態では、$R_3$及び$R_4$は、各々、独立して、ドデカジエニル、テトラデカジエニル、ヘキサデカジエニル、リノレイル、及びイコサジエニルから選択される。ある実施形態では、$R_3$及び$R_4$は両方とも、リノレイルである。いくつかの実施形態では、$R_3$及び／または$R_4$は、少なくとも３つの不飽和部位を含み得る（例えば、$R_3$及び／または$R_4$は、例えば、ドデカトリエニル、テトラデクトリエニル、ヘキサデカトリエニル、リノレニル、及びイコサトリエニルであり得る）。

【０３０５】

いくつかの実施形態では、カチオン性脂質は、以下の構造を有するか、

【化３】



またはその薬学的に許容可能な塩、互変異性体、プロドラッグもしくは立体異性体であり、式中、

$R_1$及び$R_2$は、各々、独立して、H及び$C_1$－$C_3$アルキルから選択され、

$R_3$及び$R_4$は、各々、独立して、約１０～約２０個の炭素原子を有するアルキル基であり、$R_3$及び$R_4$の少なくとも１つは、少なくとも２つの不飽和部位を含む。

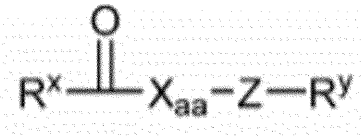
【０３０６】

一実施形態では、$R_3$及び$R_4$は、同じであり、例えば、いくつかの実施形態では、$R_3$及び$R_4$はいずれとも、リノレイル（$C_{18}$－アルキル）である。別の実施形態では、$R_3$及び$R_4$は、異なり、例えば、いくつかの実施形態では、$R_3$は、テトラデクトリエニル（$C_{14}$－アルキル）であり、$R_4$は、リノレイル（$C_{18}$－アルキル）である。好ましい実施形態では、本発明のカチオン性脂質（複数可）は、対称であり、すなわち、$R_3$及び$R_4$は、同じである。別の好ましい実施形態では、$R_3$及び$R_4$の両方は、少なくとも２つの不飽和部位を含む。いくつかの実施形態では、$R_3$及び$R_4$は、各々、独立して、ドデカジエニル、テトラデカジエニル、ヘキサデカジエニル、リノレイル、及びイコサジエニルから選択される。ある実施形態では、$R_3$及び$R_4$はいずれとも、リノレイルである。いくつかの実施形態では、$R_3$及び／または$R_4$は、少なくとも３つの不飽和部位を含み、各々、独立して、ドデカトリエニル、テトラデクトリエニル、ヘキサデカトリエニル、リノレニル、及びイコサトリエニルから選択される。

【０３０７】

様々な実施形態では、カチオン性脂質は、以下の式を有するか、

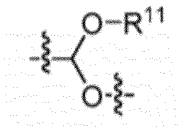
【化４】



またはその薬学的に許容可能な塩、互変異性体、プロドラッグもしくは立体異性体であり、式中、

$X_{aa}$は、式－$NR^N-CR^1R^2-C(C=O)$－を有するＤ－またはＬ－アミノ酸残基、または式－$\{NR^N-CR^1R^2-C(C=O)\}_n$－（ｎは、２～２０の整数で

ある）を有するアミノ酸残基のペプチドもしくはペプチドであり、
$R^1$は、独立して、各存在について、非水素またはアミノ酸の置換もしくは非置換側鎖であり、
$R^2$及び$R^N$は、独立して、各存在について、水素、炭素、酸素、窒素、硫黄、及び水素原子または前述のものの任意の組み合わせからなり、かつ１～２０個の炭素原子、Ｃ（１－５）アルキル、シクロアルキル、シクロアルキルアルキル、Ｃ（１－５）アルケニル、Ｃ（１－５）アルキニル、Ｃ（１－５）アルカノイル、Ｃ（１－５）アルカノイルオキシ、Ｃ（１－５）アルコキシ、Ｃ（１－５）アルコキシ－Ｃ（１－５）アルキル、Ｃ（１－５）アルコキシ－Ｃ（１－５）アルコキシ、Ｃ（１－５）アルキル－アミノ－Ｃ（１－５）アルキル－、Ｃ（１－５）ジアルキル－アミノ－Ｃ（１－５）アルキル－、ニトロ－Ｃ（１－５）アルキル、シアノ－Ｃ（１－５）アルキル、アリール－Ｃ（１－５）アルキル、４－ビフェニル－Ｃ（１－５）アルキル、カルボキシル、またはヒドロキシルを有する有機基であり、
Ｚは、－ＮＨ－、－Ｏ－、－Ｓ－、－$CH_2S$－、－$CH_2S$（Ｏ）－、または水素、炭素、酸素、窒素、及び硫黄原子から選択される１～４０個の原子からなる有機リンカーであり（好ましくは、Ｚは、－ＮＨ－または－Ｏ－であり）、
$R^x$及び$R^y$は、独立して、（ｉ）脂質（天然に存在し、または合成であり得る）、例えば、リン脂質、糖脂質、トリアシルグリセロール、グリセロリン脂質、スフィンゴリピド、セラミド、スフィンゴミエリン、セレブロシド、またはガングリオシドに由来する脂溶性尾部（尾部はステロイドを任意で含む）；（ｉｉ）水素、ヒドロキシル、アミノ、及び有機保護基から選択されるアミノ酸末端基；または（ｉｉｉ）置換または非置換Ｃ（３－２２）アルキル、Ｃ（６－１２）シクロアルキル、Ｃ（６－１２）シクロアルキル－Ｃ（３－２２）アルキル、Ｃ（３－２２）アルケニル、Ｃ（３－２２）アルキニル、Ｃ（３－２２）アルコキシ、またはＣ（６－１２）－アルコキシＣ（３－２２）アルキルである。
【０３０８】
いくつかの実施形態では、$R^x$及び$R^y$の一方は、上記で定義されている脂溶性尾部であり、他方は、アミノ酸末端基である。いくつかの実施形態では、$R^x$及び$R^y$の両方は、脂溶性尾部である。
【０３０９】
いくつかの実施形態では、$R^x$及び$R^y$の少なくとも１つは、１つ以上の生分解性基（例えば、－ＯＣ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－ＳＣ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｏ）Ｓ－、－ＯＣ（Ｓ）－、－Ｃ（Ｓ）Ｏ－、－Ｓ－Ｓ－、－Ｃ（Ｏ）（$NR^5$）－、－Ｎ（$R^5$）Ｃ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｓ）（$NR^5$）－、－Ｎ（$R^5$）Ｃ（Ｏ）－、－Ｎ（$R^5$）Ｃ（Ｏ）Ｎ（$R^5$）－、－ＯＣ（Ｏ）Ｏ－、－Ｏ$Si(R^5)_2$Ｏ－、－Ｃ（Ｏ）（$CR^3R^4$）Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－ＯＣ（Ｏ）（$CR^3R^4$）Ｃ（Ｏ）－、または
【化５】



によって隔てられている。
【０３１０】
いくつかの実施形態では、$R^{11}$は、$C_2$－$C_8$アルキルまたはアルケニルである。
【０３１１】
いくつかの実施形態では、$R^5$の各存在は、独立して、Ｈまたはアルキルである。
【０３１２】
いくつかの実施形態では、$R^3$及び$R^4$の各存在は、独立して、Ｈ、ハロゲン、ＯＨ、アルキル、アルコキシ、－$NH_2$、アルキルアミノ、またはジアルキルアミノであり；または$R_3$及び$R_4$は、それらが直接的に結合している炭素原子と一緒になって、シクロアルキル基を形成する。いくつかの特定の実施形態では、$R^3$及び$R^4$の各存在は、独立し

て、ＨまたはＣ１－Ｃ４アルキルである。

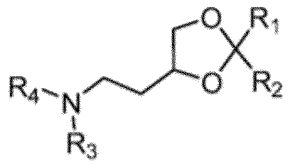
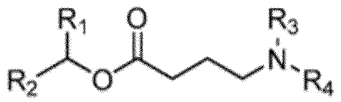
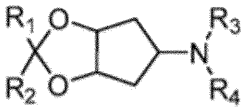
【０３１３】

いくつかの実施形態では、Ｒｘ及びＲｙは、各々、独立して、１つ以上の炭素－炭素二重結合を有する。

【０３１４】

いくつかの実施形態では、カチオン性脂質は、以下のうちの１つであるか、

【化６】


、

、もしくは

、

またはその薬学的に許容可能な塩、互変異性体、プロドラッグもしくは立体異性体であり、式中、

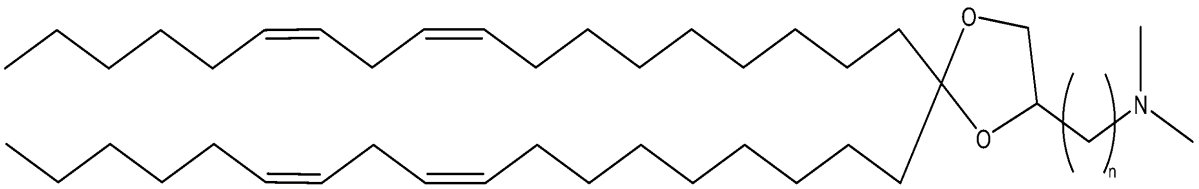
Ｒ１及びＲ２は、各々、独立して、アルキル、アルケニル、またはアルキニルであり、その各々は、任意で置換され得、

Ｒ３及びＲ４は、各々、独立して、Ｃ１－Ｃ６アルキルであり、またはＲ３及びＲ４は、一緒になって任意に置換される複素環式環を形成する。

【０３１５】

代表的な有用なジリノレイルアミノ脂質は、以下の式を有し、

【化７】



式中、ｎは、０、１、２、３、または４である。

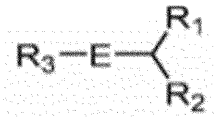
【０３１６】

一実施形態では、カチオン性脂質は、ＤＬｉｎ－Ｋ－ＤＭＡである。一実施形態では、カチオン性脂質は、ＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡ（ｎが２である上記のＤＬｉｎ－Ｋ－ＤＭＡ）である。

【０３１７】

一実施形態では、カチオン性脂質は、以下の構造を有するか、

【化８】



またはその薬学的に許容可能な塩、互変異性体、プロドラッグもしくは立体異性体であり、式中、

Ｒ１及びＲ２は、各々、独立して、各存在について任意に置換されるＣ１０－Ｃ３０アルキル、任意に置換されるＣ１０－Ｃ３０アルケニル、任意に置換されるＣ１０－Ｃ３０アルキニルまたは任意に置換されるＣ１０－Ｃ３０アシルであり、

Ｒ３は、Ｈ、任意に置換されるＣ２－Ｃ１０アルキル、任意に置換されるＣ２－Ｃ１０アルケニル、任意に置換されるＣ２－Ｃ１０アルキリル、アルキル複素環、アルキルホス

フェート、アルキルホスホロチオエート、アルキルホスホロジチオエート、アルキルホスホネート、アルキルアミン、ヒドロキシアルキル、ω－アミノアルキル、ω－（置換）アミノアルキル、ω－ホスホアルキル、ω－チオホスホアルキル、任意に置換されるポリエチレングリコール（ＰＥＧ、ｍｗ１００～４０Ｋ）、任意に置換されるｍＰＥＧ（ｍｗ１２０～４０Ｋ）、ヘテロアリール、または複素環、またはリンカーリガンドであり、例えば、いくつかの実施形態では、Ｒ３は、（ＣＨ３）２Ｎ（ＣＨ２）ｎ－（ｎは、１、２、３または４である）であり、

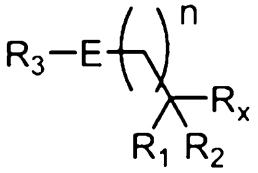
Ｅは、Ｏ、Ｓ、Ｎ（Ｑ）、Ｃ（Ｏ）、ＯＣ（Ｏ）、Ｃ（Ｏ）Ｏ、Ｎ（Ｑ）Ｃ（Ｏ）、Ｃ（Ｏ）Ｎ（Ｑ）、（Ｑ）Ｎ（ＣＯ）Ｏ、Ｏ（ＣＯ）Ｎ（Ｑ）、Ｓ（Ｏ）、ＮＳ（Ｏ）２Ｎ（Ｑ）、Ｓ（Ｏ）２、Ｎ（Ｑ）Ｓ（Ｏ）２、ＳＳ、Ｏ＝Ｎ、アリール、ヘテロアリール、環式または複素環、例えば、－Ｃ（Ｏ）Ｏであり、－は、Ｒ３への接続点であり、

Ｑは、Ｈ、アルキル、ω－アミノアルキル、ω－（置換）アミノアルキル、ω－ホスホアルキル、またはω－チオホスホアルキルである。

【０３１８】

一特定の実施形態では、実施形態１、２、３、４、または５に記載のカチオン性脂質は、以下の構造を有するか、

【化９】



またはその薬学的に許容可能な塩、互変異性体、プロドラッグもしくは立体異性体であり、

式中、

Ｅは、Ｏ、Ｓ、Ｎ（Ｑ）、Ｃ（Ｏ）、Ｎ（Ｑ）Ｃ（Ｏ）、Ｃ（Ｏ）Ｎ（Ｑ）、（Ｑ）Ｎ（ＣＯ）Ｏ、Ｏ（ＣＯ）Ｎ（Ｑ）、Ｓ（Ｏ）、ＮＳ（Ｏ）２Ｎ（Ｑ）、Ｓ（Ｏ）２、Ｎ（Ｑ）Ｓ（Ｏ）２、ＳＳ、Ｏ＝Ｎ、アリール、ヘテロアリール、環式または複素環であり、

Ｑは、Ｈ、アルキル、ω－アミノアルキル、ω－（置換）アミノアルキル、ω－ホスホアルキル、またはω－チオホスホアルキルであり、

Ｒ１及びＲ２及びＲｘは、各々、独立して、各存在についてＨ、任意に置換されるＣ１－Ｃ１０アルキル、任意に置換されるＣ１０－Ｃ３０アルキル、任意に置換されるＣ１０－Ｃ３０アルケニル、任意に置換されるＣ１０－Ｃ３０アルキニル、任意に置換されるＣ１０－Ｃ３０アシル、またはリンカー－リガンドであり、ただし、Ｒ１、Ｒ２、及びＲｘの少なくとも１つは、Ｈではなく、

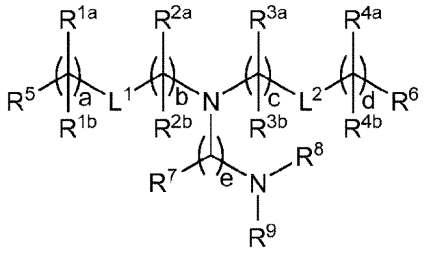
Ｒ３は、Ｈ、任意に置換されるＣ１－Ｃ１０アルキル、任意に置換されるＣ２－Ｃ１０アルケニル、任意に置換されるＣ２－Ｃ１０アルキニル、アルキル複素環、アルキルホスフェート、アルキルホスホロチオエート、アルキルホスホロジチオエート、アルキルホスホネート、アルキルアミン、ヒドロキシアルキル、ω－アミノアルキル、ω－（置換）アミノアルキル、ω－ホスホアルキル、ω－チオホスホアルキル、任意に置換されるポリエチレングリコール（ＰＥＧ、ｍｗ１００～４０Ｋ）、任意に置換されるｍＰＥＧ（ｍｗ１２０～４０Ｋ）、ヘテロアリール、または複素環、またはリンカーリガンドであり、

式中、ｎは、０、１、２、または３である。

【０３１９】

一実施形態では、実施形態１、２、３、４、または５のカチオン性脂質は、式Ｉの構造を有するか、

【化１０】



I

またはその薬学的に許容可能な塩、互変異性体、プロドラッグもしくは立体異性体であり、
式中、
$L^1$または$L^2$の一方は、－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）－、－（Ｃ＝Ｏ）Ｏ－、－Ｃ（＝Ｏ）－、－Ｏ－、－Ｓ（Ｏ）$_x$－、－Ｓ－Ｓ－、－Ｃ（＝Ｏ）Ｓ－、ＳＣ（＝Ｏ）－、－ＮＲ$^a$Ｃ（＝Ｏ）－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＲ$^a$－、ＮＲ$^a$Ｃ（＝Ｏ）ＮＲ$^a$－、－ＯＣ（＝Ｏ）ＮＲ$^a$－、または－ＮＲ$^a$Ｃ（＝Ｏ）Ｏ－であり、$L^1$または$L^2$の他方は、－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）－、－（Ｃ＝Ｏ）Ｏ－、－Ｃ（＝Ｏ）－、－Ｏ－、－Ｓ（Ｏ）$_x$－、－Ｓ－Ｓ－、－Ｃ（＝Ｏ）Ｓ－、ＳＣ（＝Ｏ）－、－ＮＲ$^a$Ｃ（＝Ｏ）－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＲ$^a$－、ＮＲ$^a$Ｃ（＝Ｏ）ＮＲ$^a$－、－ＯＣ（＝Ｏ）ＮＲ$^a$－、もしくは
－ＮＲ$^a$Ｃ（＝Ｏ）Ｏ－、または直接結合であり、
$R^a$は、ＨまたはＣ$_1$－Ｃ$_{12}$アルキルであり、
$R^{1a}$及び$R^{1b}$は、各存在で、独立して、（ａ）ＨもしくはＣ$_1$－Ｃ$_{12}$アルキル、または（ｂ）$R^{1a}$が、ＨもしくはＣ$_1$－Ｃ$_{12}$アルキルであり、$R^{1b}$が、それが結合している炭素原子と一緒になって、隣接する$R^{1b}$及びそれが結合している炭素原子と一緒になって、炭素－炭素二重結合を形成するかのいずれかであり、
$R^{2a}$及び$R^{2b}$は、各存在で、独立して、（ａ）ＨもしくはＣ$_1$－Ｃ$_{12}$アルキル、または（ｂ）$R^{2a}$が、ＨもしくはＣ$_1$－Ｃ$_{12}$アルキルであり、$R^{2b}$が、それが結合している炭素原子と一緒になって、隣接する$R^{2b}$及びそれが結合している炭素原子と一緒になって、炭素－炭素二重結合を形成するかのいずれかであり、
$R^{3a}$及び$R^{3b}$は、各存在で、独立して、（ａ）ＨもしくはＣ$_1$－Ｃ$_{12}$アルキル、または（ｂ）$R^{3a}$が、ＨもしくはＣ$_1$－Ｃ$_{12}$アルキルであり、$R^{3b}$が、それが結合している炭素原子と一緒になって、隣接する$R^{3b}$及びそれが結合している炭素原子と一緒になって、炭素－炭素二重結合を形成するかのいずれかであり、
$R^{4a}$及び$R^{4b}$は、各存在で、独立して、（ａ）ＨもしくはＣ$_1$－Ｃ$_{12}$アルキル、または（ｂ）$R^{4a}$が、ＨもしくはＣ$_1$－Ｃ$_{12}$アルキルであり、$R^{4b}$が、それが結合している炭素原子と一緒になって、隣接する$R^{4b}$及びそれが結合している炭素原子と一緒になって、炭素－炭素二重結合を形成するかのいずれかであり、
$R^5$及び$R^6$は、各々、独立して、メチルまたはシクロアルキルであり、
$R^7$は、各存在で、独立して、ＨまたはＣ$_1$－Ｃ$_{12}$アルキルであり、
$R^8$及び$R^9$は、各々、独立して、非置換Ｃ$_1$－Ｃ$_{12}$アルキルであるか、または$R^8$及び
$R^9$は、それらが結合している窒素原子と一緒になって、１個の窒素原子を含む５員、６員、または７員の複素環を形成し、
ａ及びｄは、各々、独立して、０～２４の整数であり、
ｂ及びｃは、各々、独立して、１～２４の整数であり、
ｅは、１または２であり、
ｘは、０、１、または２である。
【０３２０】

式Ｉのいくつかの実施形態では、Ｌ$^{1}$及びＬ$^{2}$は、独立して、－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）－または－（Ｃ＝Ｏ）Ｏ－である。

【０３２１】

式Ｉの特定の実施形態では、Ｒ$^{1a}$、Ｒ$^{2a}$、Ｒ$^{3a}$、またはＲ$^{4a}$の少なくとも１つは、Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{12}$アルキルであるか、またはＬ$^{1}$またはＬ$^{2}$の少なくとも１つは、－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）－または－（Ｃ＝Ｏ）Ｏ－である。他の実施形態では、Ｒ$^{1a}$及びＲ$^{1b}$は、ａが６である場合、イソプロピルではないか、またはａが８である場合、ｎ－ブチルではない。

【０３２２】

式Ｉのなおさらなる実施形態では、Ｒ$^{1a}$、Ｒ$^{2a}$、Ｒ$^{3a}$、またはＲ$^{4a}$の少なくとも１つは、Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{12}$アルキルであるか、またはＬ$^{1}$またはＬ$^{2}$の少なくとも１つは、－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）－または－（Ｃ＝Ｏ）Ｏ－であり、

Ｒ$^{1a}$及びＲ$^{1b}$は、ａが６である場合、イソプロピルではないか、またはａが８である場合、ｎ－ブチルではない。

【０３２３】

式Ｉの他の実施形態では、Ｒ$^{8}$及びＲ$^{9}$は、各々、独立して、非置換Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{12}$アルキルであるか、またはＲ$^{8}$及びＲ$^{9}$は、それらが結合している窒素原子と一緒になって、１個の窒素原子を含む５員、６員、または７員の複素環を形成する。

【０３２４】

式Ｉの特定の実施形態では、Ｌ$^{1}$またはＬ$^{2}$のいずれか１つは、－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）－または炭素－炭素二重結合であり得る。Ｌ$^{1}$及びＬ$^{2}$は、各々、－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）－であり得るか、または各々、炭素－炭素二重結合であり得る。

【０３２５】

式Ｉのいくつかの実施形態では、Ｌ$^{1}$またはＬ$^{2}$の一方は、－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）－である。他の実施形態では、Ｌ$^{1}$及びＬ$^{2}$は両方とも、－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）－である。

【０３２６】

式Ｉのいくつかの実施形態では、Ｌ$^{1}$またはＬ$^{2}$の一方は、－（Ｃ＝Ｏ）Ｏ－である。他の実施形態では、Ｌ$^{1}$及びＬ$^{2}$は両方とも、－（Ｃ＝Ｏ）Ｏ－である。

【０３２７】

式Ｉのいくつかの他の実施形態では、Ｌ$^{1}$またはＬ$^{2}$の一方は、炭素－炭素二重結合である。他の実施形態では、Ｌ$^{1}$及びＬ$^{2}$は両方とも、炭素－炭素二重結合である。

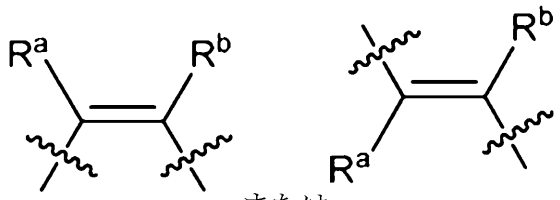
【０３２８】

式Ｉのさらに他の実施形態では、Ｌ$^{1}$またはＬ$^{2}$の一方は、－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）－であり、Ｌ$^{1}$またはＬ$^{2}$の他方は、－（Ｃ＝Ｏ）Ｏ－である。さらなる実施形態では、Ｌ$^{1}$またはＬ$^{2}$の一方は、－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）－であり、Ｌ$^{1}$またはＬ$^{2}$の他方は、炭素－炭素二重結合である。さらなる実施形態では、Ｌ$^{1}$またはＬ$^{2}$の一方は、－（Ｃ＝Ｏ）Ｏ－であり、Ｌ$^{1}$またはＬ$^{2}$の他方は、炭素－炭素二重結合である。

【０３２９】

本明細書全体にわたって使用される「炭素－炭素」二重結合は、以下の構造のうちの１つを指すことが理解され、

【化１１】




または

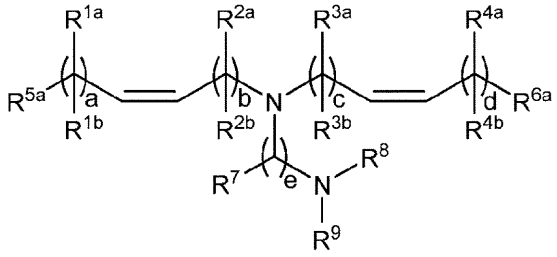
式中、Ｒ$^{a}$及びＲ$^{b}$は、各存在で、独立して、Ｈまたは置換基である。例えば、いくつか

の実施形態では、$R^a$及び$R^b$は、各存在で、独立して、H、$C_1$－$C_{12}$アルキルまたはシクロアルキル、例えば、Hまたは$C_1$－$C_{12}$アルキルである。

【０３３０】

他の実施形態では、式Ｉの脂質化合物は、以下の式（Ｉａ）を有する：

【化１２】

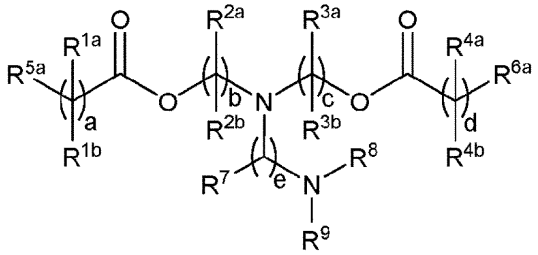


(Ia)

【０３３１】

他の実施形態では、式Ｉの脂質化合物は、以下の式（Ｉｂ）を有する：

【化１３】

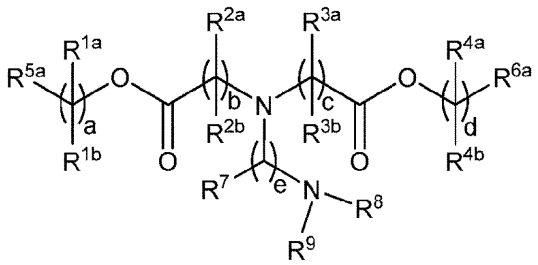


(Ib)

【０３３２】

さらに他の実施形態では、式Ｉの脂質化合物は、以下の式（Ｉｃ）を有する：

【化１４】



(Ic)

【０３３３】

式Ｉの脂質化合物の特定の実施形態では、ａ、ｂ、ｃ、及びｄは、各々、独立して、２～１２の整数、または４～１２の整数である。他の実施形態では、ａ、ｂ、ｃ、及びｄは、各々、独立して、８～１２または５～９の整数である。いくつかの特定の実施形態では、ａは、０である。いくつかの実施形態では、ａは、１である。他の実施形態では、ａは、２である。より多くの実施形態では、ａは、３である。さらに他の実施形態では、ａは、４である。いくつかの実施形態では、ａは、５である。他の実施形態では、ａは、６で

ある。より多くの実施形態では、ａは、７である。さらに他の実施形態では、ａは、８である。いくつかの実施形態では、ａは、９である。他の実施形態では、ａは、１０である。さらなる実施形態では、ａは、１１である。さらに他の実施形態では、ａは、１２である。いくつかの実施形態では、ａは、１３である。他の実施形態では、ａは、１４である。さらなる実施形態では、ａは、１５である。さらに他の実施形態では、ａは、１６である。

【０３３４】

式Ｉのいくつかの他の実施形態では、ｂは、１である。他の実施形態では、ｂは、２である。さらなる実施形態では、ｂは、３である。さらに他の実施形態では、ｂは、４である。いくつかの実施形態では、ｂは、５である。他の実施形態では、ｂは、６である。さらなる実施形態では、ｂは、７である。さらに他の実施形態では、ｂは、８である。いくつかの実施形態では、ｂは、９である。他の実施形態では、ｂは、１０である。さらなる実施形態では、ｂは、１１である。さらに他の実施形態では、ｂは、１２である。いくつかの実施形態では、ｂは、１３である。他の実施形態では、ｂは、１４である。さらなる実施形態では、ｂは、１５である。さらに他の実施形態では、ｂは、１６である。

【０３３５】

式Ｉのいくつかのさらなる実施形態では、ｃは、１である。他の実施形態では、ｃは、２である。さらなる実施形態では、ｃは、３である。さらに他の実施形態では、ｃは、４である。いくつかの実施形態では、ｃは、５である。他の実施形態では、ｃは、６である。さらなる実施形態では、ｃは、７である。さらに他の実施形態では、ｃは、８である。いくつかの実施形態では、ｃは、９である。他の実施形態では、ｃは、１０である。さらなる実施形態では、ｃは、１１である。さらに他の実施形態では、ｃは、１２である。いくつかの実施形態では、ｃは、１３である。他の実施形態では、ｃは、１４である。さらなる実施形態では、ｃは、１５である。さらに他の実施形態では、ｃは、１６である。

【０３３６】

式Ｉのいくつかの特定の他の実施形態では、ｄは、０である。いくつかの実施形態では、ｄは、１である。他の実施形態では、ｄは、２である。さらなる実施形態では、ｄは、３である。さらに他の実施形態では、ｄは、４である。いくつかの実施形態では、ｄは、５である。他の実施形態では、ｄは、６である。さらなる実施形態では、ｄは、７である。さらに他の実施形態では、ｄは、８である。いくつかの実施形態では、ｄは、９である。他の実施形態では、ｄは、１０である。さらなる実施形態では、ｄは、１１である。さらに他の実施形態では、ｄは、１２である。いくつかの実施形態では、ｄは、１３である。他の実施形態では、ｄは、１４である。さらなる実施形態では、ｄは、１５である。さらに他の実施形態では、ｄは、１６である。

【０３３７】

式Ｉのいくつかの他の様々な実施形態では、ａ及びｄは、同じである。いくつかの他の実施形態では、ｂ及びｃは、同じである。いくつかの他の特定の実施形態では、ａ及びｄは、同じであり、ｂ及びｃは、同じである。

【０３３８】

式Ｉにおけるａ及びｂの合計ならびにｃ及びｄの合計は、所望の特性を有する式Ｉの脂質を得るために変化し得る因子である。一実施形態では、ａ及びｂは、それらの合計が１４～２４の範囲の整数であるように選択される。他の実施形態では、ｃ及びｄは、それらの合計が１４～２４の範囲の整数であるように選択される。さらなる実施形態では、ａ及びｂの合計ならびにｃ及びｄの合計は、同じである。例えば、いくつかの実施形態では、ａ及びｂの合計ならびにｃ及びｄの合計は両方とも、１４～２４の範囲であり得る同じ整数である。なおさらなる実施形態では、ａ、ｂ、ｃ、及びｄは、ａ及びｂの合計ならびにｃ及びｄの合計が１２以上であるように選択される。

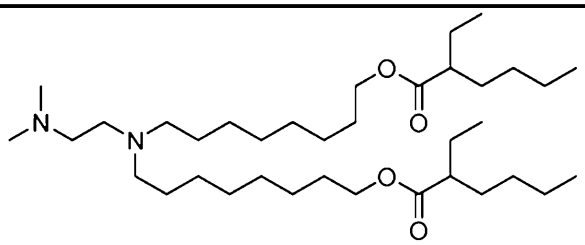
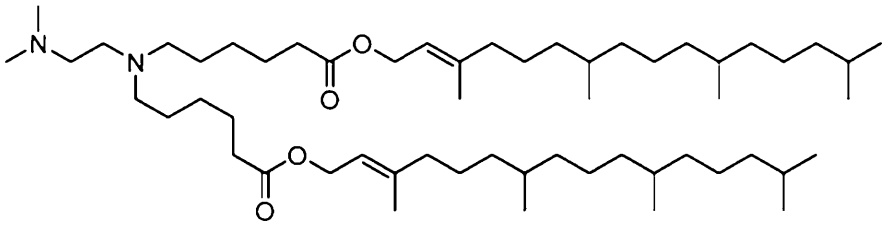
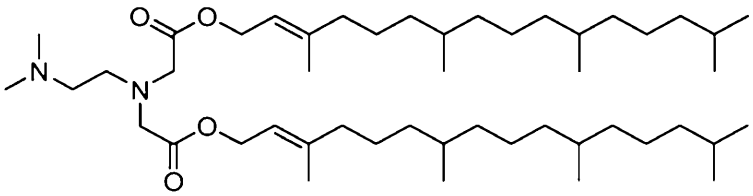
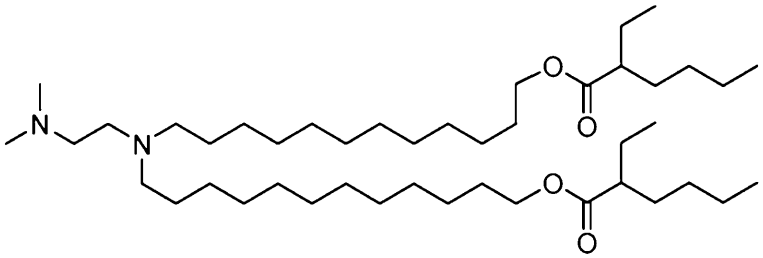
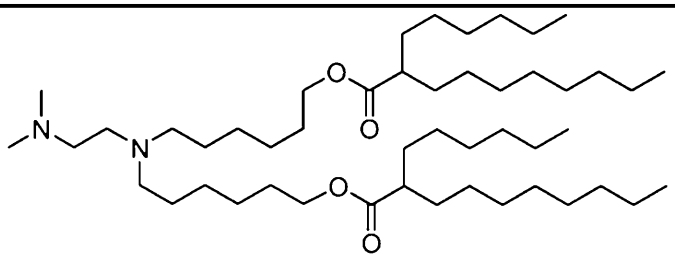
【０３３９】

式Ｉのいくつかの実施形態では、ｅは、１である。他の実施形態では、ｅは、２である。

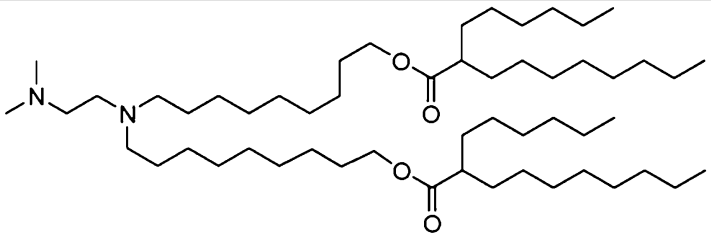
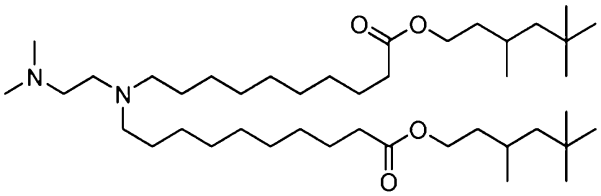
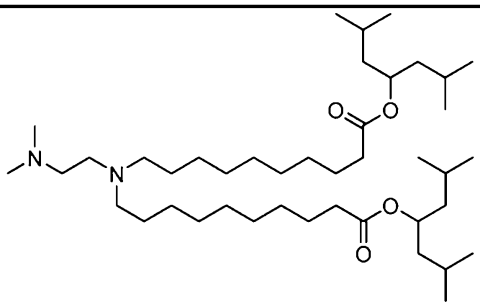
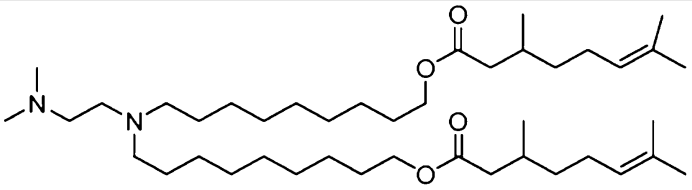
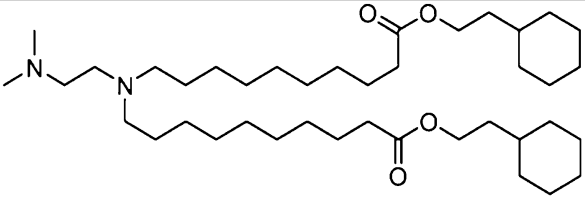
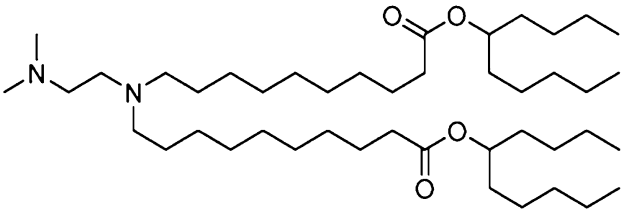
【０３４０】
式ＩのＲ$^{1a}$、Ｒ$^{2a}$、Ｒ$^{3a}$、及びＲ$^{4a}$における置換基は、特に限定されない。特定の実施形態では、Ｒ$^{1a}$、Ｒ$^{2a}$、Ｒ$^{3a}$、及びＲ$^{4a}$は、各存在でＨである。特定の他の実施形態では、Ｒ$^{1a}$、Ｒ$^{2a}$、Ｒ$^{3a}$、及びＲ$^{4a}$の少なくとも１つは、Ｃ$_1$－Ｃ$_{12}$アルキルである。特定の他の実施形態では、Ｒ$^{1a}$、Ｒ$^{2a}$、Ｒ$^{3a}$、及びＲ$^{4a}$の少なくとも１つは、Ｃ$_1$－Ｃ$_8$アルキルである。特定の他の実施形態では、Ｒ$^{1a}$、Ｒ$^{2a}$、Ｒ$^{3a}$、及びＲ$^{4a}$の少なくとも１つは、Ｃ$_1$－Ｃ$_6$アルキルである。いくつかの前述の実施形態では、Ｃ$_1$－Ｃ$_8$アルキルは、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、ｔｅｒｔ－ブチル、ｎ－ヘキシルまたはｎ－オクチルである。
【０３４１】
式Ｉの特定の実施形態では、Ｒ$^{1a}$、Ｒ$^{1b}$、Ｒ$^{4a}$、及びＲ$^{4b}$は、各存在でＣ$_1$－Ｃ$_{12}$アルキルである。
【０３４２】
式Ｉのさらなる実施形態では、Ｒ$^{1b}$、Ｒ$^{2b}$、Ｒ$^{3b}$、及びＲ$^{4b}$の少なくとも１つはＨであるか、またはＲ$^{1b}$、Ｒ$^{2b}$、Ｒ$^{3b}$、及びＲ$^{4b}$は各存在でＨである。
【０３４３】
式Ｉの特定の実施形態では、Ｒ$^{1b}$は、それが結合している炭素原子と一緒になって、隣接するＲ$^{1b}$及びそれが結合している炭素原子と一緒になって、炭素－炭素二重結合を形成する。前述のＲ$^{4b}$の他の実施形態では、それが結合している炭素原子と一緒になって、隣接するＲ$^{4b}$及びそれが結合している炭素原子と一緒になって、炭素－炭素二重結合を形成する。
【０３４４】
式ＩのＲ$^5$及びＲ$^6$の置換基は、前述の実施形態では特に限定されない。特定の実施形態では、Ｒ$^5$またはＲ$^6$の一方または両方がメチルである。特定の他の実施形態では、Ｒ$^5$またはＲ$^6$の一方または両方がシクロアルキル、例えば、シクロヘキシルである。これらの実施形態では、シクロアルキルは、置換されていてもよく、または置換されていなくてもよい。特定の他の実施形態では、シクロアルキルは、Ｃ$_1$－Ｃ$_{12}$アルキル、例えばｔｅｒｔ－ブチルで置換される。
【０３４５】
Ｒ$^7$の置換基は、式Ｉの前述の実施形態では特に限定されない。特定の実施形態では、少なくとも１つのＲ$^7$は、Ｈである。いくつかの他の実施形態では、Ｒ$^7$は、存在毎にＨである。特定の他の実施形態では、Ｒ$^7$は、Ｃ$_1$－Ｃ$_{12}$アルキルである。
【０３４６】
他の特定の式Ｉの前述の実施形態では、Ｒ$^8$またはＲ$^9$の一方は、メチルである。他の実施形態では、Ｒ$^8$及びＲ$^9$は両方とも、メチルである。
【０３４７】
式Ｉのいくつかの異なる実施形態では、Ｒ$^8$及びＲ$^9$は、それらが結合している窒素原子と一緒になって、５員、６員、または７員の複素環を形成する。前述のいくつかの実施形態では、Ｒ$^8$及びＲ$^9$は、それらが結合している窒素原子と一緒になって、５員複素環、例えば、ピロリジニル環を形成する。
【０３４８】
実施形態３のいくつかの実施形態では、第１及び第２のカチオン性脂質は、各々、独立して、式Ｉの脂質から選択される。
【０３４９】
様々な異なる実施形態では、式Ｉの脂質は、以下の表１に示される構造のうちの１つを有する。

【表１－１】

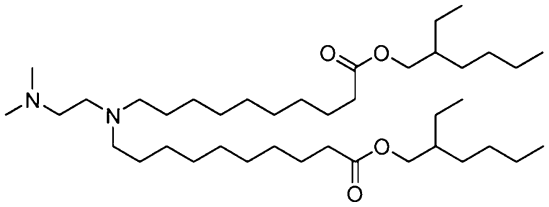
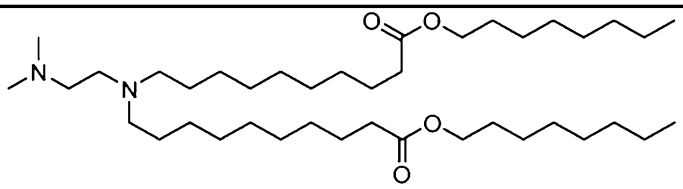
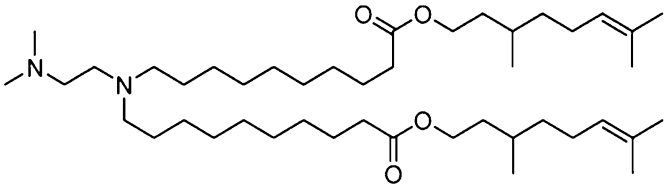
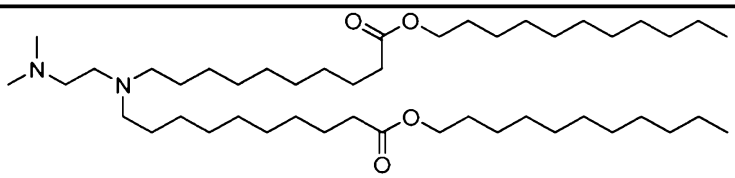
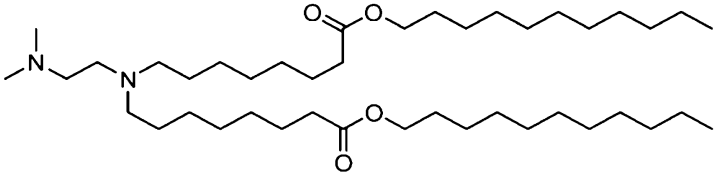
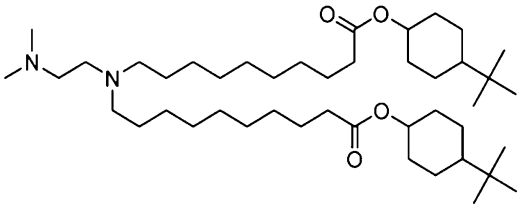
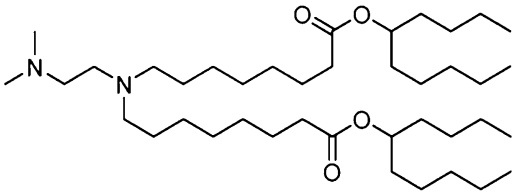
表１：式Ｉの代表的脂質

| 番号 | 構造 | pKa |
|---|---|---|
| I-1 |  | - |
| I-2 |  | 5.64 |
| I-3 |  | 7.15 |
| I-4 |  | 6.43 |
| I-5 |  | 6.28 |

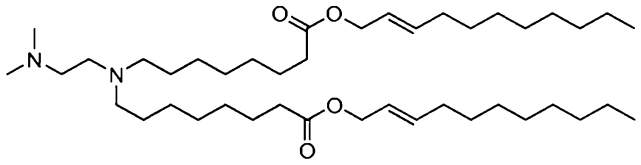
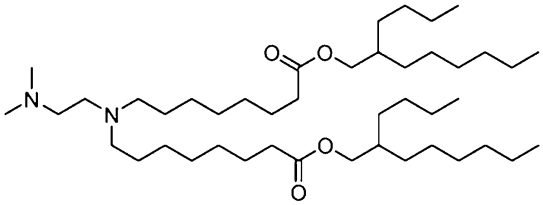
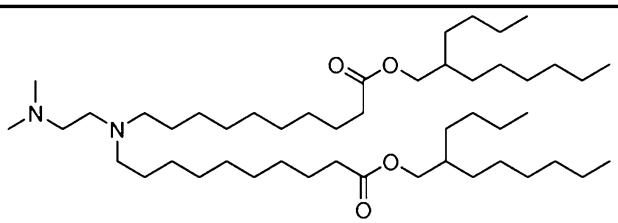
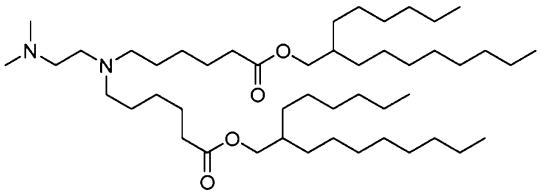
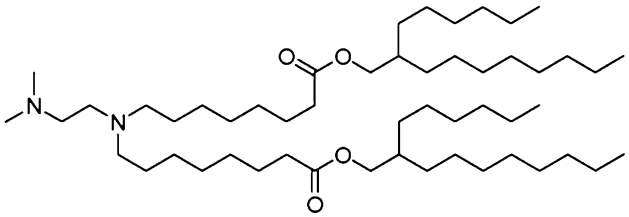
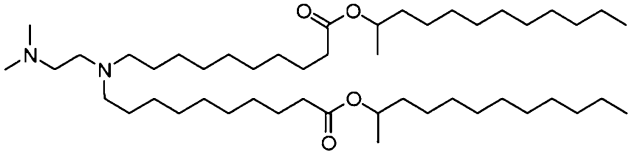
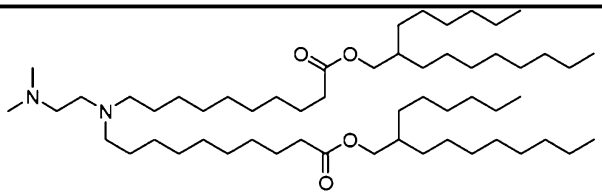
【表１－２】

| 番号 | 構造 | pKa |
|---|---|---|
| I-6 |  | 6.12 |
| I-7 |  | - |
| I-8 |  | - |
| I-9 |  | - |
| I-10 |  | - |
| I-11 |  | 6.36 |

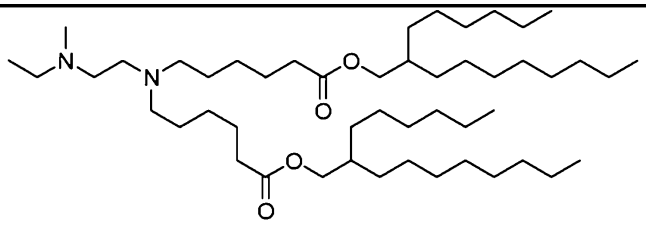
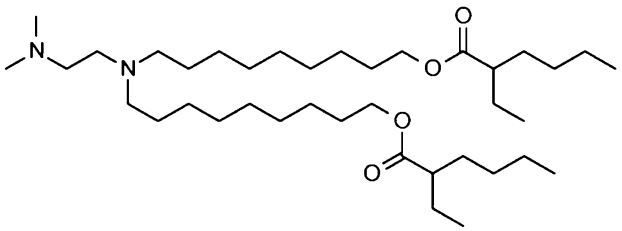
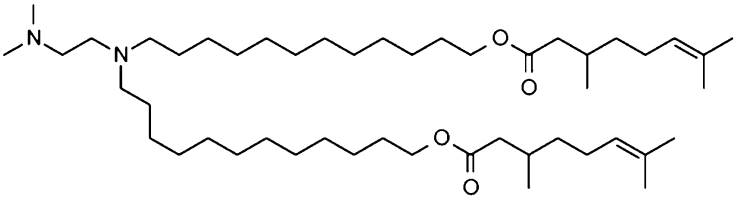
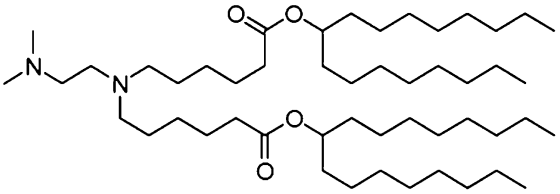
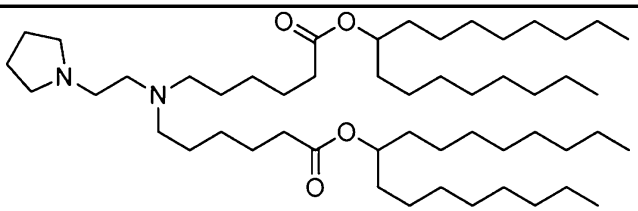
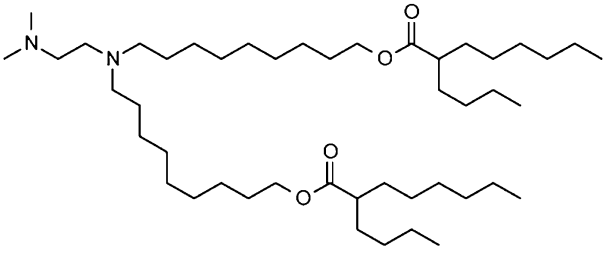
【表１－３】

| 番号 | 構造 | pKa |
|---|---|---|
| I-12 |  | - |
| I-13 |  | 6.51 |
| I-14 |  | - |
| I-15 |  | 6.30 |
| I-16 |  | 6.63 |
| I-17 |  | - |
| I-18 |  | - |

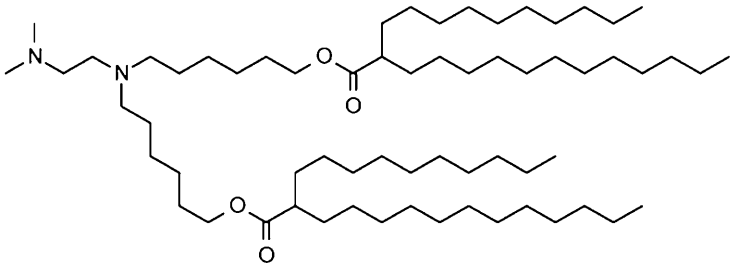
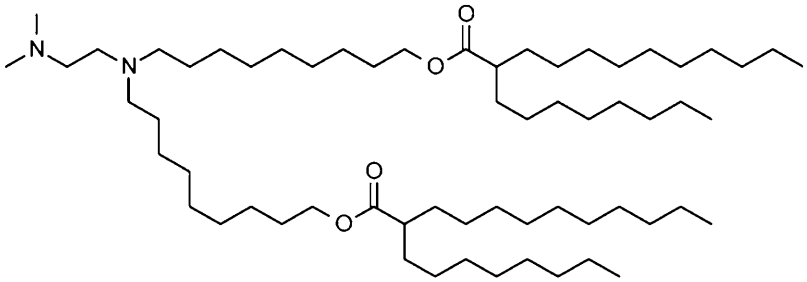
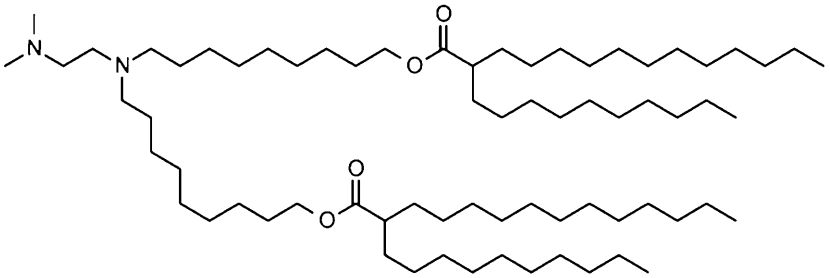
【表１－４】

| 番号 | 構造 | pKa |
|---|---|---|
| I-19 |  | 6.72 |
| I-20 |  | 6.44 |
| I-21 |  | 6.28 |
| I-22 |  | 6.53 |
| I-23 |  | 6.24 |
| I-24 |  | 6.28 |
| I-25 |  | 6.20 |

【表１－５】

| 番号 | 構造 | pKa |
|---|---|---|
| I-33 |  | 6.27 |
| I-34 |  | - |
| I-35 |  | 6.21 |
| I-36 |  | - |
| I-37 |  | - |
| I-38 |  | 6.24 |

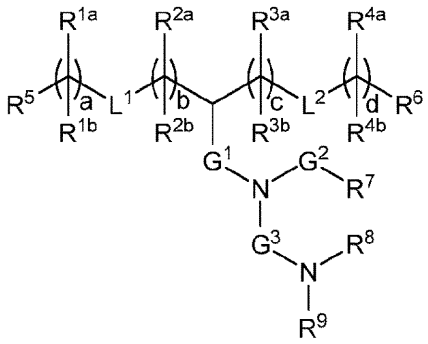
【表１－６】

| 番号 | 構造 | pKa |
|---|---|---|
| I-39 |  | 5.82 |
| I-40 |  | 6.38 |
| I-41 |  | 5.91 |

【０３５０】

いくつかの実施形態では、実施形態１、２、３、４、または５のカチオン性脂質は、式ＩＩの構造を有するか、

【化１５】



II

またはその薬学的に許容可能な塩、互変異性体、プロドラッグもしくは立体異性体であり、

式中、

$L^1$または$L^2$の一方は、－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）－、－（Ｃ＝Ｏ）Ｏ－、－Ｃ（＝Ｏ）－、－Ｏ－、－Ｓ（Ｏ）$_x$－、－Ｓ－Ｓ－、－Ｃ（＝Ｏ）Ｓ－、ＳＣ（＝Ｏ）－、－ＮＲ$^a$Ｃ（

＝Ｏ）－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＲ$^{a}$－、ＮＲ$^{a}$Ｃ（＝Ｏ）ＮＲ$^{a}$－、－ＯＣ（＝Ｏ）ＮＲ$^{a}$－、または－ＮＲ$^{a}$Ｃ（＝Ｏ）Ｏ－であり、Ｌ$^{1}$またはＬ$^{2}$の他方は、－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）－、－（Ｃ＝Ｏ）Ｏ－、－Ｃ（＝Ｏ）－、－Ｏ－、－Ｓ（Ｏ）$_{x}$－、－Ｓ－Ｓ－、－Ｃ（＝Ｏ）Ｓ－、ＳＣ（＝Ｏ）－、－ＮＲ$^{a}$Ｃ（＝Ｏ）－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＲ$^{a}$－、ＮＲ$^{a}$Ｃ（＝Ｏ）ＮＲ$^{a}$－、－ＯＣ（＝Ｏ）ＮＲ$^{a}$－、もしくは
－ＮＲ$^{a}$Ｃ（＝Ｏ）Ｏ－、または直接結合であり、

Ｇ$^{1}$は、Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{2}$アルキレン、－（Ｃ＝Ｏ）－、－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）－、－ＳＣ（＝Ｏ）－、－ＮＲ$^{a}$Ｃ（＝Ｏ）－、または直接結合であり、

Ｇ$^{2}$は、－Ｃ（＝Ｏ）－、－（Ｃ＝Ｏ）Ｏ－、－Ｃ（＝Ｏ）Ｓ－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＲ$^{a}$－、または直接結合であり、

Ｇ$^{3}$は、Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{6}$アルキレンであり、

Ｒ$^{a}$は、ＨまたはＣ$_{1}$－Ｃ$_{12}$アルキルであり、

Ｒ$^{1a}$及びＲ$^{1b}$は、各存在で、独立して、（ａ）ＨもしくはＣ$_{1}$－Ｃ$_{12}$アルキル、または（ｂ）Ｒ$^{1a}$が、ＨもしくはＣ$_{1}$－Ｃ$_{12}$アルキルであり、Ｒ$^{1b}$が、それが結合している炭素原子と一緒になって、隣接するＲ$^{1b}$及びそれが結合している炭素原子と一緒になって、炭素－炭素二重結合を形成するかのいずれかであり、

Ｒ$^{2a}$及びＲ$^{2b}$は、各存在で、独立して、（ａ）ＨもしくはＣ$_{1}$－Ｃ$_{12}$アルキル、または（ｂ）Ｒ$^{2a}$が、ＨもしくはＣ$_{1}$－Ｃ$_{12}$アルキルであり、Ｒ$^{2b}$が、それが結合している炭素原子と一緒になって、隣接するＲ$^{2b}$及びそれが結合している炭素原子と一緒になって、炭素－炭素二重結合を形成するかのいずれかであり、

Ｒ$^{3a}$及びＲ$^{3b}$は、各存在で、独立して、（ａ）ＨもしくはＣ$_{1}$－Ｃ$_{12}$アルキル、または（ｂ）Ｒ$^{3a}$が、ＨもしくはＣ$_{1}$－Ｃ$_{12}$アルキルであり、Ｒ$^{3b}$が、それが結合している炭素原子と一緒になって、隣接するＲ$^{3b}$及びそれが結合している炭素原子と一緒になって、炭素－炭素二重結合を形成するかのいずれかであり、

Ｒ$^{4a}$及びＲ$^{4b}$は、各存在で、独立して、（ａ）ＨもしくはＣ$_{1}$－Ｃ$_{12}$アルキル、または（ｂ）Ｒ$^{4a}$が、ＨもしくはＣ$_{1}$－Ｃ$_{12}$アルキルであり、Ｒ$^{4b}$が、それが結合している炭素原子と一緒になって、隣接するＲ$^{4b}$及びそれが結合している炭素原子と一緒になって、炭素－炭素二重結合を形成するかのいずれかであり、

Ｒ$^{5}$及びＲ$^{6}$は、各々、独立して、Ｈまたはメチルであり、

Ｒ$^{7}$は、Ｃ$_{4}$－Ｃ$_{20}$アルキルであり、

Ｒ$^{8}$及びＲ$^{9}$は、各々、独立して、Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{12}$アルキルであるか、またはＲ$^{8}$及びＲ$^{9}$は、それらが結合している窒素原子と一緒になって、５員、６員、または７員の複素環を形成し、

ａ、ｂ、ｃ、及びｄは、各々、独立して、１～２４の整数であり、

ｘは、０、１、または２である。

【０３５１】

式（ＩＩ）のいくつかの実施形態では、Ｌ$^{1}$及びＬ$^{2}$は、各々、独立して、－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）－、－（Ｃ＝Ｏ）Ｏ－、または直接結合である。他の実施形態では、Ｇ$^{1}$及びＧ$^{2}$は、各々、独立して、－（Ｃ＝Ｏ）－または直接結合である。いくつかの異なる実施形態では、Ｌ$^{1}$及びＬ$^{2}$は、各々、独立して、－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）－、－（Ｃ＝Ｏ）Ｏ－、または直接結合であり、Ｇ$^{1}$及びＧ$^{2}$は、各々、独立して、－（Ｃ＝Ｏ）－または直接結合である。

【０３５２】

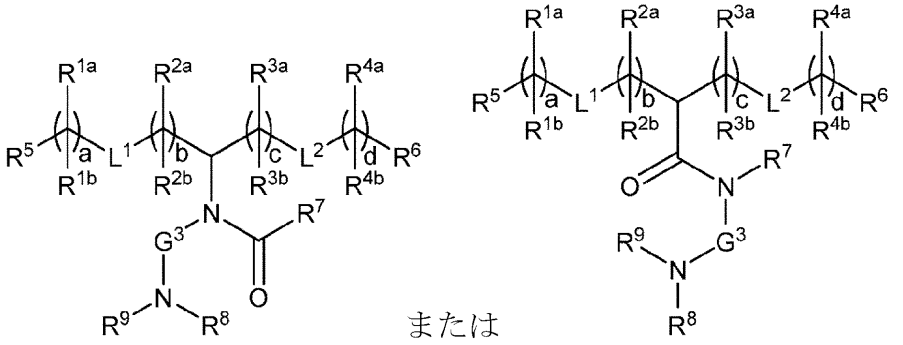
式（ＩＩ）のいくつかの異なる実施形態では、Ｌ$^{1}$及びＬ$^{2}$は、各々、独立して、－Ｃ（＝Ｏ）－、－Ｏ－、－Ｓ（Ｏ）$_{x}$－、－Ｓ－Ｓ－、－Ｃ（＝Ｏ）Ｓ－、－ＳＣ（＝Ｏ）－、－ＮＲ$^{a}$－、－ＮＲ$^{a}$Ｃ（＝Ｏ）－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＲ$^{a}$－、－ＮＲ$^{a}$Ｃ（＝Ｏ）ＮＲ$^{a}$、－ＯＣ（＝Ｏ）ＮＲ$^{a}$－、－ＮＲ$^{a}$Ｃ（＝Ｏ）Ｏ－、－ＮＲ$^{a}$Ｓ（Ｏ）$_{x}$ＮＲ$^{a}$－、－ＮＲ$^{a}$Ｓ（Ｏ）$_{x}$－、または－Ｓ（Ｏ）$_{x}$ＮＲ$^{a}$－である。

【０３５３】

式（ＩＩ）の他の前述の実施形態では、脂質化合物は、以下の式（ＩＩＡ）または（Ｉ

ＩＢ）のうちの１つを有する：

【化１６】




(IIA) (IIB)

【０３５４】

式（ＩＩ）のいくつかの実施形態では、脂質化合物は、式（ＩＩＡ）を有する。他の実施形態では、脂質化合物は、式（ＩＩＢ）を有する。

【０３５５】

式（ＩＩ）の前述の実施形態のいずれかでは、$L^1$または$L^2$の一方は、－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）－である。例えば、いくつかの実施形態では、$L^1$及び$L^2$の各々は、－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）－である。

【０３５６】

式（ＩＩ）のいくつかの異なる実施形態では、$L^1$または$L^2$の一方は、－（Ｃ＝Ｏ）Ｏ－である。例えば、いくつかの実施形態では、$L^1$及び$L^2$の各々は、－（Ｃ＝Ｏ）Ｏ－である。

【０３５７】

式（ＩＩ）の異なる実施形態では、$L^1$または$L^2$の一方は、直接結合である。本明細書で使用される「直接結合」は、基（例えば、$L^1$または$L^2$）が存在しないことを意味する。例えば、いくつかの実施形態では、$L^1$及び$L^2$の各々は、直接結合である。

【０３５８】

式（ＩＩ）の他の異なる実施形態では、$R^{1a}$及び$R^{1b}$の少なくとも１つの存在について、$R^{1a}$が、ＨもしくはＣ$_1$－Ｃ$_{12}$アルキルであり、$R^{1b}$が、それが結合している炭素原子と一緒になって、隣接する$R^{1b}$及びそれが結合している炭素原子と一緒になって、炭素－炭素二重結合を形成する。

【０３５９】

式（ＩＩ）のさらに他の異なる実施形態では、$R^{4a}$及び$R^{4b}$の少なくとも１つの存在について、$R^{4a}$が、ＨもしくはＣ$_1$－Ｃ$_{12}$アルキルであり、$R^{4b}$が、それが結合している炭素原子と一緒になって、隣接する$R^{4b}$及びそれが結合している炭素原子と一緒になって、炭素－炭素二重結合を形成する。

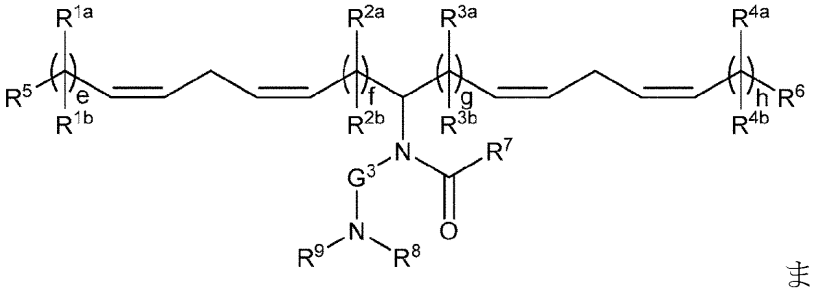
【０３６０】

式（ＩＩ）のさらなる実施形態では、$R^{2a}$及び$R^{2b}$の少なくとも１つの存在について、$R^{2a}$が、ＨもしくはＣ$_1$－Ｃ$_{12}$アルキルであり、$R^{2b}$が、それが結合している炭素原子と一緒になって、隣接する$R^{2b}$及びそれが結合している炭素原子と一緒になって、炭素－炭素二重結合を形成する。

【０３６１】

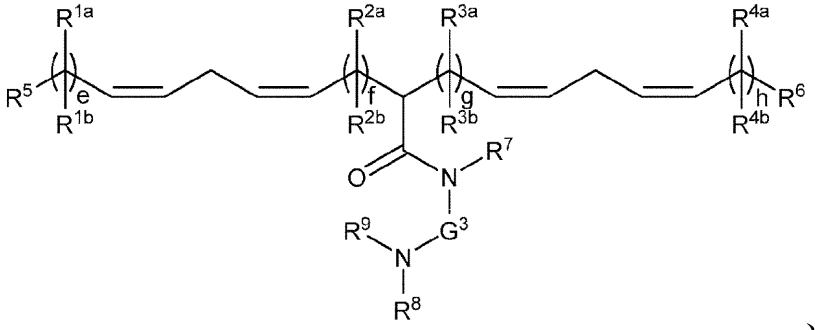
式（ＩＩ）の他の異なる実施形態では、$R^{3a}$及び$R^{3b}$の少なくとも１つの存在について、$R^{3a}$が、ＨもしくはＣ$_1$－Ｃ$_{12}$アルキルであり、$R^{3b}$が、それが結合している炭素原子と一緒になって、隣接する$R^{3b}$及びそれが結合している炭素原子と一緒になって、炭素－炭素二重結合を形成する。

【０３６２】
式（ＩＩ）の様々な他の実施形態では、脂質化合物は、以下の式（ＩＩＣ）または（ＩＩＤ）のうちの１つを有し、
【化１７】



または

(IIC)



、

(IID)

式中、ｅ、ｆ、ｇ、及びｈは、各々、独立して、１～１２の整数である。
【０３６３】
式（ＩＩ）のいくつかの実施形態では、脂質化合物は、式（ＩＩＣ）を有する。他の実施形態では、脂質化合物は、式（ＩＩＤ）を有する。
【０３６４】
式（ＩＩＣ）または（ＩＩＤ）の様々な実施形態では、ｅ、ｆ、ｇ、及びｈは、各々、独立して、４～１０の整数である。
【０３６５】
式（ＩＩ）の特定の実施形態では、ａ、ｂ、ｃ、及びｄは、各々、独立して、２～１２の整数、または４～１２の整数である。他の実施形態では、ａ、ｂ、ｃ、及びｄは、各々、独立して、８～１２または５～９の整数である。いくつかの特定の実施形態では、ａは、０である。いくつかの実施形態では、ａは、１である。他の実施形態では、ａは、２である。より多くの実施形態では、ａは、３である。さらに他の実施形態では、ａは、４である。いくつかの実施形態では、ａは、５である。他の実施形態では、ａは、６である。より多くの実施形態では、ａは、７である。さらに他の実施形態では、ａは、８である。いくつかの実施形態では、ａは、９である。他の実施形態では、ａは、１０である。さらなる実施形態では、ａは、１１である。さらに他の実施形態では、ａは、１２である。いくつかの実施形態では、ａは、１３である。他の実施形態では、ａは、１４である。さらなる実施形態では、ａは、１５である。さらに他の実施形態では、ａは、１６である。
【０３６６】
式（ＩＩ）のいくつかの実施形態では、ｂは、１である。他の実施形態では、ｂは、２である。さらなる実施形態では、ｂは、３である。さらに他の実施形態では、ｂは、４である。いくつかの実施形態では、ｂは、５である。他の実施形態では、ｂは、６である。さらなる実施形態では、ｂは、７である。さらに他の実施形態では、ｂは、８である。い

くつかの実施形態では、ｂは、９である。他の実施形態では、ｂは、１０である。さらなる実施形態では、ｂは、１１である。さらに他の実施形態では、ｂは、１２である。いくつかの実施形態では、ｂは、１３である。他の実施形態では、ｂは、１４である。さらなる実施形態では、ｂは、１５である。さらに他の実施形態では、ｂは、１６である。

【０３６７】

式（ＩＩ）のいくつかの実施形態では、ｃは、１である。他の実施形態では、ｃは、２である。さらなる実施形態では、ｃは、３である。さらに他の実施形態では、ｃは、４である。いくつかの実施形態では、ｃは、５である。他の実施形態では、ｃは、６である。さらなる実施形態では、ｃは、７である。さらに他の実施形態では、ｃは、８である。いくつかの実施形態では、ｃは、９である。他の実施形態では、ｃは、１０である。さらなる実施形態では、ｃは、１１である。さらに他の実施形態では、ｃは、１２である。いくつかの実施形態では、ｃは、１３である。他の実施形態では、ｃは、１４である。さらなる実施形態では、ｃは、１５である。さらに他の実施形態では、ｃは、１６である。

【０３６８】

式（ＩＩ）のいくつかの特定の実施形態では、ｄは、０である。いくつかの実施形態では、ｄは、１である。他の実施形態では、ｄは、２である。さらなる実施形態では、ｄは、３である。さらに他の実施形態では、ｄは、４である。いくつかの実施形態では、ｄは、５である。他の実施形態では、ｄは、６である。さらなる実施形態では、ｄは、７である。さらに他の実施形態では、ｄは、８である。いくつかの実施形態では、ｄは、９である。他の実施形態では、ｄは、１０である。さらなる実施形態では、ｄは、１１である。さらに他の実施形態では、ｄは、１２である。いくつかの実施形態では、ｄは、１３である。他の実施形態では、ｄは、１４である。さらなる実施形態では、ｄは、１５である。さらに他の実施形態では、ｄは、１６である。

【０３６９】

式（ＩＩ）のいくつかの実施形態では、ｅは、１である。他の実施形態では、ｅは、２である。さらなる実施形態では、ｅは、３である。さらに他の実施形態では、ｅは、４である。いくつかの実施形態では、ｅは、５である。他の実施形態では、ｅは、６である。さらなる実施形態では、ｅは、７である。さらに他の実施形態では、ｅは、８である。いくつかの実施形態では、ｅは、９である。他の実施形態では、ｅは、１０である。さらなる実施形態では、ｅは、１１である。さらに他の実施形態では、ｅは、１２である。

【０３７０】

式（ＩＩ）のいくつかの実施形態では、ｆは、１である。他の実施形態では、ｆは、２である。さらなる実施形態では、ｆは、３である。さらに他の実施形態では、ｆは、４である。いくつかの実施形態では、ｆは、５である。他の実施形態では、ｆは、６である。さらなる実施形態では、ｆは、７である。さらに他の実施形態では、ｆは、８である。いくつかの実施形態では、ｆは、９である。他の実施形態では、ｆは、１０である。さらなる実施形態では、ｆは、１１である。さらに他の実施形態では、ｆは、１２である。

【０３７１】

式（ＩＩ）のいくつかの実施形態では、ｇは、１である。他の実施形態では、ｇは、２である。さらなる実施形態では、ｇは、３である。さらに他の実施形態では、ｇは、４である。いくつかの実施形態では、ｇは、５である。他の実施形態では、ｇは、６である。さらなる実施形態では、ｇは、７である。さらに他の実施形態では、ｇは、８である。いくつかの実施形態では、ｇは、９である。他の実施形態では、ｇは、１０である。さらなる実施形態では、ｇは、１１である。さらに他の実施形態では、ｇは、１２である。

【０３７２】

式（ＩＩ）のいくつかの実施形態では、ｈは、１である。他の実施形態では、ｅは、２である。さらなる実施形態では、ｈは、３である。さらに他の実施形態では、ｈは、４である。いくつかの実施形態では、ｅは、５である。他の実施形態では、ｈは、６である。さらなる実施形態では、ｈは、７である。さらに他の実施形態では、ｈは、８である。いくつかの実施形態では、ｈは、９である。他の実施形態では、ｈは、１０である。さらな

る実施形態では、ｈは、１１である。さらに他の実施形態では、ｈは、１２である。

【０３７３】

式（ＩＩ）のいくつかの他の様々な実施形態では、ａ及びｄは、同じである。いくつかの他の実施形態では、ｂ及びｃは、同じである。いくつかの他の特定の実施形態では、ａ及びｄは、同じであり、ｂ及びｃは、同じである。

【０３７４】

式（ＩＩ）のａ及びｂの合計ならびにｃ及びｄの合計は、所望の特性を有する脂質を得るために変化し得る因子である。一実施形態では、ａ及びｂは、それらの合計が１４～２４の範囲の整数であるように選択される。他の実施形態では、ｃ及びｄは、それらの合計が１４～２４の範囲の整数であるように選択される。さらなる実施形態では、ａ及びｂの合計ならびにｃ及びｄの合計は、同じである。例えば、いくつかの実施形態では、ａ及びｂの合計ならびにｃ及びｄの合計は両方とも、１４～２４の範囲であり得る同じ整数である。なおさらなる実施形態では、ａ、ｂ、ｃ、及びｄは、ａ及びｂの合計ならびにｃ及びｄの合計が１２以上であるように選択される。

【０３７５】

式（ＩＩ）の$R^{1a}$、$R^{2a}$、$R^{3a}$、及び$R^{4a}$における置換基は、特に限定されない。いくつかの実施形態では、$R^{1a}$、$R^{2a}$、$R^{3a}$、及び$R^{4a}$の少なくとも１つは、Ｈである。特定の実施形態では、$R^{1a}$、$R^{2a}$、$R^{3a}$、及び$R^{4a}$は、各存在でＨである。特定の他の実施形態では、$R^{1a}$、$R^{2a}$、$R^{3a}$、及び$R^{4a}$の少なくとも１つは、$C_1$－$C_{12}$アルキルである。特定の他の実施形態では、$R^{1a}$、$R^{2a}$、$R^{3a}$、及び$R^{4a}$の少なくとも１つは、$C_1$－$C_8$アルキルである。特定の他の実施形態では、$R^{1a}$、$R^{2a}$、$R^{3a}$、及び$R^{4a}$の少なくとも１つは、$C_1$－$C_6$アルキルである。いくつかの前述の実施形態では、$C_1$－$C_8$アルキルは、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、ｔｅｒｔ－ブチル、ｎ－ヘキシルまたはｎ－オクチルである。

【０３７６】

式（ＩＩ）の特定の実施形態では、$R^{1a}$、$R^{1b}$、$R^{4a}$、及び$R^{4b}$は、各存在で$C_1$－$C_{12}$アルキルである。

【０３７７】

式（ＩＩ）のさらなる実施形態では、$R^{1b}$、$R^{2b}$、$R^{3b}$、及び$R^{4b}$の少なくとも１つはＨであるか、または$R^{1b}$、$R^{2b}$、$R^{3b}$、及び$R^{4b}$は各存在でＨである。

【０３７８】

式（ＩＩ）の特定の実施形態では、$R^{1b}$は、それが結合している炭素原子と一緒になって、隣接する$R^{1b}$及びそれが結合している炭素原子と一緒になって、炭素－炭素二重結合を形成する。前述の$R^{4b}$の他の実施形態では、それが結合している炭素原子と一緒になって、隣接する$R^{4b}$及びそれが結合している炭素原子と一緒になって、炭素－炭素二重結合を形成する。

【０３７９】

式（ＩＩ）の$R^5$及び$R^6$の置換基は、前述の実施形態では特に限定されない。特定の実施形態では、$R^5$または$R^6$の一方は、メチルである。他の実施形態では、$R^5$または$R^6$の各々は、メチルである。

【０３８０】

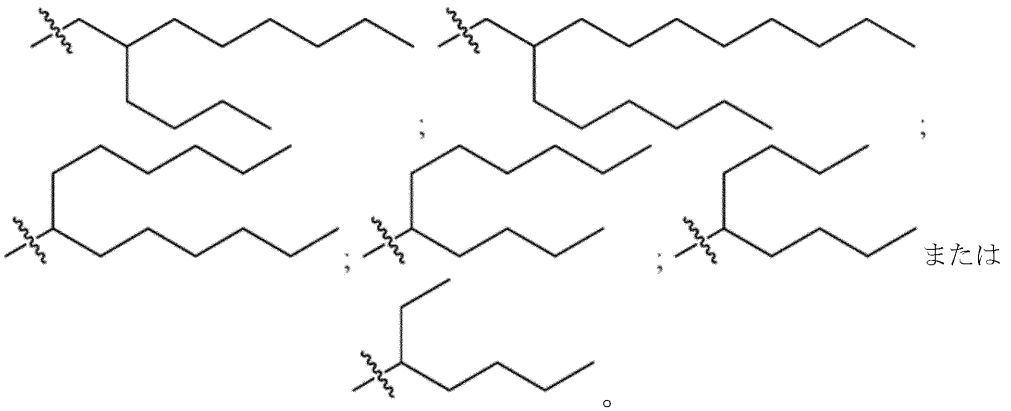
式（ＩＩ）の$R^7$の置換基は、前述の実施形態では特に限定されない。特定の実施形態では、$R^7$は、$C_6$－$C_{16}$アルキルである。いくつかの他の実施形態では、$R^7$は、$C_6$－$C_9$アルキルである。いくつかのこれらの実施形態では、$R^7$は、－（Ｃ＝Ｏ）Ｏ$R^b$、－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）$R^b$、－Ｃ（＝Ｏ）$R^b$、－Ｏ$R^b$、－Ｓ（Ｏ）$_x$$R^b$、－Ｓ－Ｓ$R^b$、－Ｃ（＝Ｏ）Ｓ$R^b$、－ＳＣ（＝Ｏ）$R^b$、－Ｎ$R^a$$R^b$、－Ｎ$R^a$Ｃ（＝Ｏ）$R^b$、－Ｃ（＝Ｏ）Ｎ$R^a$$R^b$、－Ｎ$R^a$Ｃ（＝Ｏ）Ｎ$R^a$$R^b$、－ＯＣ（＝Ｏ）Ｎ$R^a$$R^b$、－Ｎ$R^a$Ｃ（＝Ｏ）Ｏ$R^b$、－Ｎ$R^a$Ｓ（Ｏ）$_x$Ｎ$R^a$$R^b$、－Ｎ$R^a$Ｓ（Ｏ）$_x$$R^b$、または－Ｓ（Ｏ）$_x$Ｎ$R^a$$R^b$で置換され、

式中、$R^a$は、Ｈまたは$C_1$－$C_{12}$アルキルであり、$R^b$は、$C_1$－$C_{15}$アルキルであり、ｘは、０、１、または２である。例えば、いくつかの実施形態では、$R^7$は、－（Ｃ＝Ｏ）Ｏ$R^b$または－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）$R^b$で置換される。

【０３８１】

式（ＩＩ）のいくつかの前述の実施形態では、$R^b$は、分岐$C_1$－$C_{16}$アルキルである。例えば、いくつかの実施形態では、$R^b$は、以下の構造のうちの１つを有する：

【化１８】




【０３８２】

他の特定の式（ＩＩ）の前述の実施形態では、$R^8$または$R^9$の一方は、メチルである。他の実施形態では、$R^8$及び$R^9$は両方とも、メチルである。

【０３８３】

式（ＩＩ）のいくつかの異なる実施形態では、$R^8$及び$R^9$は、それらが結合している窒素原子と一緒になって、５員、６員、または７員の複素環を形成する。前述のいくつかの実施形態では、$R^8$及び$R^9$は、それらが結合している窒素原子と一緒になって、５員複素環、例えば、ピロリジニル環を形成する。前述のいくつかの実施形態では、$R^8$及び$R^9$は、それらが結合している窒素原子と一緒になって、６員複素環、例えば、ピロリジニル環を形成する。

【０３８４】

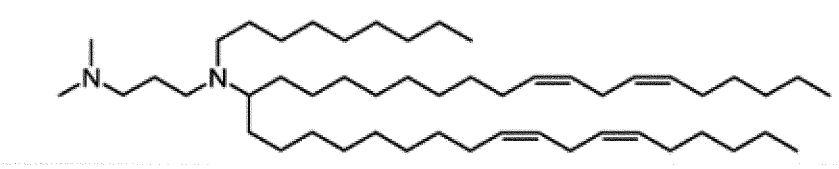
実施形態３の特定の実施形態では、第１及び第２のカチオン性脂質は、各々、独立して、式ＩＩの脂質から選択される。

【０３８５】

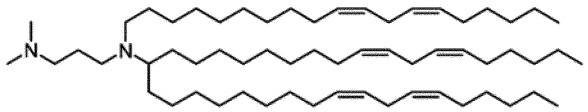
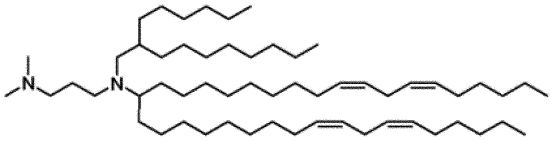
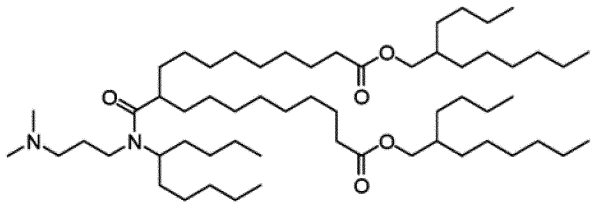
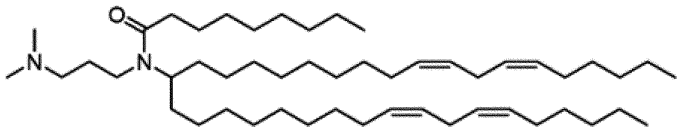
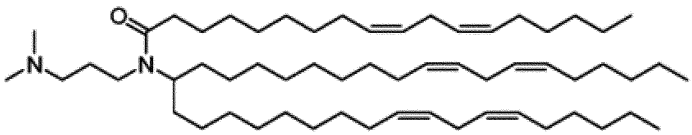
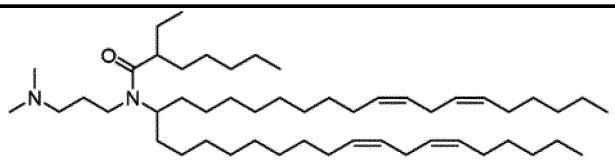
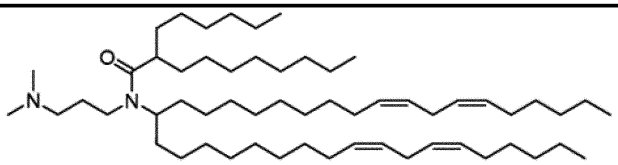
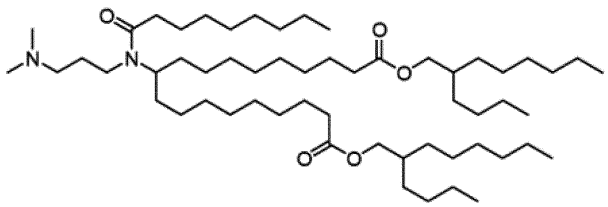
前述の式（ＩＩ）の脂質のさらに他の実施形態では、$G^3$は、$C_2$－$C_4$アルキレン、例えば、$C_3$アルキレンである。様々な異なる実施形態では、脂質化合物は、以下の表２に示される構造のうちの１つを有する

【表２－１】

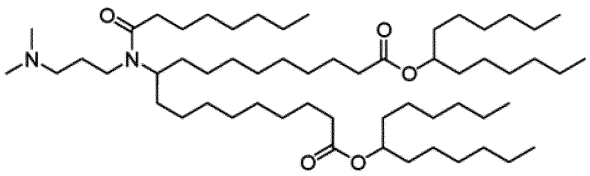
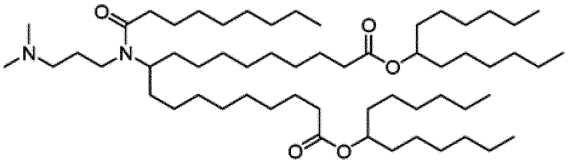
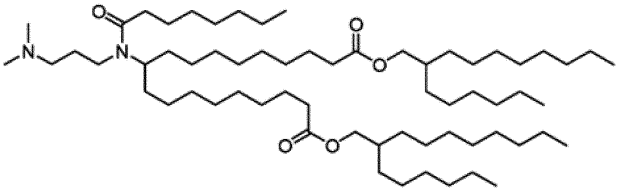
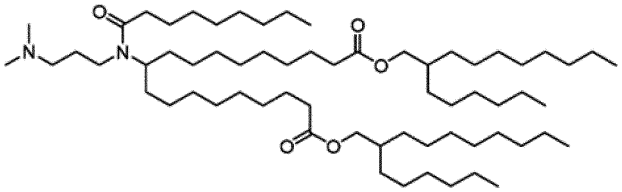
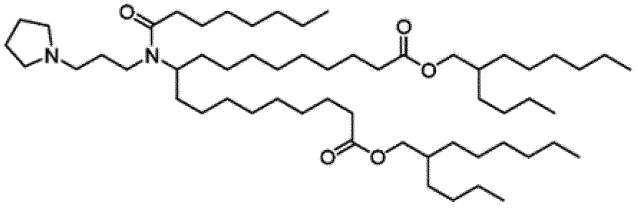
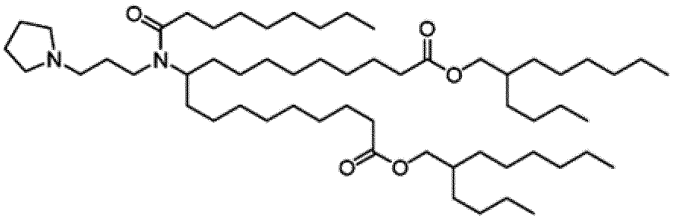
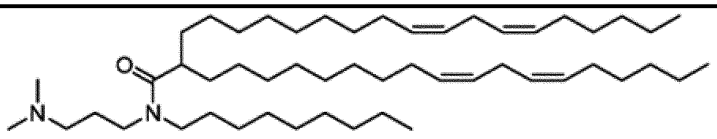
表２：式（ＩＩ）の代表的脂質

| 番号 | 構造 | pKa |
|---|---|---|
| II-1 |  | 5.64 |

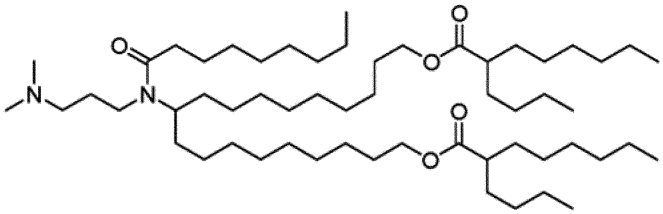
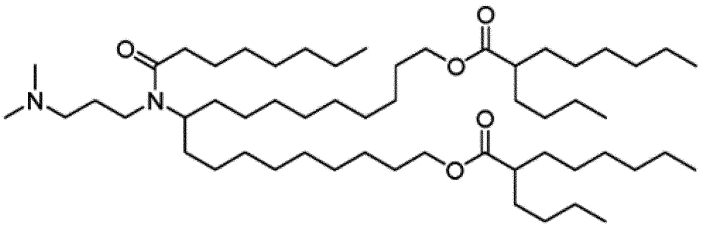
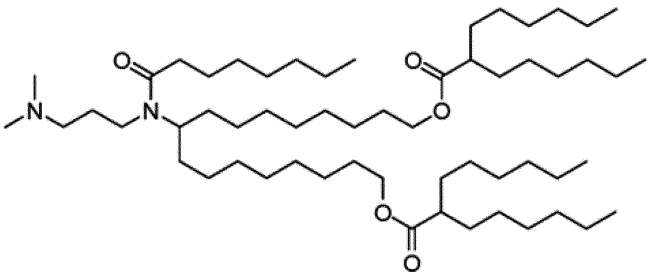
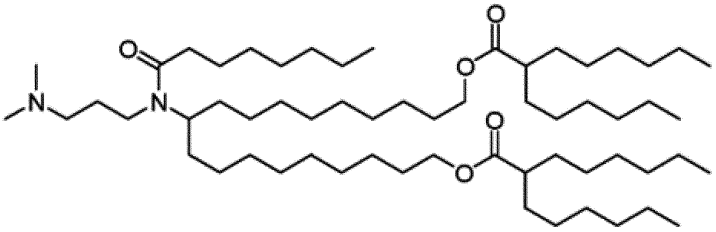
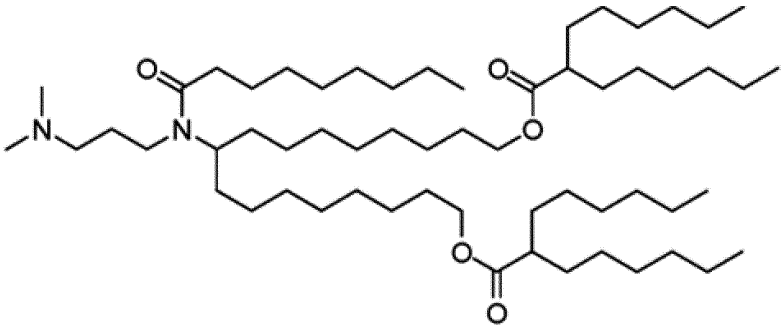
【表２－２】

| 番号 | 構造 | pKa |
|---|---|---|
| II-2 |  | - |
| II-3 |  | - |
| II-4 |  | - |
| II-5 |  | 6.27 |
| II-6 |  | 6.14 |
| II-7 |  | 5.93 |
| II-8 |  | 5.35 |
| II-9 |  | 6.27 |

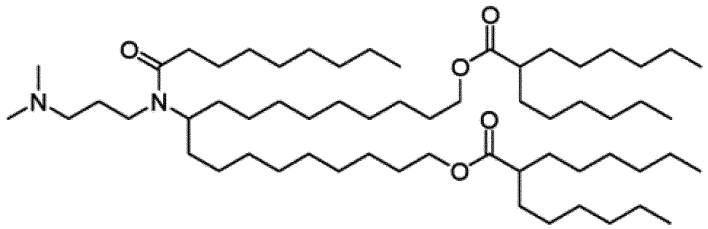
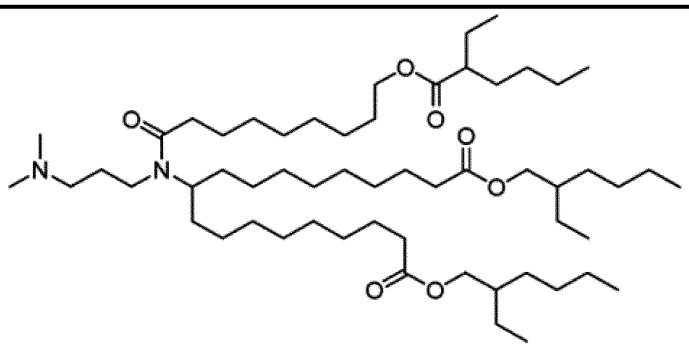
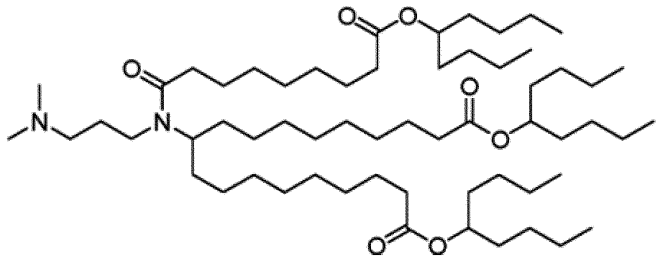
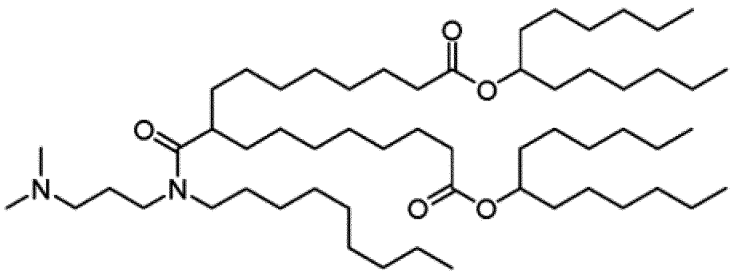
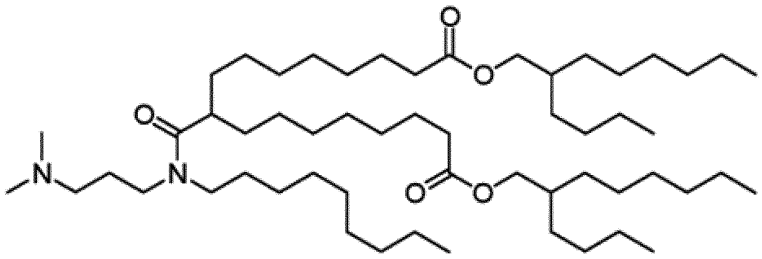
【表２－３】

| 番号 | 構造 | pKa |
|---|---|---|
| II-10 |  | 6.16 |
| II-11 |  | 6.13 |
| II-12 |  | 6.21 |
| II-13 |  | 6.22 |
| II-14 |  | 6.33 |
| II-15 |  | 6.32 |
| II-16 |  | 6.37 |

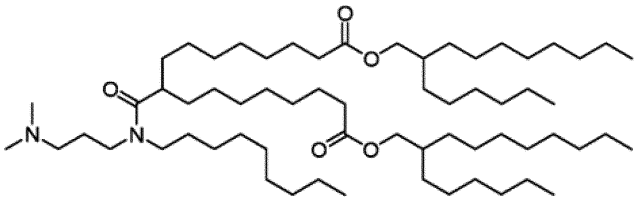
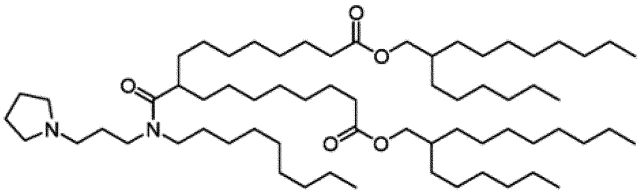
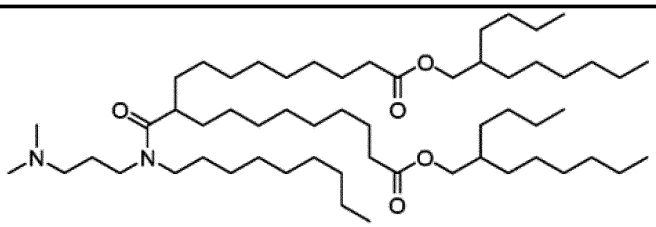
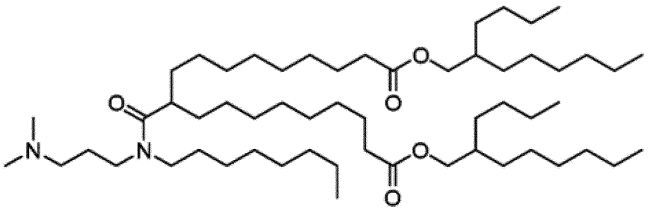
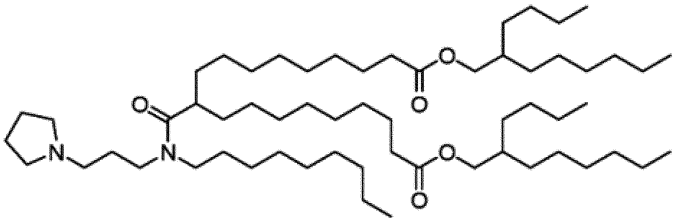
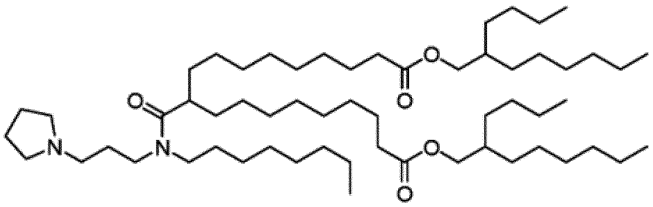
【表２－４】

| 番号 | 構造 | pKa |
|---|---|---|
| II-17 |  | 6.27 |
| II-18 |  | - |
| II-19 |  | - |
| II-20 |  | - |
| II-21 |  | - |

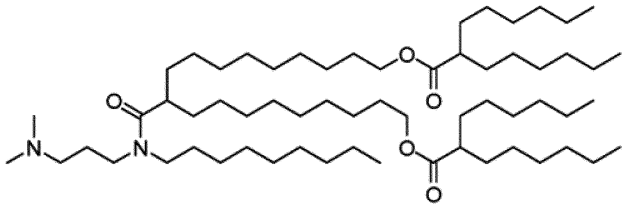
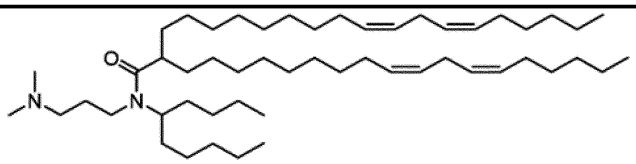
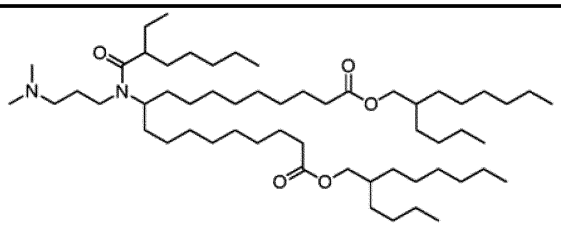
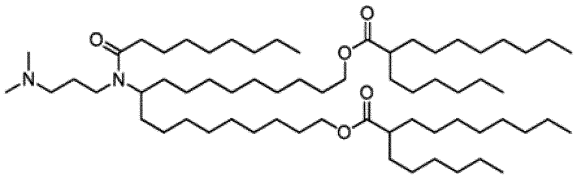
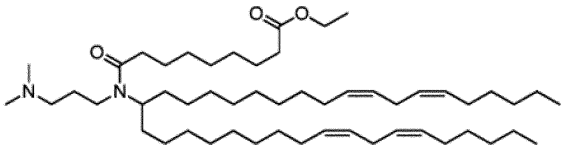
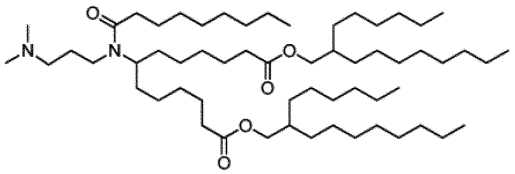
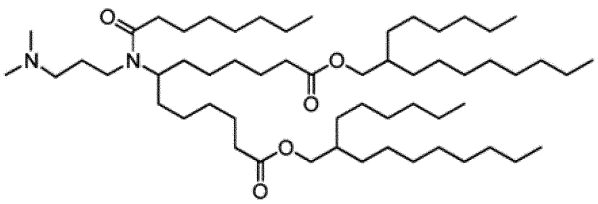
【表２－５】

| 番号 | 構造 | pKa |
|---|---|---|
| II-22 |  | - |
| II-23 |  | - |
| II-24 |  | 6.14 |
| II-25 |  | - |
| II-26 |  | - |

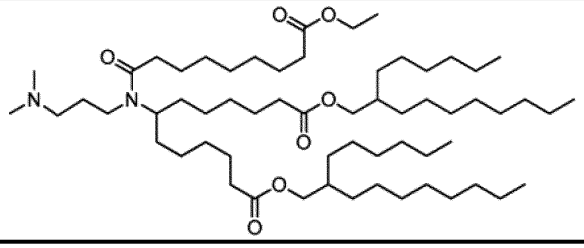
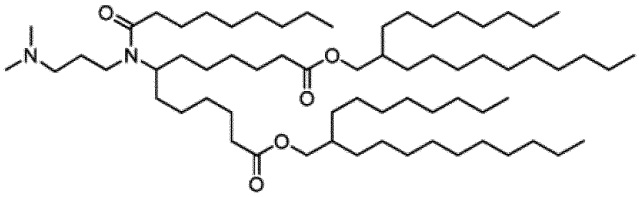
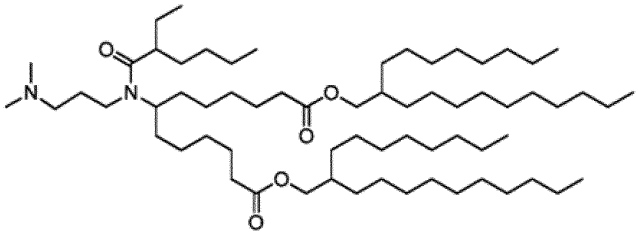
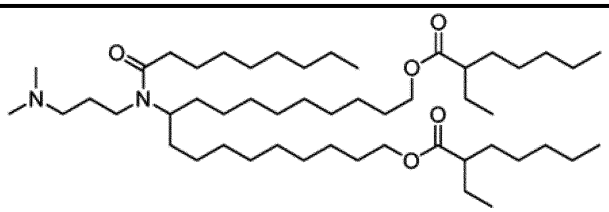
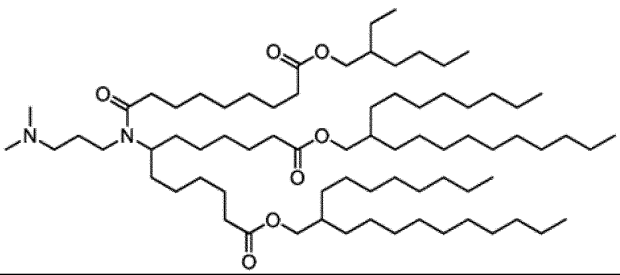
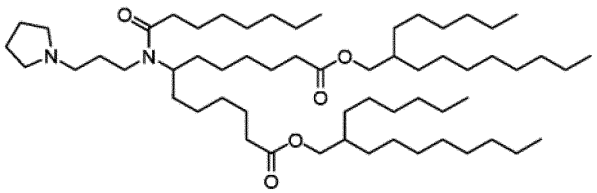
【表２－６】

| 番号 | 構造 | pKa |
|---|---|---|
| II-27 |  | - |
| II-28 |  | - |
| II-29 |  | - |
| II-30 |  | - |
| II-31 |  | - |
| II-32 |  | - |

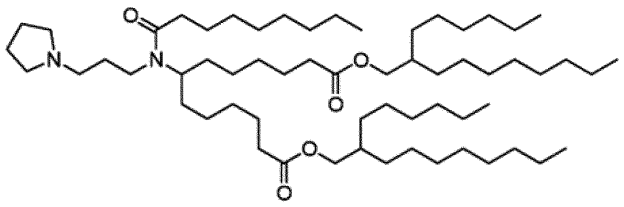
【表２－７】

| 番号 | 構造 | pKa |
|---|---|---|
| II-33 |  | - |
| II-34 |  | - |
| II-35 |  | 5.97 |
| II-36 |  | 6.13 |
| II-37 |  | 5.61 |
| II-38 |  | 6.45 |
| II-39 |  | 6.45 |

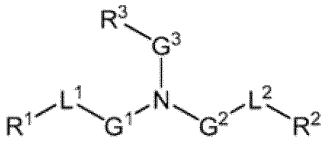
【表２－８】

| 番号 | 構造 | pKa |
|---|---|---|
| II-40 |  | 6.57 |
| II-41 |  | - |
| II-42 |  | - |
| II-43 |  | - |
| II-44 |  | - |
| II-45 |  | - |

【表２－９】

| 番号 | 構造 | pKa |
|---|---|---|
| II-46 |  | - |

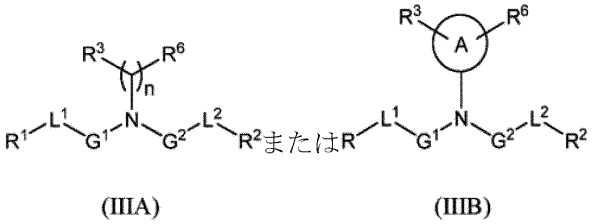
【０３８６】
いくつかの他の実施形態では、実施形態１、２、３、４、または５のカチオン性脂質は、式ＩＩＩの構造を有するか、
【化１９】



III

またはその薬学的に許容可能な塩、プロドラッグもしくは立体異性体であり、式中、
$L^1$または$L^2$の一方は、－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）－、－（Ｃ＝Ｏ）Ｏ－、－Ｃ（＝Ｏ）－、－Ｏ－、－Ｓ（Ｏ）$_x$－、－Ｓ－Ｓ－、－Ｃ（＝Ｏ）Ｓ－、ＳＣ（＝Ｏ）－、－ＮＲ$^a$Ｃ（＝Ｏ）－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＲ$^a$－、ＮＲ$^a$Ｃ（＝Ｏ）ＮＲ$^a$－、－ＯＣ（＝Ｏ）ＮＲ$^a$－、または－ＮＲ$^a$Ｃ（＝Ｏ）Ｏ－であり、$L^1$または$L^2$の他方は、－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）－、－（Ｃ＝Ｏ）Ｏ－、－Ｃ（＝Ｏ）－、－Ｏ－、－Ｓ（Ｏ）$_x$－、－Ｓ－Ｓ－、－Ｃ（＝Ｏ）Ｓ－、ＳＣ（＝Ｏ）－、－ＮＲ$^a$Ｃ（＝Ｏ）－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＲ$^a$－、ＮＲ$^a$Ｃ（＝Ｏ）ＮＲ$^a$－、－ＯＣ（＝Ｏ）ＮＲ$^a$－、もしくは
－ＮＲ$^a$Ｃ（＝Ｏ）Ｏ－、または直接結合であり、
$G^1$及び$G^2$は、各々、独立して、非置換Ｃ$_1$－Ｃ$_{12}$アルキレンまたはＣ$_1$－Ｃ$_{12}$アルケニレンであり、
$G^3$は、Ｃ$_1$－Ｃ$_{24}$アルキレン、Ｃ$_1$－Ｃ$_{24}$アルケニレン、Ｃ$_3$－Ｃ$_8$シクロアルキレン、Ｃ$_3$－Ｃ$_8$シクロアルケニレンであり、
Ｒ$^a$は、ＨまたはＣ$_1$－Ｃ$_{12}$アルキルであり、
$R^1$及び$R^2$は、各々、独立して、Ｃ$_6$－Ｃ$_{24}$アルキルまたはＣ$_6$－Ｃ$_{24}$アルケニルであり、
$R^3$は、Ｈ、ＯＲ$^5$、ＣＮ、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＲ$^4$、－ＯＣ（＝Ｏ）Ｒ$^4$または－ＮＲ$^5$Ｃ（＝Ｏ）Ｒ$^4$であり、
$R^4$は、Ｃ$_1$－Ｃ$_{12}$アルキルであり、
$R^5$は、ＨまたはＣ$_1$－Ｃ$_6$アルキルであり、
ｘは、０、１、または２である。
【０３８７】
式（ＩＩＩ）のいくつかの前述の実施形態では、脂質は、以下の式（ＩＩＩＡ）または（ＩＩＩＢ）のうちの１つを有し、

【化２０】



(IIIA) (IIIB)

式中、
Ａは、３～８員シクロアルキルまたはシクロアルキレン環であり、
$R^6$は、各存在で、独立して、Ｈ、ＯＨまたは$C_1$－$C_{24}$アルキルであり、
ｎは、１～１５の範囲の整数である。

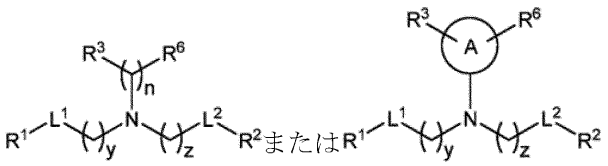
【０３８８】

式（ＩＩＩ）のいくつかの前述の実施形態では、脂質は、式（ＩＩＩＡ）を有し、他の実施形態では、脂質は、式（ＩＩＩＢ）を有する。

【０３８９】

式（ＩＩＩ）の他の実施形態では、脂質は、以下の式（ＩＩＩＣ）または（ＩＩＩＤ）のうちの１つを有し、

【化２１】



(IIIC) (IIID)

式中、ｙ及びｚは、各々、独立して、１～１２の範囲の整数である。

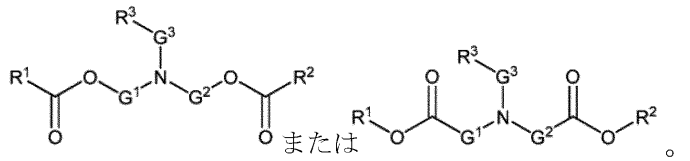
【０３９０】

式（ＩＩＩ）の前述の実施形態のいずれかでは、$L^1$または$L^2$の一方は、－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）－である。例えば、いくつかの実施形態では、$L^1$及び$L^2$の各々は、－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）－である。前述のいずれかのいくつかの異なる実施形態では、$L^1$及び$L^2$は、各々、独立して、－（Ｃ＝Ｏ）Ｏ－または－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）－である。例えば、いくつかの実施形態では、$L^1$及び$L^2$の各々は、－（Ｃ＝Ｏ）Ｏ－である。

【０３９１】

式（ＩＩＩ）のいくつかの異なる実施形態では、脂質は、以下の式（ＩＩＩＥ）または（ＩＩＩＦ）のうちの１つを有する：

【化２２】



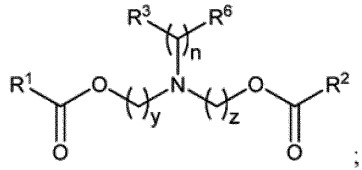
(IIIE) (IIIF)

。

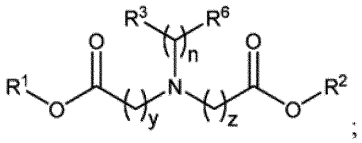
【０３９２】

式（ＩＩＩ）のいくつかの前述の実施形態では、脂質は、以下の式（ＩＩＩＧ）、（ＩＩＩＨ）、（ＩＩＩＩ）、または（ＩＩＩＪ）のうちの１つを有する：

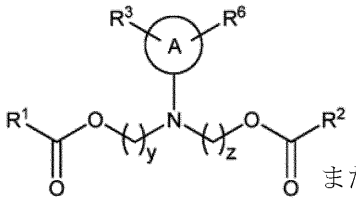
【化２３】


;

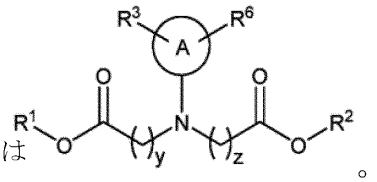
(IIIG)


;

(IIIH)


または

(III)


。

(IIIJ)

【０３９３】

式（ＩＩＩ）のいくつかの前述の実施形態では、ｎは、２～１２、例えば、２～８または２～４の範囲の整数である。例えば、いくつかの実施形態では、ｎは、３、４、５または６である。いくつかの実施形態では、ｎは、３である。いくつかの実施形態では、ｎは、４である。いくつかの実施形態では、ｎは、５である。いくつかの実施形態では、ｎは、６である。

【０３９４】

式（ＩＩＩ）のいくつかの他の前述の実施形態では、ｙ及びｚは、各々、独立して、２～１０の範囲の整数である。例えば、いくつかの実施形態では、ｙ及びｚは、各々、独立して、４～９または４～６の範囲の整数である。

【０３９５】

式（ＩＩＩ）のいくつかの前述の実施形態では、$R^6$は、Ｈである。他の前述の実施形態では、$R^6$は、$C_1-C_{24}$アルキルである。他の実施形態では、$R^6$は、ＯＨである。

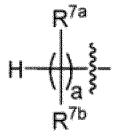
【０３９６】

式（ＩＩＩ）のいくつかの実施形態では、$G^3$は、非置換である。他の実施形態では、Ｇ３は、置換される。様々な異なる実施形態では、$G^3$は、直鎖状$C_1-C_{24}$アルキレンまたは直鎖状$C_1-C_{24}$アルケニレンである。

【０３９７】

式（ＩＩＩ）のいくつかの他の前述の実施形態では、$R^1$もしくは$R^2$、またはその両方は、$C_6-C_{24}$アルケニルである。例えば、いくつかの実施形態では、$R^1$及び$R^2$は、各々、独立して、以下の構造を有し、

【化２４】


,

式中、

$R^{7a}$及び$R^{7b}$は、各存在で、独立して、Ｈまたは$C_1-C_{12}$アルキルであり、

ａは、２～１２の整数であり、

$R^{7a}$、$R^{7b}$及びａは、各々、$R^1$及び$R^2$が、各々、独立して、６～２０個の炭素原子を含むように選択される。例えば、いくつかの実施形態では、ａは、５～９または８

～１２の範囲の整数である。

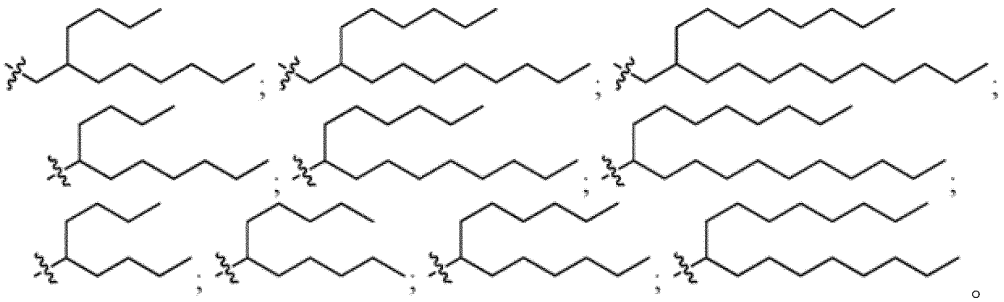
【０３９８】

式（ＩＩＩ）のいくつかの前述の実施形態では、$R^{7a}$の少なくとも１つの存在においてＨである。例えば、いくつかの実施形態では、$R^{7a}$は各存在においてＨである。前述の他の異なる実施形態では、$R^{7b}$の少なくとも１つの存在は、$C_1$－$C_8$アルキルである。例えば、いくつかの実施形態では、$C_1$－$C_8$アルキルは、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、ｔｅｒｔ－ブチル、ｎ－ヘキシルまたはｎ－オクチルである。

【０３９９】

式（ＩＩＩ）の異なる実施形態では、$R^1$もしくは$R^2$、またはその両方は、以下の構造のうちの１つを有する：

【化２５】



。

【０４００】

式（ＩＩＩ）のいくつかの前述の実施形態では、$R^3$は、－ＯＨ、－ＣＮ、－Ｃ（＝Ｏ）Ｏ$R^4$、－ＯＣ（＝Ｏ）$R^4$または－ＮＨＣ（＝Ｏ）$R^4$である。いくつかの実施形態では、$R^4$は、メチルまたはエチルである。

【０４０１】

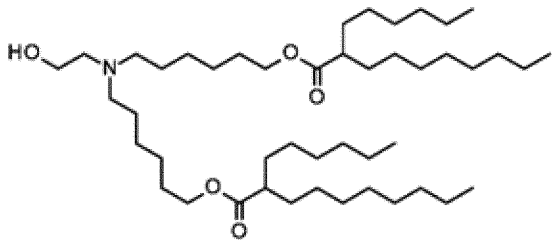
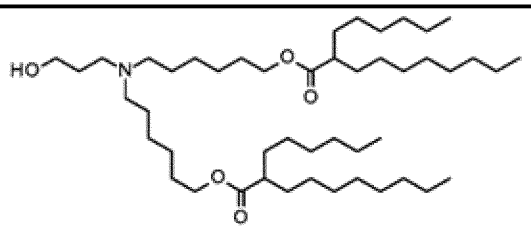
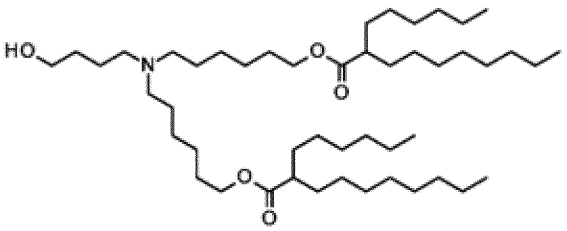
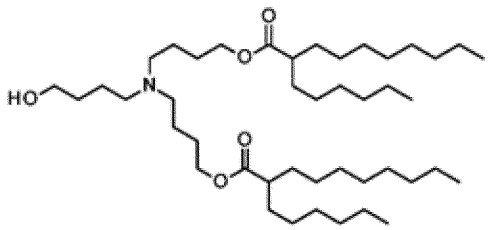
実施形態３のいくつかの特定の実施形態では、第１及び第２のカチオン性脂質は、各々、独立して、式ＩＩＩの脂質から選択される。

【０４０２】

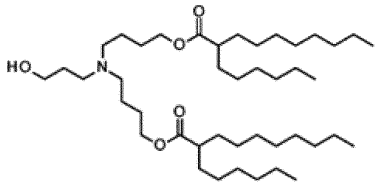
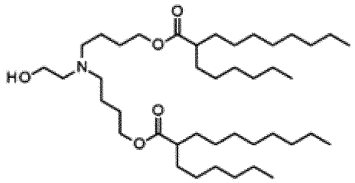
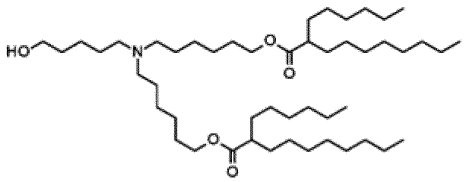
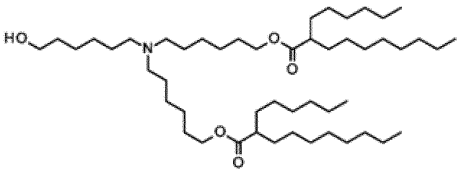
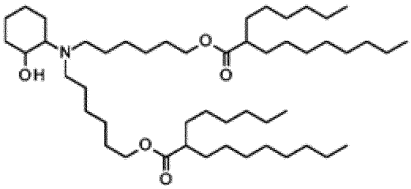
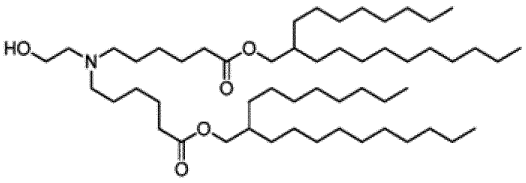
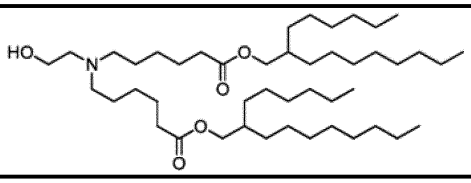
様々な異なる実施形態では、式（ＩＩＩ）の開示された実施形態のいずれか１つのカチオン性脂質（例えば、カチオン性脂質、第１のカチオン性脂質、第２のカチオン性脂質）は、以下の表３に示される構造のうちの１つを有する。

【表３－１】

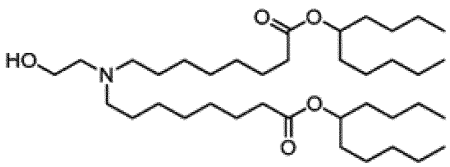
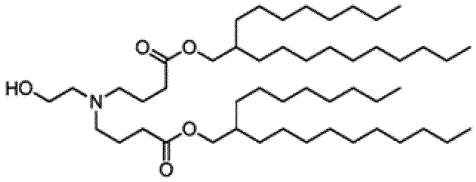
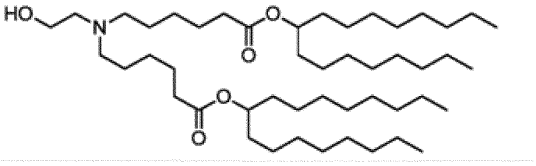
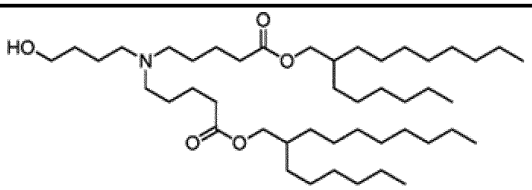
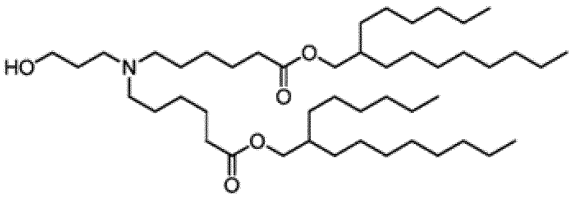
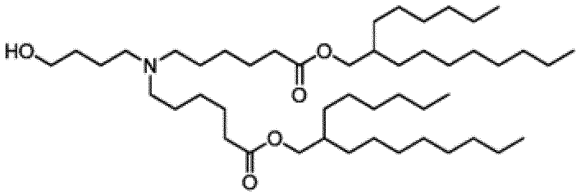
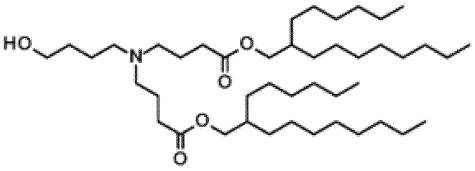
表３：式（ＩＩＩ）の代表的な化合物

| 番号 | 構造 | pKa |
|---|---|---|
| III-1 |  | 5.89 |
| III-2 |  | 6.05 |
| III-3 |  | 6.09 |
| III-4 |  | 5.60 |

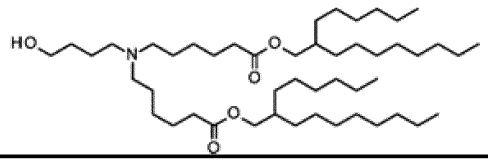
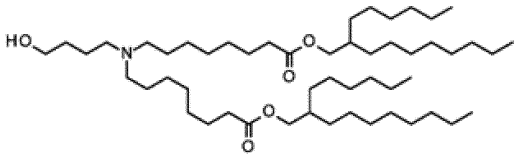
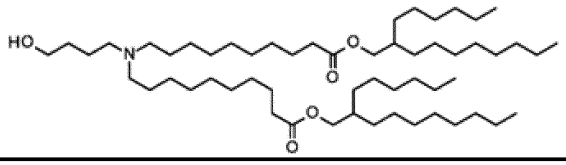
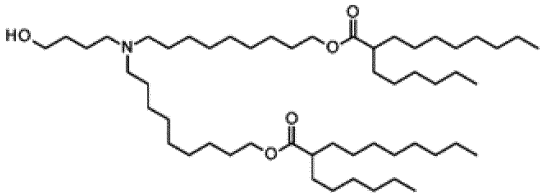
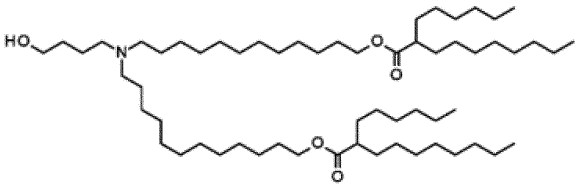
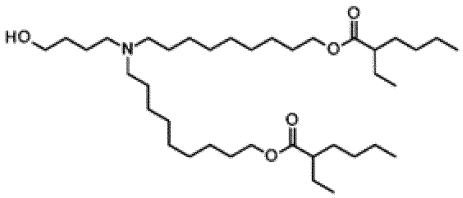
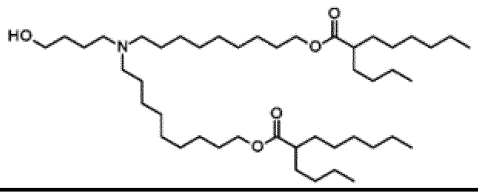
【表３－２】

| 番号 | 構造 | pKa |
|---|---|---|
| III-5 |  | 5.59 |
| III-6 |  | 5.42 |
| III-7 |  | 6.11 |
| III-8 |  | 5.84 |
| III-9 |  | - |
| III-10 |  | - |
| III-11 |  | - |

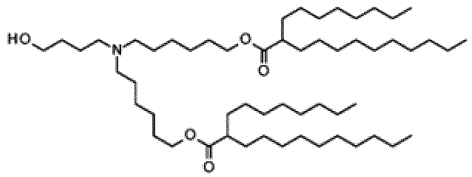
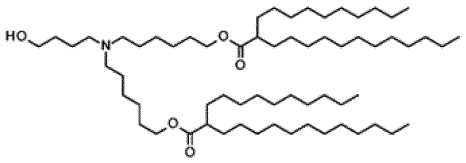
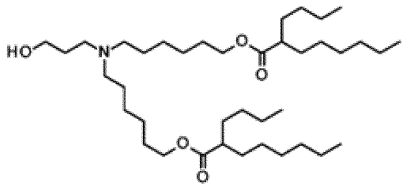
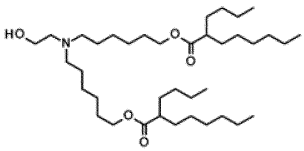
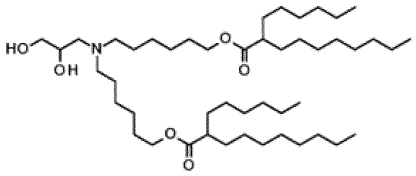
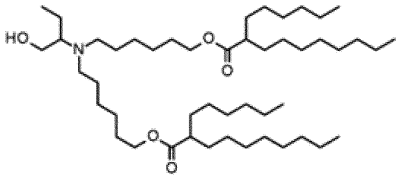
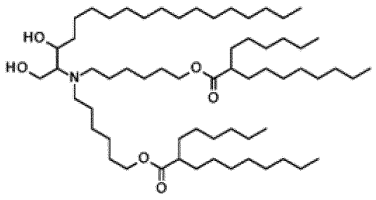
【表３－３】

| 番号 | 構造 | pKa |
|---|---|---|
| III-12 |  | - |
| III-13 |  | - |
| III-14 |  | - |
| III-15 |  | 6.14 |
| III-16 |  | 6.31 |
| III-17 |  | 6.28 |
| III-18 |  | - |

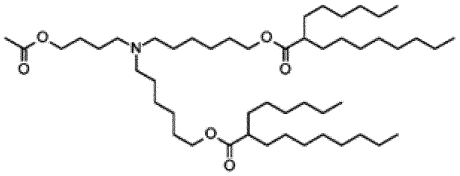
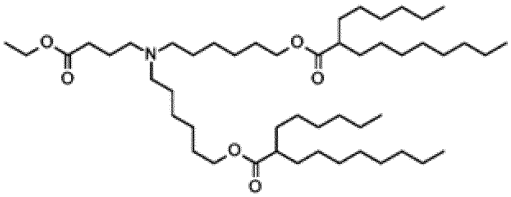
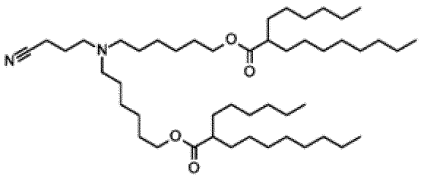
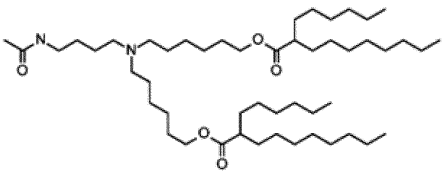
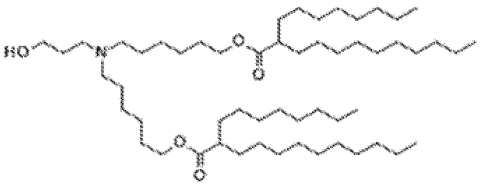
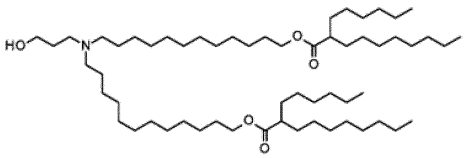
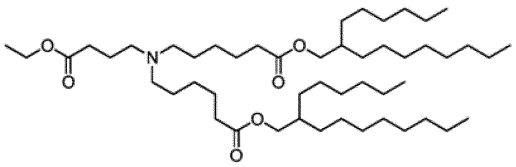
【表３－４】

| 番号 | 構造 | pKa |
|---|---|---|
| III-19 |  | - |
| III-20 |  | 6.36 |
| III-21 |  | - |
| III-22 |  | 6.10 |
| III-23 |  | 5.98 |
| III-24 |  | - |
| III-25 |  | 6.22 |

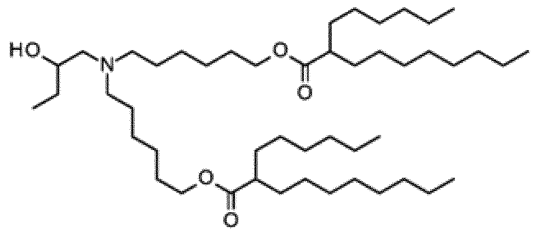
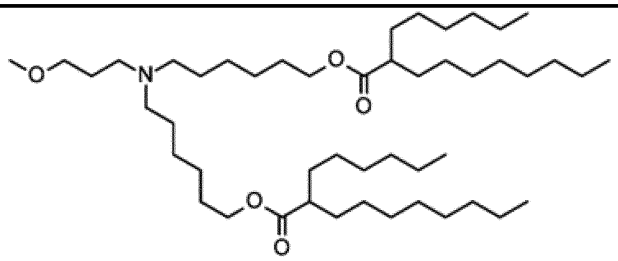
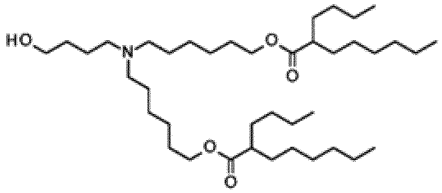
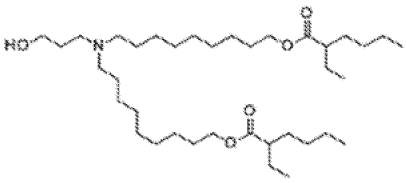
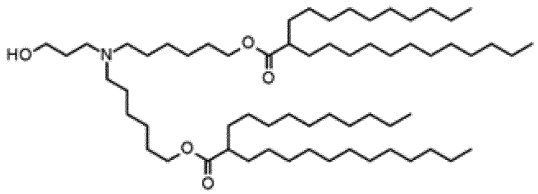
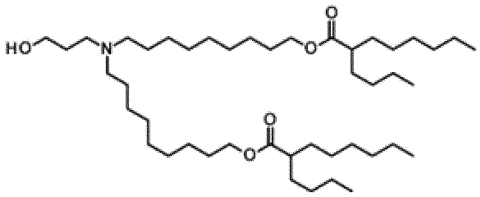
【表３－５】

| 番号 | 構造 | pKa |
|---|---|---|
| III-26 |  | 5.84 |
| III-27 |  | 5.77 |
| III-28 |  | - |
| III-29 |  | - |
| III-30 |  | 6.09 |
| III-31 |  | - |
| III-32 |  | - |

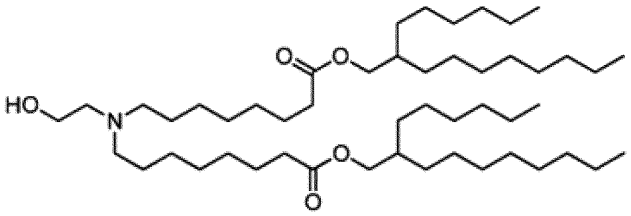
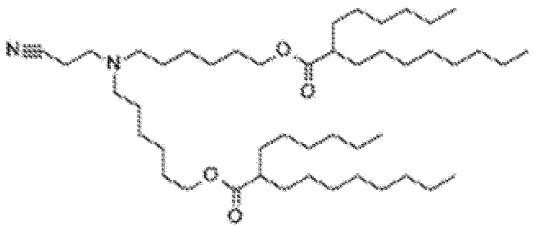
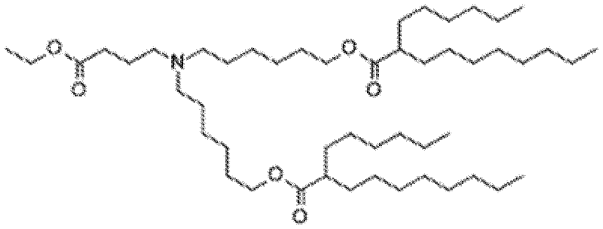
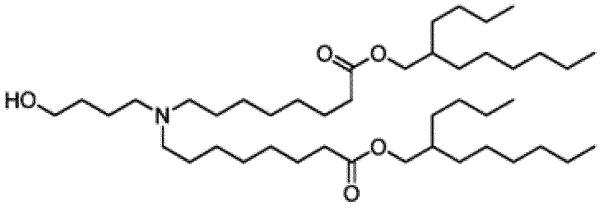
【表３－６】

| 番号 | 構造 | pKa |
|---|---|---|
| III-33 |  | - |
| III-34 |  | - |
| III-35 |  | - |
| III-36 |  | - |
| III-37 |  | - |
| III-38 |  | - |
| III-39 |  | - |

【表３－７】

| 番号 | 構造 | pKa |
|---|---|---|
| III-40 |  | - |
| III-41 |  | - |
| III-42 |  | - |
| III-43 |  | - |
| III-44 |  | - |
| III-45 |  | - |

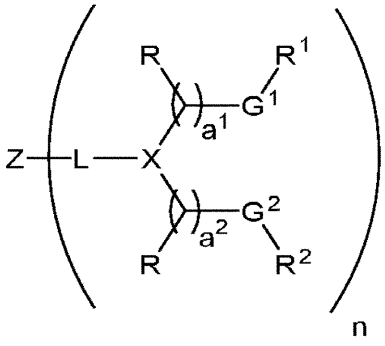
【表３－８】

| 番号 | 構造 | pKa |
|---|---|---|
| III-46 |  | - |
| III-47 |  | - |
| III-48 |  | - |
| III-49 |  | - |

【０４０３】

一実施形態では、実施形態１、２、３、４、または５のいずれか１つのカチオン性脂質は、式（ＩＶ）の構造を有するか、

【化２６】



(IV)

またはその薬学的に許容可能な塩、プロドラッグもしくは立体異性体であり、式中、

$G^1$または$G^2$の一方は、各存在で、－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）－、－（Ｃ＝Ｏ）Ｏ－、－Ｃ（＝Ｏ）－、－Ｏ－、－Ｓ（Ｏ）$_y$－、－Ｓ－Ｓ－、－Ｃ（＝Ｏ）Ｓ－、ＳＣ（＝Ｏ）－、－Ｎ（$R^a$）Ｃ（＝Ｏ）－、－Ｃ（＝Ｏ）Ｎ（$R^a$）－、－Ｎ（$R^a$）Ｃ（＝Ｏ）Ｎ（$R^a$

）－、－ＯＣ（＝Ｏ）Ｎ（Ｒａ）－、または－Ｎ（Ｒａ）Ｃ（＝Ｏ）Ｏ－であり、Ｇ１またはＧ２の他方は、各存在で、－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）－、－（Ｃ＝Ｏ）Ｏ－、－Ｃ（＝Ｏ）－、－Ｏ－、－Ｓ（Ｏ）ｙ－、－Ｓ－Ｓ－、－Ｃ（＝Ｏ）Ｓ－、－ＳＣ（＝Ｏ）－、－Ｎ（Ｒａ）Ｃ（＝Ｏ）－、－Ｃ（＝Ｏ）Ｎ（Ｒａ）－、－Ｎ（Ｒａ）Ｃ（＝Ｏ）Ｎ（Ｒａ）－、－ＯＣ（＝Ｏ）Ｎ（Ｒａ）－、または－Ｎ（Ｒａ）Ｃ（＝Ｏ）Ｏ－、または直接結合であり、

Ｌは、各存在で、～Ｏ（Ｃ＝Ｏ）－であり、～は、Ｘとの共有結合を表し、

Ｘは、ＣＲａであり、

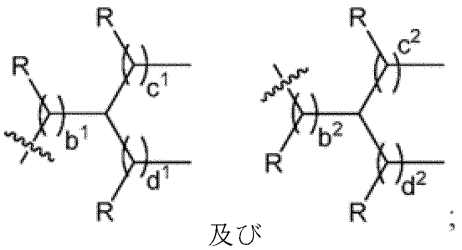
Ｚは、ｎが１である場合、アルキル、シクロアルキル、または少なくとも１つの極性官能基を含む一価部分であるか、またはＺは、ｎが１を超える場合、アルキレン、シクロアルキレン、または少なくとも１つの極性官能基を含む多価部分であり、

Ｒａは、各存在で、独立して、Ｈ、Ｃ１－Ｃ１２アルキル、Ｃ１－Ｃ１２ヒドロキシアルキル、Ｃ１－Ｃ１２アミノアルキル、Ｃ１－Ｃ１２アルキルアミノアルキル、Ｃ１－Ｃ１２アルコキシアルキル、Ｃ１－Ｃ１２アルコキシカルボニル、Ｃ１－Ｃ１２アルキルカルボニルオキシ、Ｃ１－Ｃ１２アルキルカルボニルオキシアルキル、またはＣ１－Ｃ１２アルキルカルボニルであり、

Ｒは、各存在で、独立して、（ａ）Ｈもしくは$C_1$－$C_{12}$アルキル、または（ｂ）Ｒが、それが結合している炭素原子と一緒になって、隣接するＲ及びそれが結合している炭素原子と一緒になって、炭素－炭素二重結合を形成するかのいずれかであり、

$R^1$及び$R^2$は、各存在で、それぞれ、以下の構造を有し、

【化２７】




$a^1$及び$a^2$は、各存在で、独立して、３～１２の整数であり、

$b^1$及び$b^2$は、各存在で、独立して、０または１であり、

$c^1$及び$c^2$は、各存在で、独立して、５～１０の整数であり、

$d^1$及び$d^2$は、各存在で、独立して、５～１０の整数であり、

ｙは、各存在で、独立して、０～２の整数であり、

ｎは、１～６の整数であり、

各アルキル、アルキレン、ヒドロキシルアルキル、アミノアルキル、アルキルアミニルアルキル、アルコキシアルキル、アルコキシカルボニル、アルキルカルボニルオキシ、アルキルカルボニルオキシアルキル、及びアルキルカルボニルは、任意に、１つ以上の置換基で置換される。

【０４０４】

式（ＩＶ）のいくつかの実施形態では、$G^1$及び$G^2$は、各々、独立して、－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）－または－（Ｃ＝Ｏ）Ｏ－である。

【０４０５】

式（ＩＶ）の他の実施形態では、Ｘは、ＣＨである。

【０４０６】

式（ＩＶ）の異なる実施形態では、$a^1+b^1+c^1$の合計または$a^2+b^2+c^2$の合計は、１２～２６の整数である。

【０４０７】

式（ＩＶ）のさらに他の実施形態では、ａ$^{1}$及びａ$^{2}$は、独立して、３～１０の整数である。例えば、いくつかの実施形態では、ａ$^{1}$及びａ$^{2}$は、独立して、４～９の整数である。

【０４０８】

式（ＩＶ）の様々な実施形態では、ｂ$^{1}$及びｂ$^{2}$は、０である。異なる実施形態では、ｂ$^{1}$及びｂ$^{2}$は、１である。

【０４０９】

式（ＩＶ）のさらなる実施形態では、ｃ$^{1}$、ｃ$^{2}$、ｄ$^{1}$、及びｄ$^{2}$は、独立して、６～８の整数である。

【０４１０】

式（ＩＶ）の他の実施形態では、ｃ$^{1}$及びｃ$^{2}$は、各存在で、独立して、６～１０の整数であり、ｄ$^{1}$及びｄ$^{2}$は、各存在で、独立して、６～１０の整数である。

【０４１１】

式（ＩＶ）の他の実施形態では、ｃ$^{1}$及びｃ$^{2}$は、各存在で、独立して、５～９の整数であり、ｄ$^{1}$及びｄ$^{2}$は、各存在で、独立して、５～９の整数である。

【０４１２】

式（ＩＶ）のさらなる実施形態では、Ｚは、ｎが１である場合、アルキル、シクロアルキル、または少なくとも１つの極性官能基を含む一価部分である。他の実施形態では、Ｚは、アルキルである。

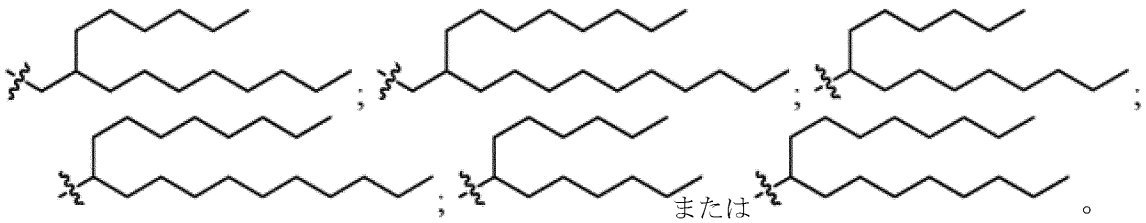
【０４１３】

前述の式（ＩＶ）の様々な実施形態では、Ｒは、各存在で、独立して、（ａ）Ｈもしくはメチル、または（ｂ）Ｒが、それが結合している炭素原子と一緒になって、隣接するＲ及びそれが結合している炭素原子と一緒になって、炭素－炭素二重結合を形成するかのいずれかである。特定の実施形態では、各Ｒは、Ｈである。他の実施形態では、少なくとも１つのＲは、それが結合している炭素原子と一緒になって、隣接するＲ及びそれが結合している炭素原子と一緒になって、炭素－炭素二重結合を形成する。

【０４１４】

式（ＩＶ）の化合物の他の実施形態では、Ｒ$^{1}$及びＲ$^{2}$は、独立して、以下の構造のうちの１つを有する：

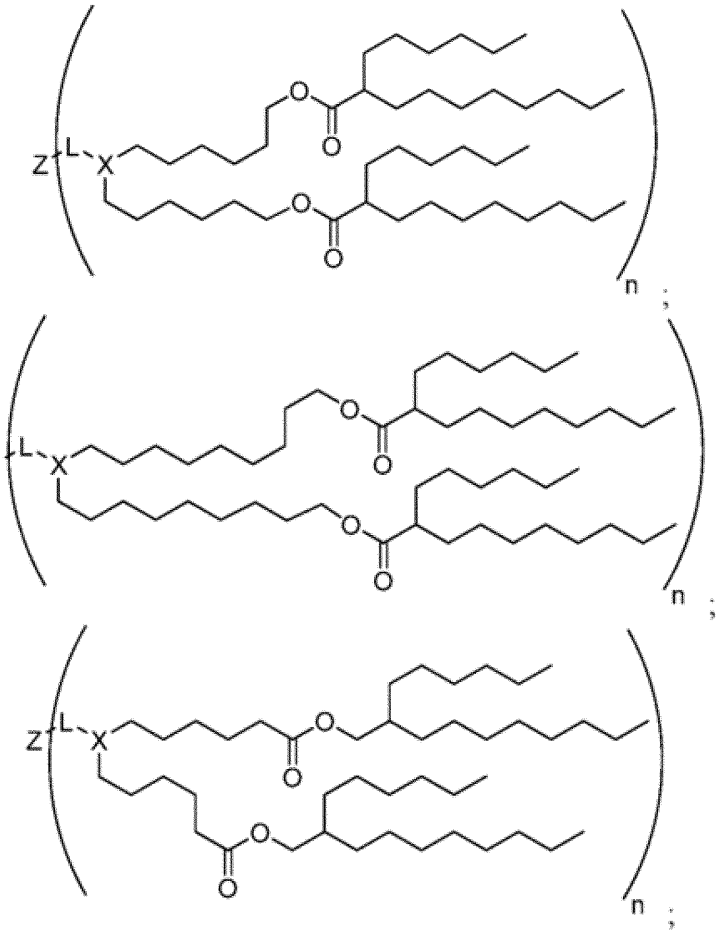
【化２８】




【０４１５】

式（ＩＶ）の特定の実施形態では、化合物は、以下の構造のうちの１つを有する：

【化２９－１】




;

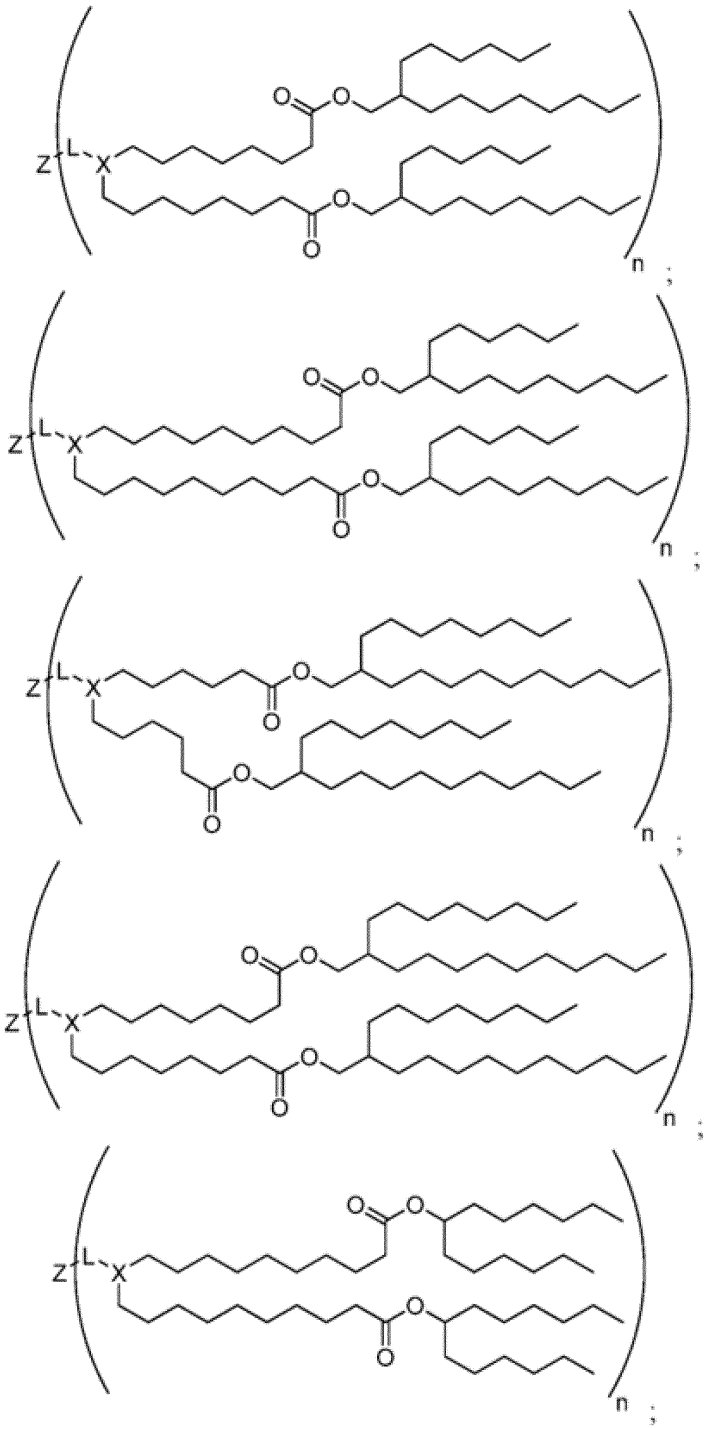



;

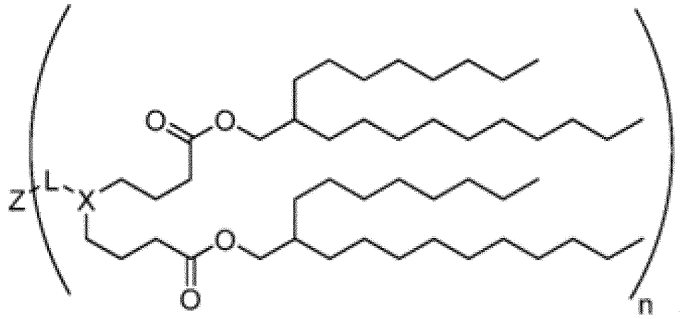



;

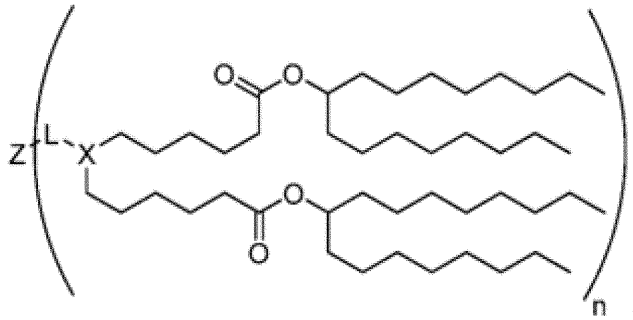
【化２９－２】



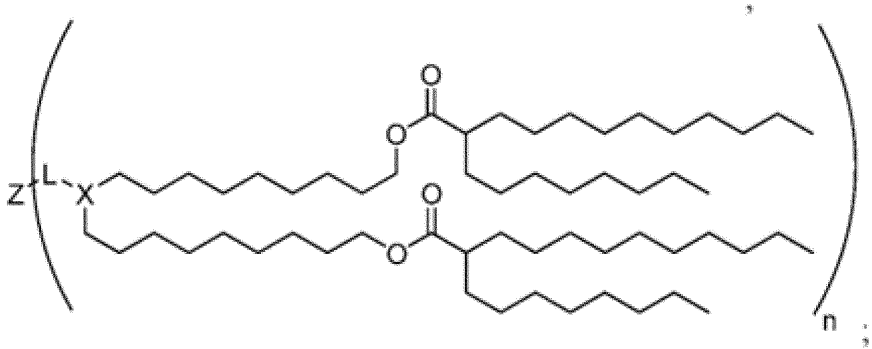
【化２９－３】



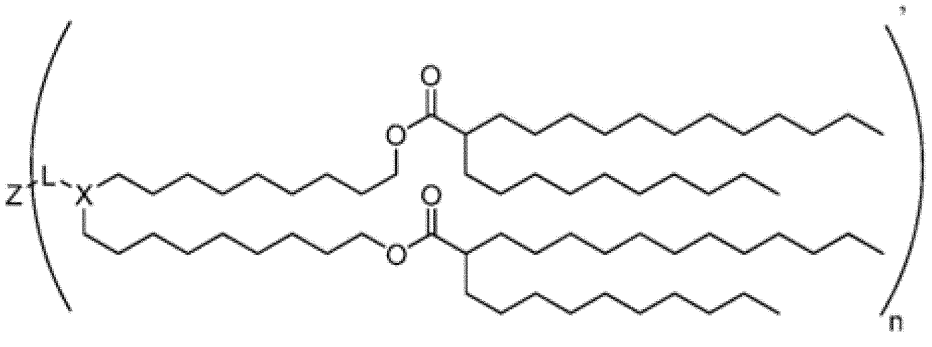
;



;

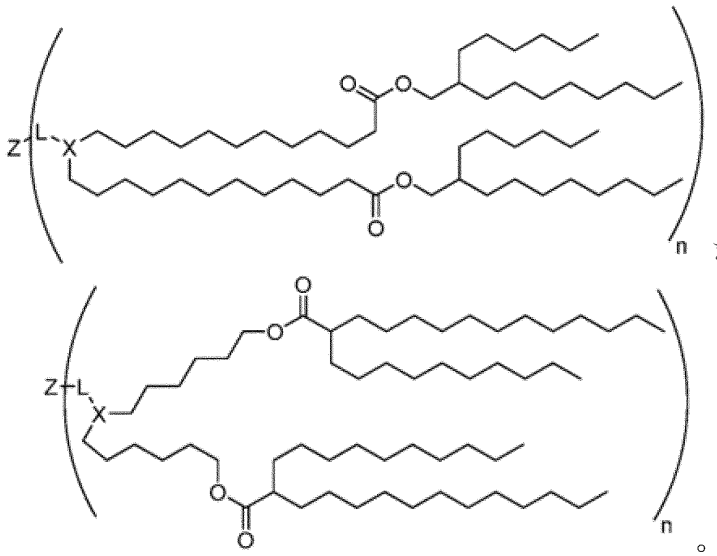


;



;

【化２９－４】

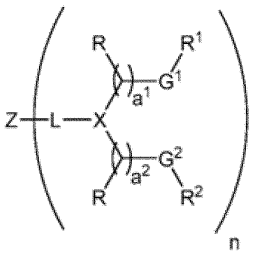


または

【０４１６】

さらに異なる実施形態では、実施形態１、２、３、４、または５のカチオン性脂質は、式（Ｖ）の構造を有するか、

【化３０】



(V)

またはその薬学的に許容可能な塩、プロドラッグもしくは立体異性体であり、式中、

$G^1$または$G^2$の一方は、各存在で、－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）－、－（Ｃ＝Ｏ）Ｏ－、－Ｃ（＝Ｏ）－、－Ｏ－、－Ｓ（Ｏ）$_y$－、－Ｓ－Ｓ－、－Ｃ（＝Ｏ）Ｓ－、ＳＣ（＝Ｏ）－、－Ｎ（$R^a$）Ｃ（＝Ｏ）－、－Ｃ（＝Ｏ）Ｎ（$R^a$）－、－Ｎ（$R^a$）Ｃ（＝Ｏ）Ｎ（$R^a$）－、－ＯＣ（＝Ｏ）Ｎ（$R^a$）－、または－Ｎ（$R^a$）Ｃ（＝Ｏ）Ｏ－であり、$G^1$または$G^2$の他方は、各存在で、－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）－、－（Ｃ＝Ｏ）Ｏ－、－Ｃ（＝Ｏ）－、－Ｏ－、－Ｓ（Ｏ）$_y$－、－Ｓ－Ｓ－、－Ｃ（＝Ｏ）Ｓ－、－ＳＣ（＝Ｏ）－、－Ｎ（$R^a$）Ｃ（＝Ｏ）－、－Ｃ（＝Ｏ）Ｎ（$R^a$）－、－Ｎ（$R^a$）Ｃ（＝Ｏ）Ｎ（$R^a$）－、－ＯＣ（＝Ｏ）Ｎ（$R^a$）－、または－Ｎ（$R^a$）Ｃ（＝Ｏ）Ｏ－、または直接結合であり、

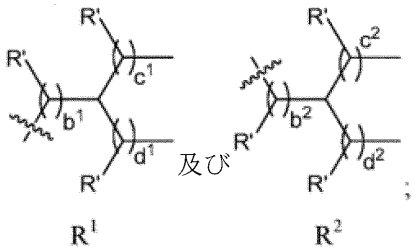
Ｌは、各存在で、～Ｏ（Ｃ＝Ｏ）－であり、～は、Ｘとの共有結合を表し、

Ｘは、Ｃ$R^a$であり、

Ｚは、ｎが１である場合、アルキル、シクロアルキル、または少なくとも１つの極性官能基を含む一価部分であるか、またはＺは、ｎが１を超える場合、アルキレン、シクロアルキレン、または少なくとも１つの極性官能基を含む多価部分であり、

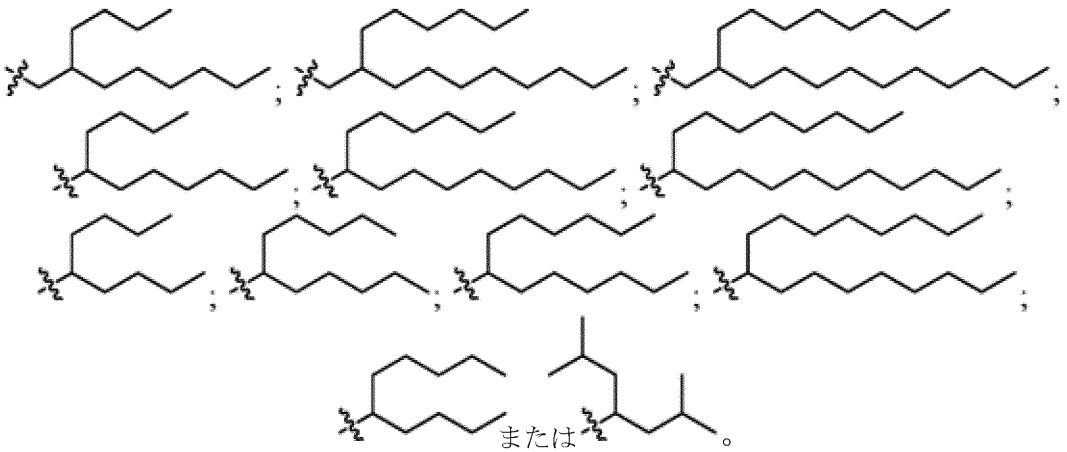
$R^a$は、各存在で、独立して、Ｈ、$C_1$－$C_{12}$アルキル、$C_1$－$C_{12}$ヒドロキシアルキル、$C_1$－$C_{12}$アミノアルキル、$C_1$－$C_{12}$アルキルアミノアルキル、$C_1$－$C_{12}$アルコキシアルキル、$C_1$－$C_{12}$アルコキシカルボニル、$C_1$－$C_{12}$アルキルカルボニルオキシ、$C_1$－$C_{12}$アルキルカルボニルオキシアルキル、または$C_1$－$C_{12}$ア

ルキルカルボニルであり、
Ｒは、各存在で、独立して、（ａ）Ｈもしくは$C_1$－$C_{12}$アルキル、または（ｂ）Ｒが、それが結合している炭素原子と一緒になって、隣接するＲ及びそれが結合している炭素原子と一緒になって、炭素－炭素二重結合を形成するかのいずれかであり、
$R^1$及び$R^2$は、各存在で、それぞれ、以下の構造を有し、
【化３１】



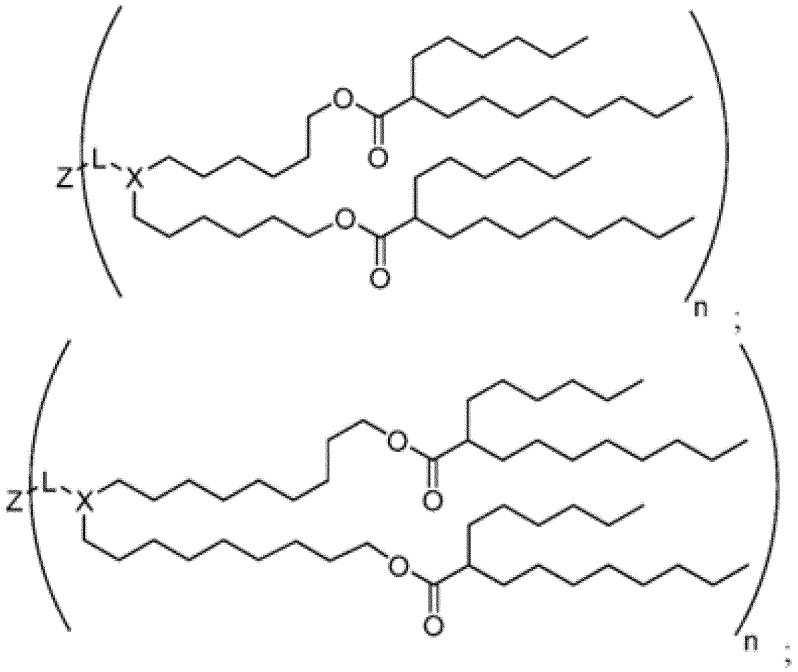

Ｒ’は、各存在で、独立して、Ｈまた$C_1$－$C_{12}$アルキルであり、
$a^1$及び$a^2$は、各存在で、独立して、３～１２の整数であり、
$b^1$及び$b^2$は、各存在で、独立して、０または１であり、
$c^1$及び$c^2$は、各存在で、独立して、２～１２の整数であり、
$d^1$及び$d^2$は、各存在で、独立して、２～１２の整数であり、
ｙは、各存在で、独立して、０～２の整数であり、
ｎは、１～６の整数であり、
$a^1$、$a^2$、$c^1$、$c^2$、$d^1$、及び$d^2$は、$a^1+c^1+d^1$の合計が、１８～３０の整数であり、$a^2+c^2+d^2$の合計が、１８～３０の整数であるように選択され、各アルキル、アルキレン、ヒドロキシルアルキル、アミノアルキル、アルキルアミニルアルキル、アルコキシアルキル、アルコキシカルボニル、アルキルカルボニルオキシ、アルキルカルボニルオキシアルキル、及びアルキルカルボニルは、任意に、１つ以上の置換基で置換される。
【０４１７】
式（Ｖ）の特定の実施形態では、$G^1$及び$G^2$は、各々、独立して、－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）－または－（Ｃ＝Ｏ）Ｏ－である。
【０４１８】
式（Ｖ）の他の実施形態では、Ｘは、ＣＨである。
【０４１９】
式（Ｖ）のいくつかの実施形態では、$a^1+c^1+d^1$の合計が、２０～３０の整数であり、$a^2+c^2+d^2$の合計が、１８～３０の整数である。他の実施形態では、$a^1+c^1+d^1$の合計が、２０～３０の整数であり、$a^2+c^2+d^2$の合計が、２０～３０の整数である。式（Ｖ）のさらなる実施形態では、$a^1+b^1+c^1$の合計または$a^2+b^2+c^2$の合計は、１２～２６の整数である。他の実施形態では、$a^1$、$a^2$、$c^1$、$c^2$、$d^1$、及び$d^2$は、$a^1+c^1+d^1$の合計が、１８～２８の整数であり、$a^2+c^2+d^2$の合計が、１８～２８の整数であるように選択される。
【０４２０】
式（Ｖ）のさらに他の実施形態では、$a^1$及び$a^2$は、独立して、３～１０の整数、例えば、４～９の整数である。
【０４２１】
式（Ｖ）のさらに他の実施形態では、$b^1$及び$b^2$は、０である。異なる実施形態では、$b^1$及び$b^2$は、１である。
【０４２２】
式（Ｖ）の特定の他の実施形態では、$c^1$、$c^2$、$d^1$、及び$d^2$は、独立して、６～８の整数である。

【０４２３】
式（Ｖ）の異なる他の実施形態では、Ｚは、ｎが１である場合、アルキル、または少なくとも１つの極性官能基を含む一価部分であるか、またはＺは、ｎが１を超える場合、アルキレン、または少なくとも１つの極性官能基を含む多価部分である。
【０４２４】
式（Ｖ）のさらなる実施形態では、Ｚは、ｎが１である場合、アルキル、シクロアルキル、または少なくとも１つの極性官能基を含む一価部分である。他の実施形態では、Ｚは、アルキルである。
【０４２５】
式（Ｖ）の他の異なる実施形態では、Ｒは、各存在で、独立して、（ａ）Ｈもしくはメチル、または（ｂ）Ｒが、それが結合している炭素原子と一緒になって、隣接するＲ及びそれが結合している炭素原子と一緒になって、炭素－炭素二重結合を形成するかのいずれかである。例えば、いくつかの実施形態では、各Ｒは、Ｈである。他の実施形態では、少なくとも１つのＲは、
それが結合している炭素原子と一緒になって、隣接するＲ及びそれが結合している炭素原子と一緒になって、炭素－炭素二重結合を形成する。
【０４２６】
さらなる実施形態では、各Ｒ’は、Ｈである。
【０４２７】
式（Ｖ）の特定の実施形態では、$a^1+c^1+d^1$の合計が、２０～２５の整数であり、$a^2+c^2+d^2$の合計が、２０～２５の整数である。
【０４２８】
式（Ｖ）の他の実施形態では、$R^1$及び$R^2$は、独立して、以下の構造のうちの１つを有する：
【化３２】

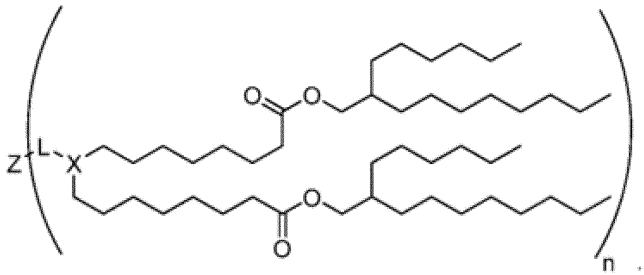


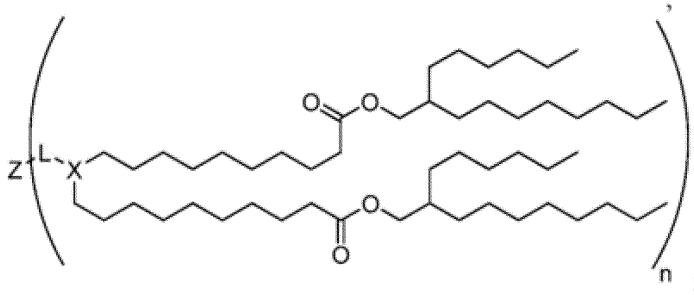

【０４２９】
式（Ｖ）のさらなる実施形態では、化合物は、以下の構造のうちの１つを有する：

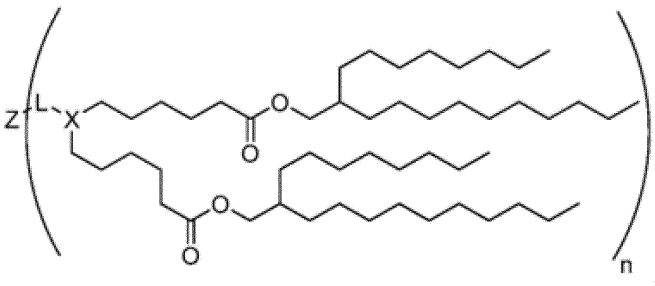
【化３３－１】

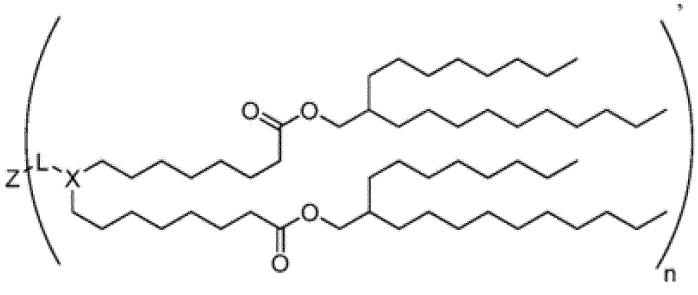


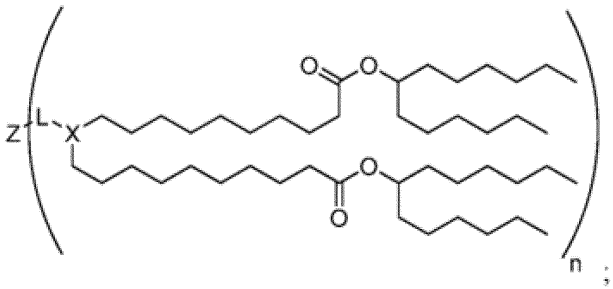
【化３３－２】


;

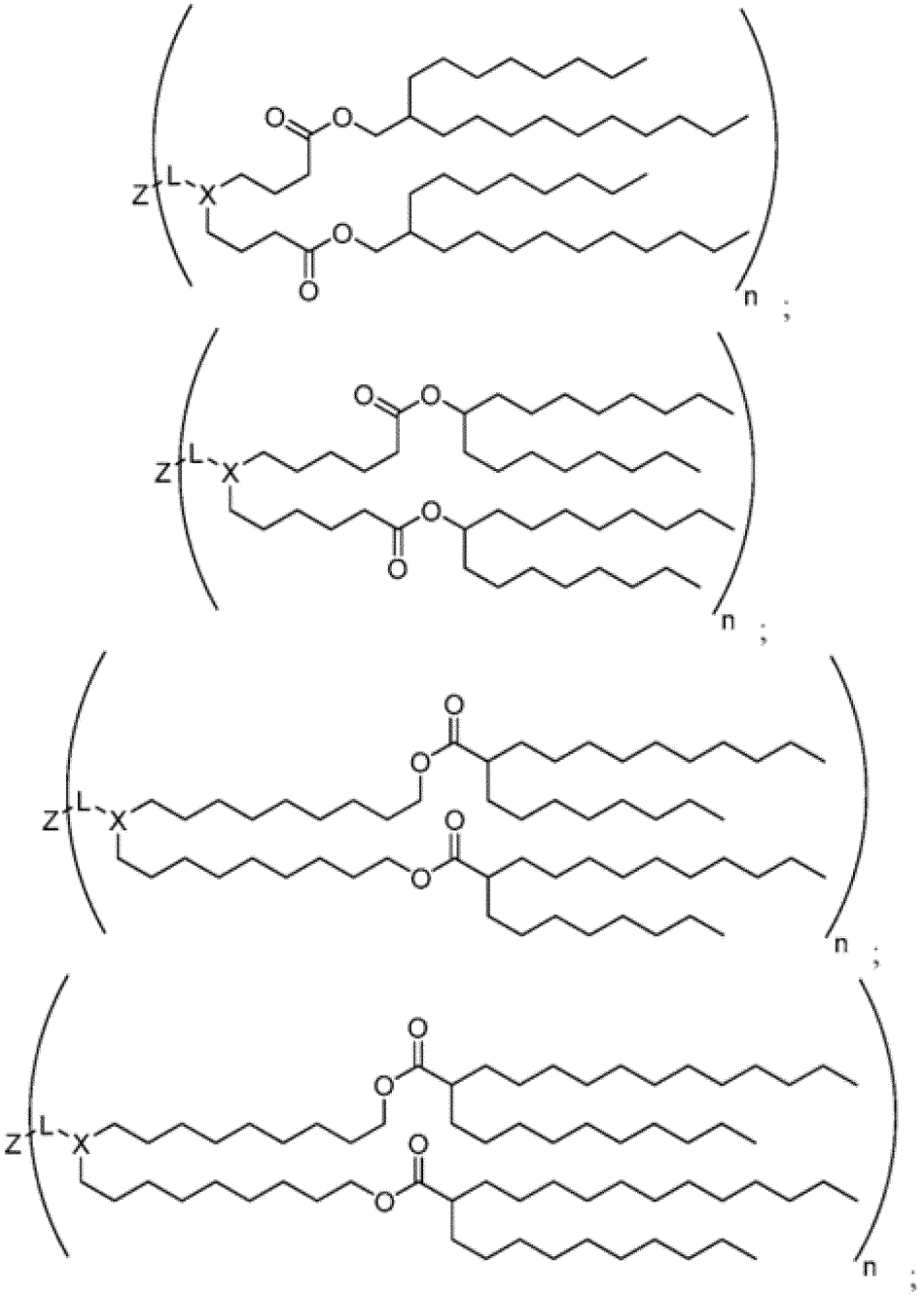

;


;

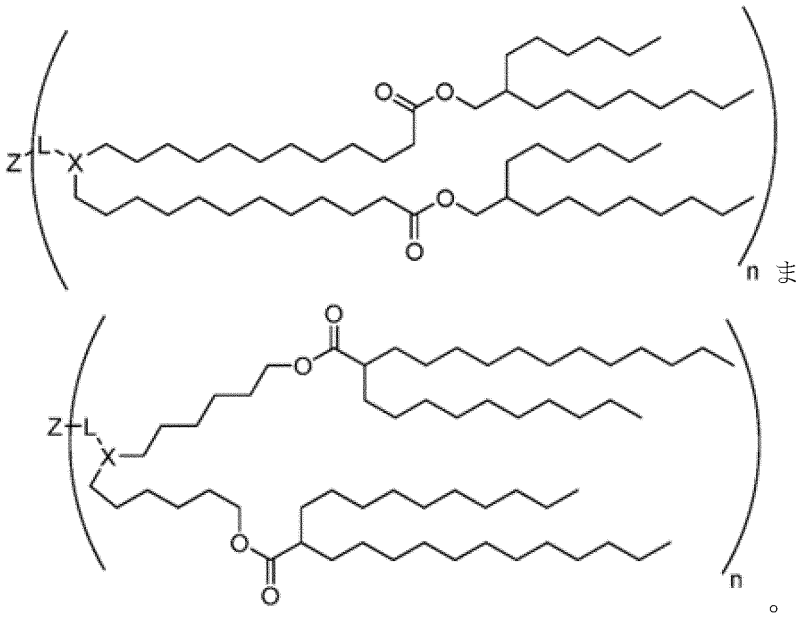

;


;

【化３３－３】



【化３３－４】

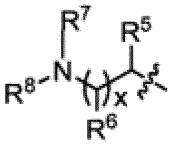


または



。

【０４３０】
式（ＩＶ）または（Ｖ）の前述の実施形態のいずれかでは、ｎは、１である。式（ＩＶ）または（Ｖ）の前述の実施形態の他の実施形態では、ｎは、１超である。
【０４３１】
式（ＩＶ）または（Ｖ）の前述の実施形態のさらにいずれかでは、Ｚは、少なくとも１つの極性官能基を含む一価または多価部分である。いくつかの実施形態では、Ｚは、少なくとも１つの極性官能基を含む一価部分である。他の実施形態では、Ｚは、少なくとも１つの極性官能基を含む多価部分である。
【０４３２】
式（ＩＶ）または（Ｖ）の前述の実施形態のさらにいずれかでは、極性官能基は、ヒドロキシル、アルコキシ、エステル、シアノ、アミド、アミノ、アルキルアミニル、ヘテロシクリル、またはヘテロアリール官能基である。
【０４３３】
式（ＩＶ）または（Ｖ）の前述の実施形態のいずれかでは、Ｚは、ヒドロキシル、ヒドロキシルアルキル、アルコキシアルキル、アミノ、アミノアルキル、アルキルアミニル、アルキルアミニルアルキル、ヘテロシクリル、またはヘテロシクリルアルキルである。
【０４３４】
式（ＩＶ）または（Ｖ）のいくつかの他の実施形態では、Ｚは、以下の構造を有し、
【化３４】



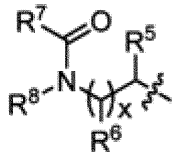
式中、
$R^5$及び$R^6$は、独立して、Ｈまたは$C_1$－$C_6$アルキルであり、
$R^7$及び$R^8$は、独立して、Ｈまたは$C_1$－$C_6$アルキルであるか、または$R^7$もしくは$R^8$は、それらが結合している窒素原子と一緒になって結合して、３～７員の複素環を形成し、

ｘは、０～６の整数である。

【０４３５】

式（ＩＶ）または（Ｖ）のさらに異なる実施形態では、Ｚは、以下の構造を有し、

【化３５】



式中、

$R^5$及び$R^6$は、独立して、Ｈまたは$C_1$－$C_6$アルキルであり、

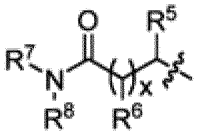
$R^7$及び$R^8$は、独立して、Ｈまたは$C_1$－$C_6$アルキルであるか、または$R^7$及び$R^8$は、それらが結合している窒素原子と一緒になって結合して、３～７員の複素環を形成し、

ｘは、０～６の整数である。

【０４３６】

式（ＩＶ）または（Ｖ）のさらに異なる実施形態では、Ｚは、以下の構造を有し、

【化３６】



式中、

$R^5$及び$R^6$は、独立して、Ｈまたは$C_1$－$C_6$アルキルであり、

$R^7$及び$R^8$は、独立して、Ｈまたは$C_1$－$C_6$アルキルであるか、または$R^7$及び$R^8$は、それらが結合している窒素原子と一緒になって結合して、３～７員の複素環を形成し、

ｘは、０～６の整数である。

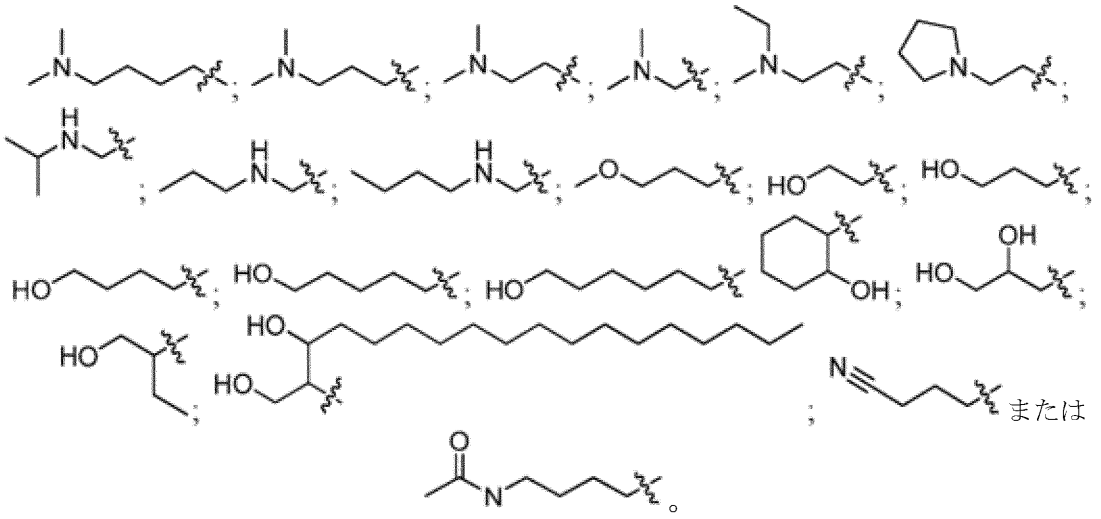
【０４３７】

式（ＩＶ）または（Ｖ）のいくつかの他の実施形態では、Ｚは、ヒドロキシルアルキル、シアノアルキル、または１つ以上のエステルもしくはアミド基で置換されたアルキルである。

【０４３８】

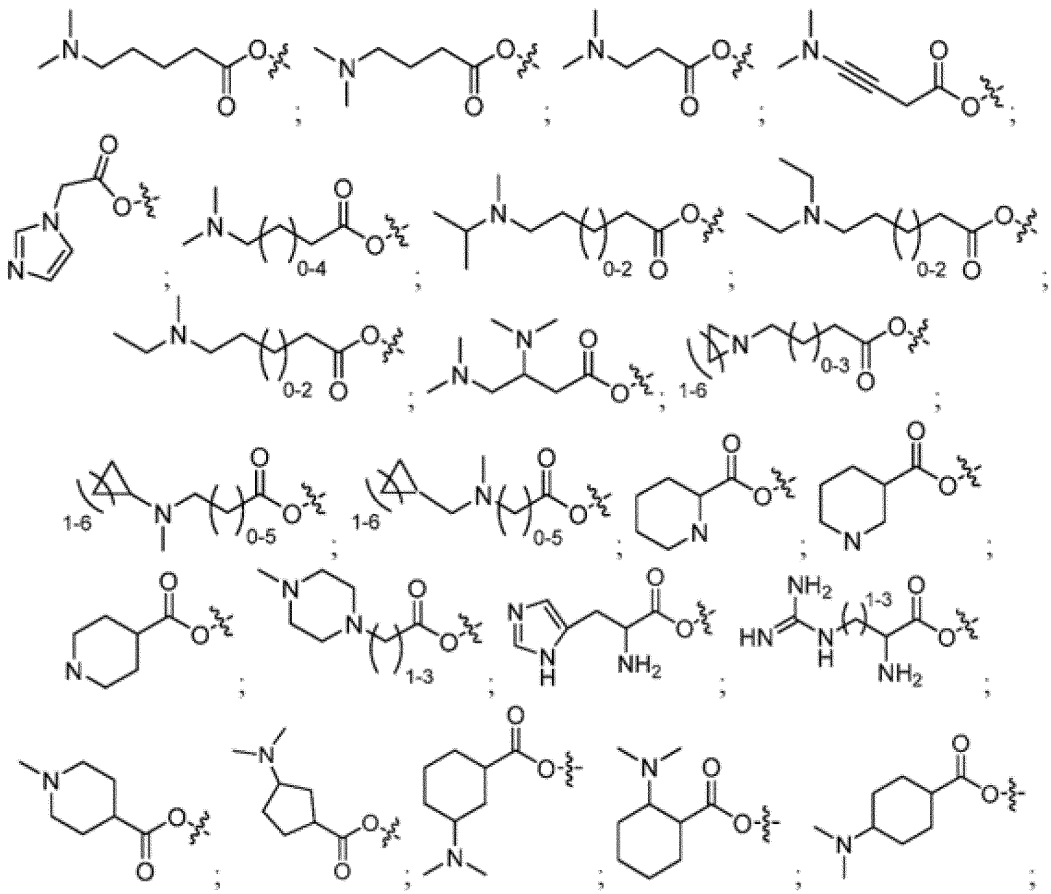
例えば、式（ＩＶ）または（Ｖ）の前述の実施形態のいずれかでは、Ｚは、以下の構造のうちの１つを有する：

【化３７】

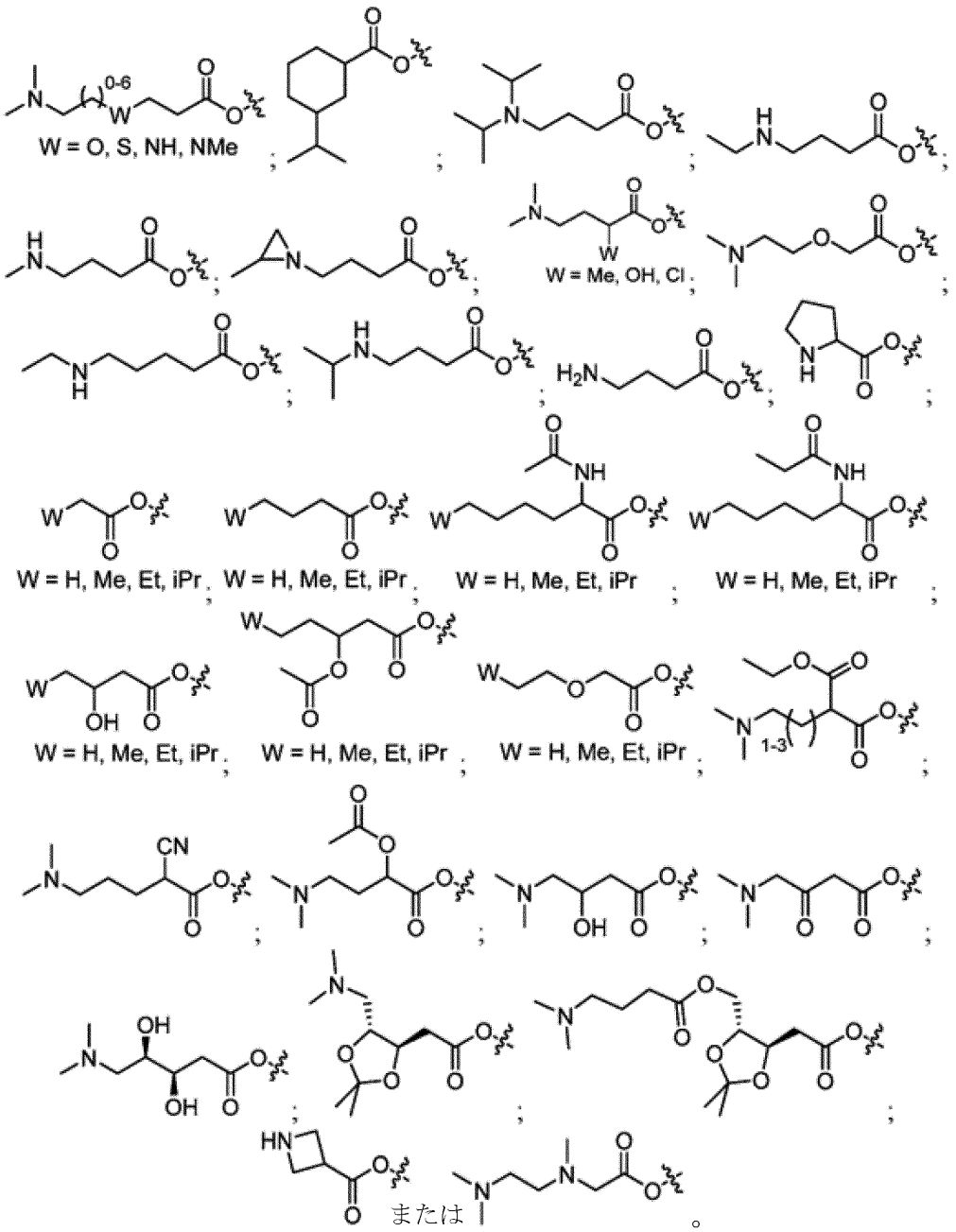


式（ＩＶ）または（Ｖ）の他の実施形態では、Ｚ－Ｌは、以下の構造のうちの１つを有する：

【化３８－１】



【化３８－２】

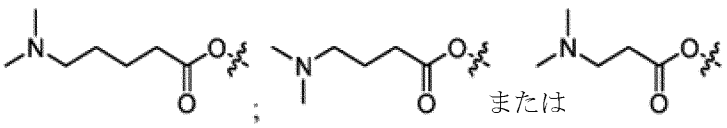



または 。

【０４３９】

他の実施形態では、Ｚ－Ｌは、以下の構造のうちの１つを有する：

【化３９】

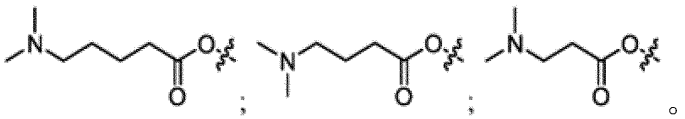


または 。

【０４４０】

さらに他の実施形態では、Ｘは、ＣＨであり、Ｚ－Ｌは、以下の構造のうちの１つを有する：

【化４０】

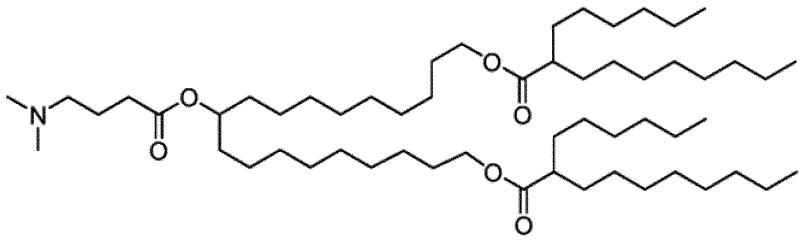
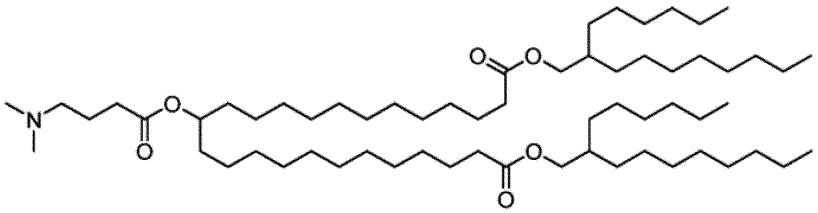
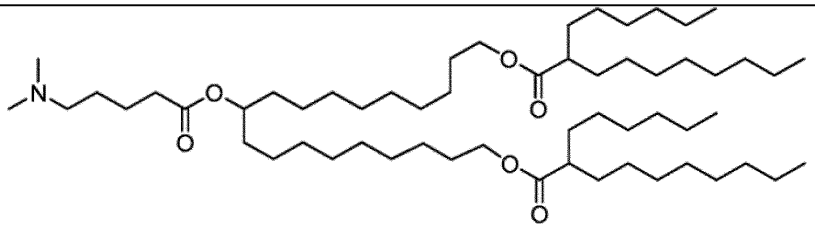


【０４４１】

様々な異なる実施形態において、実施形態１、２、３、４、または５のいずれか１つのカチオン性脂質は、以下の表４に示される構造のうちの１つを有する。

【表５】

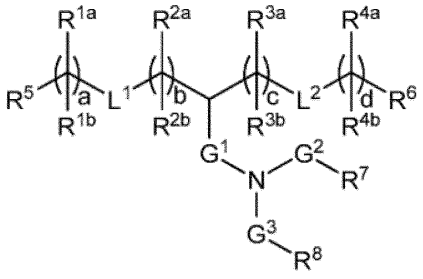
表４：式（ＩＶ）または（Ｖ）の代表的な化合物

| 番号 | 構造 |
|---|---|
| IV-1 |  |
| IV-2 |  |
| IV-3 |  |

【０４４２】

一実施形態では、カチオン性脂質は、以下の構造（ＶＩ）を有する化合物であるか、

【化４１】



(VI)

またはその薬学的に許容可能な塩、互変異性体、プロドラッグもしくは立体異性体であり、

式中、

$L^1$及び$L^2$は、各々、独立して、－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）－、－（Ｃ＝Ｏ）Ｏ－、－Ｃ（＝Ｏ）－、－Ｏ－、－Ｓ（Ｏ）$_x$－、－Ｓ－Ｓ－、－Ｃ（＝Ｏ）Ｓ－、－ＳＣ（＝Ｏ）－、－$NR^a$Ｃ（＝Ｏ）－、－Ｃ（＝Ｏ）$NR^a$－、－$NR^a$Ｃ（＝Ｏ）$NR^a$－、－ＯＣ（＝Ｏ）$NR^a$－、－$NR^a$Ｃ（＝Ｏ）Ｏ－、または直接結合であり、

$G^1$は、$C_1$－$C_2$アルキレン、－（Ｃ＝Ｏ）－、－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）－、－ＳＣ（＝Ｏ）－、－$NR^a$Ｃ（＝Ｏ）－、または直接結合であり、

$G^2$は、－Ｃ（＝Ｏ）－、－（Ｃ＝Ｏ）Ｏ－、－Ｃ（＝Ｏ）Ｓ－、－Ｃ（＝Ｏ）$NR^a$－、または直接結合であり、

$G^3$は、$C_1$－$C_6$アルキレンであり、

$R^a$は、Ｈまたは$C_1$－$C_{12}$アルキルであり、

$R^{1a}$及び$R^{1b}$は、各存在で、独立して、（ａ）Ｈもしくは$C_1$－$C_{12}$アルキル、または（ｂ）$R^{1a}$が、Ｈもしくは$C_1$－$C_{12}$アルキルであり、$R^{1b}$が、それが結合している炭素原子と一緒になって、隣接する$R^{1b}$及びそれが結合している炭素原子と一緒になって、炭素－炭素二重結合を形成するかのいずれかであり、

$R^{2a}$及び$R^{2b}$は、各存在で、独立して、（ａ）Ｈもしくは$C_1$－$C_{12}$アルキル、または（ｂ）$R^{2a}$が、Ｈもしくは$C_1$－$C_{12}$アルキルであり、$R^{2b}$が、それが結合している炭素原子と一緒になって、隣接する$R^{2b}$及びそれが結合している炭素原子と一緒になって、炭素－炭素二重結合を形成するかのいずれかであり、

$R^{3a}$及び$R^{3b}$は、各存在で、独立して、（ａ）Ｈもしくは$C_1$－$C_{12}$アルキル、または（ｂ）$R^{3a}$が、Ｈもしくは$C_1$－$C_{12}$アルキルであり、$R^{3b}$が、それが結合している炭素原子と一緒になって、隣接する$R^{3b}$及びそれが結合している炭素原子と一緒になって、炭素－炭素二重結合を形成するかのいずれかであり、

$R^{4a}$及び$R^{4b}$は、各存在で、独立して、（ａ）Ｈもしくは$C_1$－$C_{12}$アルキル、または（ｂ）$R^{4a}$が、Ｈもしくは$C_1$－$C_{12}$アルキルであり、$R^{4b}$が、それが結合している炭素原子と一緒になって、隣接する$R^{4b}$及びそれが結合している炭素原子と一緒になって、炭素－炭素二重結合を形成するかのいずれかであり、

$R^5$及び$R^6$は、各々、独立して、Ｈまたはメチルであり、

$R^7$は、Ｈまたは$C_1$－$C_{20}$アルキルであり、

$R^8$は、ＯＨ、－Ｎ（$R^9$）（Ｃ＝Ｏ）$R^{10}$、－（Ｃ＝Ｏ）$NR^9R^{10}$、－$NR^9R^{10}$、－（Ｃ＝Ｏ）Ｏ$R^{11}$、または－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）$R^{11}$であり、ただし、$R^8$が－$NR^9R^{10}$である場合、$G^3$は、$C_4$－$C_6$アルキレンであり、

$R^9$及び$R^{10}$は、各々、独立して、Ｈまたは$C_1$－$C_{12}$アルキルであり、

$R^{11}$は、アラルキルであり、

ａ、ｂ、ｃ、及びｄは、各々、独立して、１～２４の整数であり、

ｘは、０、１、または２であり、

各アルキル、アルキレン及びアラルキルは、任意に置換される。

【０４４３】

構造（ＶＩ）のいくつかの実施形態では、$L^1$及び$L^2$は、各々、独立して、－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）－、－（Ｃ＝Ｏ）Ｏ－、または直接結合である。他の実施形態では、$G^1$及び$G^2$は、各々、独立して、－（Ｃ＝Ｏ）－または直接結合である。いくつかの異なる実施形態では、$L^1$及び$L^2$は、各々、独立して、－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）－、－（Ｃ＝Ｏ）Ｏ－、または直接結合であり、$G^1$及び$G^2$は、各々、独立して、－（Ｃ＝Ｏ）－または直接結合である。

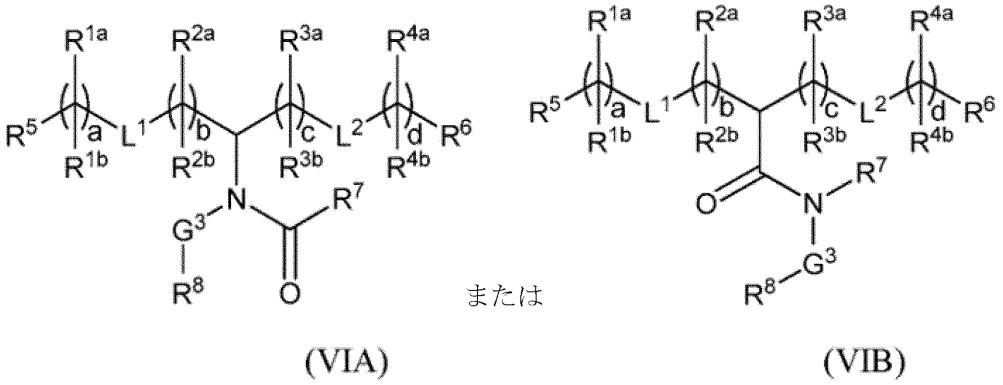
【０４４４】

構造（ＶＩ）のいくつかの異なる実施形態では、$L^1$及び$L^2$は、各々、独立して、－Ｃ（＝Ｏ）－、－Ｏ－、－Ｓ（Ｏ）$_x$－、－Ｓ－Ｓ－、－Ｃ（＝Ｏ）Ｓ－、－ＳＣ（＝Ｏ）－、－$NR^a$－、－$NR^a$Ｃ（＝Ｏ）－、－Ｃ（＝Ｏ）$NR^a$－、－$NR^a$Ｃ（＝Ｏ）$NR^a$、－ＯＣ（＝Ｏ）$NR^a$－、－$NR^a$Ｃ（＝Ｏ）Ｏ－、－$NR^a$Ｓ（Ｏ）$_x$$NR^a$－、－$NR^a$Ｓ（Ｏ）$_x$－、または－Ｓ（Ｏ）$_x$$NR^a$－である。

【０４４５】

構造（ＶＩ）の他の前述の実施形態では化合物は、以下の構造（ＶＩＡ）または（ＶＩＢ）のうちの１つを有する：

【化４２】




(VIA)　　(VIB)

いくつかの実施形態では、化合物は、構造（ＶＩＡ）を有する。他の実施形態では、化合物は、構造（ＶＩＢ）を有する。

【０４４６】

構造（ＶＩ）の前述の実施形態のいずれかでは、$L^1$または$L^2$の一方は、－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）－である。例えば、いくつかの実施形態では、$L^1$及び$L^2$の各々は、－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）－である。

【０４４７】

前述のいずれかのいくつかの異なる実施形態では、$L^1$または$L^2$の一方は、－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）－である。例えば、いくつかの実施形態では、$L^1$及び$L^2$の各々は、－（Ｃ＝Ｏ）Ｏ－である。

【０４４８】

構造（ＶＩ）の異なる実施形態では、$L^1$または$L^2$の一方は、直接結合である。本明細書で使用される「直接結合」は、基（例えば、$L^1$または$L^2$）が存在しないことを意味する。例えば、いくつかの実施形態では、$L^1$及び$L^2$の各々は、直接結合である。

【０４４９】

前述の他の異なる実施形態では、$R^{1a}$及び$R^{1b}$の少なくとも１つの存在について、$R^{1a}$が、ＨもしくはＣ$_1$－Ｃ$_{12}$アルキルであり、$R^{1b}$が、それが結合している炭素原子と一緒になって、隣接する$R^{1b}$及びそれが結合している炭素原子と一緒になって、炭素－炭素二重結合を形成する。

【０４５０】

構造（ＶＩ）のさらに他の異なる実施形態では、$R^{4a}$及び$R^{4b}$の少なくとも１つの存在について、$R^{4a}$が、ＨもしくはＣ$_1$－Ｃ$_{12}$アルキルであり、$R^{4b}$が、それが結合している炭素原子と一緒になって、隣接する$R^{4b}$及びそれが結合している炭素原子と一緒になって、炭素－炭素二重結合を形成する。

【０４５１】

構造（ＶＩ）のさらなる実施形態では、$R^{2a}$及び$R^{2b}$の少なくとも１つの存在について、$R^{2a}$が、ＨもしくはＣ$_1$－Ｃ$_{12}$アルキルであり、$R^{2b}$が、それが結合している炭素原子と一緒になって、隣接する$R^{2b}$及びそれが結合している炭素原子と一緒になって、炭素－炭素二重結合を形成する。

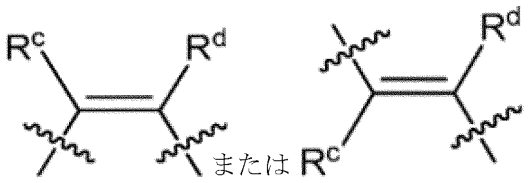
【０４５２】

前述のいずれかの他の異なる実施形態では、$R^{3a}$及び$R^{3b}$の少なくとも１つの存在について、$R^{3a}$が、ＨもしくはＣ$_1$－Ｃ$_{12}$アルキルであり、$R^{3b}$が、それが結合している炭素原子と一緒になって、隣接する$R^{3b}$及びそれが結合している炭素原子と一緒になって、炭素－炭素二重結合を形成する。

【０４５３】

「炭素－炭素」二重結合は、以下の構造のうちの１つを指すことが理解され、

【化４３】

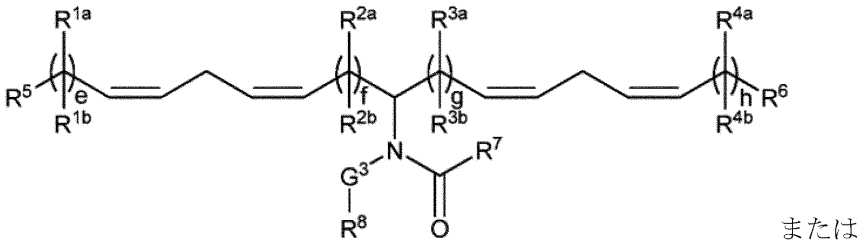



式中、$R^c$及び$R^d$は、各存在で、独立して、Ｈまたは置換基である。例えば、いくつかの実施形態では、$R^c$及び$R^d$は、各存在で、独立して、Ｈ、$C_1$－$C_{12}$アルキルまたはシクロアルキル、例えば、ＨまたはC１－C１２アルキルである。

【０４５４】

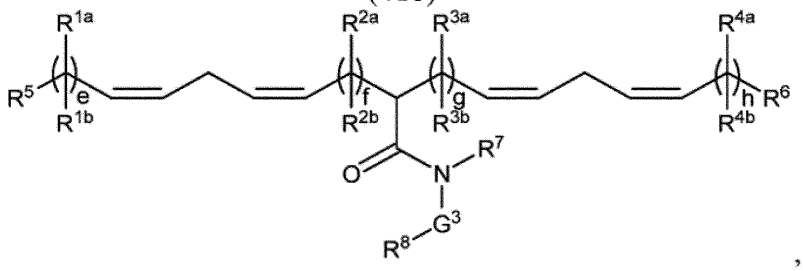
様々な他の実施形態では、化合物は、以下の構造（ＶＩＣ）または（ＶＩＤ）のうちの１つを有し、

【化４４】




または

(VIC)




,

(VID)

式中、ｅ、ｆ、ｇ、及びｈは、各々、独立して、１～１２の整数である。

【０４５５】

いくつかの実施形態では、化合物は、構造（ＶＩＣ）を有する。他の実施形態では、化合物は、構造（ＶＩＤ）を有する。

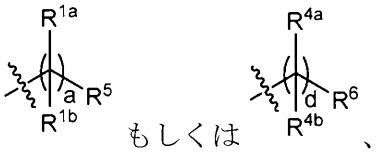
【０４５６】

構造（ＶＩＣ）または（ＶＩＤ）の化合物の様々な実施形態では、ｅ、ｆ、ｇ、及びｈは、各々、独立して、４～１０の整数である。

【０４５７】

他の異なる実施形態では、

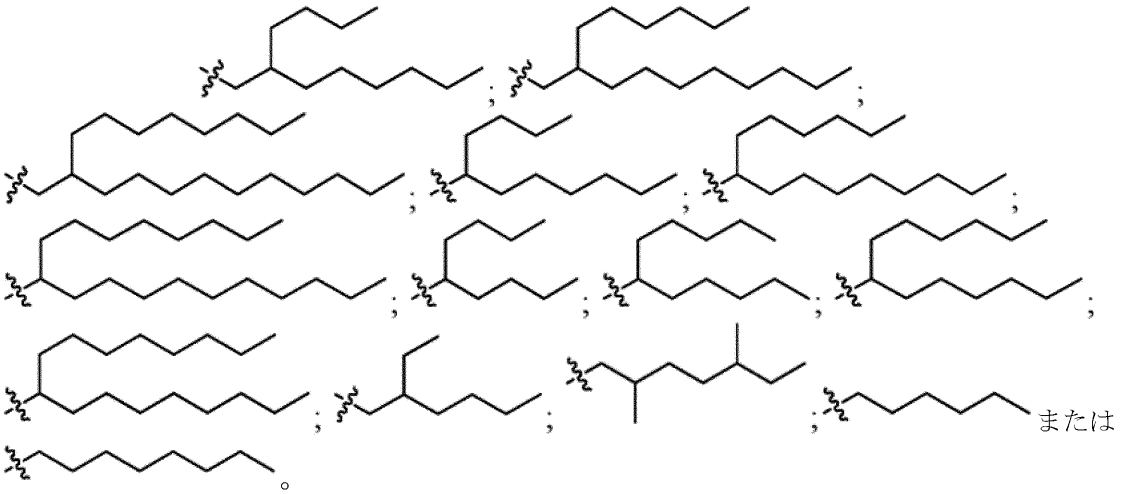
【化４５】



、

または両方が、独立して、以下の構造のうちの１つを有する：

【化４６】



。

【０４５８】

前述の特定の実施形態では、ａ、ｂ、ｃ、及びｄは、各々、独立して、２～１２の整数、または４～１２の整数である。他の実施形態では、ａ、ｂ、ｃ、及びｄは、各々、独立して、８～１２または５～９の整数である。いくつかの特定の実施形態では、ａは、０である。いくつかの実施形態では、ａは、１である。他の実施形態では、ａは、２である。より多くの実施形態では、ａは、３である。さらに他の実施形態では、ａは、４である。いくつかの実施形態では、ａは、５である。他の実施形態では、ａは、６である。より多くの実施形態では、ａは、７である。さらに他の実施形態では、ａは、８である。いくつかの実施形態では、ａは、９である。他の実施形態では、ａは、１０である。さらなる実施形態では、ａは、１１である。さらに他の実施形態では、ａは、１２である。いくつかの実施形態では、ａは、１３である。他の実施形態では、ａは、１４である。さらなる実施形態では、ａは、１５である。さらに他の実施形態では、ａは、１６である。

【０４５９】

構造（ＶＩ）のいくつかの実施形態では、ｂは、１である。他の実施形態では、ｂは、２である。さらなる実施形態では、ｂは、３である。さらに他の実施形態では、ｂは、４である。いくつかの実施形態では、ｂは、５である。他の実施形態では、ｂは、６である。さらなる実施形態では、ｂは、７である。さらに他の実施形態では、ｂは、８である。いくつかの実施形態では、ｂは、９である。他の実施形態では、ｂは、１０である。さらなる実施形態では、ｂは、１１である。さらに他の実施形態では、ｂは、１２である。いくつかの実施形態では、ｂは、１３である。他の実施形態では、ｂは、１４である。さらなる実施形態では、ｂは、１５である。さらに他の実施形態では、ｂは、１６である。

【０４６０】

構造（ＶＩ）のいくつかの実施形態では、ｃは、１である。他の実施形態では、ｃは、２である。さらなる実施形態では、ｃは、３である。さらに他の実施形態では、ｃは、４である。いくつかの実施形態では、ｃは、５である。他の実施形態では、ｃは、６である。さらなる実施形態では、ｃは、７である。さらに他の実施形態では、ｃは、８である。

いくつかの実施形態では、ｃは、９である。他の実施形態では、ｃは、１０である。さらなる実施形態では、ｃは、１１である。さらに他の実施形態では、ｃは、１２である。いくつかの実施形態では、ｃは、１３である。他の実施形態では、ｃは、１４である。さらなる実施形態では、ｃは、１５である。さらに他の実施形態では、ｃは、１６である。

【０４６１】

構造（ＶＩ）のいくつかの特定の実施形態では、ｄは、０である。いくつかの実施形態では、ｄは、１である。他の実施形態では、ｄは、２である。さらなる実施形態では、ｄは、３である。さらに他の実施形態では、ｄは、４である。いくつかの実施形態では、ｄは、５である。他の実施形態では、ｄは、６である。さらなる実施形態では、ｄは、７である。さらに他の実施形態では、ｄは、８である。いくつかの実施形態では、ｄは、９である。他の実施形態では、ｄは、１０である。さらなる実施形態では、ｄは、１１である。さらに他の実施形態では、ｄは、１２である。いくつかの実施形態では、ｄは、１３である。他の実施形態では、ｄは、１４である。さらなる実施形態では、ｄは、１５である。さらに他の実施形態では、ｄは、１６である。

【０４６２】

構造（ＶＩ）のいくつかの実施形態では、ｅは、１である。他の実施形態では、ｅは、２である。さらなる実施形態では、ｅは、３である。さらに他の実施形態では、ｅは、４である。いくつかの実施形態では、ｅは、５である。他の実施形態では、ｅは、６である。さらなる実施形態では、ｅは、７である。さらに他の実施形態では、ｅは、８である。いくつかの実施形態では、ｅは、９である。他の実施形態では、ｅは、１０である。さらなる実施形態では、ｅは、１１である。さらに他の実施形態では、ｅは、１２である。

【０４６３】

構造（ＶＩ）のいくつかの実施形態では、ｆは、１である。他の実施形態では、ｆは、２である。さらなる実施形態では、ｆは、３である。さらに他の実施形態では、ｆは、４である。いくつかの実施形態では、ｆは、５である。他の実施形態では、ｆは、６である。さらなる実施形態では、ｆは、７である。さらに他の実施形態では、ｆは、８である。いくつかの実施形態では、ｆは、９である。他の実施形態では、ｆは、１０である。さらなる実施形態では、ｆは、１１である。さらに他の実施形態では、ｆは、１２である。

【０４６４】

構造（ＶＩ）のいくつかの実施形態では、ｇは、１である。他の実施形態では、ｇは、２である。さらなる実施形態では、ｇは、３である。さらに他の実施形態では、ｇは、４である。いくつかの実施形態では、ｇは、５である。他の実施形態では、ｇは、６である。さらなる実施形態では、ｇは、７である。さらに他の実施形態では、ｇは、８である。いくつかの実施形態では、ｇは、９である。他の実施形態では、ｇは、１０である。さらなる実施形態では、ｇは、１１である。さらに他の実施形態では、ｇは、１２である。

【０４６５】

構造（ＶＩ）のいくつかの実施形態では、ｈは、１である。他の実施形態では、ｅは、２である。さらなる実施形態では、ｈは、３である。さらに他の実施形態では、ｈは、４である。いくつかの実施形態では、ｅは、５である。他の実施形態では、ｈは、６である。さらなる実施形態では、ｈは、７である。さらに他の実施形態では、ｈは、８である。いくつかの実施形態では、ｈは、９である。他の実施形態では、ｈは、１０である。さらなる実施形態では、ｈは、１１である。さらに他の実施形態では、ｈは、１２である。

【０４６６】

構造（ＶＩ）のいくつかの他の様々な実施形態では、ａ及びｄは、同じである。いくつかの他の実施形態では、ｂ及びｃは、同じである。いくつかの他の特定の実施形態では、ａ及びｄは、同じであり、ｂ及びｃは、同じである。

【０４６７】

ａ及びｂの合計ならびにｃ及びｄの合計は、所望の特性を有する脂質を得るために変化し得る因子である。一実施形態では、ａ及びｂは、それらの合計が１４～２４の範囲の整数であるように選択される。他の実施形態では、ｃ及びｄは、それらの合計が１４～２４

の範囲の整数であるように選択される。さらなる実施形態では、ａ及びｂの合計ならびにｃ及びｄの合計は、同じである。例えば、いくつかの実施形態では、ａ及びｂの合計ならびにｃ及びｄの合計は両方とも、１４～２４の範囲であり得る同じ整数である。なおさらなる実施形態では、ａ、ｂ、ｃ、及びｄは、ａ及びｂの合計ならびにｃ及びｄの合計が１２以上であるように選択される。

【０４６８】

$R^{1a}$、$R^{2a}$、$R^{3a}$、及び$R^{4a}$における置換基は、特に限定されない。いくつかの実施形態では、$R^{1a}$、$R^{2a}$、$R^{3a}$、及び$R^{4a}$の少なくとも１つは、Ｈである。特定の実施形態では、$R^{1a}$、$R^{2a}$、$R^{3a}$、及び$R^{4a}$は、各存在でＨである。特定の他の実施形態では、$R^{1a}$、$R^{2a}$、$R^{3a}$、及び$R^{4a}$の少なくとも１つは、$C_1$－$C_{12}$アルキルである。特定の他の実施形態では、$R^{1a}$、$R^{2a}$、$R^{3a}$、及び$R^{4a}$の少なくとも１つは、$C_1$－$C_8$アルキルである。特定の他の実施形態では、$R^{1a}$、$R^{2a}$、$R^{3a}$、及び$R^{4a}$の少なくとも１つは、$C_1$－$C_6$アルキルである。いくつかの前述の実施形態では、$C_1$－$C_8$アルキルは、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、ｔｅｒｔ－ブチル、ｎ－ヘキシルまたはｎ－オクチルである。

【０４６９】

前述の特定の実施形態では、$R^{1a}$、$R^{1b}$、$R^{4a}$、及び$R^{4b}$は、各存在で$C_1$－$C_{12}$アルキルである。

【０４７０】

前述のさらなる実施形態では、$R^{1b}$、$R^{2b}$、$R^{3b}$、及び$R^{4b}$の少なくとも１つはＨであるか、または$R^{1b}$、$R^{2b}$、$R^{3b}$、及び$R^{4b}$は各存在でＨである。

【０４７１】

前述の特定の実施形態では、$R^{1b}$は、それが結合している炭素原子と一緒になって、隣接する$R^{1b}$及びそれが結合している炭素原子と一緒になって、炭素－炭素二重結合を形成する。前述の$R^{4b}$の他の実施形態では、それが結合している炭素原子と一緒になって、隣接する$R^{4b}$及びそれが結合している炭素原子と一緒になって、炭素－炭素二重結合を形成する。

【０４７２】

$R^5$及び$R^6$の置換基は、前述の実施形態では特に限定されない。特定の実施形態では、$R^5$または$R^6$の一方は、メチルである。他の実施形態では、$R^5$または$R^6$の各々は、メチルである。

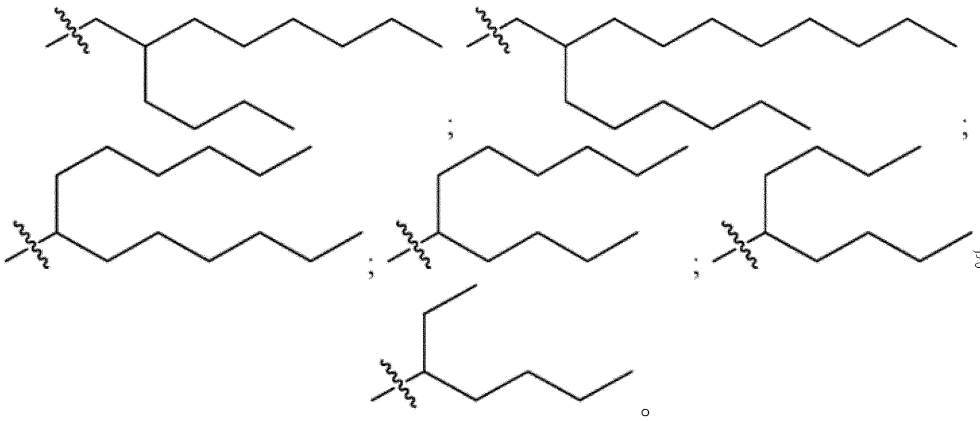
【０４７３】

$R^7$の置換基は、前述の実施形態では特に限定されない。特定の実施形態では、$R^7$は、$C_6$－$C_{16}$アルキルである。いくつかの他の実施形態では、$R^7$は、$C_6$－$C_9$アルキルである。いくつかのこれらの実施形態では、$R^7$は、－（Ｃ＝Ｏ）$OR^b$、－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）$R^b$、－Ｃ（＝Ｏ）$R^b$、－$OR^b$、－Ｓ（Ｏ）$_x$$R^b$、－Ｓ－Ｓ$R^b$、－Ｃ（＝Ｏ）Ｓ$R^b$、－ＳＣ（＝Ｏ）$R^b$、－$NR^aR^b$、－$NR^aC$（＝Ｏ）$R^b$、－Ｃ（＝Ｏ）$NR^aR^b$、－$NR^aC$（＝Ｏ）$NR^aR^b$、－ＯＣ（＝Ｏ）$NR^aR^b$、－$NR^aC$（＝Ｏ）$OR^b$、－$NR^aS$（Ｏ）$_x$$NR^aR^b$、－$NR^aS$（Ｏ）$_x$$R^b$、または－Ｓ（Ｏ）$_x$$NR^aR^b$で置換され、$R^a$は、Ｈまたは$C_1$－$C_{12}$アルキルであり、$R^b$は、$C_1$－$C_{15}$アルキルであり、ｘは、０、１、または２である。例えば、いくつかの実施形態では、$R^7$は、－（Ｃ＝Ｏ）$OR^b$または－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）$R^b$で置換される。

【０４７４】

構造（ＶＩ）の様々な前述の実施形態では、$R^b$は、分岐$C_3$－$C_{15}$アルキルである。例えば、いくつかの実施形態では、$R^b$は、以下の構造のうちの１つを有する：

【化４７】




。

他の実施形態では、$R^8$は、ＯＨである。

【０４７５】

構造（ＶＩ）の他の実施形態では、$R^8$は、－Ｎ（$R^9$）（Ｃ＝Ｏ）$R^{10}$である。いくつかの他の実施形態では、$R^8$は、－（Ｃ＝Ｏ）Ｎ$R^9$$R^{10}$である。なおさらなる実施形態では、$R^8$は、－Ｎ$R^9$$R^{10}$である。いくつかの前述の実施形態では、$R^9$及び$R^{10}$は、各々、独立して、Ｈまたは$C_1$－$C_8$アルキル、例えば、Ｈまたは$C_1$－$C_3$アルキルである。より具体的なこれらの実施形態では、$C_1$－$C_8$アルキルまたは$C_1$－$C_3$アルキルは、非置換であるか、またはヒドロキシルで置換される。他のこれらの実施形態では、$R^9$及び$R^{10}$は、各々、メチルである。

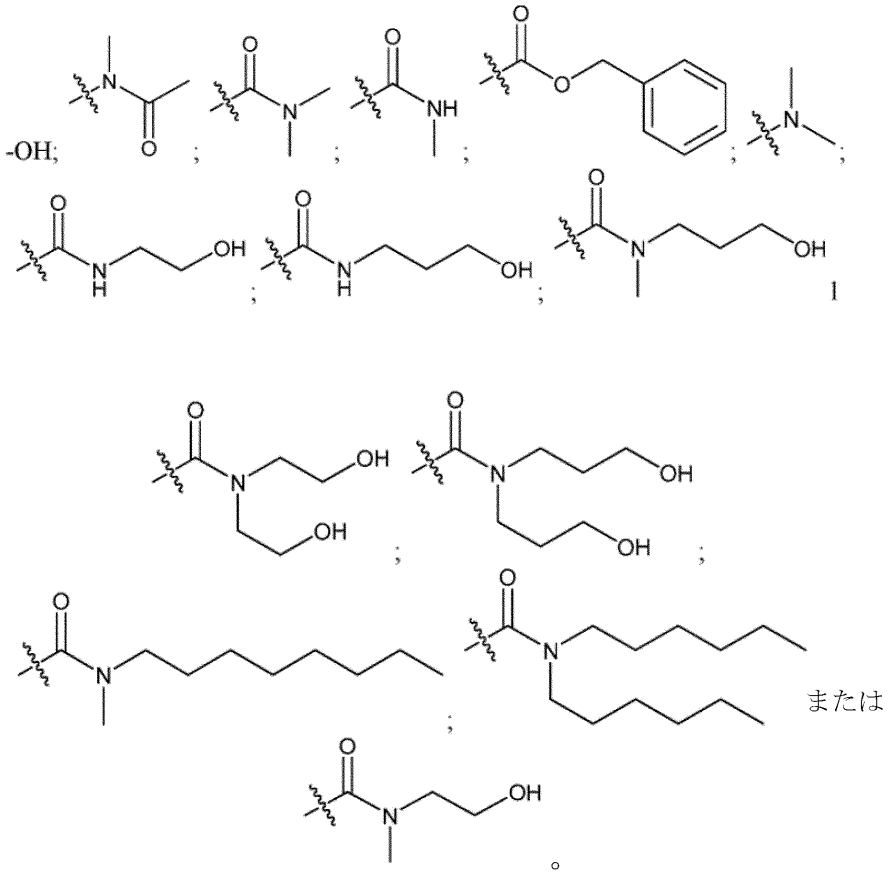
【０４７６】

構造（ＶＩ）のなおさらなる実施形態では、$R^8$は、－（Ｃ＝Ｏ）Ｏ$R^{11}$である。いくつかのこれらの実施形態では、$R^{11}$は、ベンジルである。

【０４７７】

構造（ＶＩ）のさらにより具体的な実施形態では、$R^8$は、以下の構造のうちの１つを有する：

【化４８】



【０４７８】

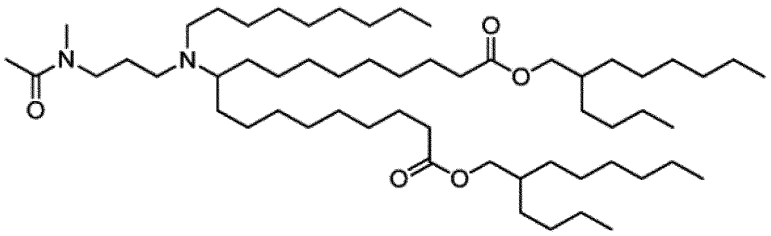
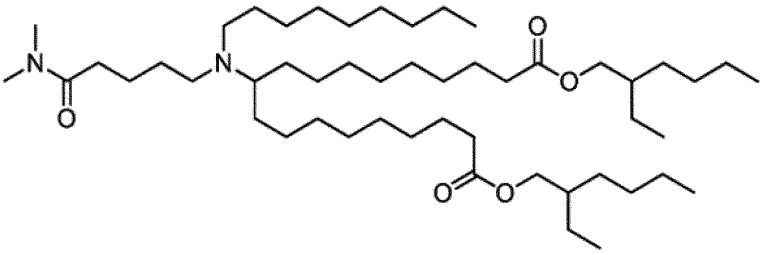
前述の化合物のさらに他の実施形態では、$G^3$は、$C_2$－$C_5$アルキレン、例えば、$C_2$－$C_4$アルキレン、$C_3$アルキレンまたは$C_4$アルキレンである。いくつかの実施形態では、$R^8$は、ＯＨである。他の実施形態では、$G^2$は、非存在であり、$R^7$は$C_1$－$C_2$アルキレン、例えば、メチルである。

【０４７９】

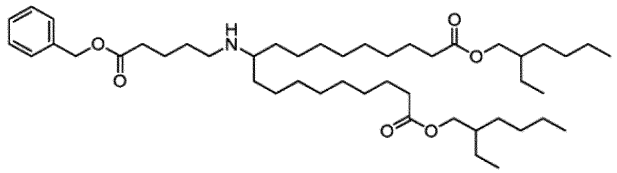
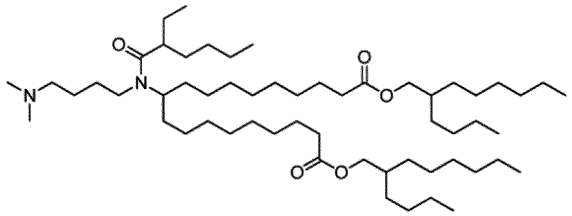
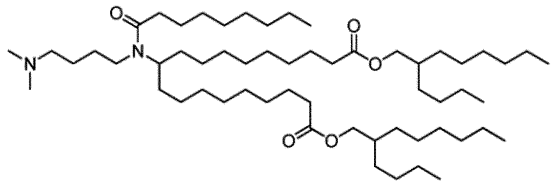
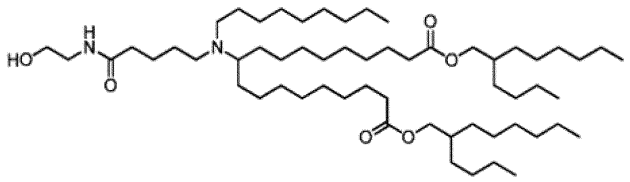
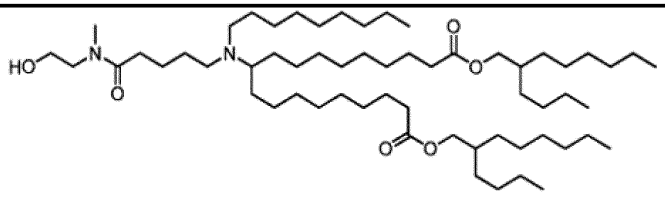
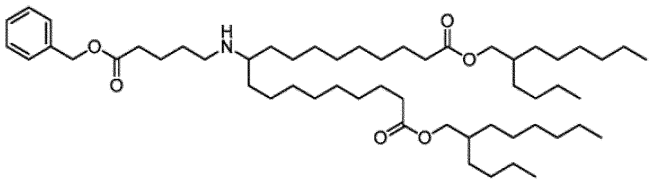
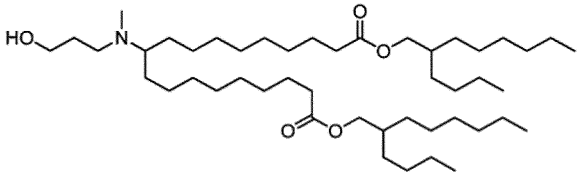
様々な異なる実施形態では、化合物は、以下の表５に示される構造のうちの１つを有する。

【表５－１】

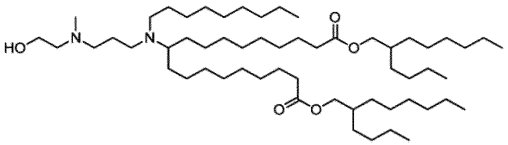
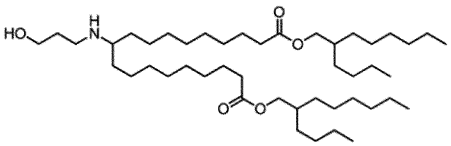
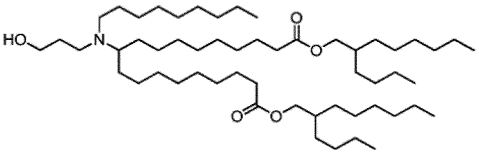
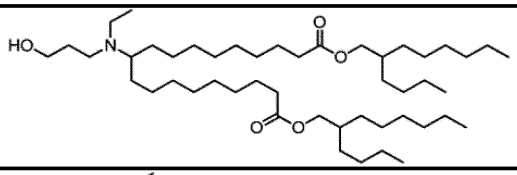
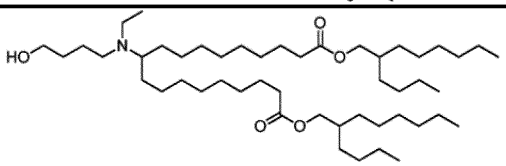
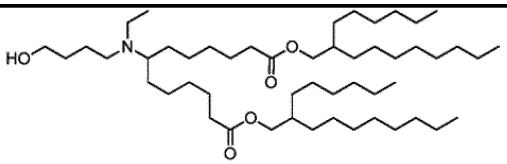
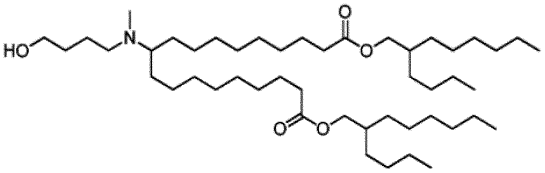
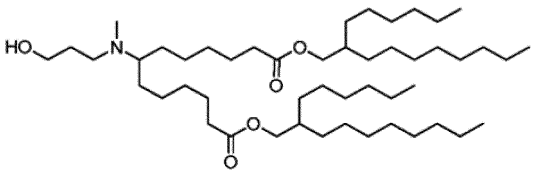
表５．構造（ＶＩ）の代表的なカチオン性脂質

| 番号 | 構造 |
|---|---|
| VI-1 |  |
| VI-2 |  |

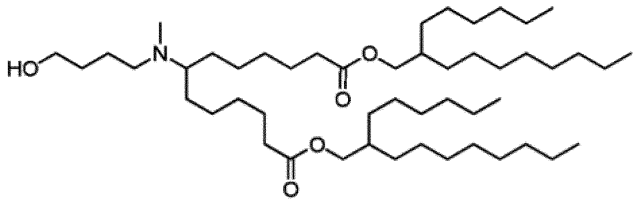
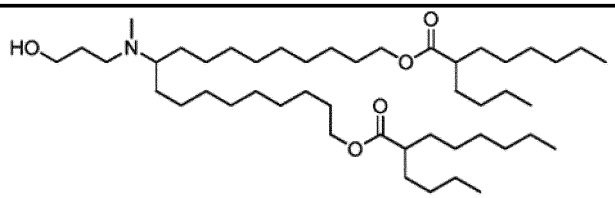
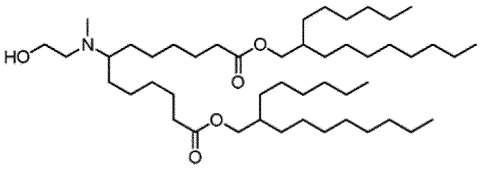
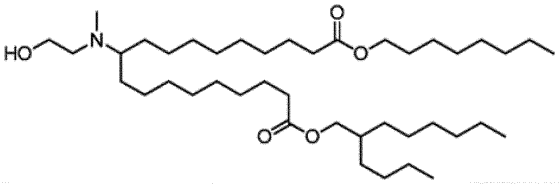
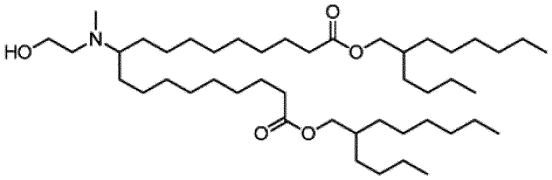
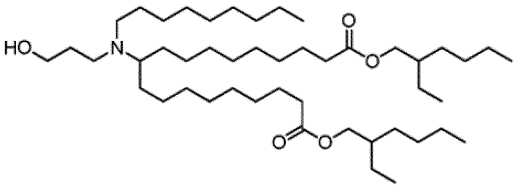
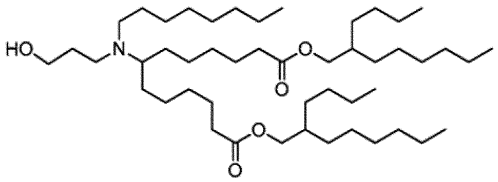
【表５－２】

| 番号 | 構造 |
|---|---|
| VI-3 |  |
| VI-4 |  |
| VI-5 |  |
| VI-6 |  |
| VI-7 |  |
| VI-8 |  |
| VI-9 |  |

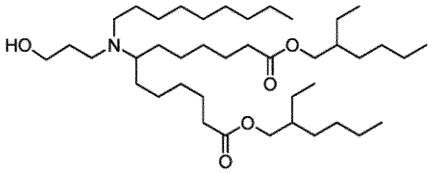
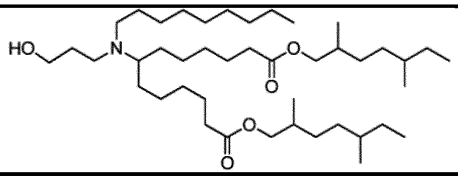
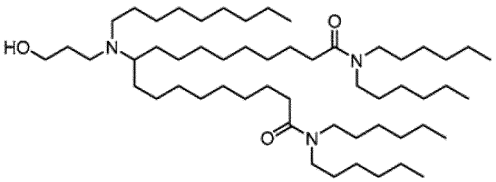
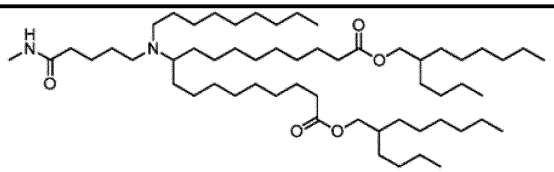
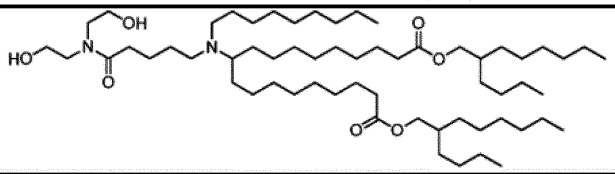
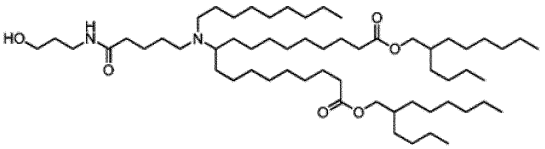
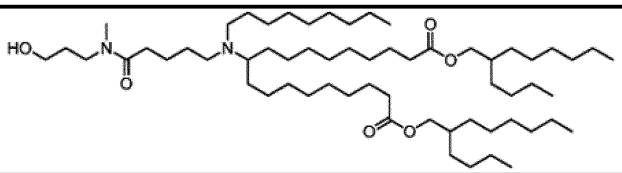
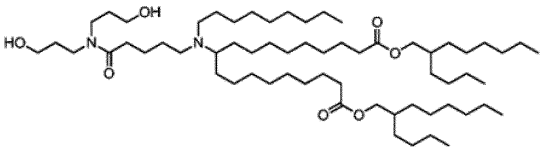
【表５－３】

| 番号 | 構造 |
|---|---|
| VI-10 |  |
| VI-11 |  |
| VI-12 |  |
| VI-13 |  |
| VI-14 |  |
| VI-15 |  |
| VI-16 |  |
| VI-17 |  |

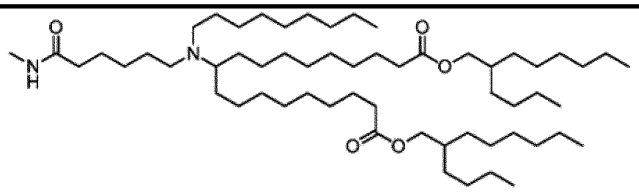
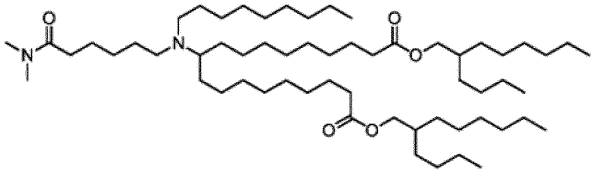
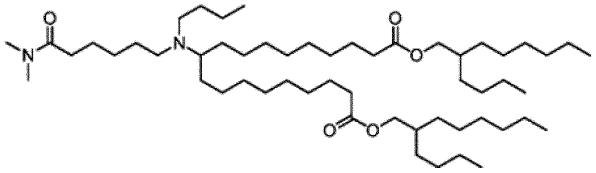
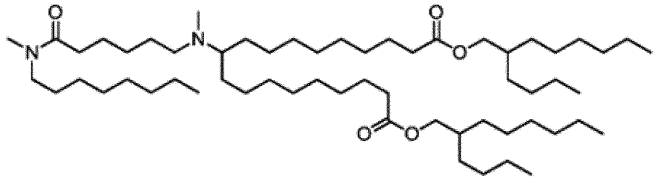
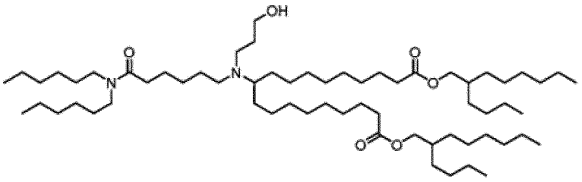
【表５－４】

| 番号 | 構造 |
|---|---|
| VI-18 |  |
| VI-19 |  |
| VI-20 |  |
| VI-21 |  |
| VI-22 |  |
| VI-23 |  |
| VI-24 |  |

【表５－５】

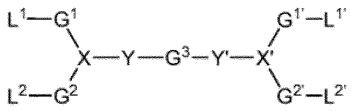
| 番号 | 構造 |
|---|---|
| VI-25 |  |
| VI-26 |  |
| VI-27 |  |
| VI-28 |  |
| VI-29 |  |
| VI-30 |  |
| VI-31 |  |
| VI-32 |  |

【表５－６】

| 番号 | 構造 |
|---|---|
| VI-33 |  |
| VI-34 |  |
| VI-35 |  |
| VI-36 |  |
| VI-37 |  |

一実施形態では、カチオン性脂質は、以下の構造（ＶＩＩ）を有する化合物であるか、

【化４９】



(VII)

またはその薬学的に許容可能な塩、プロドラッグもしくは立体異性体であり、式中、

Ｘ及びＸ’は、各々、独立して、ＮまたはＣＲであり、

Ｙ及びＹ’は、各々、独立して、非存在、－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）－、－（Ｃ＝Ｏ）Ｏ－、またはＮＲであり、

ただし、

ａ）ＸがＮである場合、Ｙは非存在であり、

ｂ）Ｘ’がＮである場合、Ｙ’は非存在であり、

ｃ）ＸがＣＲである場合、Ｙは－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）－、－（Ｃ＝Ｏ）Ｏ－、またはＮＲであり、

ｄ）Ｘ’がＣＲである場合、Ｙ’は、－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）－、－（Ｃ＝Ｏ）Ｏ－、またはＮＲであり、

$L^1$及び$L^{1'}$は、各々、独立して、－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）$R^1$、－（Ｃ＝Ｏ）Ｏ$R^1$、－Ｃ（＝Ｏ）$R^1$、－Ｏ$R^1$、－Ｓ（Ｏ）$_z$$R^1$、－Ｓ－Ｓ$R^1$、－Ｃ（＝Ｏ）Ｓ$R^1$、－Ｓ

（＝Ｏ）Ｒ$^{1}$、－ＮＲ$^{a}$Ｃ（＝Ｏ）Ｒ$^{1}$、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＲ$^{b}$Ｒ$^{c}$、－ＮＲ$^{a}$Ｃ（＝Ｏ）ＮＲ$^{b}$Ｒ$^{c}$、－ＯＣ（＝Ｏ）ＮＲ$^{b}$Ｒ$^{c}$、または－ＮＲ$^{a}$Ｃ（＝Ｏ）ＯＲ$^{1}$であり、

Ｌ$^{2}$及びＬ$^{2'}$は、各々、独立して、－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）Ｒ$^{2}$、－（Ｃ＝Ｏ）ＯＲ$^{2}$、－Ｃ（＝Ｏ）Ｒ$^{2}$、－ＯＲ$^{2}$、－Ｓ（Ｏ）$_{z}$Ｒ$^{2}$、－Ｓ－ＳＲ$^{2}$、－Ｃ（＝Ｏ）ＳＲ$^{2}$、－ＳＣ（＝Ｏ）Ｒ$^{2}$、－ＮＲ$^{d}$Ｃ（＝Ｏ）Ｒ$^{2}$、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＲ$^{e}$Ｒ$^{f}$、－ＮＲ$^{d}$Ｃ（＝Ｏ）ＮＲ$^{e}$Ｒ$^{f}$、－ＯＣ（＝Ｏ）ＮＲ$^{e}$Ｒ$^{f}$、－ＮＲ$^{d}$Ｃ（＝Ｏ）ＯＲ$^{2}$、またはＲ$^{2}$との直接結合であり、

Ｇ$^{1}$、Ｇ$^{1'}$、Ｇ$^{2}$、及びＧ$^{2'}$は、各々、独立して、Ｃ$_{2}$－Ｃ$_{12}$アルキレンまたはＣ$_{2}$－Ｃ$_{12}$アルケニレンであり、

Ｇ$^{3}$は、Ｃ$_{2}$－Ｃ$_{24}$ヘテロアルキレンまたはＣ$_{2}$－Ｃ$_{24}$ヘテロアルケニレンであり、

Ｒ$^{a}$、Ｒ$^{b}$、Ｒ$^{d}$、及びＲ$^{e}$は、各存在で、独立して、Ｈ、Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{12}$アルキルまたはＣ$_{2}$－Ｃ$_{12}$アルケニルであり、

Ｒ$^{c}$及びＲ$^{f}$は、各存在で、独立して、Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{12}$アルキルまたはＣ$_{2}$－Ｃ$_{12}$アルケニルであり、

Ｒは、各存在で、独立して、ＨまたはＣ$_{1}$－Ｃ$_{12}$アルキルであり、

Ｒ$^{1}$及びＲ$^{2}$は、各々、独立して、分岐Ｃ$_{6}$－Ｃ$_{24}$アルキルまたは分岐Ｃ$_{6}$－Ｃ$_{24}$アルケニルであり、

ｚは、０、１、または２であり、

各アルキル、アルケニル、アルキレン、アルケニレン、ヘテロアルキレン、及びヘテロアルケニレンは、別段の指定がない限り、独立して、置換または非置換である。

【０４８０】

構造（ＶＩＩ）の他の異なる実施形態では、

Ｘ及びＸ’は、各々、独立して、ＮまたはＣＲであり、

Ｙ及びＹ’は、各々、独立して、非存在、またはＮＲであり、ただし、

ａ）ＸがＮである場合、Ｙは非存在であり、

ｂ）Ｘ’がＮである場合、Ｙ’は非存在であり、

ｃ）ＸがＣＲである場合、ＹはＮＲであり、

ｄ）Ｘ’がＣＲの場合、Ｙ’はＮＲであり、

Ｌ$^{1}$及びＬ$^{1'}$は、各々、独立して、－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）Ｒ$^{1}$、－（Ｃ＝Ｏ）ＯＲ$^{1}$、－Ｃ（＝Ｏ）Ｒ$^{1}$、－ＯＲ$^{1}$、－Ｓ（Ｏ）$_{z}$Ｒ$^{1}$、－Ｓ－ＳＲ$^{1}$、－Ｃ（＝Ｏ）ＳＲ$^{1}$、－ＳＣ（＝Ｏ）Ｒ$^{1}$、－ＮＲ$^{a}$Ｃ（＝Ｏ）Ｒ$^{1}$、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＲ$^{b}$Ｒ$^{c}$、－ＮＲ$^{a}$Ｃ（＝Ｏ）ＮＲ$^{b}$Ｒ$^{c}$、－ＯＣ（＝Ｏ）ＮＲ$^{b}$Ｒ$^{c}$、または－ＮＲ$^{a}$Ｃ（＝Ｏ）ＯＲ$^{1}$であり、

Ｌ$^{2}$及びＬ$^{2'}$は、各々、独立して、－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）Ｒ$^{2}$、－（Ｃ＝Ｏ）ＯＲ$^{2}$、－Ｃ（＝Ｏ）Ｒ$^{2}$、－ＯＲ$^{2}$、－Ｓ（Ｏ）$_{z}$Ｒ$^{2}$、－Ｓ－ＳＲ$^{2}$、－Ｃ（＝Ｏ）ＳＲ$^{2}$、－ＳＣ（＝Ｏ）Ｒ$^{2}$、－ＮＲ$^{d}$Ｃ（＝Ｏ）Ｒ$^{2}$、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＲ$^{e}$Ｒ$^{f}$、－ＮＲ$^{d}$Ｃ（＝Ｏ）ＮＲ$^{e}$Ｒ$^{f}$、－ＯＣ（＝Ｏ）ＮＲ$^{e}$Ｒ$^{f}$、－ＮＲ$^{d}$Ｃ（＝Ｏ）ＯＲ$^{2}$、またはＲ$^{2}$との直接結合であり、

Ｇ$^{1}$、Ｇ$^{1'}$、Ｇ$^{2}$、及びＧ$^{2'}$は、各々、独立して、Ｃ$_{2}$－Ｃ$_{12}$アルキレンまたはＣ$_{2}$－Ｃ$_{12}$アルケニレンであり、

Ｇ$^{3}$は、Ｃ$_{2}$－Ｃ$_{24}$アルキレンオキシドまたはＣ$_{2}$－Ｃ$_{24}$アルケニレンオキシドであり、

Ｒ$^{a}$、Ｒ$^{b}$、Ｒ$^{d}$、及びＲ$^{e}$は、各存在で、独立して、Ｈ、Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{12}$アルキルまたはＣ$_{2}$－Ｃ$_{12}$アルケニルであり、

Ｒ$^{c}$及びＲ$^{f}$は、各存在で、独立して、Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{12}$アルキルまたはＣ$_{2}$－Ｃ$_{12}$アルケニルであり、

Ｒは、各存在で、独立して、ＨまたはＣ$_{1}$－Ｃ$_{12}$アルキルであり、

Ｒ$^{1}$及びＲ$^{2}$は、各々、独立して、分岐Ｃ$_{6}$－Ｃ$_{24}$アルキルまたは分岐Ｃ$_{6}$－Ｃ$_{24}$アルケニルであり、

ｚは、０、１、または２であり、

各アルキル、アルケニル、アルキレン、アルケニレン、アルキレンオキシド、及びアルケ

ニレンオキシドは、別段の指定がない限り、独立して、置換または非置換である。

【０４８１】

構造（ＶＩＩ）のいくつかの実施形態では、$G^3$は、$C_2$－$C_{24}$アルキレンオキシドまたは$C_2$－$C_{24}$アルケニレンオキシドである。特定の実施形態では、$G^3$は、非置換である。他の実施形態では、$G^3$は、置換され、例えば、ヒドロキシルで置換される。より具体的な実施形態では、$G^3$は、$C_2$－$C_{12}$アルキレンオキシドであり、例えば、いくつかの実施形態では、$G^3$は、$C_3$－$C_7$アルキレンオキシドであり、または他の実施形態では、$G^3$は、$C_3$－$C_{12}$アルキレンオキシドである。

【０４８２】

構造（ＶＩＩ）の他の実施形態では、$G^3$は、$C_2$－$C_{24}$アルキレンアミニルまたは$C_2$－$C_{24}$アルケニレンアミニル、例えば、$C_6$－$C_{12}$アルキレンアミニルである。いくつかのこれらの実施形態では、$G^3$は、非置換である。他のこれらの実施形態では、$G^3$は、$C_1$－$C_6$アルキルで置換される。

【０４８３】

構造（ＶＩＩ）のいくつかの実施形態では、Ｘ及びＸ’は、各々、Ｎであり、Ｙ及びＹ’は、各々、非存在である。他の実施形態では、Ｘ及びＸ’は、各々、ＣＲであり、Ｙ及びＹ’は、各々、ＮＲである。いくつかのこれらの実施形態では、Ｒは、Ｈである。

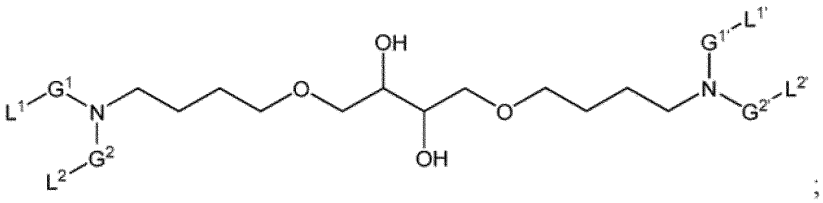
【０４８４】

構造（ＶＩＩ）の特定の実施形態では、Ｘ及びＸ’は、各々、ＣＲであり、Ｙ及びＹ’は、各々、独立して、－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）－または－（Ｃ＝Ｏ）Ｏ－である。

【０４８５】

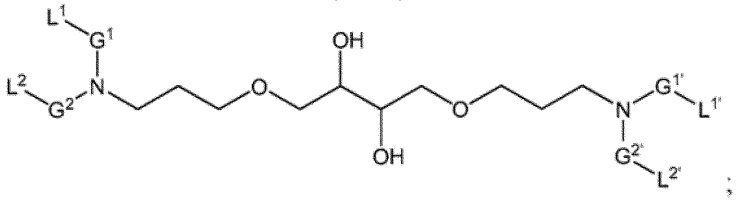
構造（ＶＩＩ）のいくつかの前述の実施形態では、化合物は、以下の構造（ＶＩＩＡ）、（ＶＩＩＢ）、（ＶＩＩＣ）、（ＶＩＩＤ）、（ＶＩＩＥ）、（ＶＩＩＦ）、（ＶＩＩＧ）、または（ＶＩＩＨ）のうちの１つを有し、

【化５０－１】



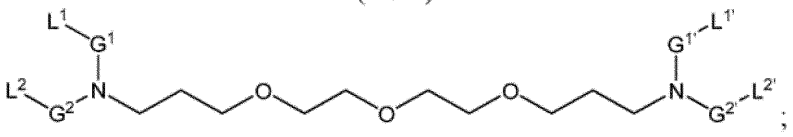
;

(VIIA)



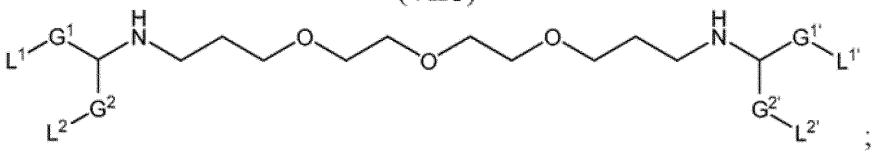
;

(VIIB)



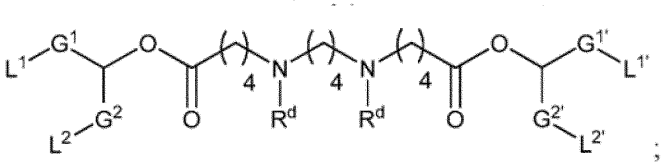
;

(VIIC)



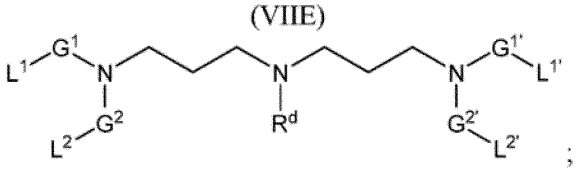
;

(VIID)



;

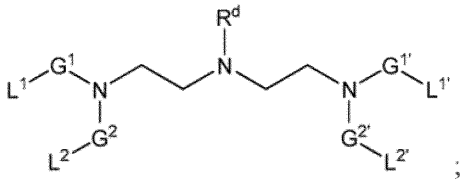
(VIIE)



;

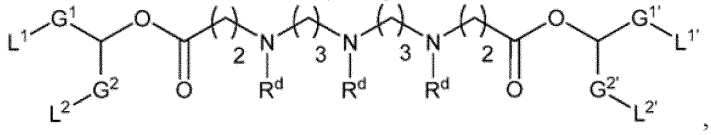
(VIIF)

【化５０－２】



；または

(VIIG)



,

(VIIH)

式中、$R^d$は、各存在で、独立して、Hまたは任意に置換$C_1$－$C_6$アルキルである。例えば、いくつかの実施形態では、$R^d$は、Hである。他の実施形態では、$R^d$は、$C_1$－$C_6$アルキル、例えば、メチルである。他の実施形態では、$R^d$は、置換$C_1$－$C_6$アルキル、例えば、－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）Ｒ、－（Ｃ＝Ｏ）ＯＲ、－ＮＲＣ（＝Ｏ）Ｒ、または－Ｃ（＝Ｏ）Ｎ（Ｒ）$_2$で置換される$C_1$－$C_6$アルキルであり、Ｒは、各存在で、独立して、Hまたは$C_1$－$C_{12}$アルキルである。

【０４８６】

構造（ＶＩＩ）のいくつかの前述の実施形態では、$L^1$及び$L^{1'}$は、各々、独立して、－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）$R^1$、－（Ｃ＝Ｏ）Ｏ$R^1$、または－Ｃ（＝Ｏ）Ｎ$R^b$$R^c$であり、$L^2$及び$L^{2'}$は、各々、独立して、－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）$R^2$、－（Ｃ＝Ｏ）Ｏ$R^2$、または－Ｃ（＝Ｏ）Ｎ$R^e$$R^f$である。例えば、いくつかの実施形態では、$L^1$及び$L^{1'}$は、各々、－（Ｃ＝Ｏ）Ｏ$R^1$であり、$L^2$及び$L^{2'}$は、各々、－（Ｃ＝Ｏ）Ｏ$R^2$である。他の実施形態では、$L^1$及び$L^{1'}$は、各々、－（Ｃ＝Ｏ）Ｏ$R^1$であり、$L^2$及び$L^{2'}$は、各々、－Ｃ（＝Ｏ）Ｎ$R^e$$R^f$である。他の実施形態では、$L^1$及び$L^{1'}$は、各々、－Ｃ（＝Ｏ）Ｎ$R^b$$R^c$であり、$L^2$及び$L^{2'}$は、各々、－Ｃ（＝Ｏ）Ｎ$R^e$$R^f$である。

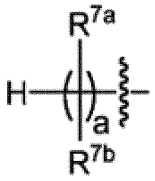
【０４８７】

前述のいくつかの実施形態では、$G^1$、$G^{1'}$、$G^2$、及び$G^{2'}$は、各々、独立して、$C_2$－$C_8$アルキレン、例えば、$C_4$－$C_8$アルキレンである。

【０４８８】

構造（ＶＩＩ）のいくつかの前述の実施形態では、$R^1$または$R^2$は、各々、各存在で、独立して、分岐$C_6$－$C_{24}$アルキルである。例えば、いくつかの実施形態では、$R^1$及び$R^2$は、各存在で、独立して、以下の構造を有し、

【化５１】



，

式中、

$R^{7a}$及び$R^{7b}$は、各存在で、独立して、Hまたは$C_1$－$C_{12}$アルキルであり、及び、

ａは、２～１２の整数であり、

$R^{7a}$、$R^{7b}$及びａは、各々、$R^1$及び$R^2$が、各々、独立して、６～２０個の炭素原子を含むように選択される。例えば、いくつかの実施形態では、ａは、５～９または８～１２の範囲の整数である。

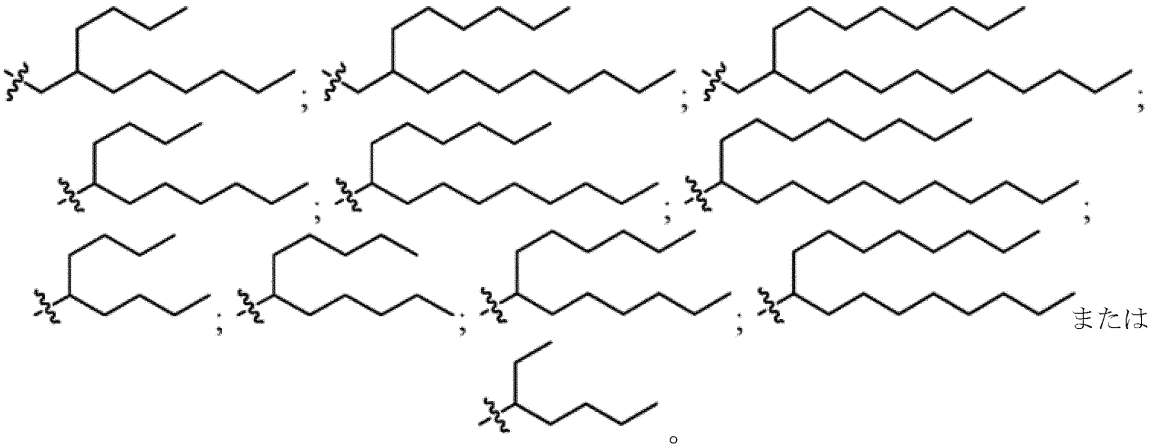
【０４８９】

構造（ＶＩＩ）のいくつかの前述の実施形態では、$R^{7a}$の少なくとも１つの存在においてHである。例えば、いくつかの実施形態では、$R^{7a}$は各存在においてHである。前述の他の異なる実施形態では、$R^{7b}$の少なくとも１つの存在は、$C_1$－$C_8$アルキルである。例えば、いくつかの実施形態では、$C_1$－$C_8$アルキルは、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、ｔｅｒｔ－ブチル、ｎ－ヘキシルまたはｎ－オクチルである。

【０４９０】

構造（ＶＩＩ）の異なる実施形態では、$R^1$もしくは$R^2$、またはその両方は、各存在で、独立して、以下の構造のうちの１つを有する：

【化５２】




。

【０４９１】

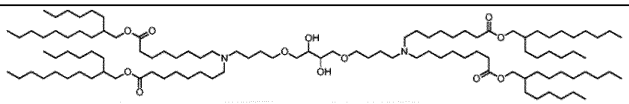
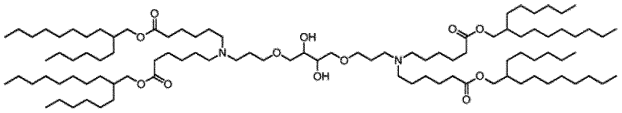
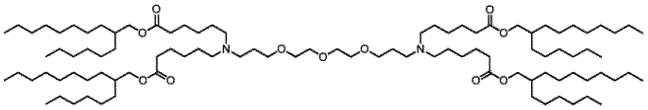
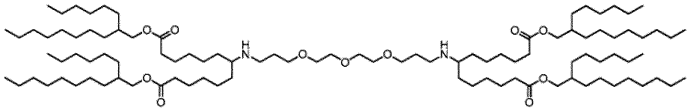
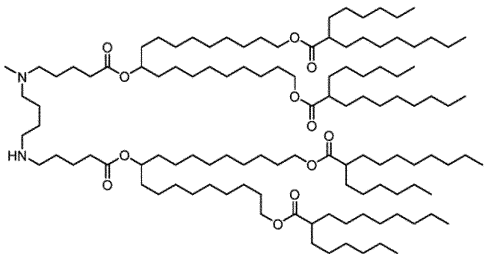
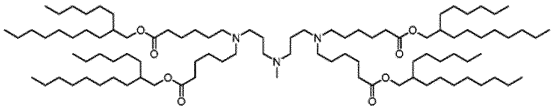
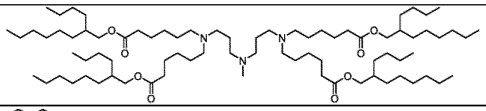
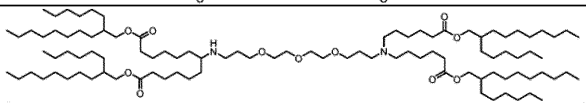
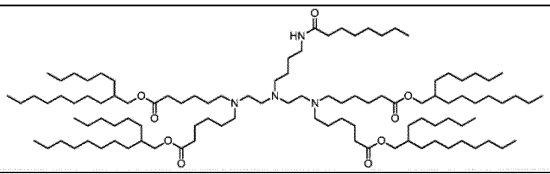
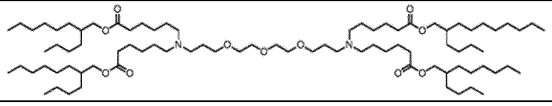
構造（ＶＩＩ）のいくつかの前述の実施形態では、$R^b$、$R^c$、$R^e$、及び$R^f$は、存在する場合、各々、独立して、$C_3$－$C_{12}$アルキルである。例えば、いくつかの実施形態では、$R^b$、$R^c$、$R^e$、及び$R^f$は、存在する場合、ｎ－ヘキシルであり、他の実施形態では、$R^b$、$R^c$、$R^e$、及び$R^f$は、存在する場合、ｎ－オクチルである。

【０４９２】

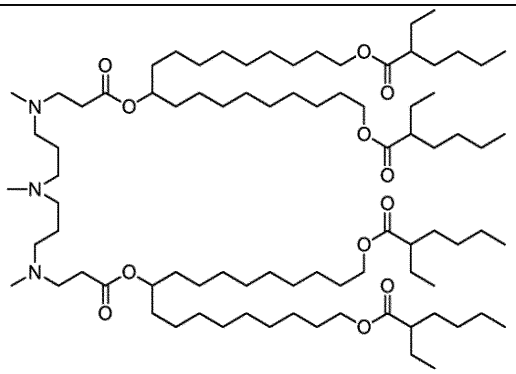
構造（ＶＩＩ）の様々な異なる実施形態では、カチオン性脂質は、以下の表６に示される構造のうちの１つを有する。

【表６－１】

表６．構造（ＶＩＩ）の代表的なカチオン性脂質

| 番号 | 構造 |
|---|---|
| VII-1 |  |
| VII-2 |  |
| VII-3 |  |
| VII-4 |  |
| VII-5 |  |
| VII-6 |  |
| VII-7 |  |
| VII-8 |  |
| VII-9 |  |
| VII-10 |  |

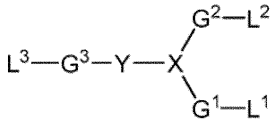
【表６－２】

| 番号 | 構造 |
|---|---|
| VII-11 |  |

【０４９３】

一実施形態では、カチオン性脂質は、以下の構造（ＶＩＩＩ）を有する化合物であるか、

【化５３】



(VIII)

またはその薬学的に許容可能な塩、プロドラッグもしくは立体異性体であり、式中、

ＸはＮであり、Ｙは非存在であるか、またはＸはＣＲであり、ＹはＮＲであり、

$L^1$は、－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）$R^1$、－（Ｃ＝Ｏ）Ｏ$R^1$、－Ｃ（＝Ｏ）$R^1$、－Ｏ$R^1$、－Ｓ（Ｏ）$_x$$R^1$、－Ｓ－Ｓ$R^1$、－Ｃ（＝Ｏ）Ｓ$R^1$、－ＳＣ（＝Ｏ）$R^1$、－Ｎ$R^a$Ｃ（＝Ｏ）$R^1$、－Ｃ（＝Ｏ）Ｎ$R^b$$R^c$、－Ｎ$R^a$Ｃ（＝Ｏ）Ｎ$R^b$$R^c$、－ＯＣ（＝Ｏ）Ｎ$R^b$$R^c$、または－Ｎ$R^a$Ｃ（＝Ｏ）Ｏ$R^1$であり、

$L^2$は、－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）$R^2$、－（Ｃ＝Ｏ）Ｏ$R^2$、－Ｃ（＝Ｏ）$R^2$、－Ｏ$R^2$、－Ｓ（Ｏ）$_x$$R^2$、－Ｓ－Ｓ$R^2$、－Ｃ（＝Ｏ）Ｓ$R^2$、－ＳＣ（＝Ｏ）$R^2$、－Ｎ$R^d$Ｃ（＝Ｏ）$R^2$、－Ｃ（＝Ｏ）Ｎ$R^e$$R^f$、－Ｎ$R^d$Ｃ（＝Ｏ）Ｎ$R^e$$R^f$、－ＯＣ（＝Ｏ）Ｎ$R^e$$R^f$、－Ｎ$R^d$Ｃ（＝Ｏ）Ｏ$R^2$、または$R^2$との直接結合であり、

$L^3$は、－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）$R^3$または－（Ｃ＝Ｏ）Ｏ$R^3$であり、

$G^1$及び$G^2$は、各々、独立して、$C_2$－$C_{12}$アルキレンまたは$C_2$－$C_{12}$アルケニレンであり、

$G^3$は、$C_1$－$C_{24}$アルキレン、$C_2$－$C_{24}$アルケニレン、$C_1$－$C_{24}$ヘテロアルキレン、または$C_2$－$C_{24}$ヘテロアルケニレンであり、

$R^a$、$R^b$、$R^d$、及び$R^e$は、各々、独立して、Ｈまたは$C_1$－$C_{12}$アルキルまたは$C_1$－$C_{12}$アルケニルであり、

$R^c$及び$R^f$は、各々、独立して、$C_1$－$C_{12}$アルキルまたは$C_2$－$C_{12}$アルケニルであり、

各Ｒは、独立して、Ｈまたは$C_1$－$C_{12}$アルキルであり、

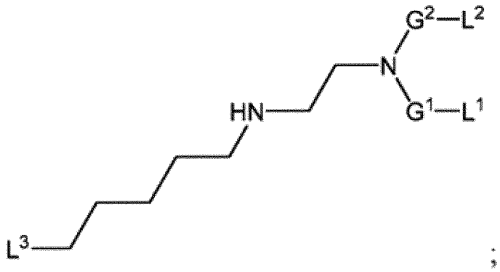
$R^1$、$R^2$、及び$R^3$は、各々、独立して、$C_1$－$C_{24}$アルキルまたは$C_2$－$C_{24}$アルケニルであり、

ｘは、０、１、または２であり、

各アルキル、アルケニル、アルキレン、アルケニレン、ヘテロアルキレン、及びヘテロアルケニレンは、別段の指定がない限り、独立して、置換または非置換である。

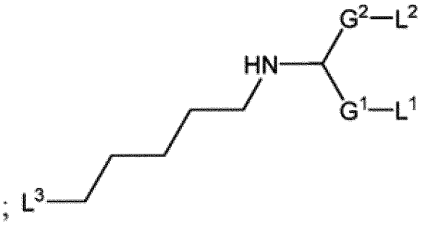
【０４９４】
構造（Ｉ）のさらなる実施形態では、
ＸはＮであり、Ｙは非存在であるか、またはＸはＣＲであり、ＹはＮＲであり、
$L^1$は、－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）$R^1$、－（Ｃ＝Ｏ）Ｏ$R^1$、－Ｃ（＝Ｏ）$R^1$、－Ｏ$R^1$、－Ｓ（Ｏ）$_x$$R^1$、－Ｓ－Ｓ$R^1$、－Ｃ（＝Ｏ）Ｓ$R^1$、－ＳＣ（＝Ｏ）$R^1$、－Ｎ$R^a$Ｃ（＝Ｏ）$R^1$、－Ｃ（＝Ｏ）Ｎ$R^b$$R^c$、－Ｎ$R^a$Ｃ（＝Ｏ）$R^b$$R^c$、－ＯＣ（＝Ｏ）Ｎ$R^b$$R^c$、または－Ｎ$R^a$Ｃ（＝Ｏ）Ｏ$R^1$であり、
$L^2$は、－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）$R^2$、－（Ｃ＝Ｏ）Ｏ$R^2$、－Ｃ（＝Ｏ）$R^2$、－Ｏ$R^2$、－Ｓ（Ｏ）$_x$$R^2$、－Ｓ－Ｓ$R^2$、－Ｃ（＝Ｏ）Ｓ$R^2$、－ＳＣ（＝Ｏ）$R^2$、－Ｎ$R^d$Ｃ（＝Ｏ）$R^2$、－Ｃ（＝Ｏ）Ｎ$R^e$$R^f$、－Ｎ$R^d$Ｃ（＝Ｏ）Ｎ$R^e$$R^f$、－ＯＣ（＝Ｏ）Ｎ$R^e$$R^f$、－Ｎ$R^d$Ｃ（＝Ｏ）Ｏ$R^2$、または$R^2$との直接結合であり、
$L^3$は、－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）$R^3$または－（Ｃ＝Ｏ）Ｏ$R^3$であり、
$G^1$及び$G^2$は、各々、独立して、$Ｃ_2$－$Ｃ_{12}$アルキレンまたは$Ｃ_2$－$Ｃ_{12}$アルケニレンであり、
$G^3$は、ＸがＣＲであり、ＹがＮＲである場合、$Ｃ_1$－$Ｃ_{24}$アルキレン、$Ｃ_2$－$Ｃ_{24}$アルケニレン、$Ｃ_1$－$Ｃ_{24}$ヘテロアルキレン、または$Ｃ_2$－$Ｃ_{24}$ヘテロアルケニレンであり、$G^3$は、ＸがＮであり、Ｙが非存在である場合、$Ｃ_1$－$Ｃ_{24}$ヘテロアルキレン、または$Ｃ_2$－$Ｃ_{24}$ヘテロアルケニレンであり、
$R^a$、$R^b$、$R^d$、及び$R^e$は、各々、独立して、Ｈまたは$Ｃ_1$－$Ｃ_{12}$アルキルまたは$Ｃ_1$－$Ｃ_{12}$アルケニルであり、
$R^c$及び$R^f$は、各々、独立して、$Ｃ_1$－$Ｃ_{12}$アルキルまたは$Ｃ_2$－$Ｃ_{12}$アルケニルであり、
各Ｒは、独立して、Ｈまたは$Ｃ_1$－$Ｃ_{12}$アルキルであり、
$R^1$、$R^2$、及び$R^3$は、各々、独立して、$Ｃ_1$－$Ｃ_{24}$アルキルまたは$Ｃ_2$－$Ｃ_{24}$アルケニルであり、
ｘは、０、１、または２であり、
各アルキル、アルケニル、アルキレン、アルケニレン、ヘテロアルキレン、及びヘテロアルケニレンは、別段の指定がない限り、独立して、置換または非置換である。
【０４９５】
構造（Ｉ）の他の実施形態では、
ＸはＮであり、Ｙは非存在であるか、またはＸはＣＲであり、ＹはＮＲであり、
$L^1$は、－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）$R^1$、－（Ｃ＝Ｏ）Ｏ$R^1$、－Ｃ（＝Ｏ）$R^1$、－Ｏ$R^1$、－Ｓ（Ｏ）$_x$$R^1$、－Ｓ－Ｓ$R^1$、－Ｃ（＝Ｏ）Ｓ$R^1$、－ＳＣ（＝Ｏ）$R^1$、－Ｎ$R^a$Ｃ（＝Ｏ）$R^1$、－Ｃ（＝Ｏ）Ｎ$R^b$$R^c$、－Ｎ$R^a$Ｃ（＝Ｏ）Ｎ$R^b$$R^c$、－ＯＣ（＝Ｏ）Ｎ$R^b$$R^c$、または－Ｎ$R^a$Ｃ（＝Ｏ）Ｏ$R^1$であり、
$L^2$は、－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）$R^2$、－（Ｃ＝Ｏ）Ｏ$R^2$、－Ｃ（＝Ｏ）$R^2$、－Ｏ$R^2$、－Ｓ（Ｏ）$_x$$R^2$、－Ｓ－Ｓ$R^2$、－Ｃ（＝Ｏ）Ｓ$R^2$、－ＳＣ（＝Ｏ）$R^2$、－Ｎ$R^d$Ｃ（＝Ｏ）$R^2$、－Ｃ（＝Ｏ）Ｎ$R^e$$R^f$、－Ｎ$R^d$Ｃ（＝Ｏ）Ｎ$R^e$$R^f$、－ＯＣ（＝Ｏ）Ｎ$R^e$$R^f$、－Ｎ$R^d$Ｃ（＝Ｏ）Ｏ$R^2$、または$R^2$との直接結合であり、
$L^3$は、－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）$R^3$または－（Ｃ＝Ｏ）Ｏ$R^3$であり、
$G^1$及び$G^2$は、各々、独立して、$Ｃ_2$－$Ｃ_{12}$アルキレンまたは$Ｃ_2$－$Ｃ_{12}$アルケニレンであり、
$G^3$は、$Ｃ_1$－$Ｃ_{24}$アルキレン、$Ｃ_2$－$Ｃ_{24}$アルケニレン、$Ｃ_1$－$Ｃ_{24}$ヘテロアルキレン、または$Ｃ_2$－$Ｃ_{24}$ヘテロアルケニレンであり、
$R^a$、$R^b$、$R^d$、及び$R^e$は、各々、独立して、Ｈまたは$Ｃ_1$－$Ｃ_{12}$アルキルまたは$Ｃ_1$－$Ｃ_{12}$アルケニルであり、
$R^c$及び$R^f$は、各々、独立して、$Ｃ_1$－$Ｃ_{12}$アルキルまたは$Ｃ_2$－$Ｃ_{12}$アルケニルであり、
各Ｒは、独立して、Ｈまたは$Ｃ_1$－$Ｃ_{12}$アルキルであり、
$R^1$、$R^2$、及び$R^3$は、各々、独立して、分岐$Ｃ_6$－$Ｃ_{24}$アルキルまたは分岐$Ｃ_6$

－Ｃ２４アルケニルであり、
ｘは、０、１、または２であり、
各アルキル、アルケニル、アルキレン、アルケニレン、ヘテロアルキレン、及びヘテロアルケニレンは、別段の指定がない限り、独立して、置換または非置換である。
【０４９６】
構造（ＶＩＩＩ）の特定の実施形態では、$G^3$は、非置換である。より具体的な実施形態では、$G^3$は、Ｃ２－Ｃ１２アルキレンであり、例えば、いくつかの実施形態では、$G^3$は、Ｃ３－Ｃ７アルキレンであり、または他の実施形態では、$G^3$は、Ｃ３－Ｃ１２アルキレンである。いくつかの実施形態では、$G^3$は、Ｃ２またはＣ３アルキレンである。
【０４９７】
構造（ＶＩＩＩ）の他の実施形態では、$G^3$は、Ｃ１－Ｃ１２ヘテロアルキレン、例えば、Ｃ１－Ｃ１２アミニルアルキレンである。
【０４９８】
構造（ＶＩＩＩ）の特定の実施形態では、Ｘは、Ｎであり、Ｙは、非存在である。他の実施形態では、Ｘは、ＣＲであり、Ｙは、ＮＲであり、例えば、いくつかのこれらの実施形態では、Ｒは、Ｈである。
【０４９９】
構造（ＶＩＩＩ）のいくつかの前述の実施形態では、化合物は、以下の構造（ＶＩＩＩＡ）、（ＶＩＩＩＢ）、（ＶＩＩＩＣ）、または（ＶＩＩＩＤ）のうちの１つを有する：
【化５４】

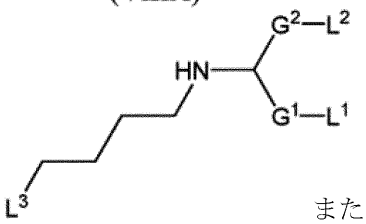



(VIIIA)

;

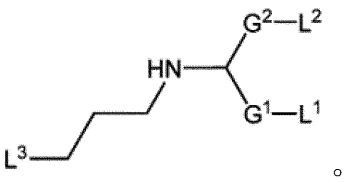



(VIIIB)




(VIIIC)

または

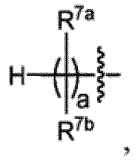



(VIIID)

。

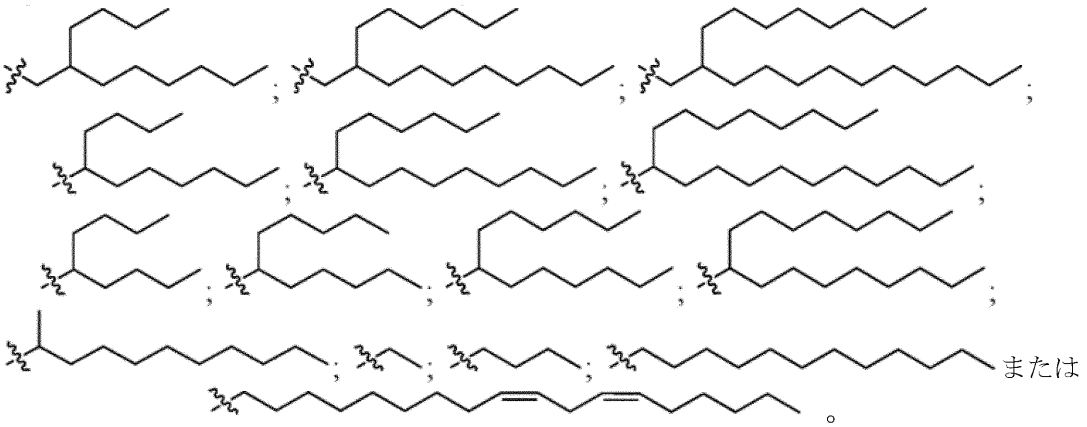
【０５００】
構造（ＶＩＩＩ）のいくつかの前述の実施形態では、$L^1$は、－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）$R^1$、－（Ｃ＝Ｏ）Ｏ$R^1$、または
－Ｃ（＝Ｏ）Ｎ$R^b$ $R^c$であり、$L^2$は、－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）$R^2$、－（Ｃ＝Ｏ）Ｏ$R^2$、または－Ｃ（＝Ｏ）Ｎ$R^e$ $R^f$である。他の具体的な実施形態では、$L^1$は、－（Ｃ＝Ｏ）Ｏ$R^1$であり、$L^2$は、－（Ｃ＝Ｏ）Ｏ$R^2$である。前述の実施形態のいずれかでは、$L^3$は、－（Ｃ＝Ｏ）Ｏ$R^3$である。
【０５０１】
構造（ＶＩＩＩ）のいくつかの前述の実施形態では、$G^1$及び$G^2$は、各々、独立して、Ｃ２－Ｃ１２アルキレン、例えば、Ｃ４－Ｃ１０アルキレンである。
【０５０２】
構造（ＶＩＩＩ）のいくつかの前述の実施形態では、$R^1$、$R^2$、及び$R^3$は、各々、独立して、分岐Ｃ６－Ｃ２４アルキルである。例えば、いくつかの実施形態では、$R^1$、

Ｒ２、及びＲ３は、各々、独立して、以下の構造を有し、
【化５５】



，

式中、
Ｒ７ａ及びＲ７ｂは、各存在で、独立して、Ｈまたは$C_1$－$C_{12}$アルキルであり、
及び、
ａは、２～１２の整数であり、
Ｒ７ａ、Ｒ７ｂ及びａは、各々、Ｒ１及びＲ２が、各々、独立して、６～２０個の炭素原子を含むように選択される。例えば、いくつかの実施形態では、ａは、５～９または８～１２の範囲の整数である。
【０５０３】
構造（ＶＩＩＩ）のいくつかの前述の実施形態では、Ｒ７ａの少なくとも１つの存在においてＨである。例えば、いくつかの実施形態では、Ｒ７ａは各存在においてＨである。前述の他の異なる実施形態では、Ｒ７ｂの少なくとも１つの存在は、$C_1$－$C_8$アルキルである。例えば、いくつかの実施形態では、$C_1$－$C_8$アルキルは、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、ｔｅｒｔ－ブチル、ｎ－ヘキシルまたはｎ－オクチルである。
【０５０４】
構造（ＶＩＩＩ）のいくつかの前述の実施形態では、Ｘは、ＣＲであり、Ｙは、ＮＲであり、Ｒ３は、$C_1$－$C_{12}$アルキル、例えば、エチル、プロピル、またはブチルである。いくつかのこれらの実施形態では、Ｒ１及びＲ２は、各々、独立して、分岐$C_6$－$C_{24}$アルキルである。
【０５０５】
構造（ＶＩＩＩ）の異なる実施形態では、Ｒ１、Ｒ２、及びＲ３は、各々、独立して、以下の構造のうちの１つを有する：
【化５６】



または

。

【０５０６】
構造（ＶＩＩＩ）の特定の実施形態では、Ｒ１及びＲ２及びＲ３は、各々、独立して、分岐$C_6$－$C_{24}$アルキルであり、Ｒ３は、$C_1$－$C_{24}$アルキルまたは$C_2$－$C_{24}$アルケニルである。
【０５０７】
構造（ＶＩＩＩ）のいくつかの前述の実施形態では、Ｒｂ、Ｒｃ、Ｒｅ、及びＲｆは、

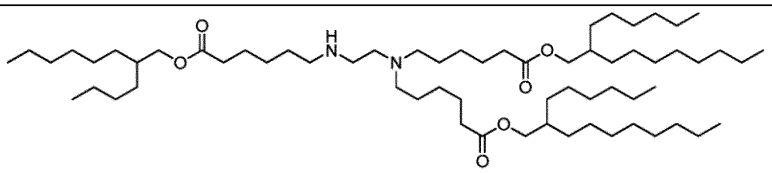
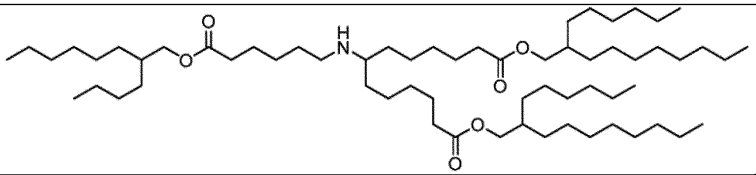
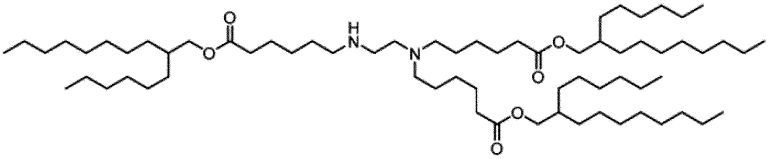
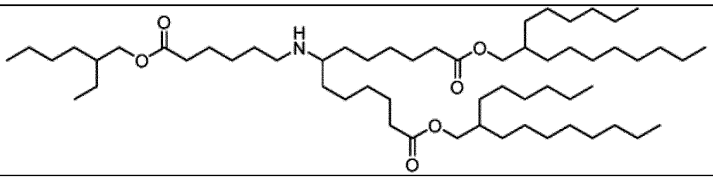
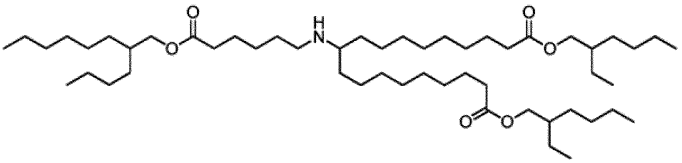
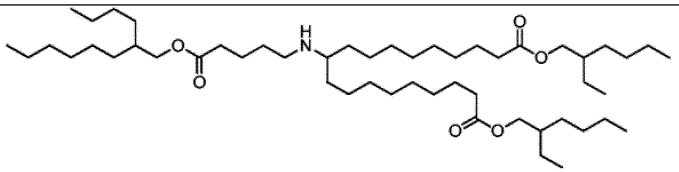
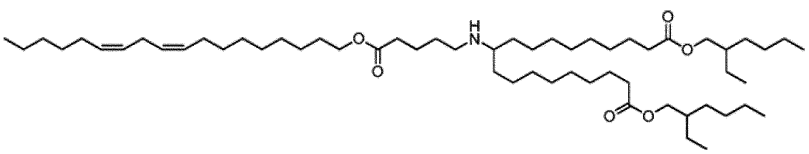
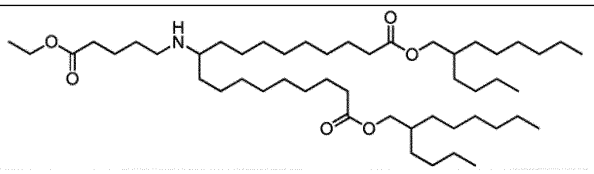
各々、独立して、Ｃ３－Ｃ１２アルキルである。例えば、いくつかの実施形態では、Ｒ$^{b}$、Ｒ$^{c}$、Ｒ$^{e}$、及びＲ$^{f}$は、ｎ－ヘキシルであり、他の実施形態では、Ｒ$^{b}$、Ｒ$^{c}$、Ｒ$^{e}$、及びＲ$^{f}$は、ｎ－オクチルである。

【０５０８】

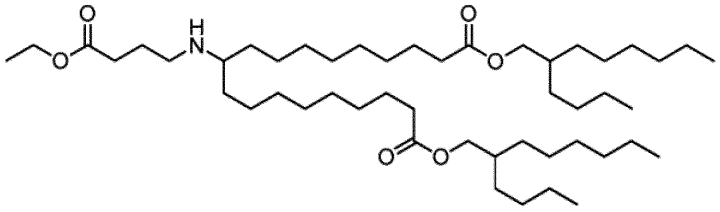
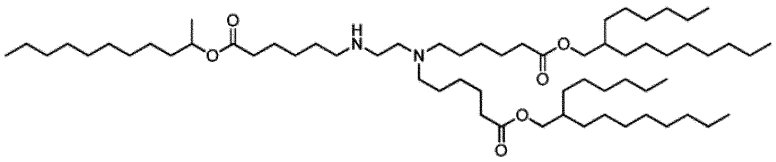
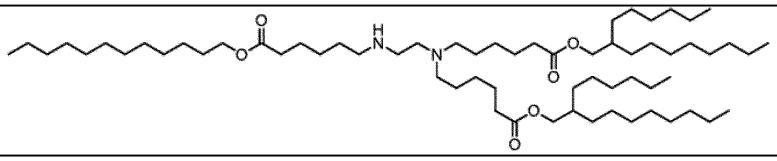
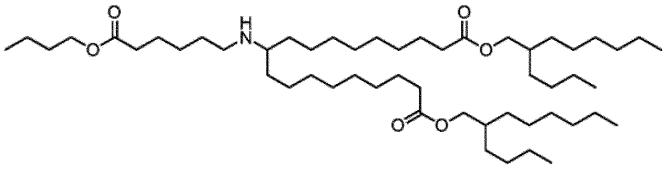
構造（ＶＩＩＩ）の様々な異なる実施形態では、化合物は、以下の表７に示される構造のうちの１つを有する。

【表７－１】

表７．構造（ＶＩＩＩ）の代表的なカチオン性脂質

| 番号 | 構造 |
|---|---|
| VIII-1 |  |
| VIII-2 |  |
| VIII-3 |  |
| VIII-4 |  |
| VIII-5 |  |
| VIII-6 |  |
| VIII-7 |  |
| VIII-8 |  |

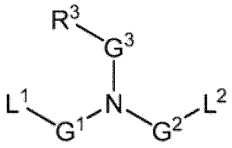
【表７－２】

| 番号 | 構造 |
|---|---|
| VIII-9 |  |
| VIII-10 |  |
| VIII-11 |  |
| VIII-12 |  |

【０５０９】

一実施形態では、カチオン性脂質は、以下の構造（ＩＸ）を有する化合物であるか、

【化５７】



(IX)

またはその薬学的に許容可能な塩、プロドラッグもしくは立体異性体であり、式中、

$L^1$は、－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）$R^1$、－（Ｃ＝Ｏ）Ｏ$R^1$、－Ｃ（＝Ｏ）$R^1$、－Ｏ$R^1$、－Ｓ（Ｏ）$_x$$R^1$、－Ｓ－Ｓ$R^1$、－Ｃ（＝Ｏ）Ｓ$R^1$、－ＳＣ（＝Ｏ）$R^1$、－Ｎ$R^a$Ｃ（＝Ｏ）$R^1$、－Ｃ（＝Ｏ）Ｎ$R^b$$R^c$、－Ｎ$R^a$Ｃ（＝Ｏ）Ｎ$R^b$$R^c$、－ＯＣ（＝Ｏ）Ｎ$R^b$$R^c$、または－Ｎ$R^a$Ｃ（＝Ｏ）Ｏ$R^1$であり、

$L^2$は、－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）$R^2$、－（Ｃ＝Ｏ）Ｏ$R^2$、－Ｃ（＝Ｏ）$R^2$、－Ｏ$R^2$、－Ｓ（Ｏ）$_x$$R^2$、－Ｓ－Ｓ$R^2$、－Ｃ（＝Ｏ）Ｓ$R^2$、－ＳＣ（＝Ｏ）$R^2$、－Ｎ$R^d$Ｃ（＝Ｏ）$R^2$、－Ｃ（＝Ｏ）Ｎ$R^e$$R^f$、－Ｎ$R^d$Ｃ（＝Ｏ）Ｎ$R^e$$R^f$、－ＯＣ（＝Ｏ）Ｎ$R^e$$R^f$、－Ｎ$R^d$Ｃ（＝Ｏ）Ｏ$R^2$、または$R^2$との直接結合であり、

$G^1$及び$G^2$は、各々、独立して、Ｃ$_2$－Ｃ$_{12}$アルキレンまたはＣ$_2$－Ｃ$_{12}$アルケニレンであり、

$G^3$は、Ｃ$_1$－Ｃ$_{24}$アルキレン、Ｃ$_2$－Ｃ$_{24}$アルケニレン、Ｃ$_3$－Ｃ$_8$シクロアルキレン、またはＣ$_3$－Ｃ$_8$シクロアルケニレンであり、

$R^a$、$R^b$、$R^d$、及び$R^e$は、各々、独立して、ＨまたはＣ$_1$－Ｃ$_{12}$アルキルまたはＣ$_1$－Ｃ$_{12}$アルケニルであり、

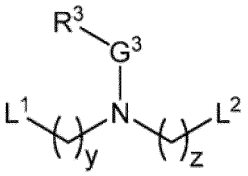
$R^c$及び$R^f$は、各々、独立して、Ｃ$_1$－Ｃ$_{12}$アルキルまたはＣ$_2$－Ｃ$_{12}$アルケニル

であり、
$R^1$及び$R^2$は、各々、独立して、分岐$C_6$－$C_{24}$アルキルまたは分岐$C_6$－$C_{24}$アルケニルであり、
$R^3$は、－N（$R^4$）$R^5$であり、
$R^4$は、$C_1$－$C_{12}$アルキルであり、
$R^5$は、置換$C_1$－$C_{12}$アルキルであり、
xは、０、１、または２であり、
各アルキル、アルケニル、アルキレン、アルケニレン、シクロアルキレン、シクロアルケニレン、アリール、及びアラルキルは、別段の指定がない限り、独立して、置換または非置換である。

【０５１０】
構造（ＸＩ）の特定の実施形態では、$G^3$は、非置換である。より具体的な実施形態では、$G^3$は、$C_2$－$C_{12}$アルキレンであり、例えば、いくつかの実施形態では、$G^3$は、$C_3$－$C_7$アルキレンであり、または他の実施形態では、$G^3$は、$C_3$－$C_{12}$アルキレンである。いくつかの実施形態では、$G^3$は、$C_2$または$C_3$アルキレンである。

【０５１１】
構造（ＩＸ）のいくつかの前述の実施形態では、化合物は、以下の構造（ＩＸ　Ａ）を有し、

【化５８】



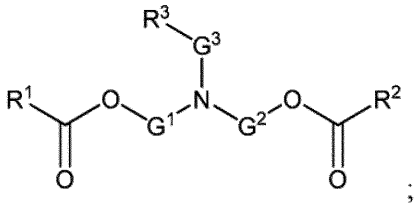
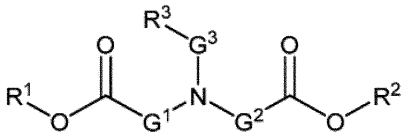
(IXA)

式中、ｙ及びｚは、各々、独立して、２～１２の範囲の整数、例えば、２～６、４～１０、または例えば、４もしくは５の整数である。特定の実施形態では、ｙ及びｚは、各々、同じであり、４、５、６、７、８、及び９から選択される。

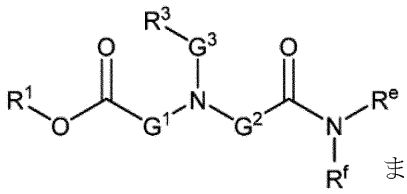
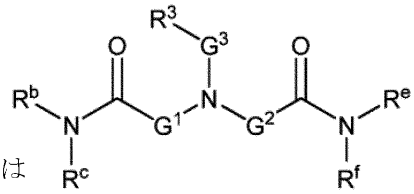
【０５１２】
構造（ＩＸ）いくつかの前述の実施形態では、$L^1$は、－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）$R^1$、－（Ｃ＝Ｏ）Ｏ$R^1$、または－Ｃ（＝Ｏ）Ｎ$R^b$$R^c$であり、$L^2$は、－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）$R^2$、－（Ｃ＝Ｏ）Ｏ$R^2$、または－Ｃ（＝Ｏ）Ｎ$R^e$$R^f$である。例えば、いくつかの実施形態では、$L^1$及び$L^2$は、それぞれ、－（Ｃ＝Ｏ）Ｏ$R^1$及び－（Ｃ＝Ｏ）Ｏ$R^2$である。他の実施形態では、$L^1$は、－（Ｃ＝Ｏ）Ｏ$R^1$であり、$L^2$は、－Ｃ（＝Ｏ）Ｎ$R^e$$R^f$である。他の実施形態では、$L^1$は、
－Ｃ（＝Ｏ）Ｎ$R^b$$R^c$であり、$L^2$は、－Ｃ（＝Ｏ）Ｎ$R^e$$R^f$である。

【０５１３】
前述の他の実施形態では、化合物は、以下の構造（ＩＸＢ）、（ＩＸＣ）、（ＩＸＤ）、または（ＩＸＥ）のうちの１つを有する：

【化５９】


;


(IXB) (IXC)


または

。

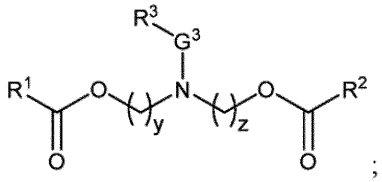
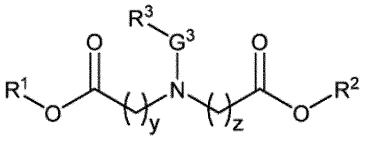
(IXD) (IXE)

いくつかの前述の実施形態では、化合物は、構造（ＩＸＢ）を有し、他の実施形態では、化合物は、構造（ＩＸＣ）を有し、さらに他の実施形態では、化合物は、構造（ＩＸＤ）を有する。他の実施形態では、化合物は、構造（ＩＸＥ）を有する。

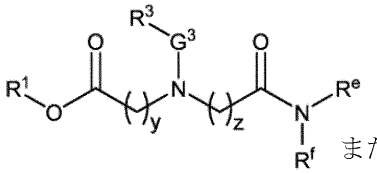
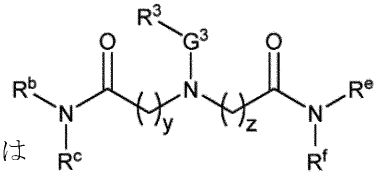
【０５１４】

前述のいくつかの異なる実施形態では、化合物は、以下の構造（ＩＸＦ）、（ＩＸＧ）、（ＩＸＨ）、または（ＩＸＪ）のうちの１つを有し、

【化６０】


;


(IXF) (IXG)


または

。

(IXH) (IXJ)

式中、ｙ及びｚは、各々、独立して、２～１２の範囲の整数、例えば、２～６の整数、例えば、４である。

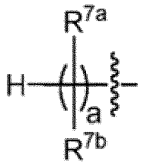
【０５１５】

構造（ＩＸ）のいくつかの前述の実施形態では、ｙ及びｚは、各々、独立して、２～１０、２～８、４～１０、または４～７の範囲の整数である。例えば、いくつかの実施形態では、ｙは、４、５、６、７、８、９、１０、１１、または１２である。いくつかの実施形態では、ｚは、４、５、６、７、８、９、１０、１１、または１２である。いくつかの実施形態では、ｙ及びｚは、同じであり、他の実施形態では、ｙ及びｚは、異なる。

【０５１６】

構造（ＩＸ）のいくつかの前述の実施形態では、$R^1$もしくは$R^2$、またはその両方が、分岐$C_6$－$C_{24}$アルキルである。例えば、いくつかの実施形態では、$R^1$及び$R^2$は、各々、独立して、以下の構造を有し、

【化６１】



，

式中、

Ｒ$^{7a}$及びＲ$^{7b}$は、各存在で、独立して、ＨまたはＣ$_{1}$－Ｃ$_{12}$アルキルであり、

ａは、２～１２の整数であり、

Ｒ$^{7a}$、Ｒ$^{7b}$及びａは、各々、Ｒ$^{1}$及びＲ$^{2}$が、各々、独立して、６～２０個の炭素原子を含むように選択される。例えば、いくつかの実施形態では、ａは、５～９または８～１２の範囲の整数である。

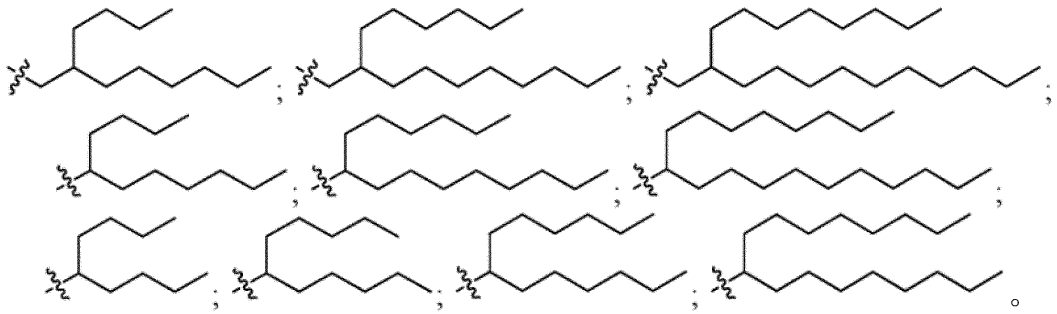
【０５１７】

構造（ＩＸ）のいくつかの前述の実施形態では、Ｒ$^{7a}$の少なくとも１つの存在においてＨである。例えば、いくつかの実施形態では、Ｒ$^{7a}$は各存在においてＨである。前述の他の異なる実施形態では、Ｒ$^{7b}$の少なくとも１つの存在は、Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{8}$アルキルである。例えば、いくつかの実施形態では、Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{8}$アルキルは、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、ｔｅｒｔ－ブチル、ｎ－ヘキシルまたはｎ－オクチルである。

【０５１８】

構造（ＩＸ）の異なる実施形態では、Ｒ$^{1}$もしくはＲ$^{2}$、またはその両方は、以下の構造を有する：

【化６２】



。

【０５１９】

構造（ＩＸ）のいくつかの前述の実施形態では、Ｒ$^{b}$、Ｒ$^{c}$、Ｒ$^{e}$、及びＲ$^{f}$は、各々、独立して、Ｃ$_{3}$－Ｃ$_{12}$アルキルである。例えば、いくつかの実施形態では、Ｒ$^{b}$、Ｒ$^{c}$、Ｒ$^{e}$、及びＲ$^{f}$は、ｎ－ヘキシルであり、他の実施形態では、Ｒ$^{b}$、Ｒ$^{c}$、Ｒ$^{e}$、及びＲ$^{f}$は、ｎ－オクチルである。

【０５２０】

構造（ＩＸ）の前述の実施形態のいずれかでは、Ｒ$^{4}$は、置換または非置換：メチル、エチル、プロピル、ｎ－ブチル、ｎ－ヘキシル、ｎ－オクチル、またはｎ－ノニルである。例えば、いくつかの実施形態では、Ｒ$^{4}$は、非置換である。他のＲ$^{4}$は、－ＯＲ$^{g}$、－ＮＲ$^{g}$Ｃ（＝Ｏ）Ｒ$^{h}$、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＲ$^{g}$Ｒ$^{h}$、－Ｃ（＝Ｏ）Ｒ$^{h}$、－ＯＣ（＝Ｏ）Ｒ$^{h}$、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＲ$^{h}$、及び－ＯＲ$^{i}$ＯＨからなる群から選択される１つ以上の置換基で置換され、式中、

Ｒ$^{g}$は、各存在で、独立して、ＨまたはＣ$_{1}$－Ｃ$_{6}$アルキルであり、

Ｒ$^{h}$は、各存在で、独立して、Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{6}$アルキルであり、

Ｒ$^{i}$は、各存在で、独立して、Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{6}$アルキレンである。

【０５２１】

構造（ＩＸ）の他の前述の実施形態では、$R^5$は、置換：メチル、エチル、プロピル、ｎ－ブチル、ｎ－ヘキシル、ｎ－オクチル、またはｎ－ノニルである。いくつかの実施形態では、$R^5$は、置換エチルまたは置換プロピルである。他の異なる実施形態では、$R^5$は、ヒドロキシルで置換される。なおさらなる実施形態では、$R^5$は、－ＯＲ$^g$、－ＮＲ$^g$Ｃ（＝Ｏ）Ｒ$^h$、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＲ$^g$Ｒ$^h$、－Ｃ（＝Ｏ）Ｒ$^h$、－ＯＣ（＝Ｏ）Ｒ$^h$、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＲ$^h$、及び－ＯＲ$^i$ＯＨからなる群から選択される１つ以上の置換基で置換され、

式中、

$R^g$は、各存在で、独立して、ＨまたはＣ$_1$－Ｃ$_6$アルキルであり、

$R^h$は、各存在で、独立して、Ｃ$_1$－Ｃ$_6$アルキルであり、

$R^i$は、各存在で、独立して、Ｃ$_1$－Ｃ$_6$アルキレンである。

【０５２２】

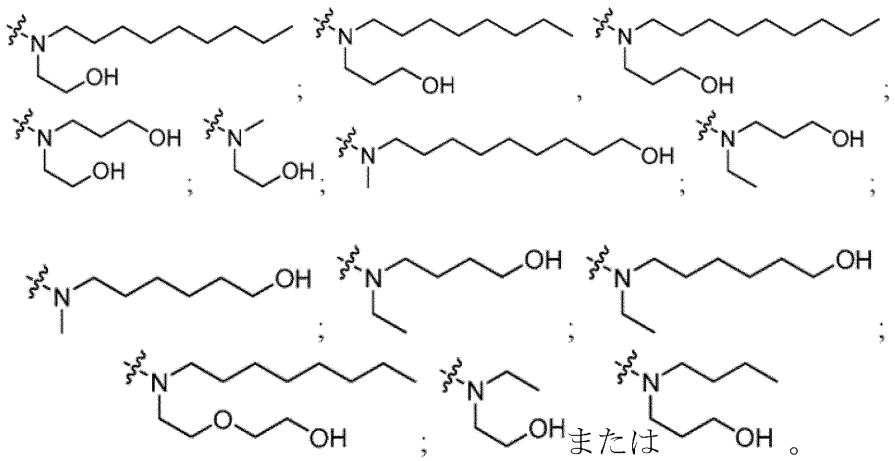
構造（ＩＸ）の他の実施形態では、$R^4$は、非置換メチルであり、

$R^5$は、置換：メチル、エチル、プロピル、ｎ－ブチル、ｎ－ヘキシル、ｎ－オクチル、またはｎ－ノニルである。いくつかのこれらの実施形態では、$R^5$は、ヒドロキシルで置換される。

【０５２３】

構造（ＩＸ）のいくつかの他の特定の実施形態では、$R^3$は、以下の構造のうちの１つを有する：

【化６３】

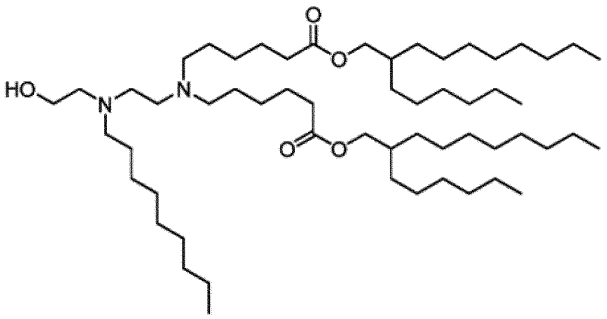
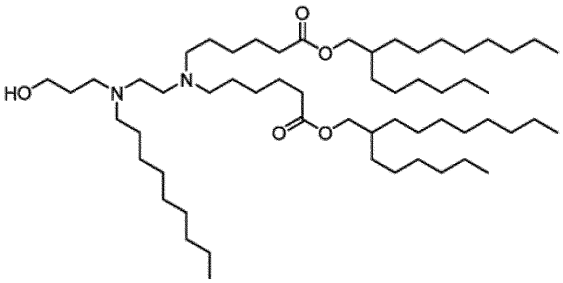
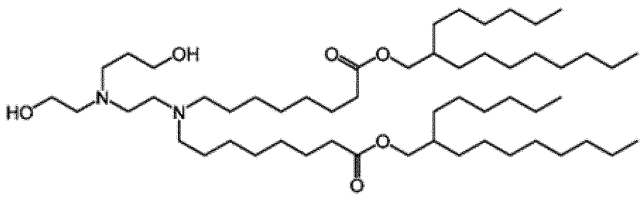
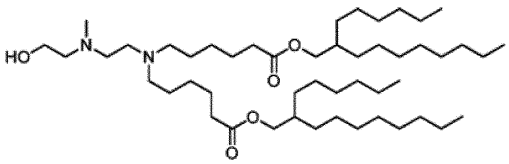
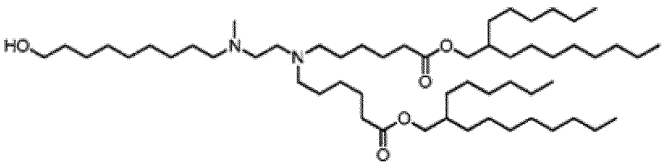



【０５２４】

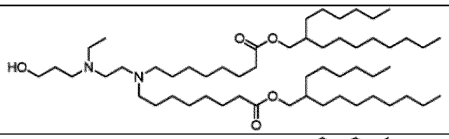
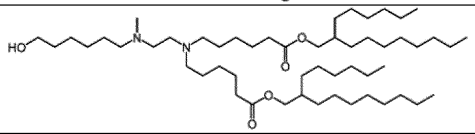
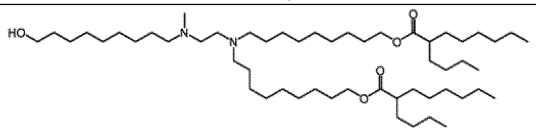
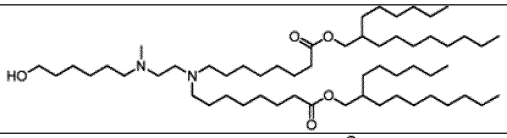
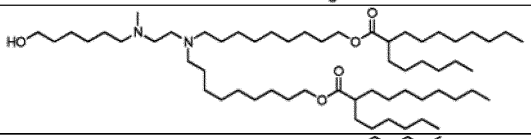
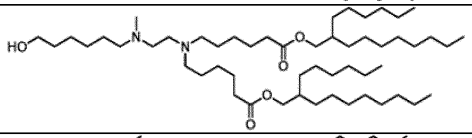
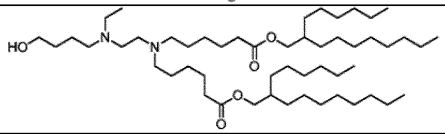
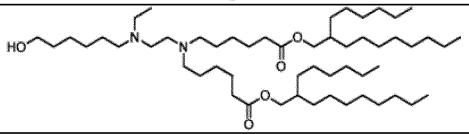
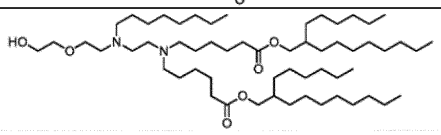
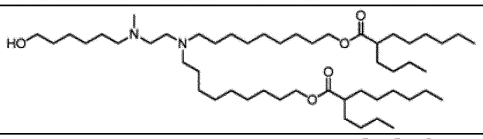
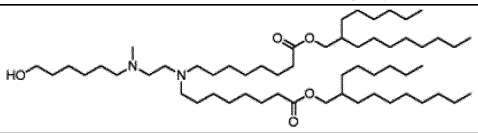
構造（ＩＸ）の様々な異なる実施形態では、カチオン性脂質は、以下の表８に示される構造のうちの１つを有する。

【表８－１】

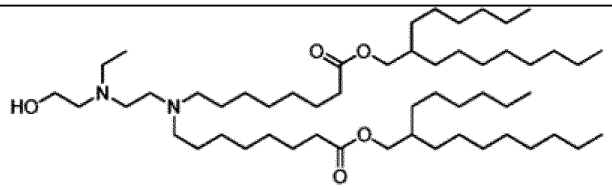
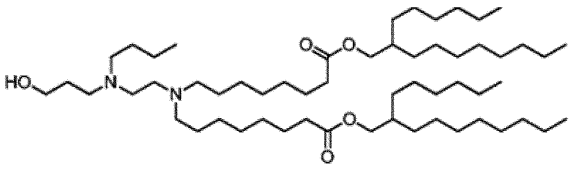
表８．構造（ＩＸ）の代表的なカチオン性脂質

| 番号 | 構造 |
|---|---|
| IX-1 |  |
| IX-2 |  |
| IX-3 |  |
| IX-4 |  |
| IX-5 |  |

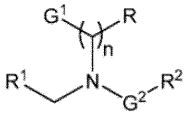
【表８－２】

| 番号 | 構造 |
|---|---|
| IX-6 |  |
| IX-7 |  |
| IX-8 |  |
| IX-9 |  |
| IX-10 |  |
| IX-11 |  |
| IX-12 |  |
| IX-13 |  |
| IX-14 |  |
| IX-15 |  |
| IX-16 |  |

【表８－３】

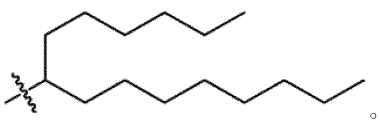
| 番号 | 構造 |
|---|---|
| IX-17 |  |
| IX-18 |  |

【０５２５】
一実施形態では、カチオン性脂質は、以下の構造（Ｘ）を有する化合物であるか、
【化６４】



(X)

またはその薬学的に許容可能な塩、互変異性体、プロドラッグもしくは立体異性体であり、
式中、
$G^1$は、－ＯＨ、$-NR^3R^4$、－（Ｃ＝Ｏ）$NR^5$、または$-NR^3$（Ｃ＝Ｏ）$R^5$であり、
$G^2$は、$-CH_2-$または－（Ｃ＝Ｏ）－であり、
Ｒは、各存在で、独立して、ＨまたはＯＨであり、
$R^1$及び$R^2$は、各々、独立して、分岐、飽和または不飽和$C_{12}-C_{36}$アルキルであり、
$R^3$及び$R^4$は、各々、独立して、Ｈ、または直鎖もしくは分岐、飽和もしくは不飽和$C_1-C_6$アルキルであり、
$R^5$は、直鎖または分岐、飽和または不飽和$C_1-C_6$アルキルであり、
ｎは、２～６の整数である。
【０５２６】
いくつかの実施形態では、$R^1$及び$R^2$は、各々、独立して、分岐、飽和または不飽和$C_{12}-C_{30}$アルキル、$C_{12}-C_{20}$アルキル、または$C_{15}-C_{20}$アルキルである。いくつかの特定の実施形態では、$R^1$及び$R^2$は、各々、飽和である。特定の実施形態では、$R^1$及び$R^2$の少なくとも１つは、不飽和である。
【０５２７】
構造（Ｘ）のいくつかの前述の実施形態では、$R^1$及び$R^2$は、以下の構造を有する：
【化６５】

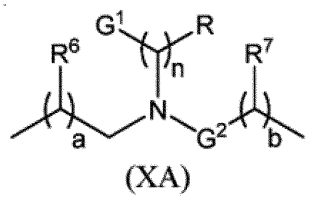


。

【０５２８】

構造（Ｘ）のいくつかの前述の実施形態では、化合物は、以下の構造（ＸＡ）を有し、

【化６６】




(XA)

式中、

$R^6$及び$R^7$は、各存在で、独立して、Ｈ、または直鎖もしくは分岐、飽和もしくは不飽和$C_1$－$C_{14}$アルキルであり、

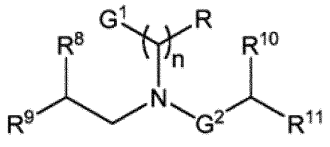
ａ及びｂは、各々、独立して、１～１５の範囲の整数であり、

ただし、$R^6$及びａ、ならびに$R^7$及びｂは、各々、独立して、$R^1$及び$R^2$が、各々、独立して、分岐、飽和または不飽和$C_{12}$－$C_{36}$アルキルであるように選択される。

【０５２９】

いくつかの前述の実施形態では、化合物は、以下の構造（ＸＢ）を有し、

【化６７】




(XB)

式中、

$R^8$、$R^9$、$R^{10}$、及び$R^{11}$は、各々、独立して、直鎖または分岐、飽和または不飽和$C_4$－$C_{12}$アルキルであり、ただし、$R^8$及び$R^9$、ならびに$R^{10}$及び$R^{11}$は、各々、独立して、$R^1$及び$R^2$が、各々、独立して、分岐、飽和または不飽和$C_{12}$－$C_{36}$アルキルであるように選択される。（ＸＢ）のいくつかの実施形態では、$R^8$、$R^9$、$R^{10}$、及び$R^{11}$は、各々、独立して、直鎖または分岐、飽和または不飽和$C_6$－$C_{10}$アルキルである。（ＸＢ）の特定の実施形態では、$R^8$、$R^9$、$R^{10}$、及び$R^{11}$の少なくとも１つは、不飽和である。（ＸＢ）の他の特定の実施形態では、$R^8$、$R^9$、$R^{10}$、及び$R^{11}$の各々は、飽和である。

【０５３０】

いくつかの前述の実施形態では、化合物は、構造（ＸＡ）を有し、他の実施形態では、化合物は、構造（ＸＢ）を有する。

【０５３１】

いくつかの前述の実施形態では、$G^1$は、－ＯＨであり、いくつかの実施形態では、$G^1$は、－$NR^3R^4$である。例えば、いくつかの実施形態では、$G^1$は、－$NH_2$、－$NHCH_3$、または－$N(CH_3)_2$である。特定の実施形態では、$G^1$は、－（Ｃ＝Ｏ）$NR^5$である。特定の他の実施形態では、$G^1$は、－$NR^3$（Ｃ＝Ｏ）$R^5$である。例えば、いくつかの実施形態では、$G^1$は、－ＮＨ（Ｃ＝Ｏ）$CH_3$または－ＮＨ（Ｃ＝Ｏ）$CH_2CH_2CH_3$である。

【０５３２】

構造（Ｘ）のいくつかの前述の実施形態では、$G^2$は、－$CH_2$－である。いくつかの異なる実施形態では、$G^2$は、－（Ｃ＝Ｏ）－である。

【０５３３】

構造（Ｘ）のいくつかの前述の実施形態では、ｎは、２～６の範囲の整数であり、例え

ば、いくつかの実施形態では、ｎは、２、３、４、５、または６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。いくつかの実施形態では、ｎは、４である。

【０５３４】

構造（Ｘ）の特定の前述の実施形態では、$R^1$、$R^2$、$R^3$、$R^4$、及び$R^5$の少なくとも１つは、非置換である。例えば、いくつかの実施形態では、$R^1$、$R^2$、$R^3$、$R^4$、及び$R^5$は、各々、非置換である。いくつかの実施形態では、$R^3$は、置換される。他の実施形態では、$R^4$は、置換される。なおさらなる実施形態では、$R^5$は、置換される。特定の実施形態では、$R^3$及び$R^4$の各々は、置換される。いくつかの実施形態では、$R^3$、$R^4$、または$R^5$上の置換基は、ヒドロキシルである。特定の実施形態では、$R^3$及び$R^4$は、各々、ヒドロキシルで置換される。

【０５３５】

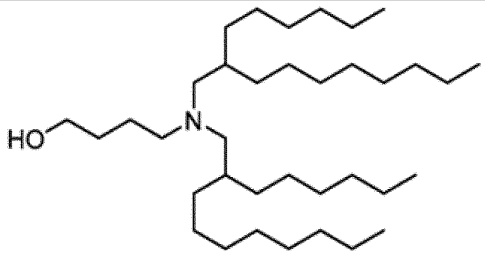
構造（Ｘ）のいくつかの前述の実施形態では、少なくとも１つのＲは、ＯＨである。他の実施形態では、各Ｒは、Ｈである。

【０５３６】

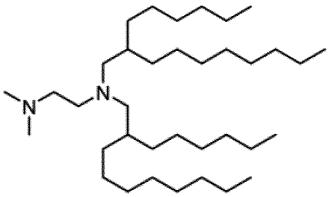
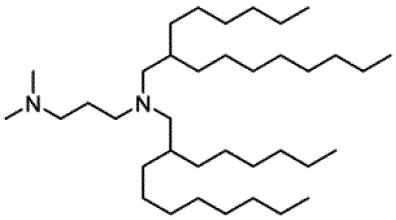
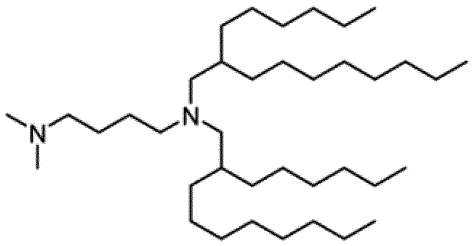
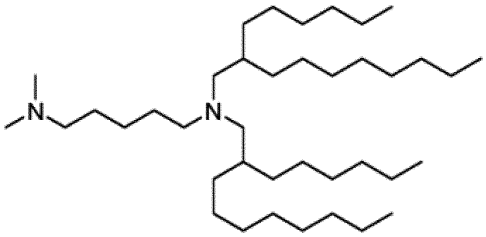
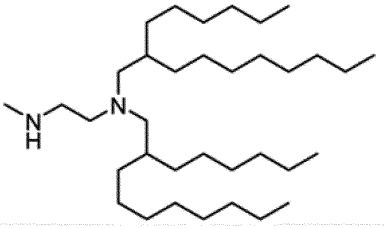
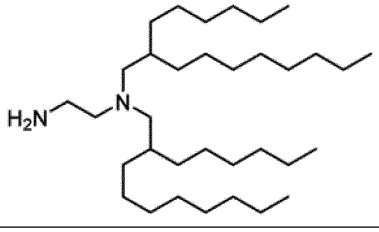
構造（Ｘ）の様々な異なる実施形態では、化合物は、以下の表９に示される構造のうちの１つを有する。

【表９－１】

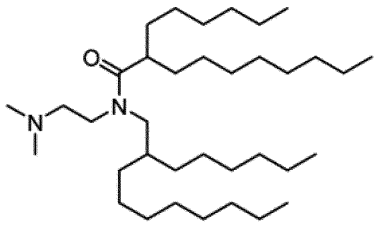
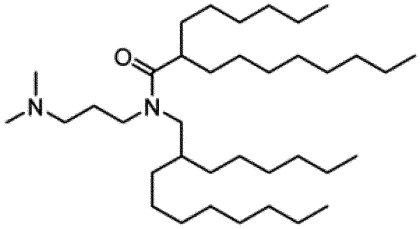
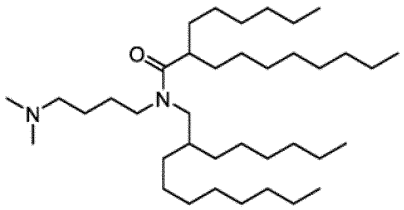
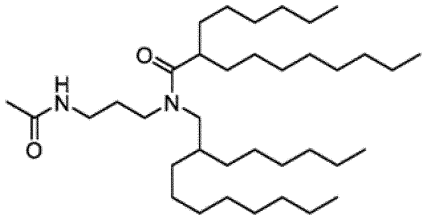
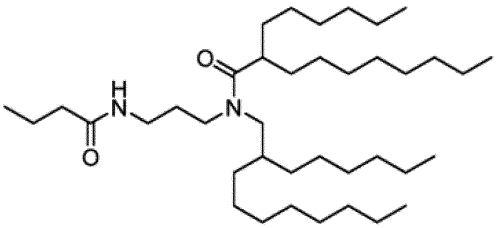
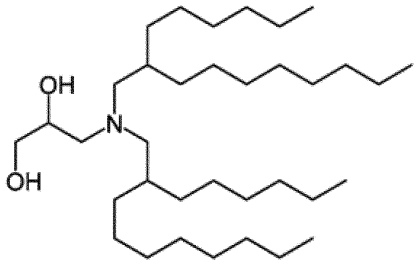
表９．構造（Ｘ）の代表的なカチオン性脂質

| 番号 | 構造 |
|---|---|
| X-1 |  |

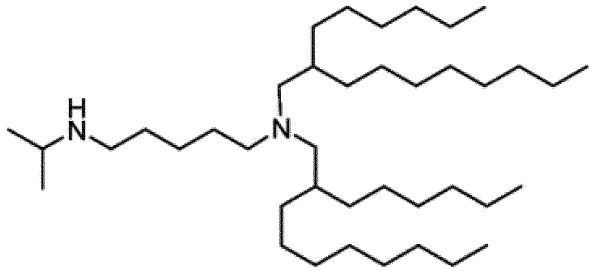
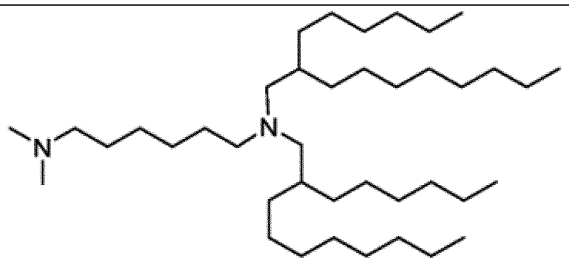
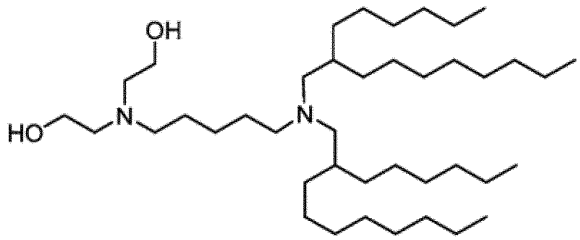
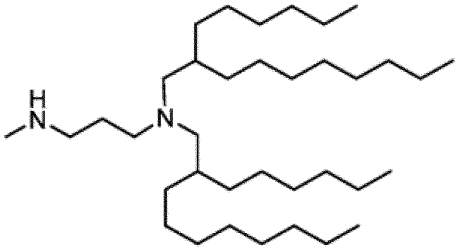
【表９－２】

| 番号 | 構造 |
|---|---|
| X-2 |  |
| X-3 |  |
| X-4 |  |
| X-5 |  |
| X-6 |  |
| X-7 |  |

【表９－３】

| 番号 | 構造 |
|---|---|
| X-8 |  |
| X-9 |  |
| X-10 |  |
| X-11 |  |
| X-12 |  |
| X-13 |  |

【表９－４】

| 番号 | 構造 |
|---|---|
| X-14 |  |
| X-15 |  |
| X-16 |  |
| X-17 |  |

【０５３７】

実施形態１、２、３、４、または５のいずれかでは、ＬＮＰは、中性脂質をさらに含む。様々な実施形態では、カチオン性脂質対中性脂質のモル比は、約２：１～約８：１の範囲である。特定の実施形態では、中性脂質は、５～１０モルパーセント、５～１５モルパーセント、７～１３モルパーセント、または９～１１モルパーセントの範囲の濃度で前述のＬＮＰのいずれかに存在する。特定の実施形態では、中性脂質は、約９．５、１０、または１０．５モルパーセントの濃度で存在する。いくつかの実施形態では、カチオン性脂質対中性脂質のモル比は、約４．１：１．０～約４．９：１．０、約４．５：１．０～約４．８：１．０、または約４．７：１．０～４．８：１．０の範囲である。いくつかの実施形態では、総カチオン性脂質対中性脂質のモル比は、約４．１：１．０～約４．９：１．０、約４．５：１．０～約４．８：１．０、または約４．７：１．０～４．８：１．０の範囲である。

【０５３８】

実施形態１、２、３、４、または５のいずれかで使用される例示的な中性脂質には、例えば、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）及びジオレオイル－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カルボキシラート（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）、１６－Ｏ－モノメチルＰＥ、１６－Ｏ－ジメチルＰＥ、１８－１－トランスＰＥ、１－ステアリオイル－２－オレオイルホスファチジルエタノールアミン（ＳＯＰＥ）、及び１，２－ジエライドイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（トランスＤＯＰＥ）が含まれる。一実施形態では、中性脂質は、１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３ホスホコリン（ＤＳＰＣ）である。いくつかの実施形態では、中性脂質は、ＤＳＰＣ、ＤＰＰＣ、ＤＭＰＣ、ＤＯＰＣ、ＰＯＰＣ、ＤＯＰＥ、及びＳＭから選択される。いくつかの実施形態では、中性脂質は、ＤＳＰＣである。

【０５３９】

実施形態１、２、３、４、または５の様々な実施形態では、開示される脂質ナノ粒子のいずれかは、ステロイドまたはステロイド類似体を含む。特定の実施形態では、ステロイドまたはステロイド類似体は、コレステロールである。いくつかの実施形態では、ステロイドは、３９～４９モルパーセント、４０～４６モルパーセント、４０～４４モルパーセント、４０～４２モルパーセント、４２～４４モルパーセント、または４４～４６モルパーセントの範囲の濃度で存在する。特定の実施形態では、ステロイドは、４０、４１、４２、４３、４４、４５、または４６モルパーセントの濃度で存在する。

【０５４０】

特定の実施形態では、カチオン性脂質対ステロイドのモル比は、１．０：０．９～１．０：１．２、または１．０：１．０～１．０：１．２の範囲である。いくつかのこれらの実施形態では、カチオン性脂質対コレステロールのモル比は、約５：１～１：１の範囲である。特定の実施形態では、ステロイドは、ステロイドの３２～４０モルパーセントの範囲の濃度で存在する。

【０５４１】

特定の実施形態では、総カチオン対ステロイドのモル比は、１．０：０．９～１．０：１．２、または１．０：１．０～１．０：１．２の範囲である。いくつかのこれらの実施形態では、総カチオン性脂質対コレステロールのモル比は、約５：１～１：１の範囲である。特定の実施形態では、ステロイドは、ステロイドの３２～４０モルパーセントの範囲の濃度で存在する。

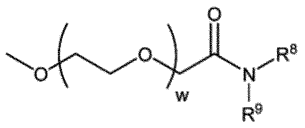
【０５４２】

実施形態１、２、３、４、または５のいくつかの実施形態では、ＬＮＰは、ポリマー複合脂質をさらに含む。実施形態１、２、３、４、または５の様々な他の実施形態では、ポリマー複合脂質は、ペグ化脂質である。例えば、いくつかの実施形態は、ペグ化ジアシルグリセロール（ＰＥＧ－ＤＡＧ）、例えば、１－（モノメトキシ－ポリエチレングリコール）－２，３－ジミリストイルグリセロール（ＰＥＧ－ＤＭＧ）、ペグ化ホスファチジルエタノールアミン（ＰＥＧ－ＰＥ）、ＰＥＧサクシネートジアシルグリセロール（ＰＥＧ－Ｓ－ＤＡＧ）、例えば、４－Ｏ－（２’，３’－ジ（テトラデカノイルオキシ）プロピル－１－Ｏ－（ω－メトキシ（ポリエトキシ）エチル）ブタンジオエート（ＰＥＧ－Ｓ－ＤＭＧ）、ペグ化セラミド（ＰＥＧ－ｃｅｒ）、またはＰＥＧジアルコキシプロピルカルバメート、例えば、ω－メトキシ（ポリエトキシ）エチル－Ｎ－（２，３－ジ（テトラデカノキシ）プロピル）カルバメート、または２，３－ジ（テトラデカノキシ）プロピル－Ｎ－（ω－メトキシ（ポリエトキシ）エチル）カルバメートを含む。

【０５４３】

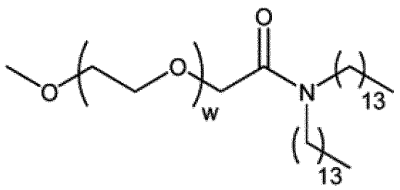
様々な実施形態において、ポリマー複合脂質は、１．０から２．５モルパーセントの範囲の濃度で存在する。特定の実施形態では、ポリマー複合脂質は、約１．７モルパーセントの濃度で存在する。いくつかの実施形態では、ポリマー複合脂質は、約１．５モルパーセントの濃度で存在する。

【０５４４】
特定の実施形態では、カチオン性脂質対ポリマー複合脂質のモル比は、約３５：１～約２５：１の範囲である。いくつかの実施形態では、カチオン性脂質対ポリマー複合脂質のモル比は、約１００：１～約２０：１の範囲である。
【０５４５】
特定の実施形態では、総カチオン性脂質（すなわち、第１及び第２のカチオン性脂質の合計）対ポリマー結合脂質のモル比は、約３５：１～約２５：１の範囲である。いくつかの実施形態では、総カチオン性脂質対ポリマー複合脂質のモル比は、約１００：１～約２０：１の範囲である。
【０５４６】
実施形態１、２、３、４、または５のいくつかの実施形態では、ペグ化脂質は、存在する場合、以下の式（ＸＩ）を有するか、
【化６８】



(XI)

またはその薬学的に許容される塩、互変異性体もしくは立体異性体であり、
式中、
$R^{12}$及び$R^{13}$は、各々、独立して、１０～３０個の炭素原子を含む直鎖または分岐、飽和または不飽和アルキル鎖であり、アルキル鎖は、任意に、１つ以上のエステル結合によって中断され、
ｗは、３０～６０の範囲の平均値を有する。
【０５４７】
いくつかの実施形態では、$R^{12}$及び$R^{13}$は、各々、独立して、１２～１６個の炭素原子を含む直鎖、飽和アルキル鎖である。他の実施形態では、平均ｗは、４２～５５の範囲であり、例えば、平均ｗは、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、または５５である。いくつかの特定の実施形態では、平均ｗは、約４９である。
【０５４８】
いくつかの実施形態では、ペグ化脂質は、以下の式（ＸＩａ）を有し、
【化６９】



(XIa)

式中、平均ｗは、約４９である。
【０５４９】
実施形態１、２、３、４、または５のいくつかの実施形態では、核酸は、アンチセンス及びメッセンジャーＲＮＡから選択される。例えば、メッセンジャーＲＮＡは、例えば免疫原性タンパク質の翻訳により、免疫応答を誘導するために（例えば、ワクチンとして）使用され得る。
【０５５０】

実施形態１、２、３　４、または５の他の実施形態では、核酸はｍＲＮＡであり、ＬＮＰ中のｍＲＮＡ対脂質比（すなわち、Ｎ／Ｐは、Ｎはカチオン性脂質のモルを表し、Ｐは核酸の一部として存在するリン酸のモルを表す。

【０５５１】

ある実施形態では、輸送ビヒクルは、米国特許公開第２０１９０３１４５２４号に記載されている脂質またはイオン化可能脂質を含む。

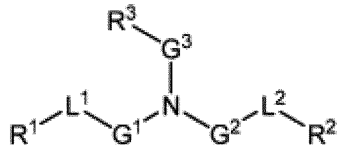
【０５５２】

本発明のいくつかの実施形態は、インビボで核酸の増加した活性及び組成物の改善した許容性を提供する、表１０に列挙される構造として本明細書に記載の新規カチオン性脂質の１つ以上を含む核酸－脂質ナノ粒子組成物を提供する。

【０５５３】

一実施形態では、イオン化可能脂質は、以下の構造（ＸＩＩ）を有するか、

【化７０】



（ＸＩＩ）

またはその薬学的に許容可能な塩、互変異性体、プロドラッグもしくは立体異性体であり、式中、

$L^1$または$L^2$の一方は、－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）－、－（Ｃ＝Ｏ）Ｏ－、－Ｃ（＝Ｏ）－、－Ｏ－、－Ｓ（Ｏ）$_x$－、－Ｓ－Ｓ－、－Ｃ（＝Ｏ）Ｓ－、ＳＣ（＝Ｏ）－、－$NR^aC$（＝Ｏ）－、－Ｃ（＝Ｏ）$NR^a$－、$NR^aC$（＝）$NR^a$－、－ＯＣ（＝Ｏ）$NR^a$－、または－$NR^aC$（＝Ｏ）Ｏ－であり、$L^1$または$L^2$の他方は、－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）－、－（Ｃ＝Ｏ）Ｏ－、－Ｃ（＝Ｏ）－、－Ｏ－、－Ｓ（Ｏ）$_x$－、－Ｓ－Ｓ－、－Ｃ（＝Ｏ）Ｓ－、ＳＣ（＝Ｏ）－、－$NR^aC$（＝Ｏ）－、－Ｃ（＝Ｏ）$NR^a$－、$NR^aC$（＝Ｏ）$NR^a$－、－ＯＣ（＝Ｏ）$NR^a$－、または－$NR^aC$（＝Ｏ）Ｏ－、または直接結合であり、

$G^1$及び$G^2$は、各々、独立して、非置換$C_1$－$C_{12}$アルキレンまたは$C_1$－$C_{12}$アルケニレンであり、

$G^3$は、$C_1$－$C_{24}$アルキレン、$C_1$－$C_{24}$アルケニレン、$C_3$－$C_8$シクロアルキレン、$C_3$－$C_8$シクロアルケニレンであり、

$R^a$は、Ｈまたは$C_1$－$C_{12}$アルキルであり、

$R^1$及び$R^2$は、各々、独立して、$C_6$－$C_{24}$アルキルまたは$C_6$－$C_{24}$アルケニルであり、

$R^3$は、Ｈ、$OR^5$、ＣＮ、－Ｃ（＝Ｏ）$OR^4$、－ＯＣ（＝Ｏ）$R^4$または－$NR^5$Ｃ（＝Ｏ）$R^4$であり、

$R^4$は、$C_1$－$C_{12}$アルキルであり、

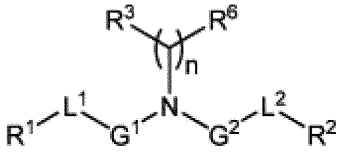
$R^5$は、Ｈまたは$C_1$－$C_6$アルキルであり、

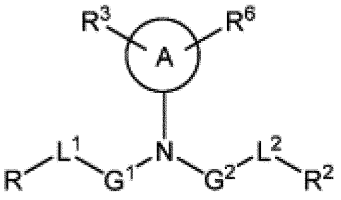
ｘは、０、１、または２である。

【０５５４】

いくつかの実施形態では、イオン化可能脂質は、以下の構造（ＸＩＩＡ）または（ＸＩＩＢ）のうちの１つを有し、

【化７１】


（ＸＩＩＡ）


（ＸＩＩＢ）

式中、
Ａは、３～８員シクロアルキルまたはシクロアルキレン環であり、
Ｒ$^{6}$は、各存在で、独立して、Ｈ、ＯＨまたはＣ$_{1}$－Ｃ$_{24}$アルキルであり、
ｎは、１～１５の範囲の整数である。

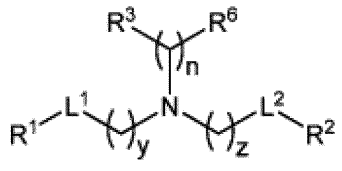
【０５５５】

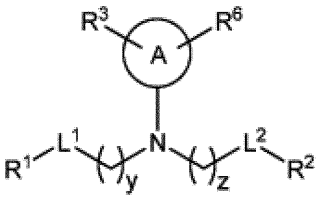
いくつかの実施形態では、イオン化可能脂質は、構造（ＸＩＩＡ）を有し、他の実施形態では、イオン化可能脂質は、構造（ＸＩＩＢ）を有する。

【０５５６】

他の実施形態では、イオン化可能脂質は、以下の構造（ＸＩＩＣ）または（ＸＩＩＤ）のうちの１つを有し、

【化７２】


（ＸＩＩＣ）


（ＸＩＩＤ）

式中、ｙ及びｚは、各々、独立して、１～１２の範囲の整数である。

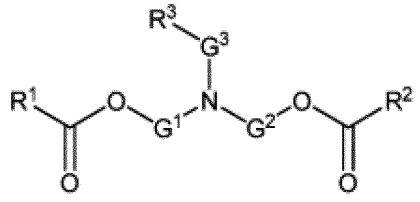
【０５５７】

いくつかの実施形態では、Ｌ$^{1}$またはＬ$^{2}$の一方は、－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）－である。例えば、いくつかの実施形態では、Ｌ$^{1}$及びＬ$^{2}$の各々は、－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）－である。前述のいずれかのいくつかの異なる実施形態では、Ｌ$^{1}$及びＬ$^{2}$は、各々、独立して、－（Ｃ＝Ｏ）Ｏ－または－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）－である。例えば、いくつかの実施形態では、Ｌ$^{1}$及びＬ$^{2}$の各々は、－（Ｃ＝Ｏ）Ｏ－である。

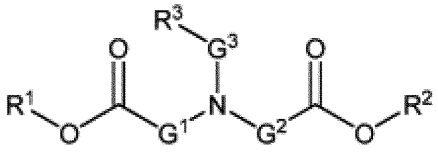
【０５５８】

いくつかの実施形態では、イオン化可能脂質は、以下の構造（ＸＩＩＥ）または（ＸＩＩＦ）のうちの１つを有する：

【化７３】



（ＸＩＩＥ）

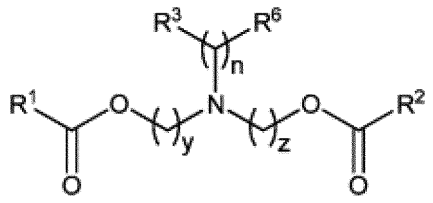


（ＸＩＩＦ）

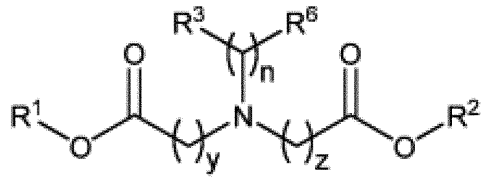
【０５５９】

いくつかの実施形態では、イオン化可能脂質は、以下の構造（ＸＩＩＧ）、（ＸＩＩＨ）、（ＸＩＩＩ）、または（ＸＩＩＪ）のうちの１つを有する：

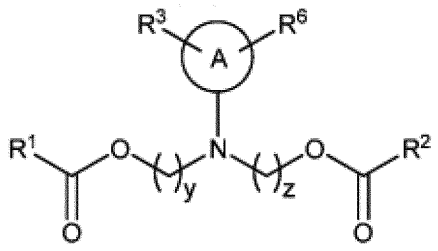
【化７４】



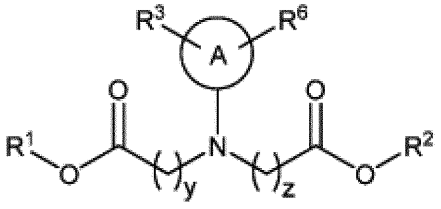
（ＸＩＩＧ）



（ＸＩＩＨ）



（ＸＩＩＩ）

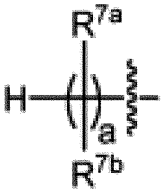


（ＸＩＩＪ）

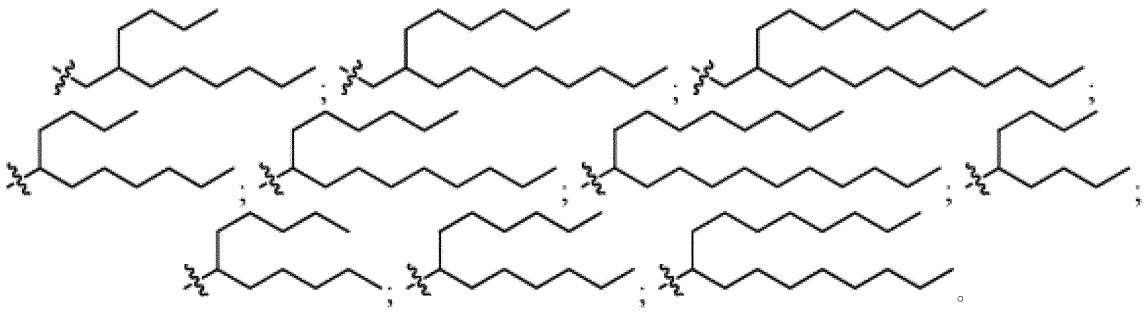
【０５６０】

いくつかの実施形態では、ｎは、２～１２、例えば、２～８または２～４の範囲の整数である。例えば、いくつかの実施形態では、ｎは、３、４、５または６である。いくつかの実施形態では、ｎは、３である。いくつかの実施形態では、ｎは、４である。いくつかの実施形態では、ｎは、５である。いくつかの実施形態では、ｎは、６である。

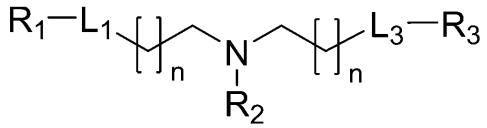
【０５６１】
いくつかの実施形態では、ｙ及びｚは、各々、独立して、２～１０の範囲の整数である。例えば、いくつかの実施形態では、ｙ及びｚは、各々、独立して、４～９または４～６の範囲の整数である。
【０５６２】
いくつかの実施形態では、$R^6$は、Ｈである。他の実施形態では、$R^6$は、$C_1-C_{24}$アルキルである。他の実施形態では、$R^6$は、ＯＨである。
【０５６３】
いくつかの実施形態では、$G^3$は、非置換である。他の実施形態では、Ｇ３は、置換される。様々な異なる実施形態では、$G^3$は、直鎖状$C_1-C_{24}$アルキレンまたは直鎖状$C_1-C_{24}$アルケニレンである。
【０５６４】
いくつかの実施形態では、$R^1$もしくは$R^2$、またはその両方は、$C_6-C_{24}$アルケニルである。例えば、いくつかの実施形態では、$R^1$及び$R^2$は、各々、独立して、以下の構造を有し、
【化７５】



式中、
$R^{7a}$及び$R^{7b}$は、各存在で、独立して、Ｈまたは$C_1-C_{12}$アルキルであり、
ａは、２～１２の整数であり、
$R^{7a}$、$R^{7b}$及びａは、各々、$R^1$及び$R^2$が、各々、独立して、６～２０個の炭素原子を含むように選択される。
【０５６５】
いくつかの実施形態では、ａは、５～９または８～１２の範囲の整数である。
【０５６６】
いくつかの実施形態では、$R^{7a}$の少なくとも１つの存在においてＨである。例えば、いくつかの実施形態では、$R^{7a}$は各存在においてＨである。他の異なる実施形態では、$R^{7b}$の少なくとも１つの存在は、$C_1-C_8$アルキルである。例えば、いくつかの実施形態では、$C_1-C_8$アルキルは、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、ｔｅｒｔ－ブチル、ｎ－ヘキシルまたはｎ－オクチルである。
【０５６７】
異なる実施形態では、$R^1$もしくは$R^2$、またはその両方は、以下の構造のうちの１つを有する：
【化７６】



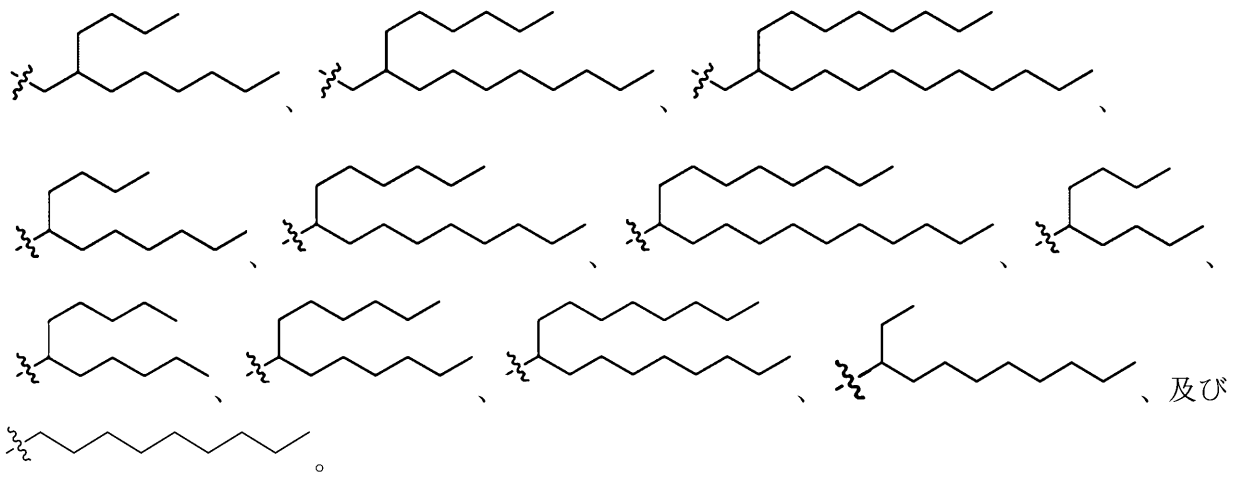
【０５６８】
いくつかの実施形態では、$R^3$は、－ＯＨ、－ＣＮ、－Ｃ（＝Ｏ）Ｏ$R^4$、－ＯＣ（＝Ｏ）$R^4$または－ＮＨＣ（＝Ｏ）$R^4$である。いくつかの実施形態では、$R^4$は、メチルまたはエチルである。
【０５６９】
いくつかの実施形態では、イオン化脂質は、式（１）の化合物であり、
【化７７】



式（１）、

式中、
各ｎは、独立して、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、または１５であり、
$L_1$及び$L_3$は、各々、独立して、－ＯＣ（Ｏ）－＊または－Ｃ（Ｏ）Ｏ－＊であり、「＊」は、$R_1$または$R_3$に対する結合点を示し、
$R_1$及び$R_3$は、各々、独立して、オキソ、ハロ、ヒドロキシ、シアノ、アルキル、アルケニル、アルデヒド、ヘテロシクリルアルキル、ヒドロキシアルキル、ジヒドロキシアルキル、ヒドロキシアルキルアミノアルキル、アミノアルキル、アルキルアミノアルキル、ジアルキルアミノアルキル、（ヘテロシクリル）（アルキル）アミノアルキル、ヘテロシクリル、ヘテロアリール、アルキルヘテロアリール、アルキニル、アルコキシ、アミノ、ジアルキルアミノ、アミノアルキルカルボニルアミノ、アミノカルボニルアルキルアミノ、（アミノカルボニルアルキル）（アルキル）アミノ、アルケニルカルボニルアミノ、ヒドロキシカルボニル、アルキルオキシカルボニル、アミノカルボニル、アミノアルキルアミノカルボニル、アルキルアミノアルキルアミノカルボニル、ジアルキルアミノアルキルアミノカルボニル、ヘテロシクリルアルキルアミノカルボニル、（アルキルアミノアルキル）（アルキル）アミノカルボニル、アルキルアミノアルキルカルボニル、ジアルキルアミノアルキルカルボニル、ヘテロシクリルカルボニル、アルケニルカルボニル、アルキニルカルボニル、アルキルスルホキシド、アルキルスルホキシドアルキル、アルキルスルホニル、及びアルキルスルホンアルキルから選択される１つ以上の置換基によって任意に置換される直鎖状または分岐状$C_9$－$C_{20}$アルキルまたは$C_9$－$C_{20}$アルケニルである。
【０５７０】
いくつかの実施形態では、$R_1$及び$R_3$は、同じである。いくつかの実施形態では、$R_1$及び$R_3$は、異なる。
【０５７１】
いくつかの実施形態では、$R_1$及び$R_3$は、各々、独立して、分岐状飽和$C_9$－$C_{20}$アルキルである。いくつかの実施形態では、$R_1$及び$R_3$の一方は、分岐状飽和$C_9$－$C_{20}$アルキルであり、他方は、非分岐状飽和$C_9$－$C_{20}$アルキルである。いくつかの実施形態では、$R_1$及び$R_3$は、各々、独立して、以下からなる群から選択される：

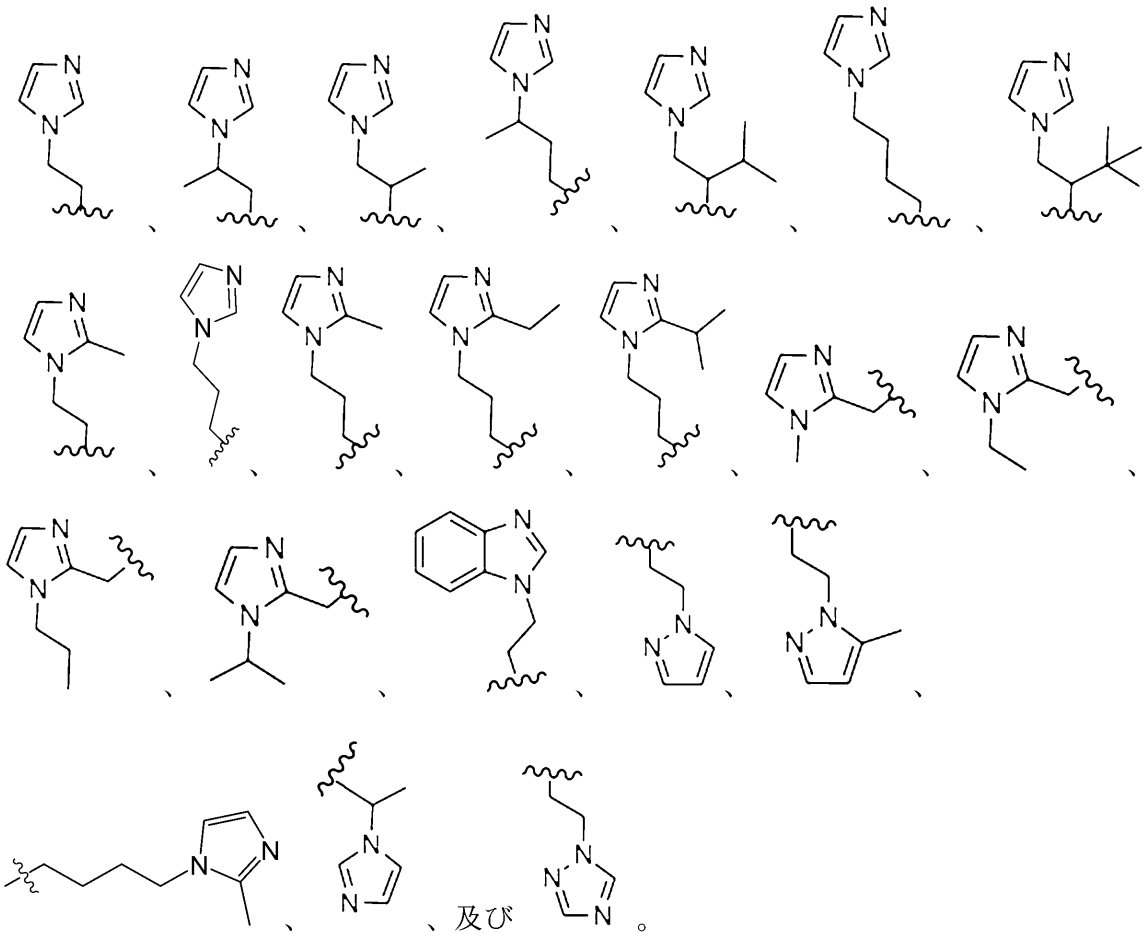
【化７８】



【０５７２】

様々な実施形態では、$R_2$は、以下からなる群から選択される：

【化７９】



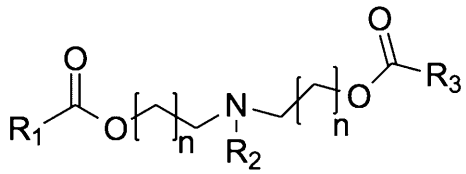
【０５７３】

いくつかの実施形態では、$R_2$は、国際特許公開第ＷＯ２０１９／１５２８４８Ａ１号に記載されているとおりであり得、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

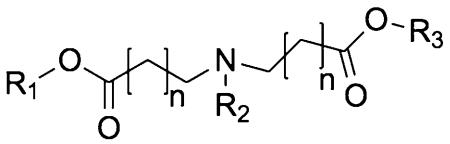
【０５７４】

いくつかの実施形態では、イオン化可能脂質は、式（１－１）または式（１－２）の化合物であり、

【化８０】



式（１－１）、



式（１－２）、

式中、ｎ、Ｒ１、Ｒ２、及びＲ３は、式（１）において定義されているとおりである。

【０５７５】

上記化合物及び組成物のための調製方法は、以下に記載されており及び／または当該技術分野で知られている。

【０５７６】

本明細書に記載のプロセスにおいて、中間体化合物の官能基は、好適な保護基によって保護される必要があり得ることが当業者によって理解される。かかる官能基には、例えば、ヒドロキシル、アミノ、メルカプト、及びカルボン酸が含まれる。ヒドロキシルのための好適な保護基には、例えば、トリアルキルシリルまたはジアリールアルキルシリル（例えば、ｔ－ブチルジメチルシリル、ｔ－ブチルジフェニルシリルまたはトリメチルシリル）、テトラヒドロチオピラニル、ベンジルなどが含まれる。アミノ、アミジノ、及びグアニジノのための好適な保護基には、例えば、ｔ－ブトキシカルボニル、ベンジルオキシカルボニルなどが含まれる。メルカプトのための好適な保護基には、例えば、－Ｃ（Ｏ）－Ｒ’’（式中、Ｒ’’は、アルキル、アリール、またはアリールアルキルである）、ｐ－メトキシベンジル、トリチルなどが含まれる。カルボン酸のための好適な保護基には、例えば、アルキル、アリール、またはアリールアルキルエステルが含まれる。保護基は、当業者に知られており、本明細書に記載される標準的な技術に従って付加または除去され得る。保護基の使用は、例えば、Ｇｒｅｅｎ，Ｔ．Ｗ．ａｎｄ　Ｐ．Ｇ．Ｍ．Ｗｕｔｚ，Ｐｒｏｔｅｃｔｉｖｅ　Ｇｒｏｕｐｓ　ｉｎ　Ｏｒｇａｎｉｃ　Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ（１９９９），３ｒｄ　Ｅｄ．，Ｗｉｌｅｙに詳細に記載されている。当業者が理解されるであろうが、保護基はまた、Ｗａｎｇ樹脂、Ｒｉｎｋ樹脂、または２－クロロトリチル－クロリド樹脂などのポリマー樹脂であり得る。

【０５７７】

また、本発明の化合物のかかる保護された誘導体は、それ自体では薬理学的活性を有さない場合があるが、それらは、哺乳動物に投与され、その後、体内で代謝されて薬理学的に活性な本発明の化合物が形成され得ることが当業者によって理解される。そのため、かかる誘導体は、プロドラッグとして記載され得る。本発明の化合物の全てのプロドラッグは、本発明の範囲に含まれる。

【０５７８】

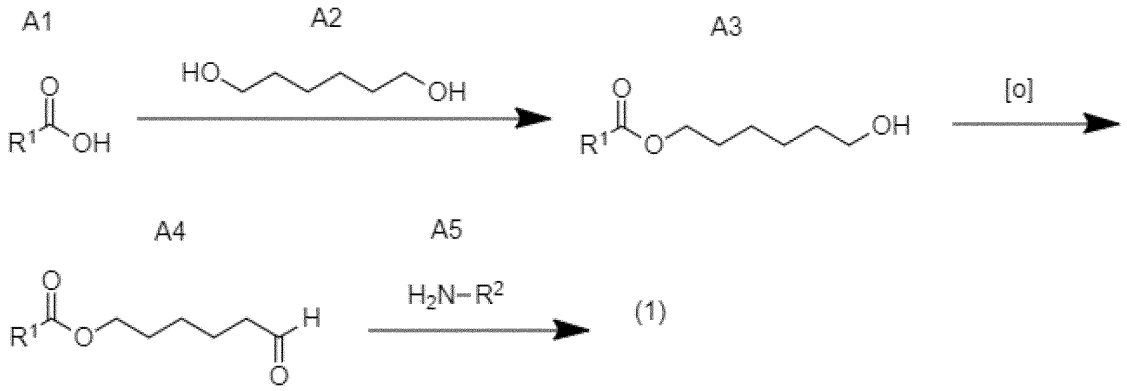
さらに、遊離塩基または酸形態で存在する本発明の全ての化合物は、当業者に知られている方法によって適切な無機または有機塩基または酸での処置によってそれらの薬学的に許容可能な塩に変換され得る。本発明の化合物の塩はまた、標準的な技術によってそれら

の遊離塩基または酸形態に変換され得る。

【０５７９】

以下の反応スキームは、式（１）の化合物を作製するための例示的な方法を示している：

【化８１】



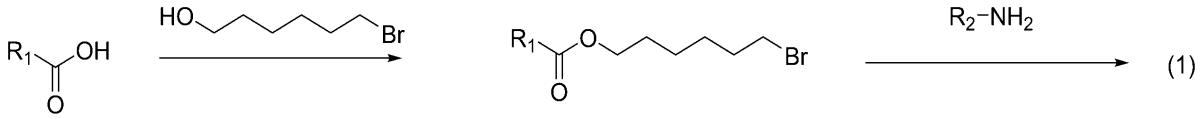

【０５８０】

Ａ１は、購入されるか、または当該技術分野で知られている方法に従って調製される。適切な縮合条件（例えば、ＤＣＣ）下でのＡ１とジオールＡ２との反応は、エステル／アルコールＡ３を生成し、これは次いで、（例えば、ＰＣＣで）アルデヒドＡ４に酸化され得る。還元的アミノ化条件下でのＡ４とアミンＡ５との反応は、式（１）の化合物を生成する。

【０５８１】

以下の反応スキームは、$R_1$及び$R_3$が同じである式（１）の化合物を作製するための第２の例示的な方法を説明する：

【化８２】




【０５８２】

例えば、保護基を使用する、上記反応スキームに対する修飾は、$R_1$及び$R_3$が異なる化合物を生成し得る。上記反応スキームに対する保護基の使用、及び他の修飾方法は、当業者に容易に明らかとなる。

【０５８３】

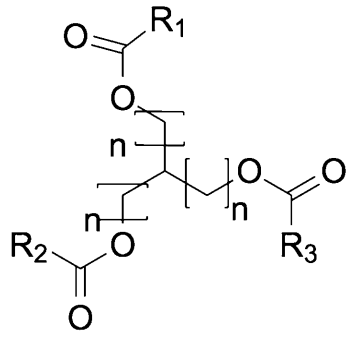
当業者は、類似の方法によってまたは当業者に知られている他の方法を組み合わせることによってこれらの化合物を作製することが可能であり得ることが理解される。当業者は、適切な出発物質を使用し、合成のパラメータを修飾することによって本明細書に具体的に例示されていない式（１）の他の化合物を作製することができるであろうことが理解される。通常、出発物質は、Ｓｉｇｍａ Ａｌｄｒｉｃｈ、Ｌａｎｃａｓｔｅｒ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ，Ｉｎｃ、Ｍａｙｂｒｉｄｇｅ、Ｍａｔｒｉｘ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、ＴＣＩ、及びＦｌｕｏｒｏｃｈｅｍ ＵＳＡなどの供給源から得られ、または当業者に知られている供給源に従って合成され（例えば、Ａｄｖａｎｃｅｄ Ｏｒｇａｎｉｃ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ：Ｒｅａｃｔｉｏｎｓ，Ｍｅｃｈａｎｉｓｍｓ，ａｎｄ Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ，５ｔｈ ｅｄｉｔｉｏｎ（Ｗｉｌｅｙ，Ｄｅｃｅｍｂｅｒ ２０００））、または本発

明に記載されているように調製され得る。

【０５８４】

いくつかの実施形態では、イオン化可能脂質は、式（２）の化合物であり、

【化８３】



式（２）、

式中、各ｎは、独立して、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、または１５である。

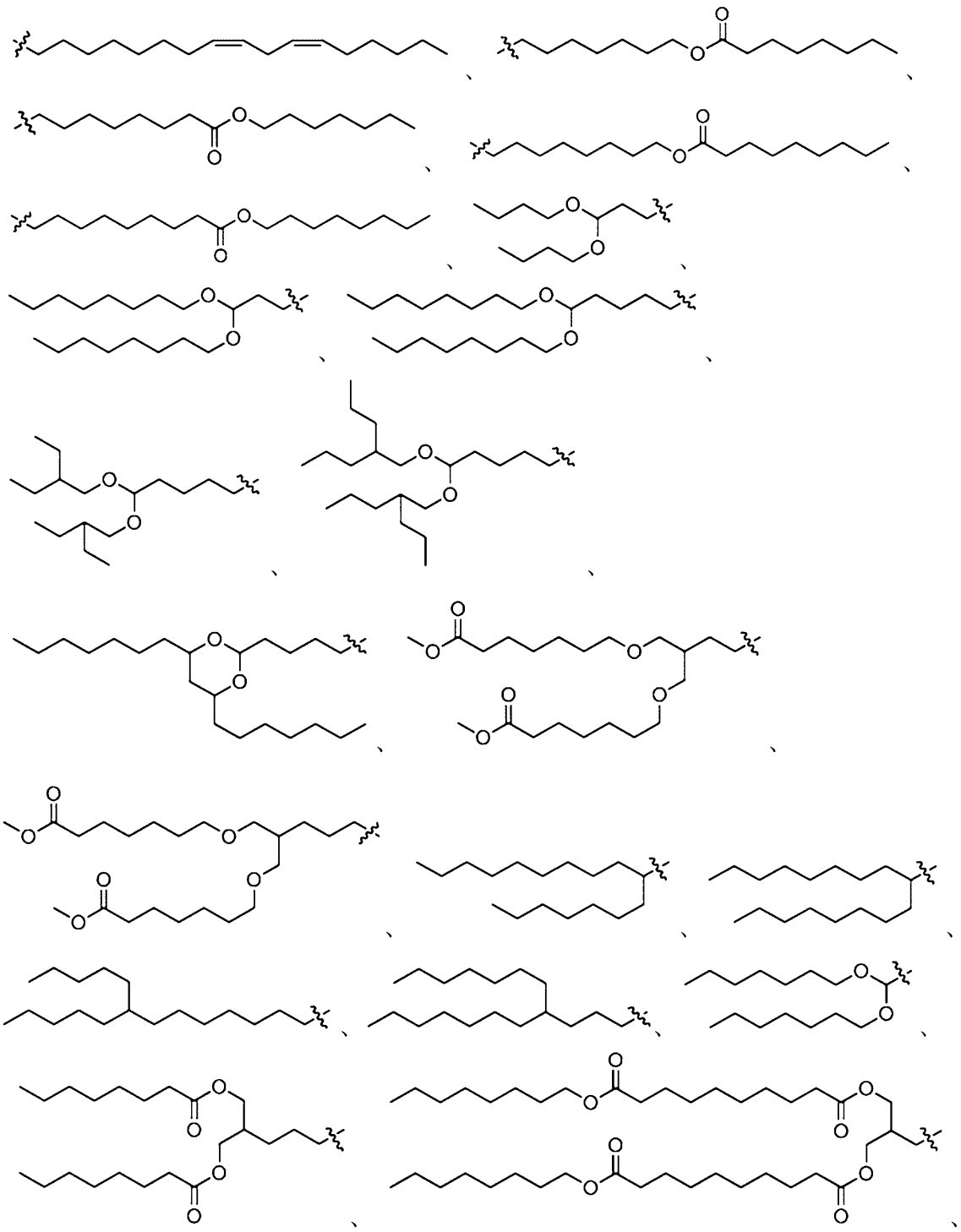
【０５８５】

いくつかの実施形態では、式（２）において使用される場合、$R_1$及び$R_2$は、式（１）において定義されているとおりである。

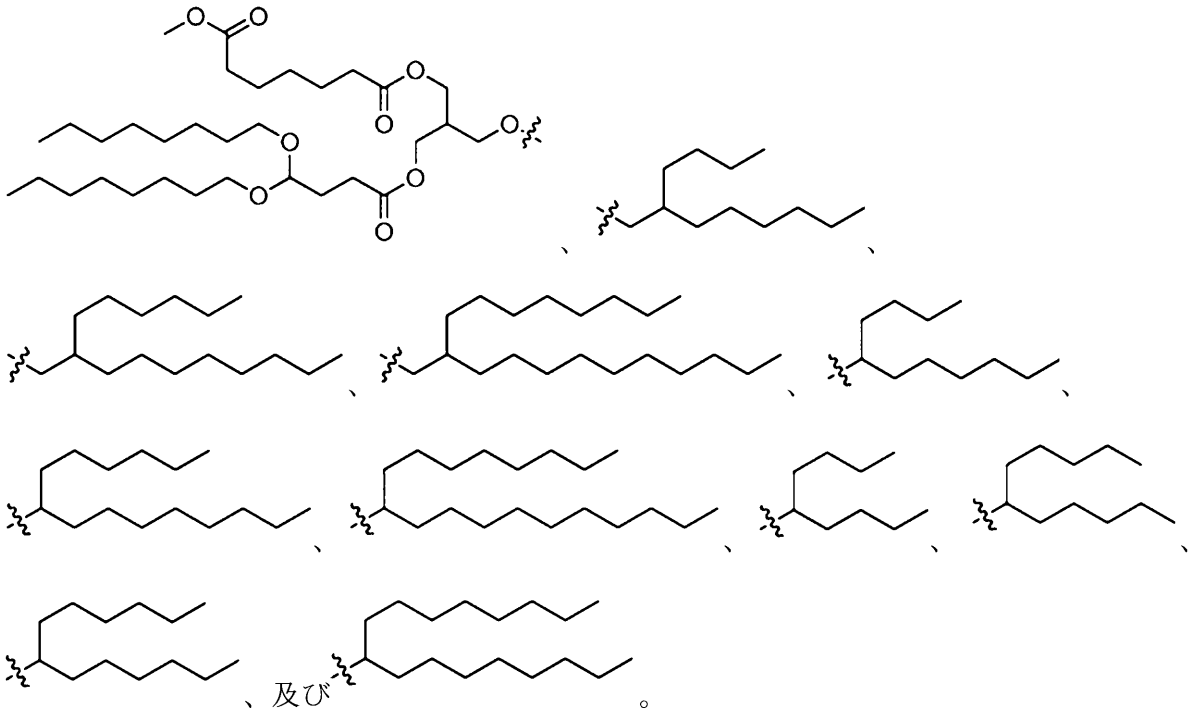
【０５８６】

いくつかの実施形態では、式（２）において使用される場合、$R_1$及び$R_2$は、各々、独立して、以下からなる群から選択される：

【化８４－１】



【化８４－２】



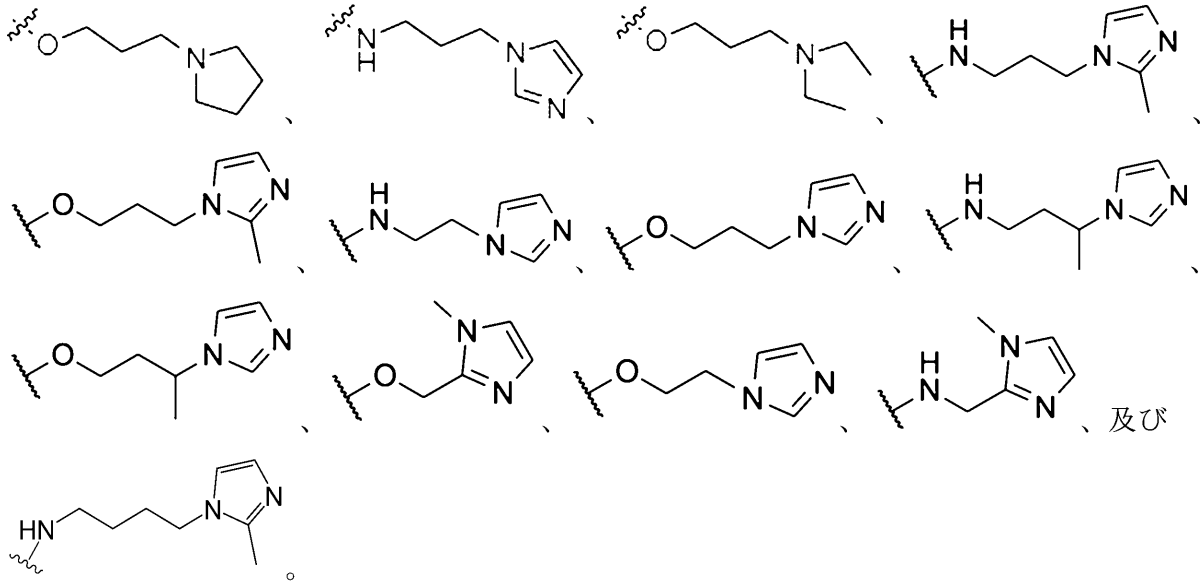
【０５８７】

いくつかの実施形態では、式（２）において使用されるＲ$_1$及び／またはＲ$_2$は、国際特許公開第ＷＯ２０１５／０９５３４０Ａ１号（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているとおりであり得る。いくつかの実施形態では、式（２）において使用されるＲ$_1$は、国際特許公開第ＷＯ２０１９／１５２５５７Ａ１号に記載されているとおりであり得、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

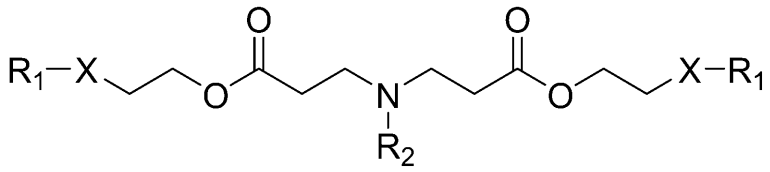
【０５８８】

いくつかの実施形態では、式（２）において使用される場合、Ｒ$_3$は、以下からなる群から選択される：

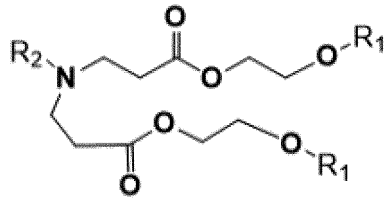
【化８５】



【０５８９】
いくつかの実施形態では、イオン化可能脂質は、式（３）の化合物であり、
【化８６】

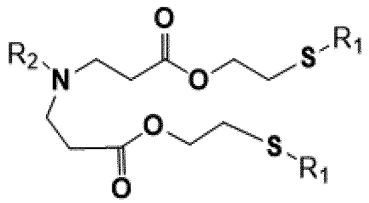


式中、Ｘは－Ｏ－、－Ｓ－、または－ＯＣ（Ｏ）－＊から選択され、＊は、Ｒ１との結合点を示す。
【０５９０】
いくつかの実施形態では、イオン化可能脂質は、式（３－１）の化合物である：
【化８７】



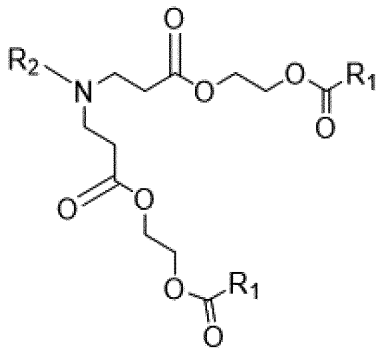
（３－１）。

【０５９１】
いくつかの実施形態では、イオン化可能脂質は、式（３－２）の化合物である：
【化８８】



（３－２）。

【０５９２】
いくつかの実施形態では、イオン化可能脂質は、式（３－３）の化合物である：
【化８９】

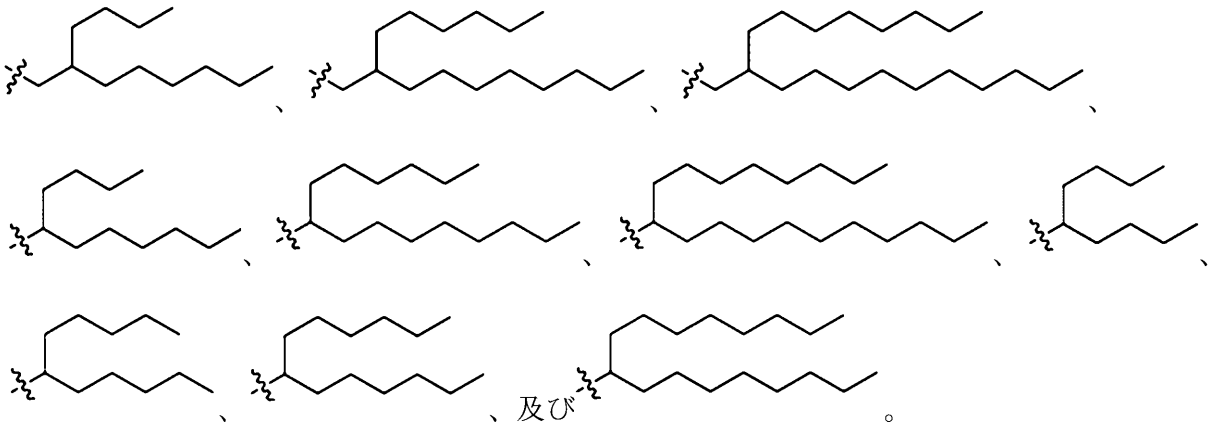


（３－３）。

【０５９３】
いくつかの実施形態では、式（３－１）、（３－２）、または（３－３）において使用

される場合、各$R_1$は、独立して、分岐状飽和$C_9$－$C_{20}$アルキルである。いくつかの実施形態では、各$R_1$は、独立して、以下からなる群から独立して選択される：

【化９０】



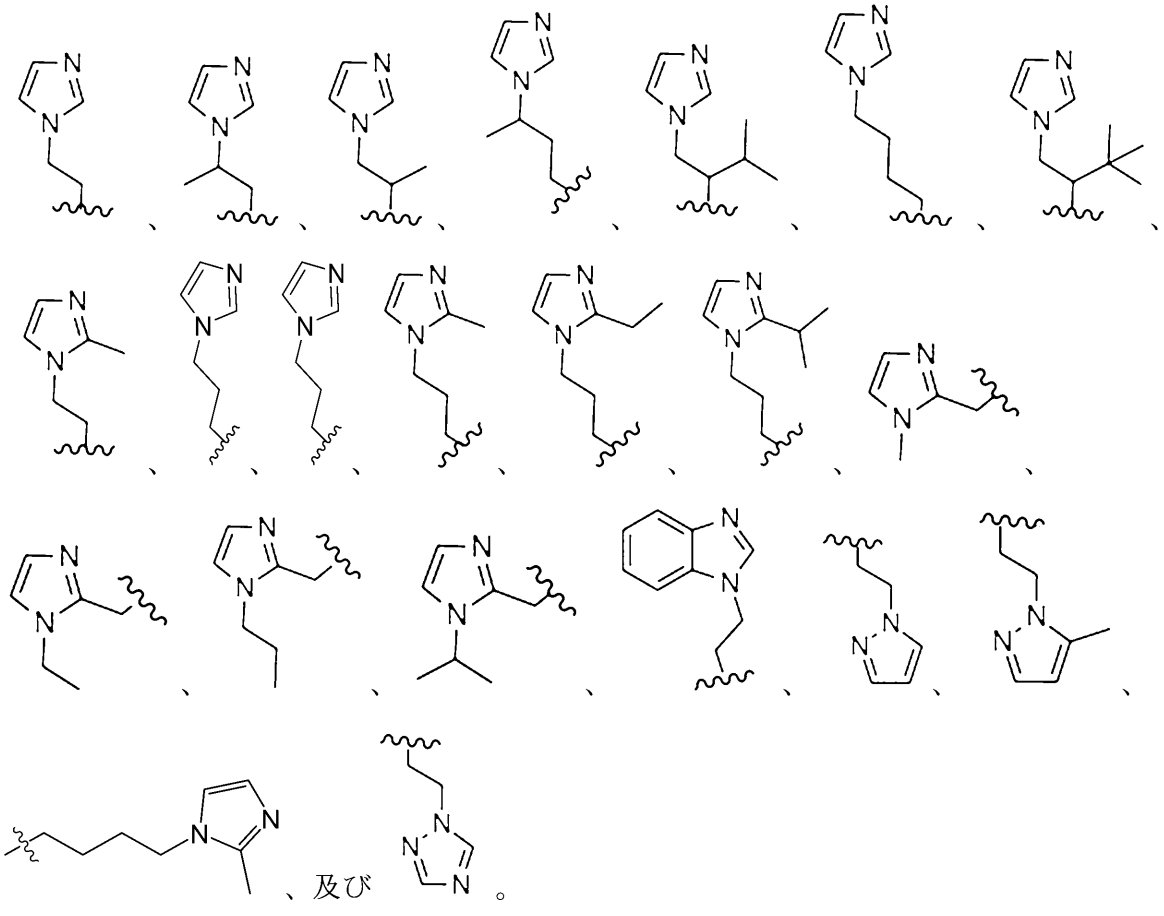
【０５９４】

いくつかの実施形態では、式（３－１）、（３－２）、または（３－３）における各$R_1$は、同じである。

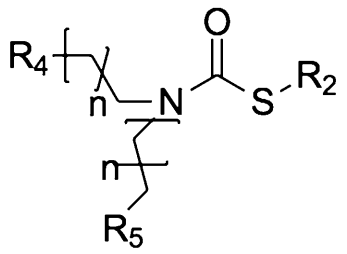
【０５９５】

いくつかの実施形態では、式（３－１）、（３－２）、または（３－３）において使用される場合、$R_2$は、以下からなる群から選択される：

【化９１】

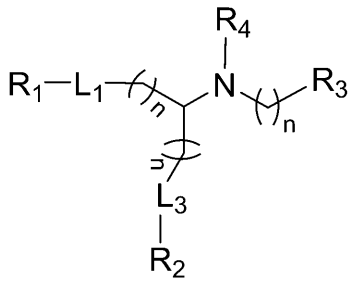


【０５９６】
いくつかの実施形態では、式（３－１）、（３－２）、または（３－３）において使用されるＲ$_2$は、国際特許公開第ＷＯ２０１９／１５２８４８Ａ１号に記載されているとおりであり得、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。
【０５９７】
いくつかの実施形態では、イオン化可能脂質は、式（５）の化合物であり、
【化９２】



（５）、

式中、
各ｎは、独立して、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、または１５であり、
Ｒ$_2$は、式（１）において定義されているとおりである。
【０５９８】
いくつかの実施形態では、式（５）において使用される場合、Ｒ$_4$及びＲ$_5$は、式（１）において、各々、Ｒ$_1$及びＲ$_3$として定義されている。いくつかの実施形態では、式（５）において使用される場合、Ｒ$_4$及びＲ$_5$は、国際特許公開第ＷＯ２０１９／１９１７８０Ａ１号に記載されているとおりであり得、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。
【０５９９】
いくつかの実施形態では、イオン化脂質は、式（６）の化合物であり、
【化９３】



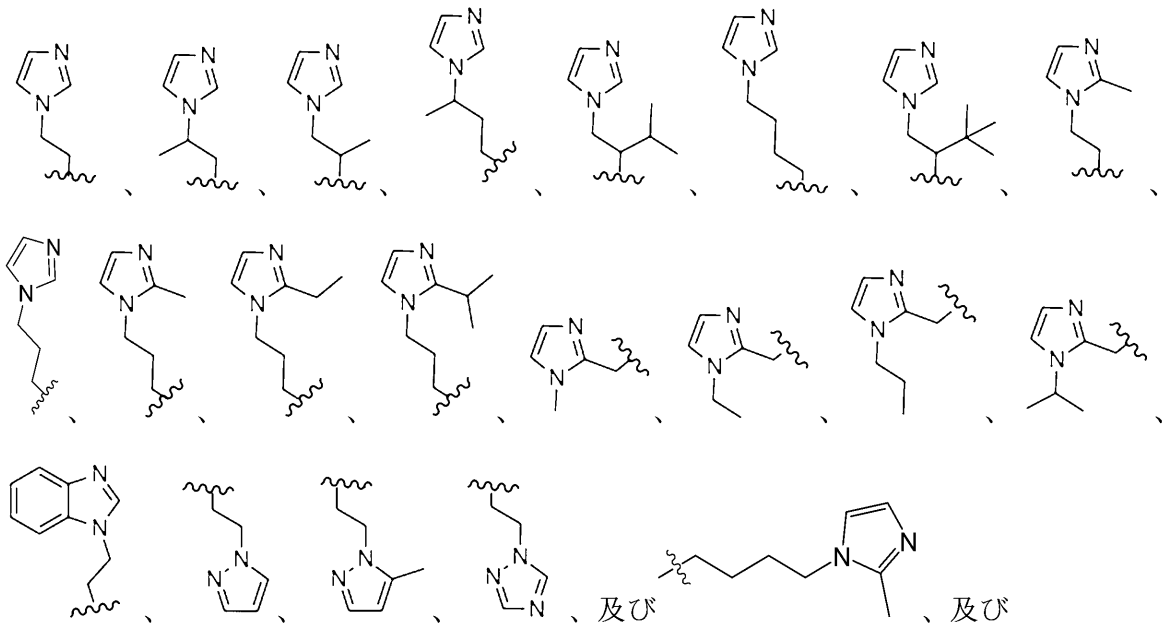
式（６）

式中、
各ｎは、独立して、０～１５の整数であり、
Ｌ$_1$及びＬ$_3$は、各々、独立して、－ＯＣ（Ｏ）－＊または－Ｃ（Ｏ）Ｏ－＊であり、「＊」は、Ｒ$_1$またはＲ$_3$に対する結合点を示し、
Ｒ$_1$及びＲ$_2$は、各々、独立して、オキソ、ハロ、ヒドロキシ、シアノ、アルキル、アルケニル、アルデヒド、ヘテロシクリルアルキル、ヒドロキシアルキル、ジヒドロキシアルキル、ヒドロキシアルキルアミノアルキル、アミノアルキル、アルキルアミノアルキル、ジアルキルアミノアルキル、（ヘテロシクリル）（アルキル）アミノアルキル、ヘテロシクリル、ヘテロアリール、アルキルヘテロアリール、アルキニル、アルコキシ、アミノ、ジアルキルアミノ、アミノアルキルカルボニルアミノ、アミノカルボニルアルキルアミ

ノ、（アミノカルボニルアルキル）（アルキル）アミノ、アルケニルカルボニルアミノ、ヒドロキシカルボニル、アルキルオキシカルボニル、アミノカルボニル、アミノアルキルアミノカルボニル、アルキルアミノアルキルアミノカルボニル、ジアルキルアミノアルキルアミノカルボニル、ヘテロシクリルアルキルアミノカルボニル、（アルキルアミノアルキル）（アルキル）アミノカルボニル、アルキルアミノアルキルカルボニル、ジアルキルアミノアルキルカルボニル、ヘテロシクリルカルボニル、アルケニルカルボニル、アルキニルカルボニル、アルキルスルホキシド、アルキルスルホキシドアルキル、アルキルスルホニル、及びアルキルスルホンアルキルからなる群から選択される１つ以上の置換基によって任意に置換される直鎖状または分岐状Ｃ９－Ｃ２０アルキルまたはＣ９－Ｃ２０アルケニルであり、

Ｒ３は、以下からなる群から選択され、

【化９４】

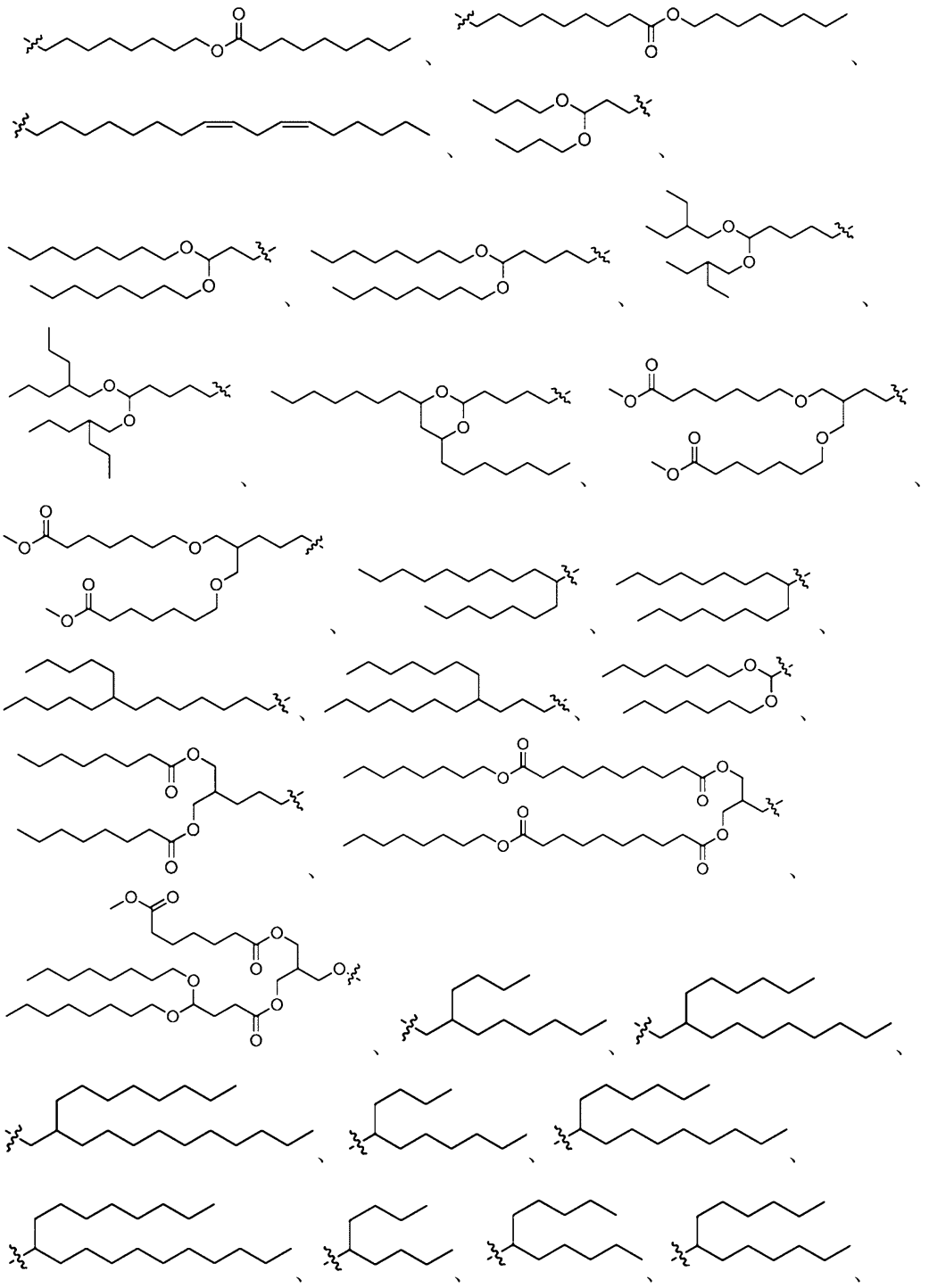


Ｒ４は、直鎖状または分岐Ｃ１－Ｃ１５アルキルもしくはＣ１－Ｃ１５アルケニルである。

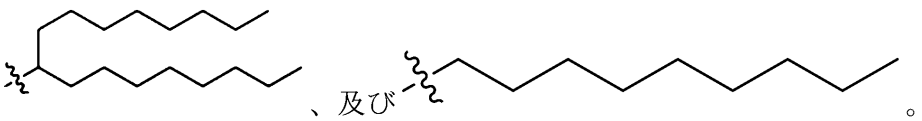
【０６００】

いくつかの実施形態では、Ｒ１及びＲ２は、各々、独立して、以下からなる群から選択される：

【化９５－１】



【化９５－２】



【０６０１】

いくつかの実施形態では、$R_1$及び$R_2$は、同じである。いくつかの実施形態では、R

$_1$及び$R_2$は、異なる。

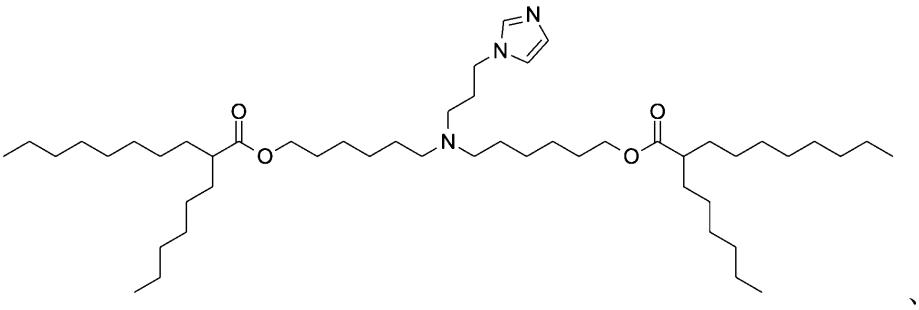
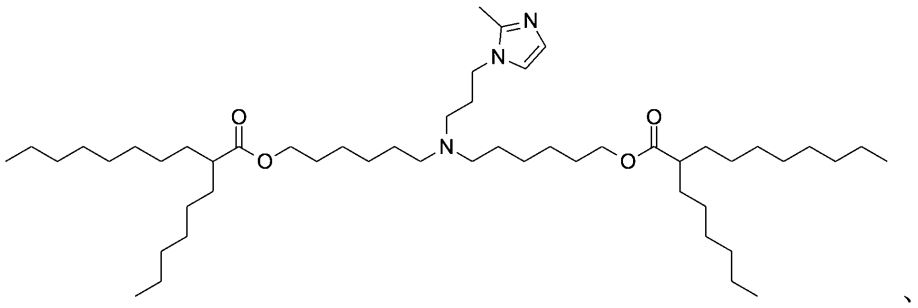
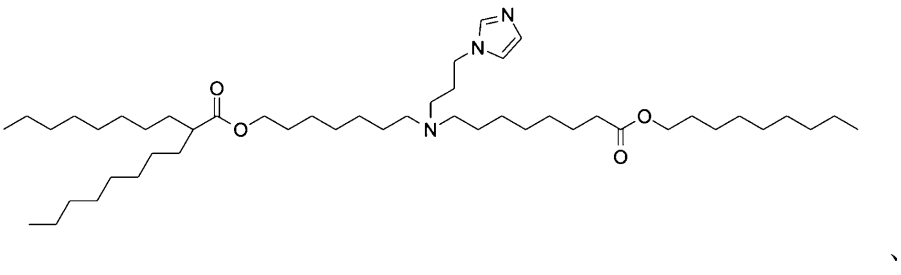
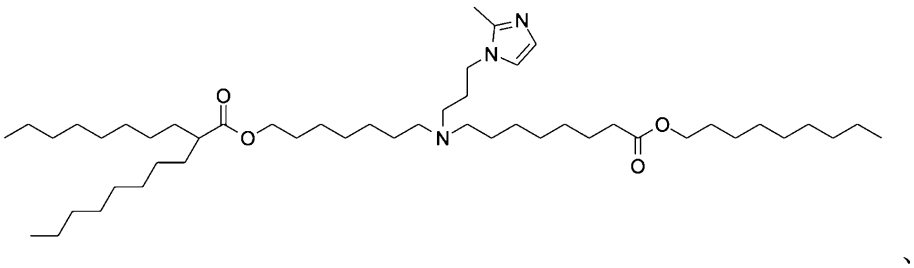
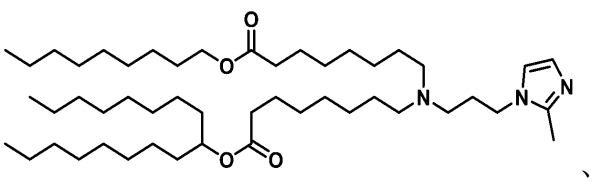
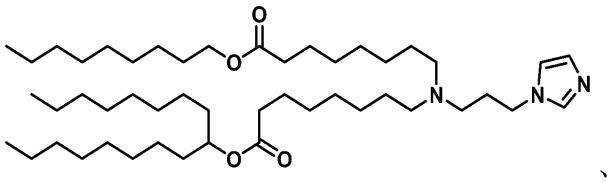
【０６０２】

いくつかの実施形態では、本開示のイオン化可能脂質は、表１０ａから選択される。いくつかの実施形態では、イオン化可能脂質は、表１０ａにおける脂質２６である。いくつかの実施形態では、イオン化可能脂質は、表１０ａにおける脂質２７である。いくつかの実施形態では、イオン化可能脂質は、表１０ａにおける脂質５３である。いくつかの実施形態では、イオン化可能脂質は、表１０ａにおける脂質５４である。いくつかの実施形態では、イオン化可能脂質は、表１０ａにおける脂質４５である。いくつかの実施形態では、イオン化可能脂質は、表１０ａにおける脂質４６である。いくつかの実施形態では、イオン化可能脂質は、表１０ａにおける脂質１３７である。いくつかの実施形態では、イオン化可能脂質は、表１０ａにおける脂質１３８である。いくつかの実施形態では、イオン化可能脂質は、表１０ａにおける脂質１３９である。いくつかの実施形態では、イオン化可能脂質は、表１０ａにおける脂質１２８である。いくつかの実施形態では、イオン化可能脂質は、表１０ａにおける脂質１３０である。

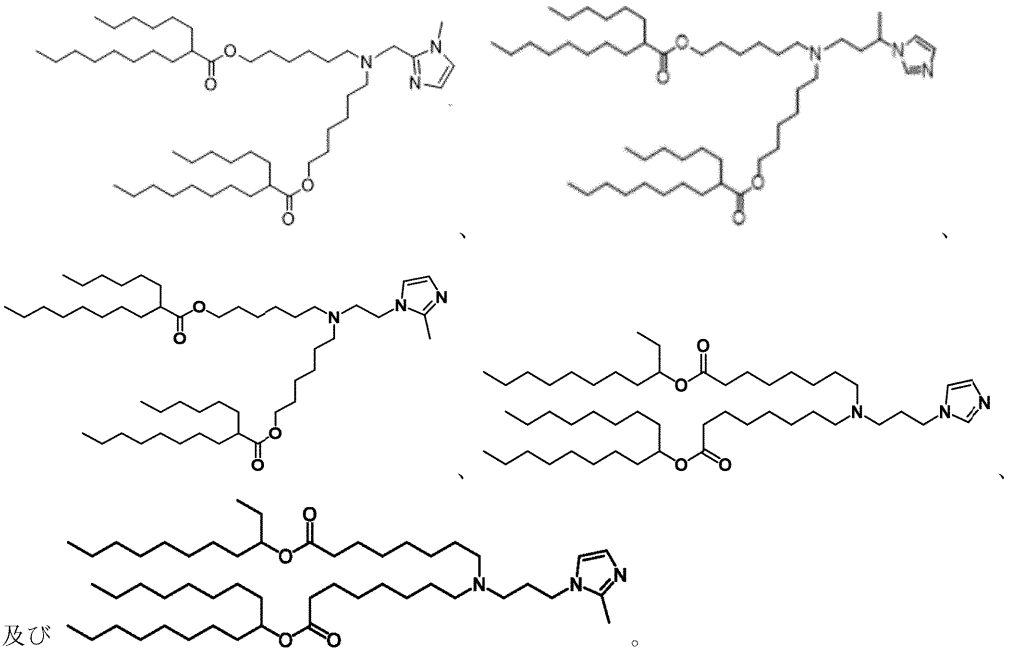
【０６０３】

いくつかの実施形態では、本開示のイオン化可能脂質は、以下からなる群から選択される：

【化９６－１】

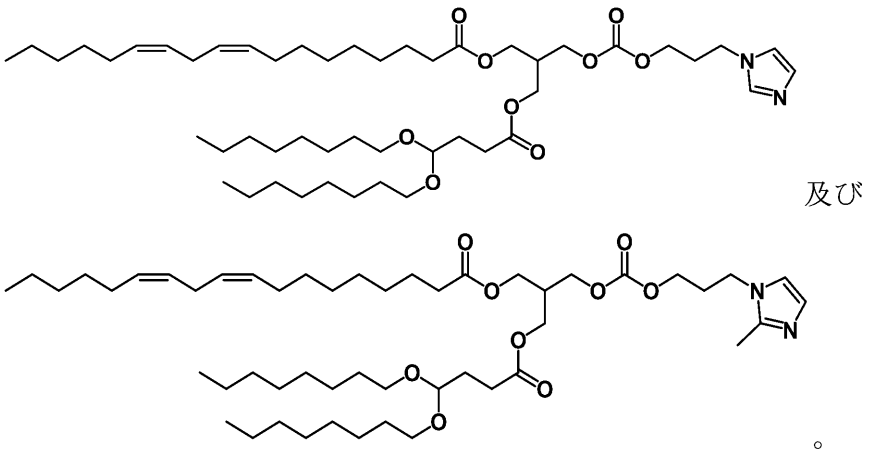

、

、

、

、

、

、

【化９６－２】



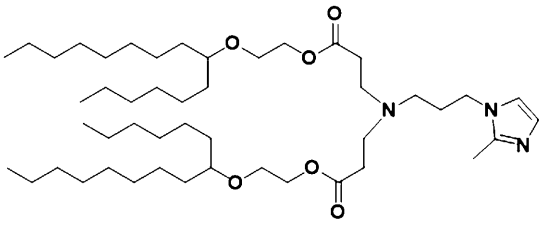
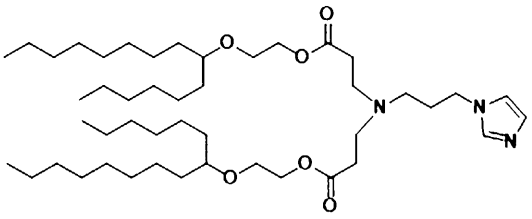
【０６０４】
いくつかの実施形態では、本開示のイオン化可能脂質は、以下からなる群から選択される：

【化９７】



【０６０５】
いくつかの実施形態では、本開示のイオン化可能脂質は、以下からなる群から選択される：

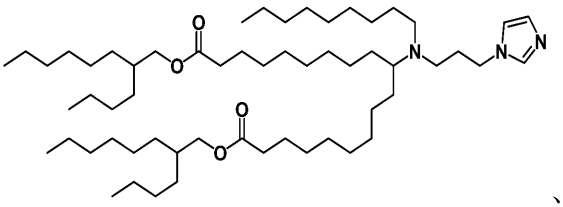
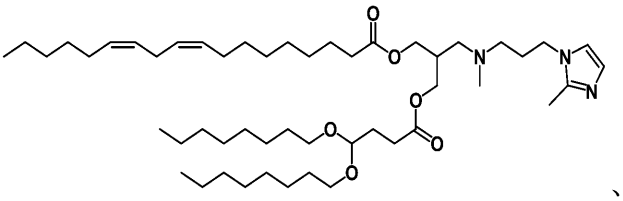
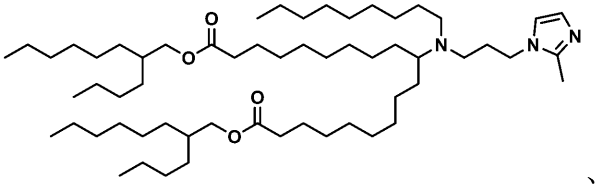
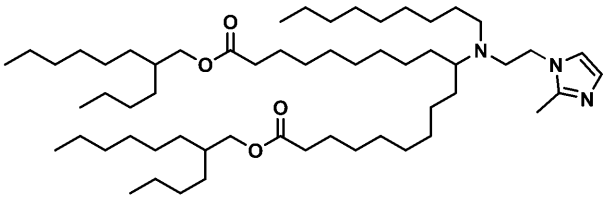
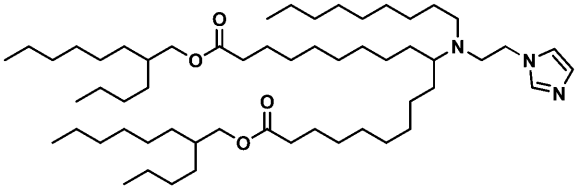
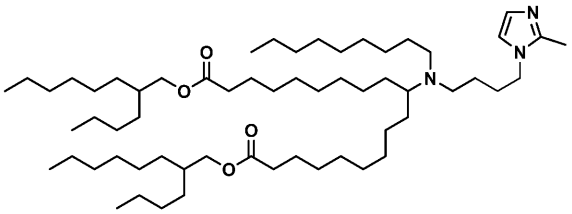
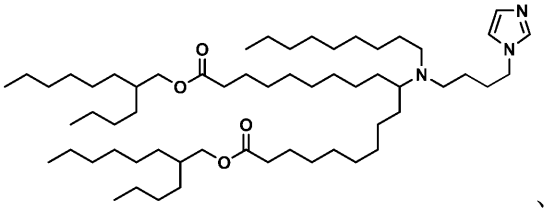
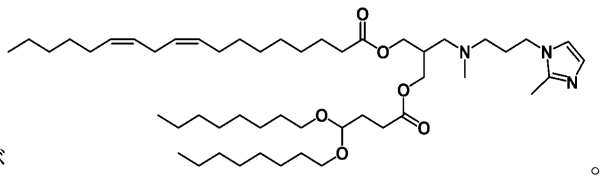
【化９８】


及び

。

【０６０６】

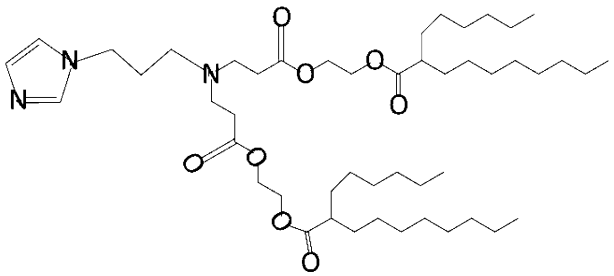
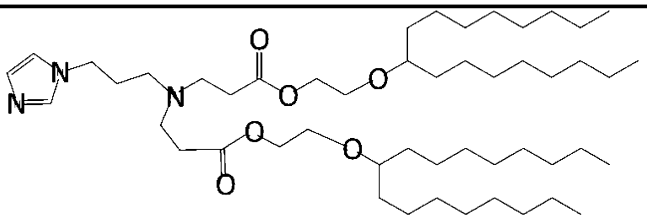
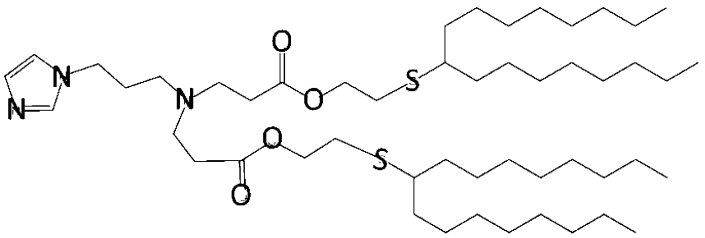
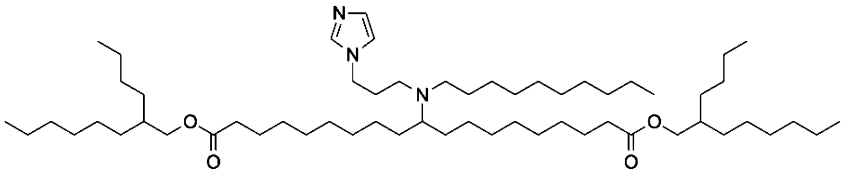
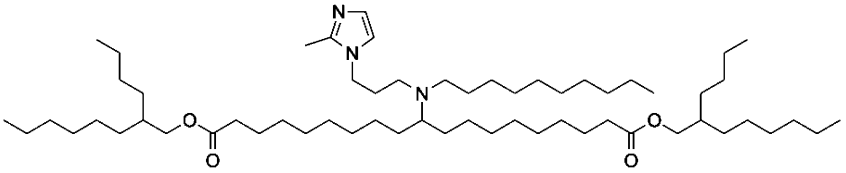
いくつかの実施形態では、本開示のイオン化可能脂質は、以下からなる群から選択される：

【化９９】

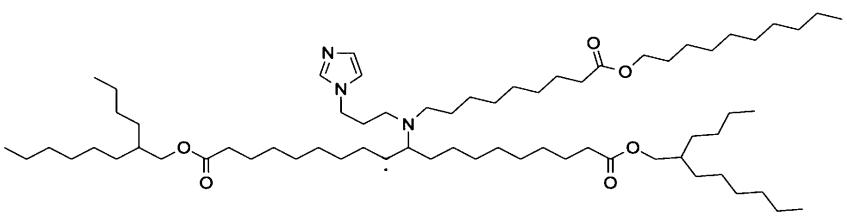
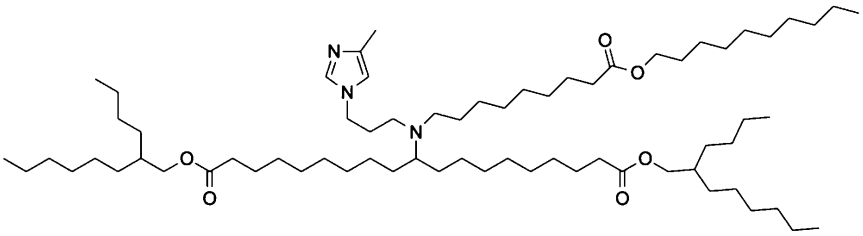
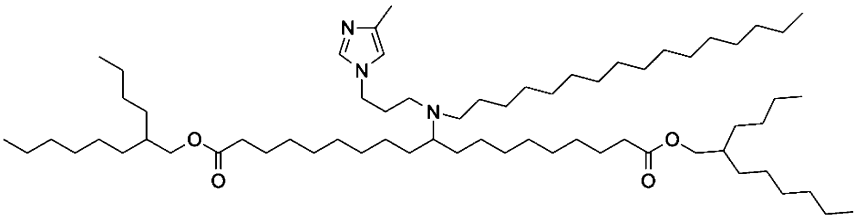
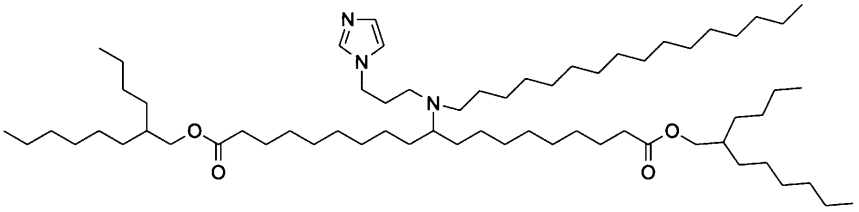
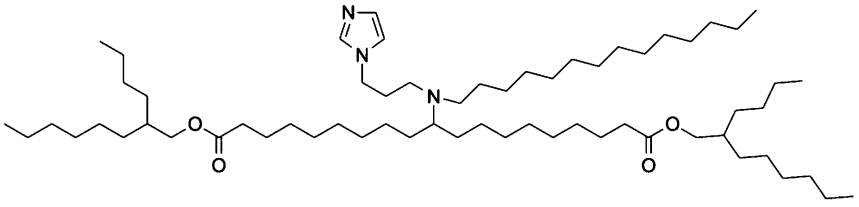

、

、

、

、

、

、

、及び

。

【表１０ａ－１】

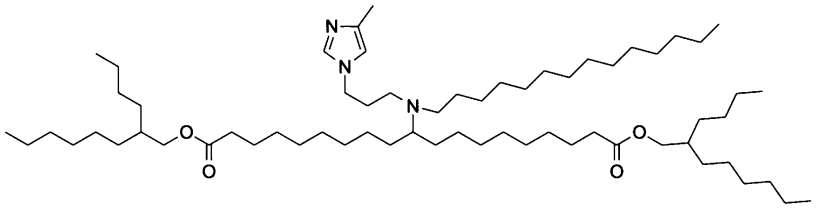
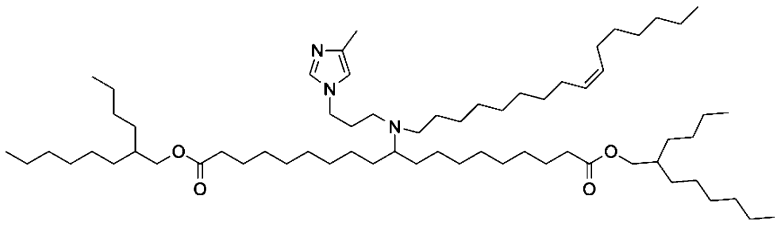
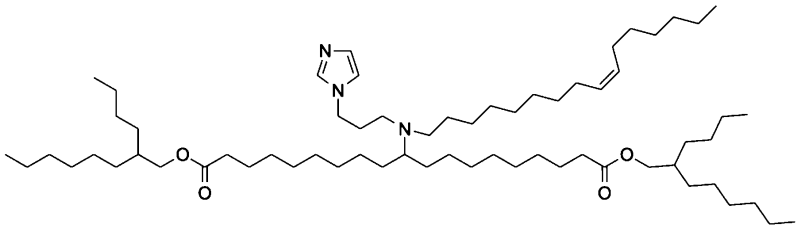
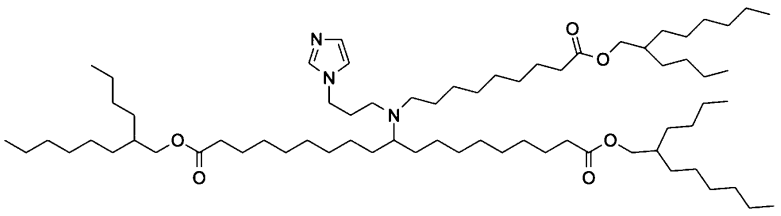
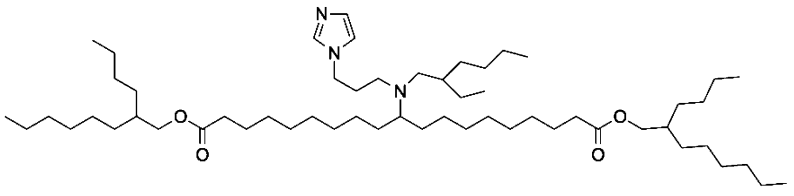
表１０ａ

| イオン化可能脂質番号 | 構造 |
|---|---|
| 1 |  |
| 2 |  |
| 3 |  |
| 4 |  |
| 5 |  |

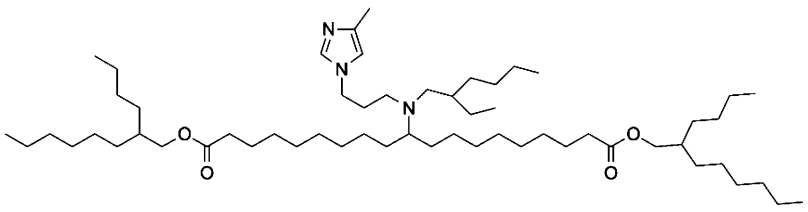
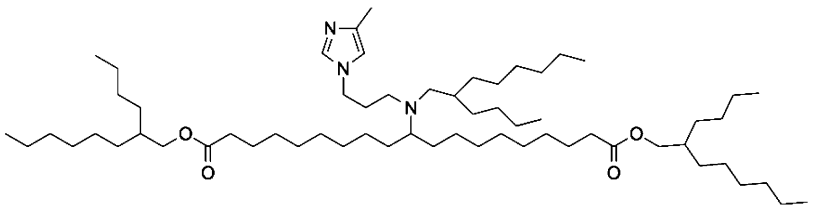
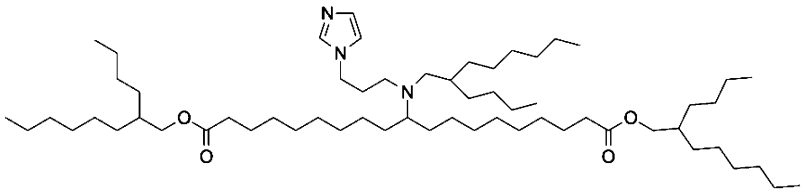
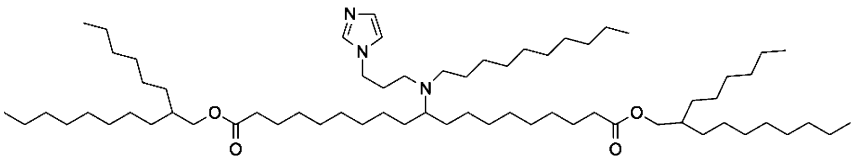
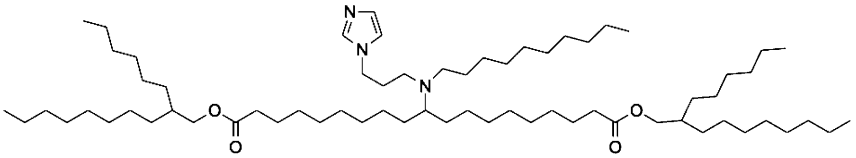
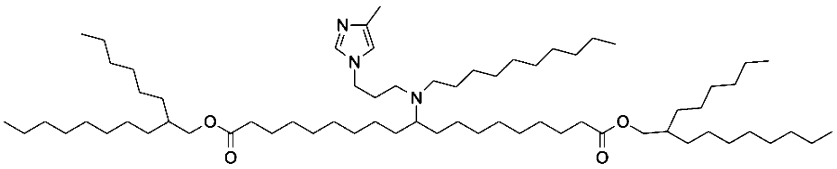
【表１０ａ－２】

| | |
|---|---|
| 6 |  |
| 7 |  |
| 8 |  |
| 9 |  |
| 10 |  |

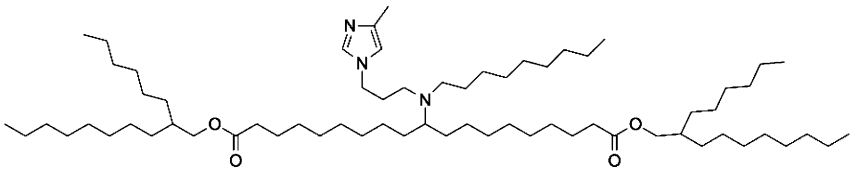
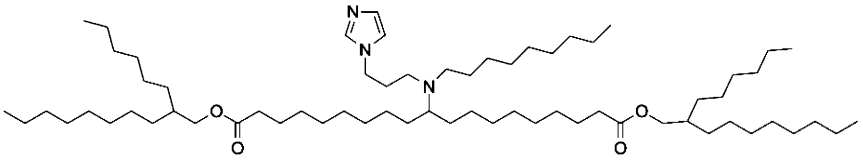
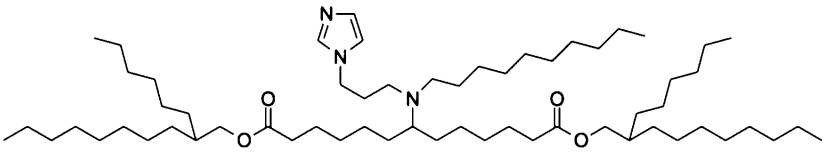
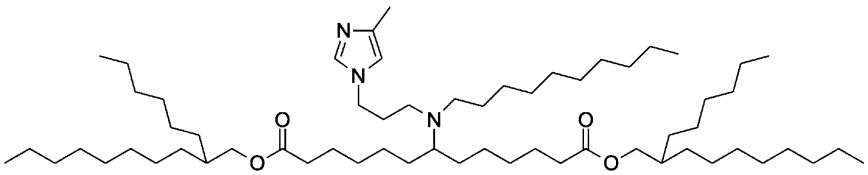
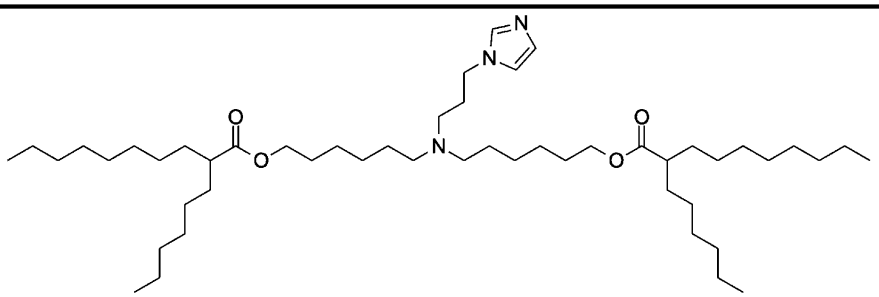
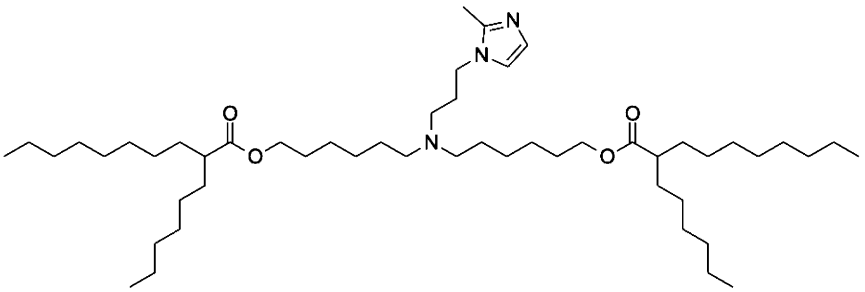
【表１０ａ－３】

| | |
|---|---|
| 11 |  |
| 12 |  |
| 13 |  |
| 14 |  |
| 15 |  |

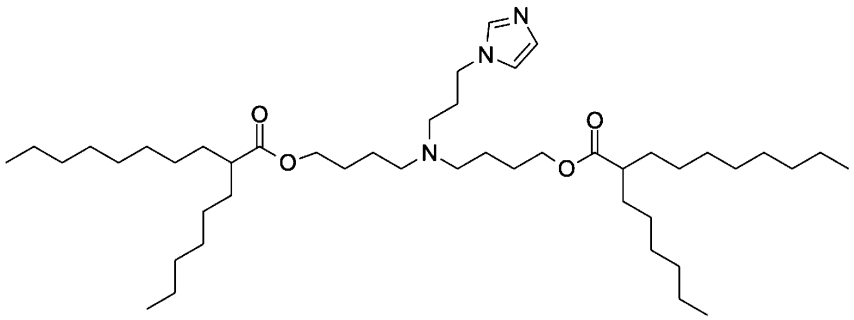
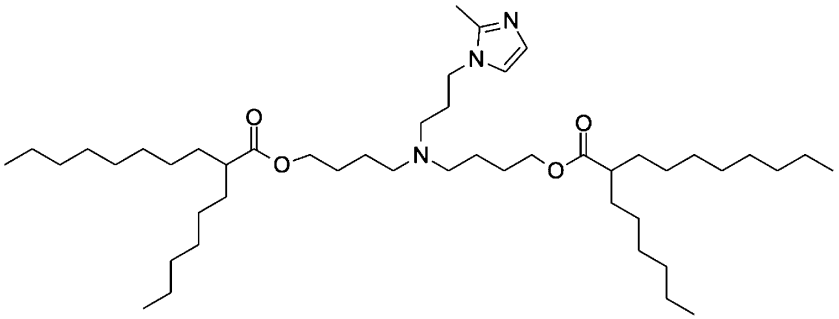
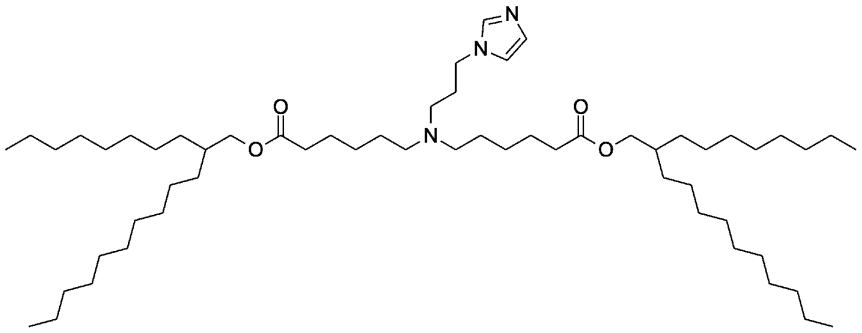
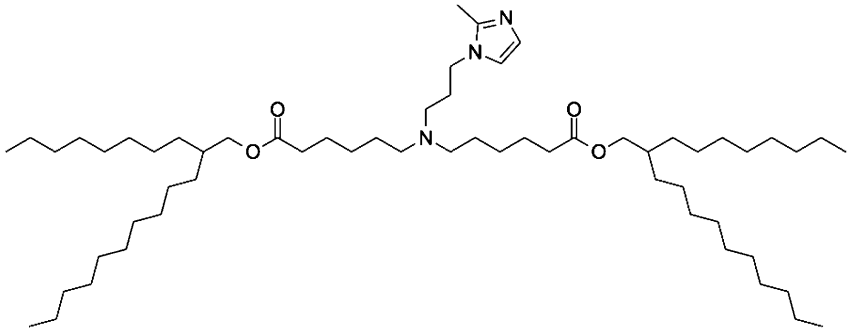
【表１０ａ－４】

| | |
|---|---|
| 16 |  |
| 17 |  |
| 18 |  |
| 19 |  |
| 20 |  |
| 21 |  |

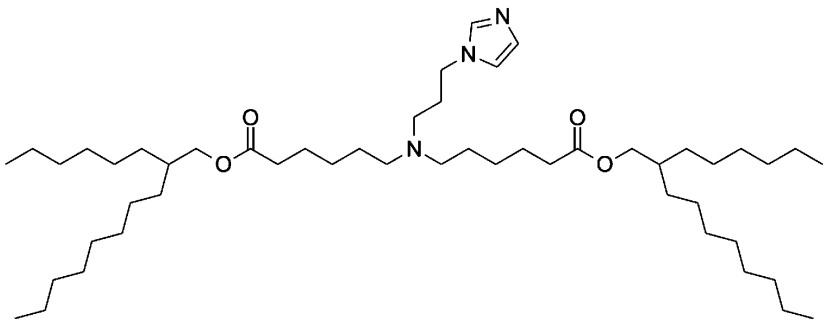
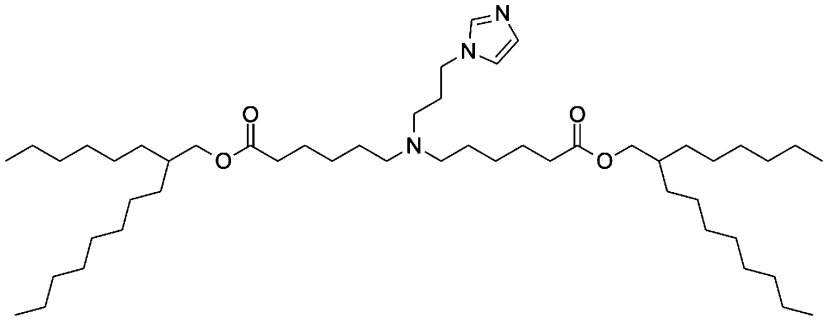
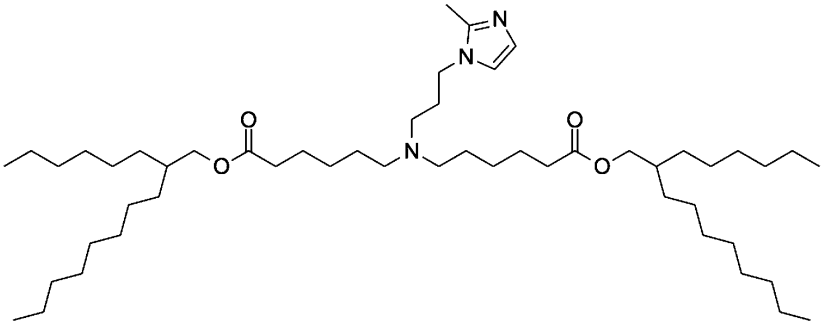
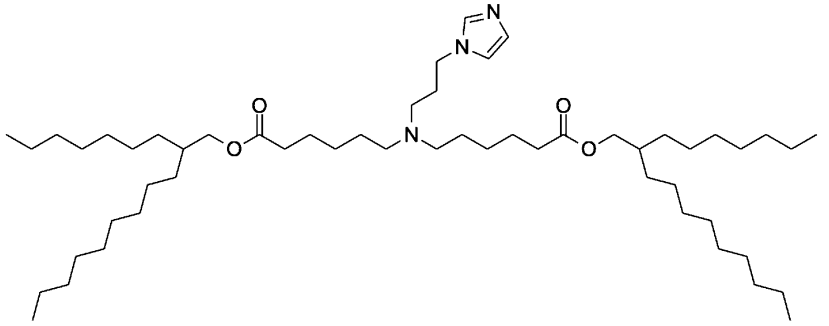
【表１０ａ－５】

| | |
|---|---|
| 22 |  |
| 23 |  |
| 24 |  |
| 25 |  |
| 26 |  |
| 27 |  |

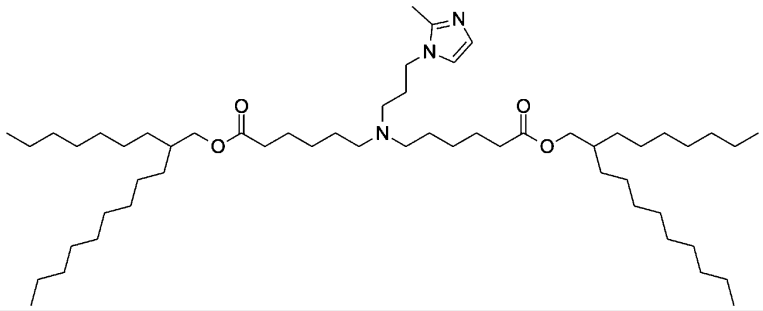
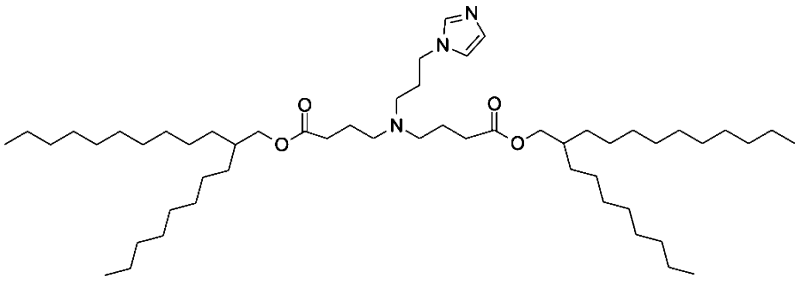
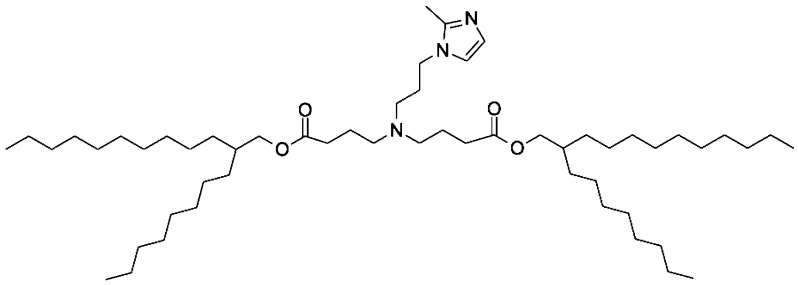
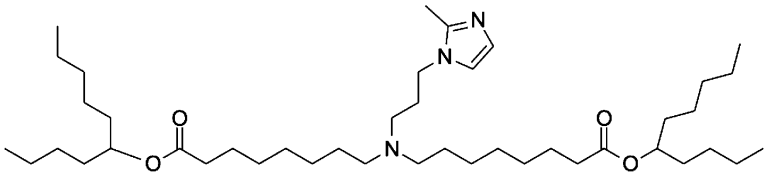
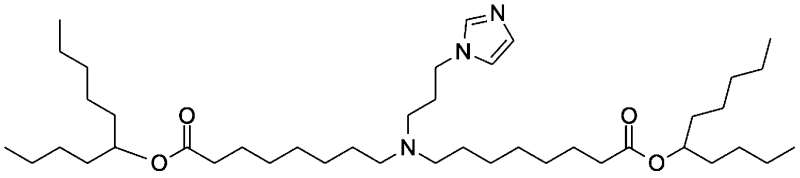
【表１０ａ－６】

| | |
|---|---|
| 28 |  |
| 29 |  |
| 30 |  |
| 31 |  |

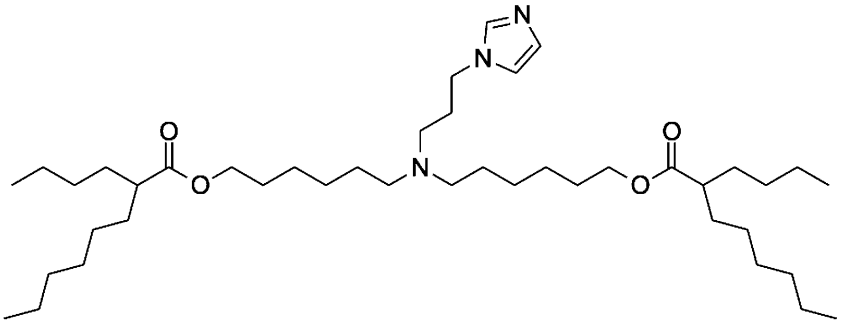
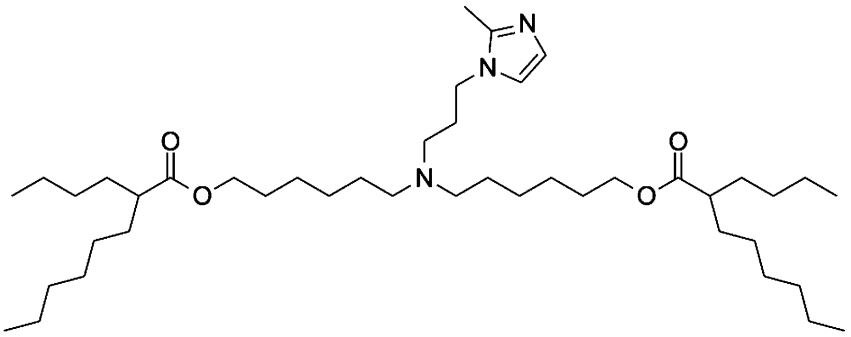
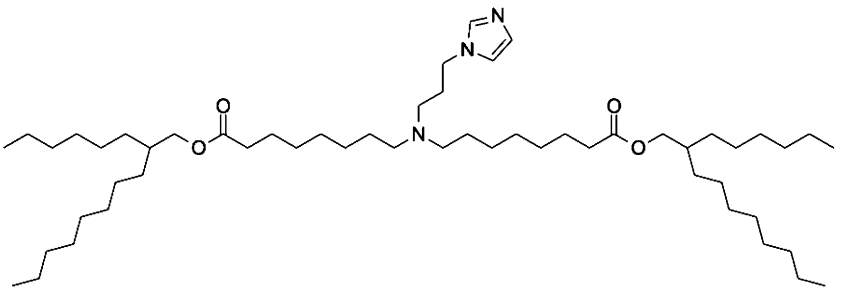
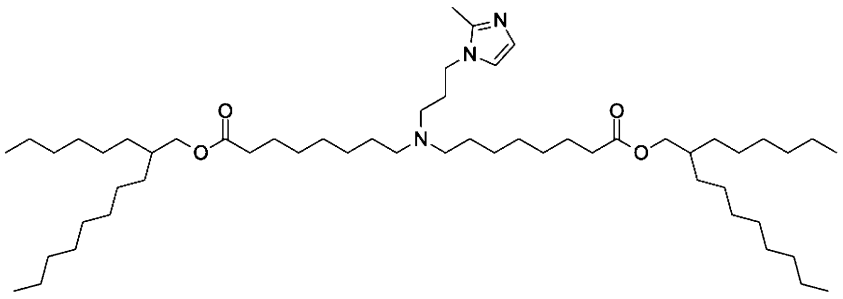
【表１０ａ－７】

| | |
|---|---|
| 32 |  |
| 33 |  |
| 34 |  |
| 35 |  |

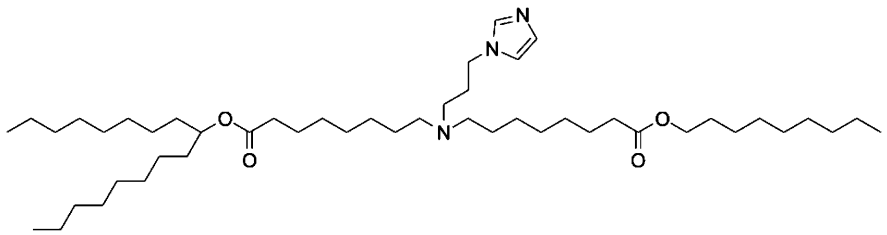
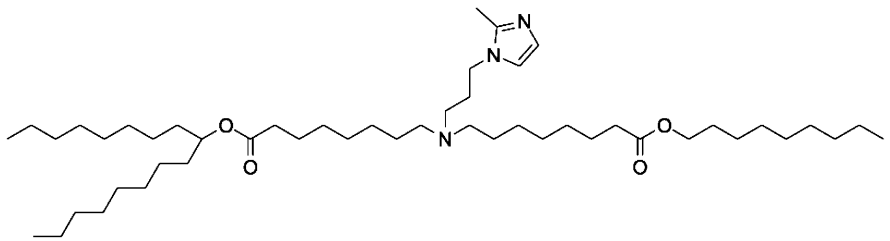
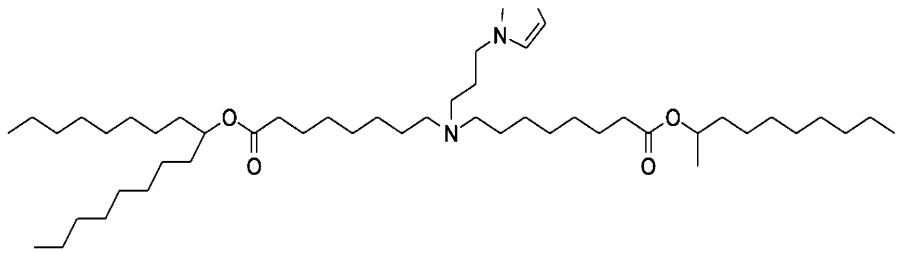
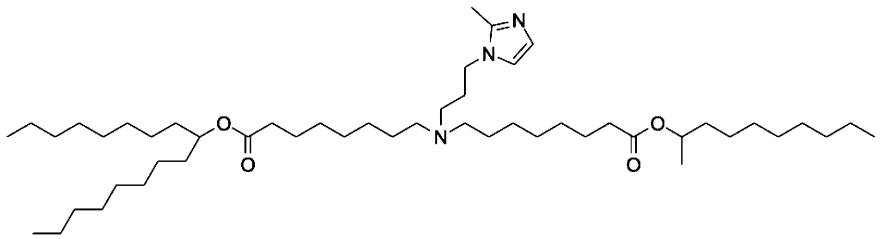
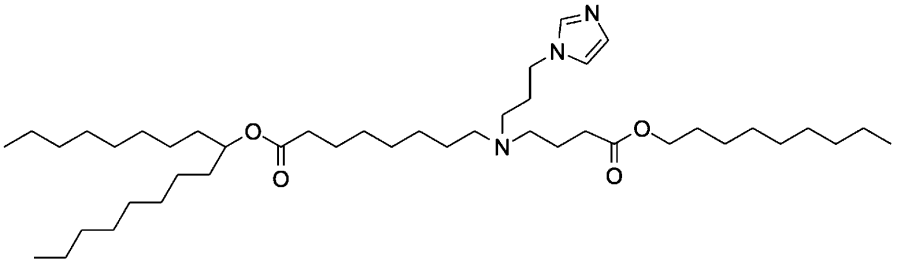
【表１０ａ－８】

| | |
|---|---|
| 36 |  |
| 37 |  |
| 38 |  |
| 39 |  |
| 40 |  |

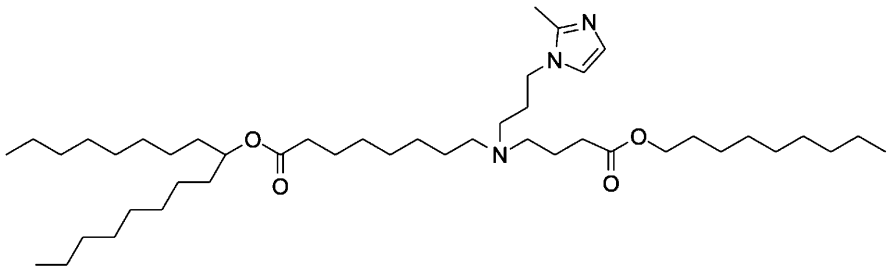
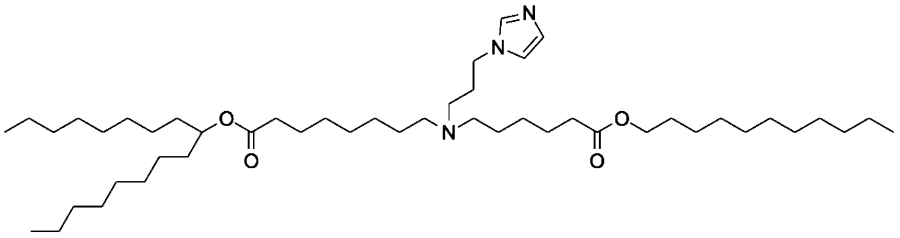
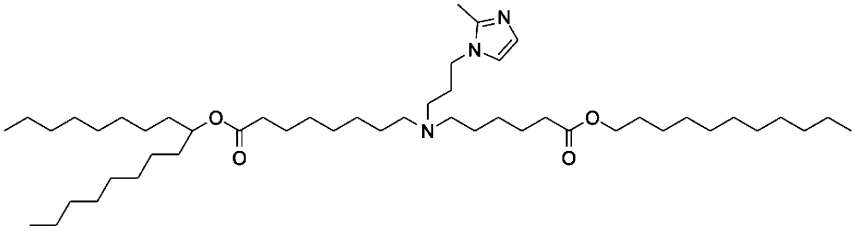
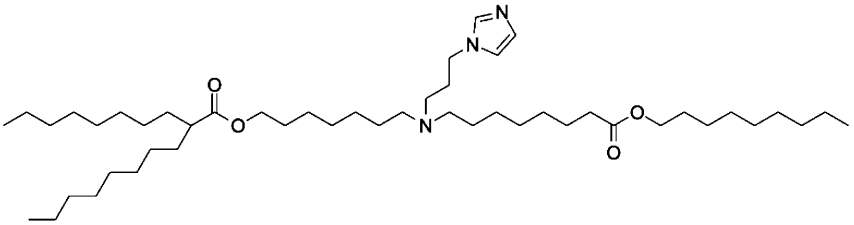
【表１０ａ－９】

| | |
|---|---|
| 41 |  |
| 42 |  |
| 43 |  |
| 44 |  |

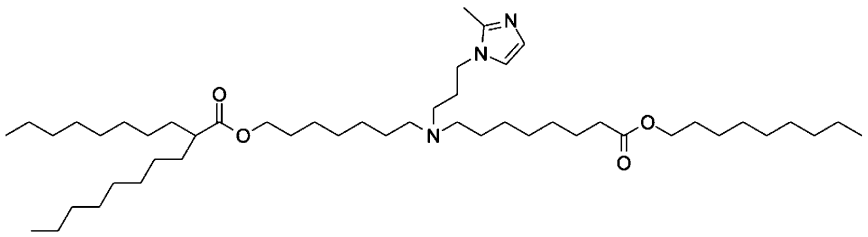
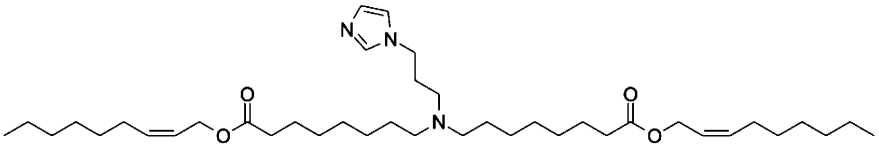
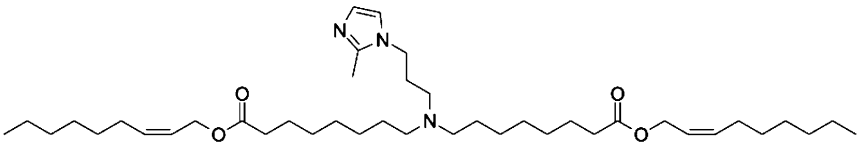
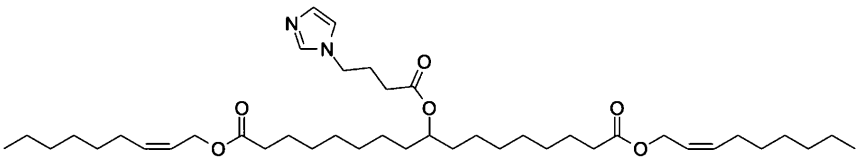
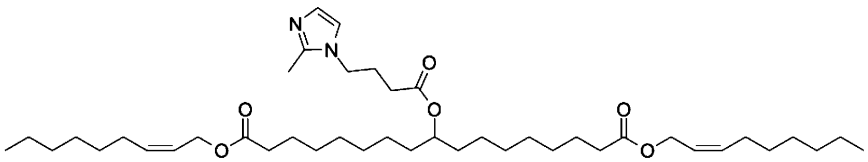
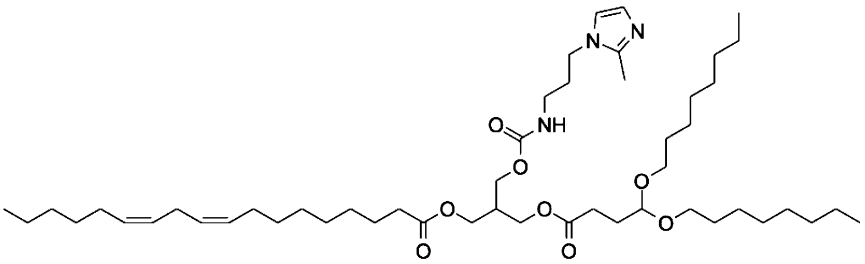
【表１０ａ－１０】

| | |
|---|---|
| 45 |  |
| 46 |  |
| 47 |  |
| 48 |  |
| 49 |  |

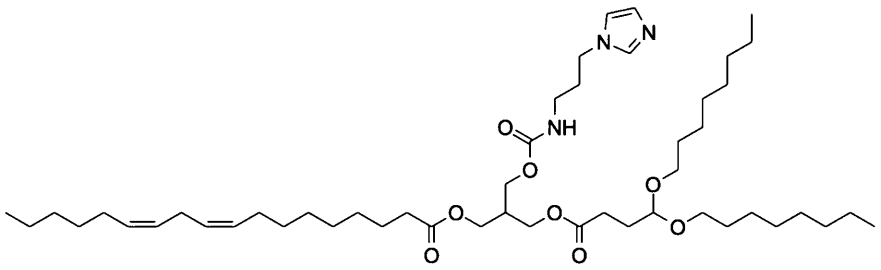
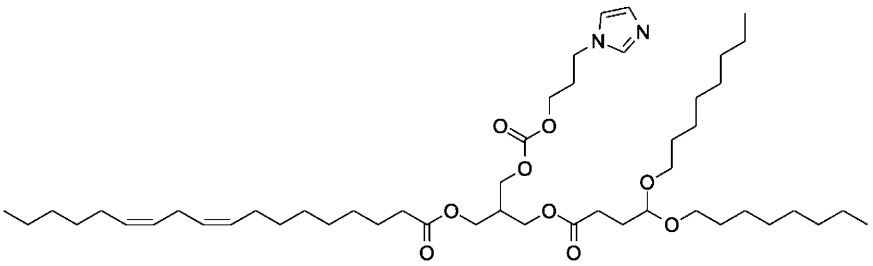
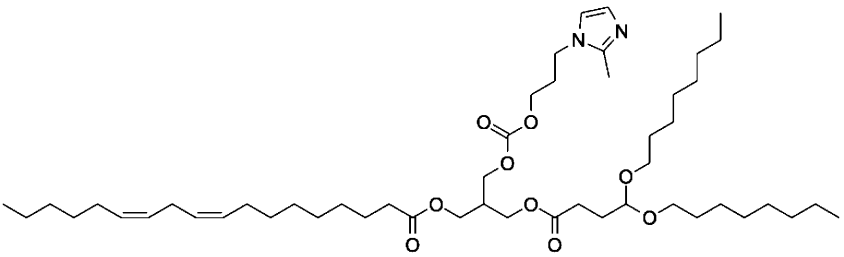
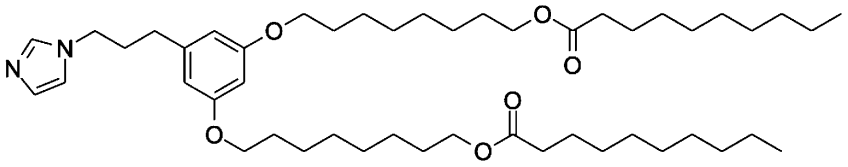
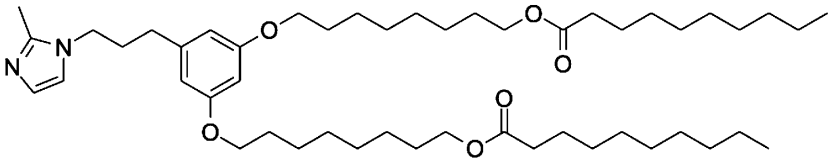
【表１０ａ－１１】

| | |
|---|---|
| 50 |  |
| 51 |  |
| 52 |  |
| 53 |  |

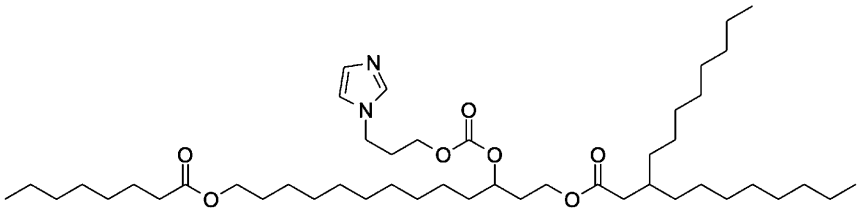
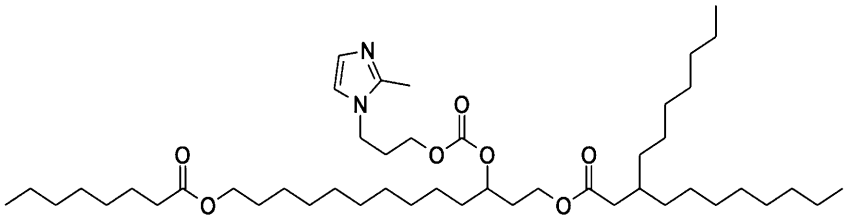
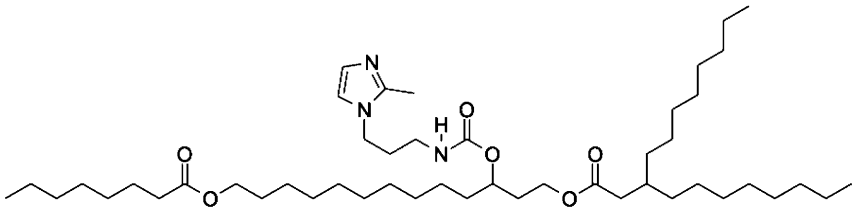
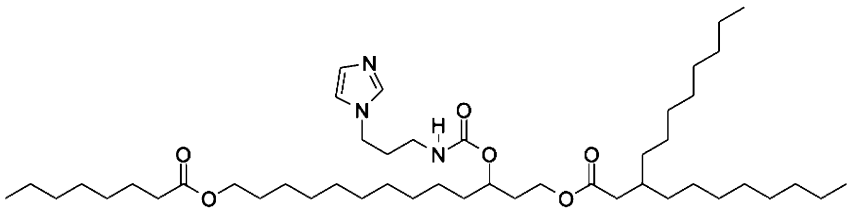
【表１０ａ－１２】

| | |
|---|---|
| 54 |  |
| 55 |  |
| 56 |  |
| 57 |  |
| 58 |  |
| 59 |  |

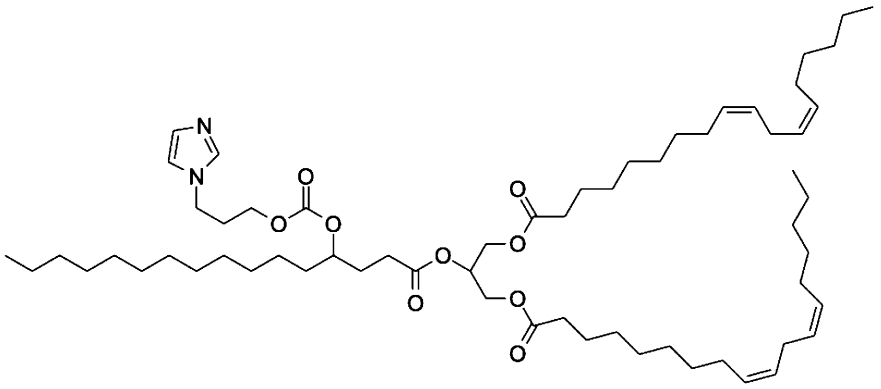
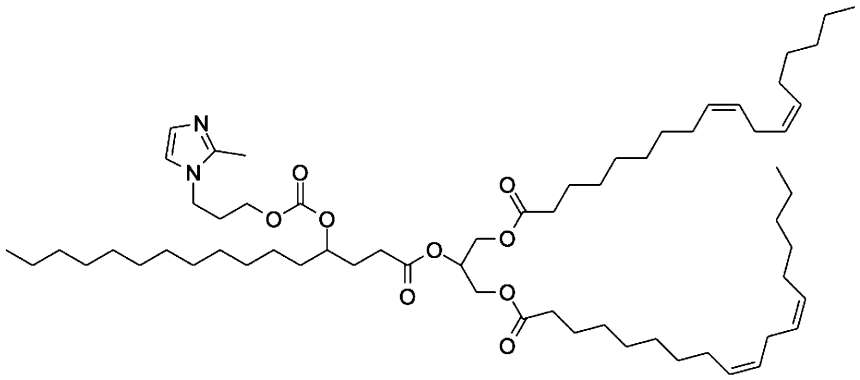
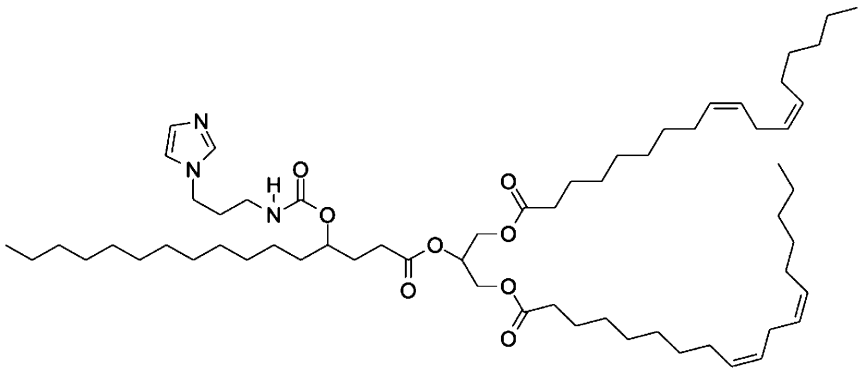
【表１０ａ－１３】

| | |
|---|---|
| 60 |  |
| 61 |  |
| 62 |  |
| 63 |  |
| 64 |  |

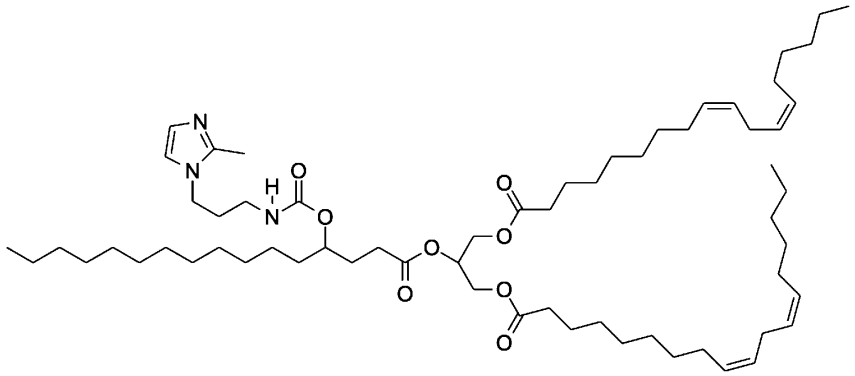
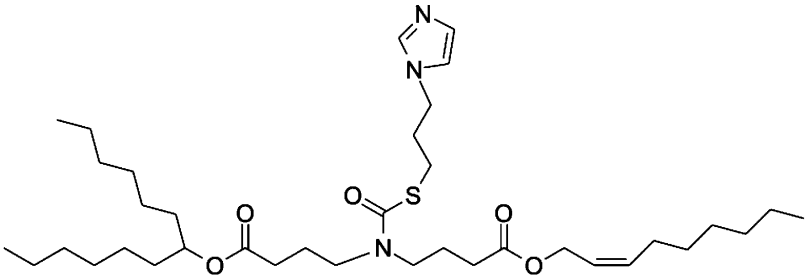
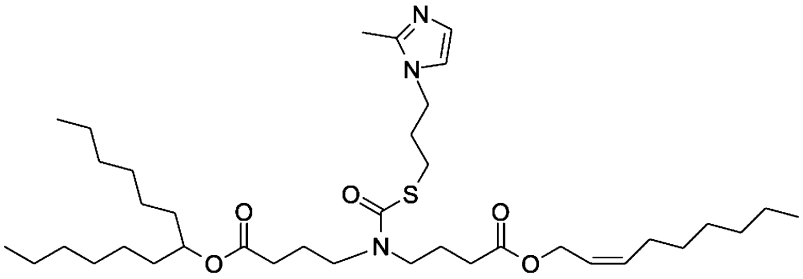
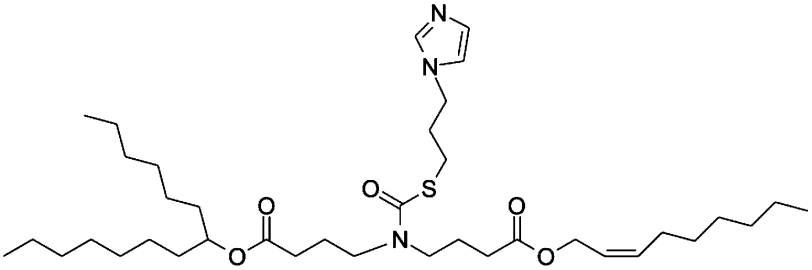
【表１０ａ－１４】

| | |
|---|---|
| 65 |  |
| 66 |  |
| 67 |  |
| 68 |  |

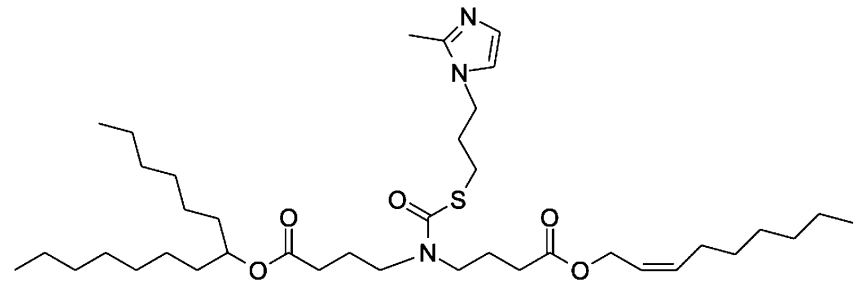
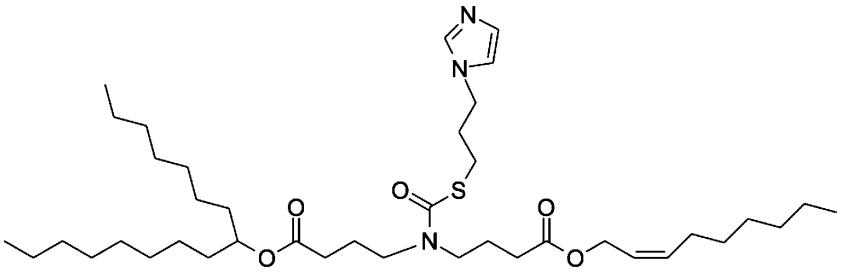
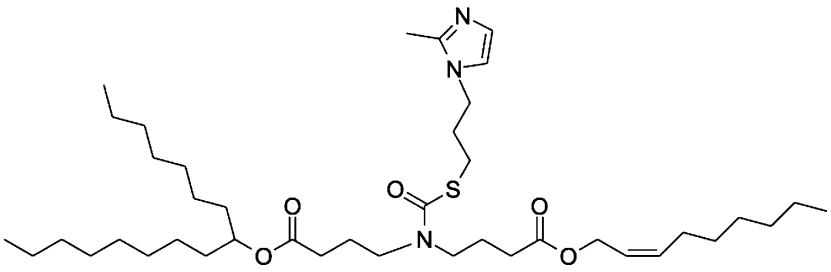
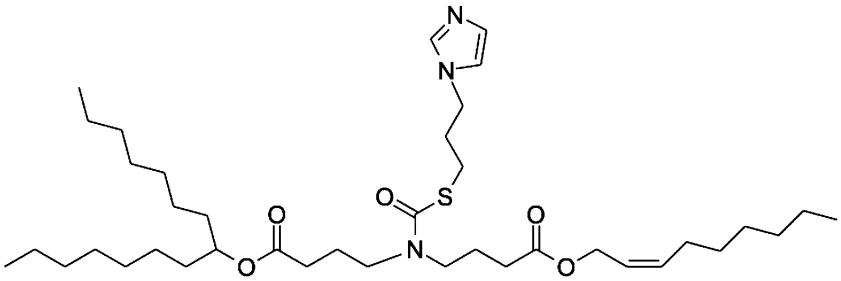
【表１０ａ－１５】

| | |
|---|---|
| 69 |  |
| 70 |  |
| 71 |  |

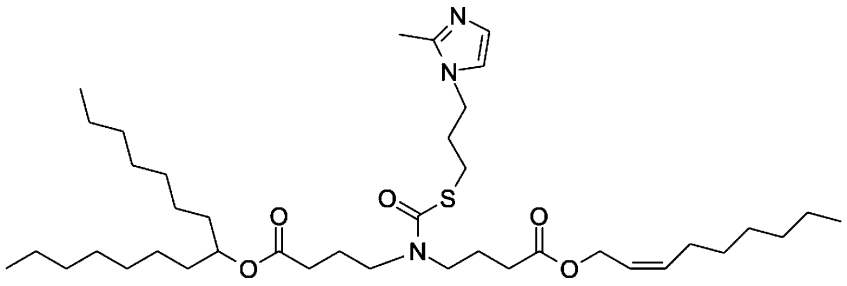
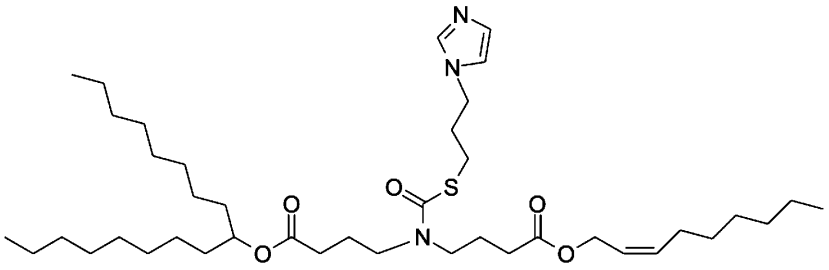
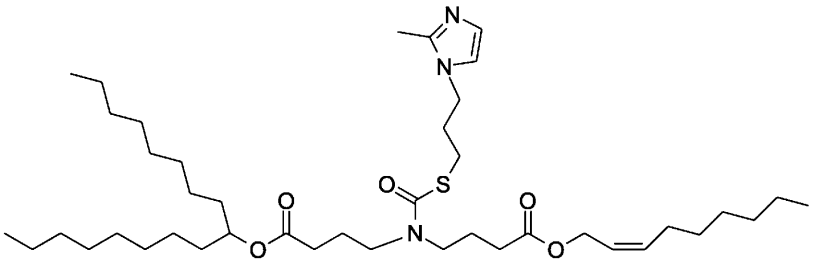
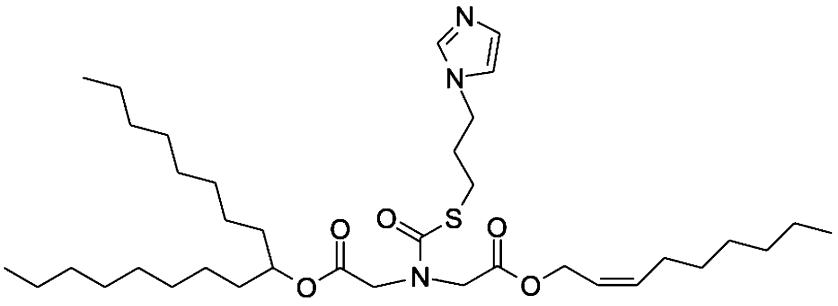
【表１０ａ－１６】

| | |
|---|---|
| 72 |  |
| 73 |  |
| 74 |  |
| 75 |  |

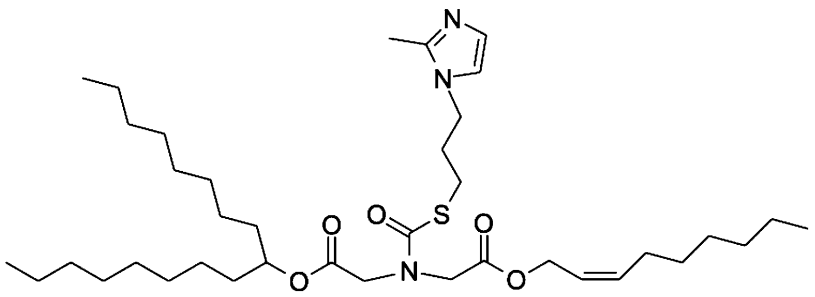
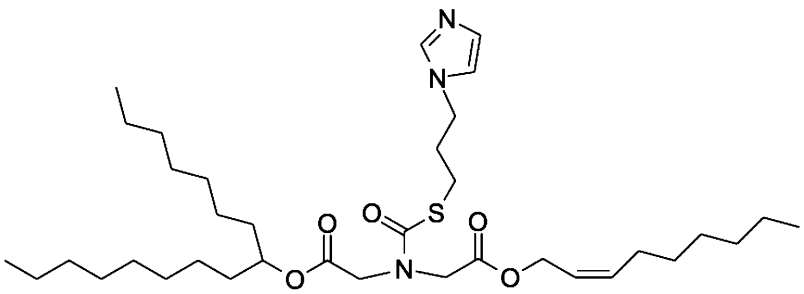
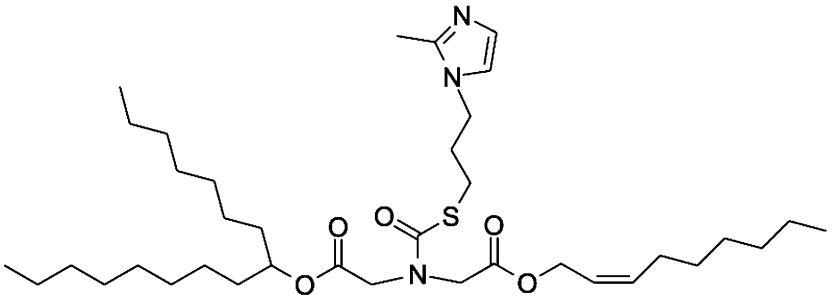
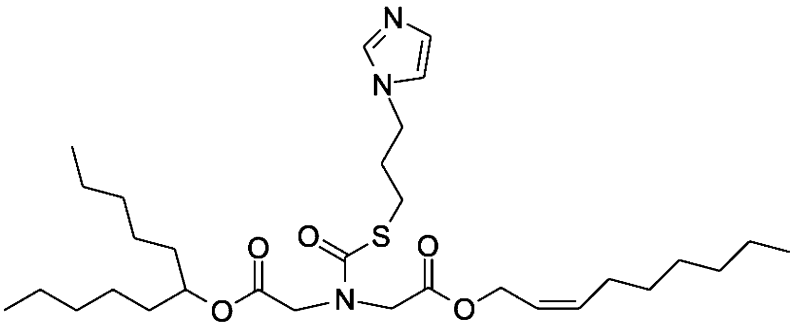
【表１０ａ－１７】

| | |
|---|---|
| 76 |  |
| 77 |  |
| 78 |  |
| 79 |  |

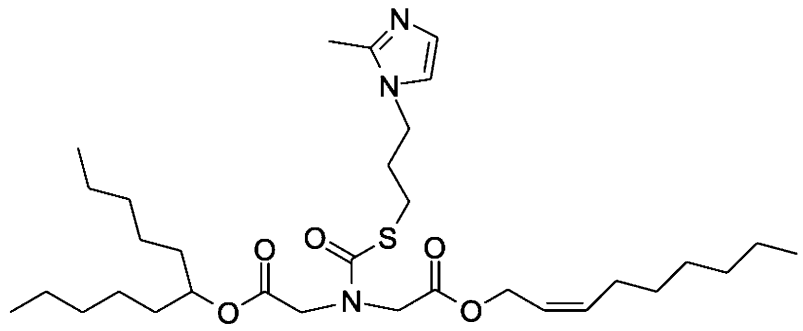
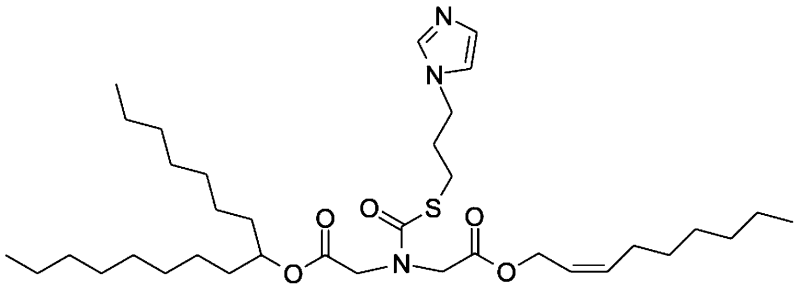
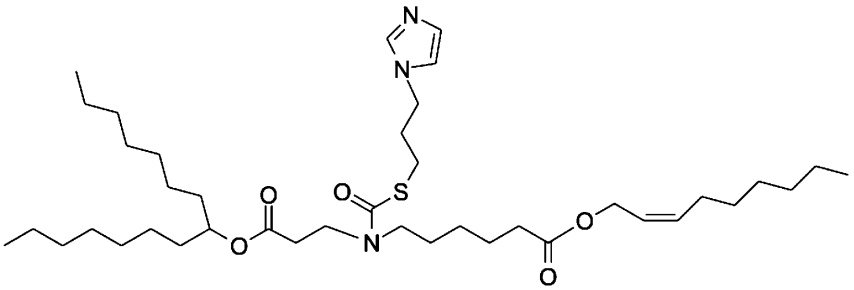
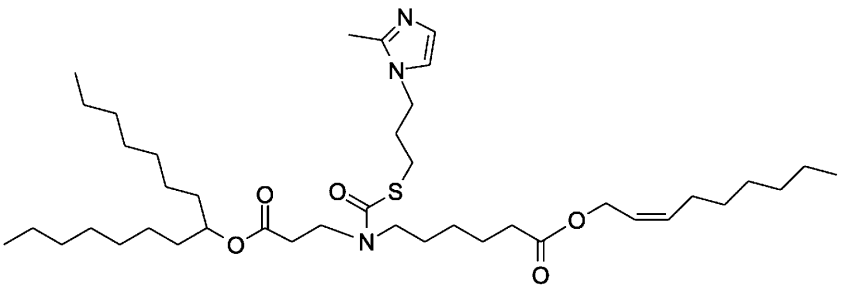
【表１０ａ－１８】

| | |
|---|---|
| 80 |  |
| 81 |  |
| 82 |  |
| 83 |  |

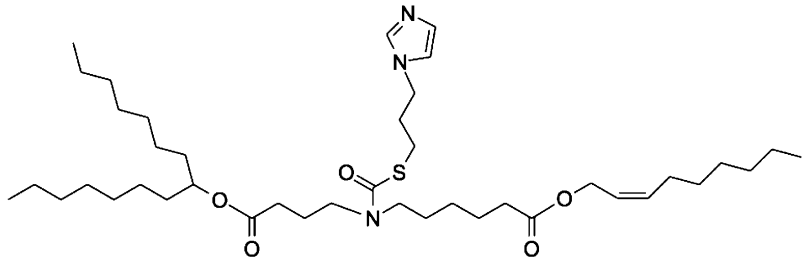
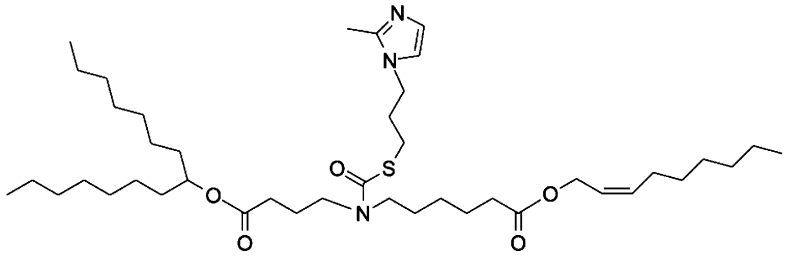
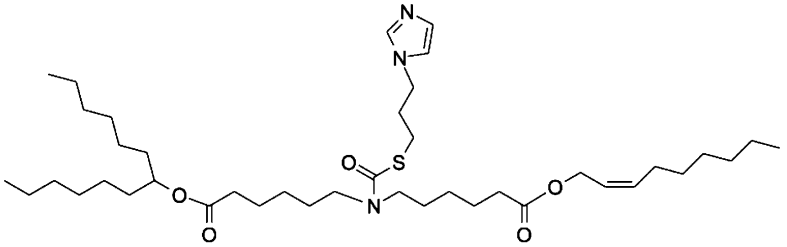
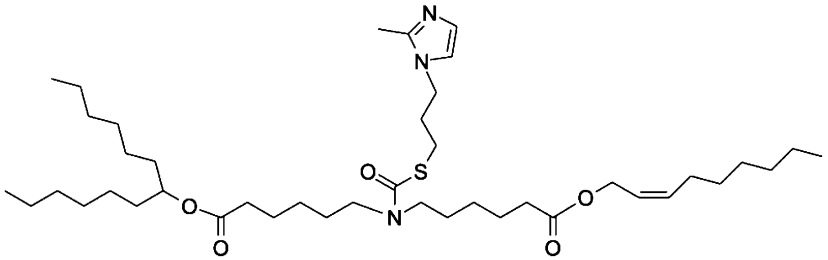
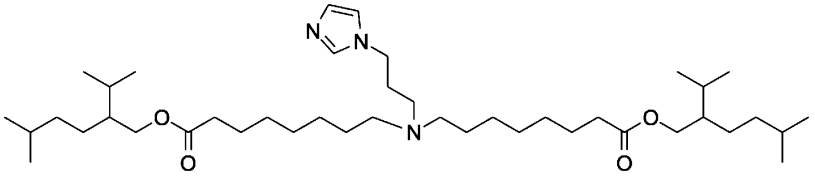
【表１０ａ－１９】

| | |
|---|---|
| 84 |  |
| 85 |  |
| 86 |  |
| 87 |  |

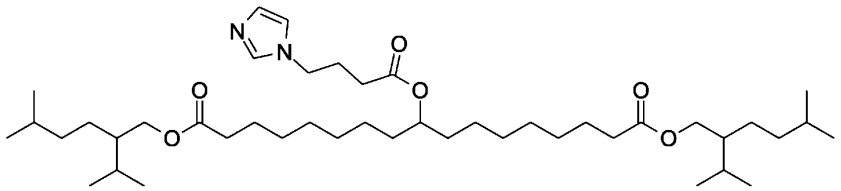
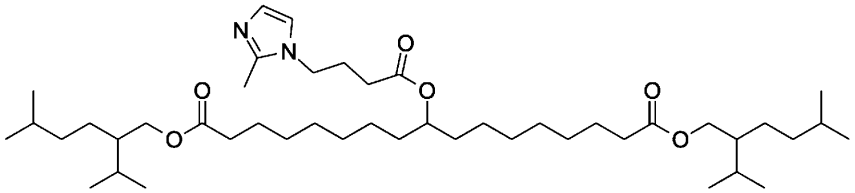
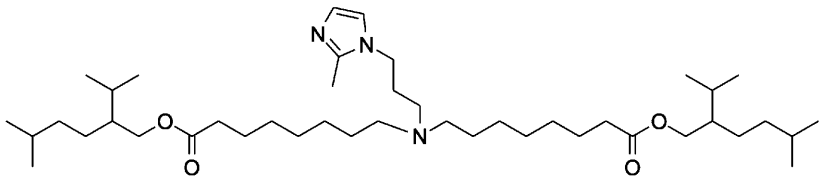
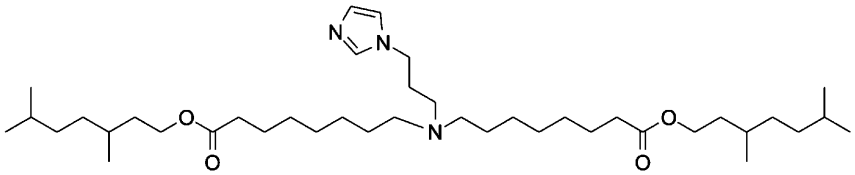
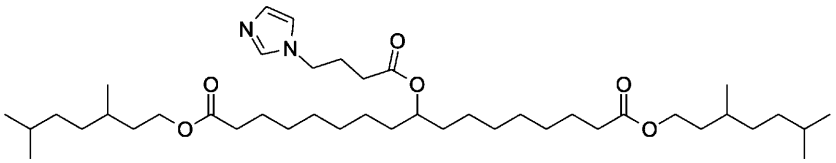
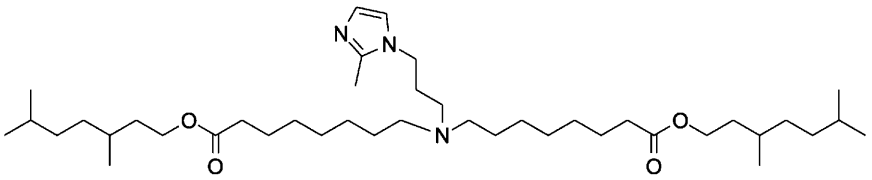
【表１０ａ－２０】

| | |
|---|---|
| 88 |  |
| 89 |  |
| 90 |  |
| 91 |  |

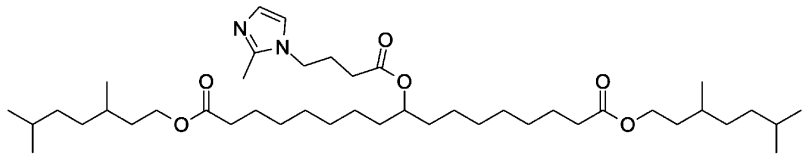
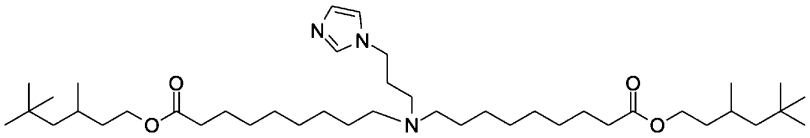
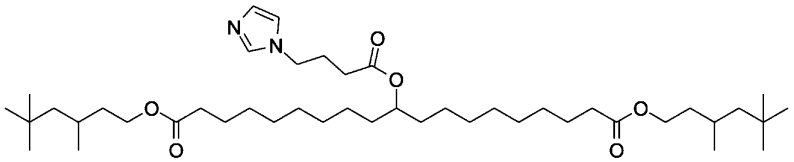
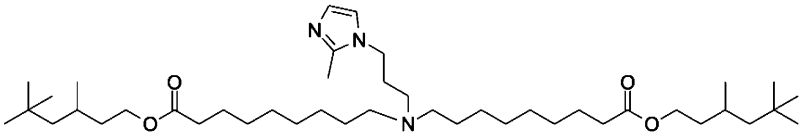
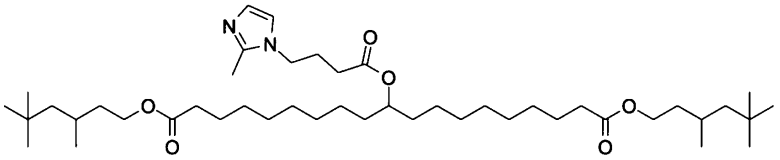
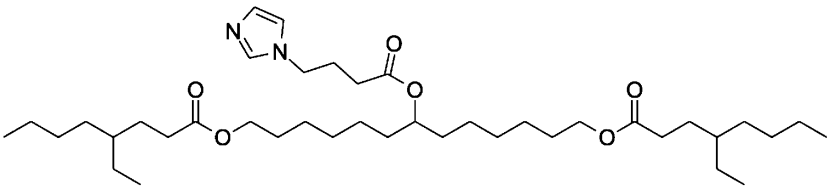
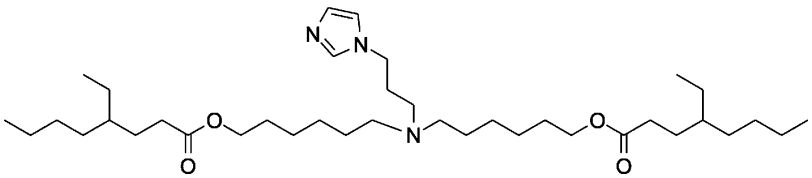
【表１０ａ－２１】

| | |
|---|---|
| 92 |  |
| 93 |  |
| 94 |  |
| 95 |  |
| 96 |  |

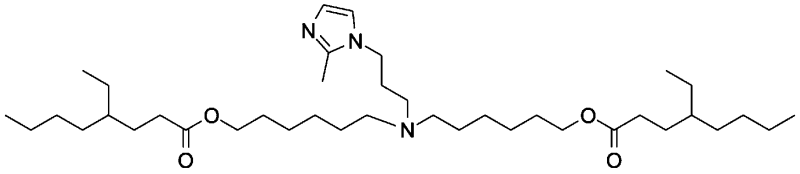
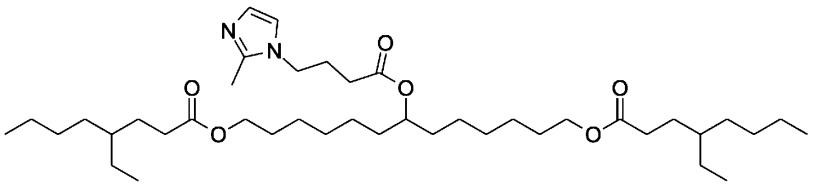
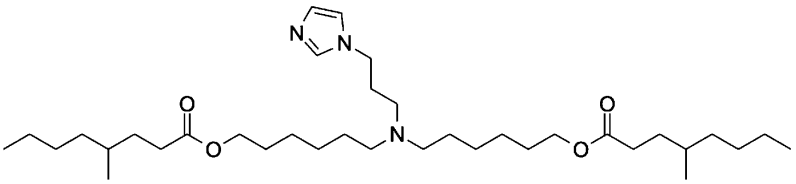
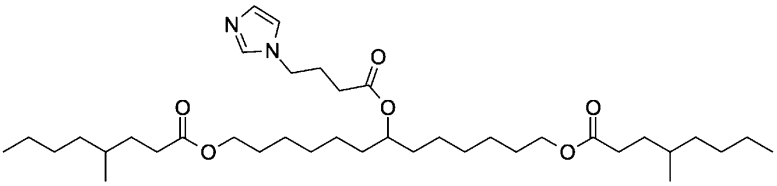
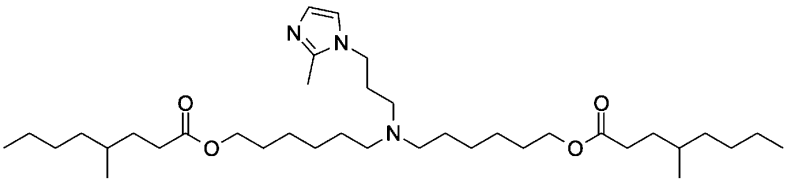
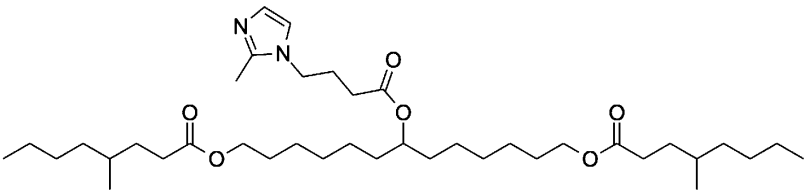
【表１０ａ－２２】

| | |
|---|---|
| 97 |  |
| 98 |  |
| 99 |  |
| 100 |  |
| 101 |  |
| 102 |  |

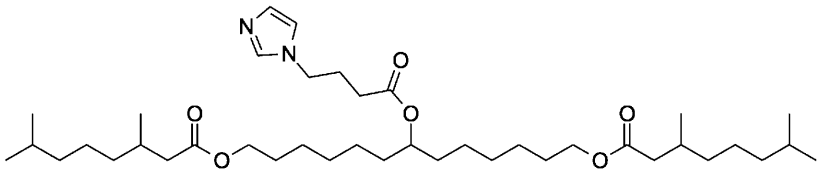
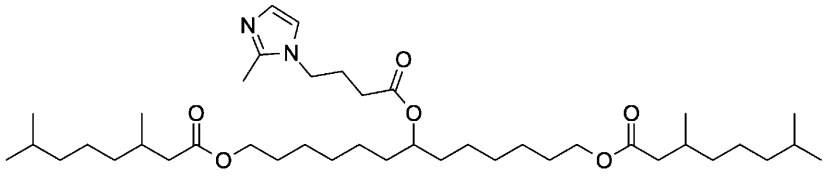
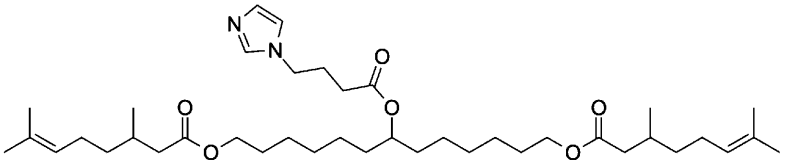
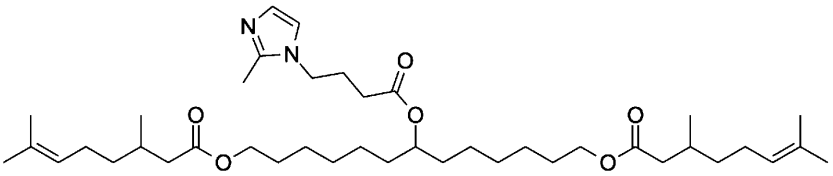
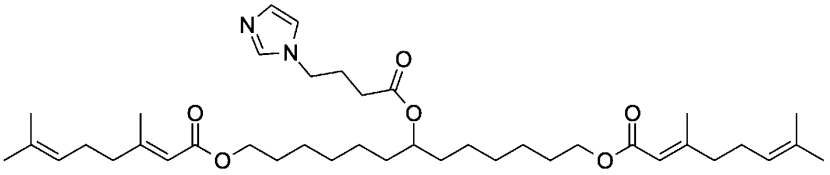
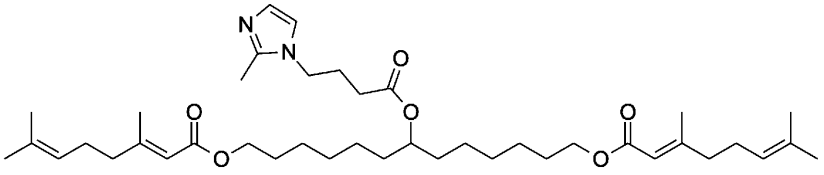
【表１０ａ－２３】

| | |
|---|---|
| 103 |  |
| 104 |  |
| 105 |  |
| 106 |  |
| 107 |  |
| 108 |  |
| 109 |  |

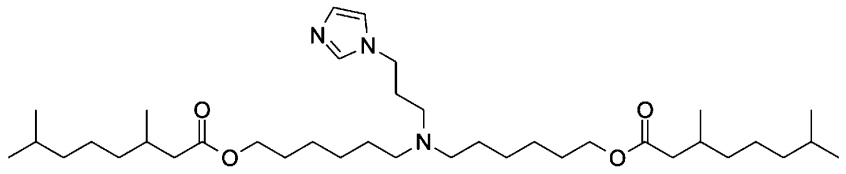
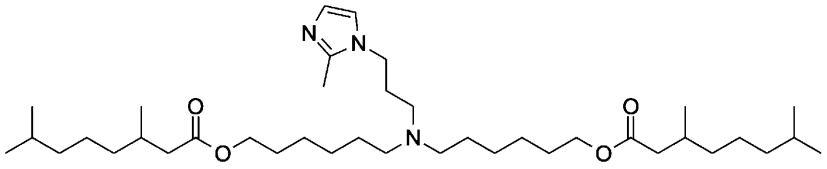
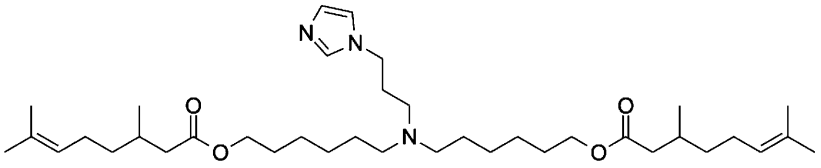
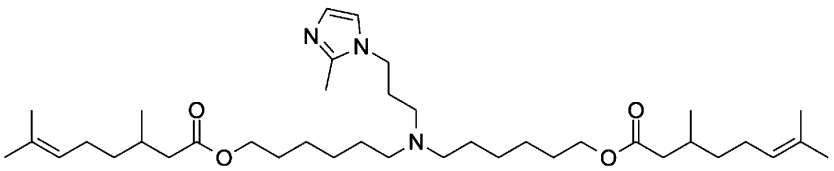
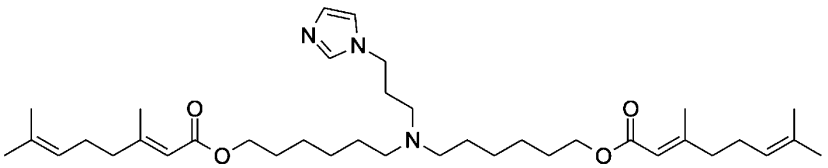
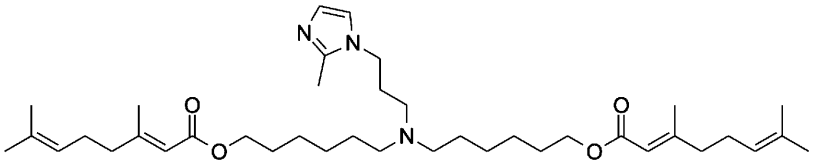
【表１０ａ－２４】

| | |
|---|---|
| 110 |  |
| 111 |  |
| 112 |  |
| 113 |  |
| 114 |  |
| 115 |  |

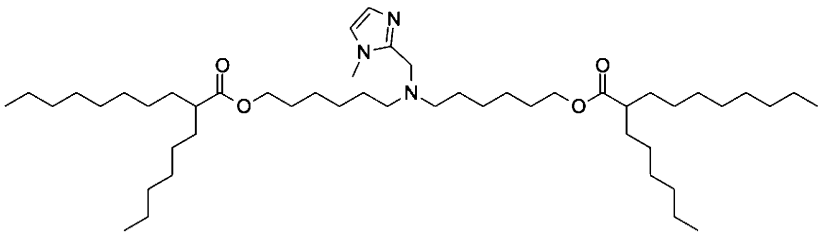
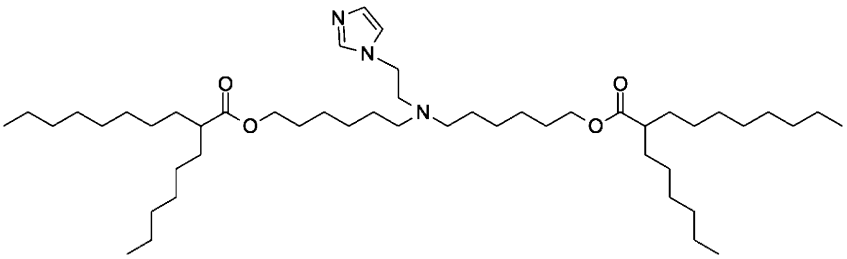
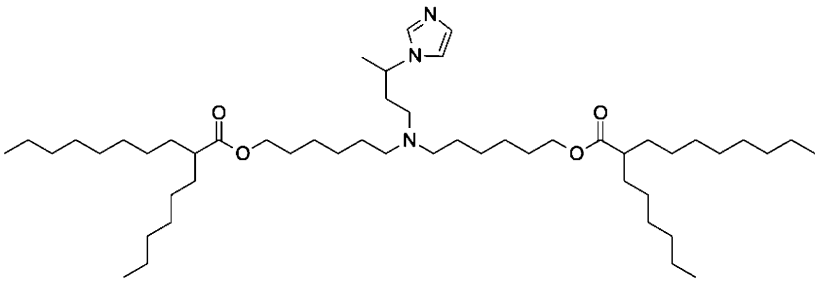
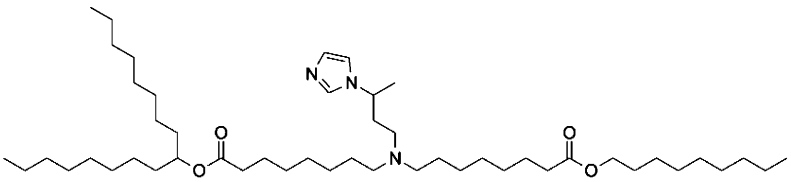
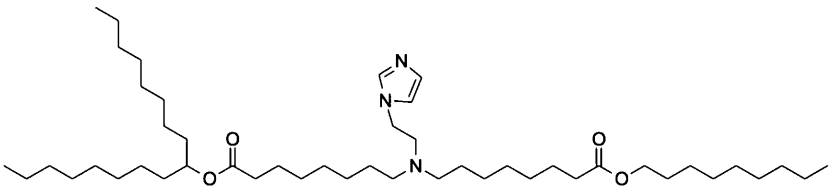
【表１０ａ－２５】

| | |
|---|---|
| 116 |  |
| 117 |  |
| 118 |  |
| 119 |  |
| 120 |  |
| 121 |  |

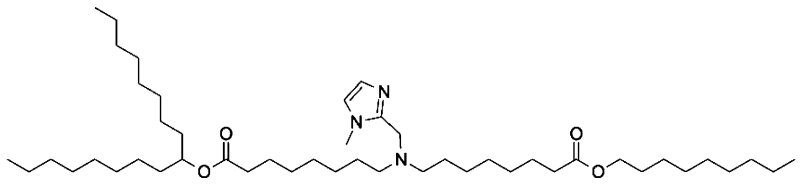
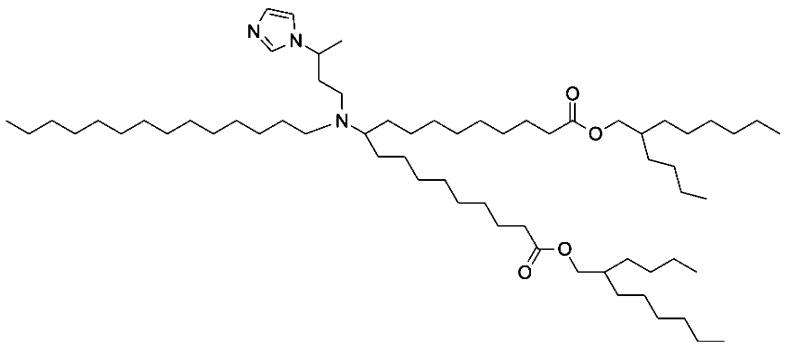
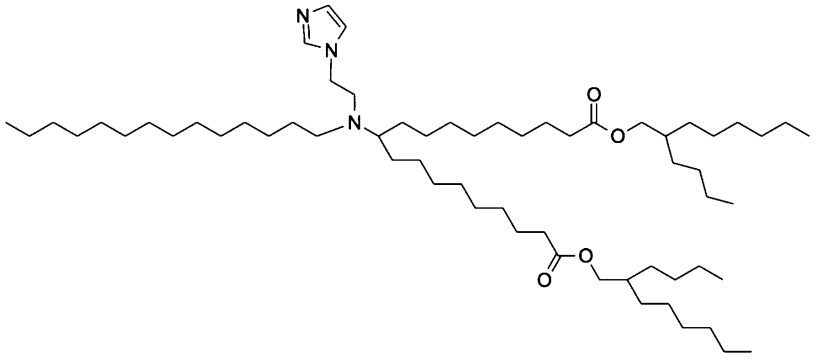
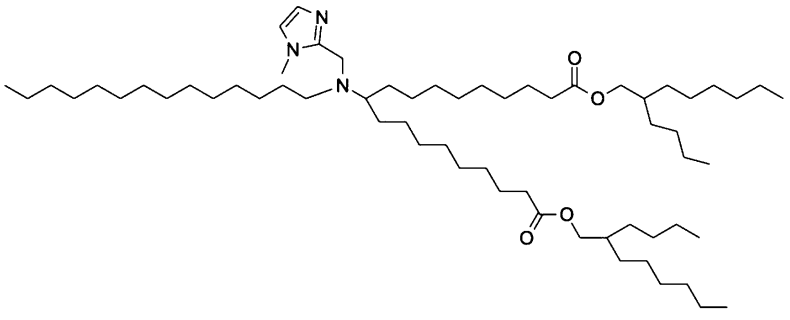
【表１０ａ－２６】

| | |
|---|---|
| 122 |  |
| 123 |  |
| 124 |  |
| 125 |  |
| 126 |  |
| 127 |  |

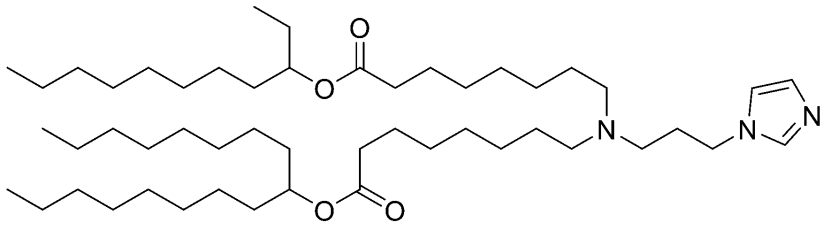
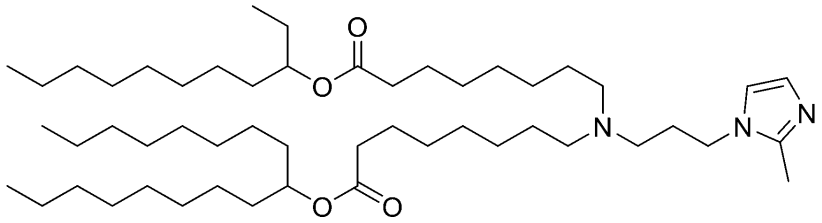
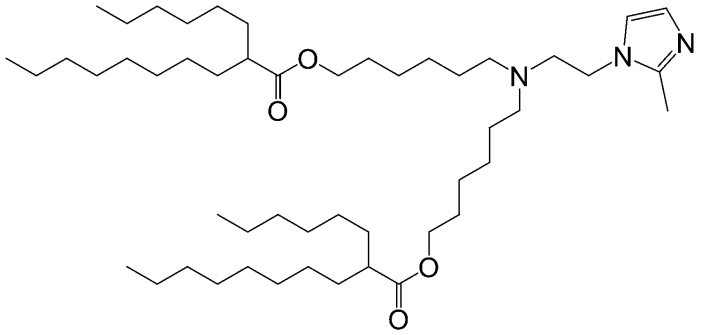
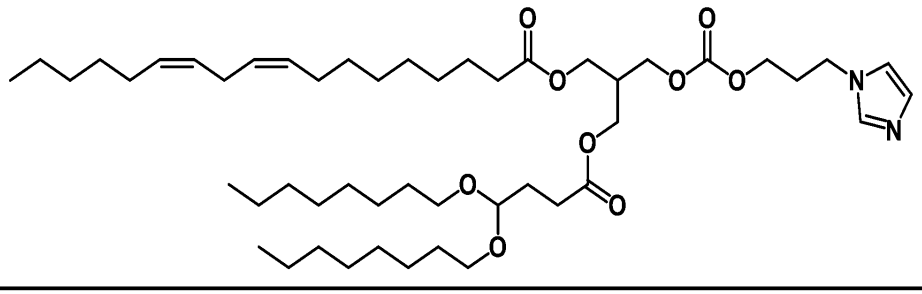
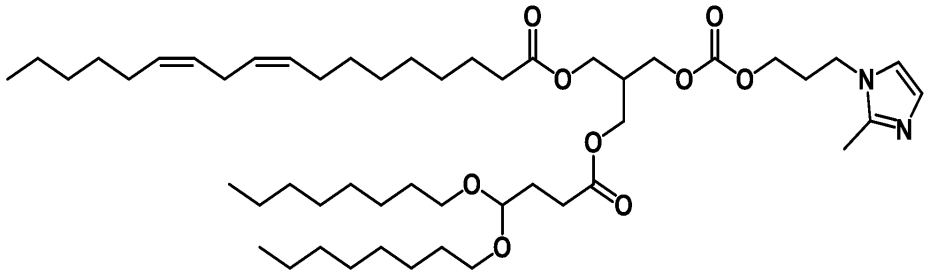
【表１０ａ－２７】

| | |
|---|---|
| 128 |  |
| 129 |  |
| 130 |  |
| 131 |  |
| 132 |  |

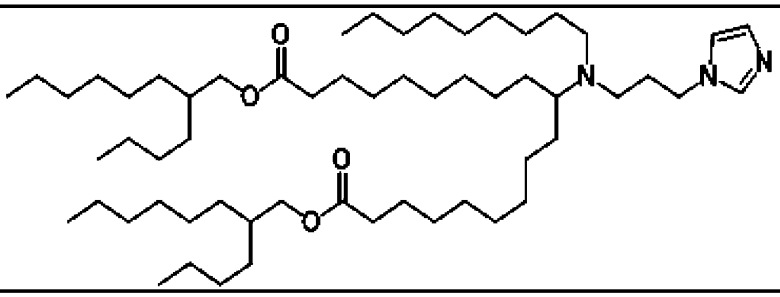
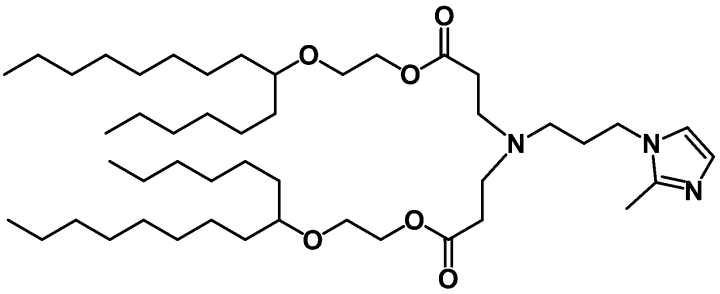
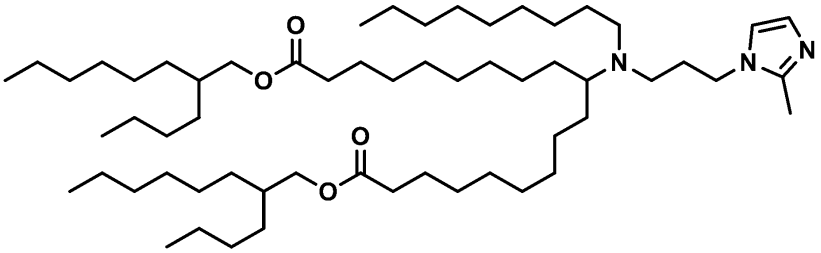
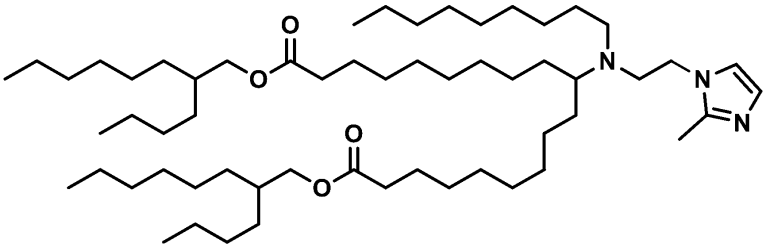
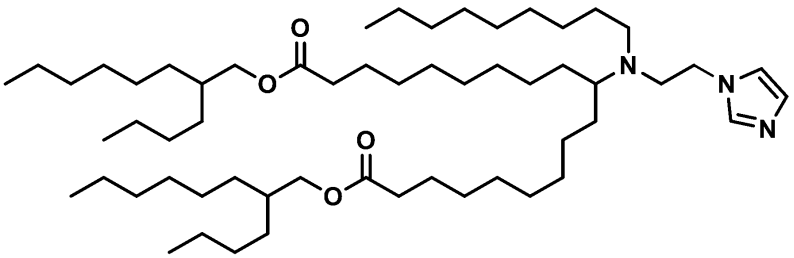
【表１０ａ－２８】

| | |
|---|---|
| 133 |  |
| 134 |  |
| 135 |  |
| 136 |  |

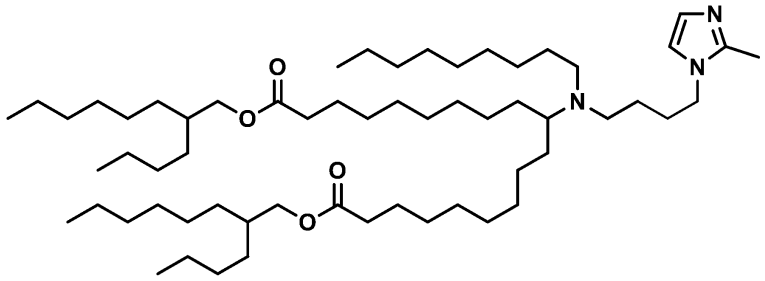
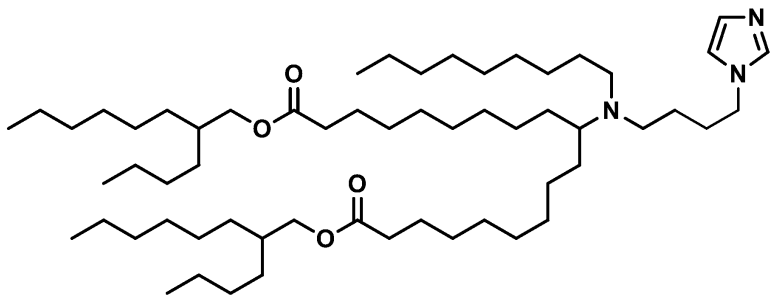
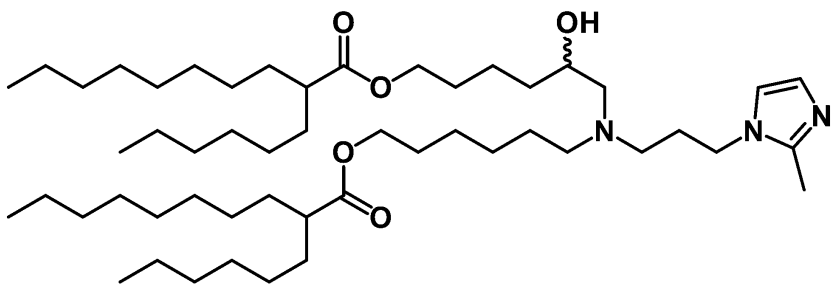
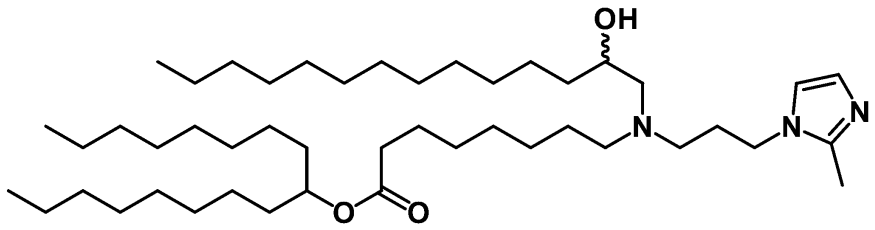
【表１０ａ－２９】

| | |
|---|---|
| 137 |  |
| 138 |  |
| 139 |  |
| 140 |  |
| 141 |  |

【表１０ａ－３０】

| | |
|---|---|
| 142 |  |
| 143 |  |
| 144 |  |
| 145 |  |
| 146 |  |

【表１０ａ－３１】

| | |
|---|---|
| 147 |  |
| 148 |  |
| 149 |  |
| 150 |  |
| 151 | |

【０６０７】

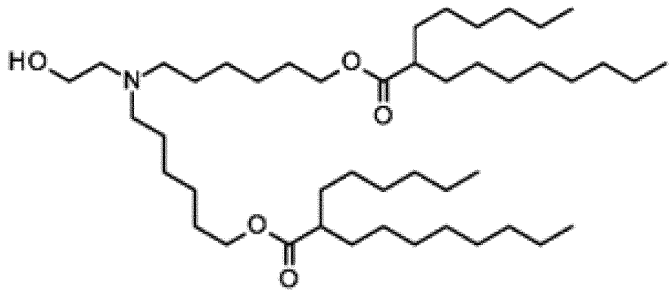
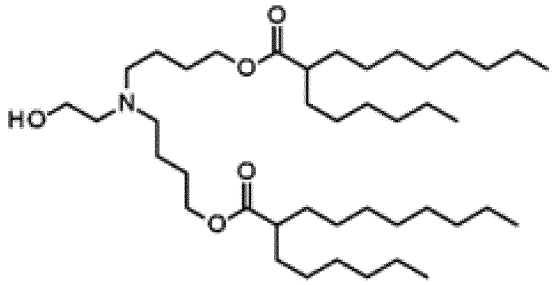
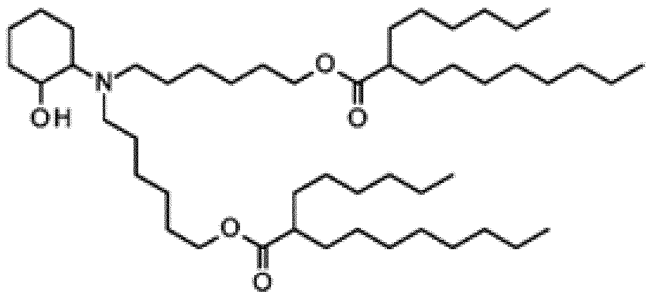
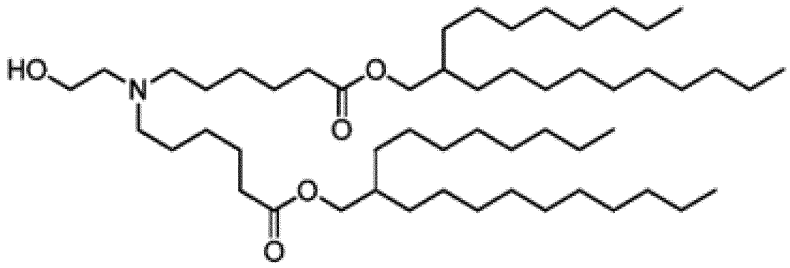
いくつかの実施形態では、イオン化可能脂質は、ベータ－ヒドロキシルアミン頭部基を有する。いくつかの実施形態では、イオン化可能脂質は、ガンマ－ヒドロキシルアミン頭部基を有する。

【０６０８】

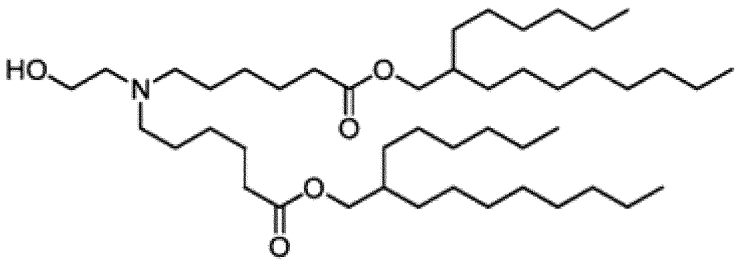
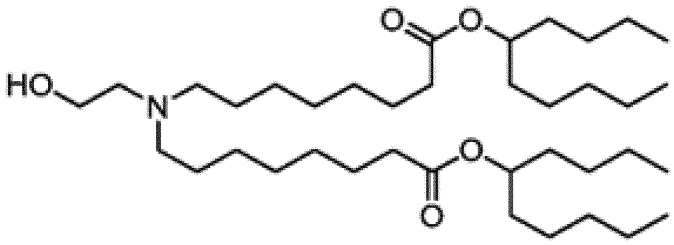
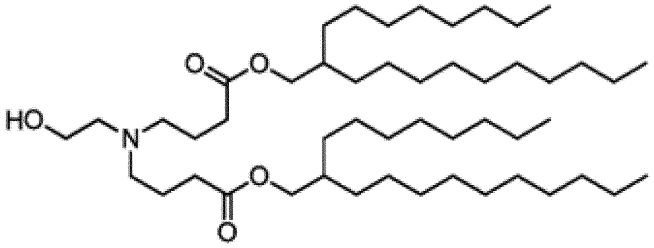
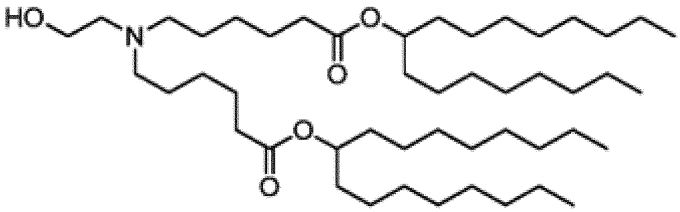
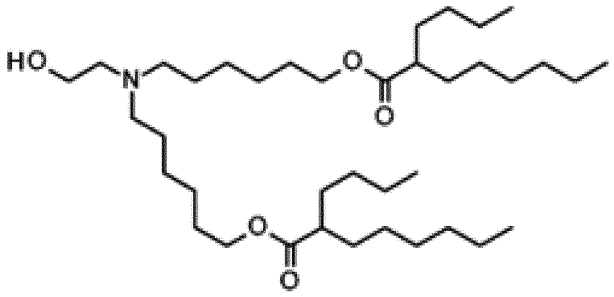
いくつかの実施形態では、本開示のイオン化可能脂質は、表１０ｂから選択される脂質である。いくつかの実施形態では、本開示のイオン化可能脂質は、表１０ｂからの脂質１５である。ある実施形態では、イオン化可能脂質は、米国特許公開第ＵＳ２０１７０２１０６９７Ａ１号に記載されている。ある実施形態では、イオン化可能脂質は、米国特許公

開第ＵＳ２０１７０１１９９０４Ａ１号に記載されている。
【表１０ｂ－１】

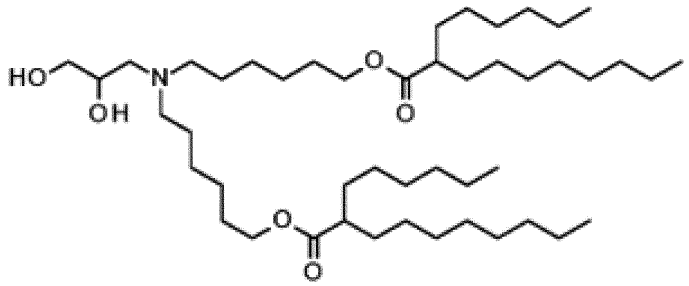
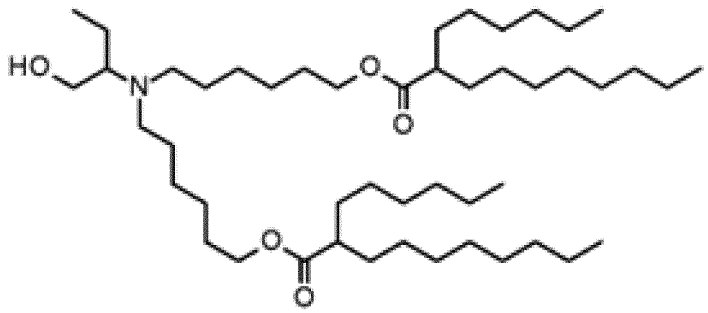
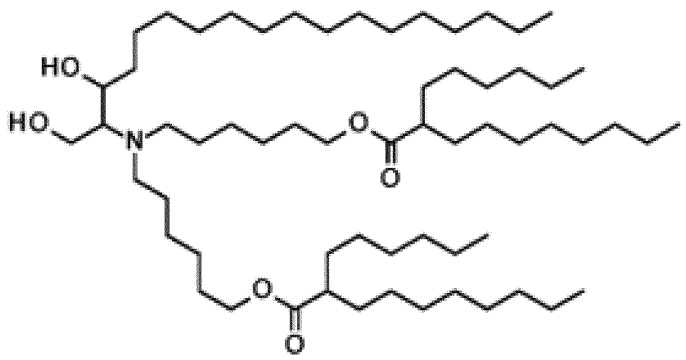
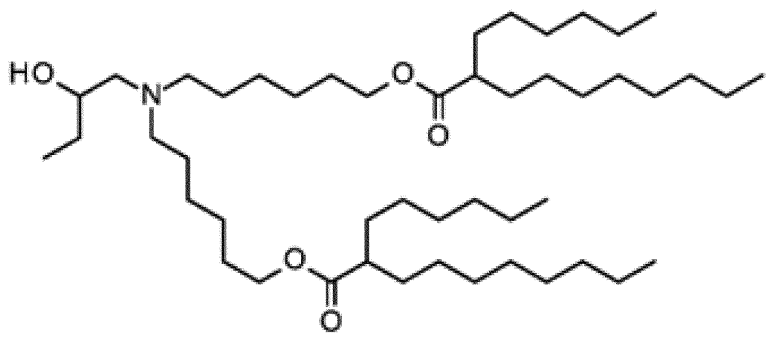
表１０ｂ

| イオン化可能脂質番号 | 構造 |
|---|---|
| 1 |  |
| 2 |  |
| 3 |  |
| 4 |  |

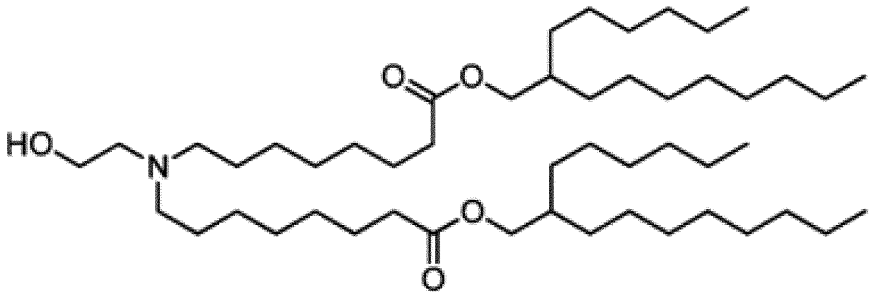
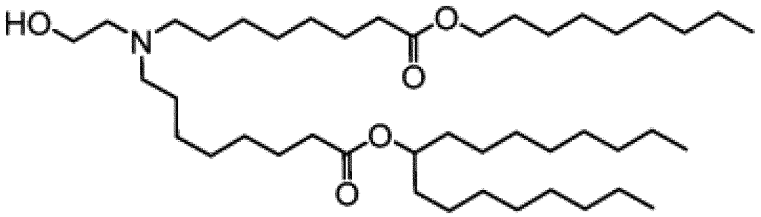
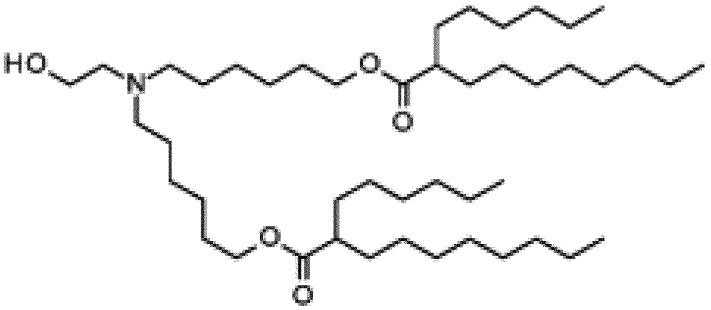
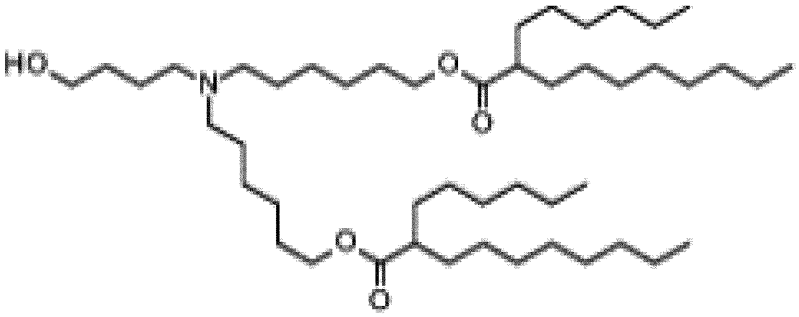
【表１０ｂ－２】

| | |
|---|---|
| 5 |  |
| 6 |  |
| 7 |  |
| 8 |  |
| 9 |  |

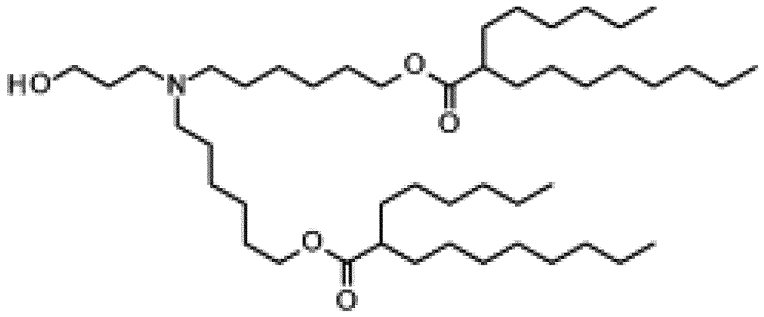
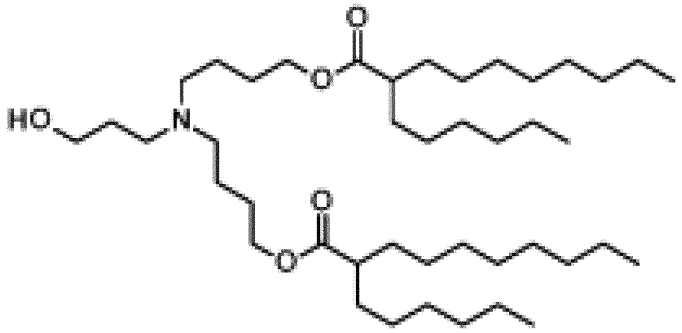
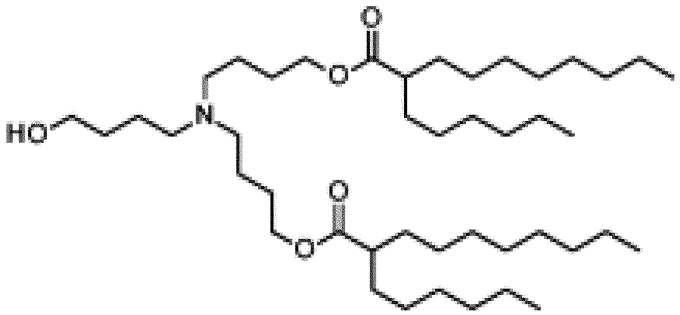
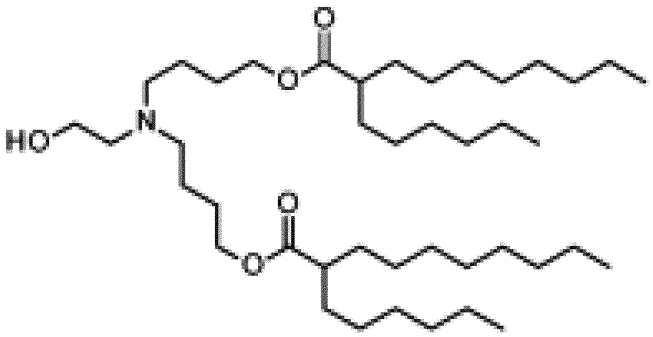
【表１０ｂ－３】

| | |
|---|---|
| 10 |  |
| 11 |  |
| 12 |  |
| 13 |  |

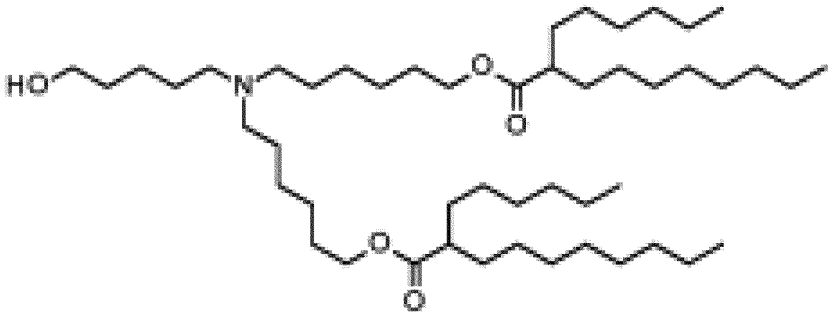
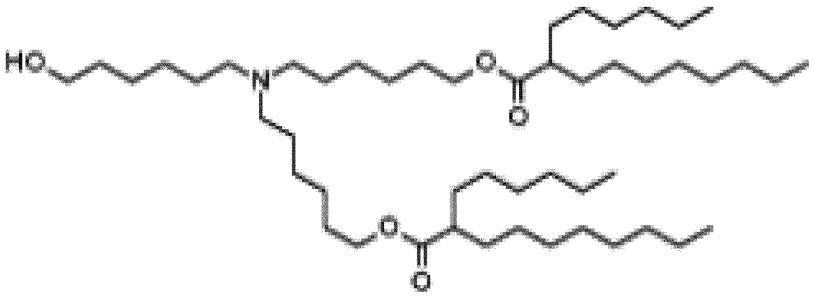
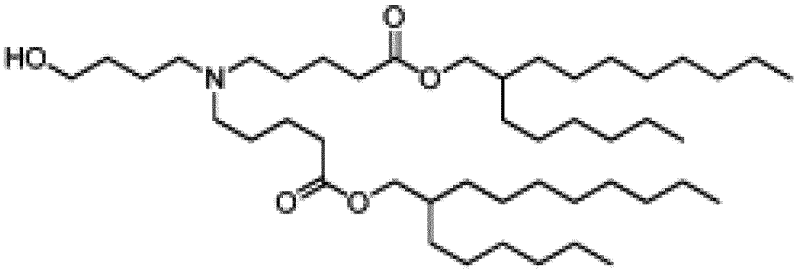
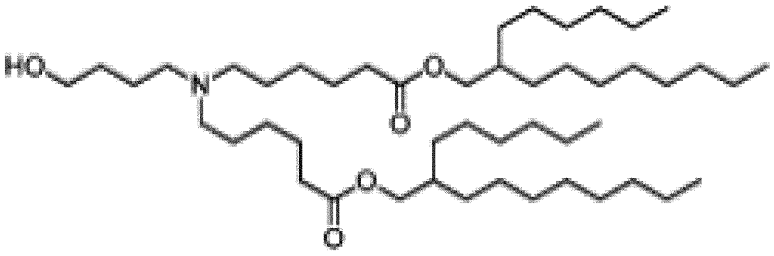
【表１０ｂ－４】

| | |
|---|---|
| 14 |  |
| 15 |  |
| 16 |  |
| 17 |  |

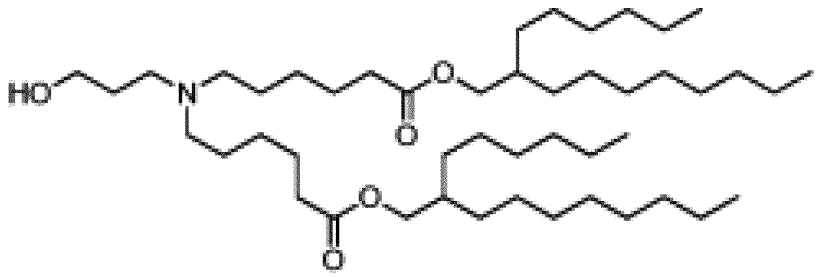
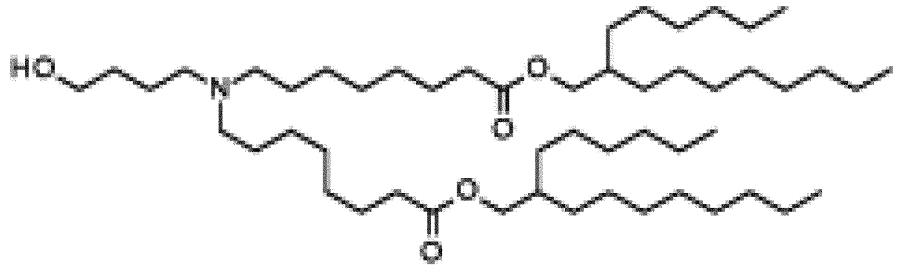
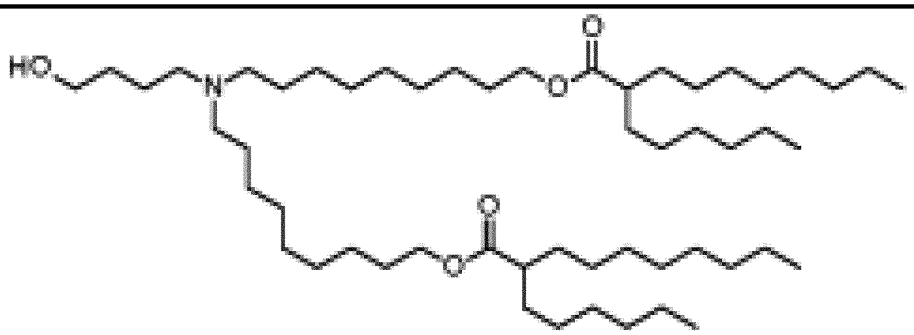
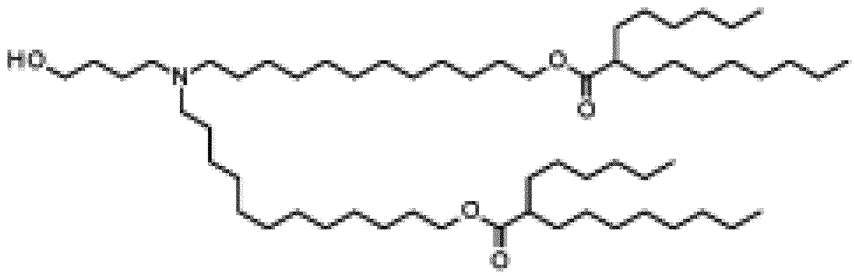
【表１０ｂ－５】

| | |
|---|---|
| 18 |  |
| 19 |  |
| 20 |  |
| 21 |  |

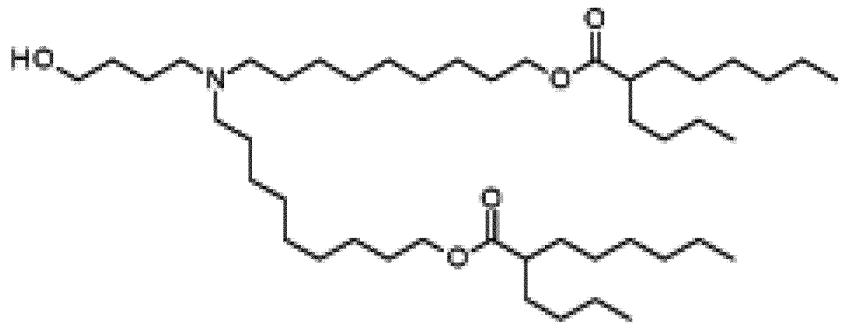
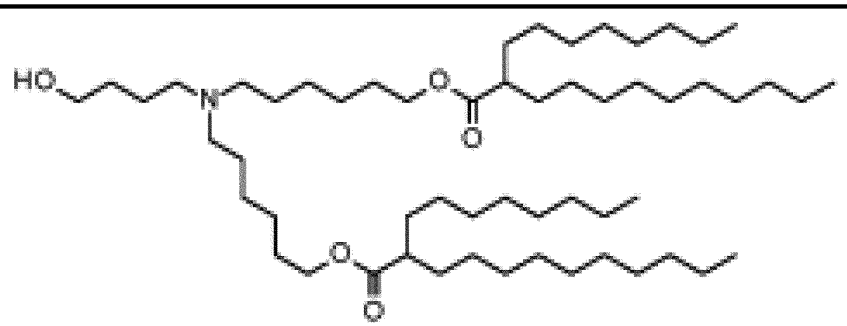
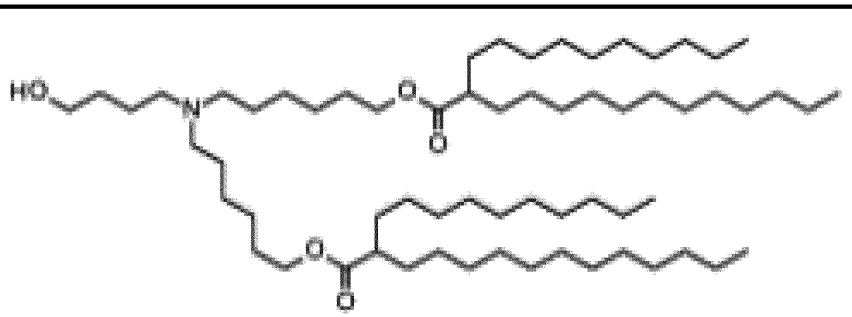
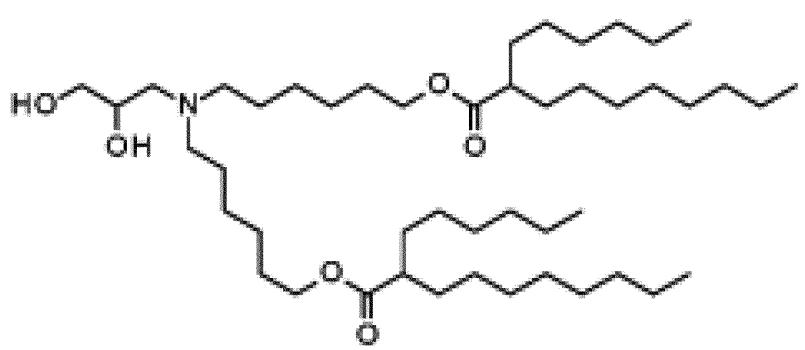
【表１０ｂ－６】

| | |
|---|---|
| 22 |  |
| 23 |  |
| 24 |  |
| 25 |  |

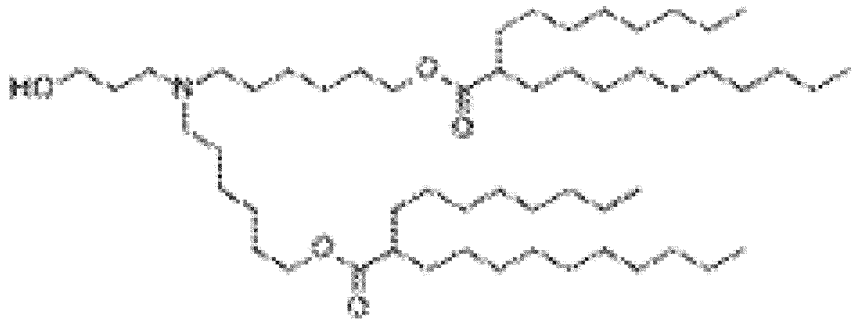
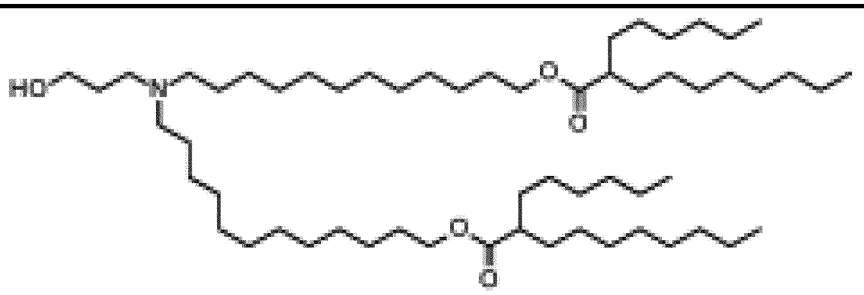
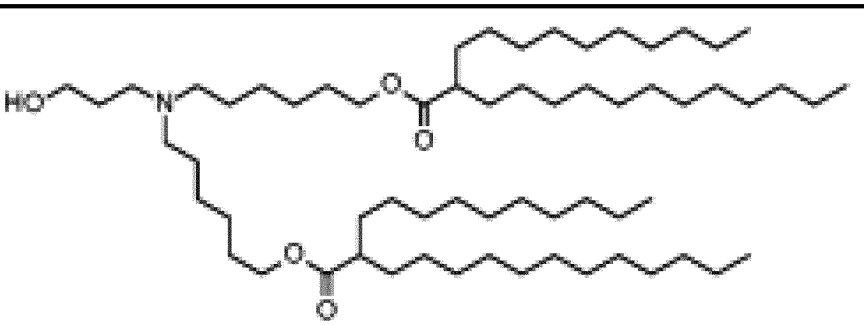
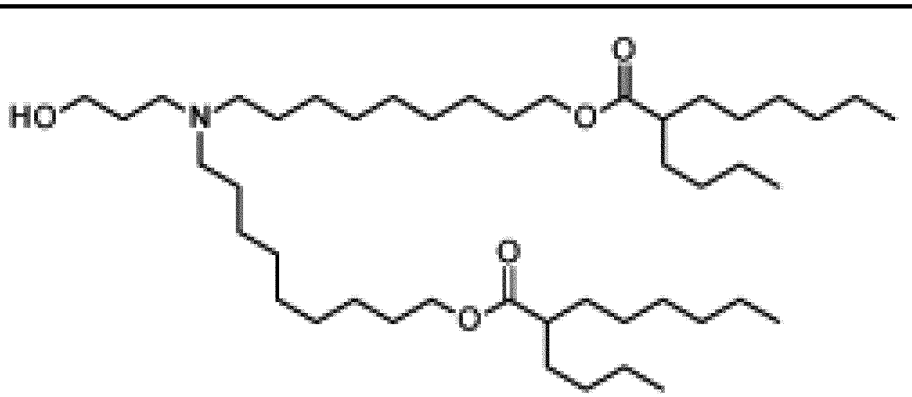
【表１０ｂ－７】

| | |
|---|---|
| 26 |  |
| 27 |  |
| 28 |  |
| 29 |  |

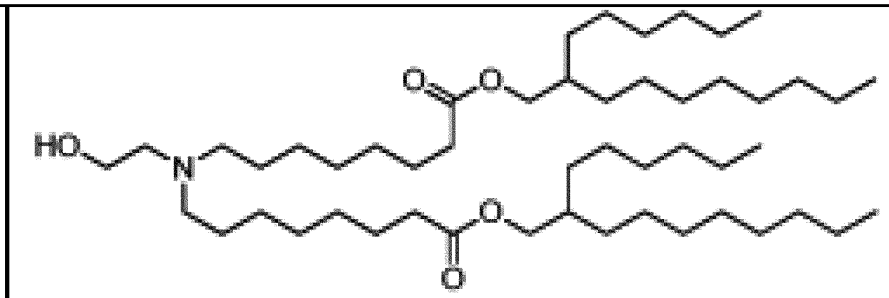
【表１０ｂ－８】

| | |
|---|---|
| 30 |  |
| 31 |  |
| 32 |  |
| 33 |  |

【表１０ｂ－９】

| | |
|---|---|
| 34 |  |
| 35 |  |
| 36 |  |
| 37 |  |

【表１０ｂ－１０】

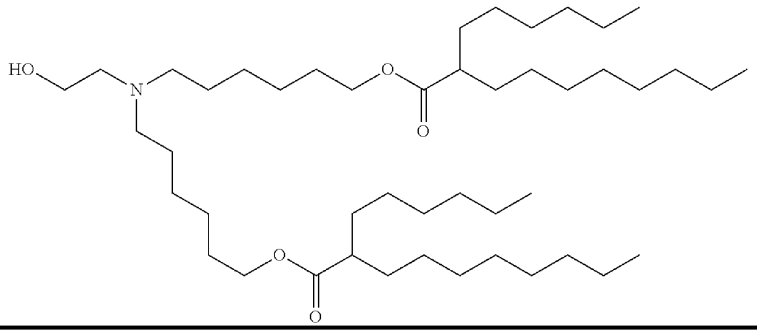
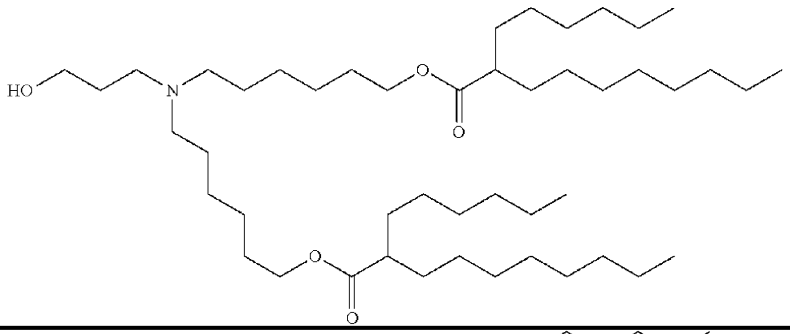
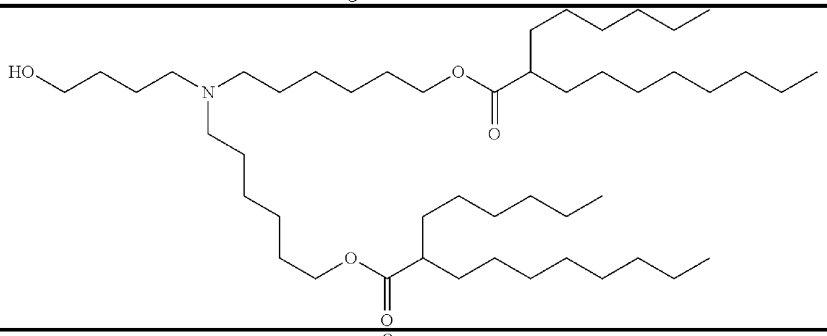
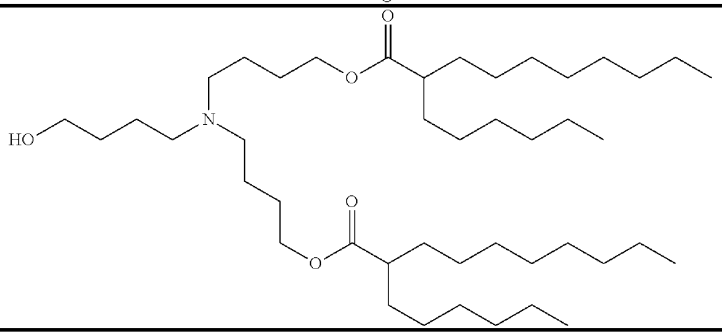
| | |
|---|---|
| 38 |  |
| 39 | |

【０６０９】

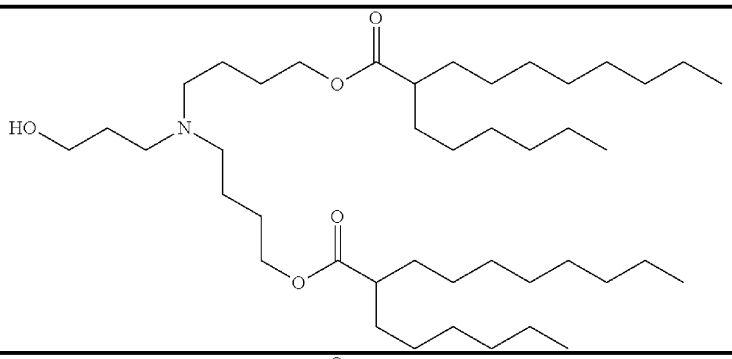
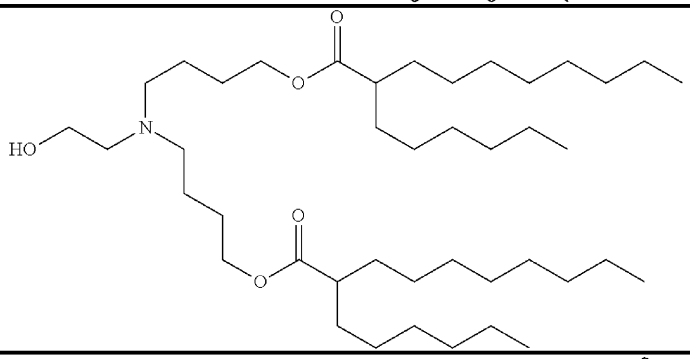
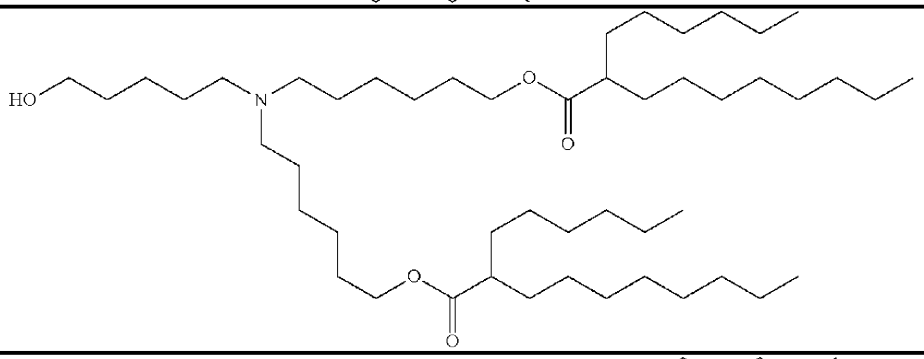
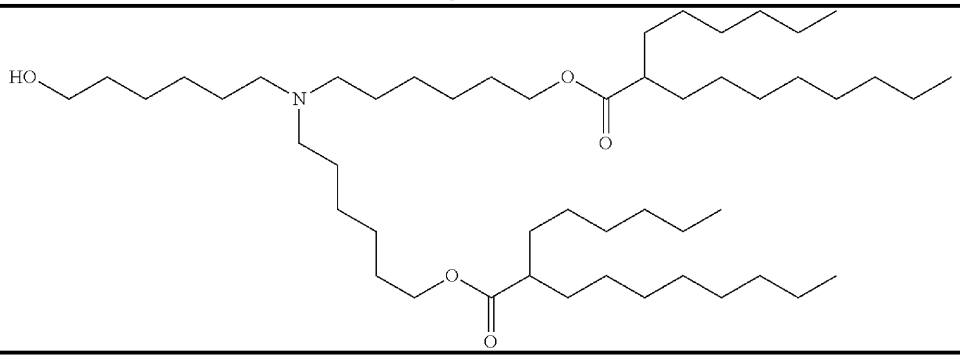
いくつかの実施形態では、イオン化可能脂質は、以下の表１０に示される構造のうちの１つを有する。

【表１０－１】

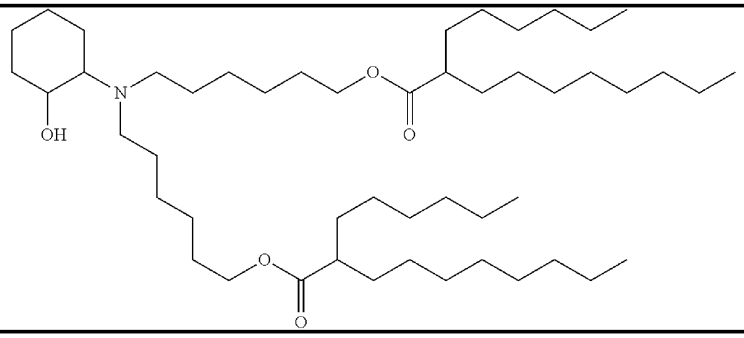
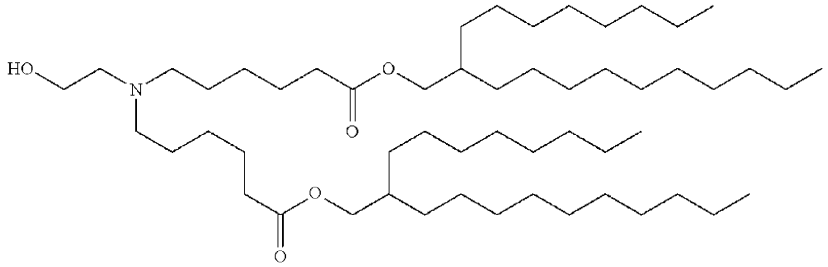
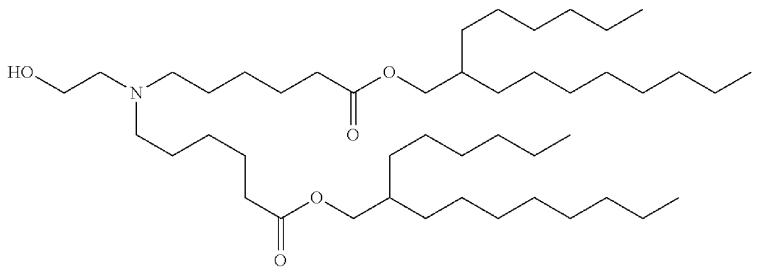
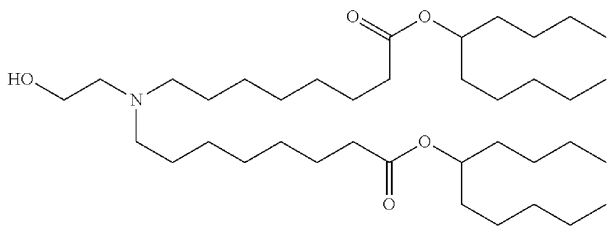
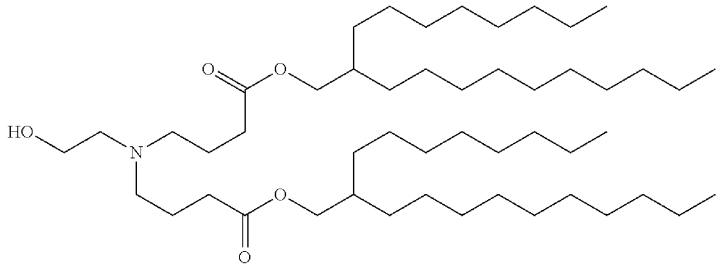
表１０

| 番号 | 構造 |
|---|---|
| 1 |  |
| 2 |  |
| 3 |  |
| 4 |  |

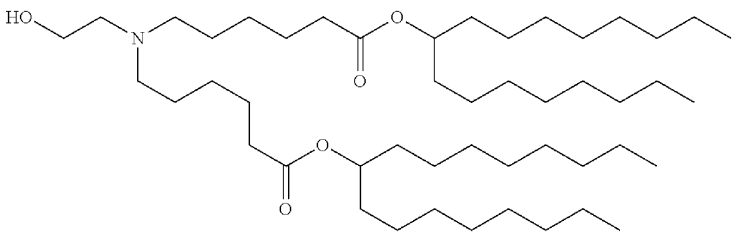
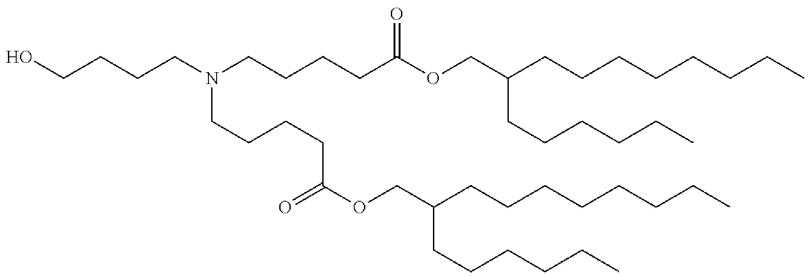
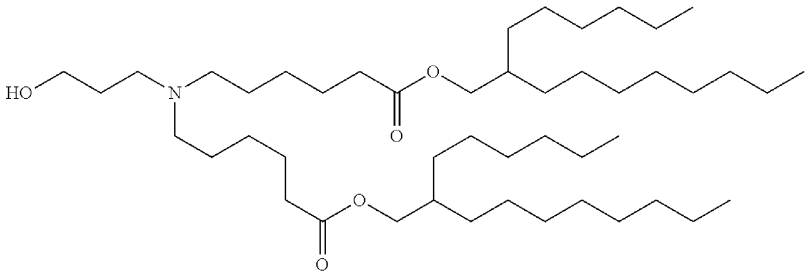
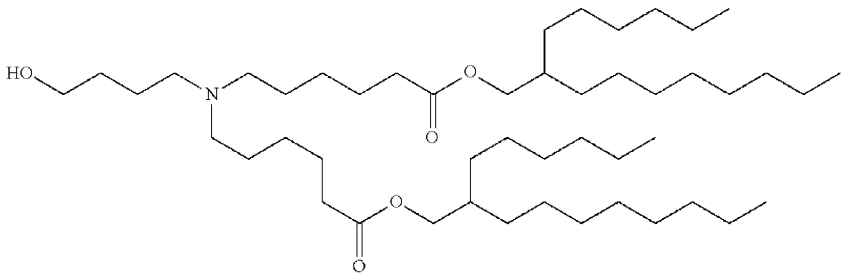
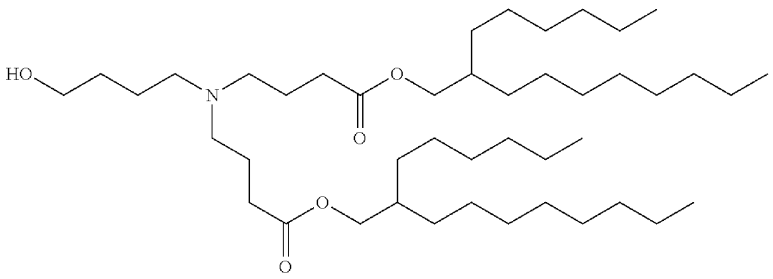
【表１０－２】

| | |
|---|---|
| 5 |  |
| 6 |  |
| 7 |  |
| 8 |  |

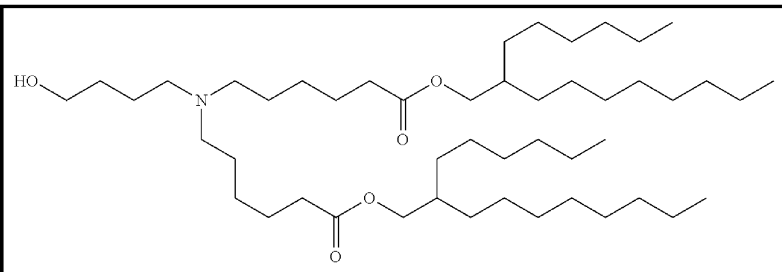
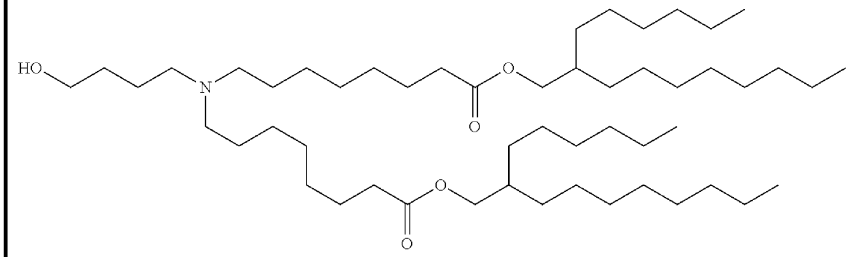
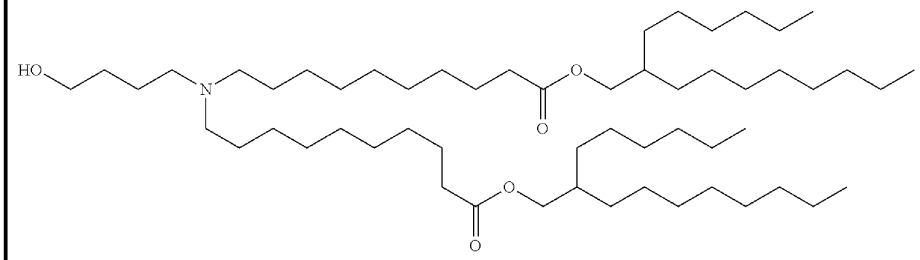
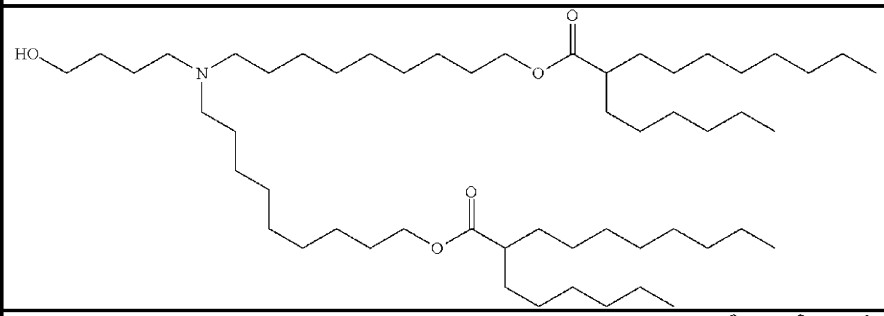
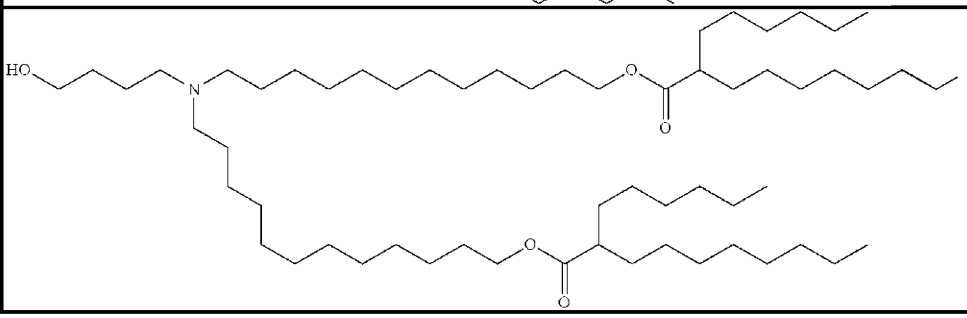
【表１０－３】

| | |
|---|---|
| 9 |  |
| 10 |  |
| 11 |  |
| 12 |  |
| 13 |  |

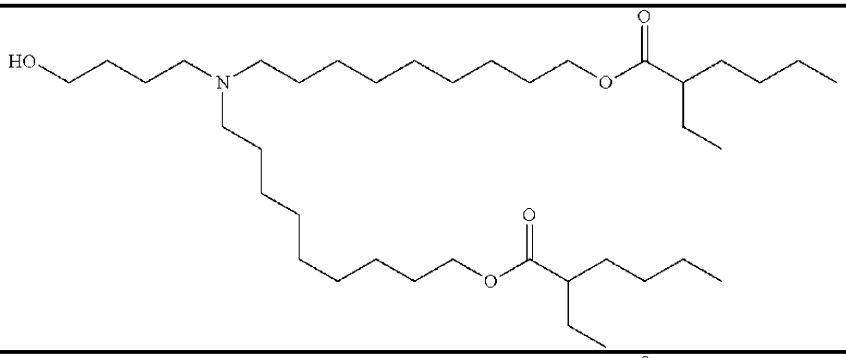
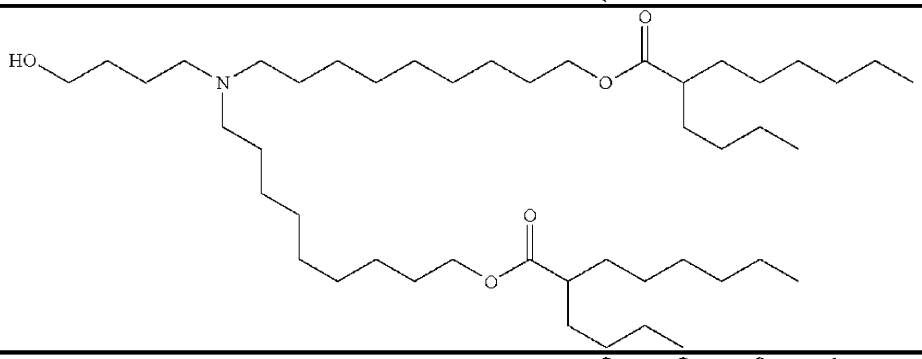
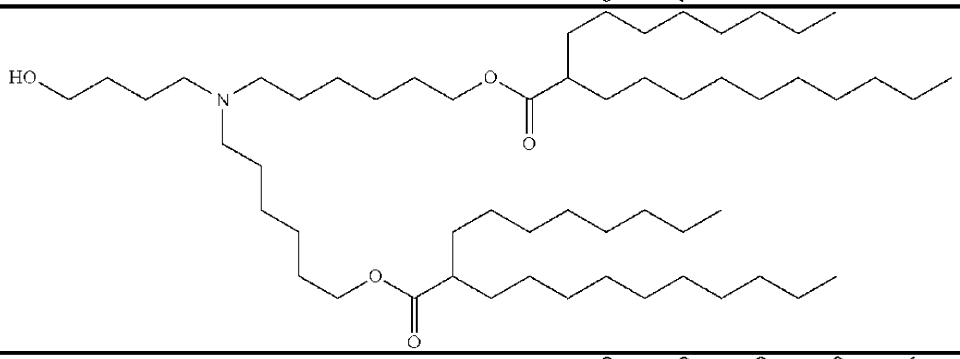
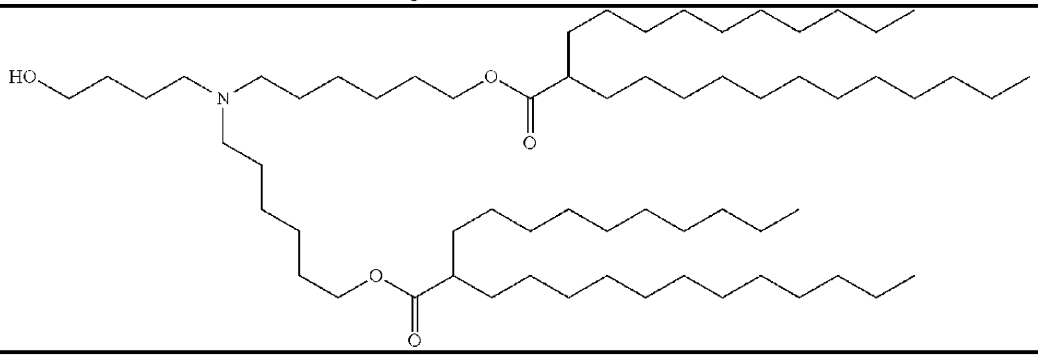
【表１０－４】

| | |
|---|---|
| 14 |  |
| 15 |  |
| 16 |  |
| 17 |  |
| 18 |  |

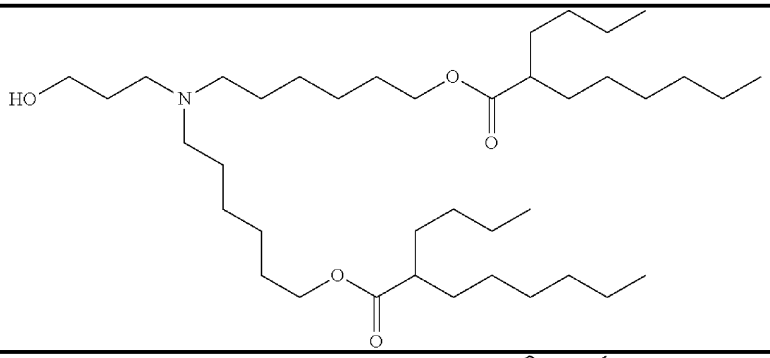
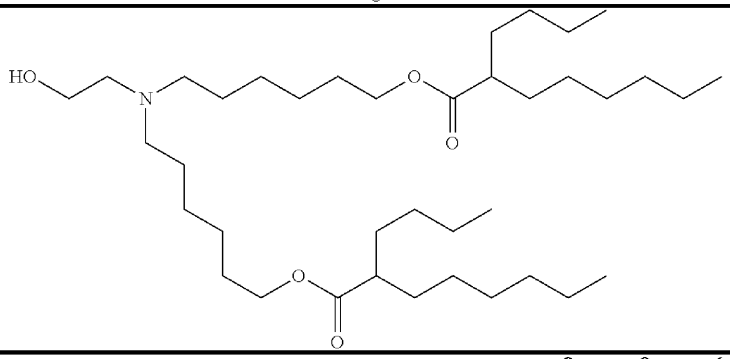
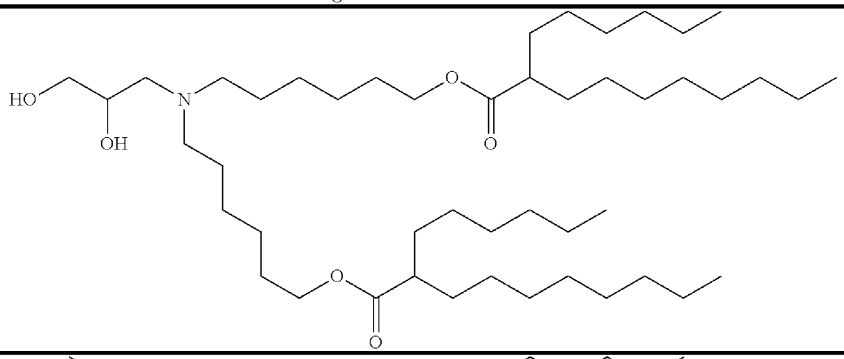
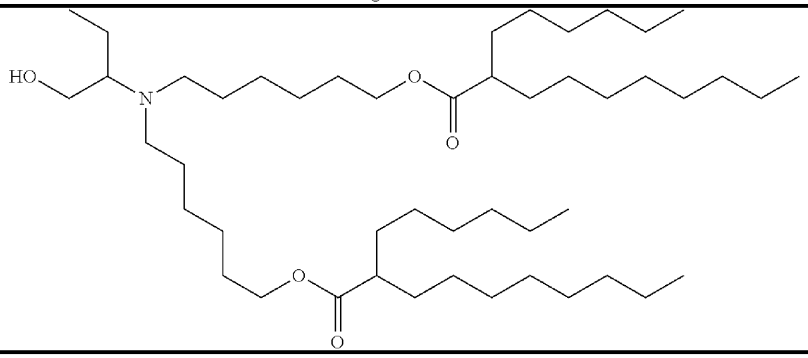
【表１０－５】

| | |
|---|---|
| 19 |  |
| 20 |  |
| 21 |  |
| 22 |  |
| 23 |  |

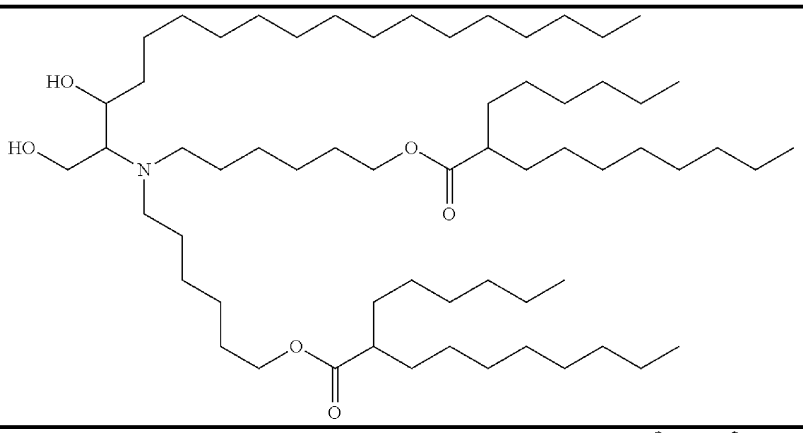
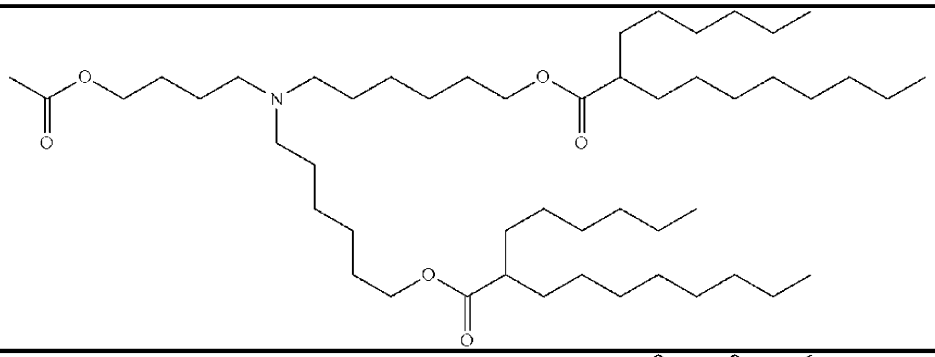
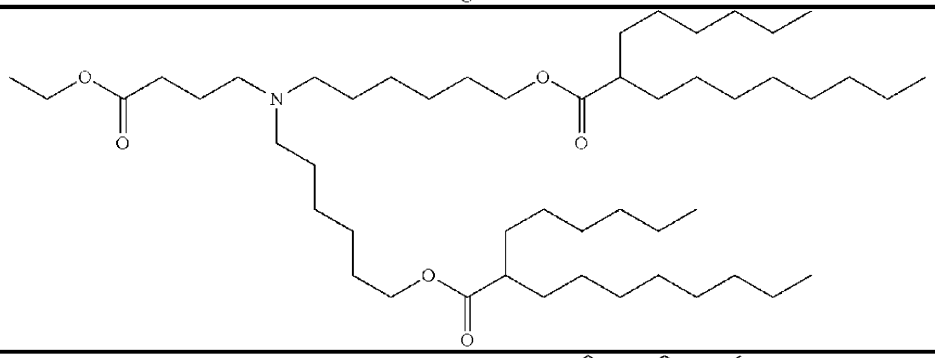
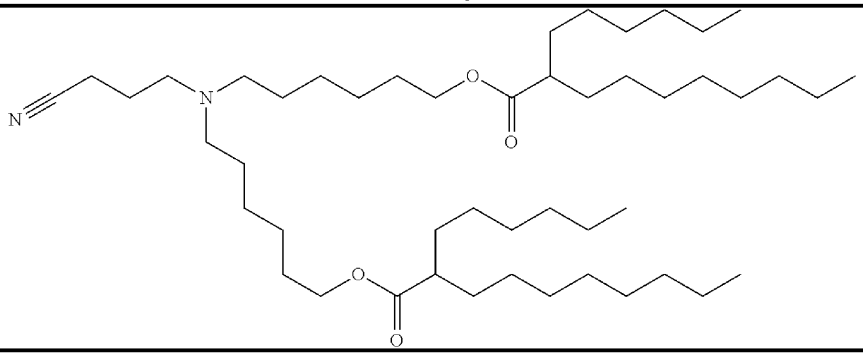
【表１０－６】

| | |
|---|---|
| 24 |  |
| 25 |  |
| 26 |  |
| 27 |  |

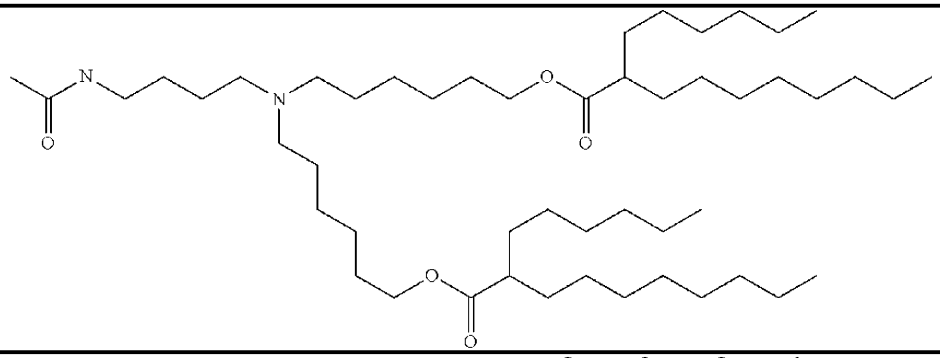
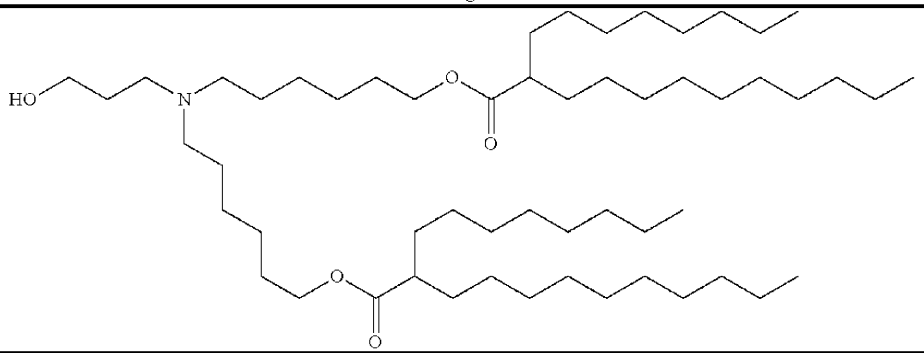
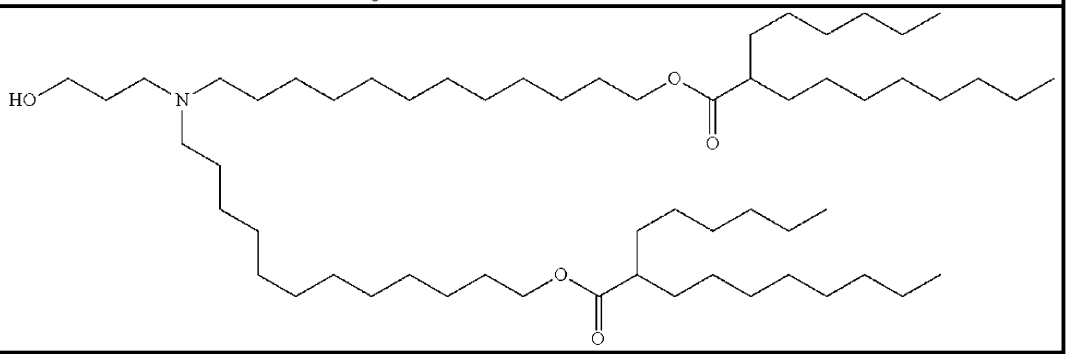
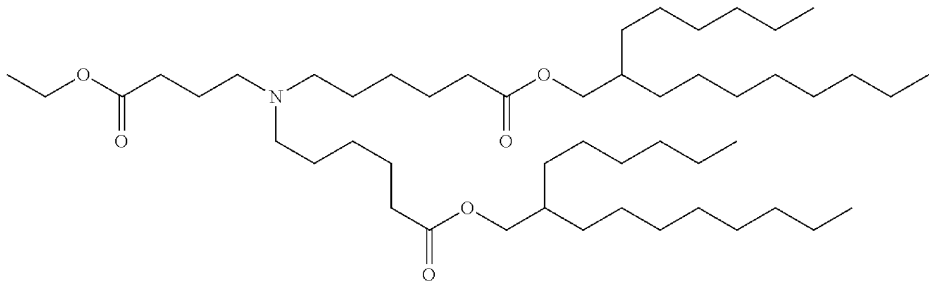
【表１０－７】

| | |
|---|---|
| 28 |  |
| 29 |  |
| 30 |  |
| 31 |  |

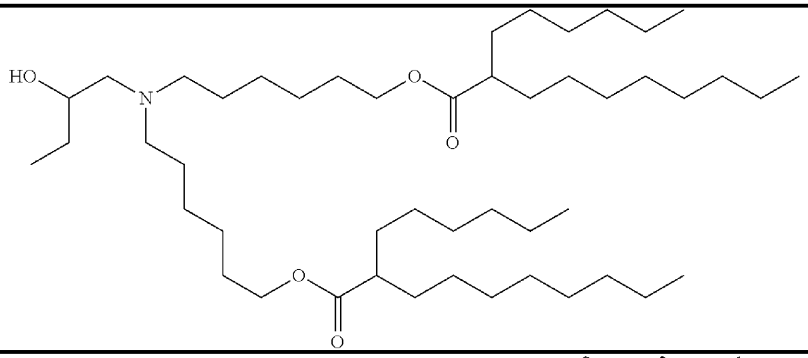
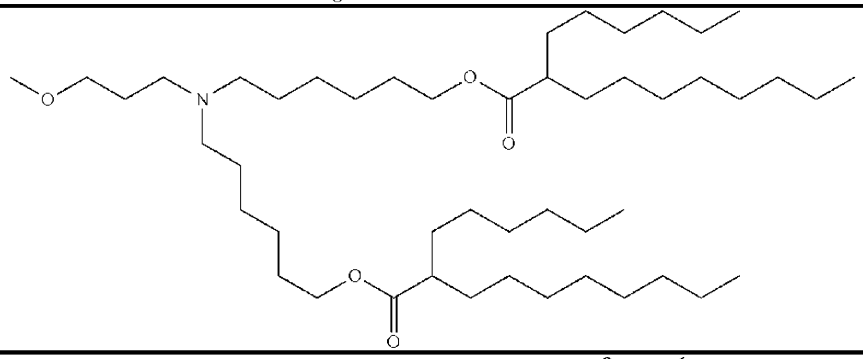
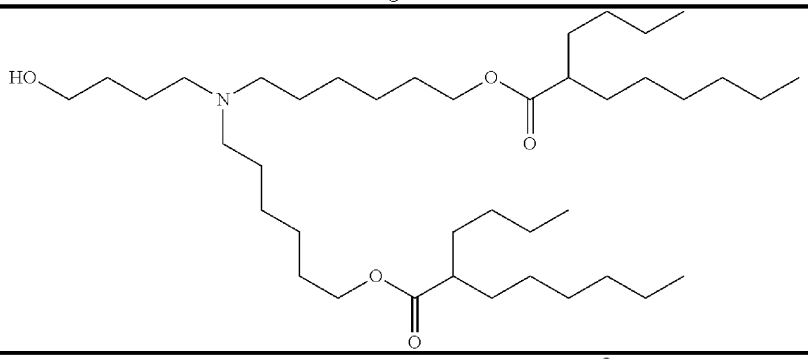
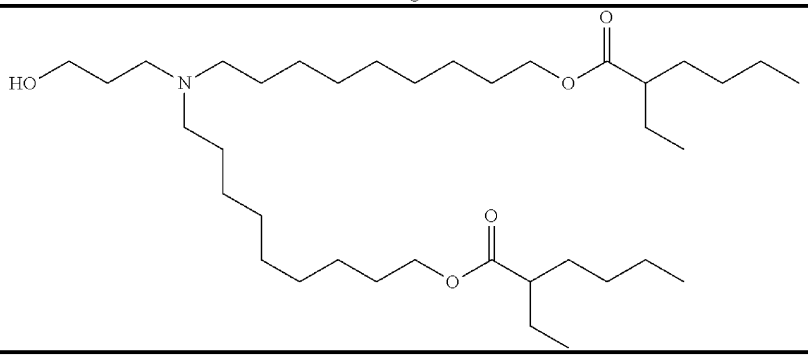
【表１０－８】

| | |
|---|---|
| 32 |  |
| 33 |  |
| 34 |  |
| 35 |  |

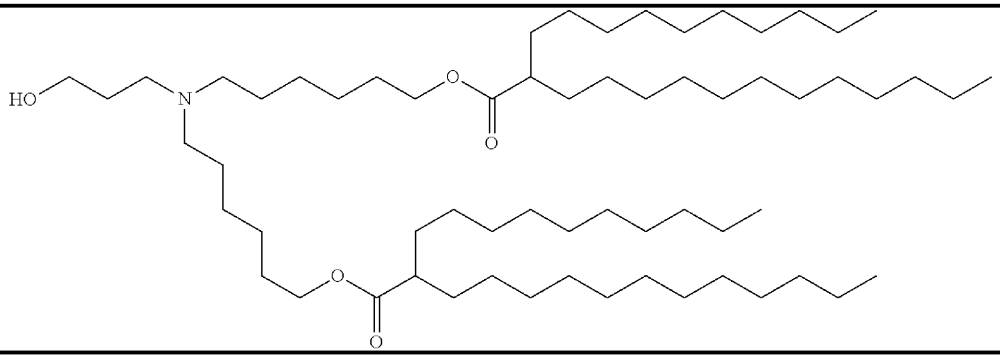
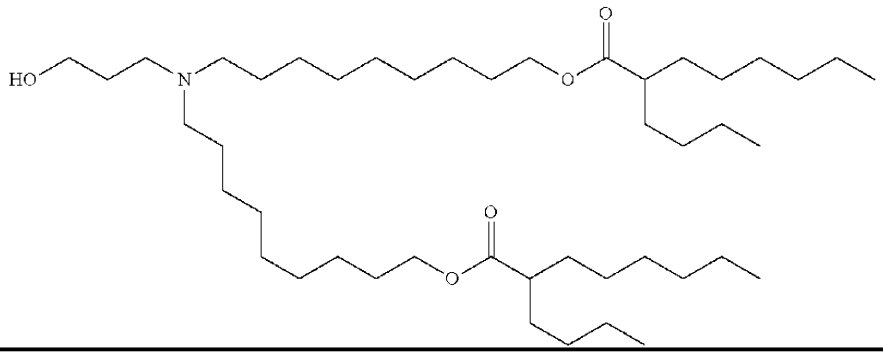
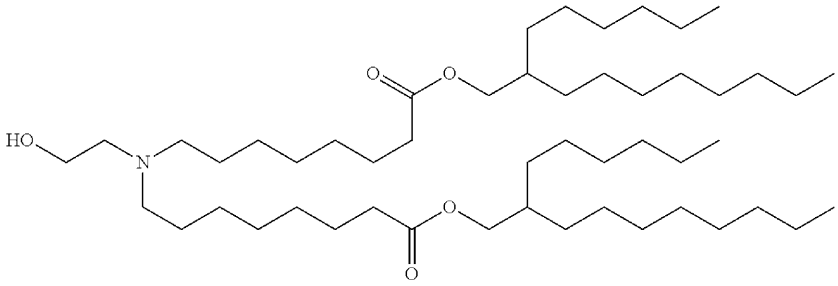
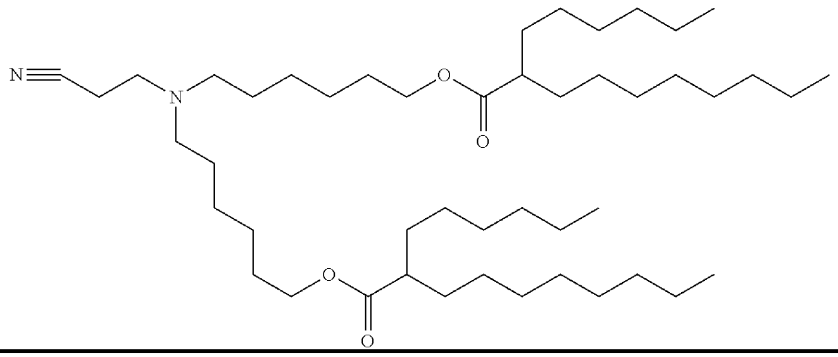
【表１０－９】

| | |
|---|---|
| 36 |  |
| 37 |  |
| 38 |  |
| 39 |  |

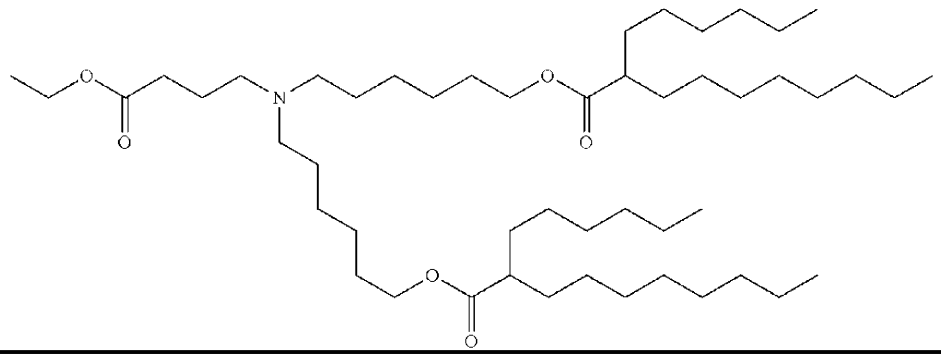
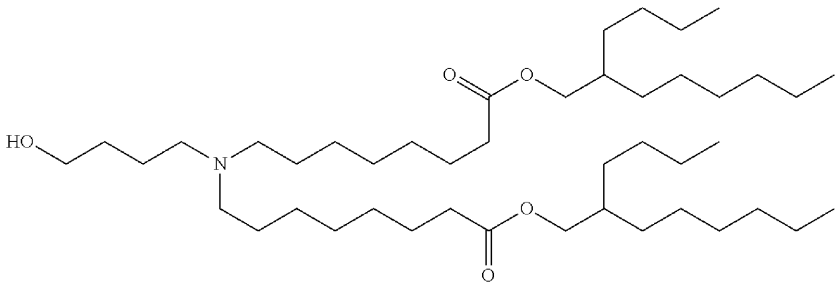
【表１０－１０】

| | |
|---|---|
| 40 |  |
| 41 |  |
| 42 |  |
| 43 |  |

【表１０－１１】

| | |
|---|---|
| 44 |  |
| 45 |  |
| 46 |  |
| 47 |  |

【表１０－１２】

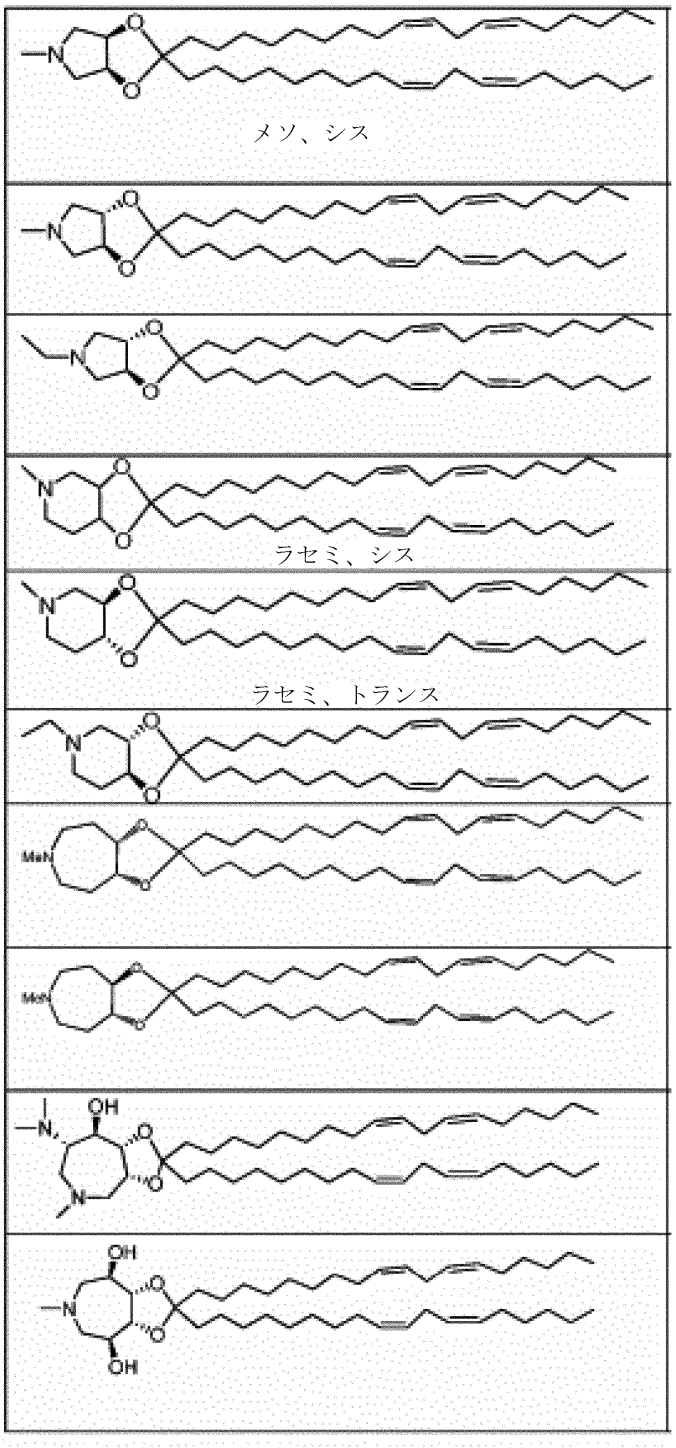
| | |
|---|---|
| 48 |  |
| 49 |  |

【０６１０】

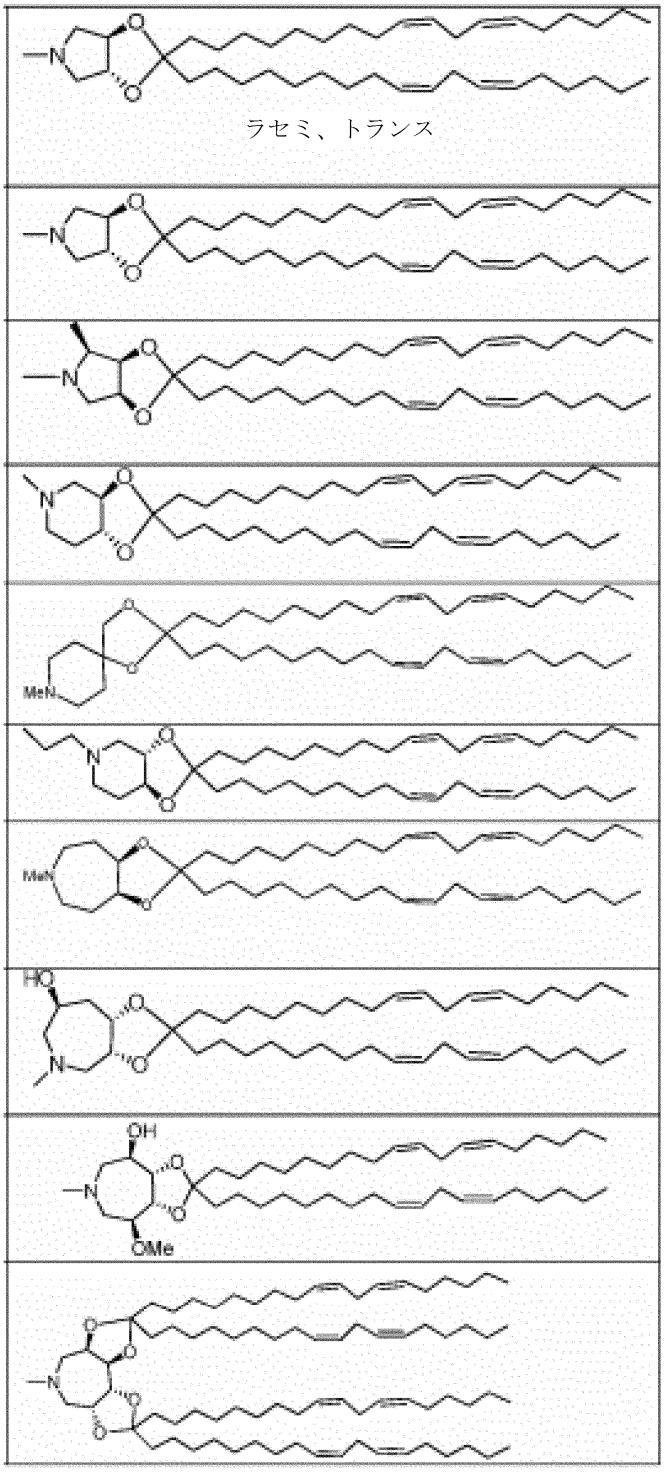
いくつかの実施形態では、イオン化可能脂質は、以下の表１１に示される構造のうちの１つを有する。いくつかの実施形態では、表１１に示されるイオン化可能脂質は、国際特許出願第ＰＣＴ／ＵＳ２０１０／０６１０５８号に記載されているとおりである。

【表１１－１】

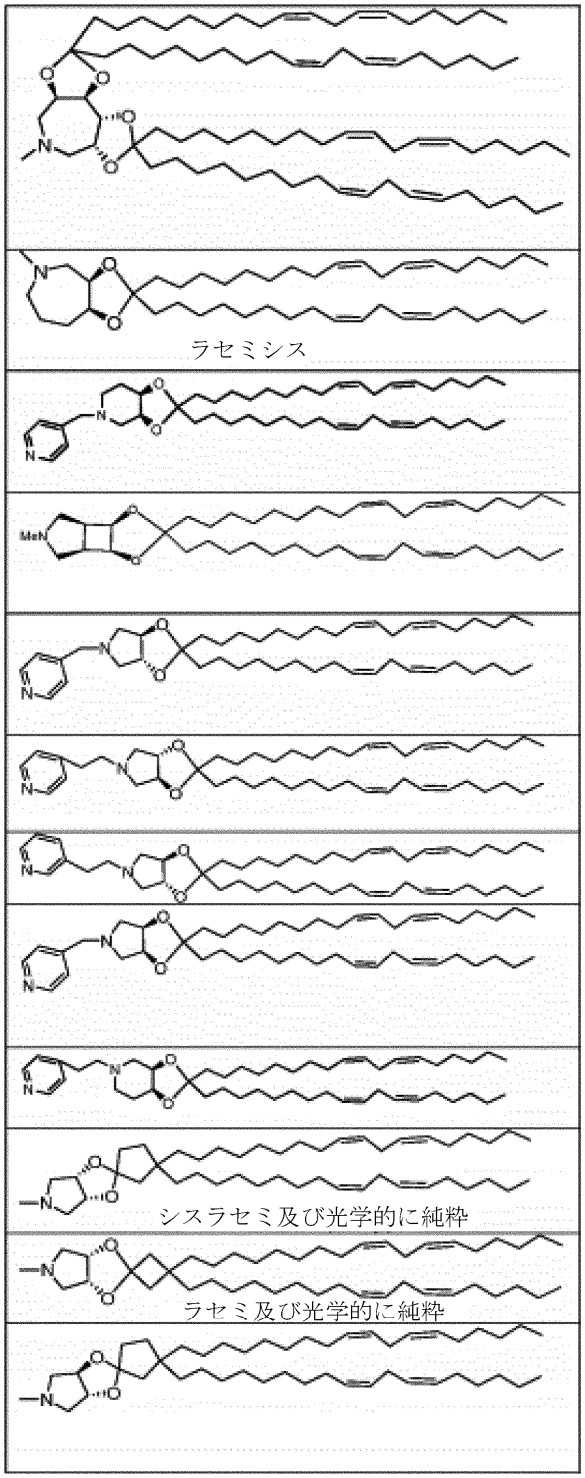
表１１



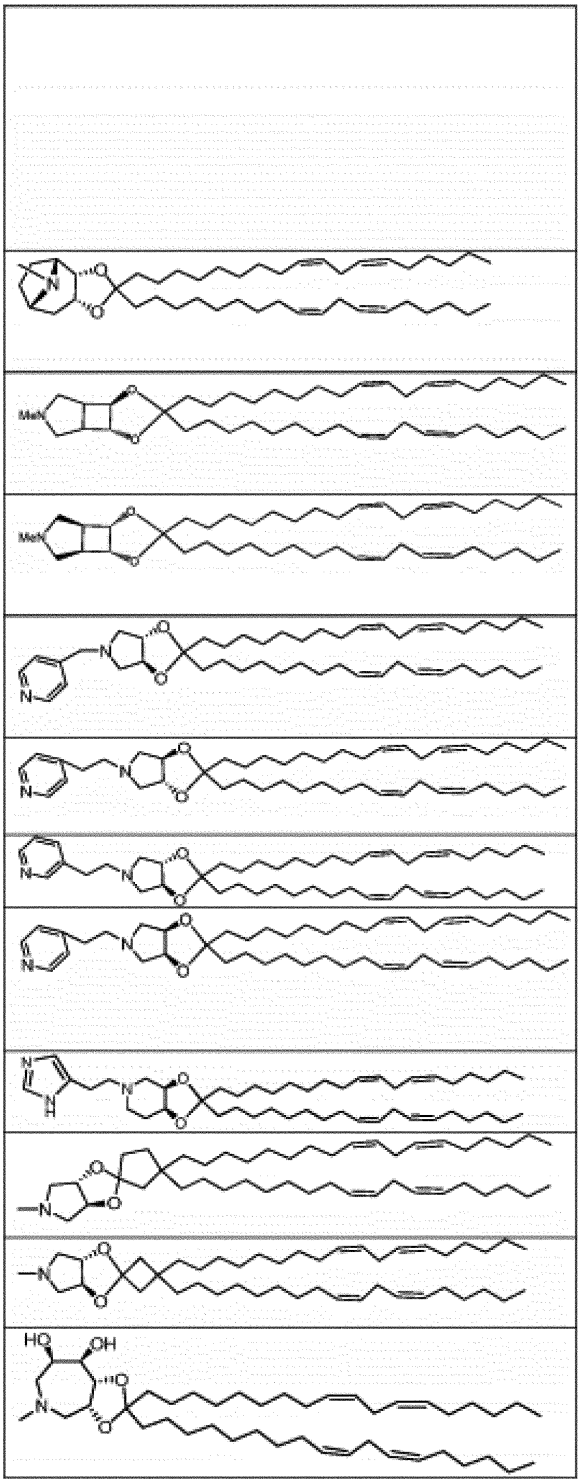
【表１１－２】



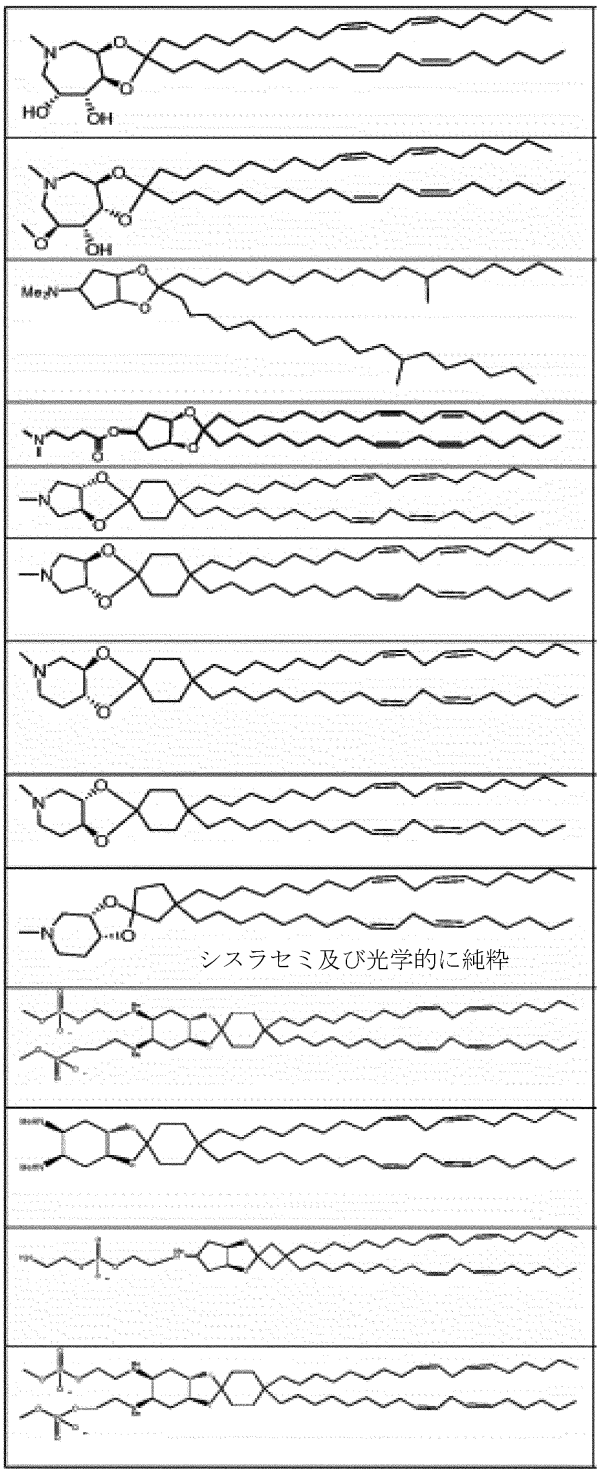
【表１１－３】



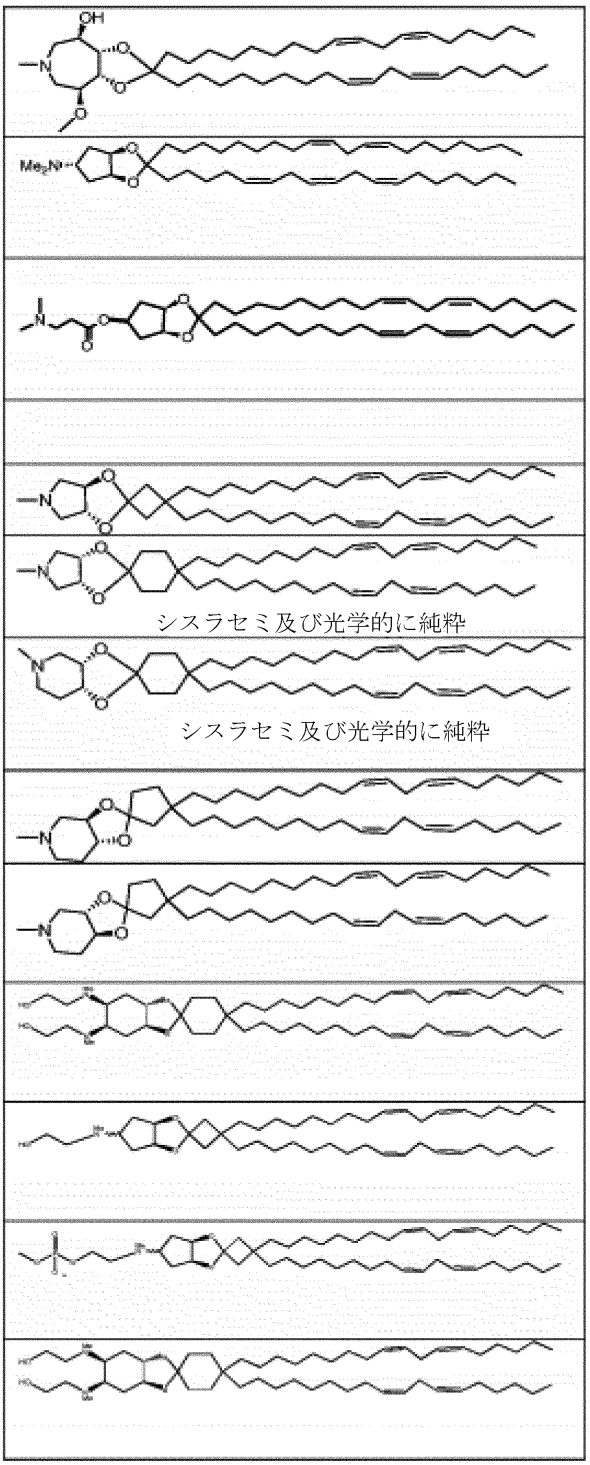
【表１１－４】



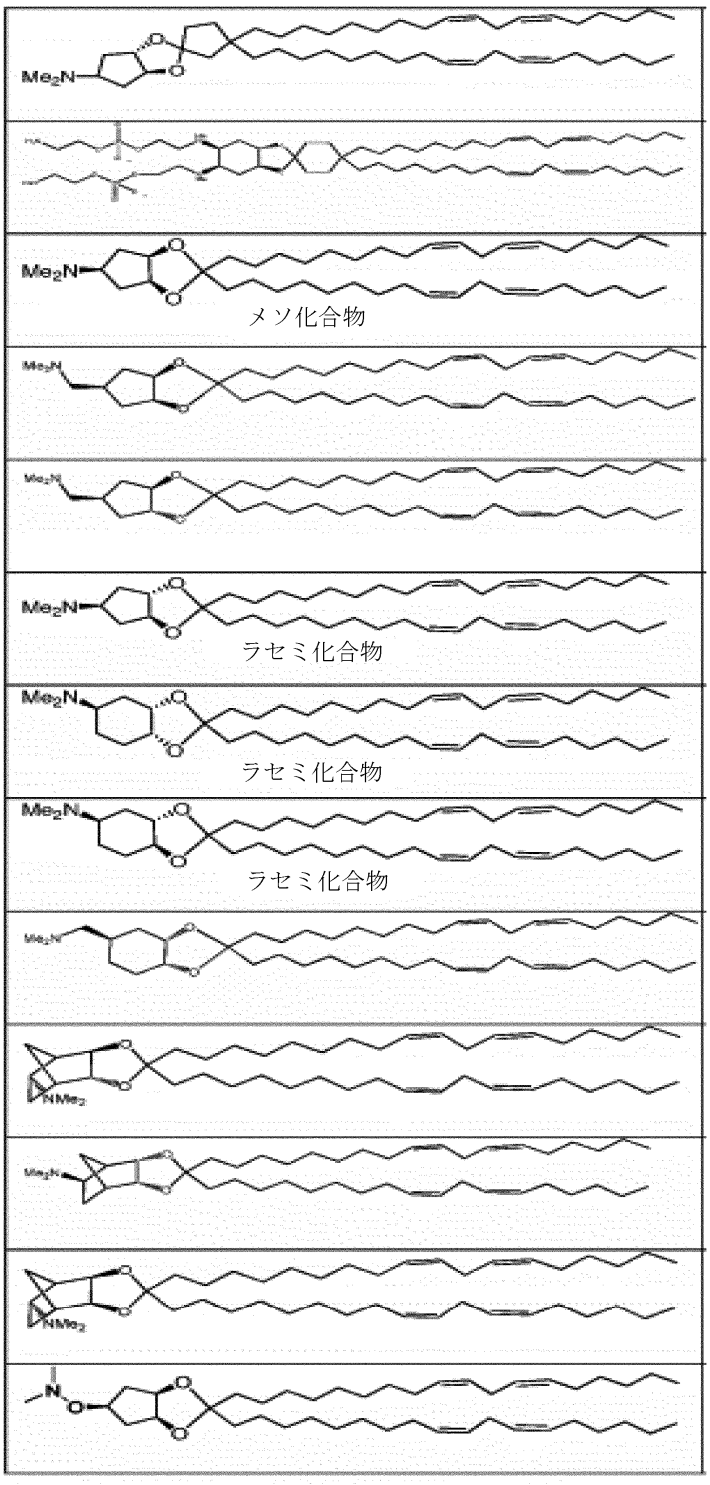
【表１１－５】



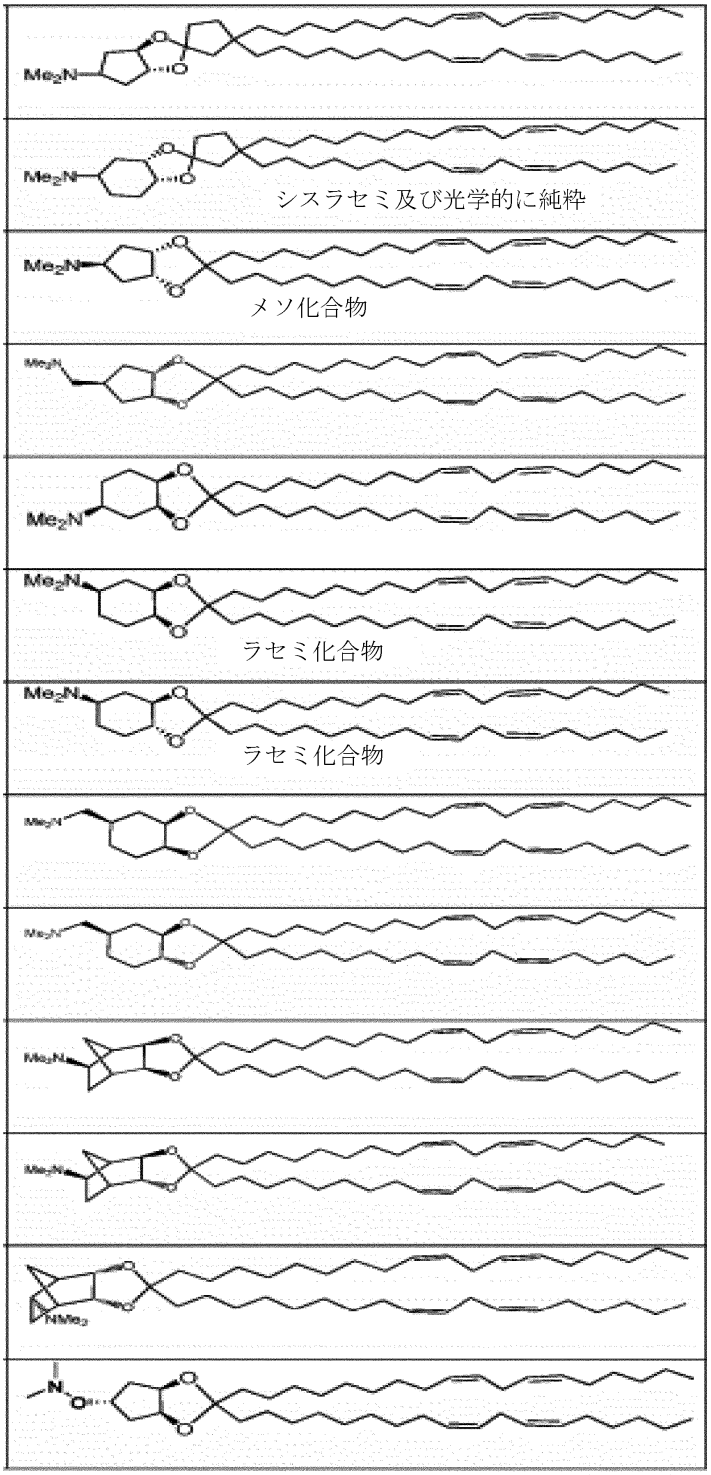
【表１１－６】



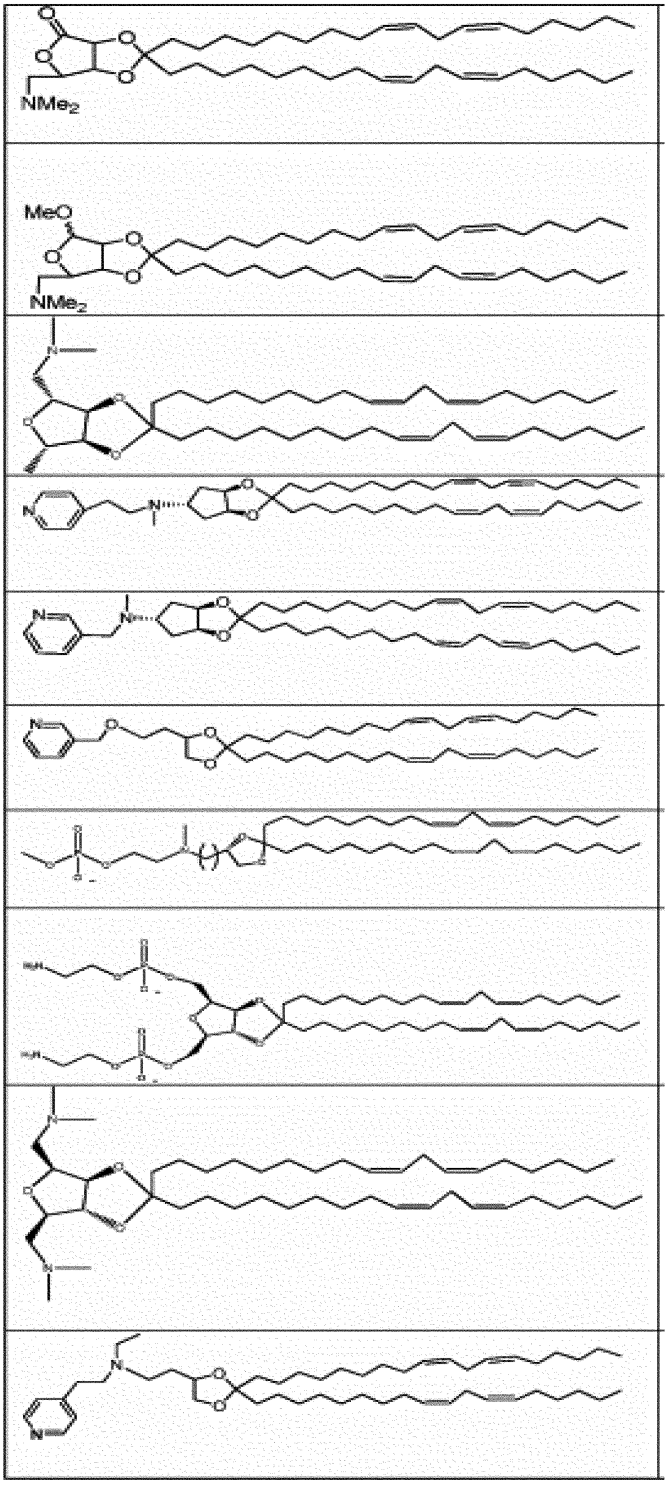
【表１１－７】



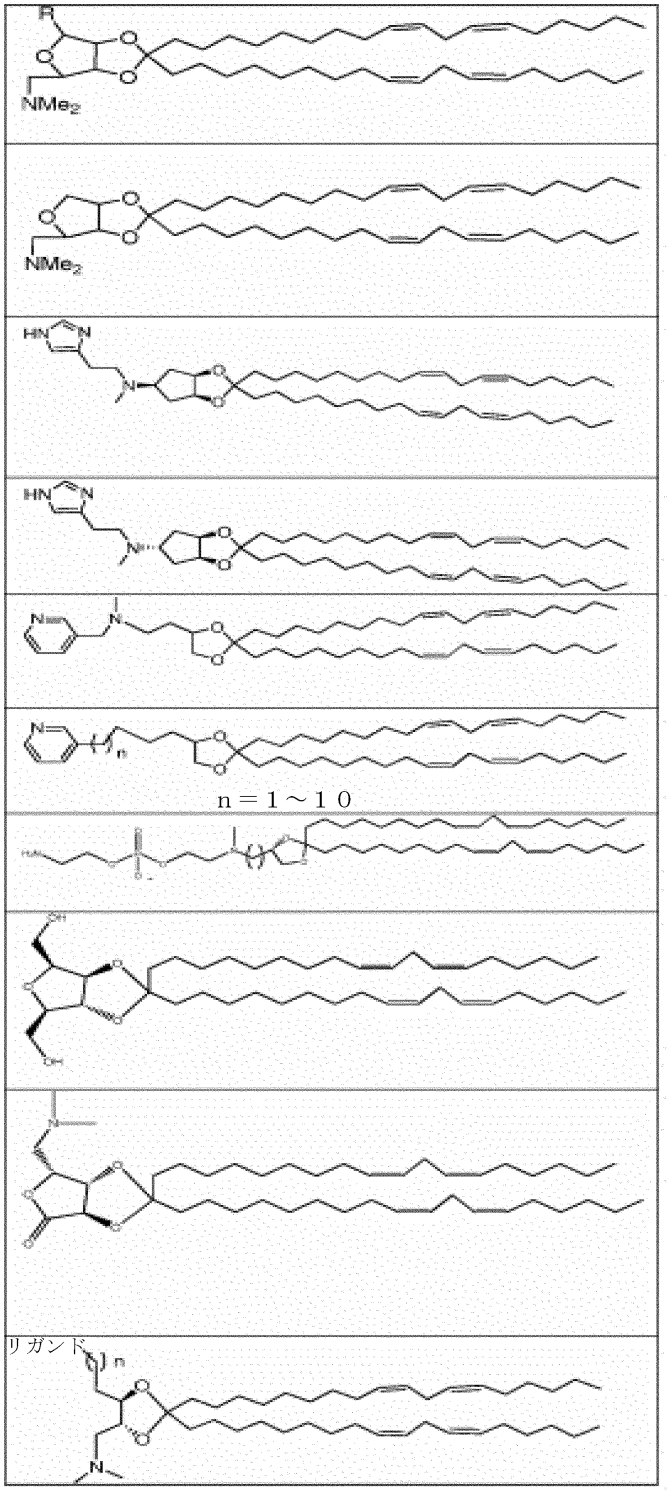
【表１１－８】



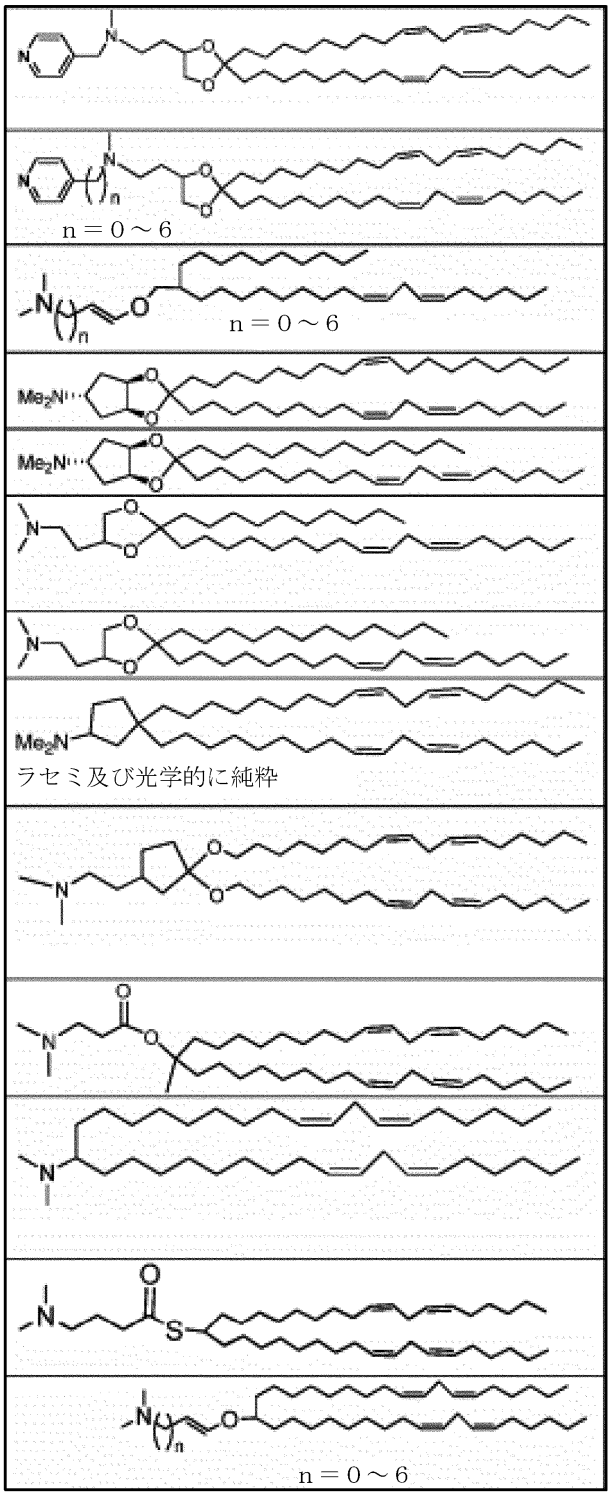
【表１１－９】



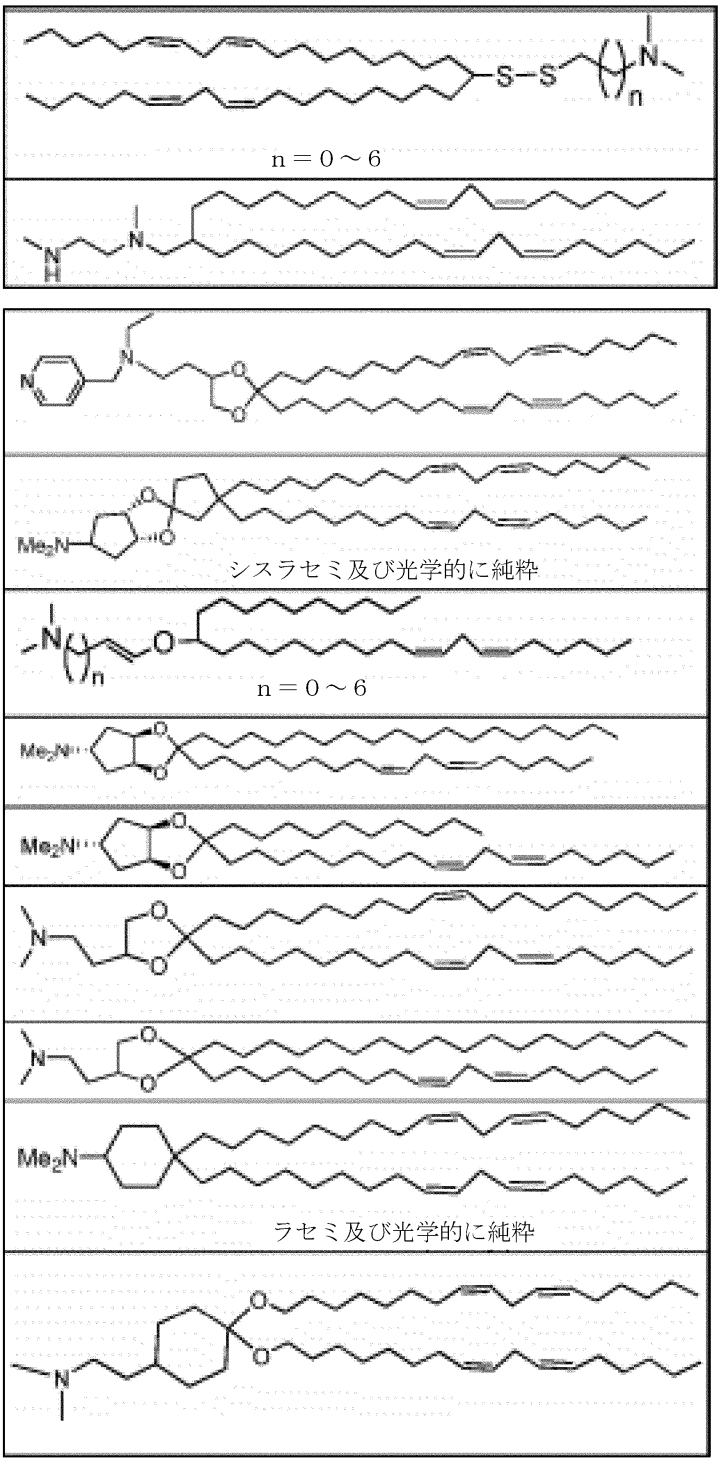
【表１１－１０】



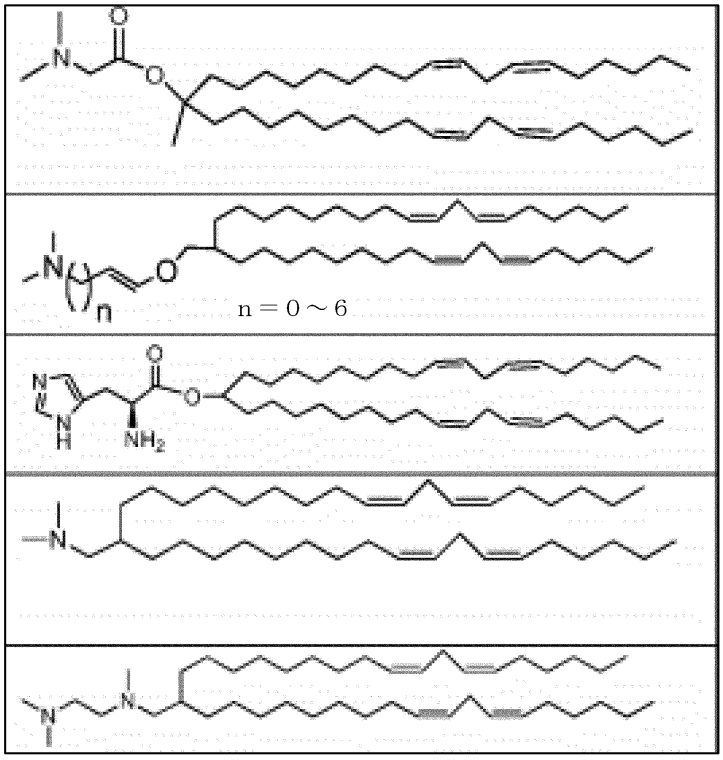
【表１１－１１】

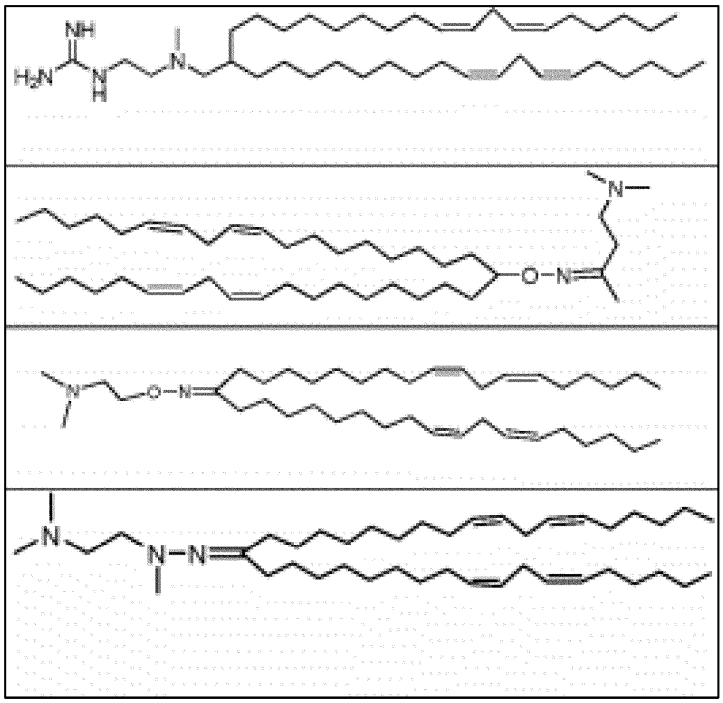


【表１１－１２】

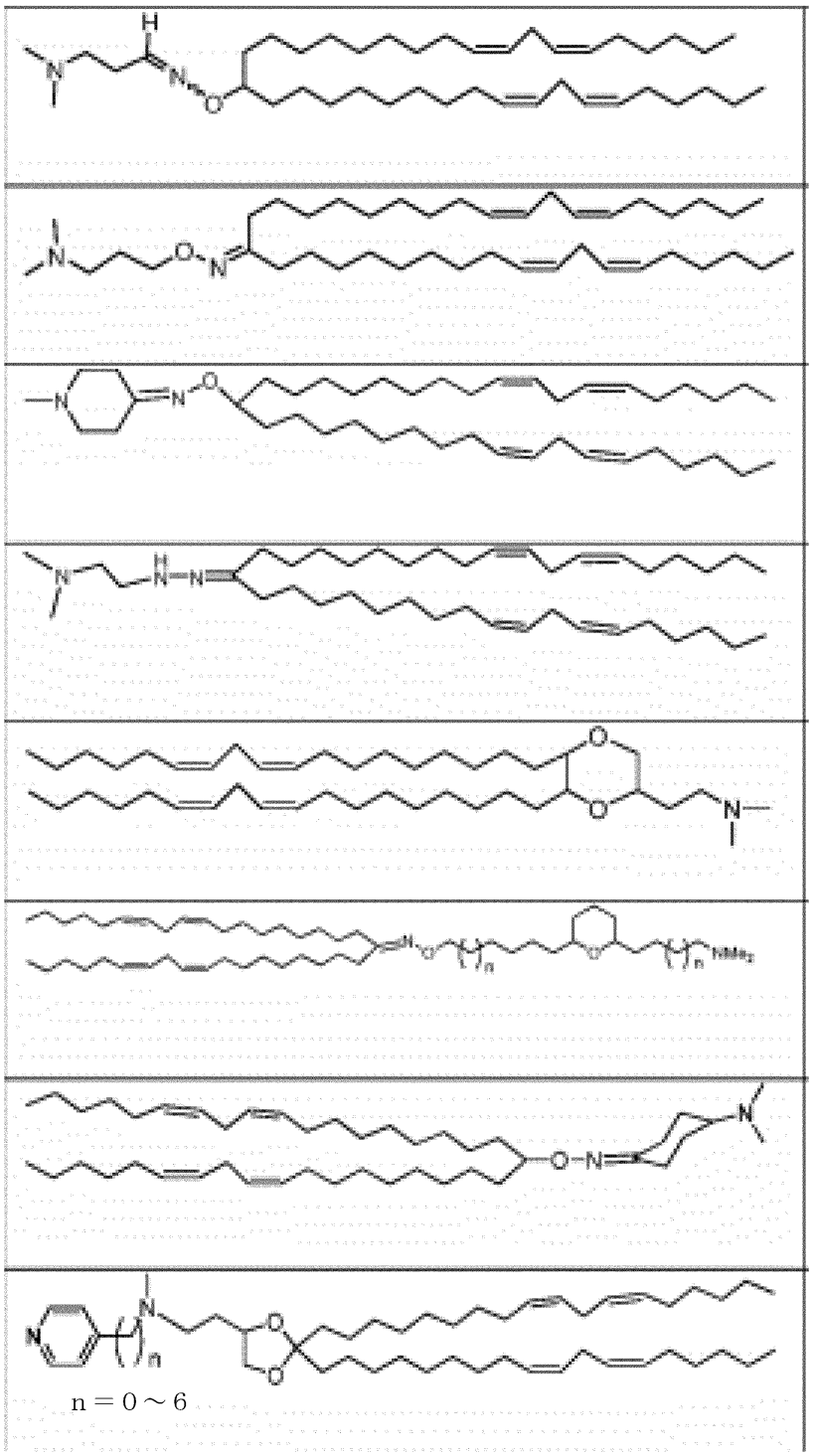


【表１１－１３】

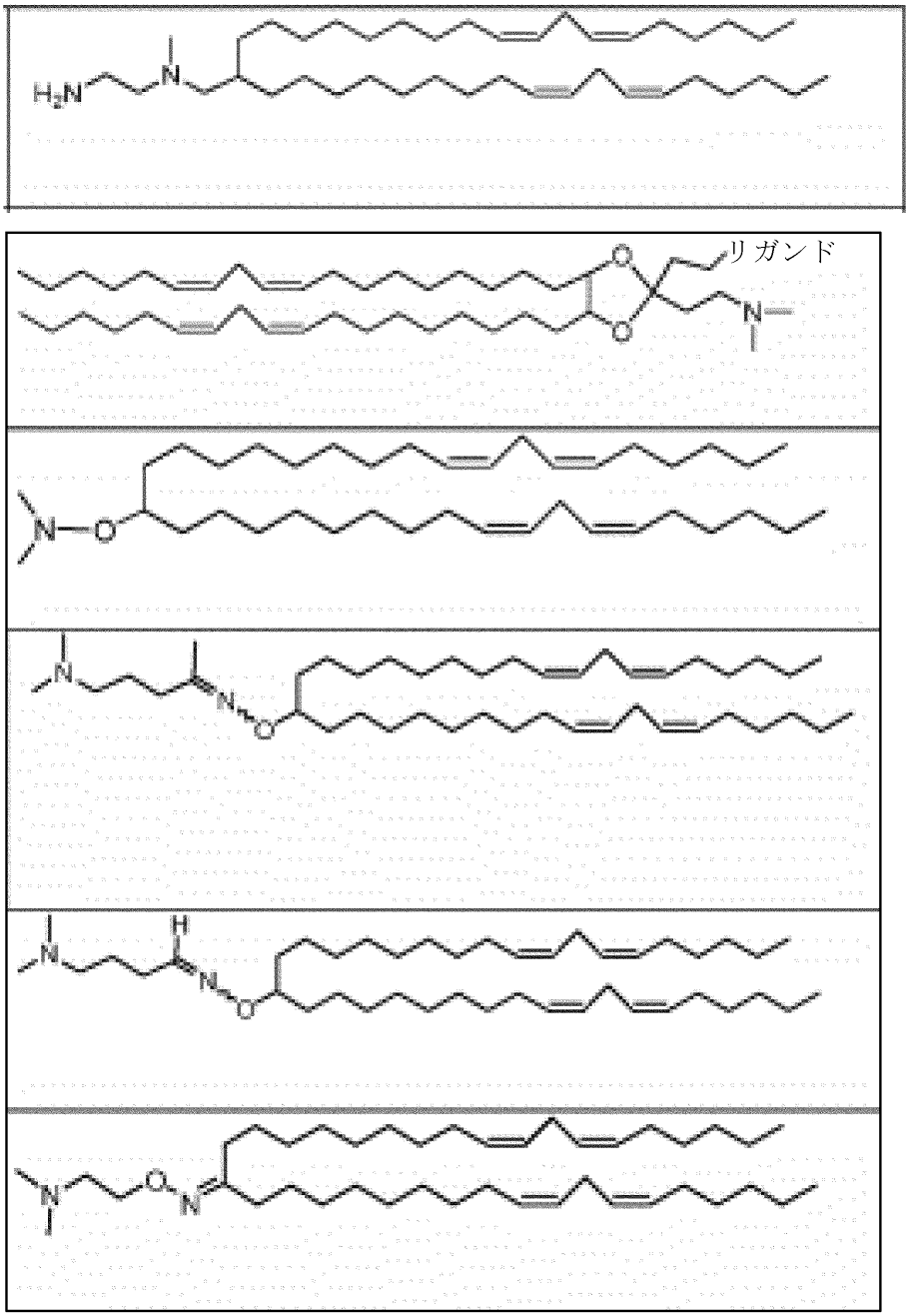


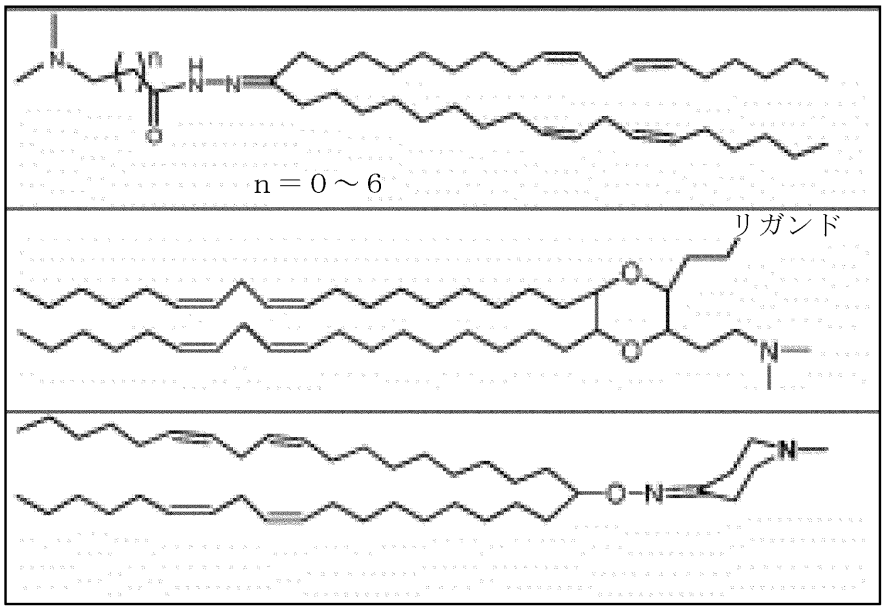
【表１１－１４】

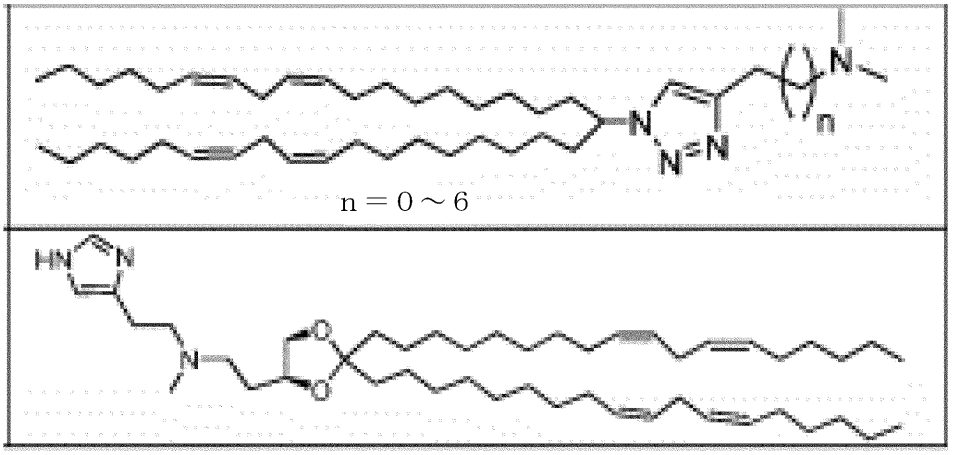


【表１１－１５】

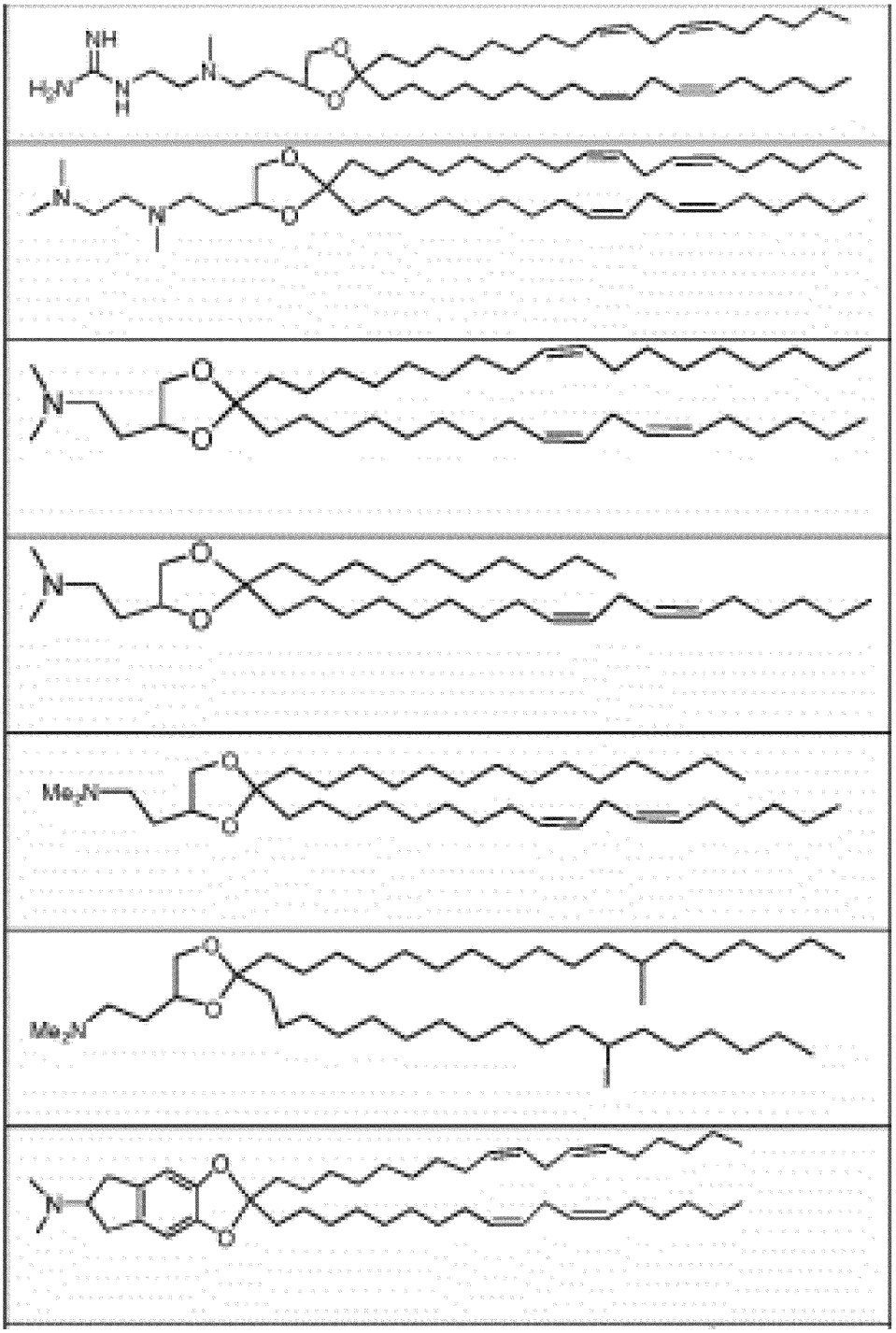


【表１１－１６】

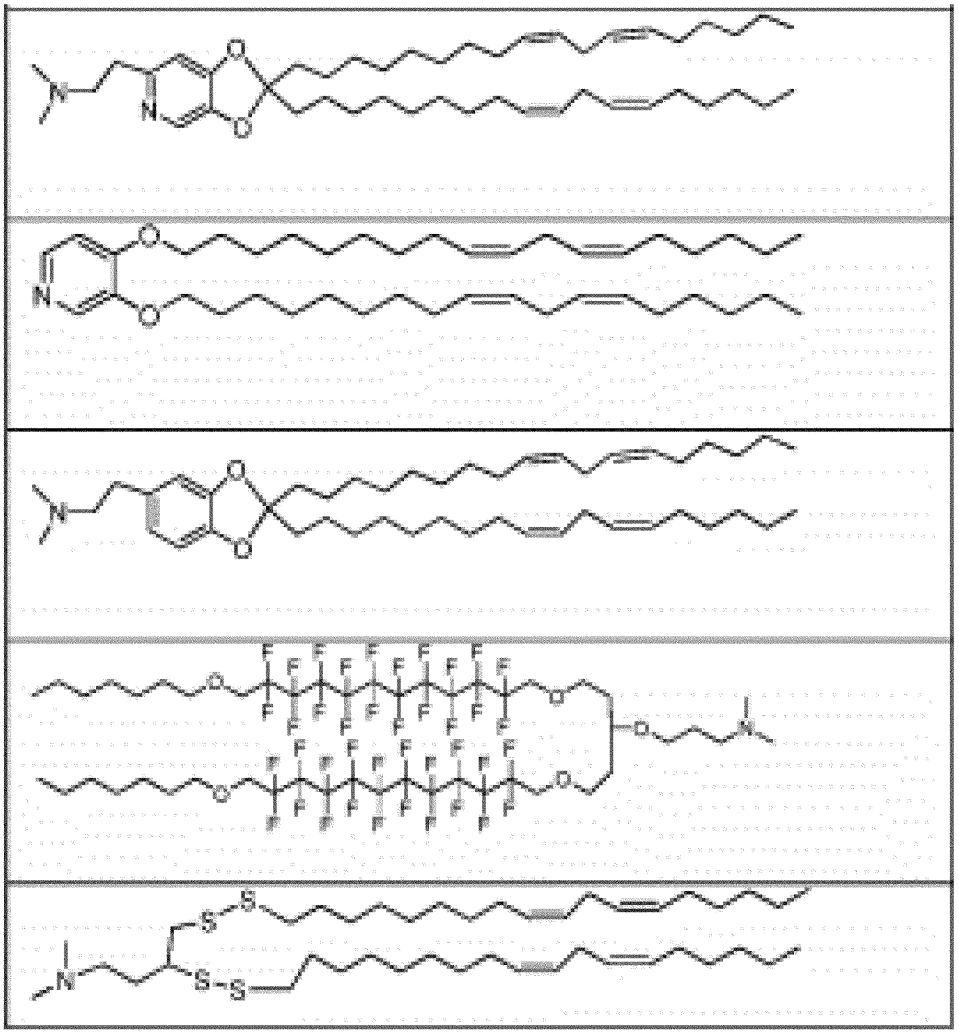


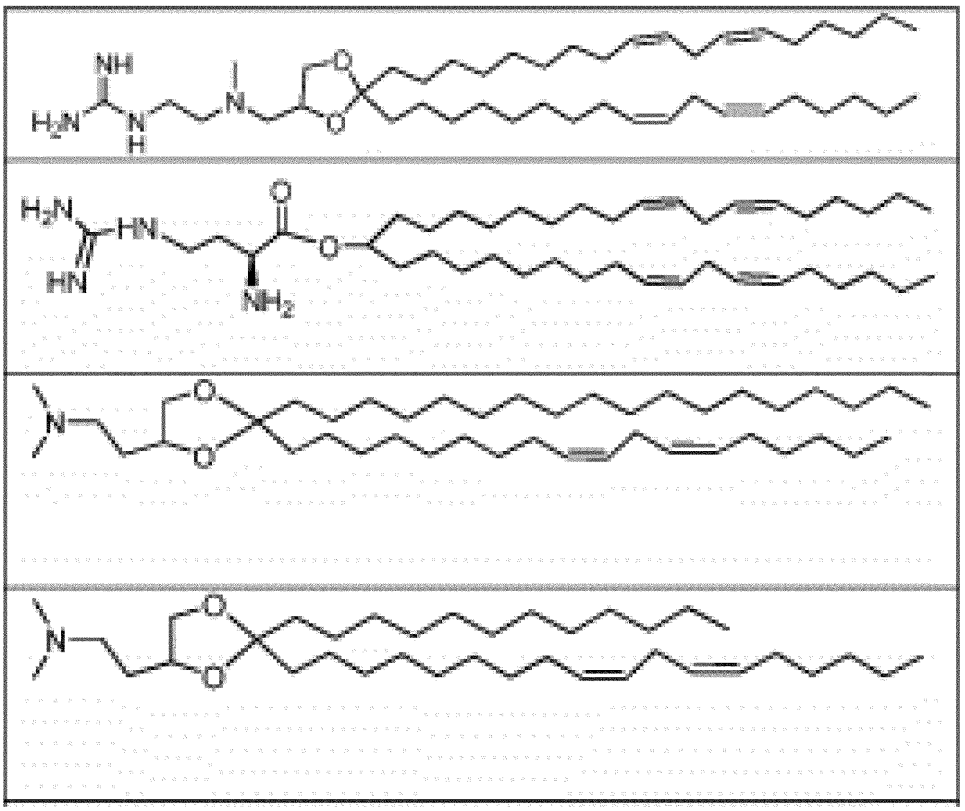
【表１１－１７】



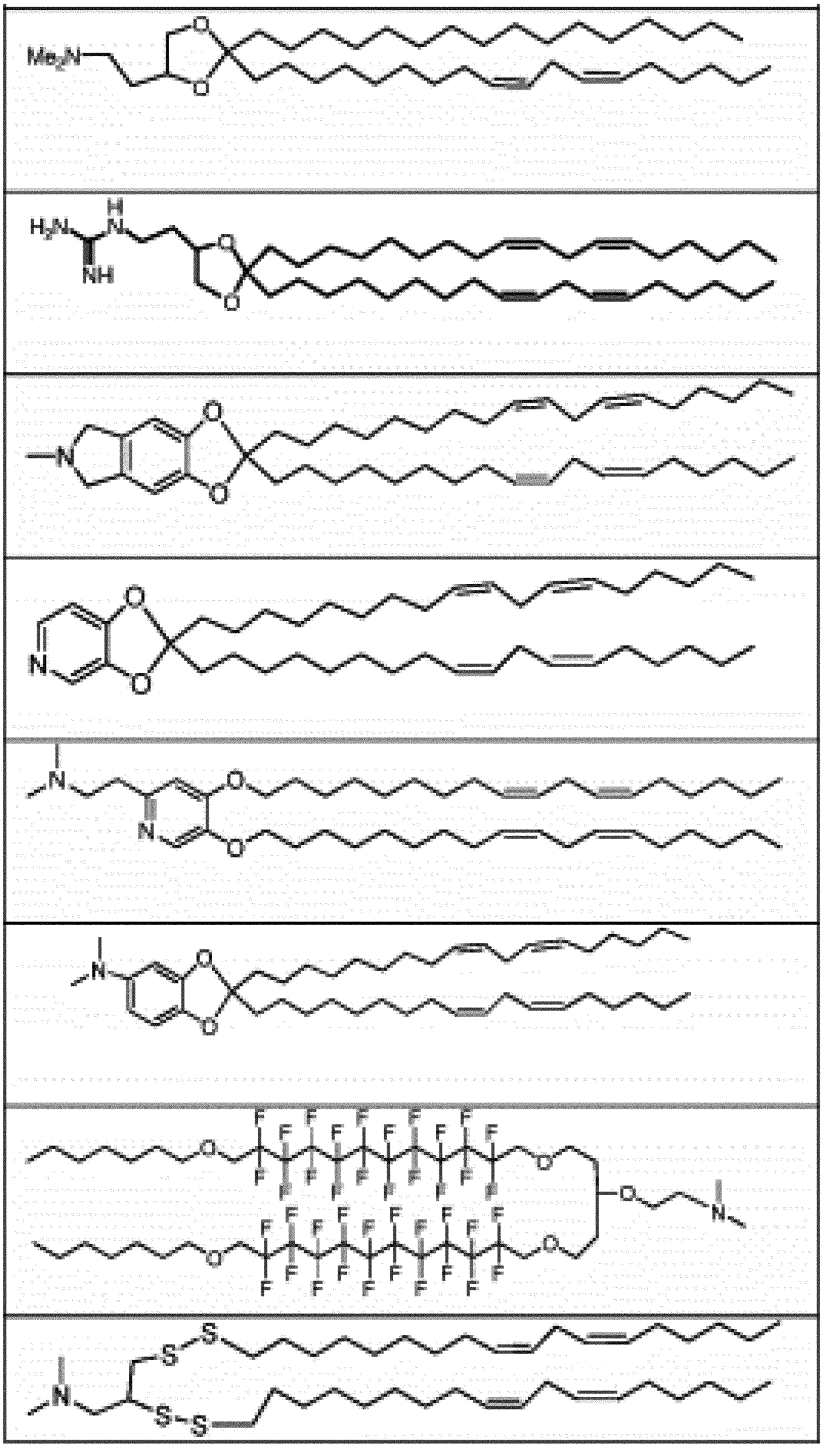
【表１１－１８】



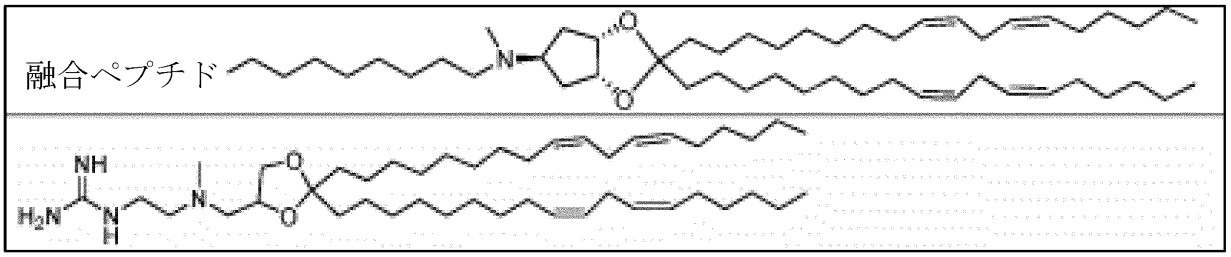
【表１１－１９】

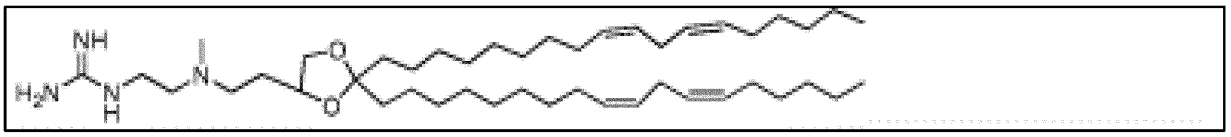


【表１１－２０】

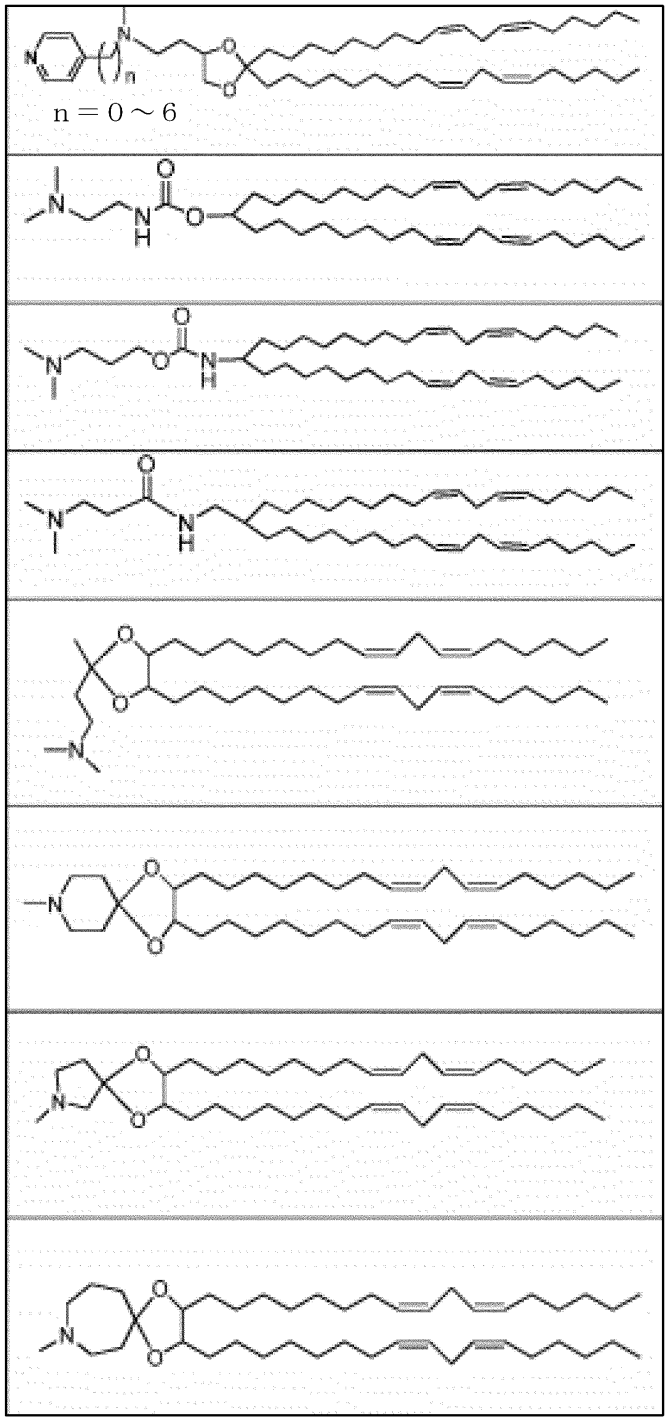


【表１１－２１】

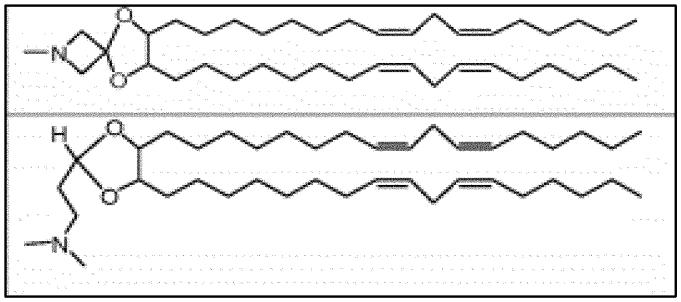
融合ペプチド 

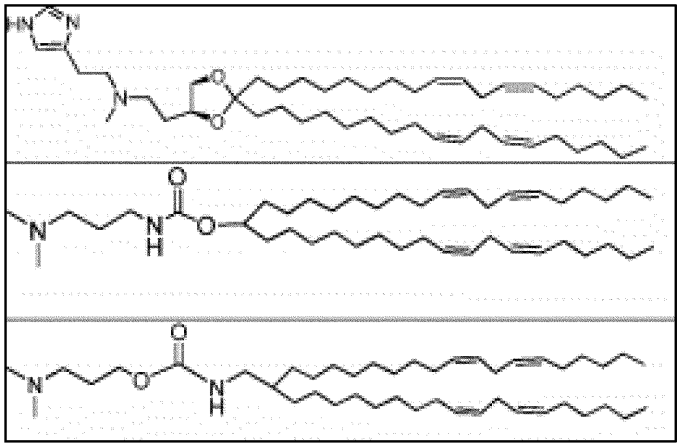


【表１１－２２】

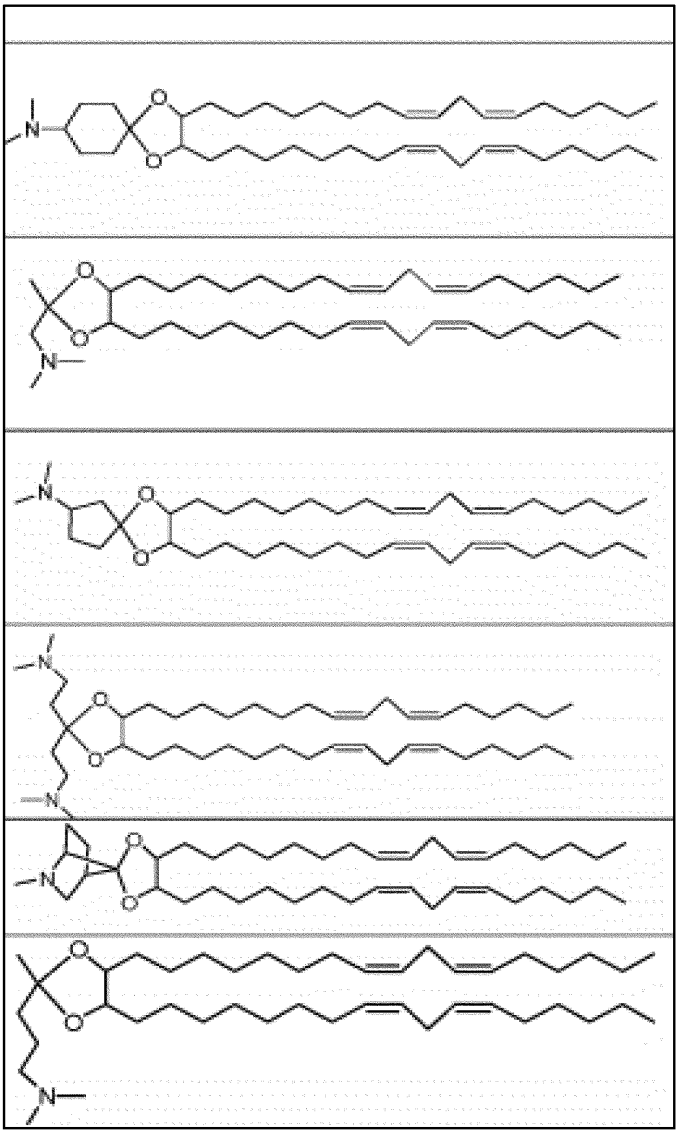


【表１１－２３】

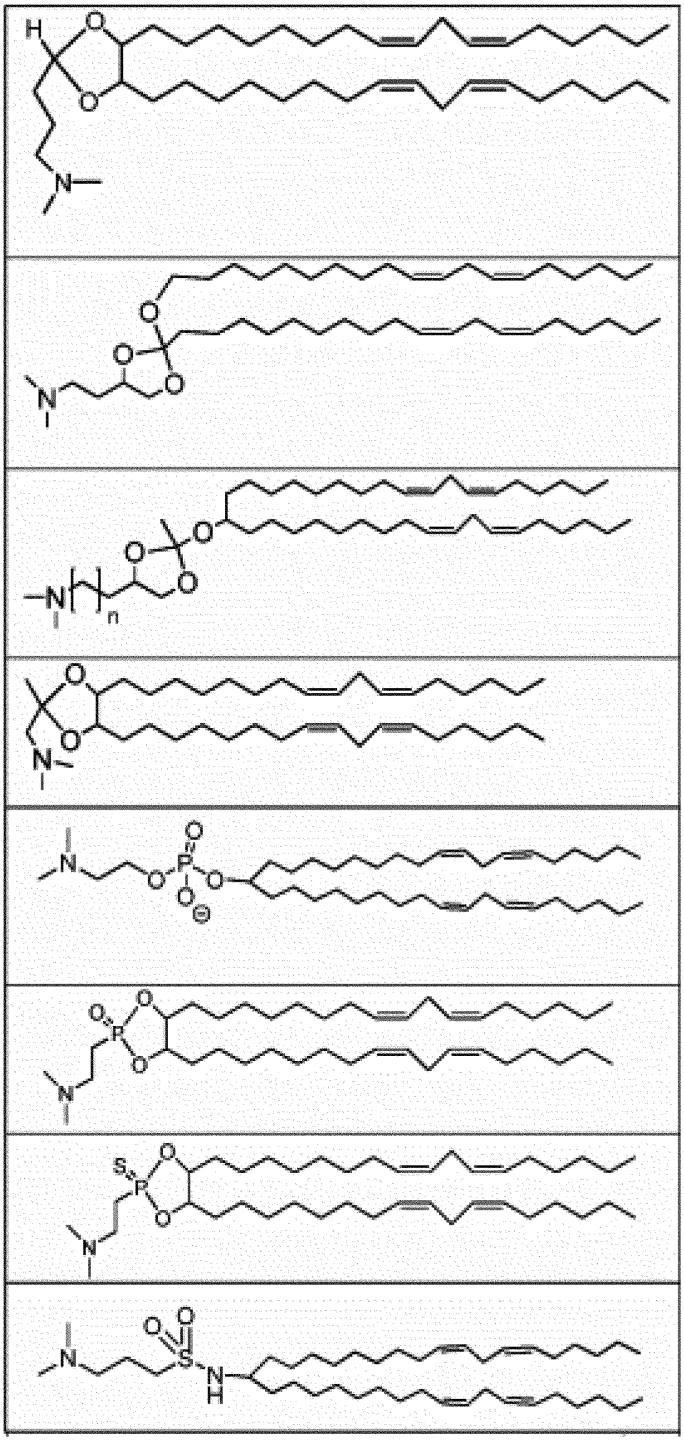




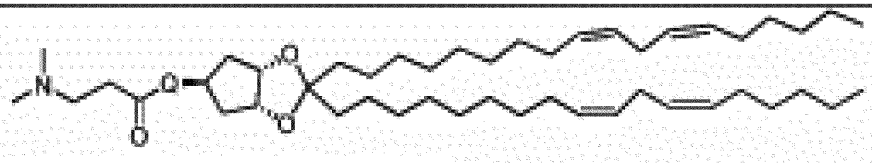
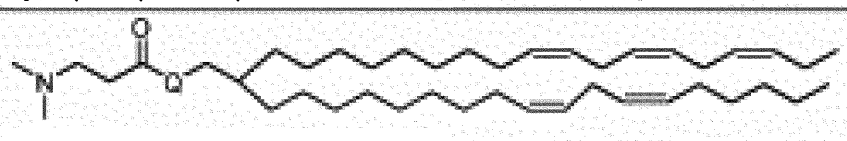
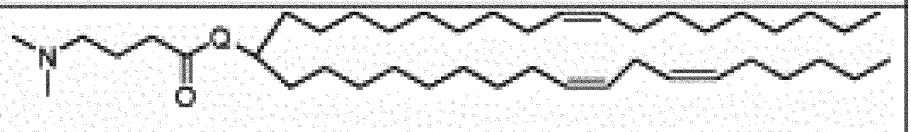
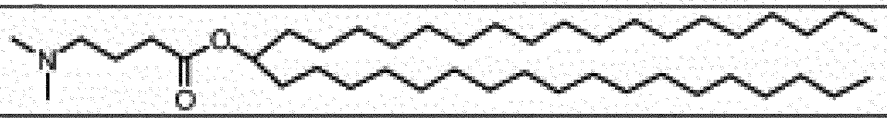
【表１１－２４】



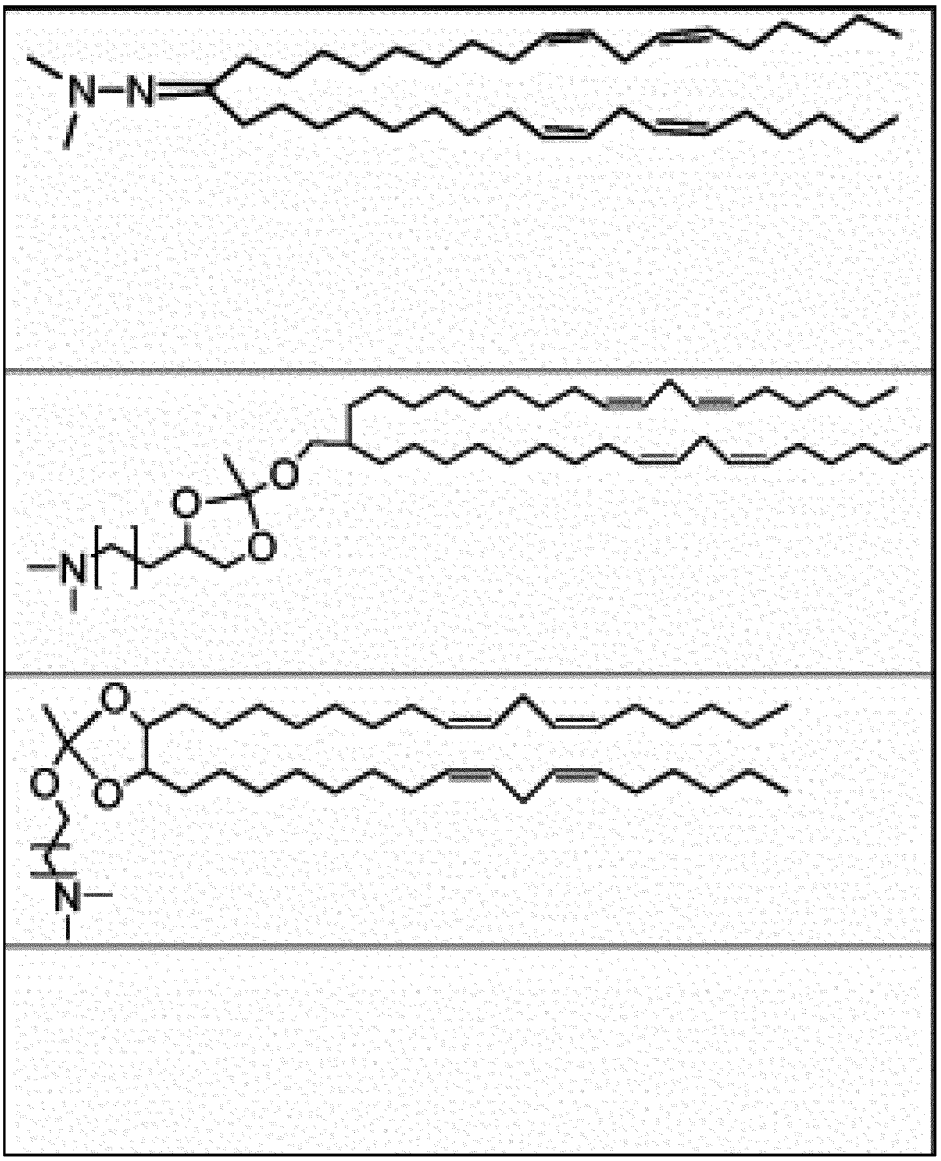
【表１１－２５】



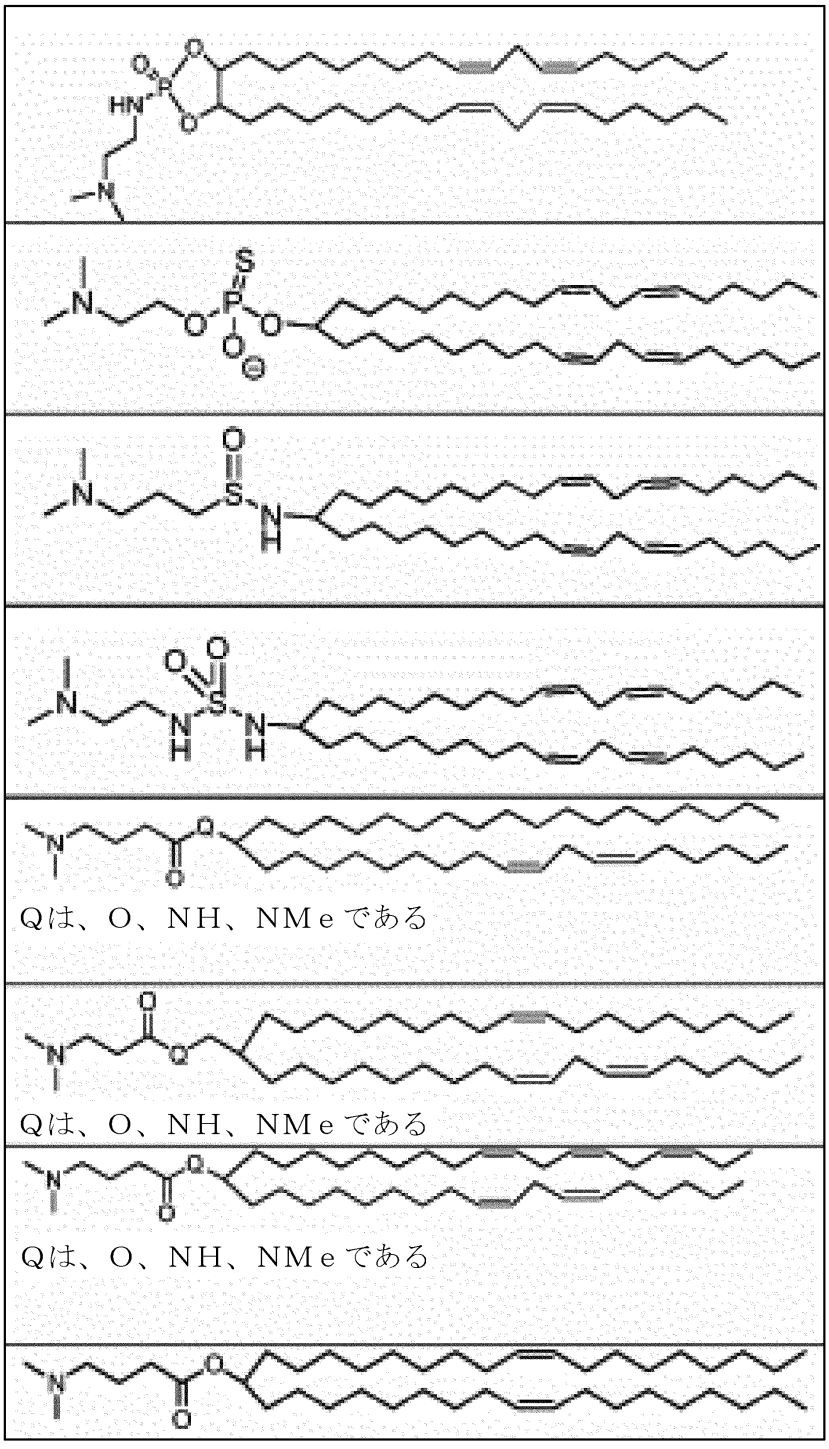
【表１１－２６】

| |
|---|
|  Ｑは、Ｏ、ＮＨ、ＮＭｅである |
|  Ｑは、Ｏ、ＮＨ、ＮＭｅである |
|  Ｑは、Ｏ、ＮＨ、ＮＭｅである |
|  |

【表１１－２７】



【表１１－２８】

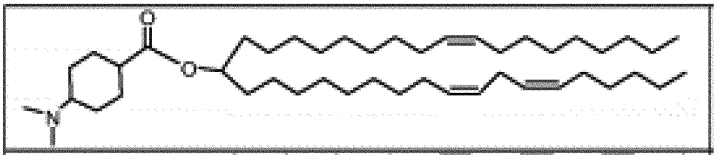
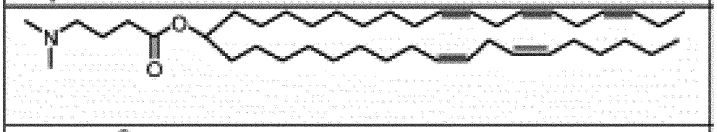
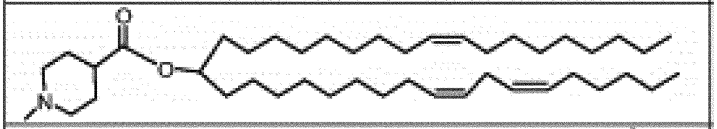
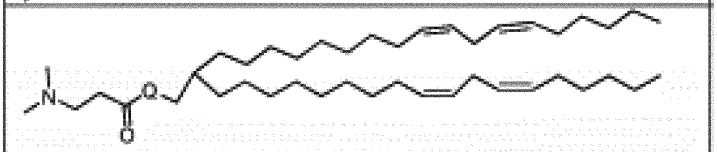
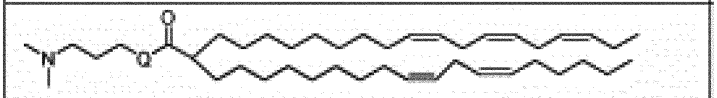
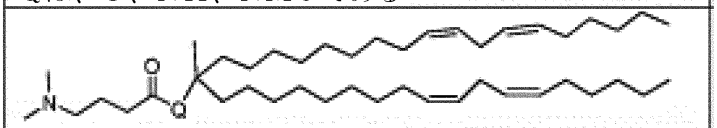
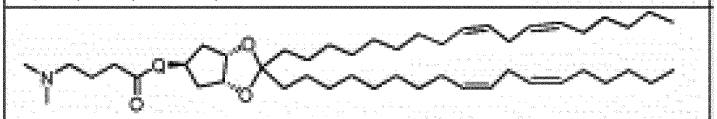
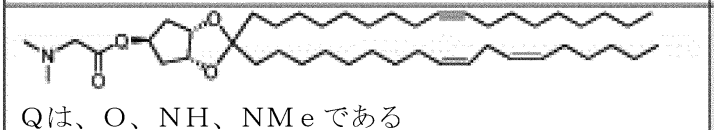
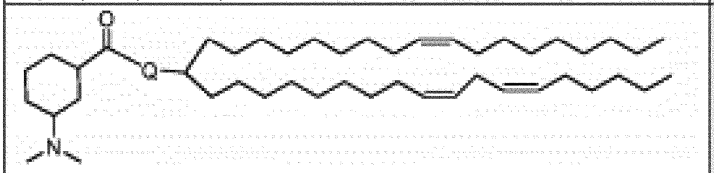


Ｑは、Ｏ、ＮＨ、ＮＭｅである

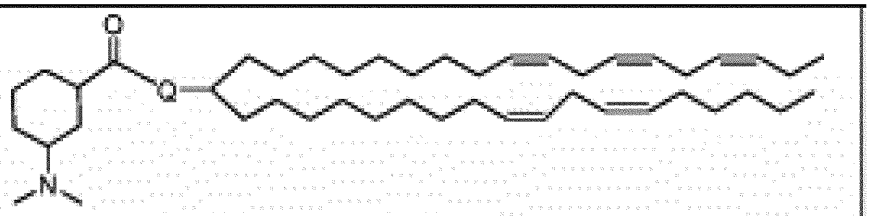
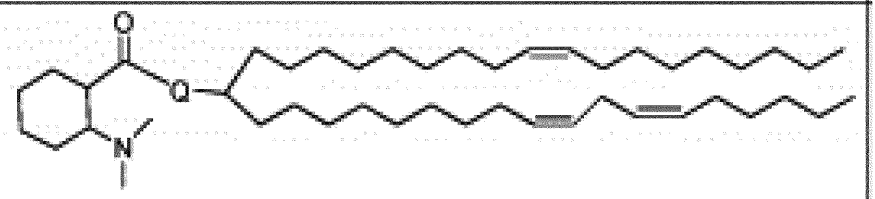
Ｑは、Ｏ、ＮＨ、ＮＭｅである

Ｑは、Ｏ、ＮＨ、ＮＭｅである

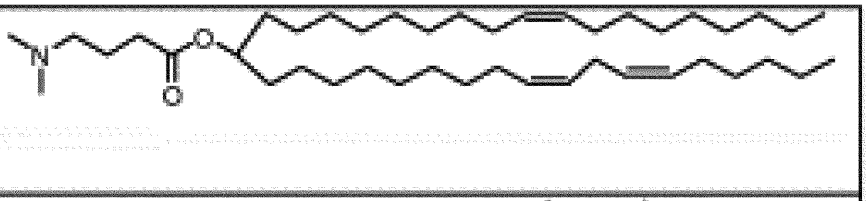
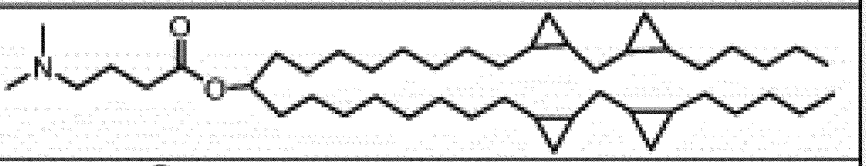
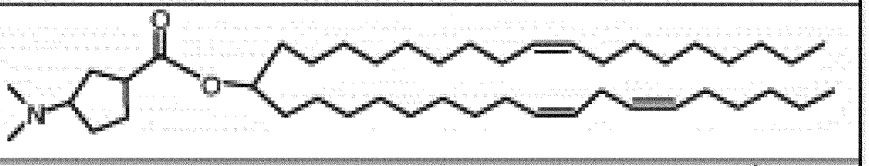
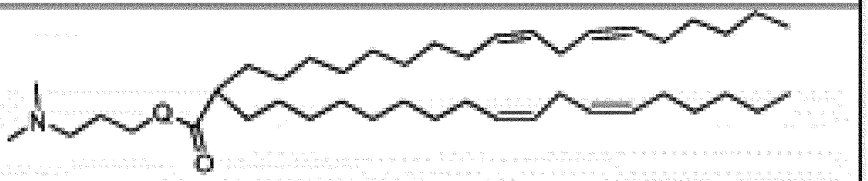
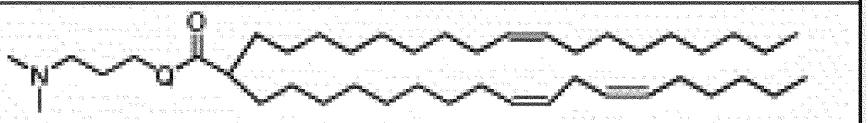
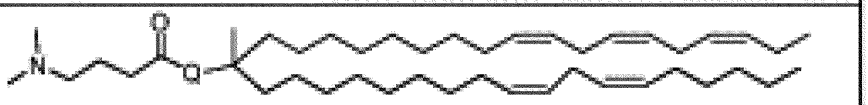
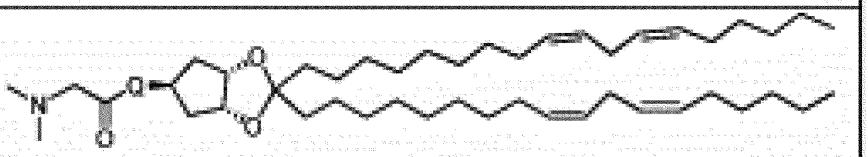
【表１１－２９】

| |
|---|
|  |
|  |
|  |
|  Ｑは、Ｏ、ＮＨ、ＮＭｅである |
|  Ｑは、Ｏ、ＮＨ、ＮＭｅである |
|  Ｑは、Ｏ、ＮＨ、ＮＭｅである |
|  Ｑは、Ｏ、ＮＨ、ＮＭｅである |
|  Ｑは、Ｏ、ＮＨ、ＮＭｅである |
| Ｑは、Ｏ、ＮＨ、ＮＭｅである |
|  Ｑは、Ｏ、ＮＨ、ＮＭｅである |

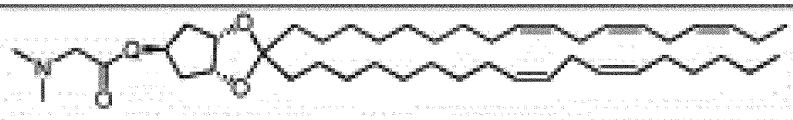
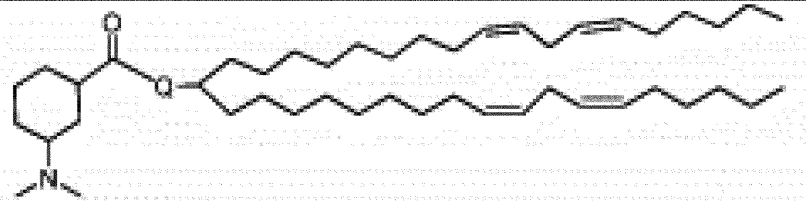
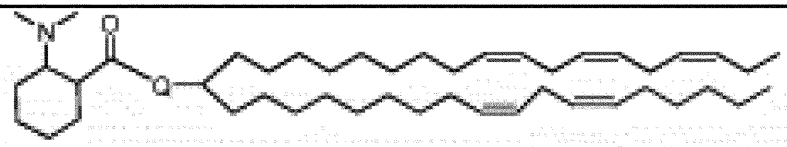
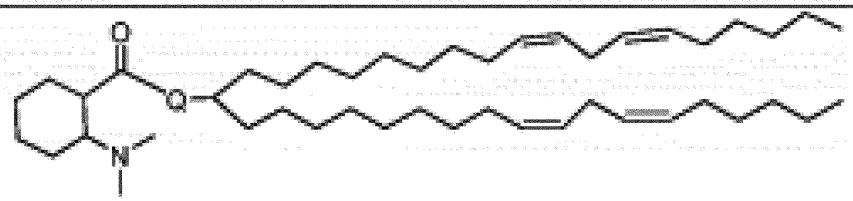
【表１１－３０】

| | |
|---|---|
|  | Ｑは、Ｏ、ＮＨ、ＮＭｅである |
|  | Ｑは、Ｏ、ＮＨ、ＮＭｅである |

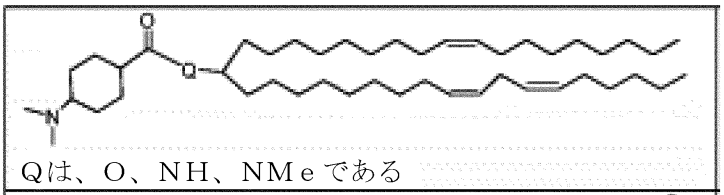
【表１１－３１】

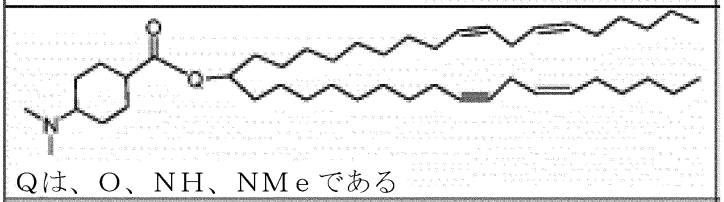
| | |
|---|---|
|  | |
|  | |
|  | |
|  | Ｑは、Ｏ、ＮＨ、ＮＭｅである |
|  | Ｑは、Ｏ、ＮＨ、ＮＭｅである |
|  | Ｑは、Ｏ、ＮＨ、ＮＭｅである |
|  | Ｑは、Ｏ、ＮＨ、ＮＭｅである |

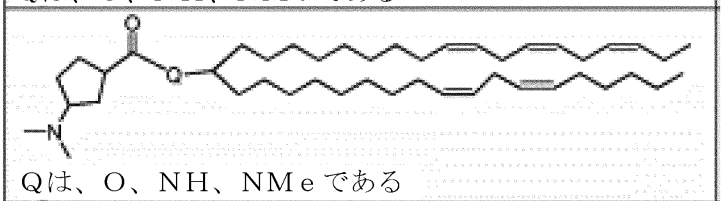
【表１１－３２】

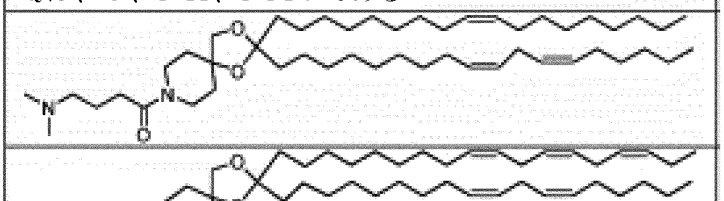
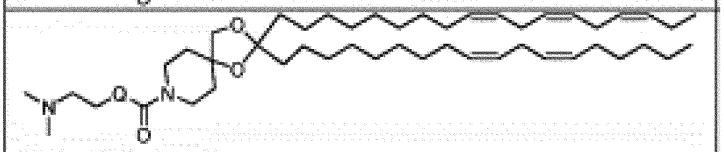
| |
|---|
| <br>Ｑは、Ｏ、ＮＨ、ＮＭｅである |
|  <br>Ｑは、Ｏ、ＮＨ、ＮＭｅである |
|  <br>Ｑは、Ｏ、ＮＨ、ＮＭｅである |
|  <br>Ｑは、Ｏ、ＮＨ、ＮＭｅである |
|  <br>Ｑは、Ｏ、ＮＨ、ＮＭｅである |

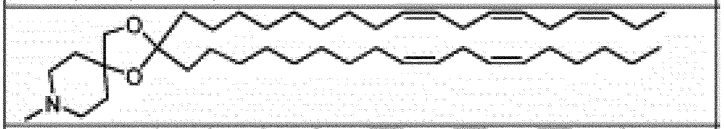
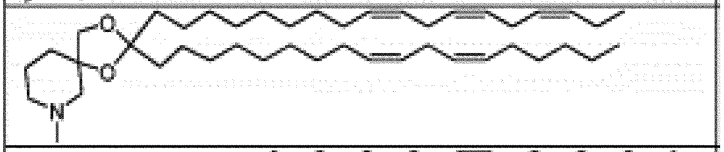
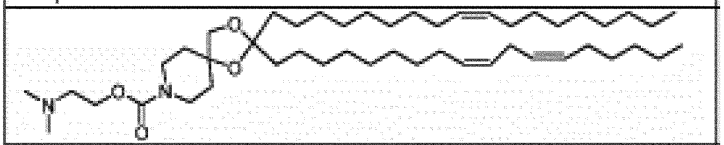
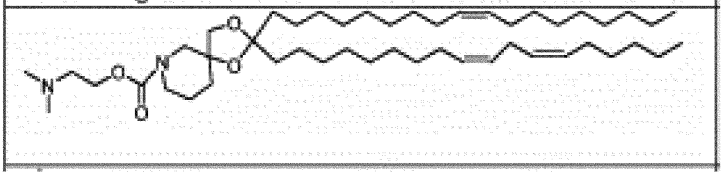
【表１１－３３】


Ｑは、Ｏ、ＮＨ、ＮＭｅである

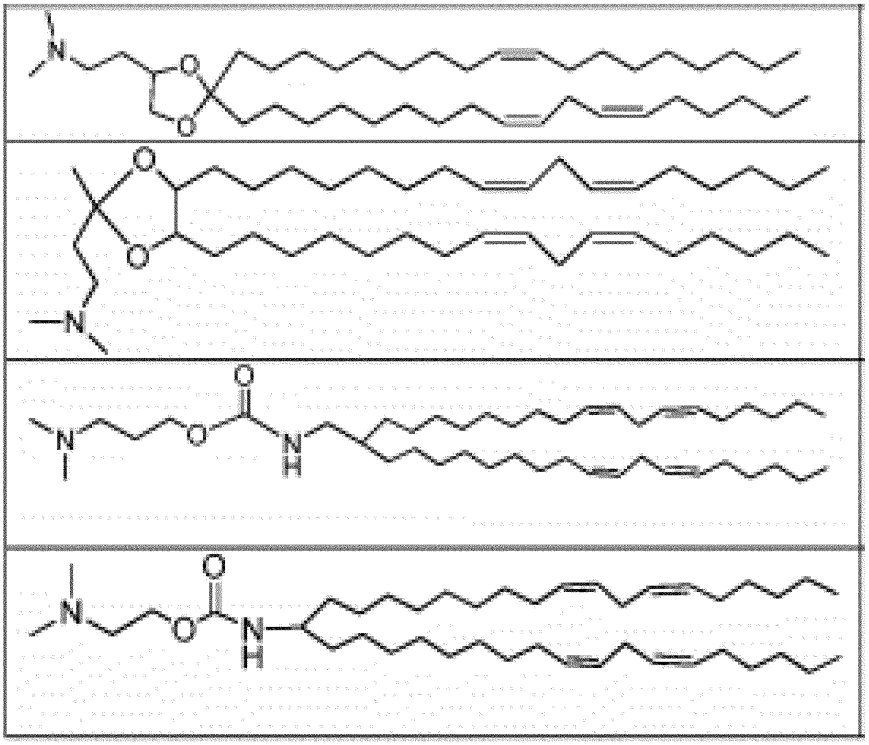

Ｑは、Ｏ、ＮＨ、ＮＭｅである


Ｑは、Ｏ、ＮＨ、ＮＭｅである

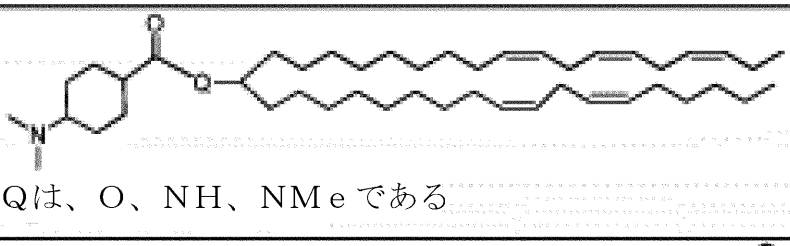
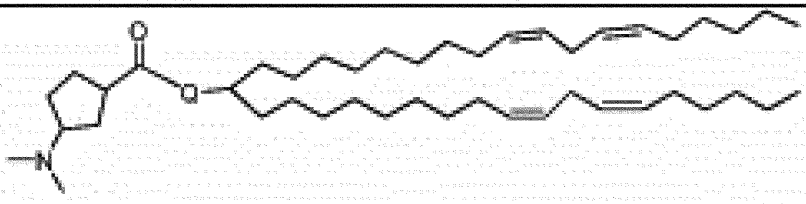
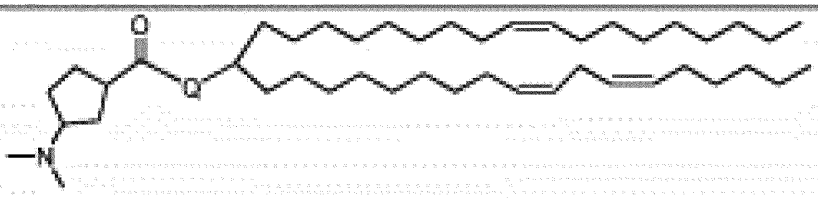
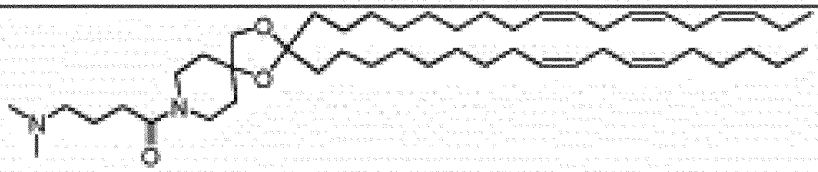
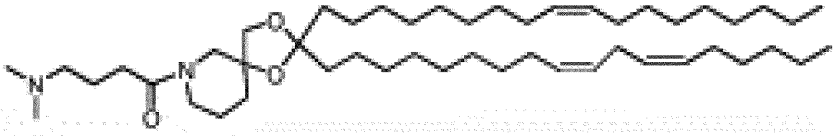


Ｑは、Ｏ、ＮＨ、ＮＭｅである

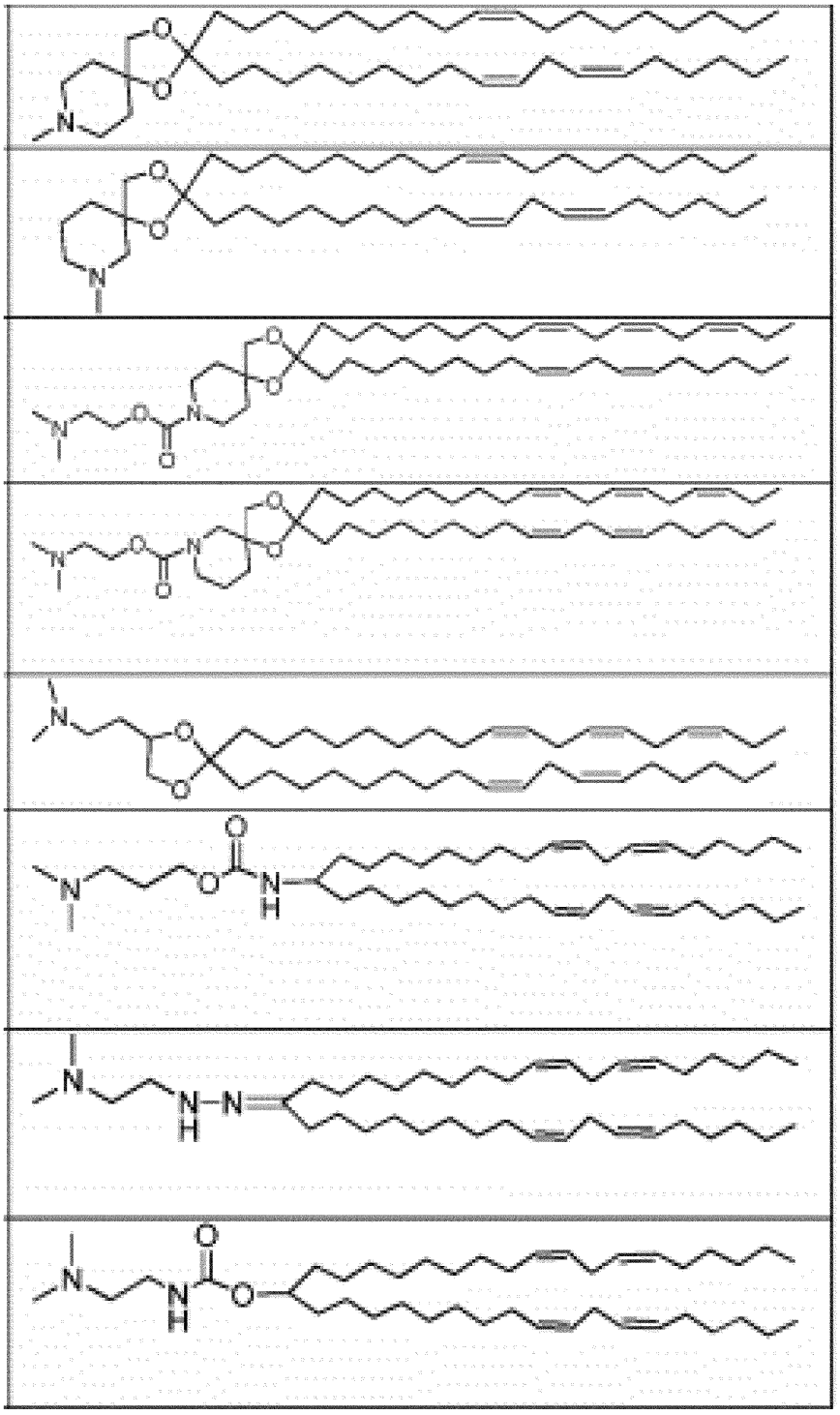
【表１１－３４】



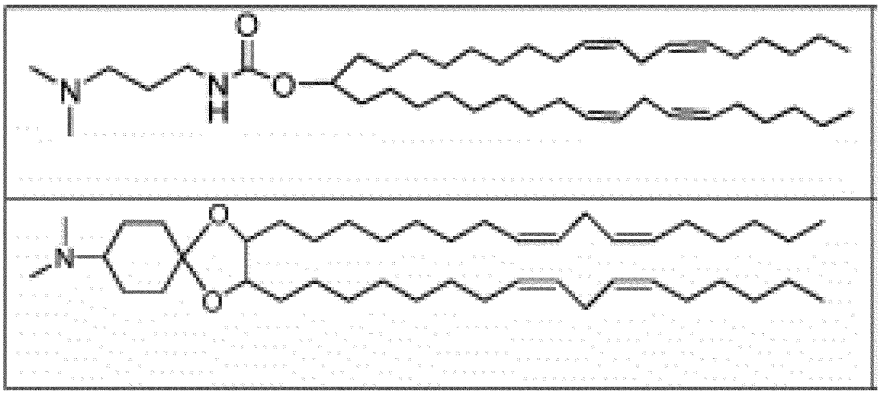
【表１１－３５】

| |
|---|
|  Ｑは、Ｏ、ＮＨ、ＮＭｅである |
|  Ｑは、Ｏ、ＮＨ、ＮＭｅである |
|  Ｑは、Ｏ、ＮＨ、ＮＭｅである |
|  |
|  |

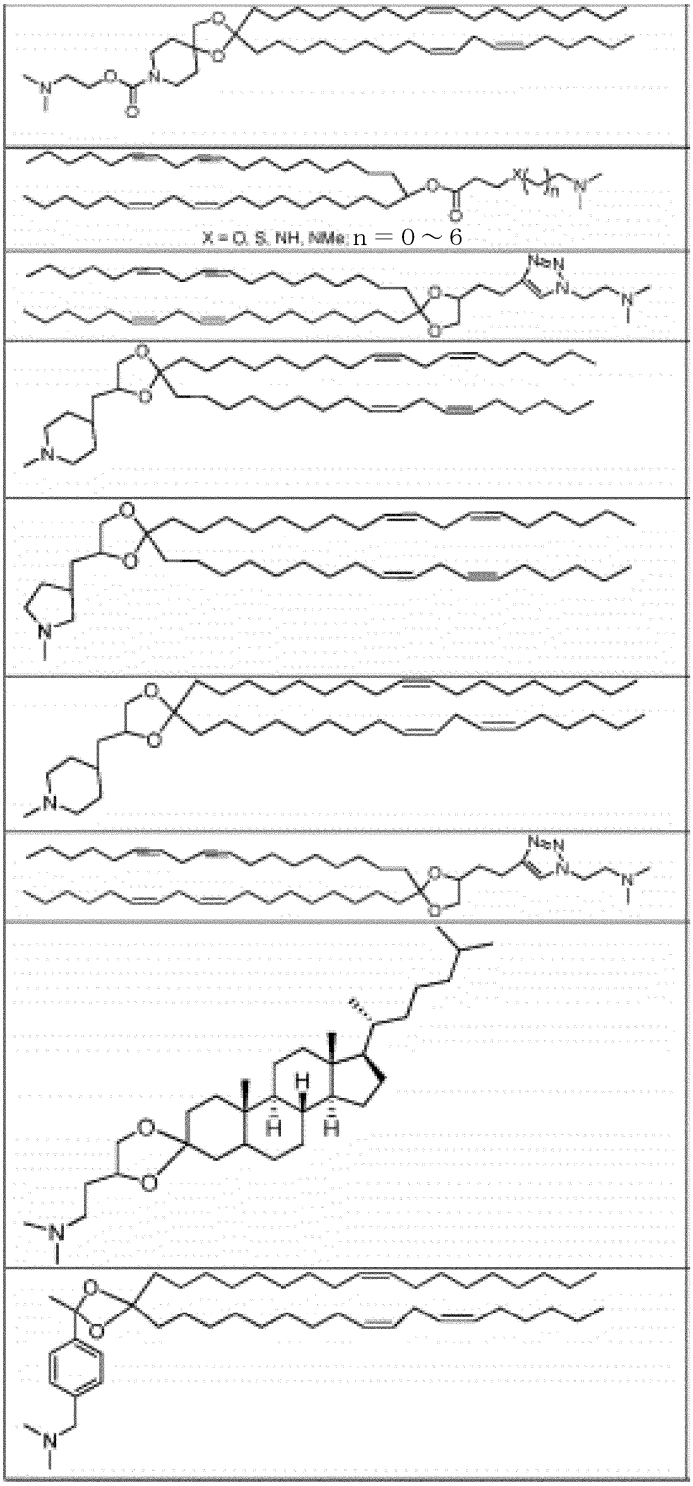
【表１１－３６】



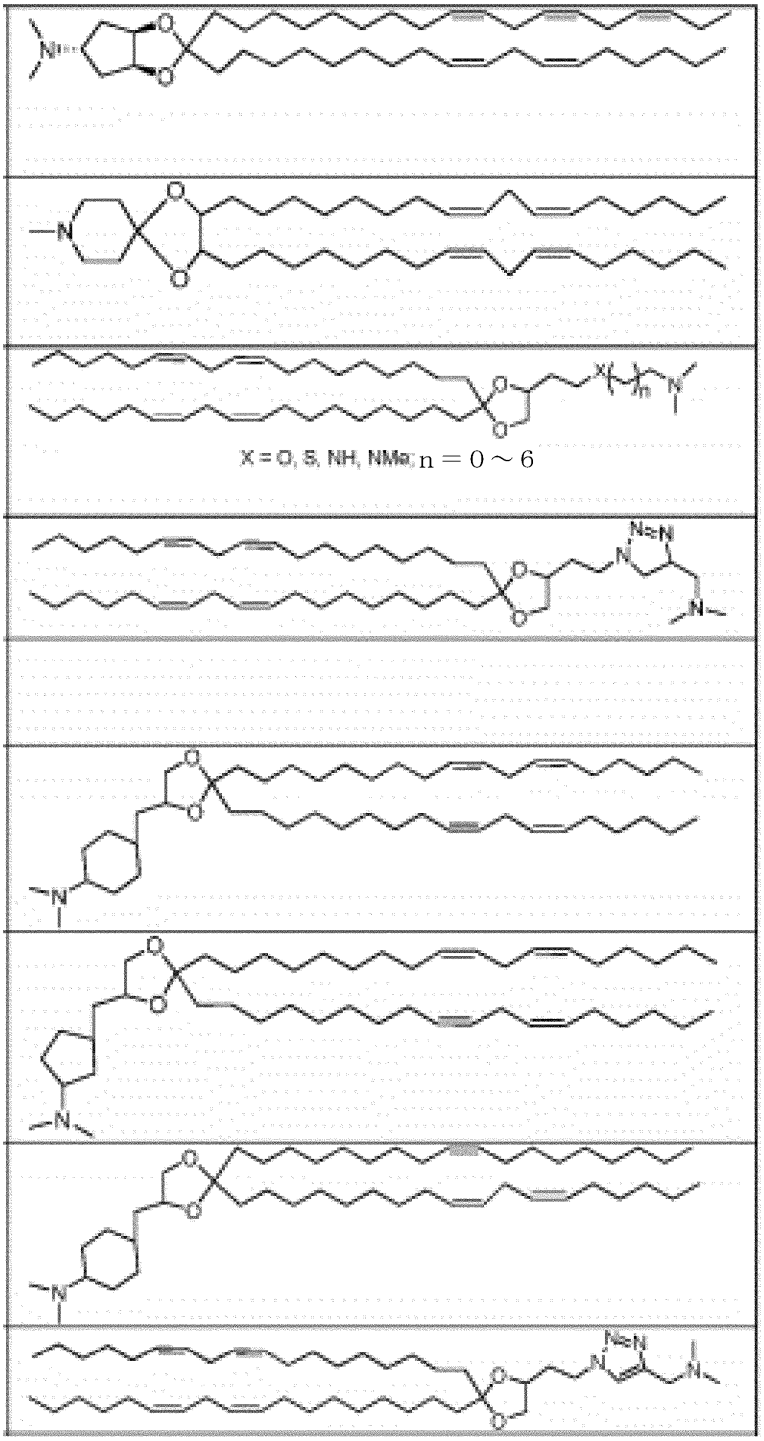
【表１１－３７】



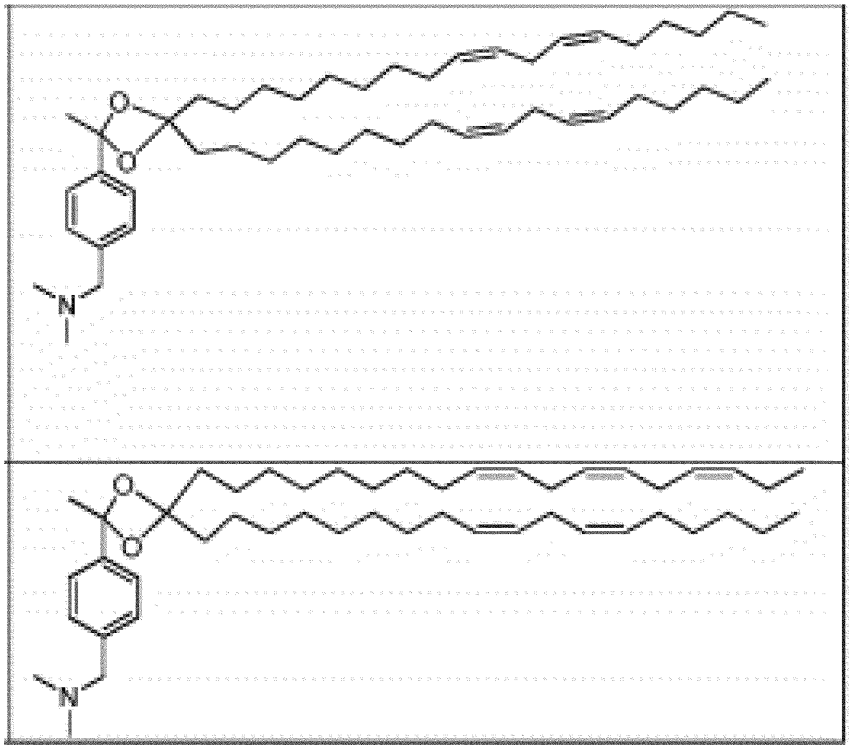
【表１１－３８】



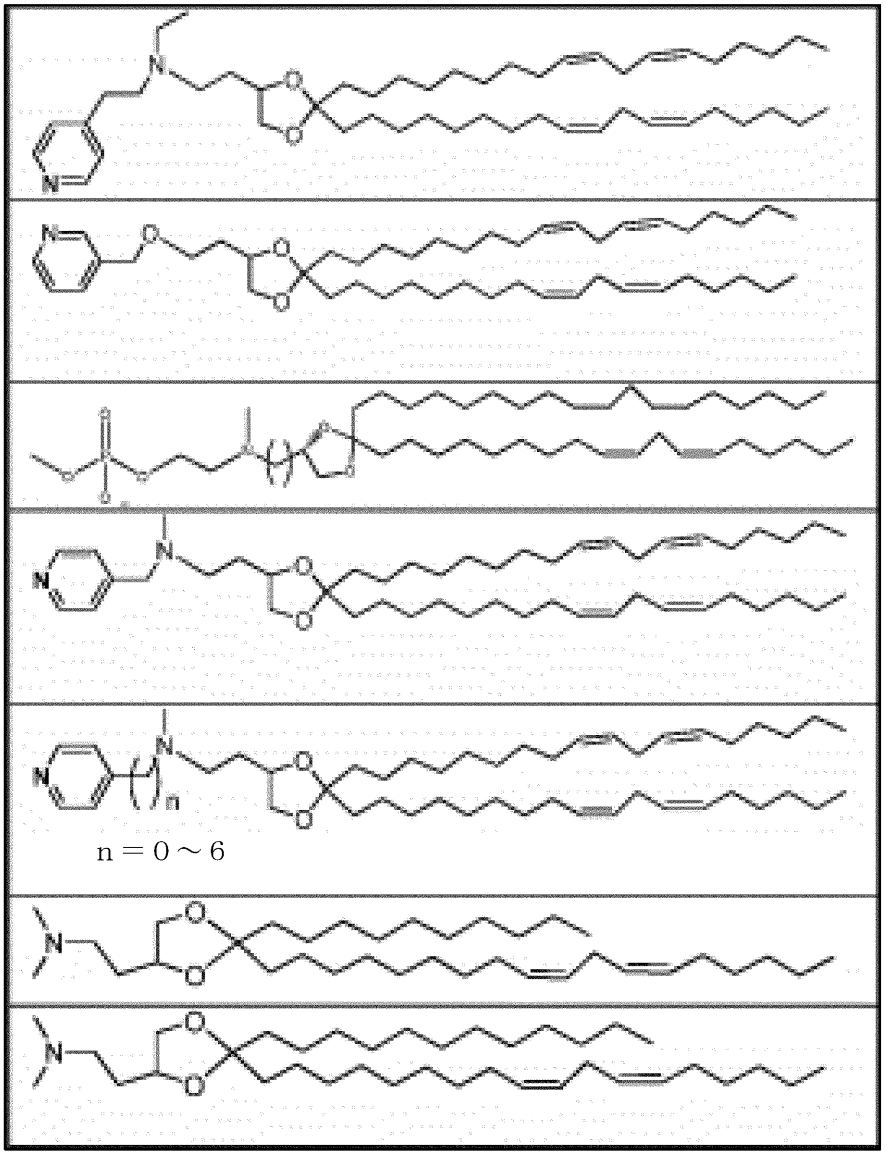
【表１１－３９】



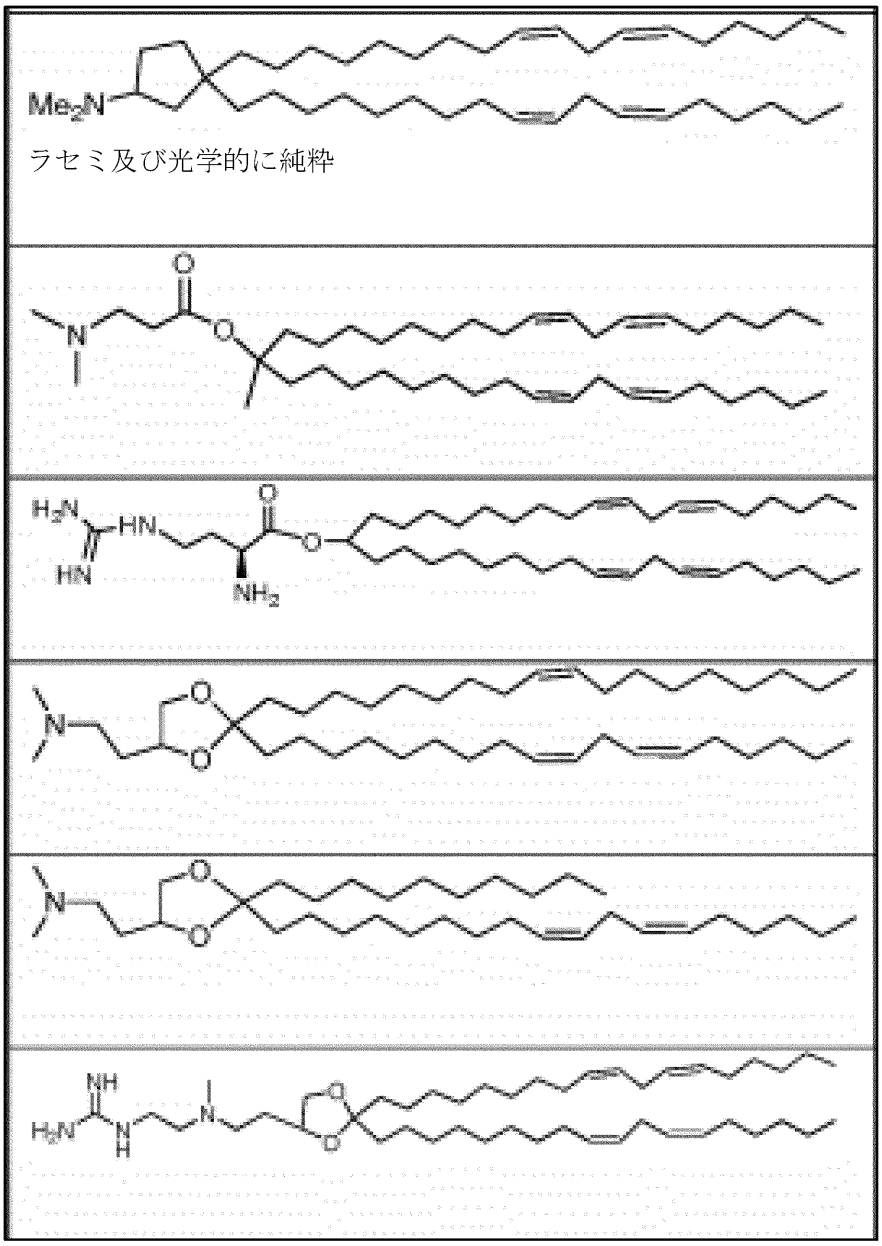
【表１１－４０】



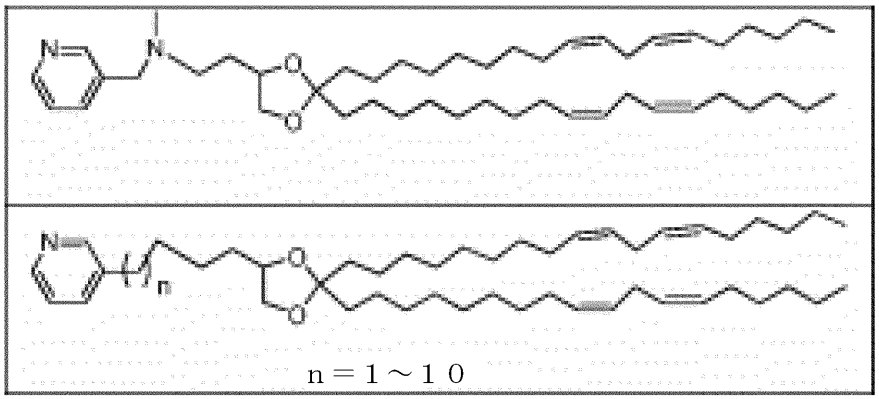
【表１１－４１】

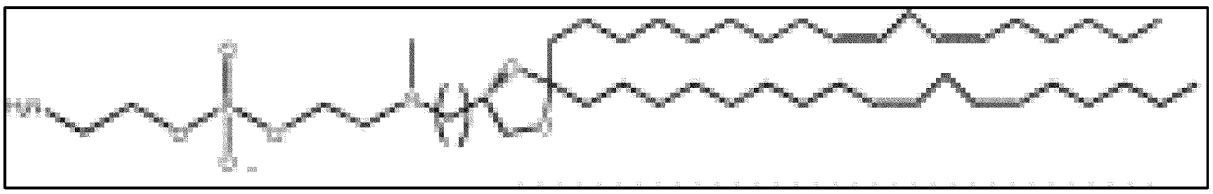


【表１１－４２】

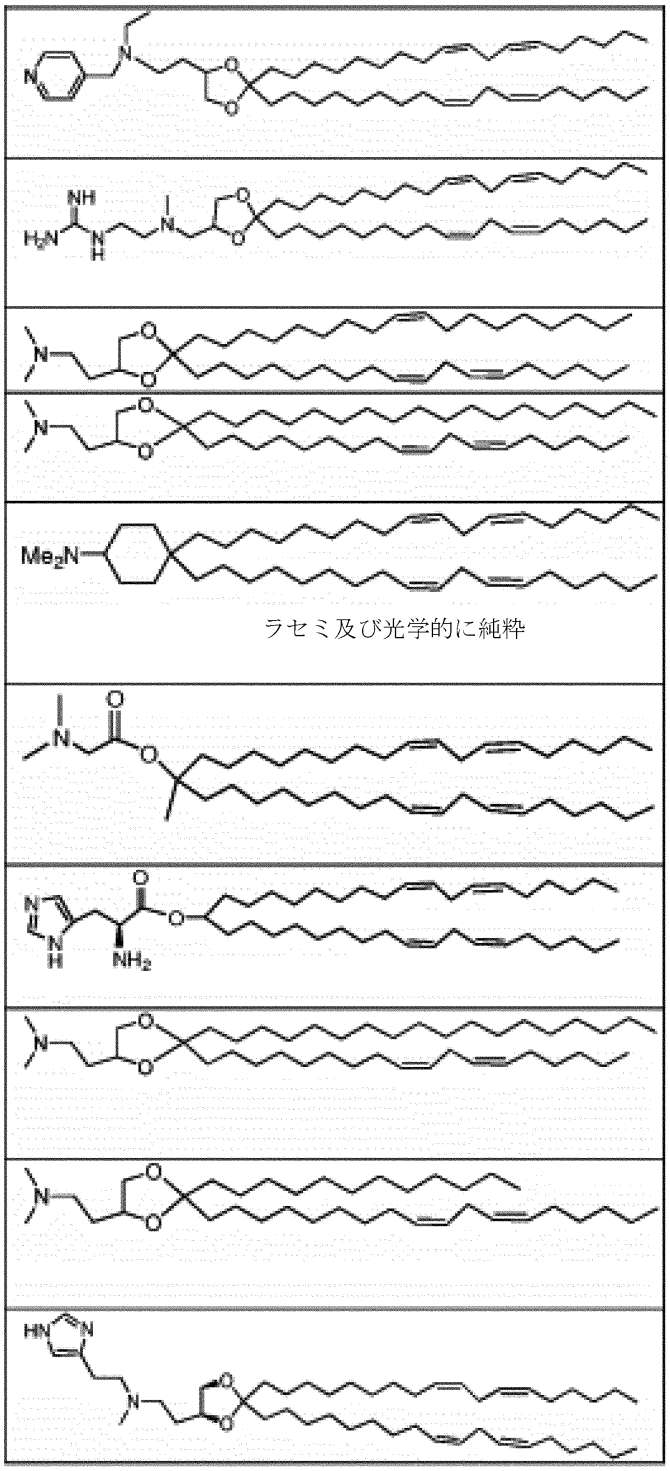


【表１１－４３】



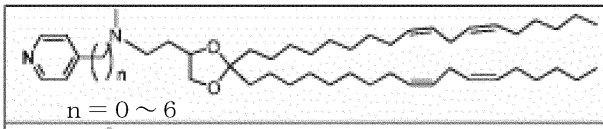
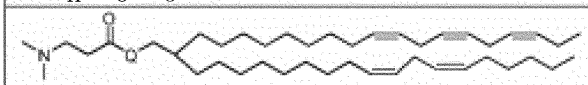
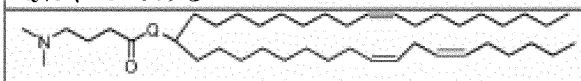
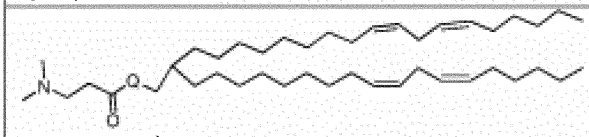
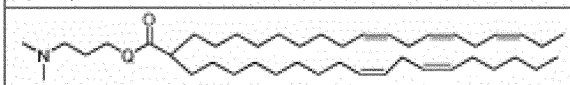
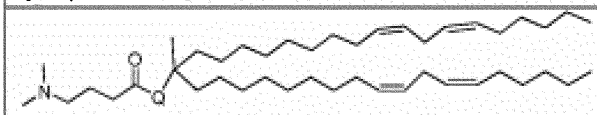
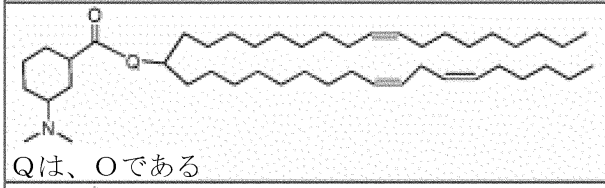
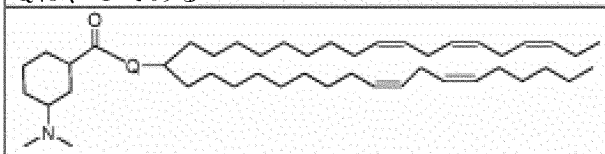
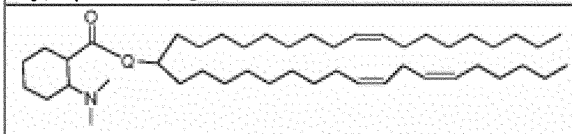
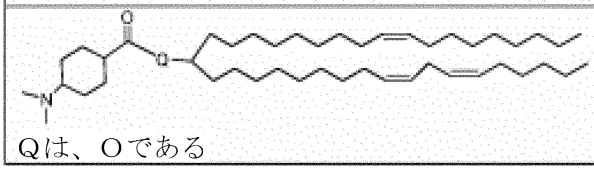



【表１１－４４】

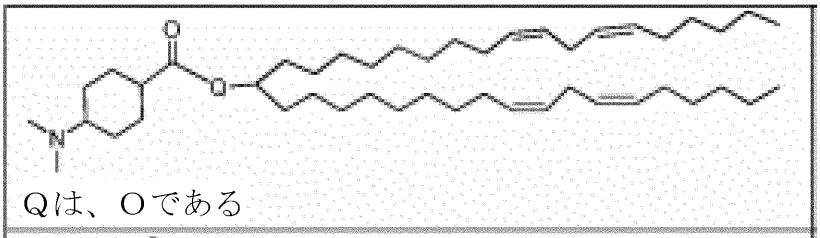


ラセミ及び光学的に純粋

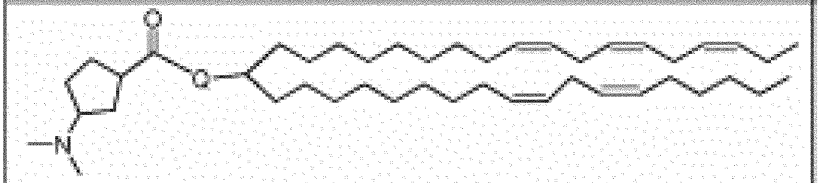
【表１１－４５】

| | |
|---|---|
|  n＝0～6 | |
|  Qは、Oである | |
|  Qは、Oである | |
|  Qは、Oである | |
|  Qは、Oである | |
|  Qは、Oである | |
|  Qは、Oである | |
|  Qは、Oである | |
|  Qは、Oである | |
|  Qは、Oである | |

【表１１－４６】

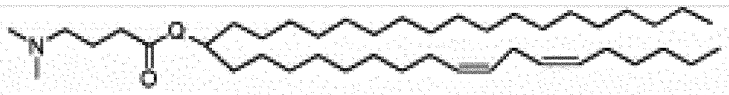
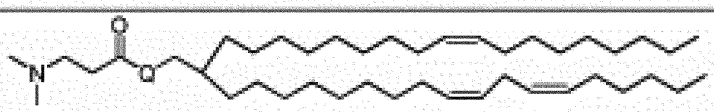
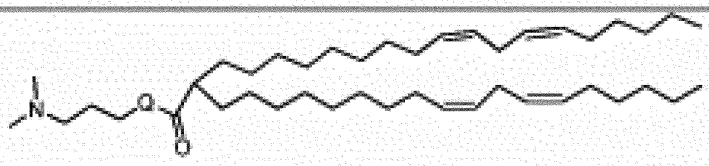
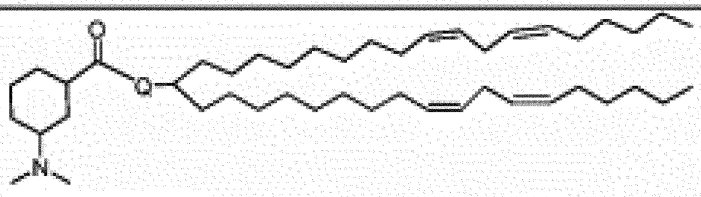
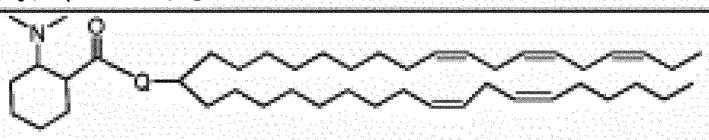



Ｑは、Ｏである

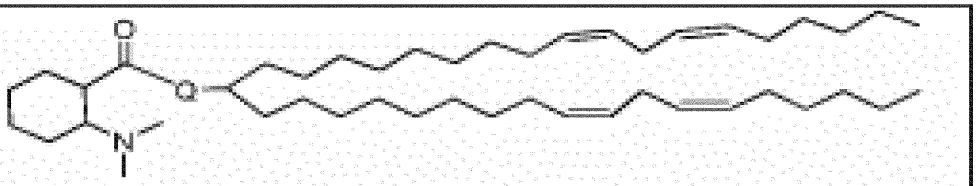
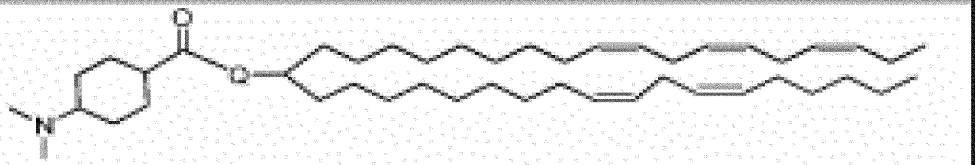
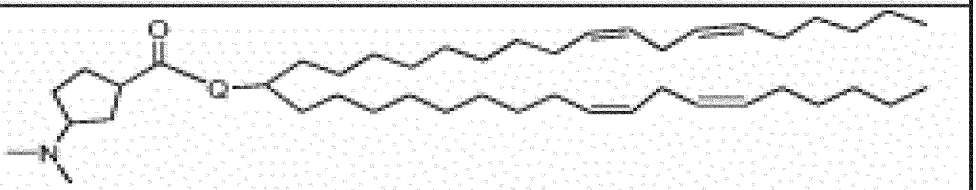
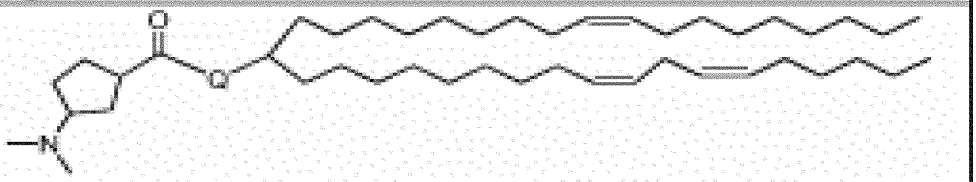



Ｑは、Ｏである

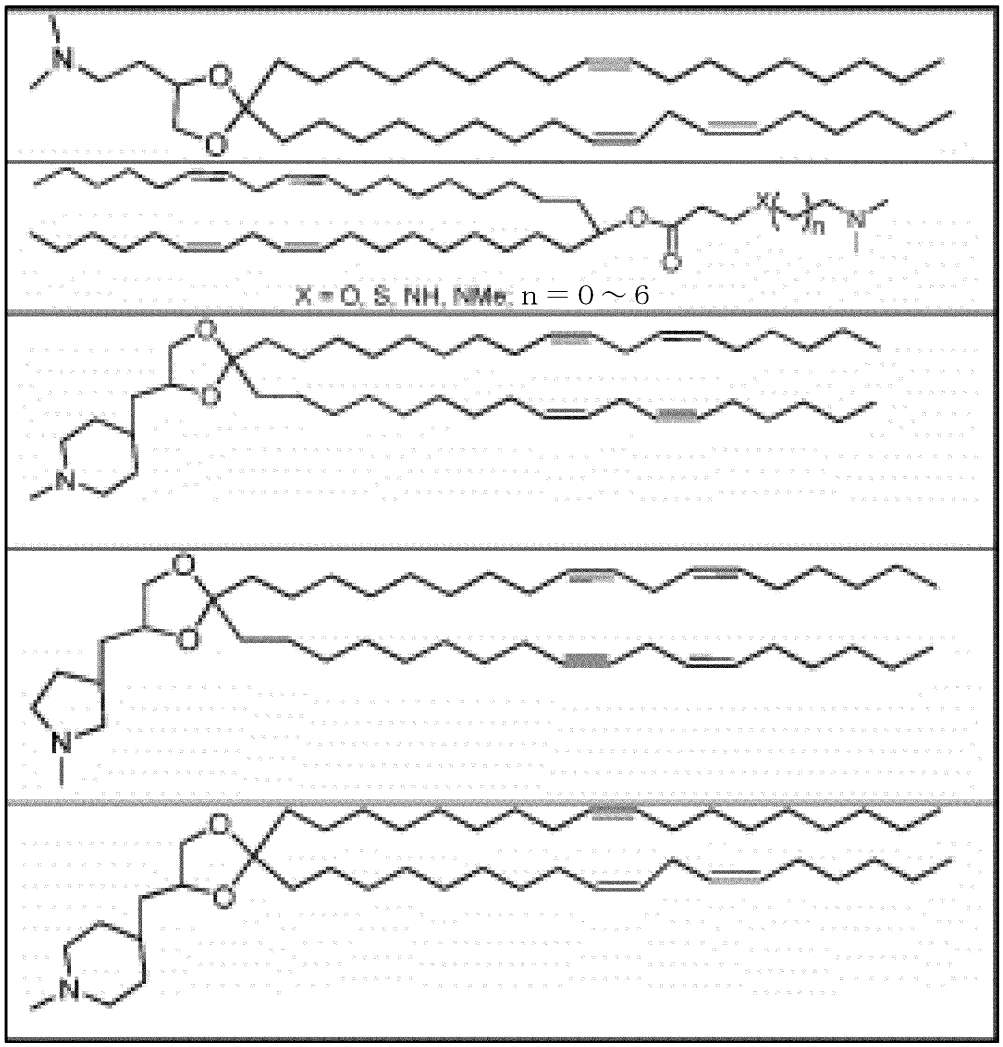
【表１１－４７】

| |
|---|
|  Ｑは、Ｏである |
|  Ｑは、Ｏである |
| Ｑは、Ｏである |
|  Ｑは、Ｏである |
| Ｑは、Ｏである |
| Ｑは、Ｏである |
|  Ｑは、Ｏである |
|  Ｑは、Ｏである |

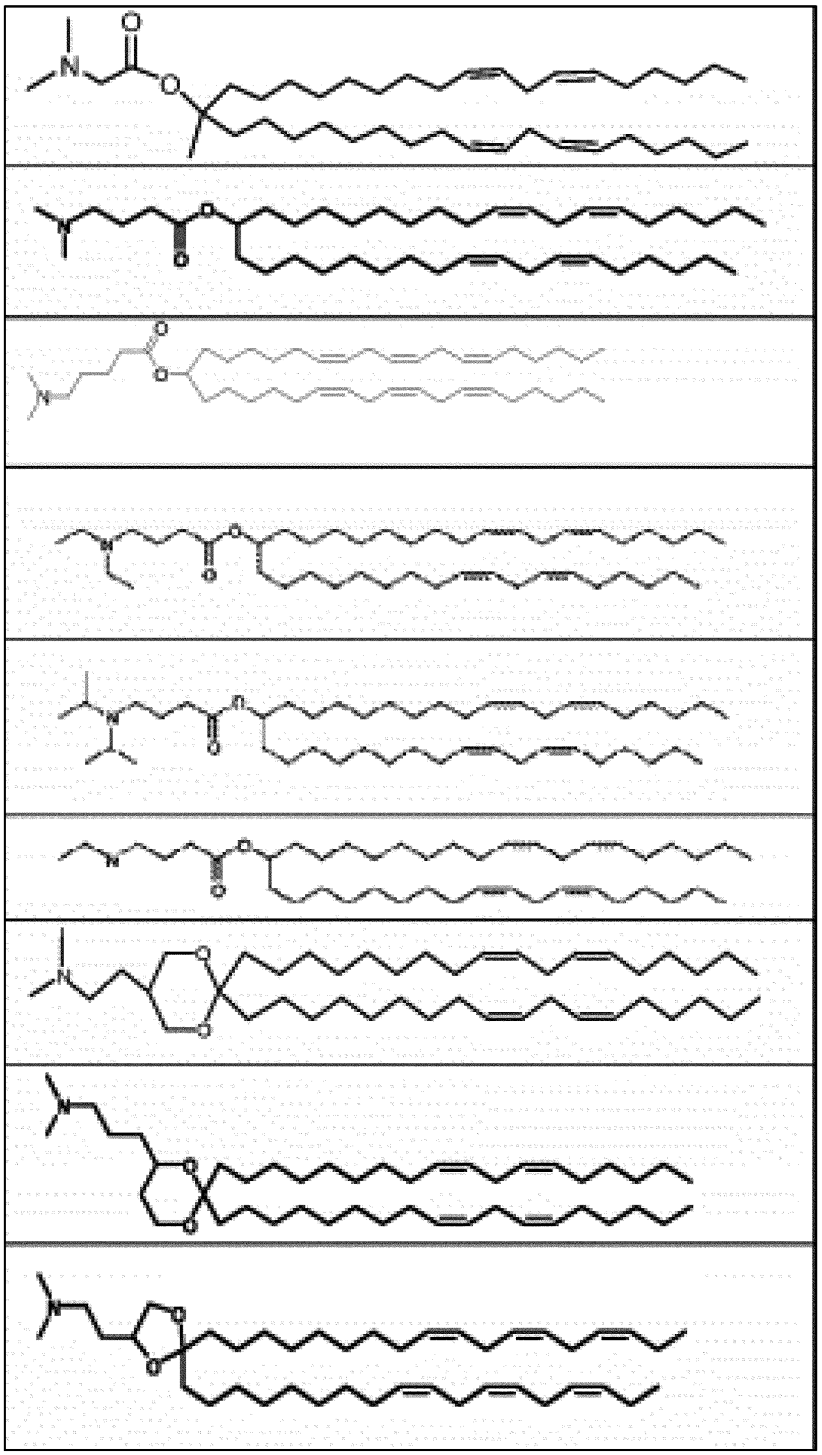
【表１１－４８】

| | |
|---|---|
|  | Ｑは、Ｏである |
|  | Ｑは、Ｏである |
|  | Ｑは、Ｏである |
|  | Ｑは、Ｏである |

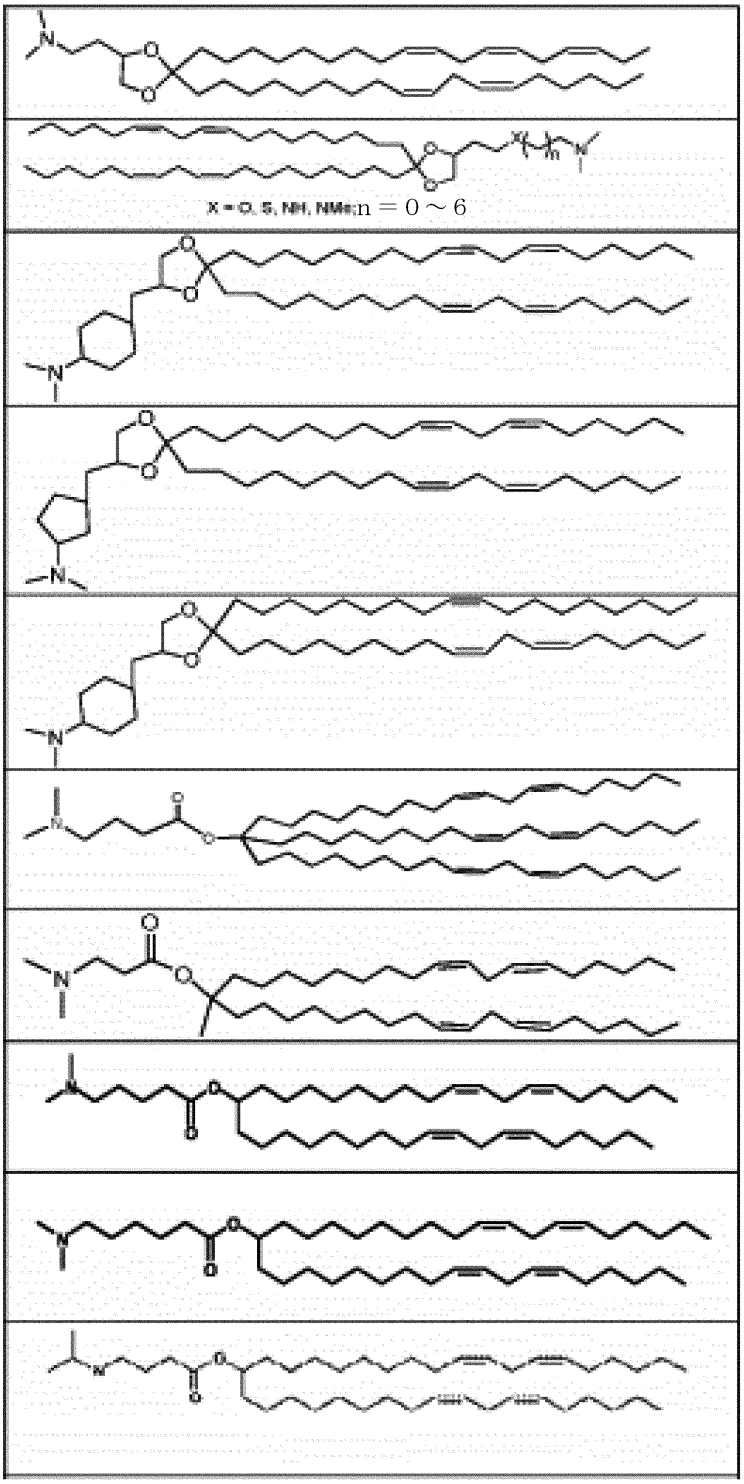
【表１１－４９】



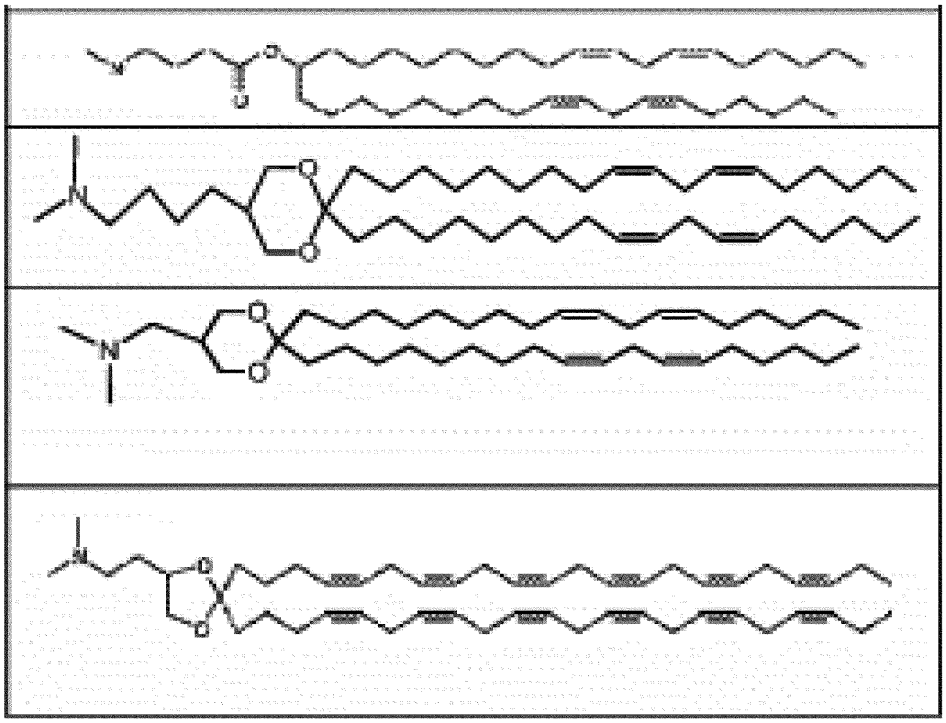
【表１１－５０】



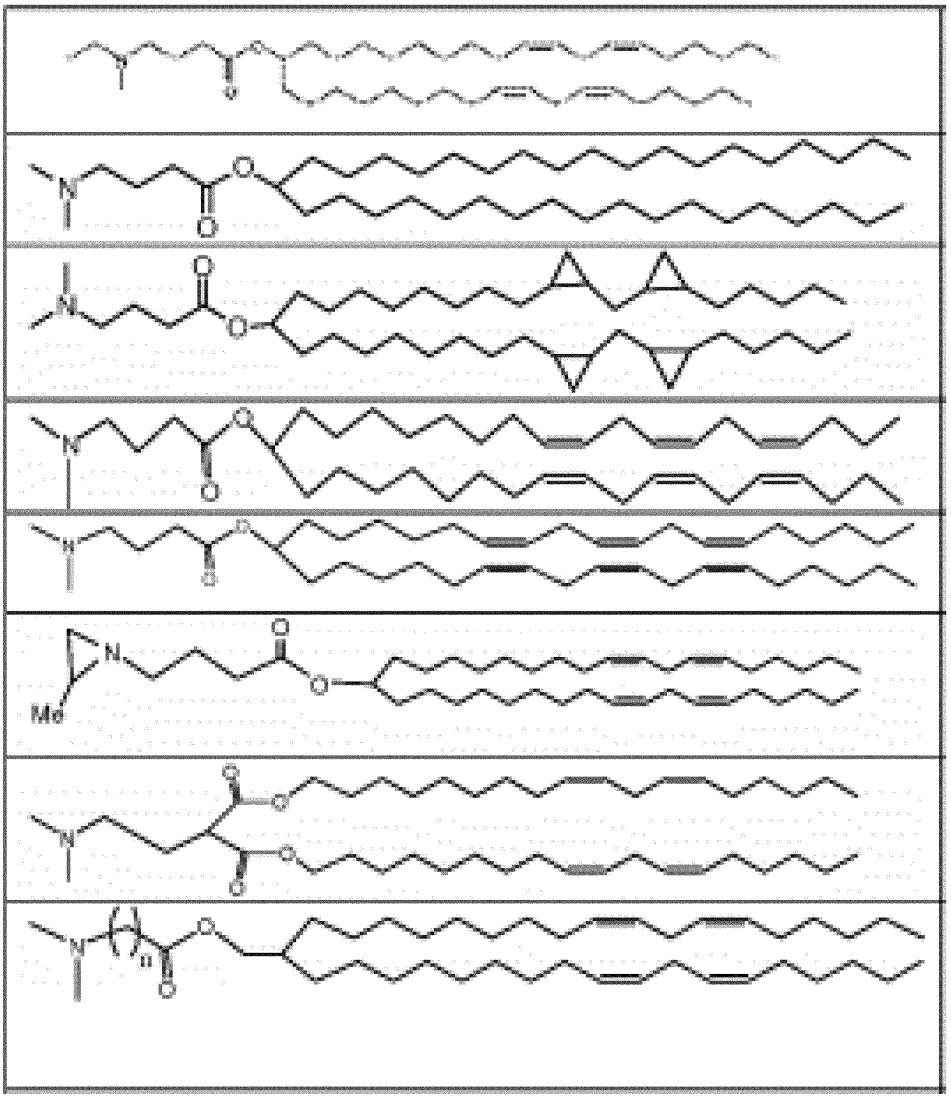
【表１１－５１】



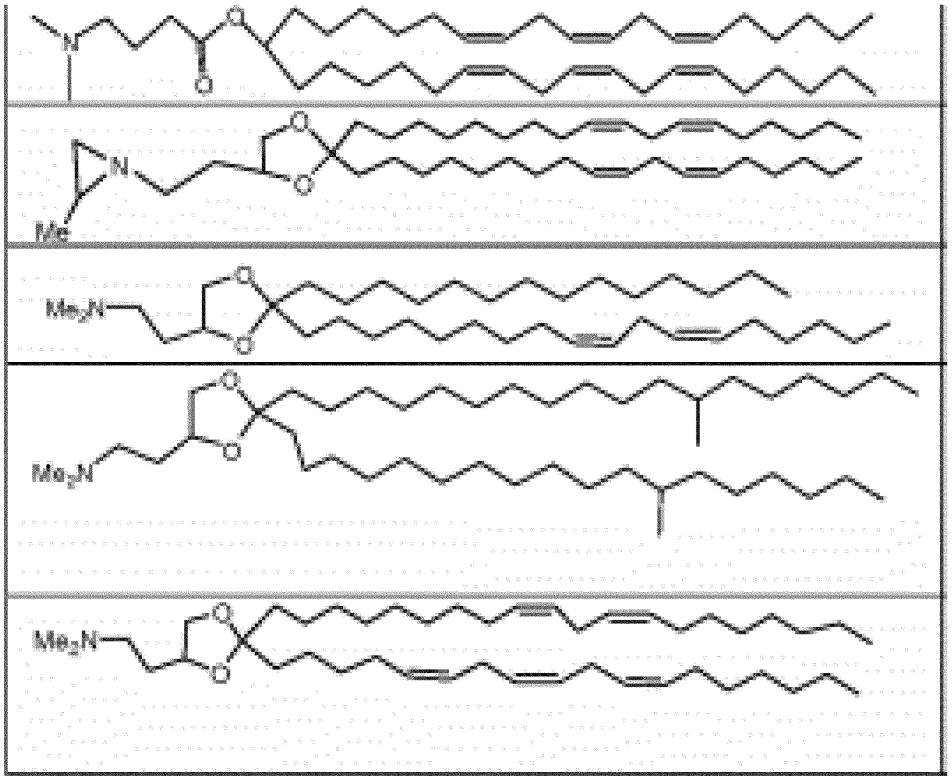
【表１１－５２】

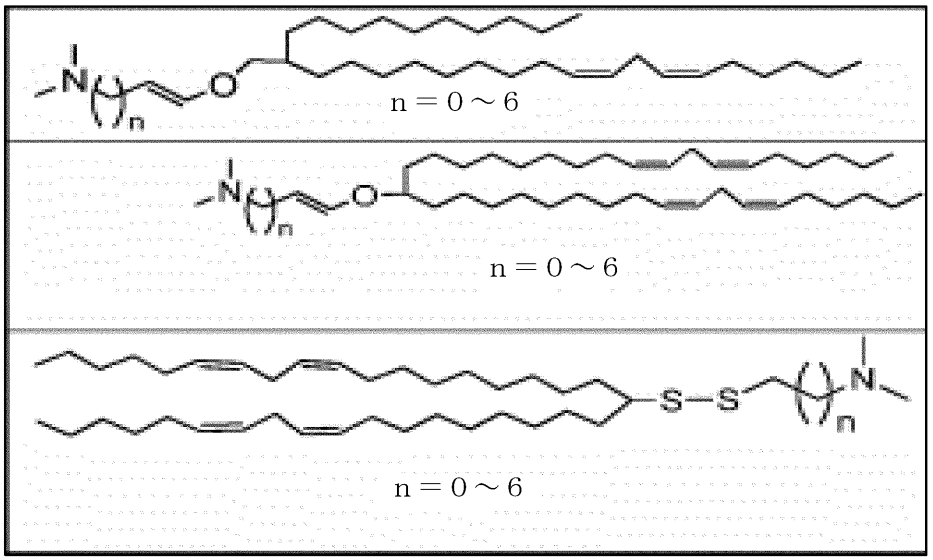


【表１１－５３】

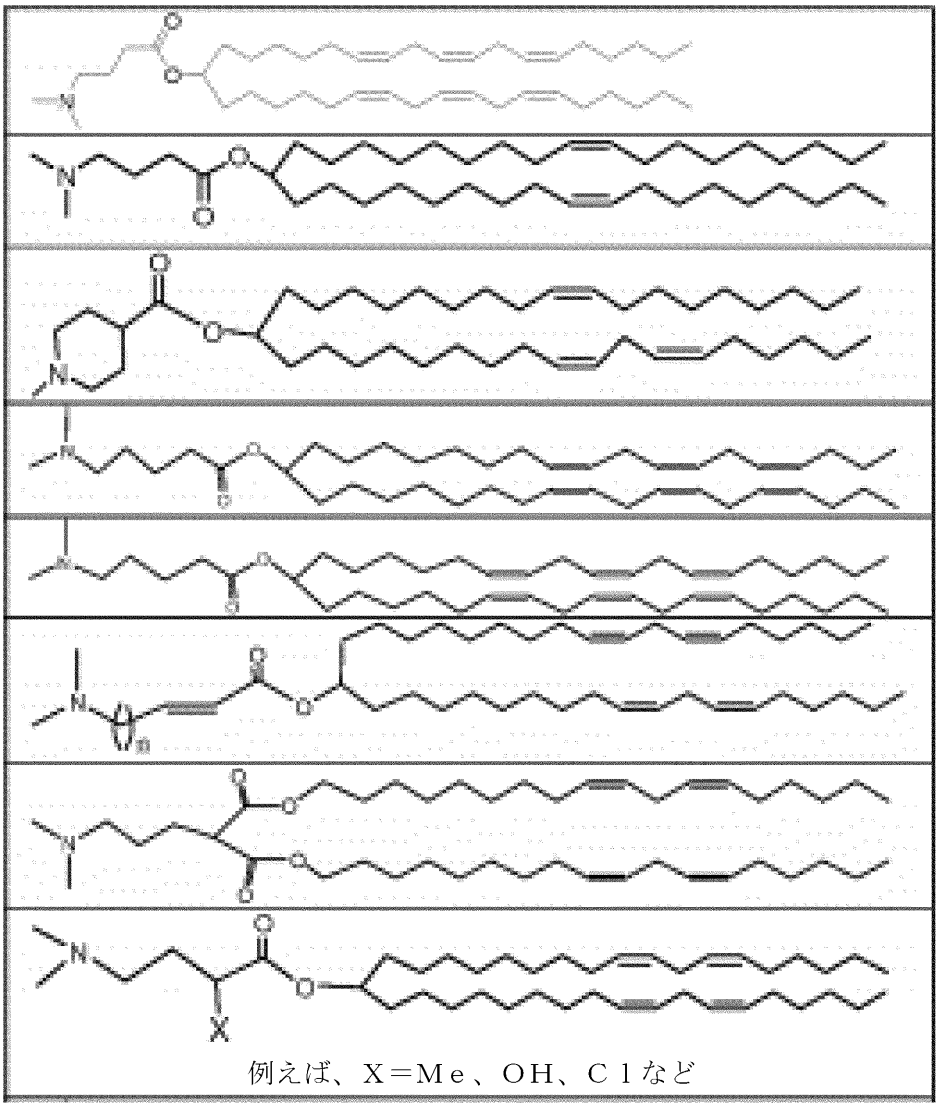


【表１１－５４】

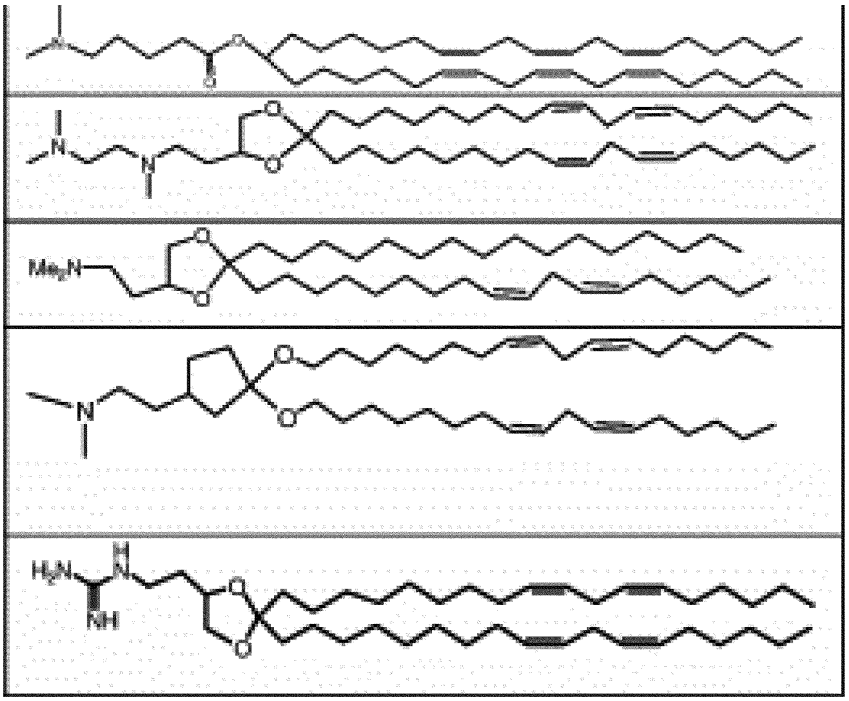


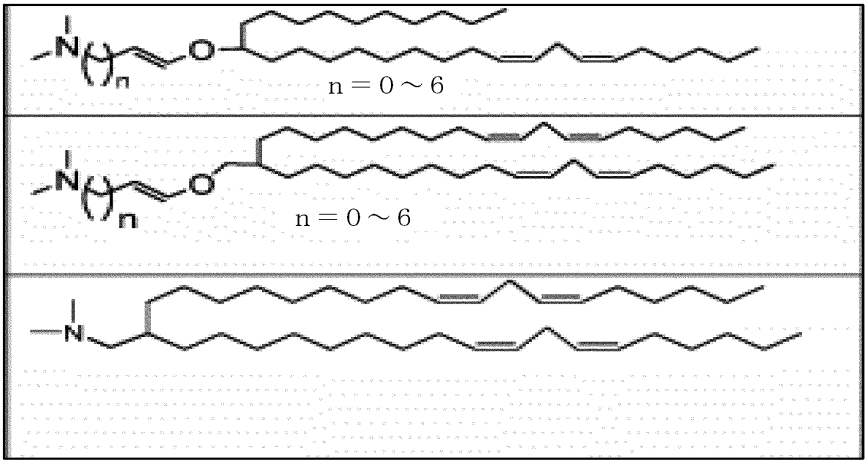



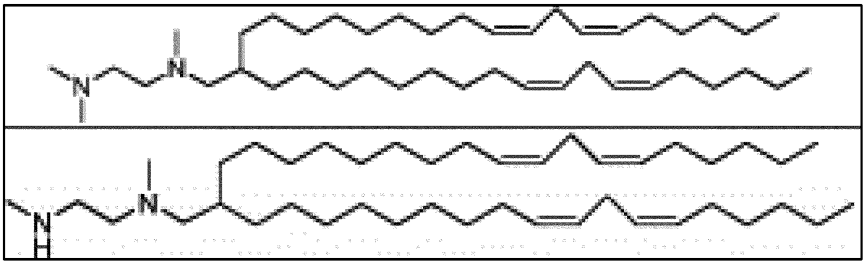
【表１１－５５】



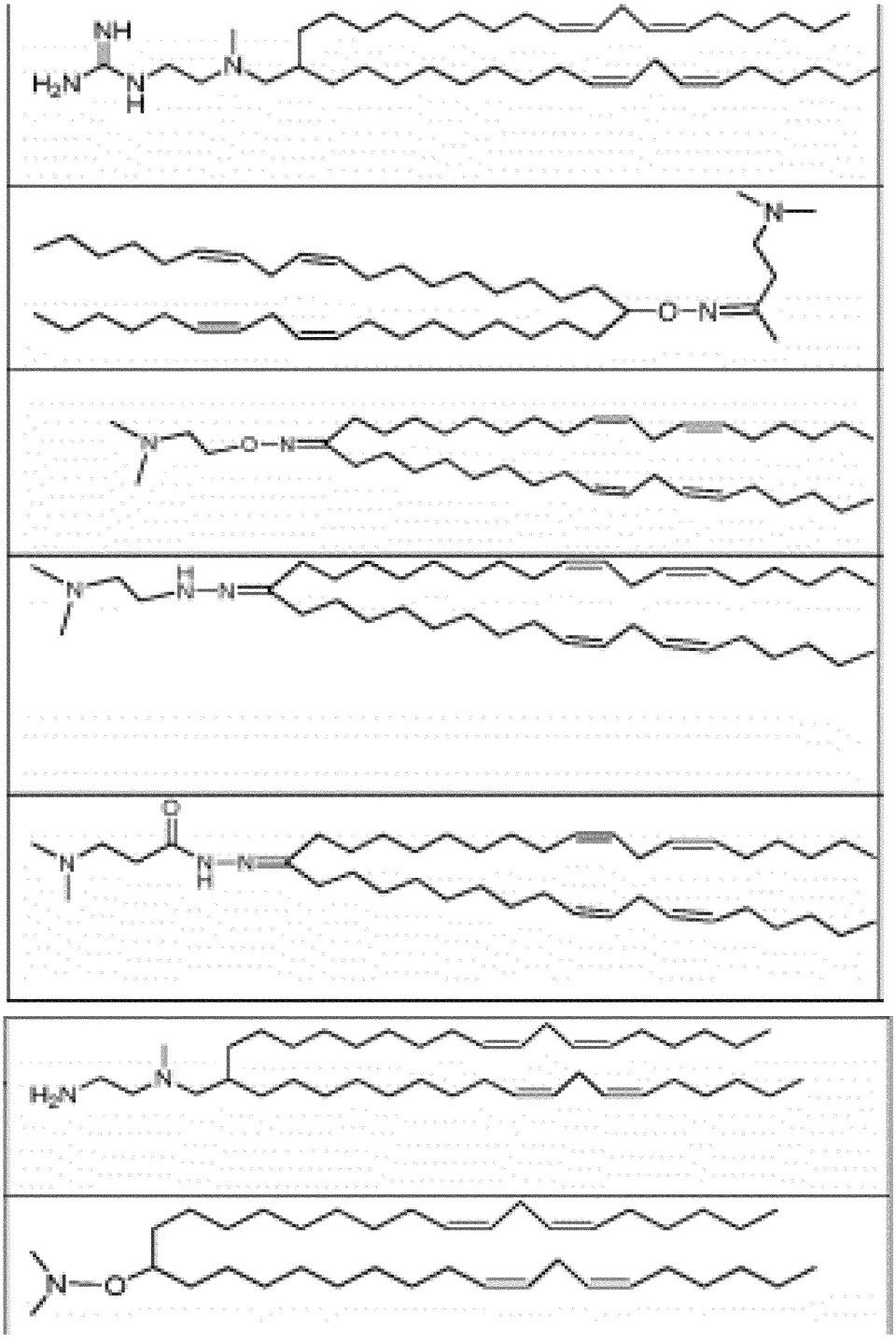
【表１１－５６】



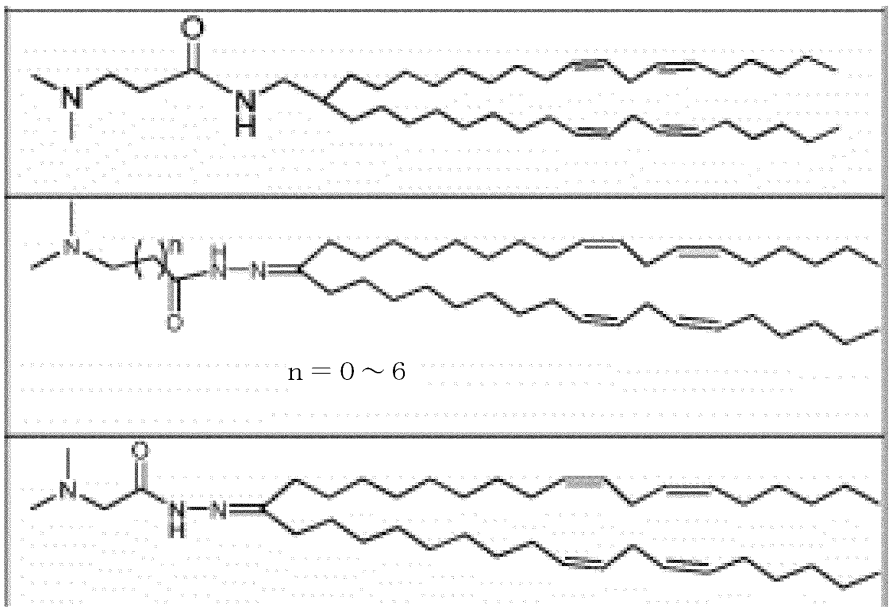


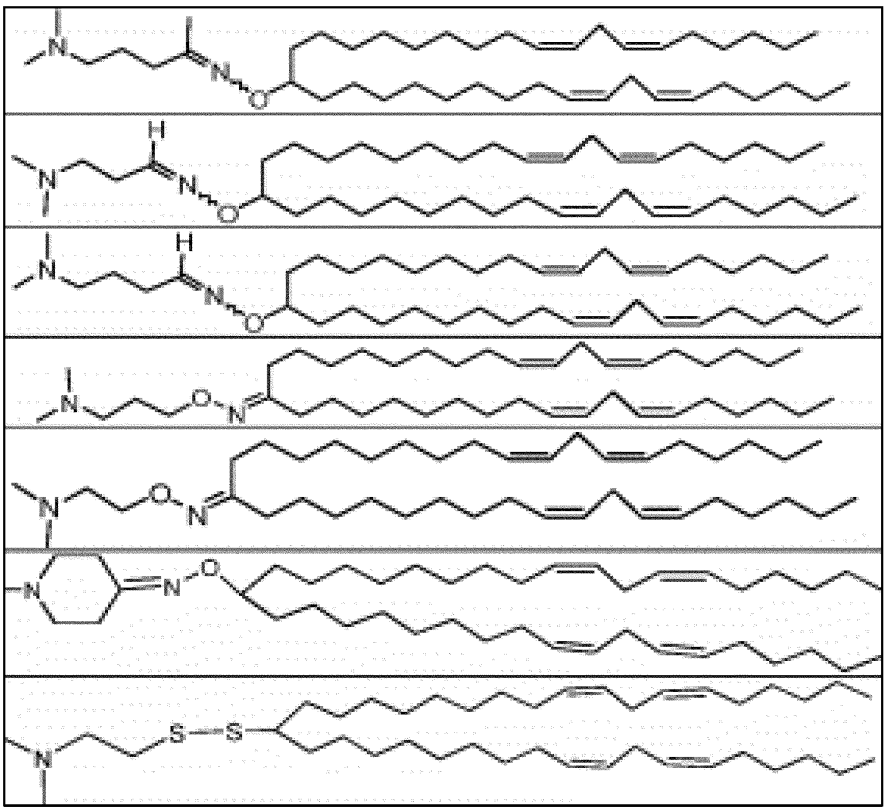



【表１１－５７】

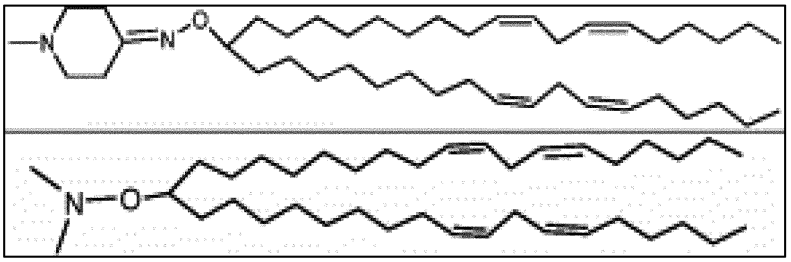


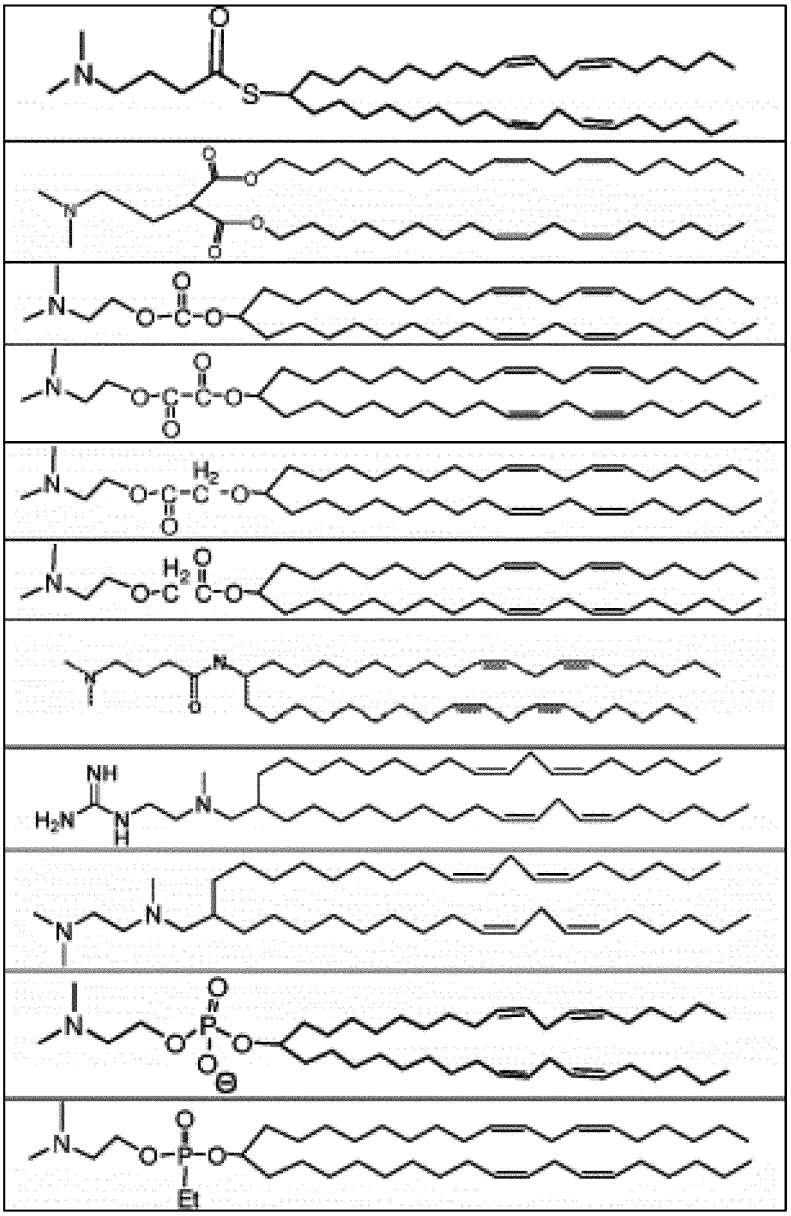
【表１１－５８】



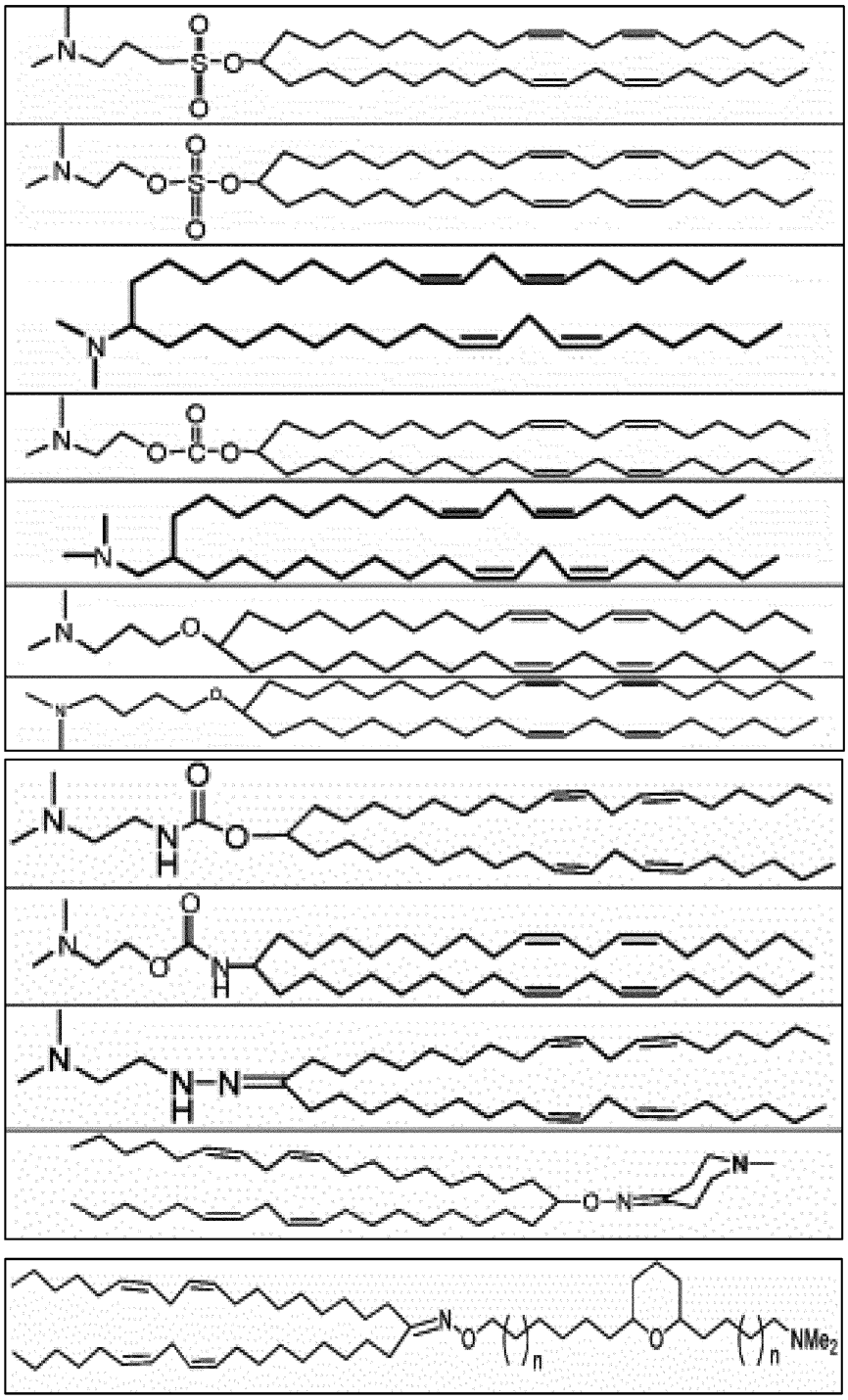



【表１１－５９】

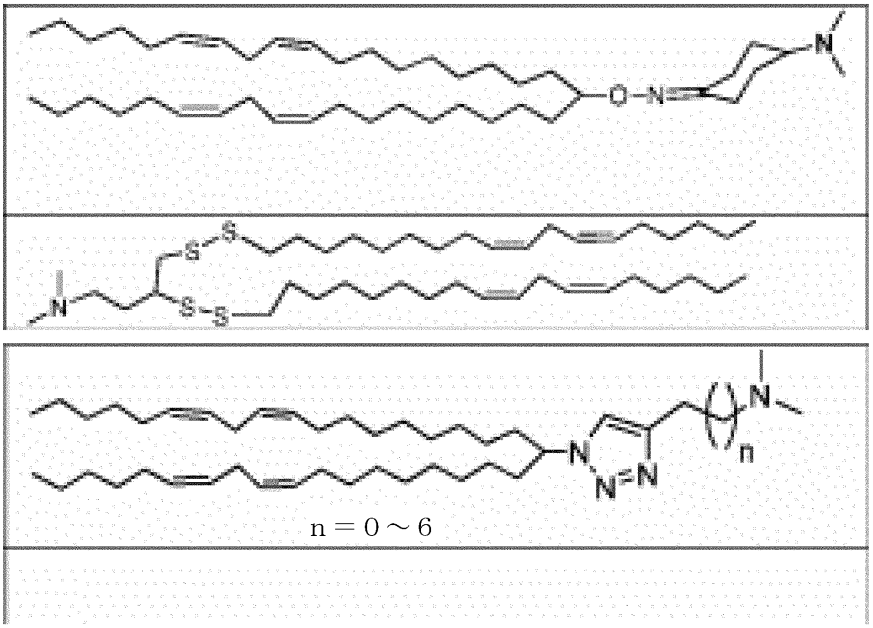




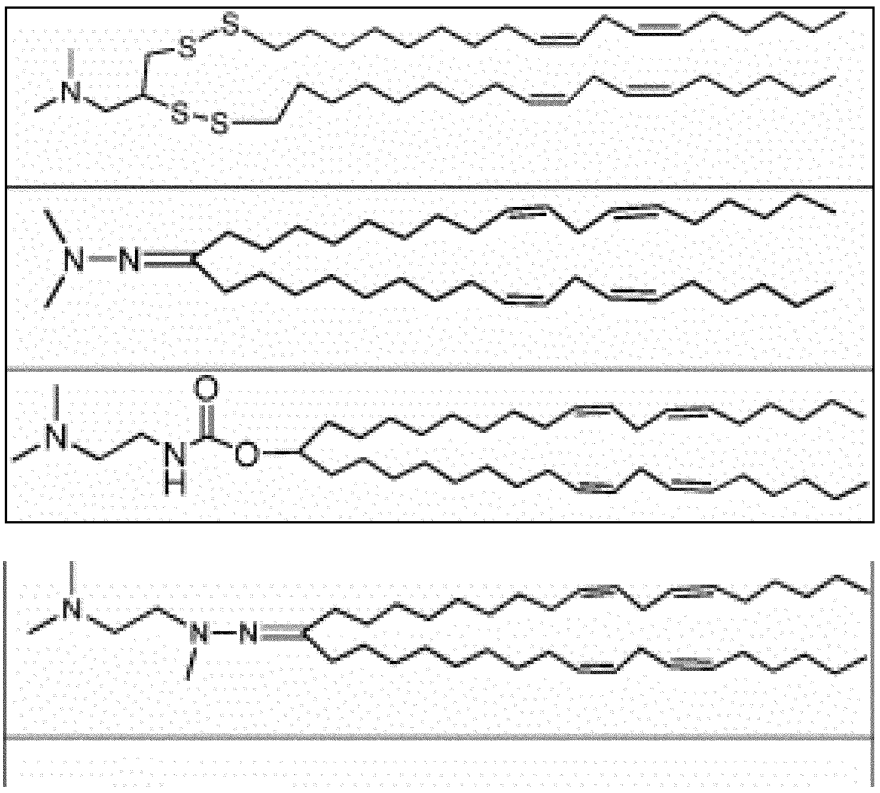
【表１１－６０】



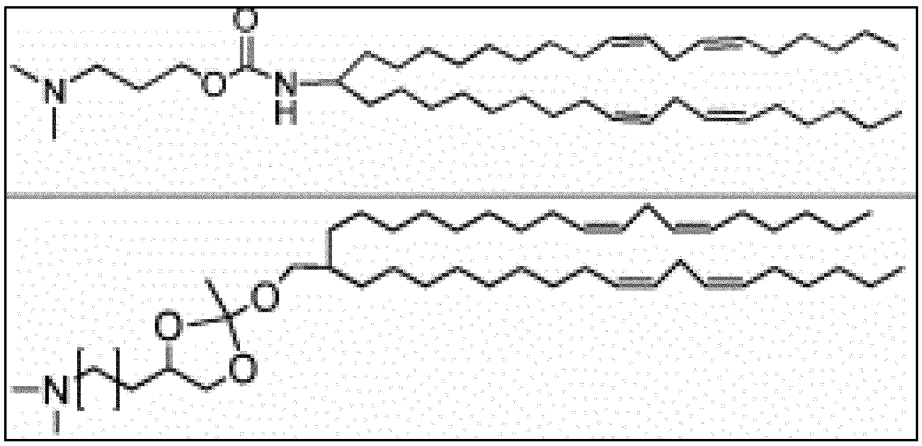
【表１１－６１】

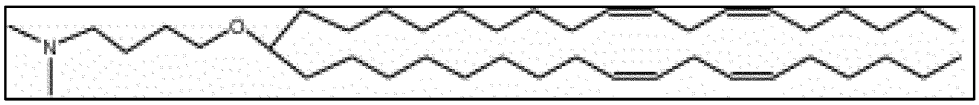


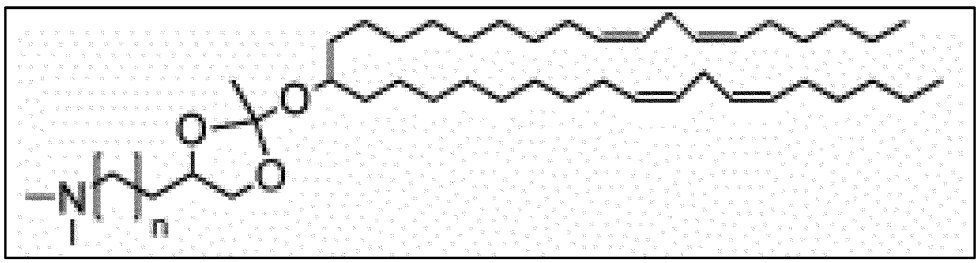
n＝0～6

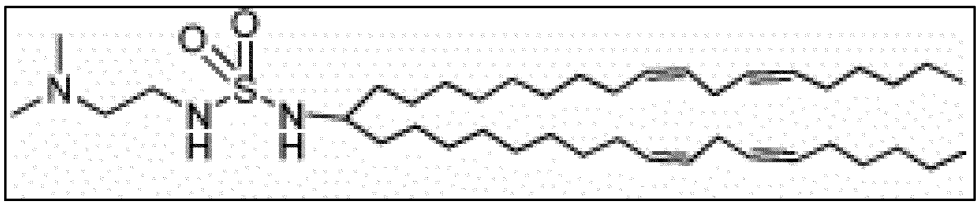


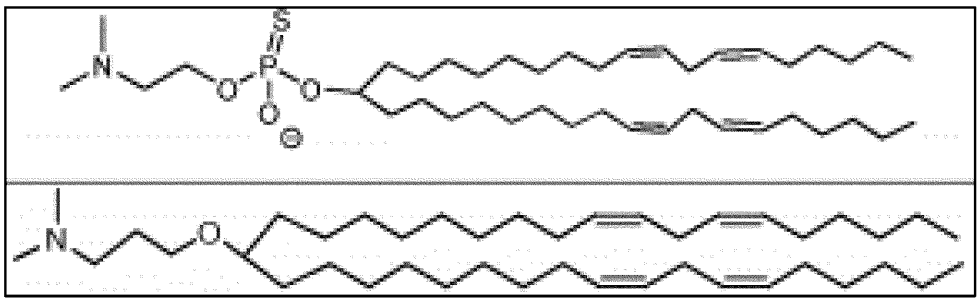
【表１１－６２】



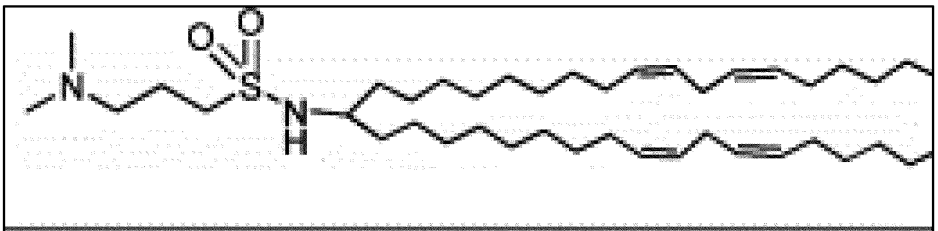


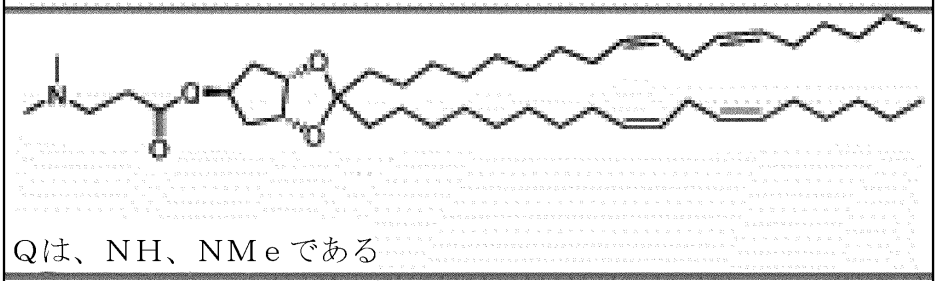




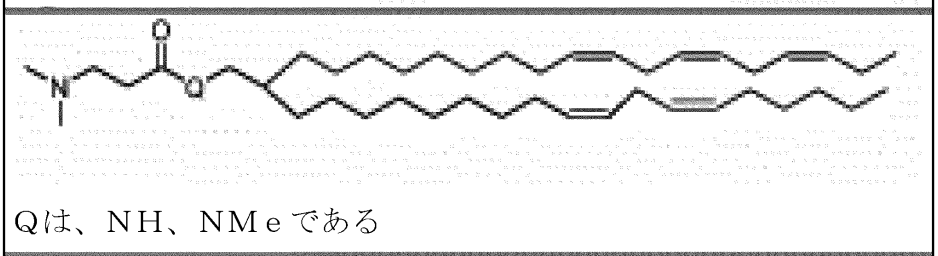


【表１１－６３】

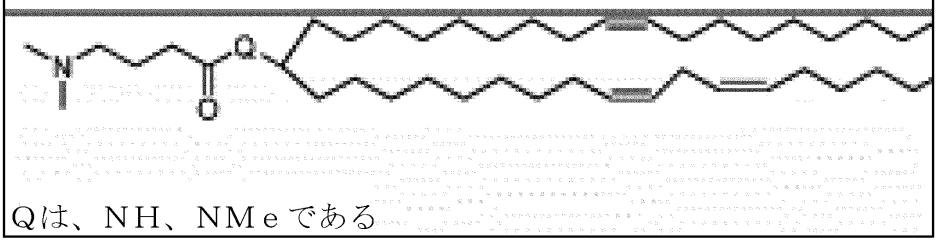




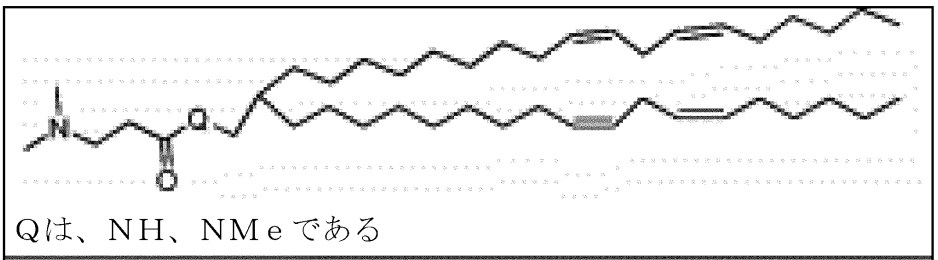
Ｑは、ＮＨ、ＮＭｅである



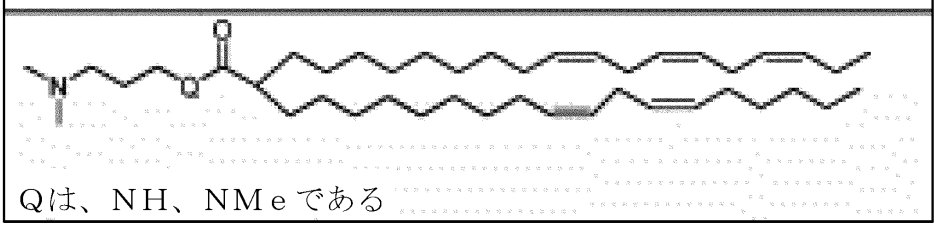
Ｑは、ＮＨ、ＮＭｅである



Ｑは、ＮＨ、ＮＭｅである

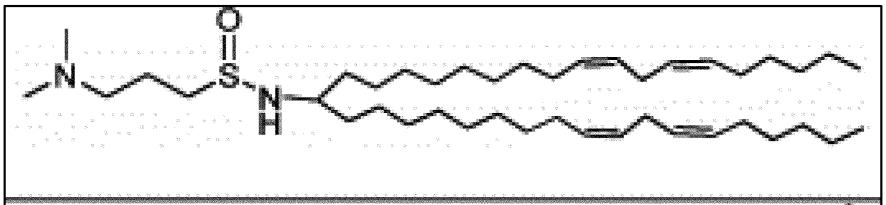


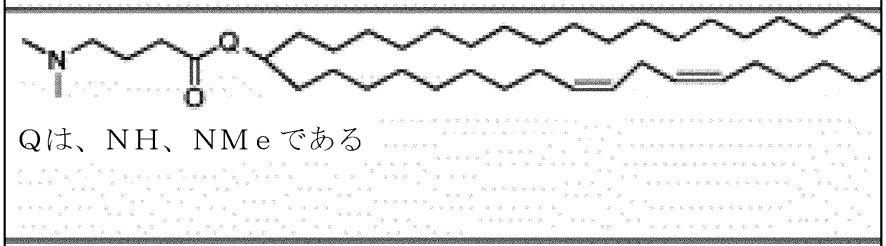
Ｑは、ＮＨ、ＮＭｅである



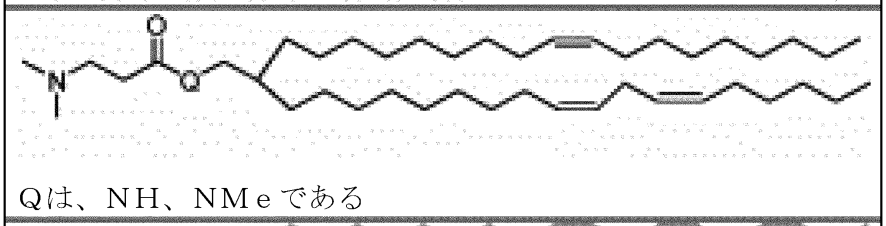
Ｑは、ＮＨ、ＮＭｅである

【表１１－６４】

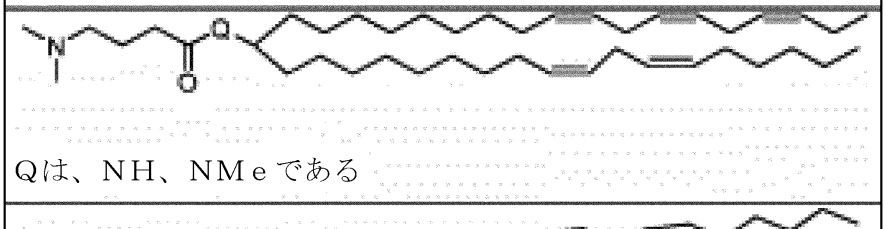




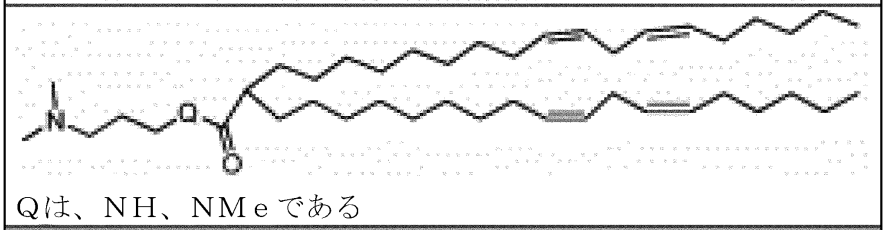
Ｑは、ＮＨ、ＮＭｅである



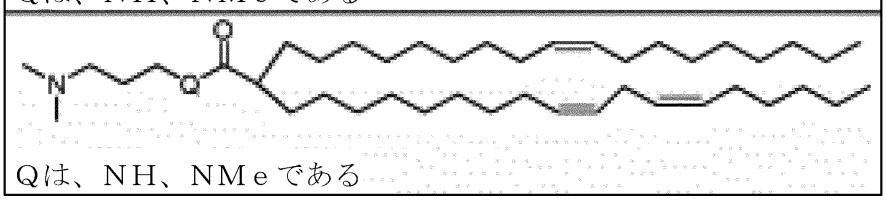
Ｑは、ＮＨ、ＮＭｅである



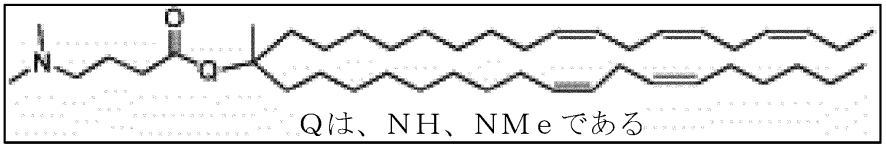
Ｑは、ＮＨ、ＮＭｅである



Ｑは、ＮＨ、ＮＭｅである

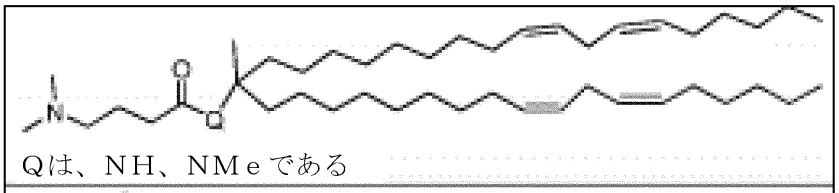


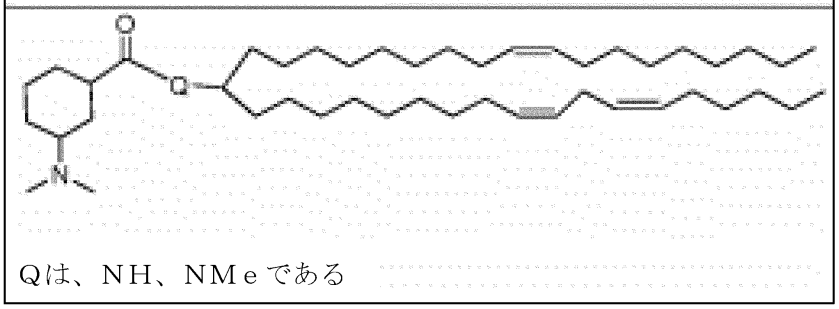
Ｑは、ＮＨ、ＮＭｅである

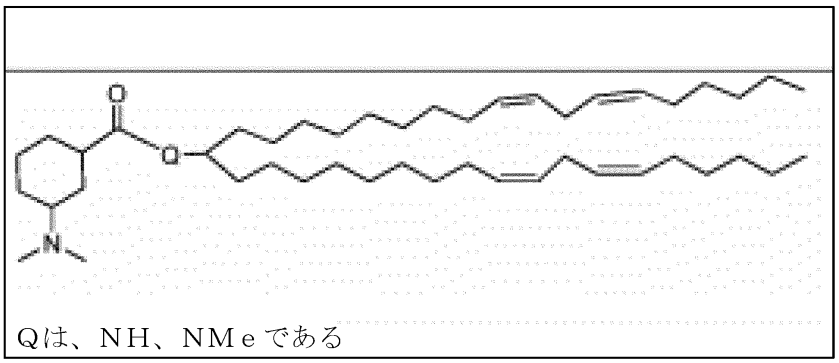


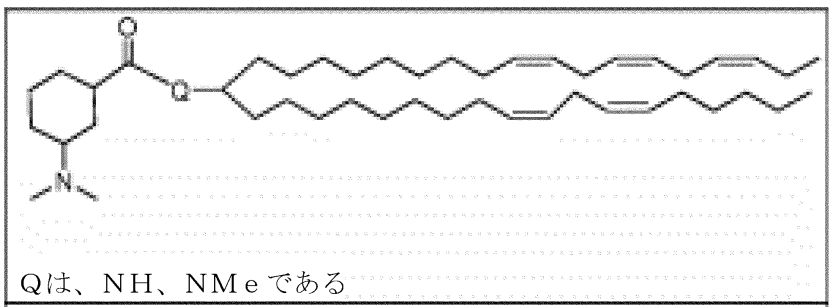
Ｑは、ＮＨ、ＮＭｅである

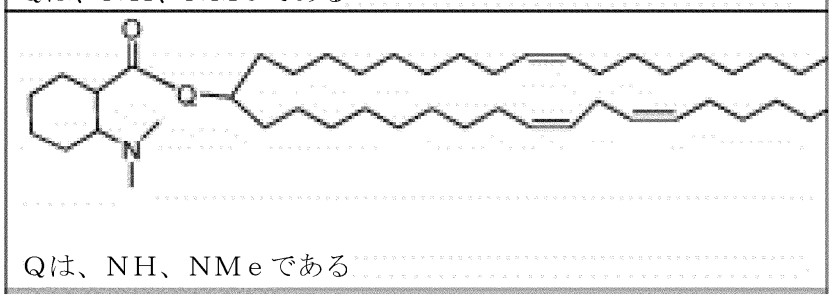
【表１１－６５】


Qは、NH、NMeである

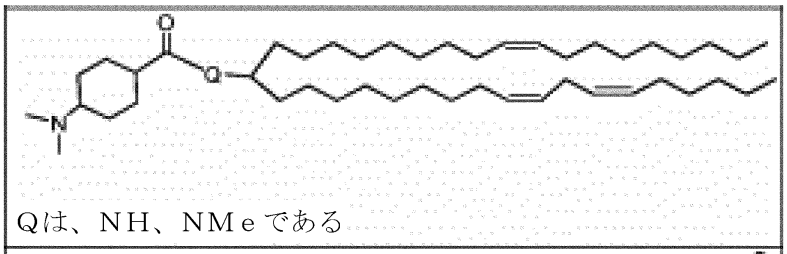

Qは、NH、NMeである


Qは、NH、NMeである

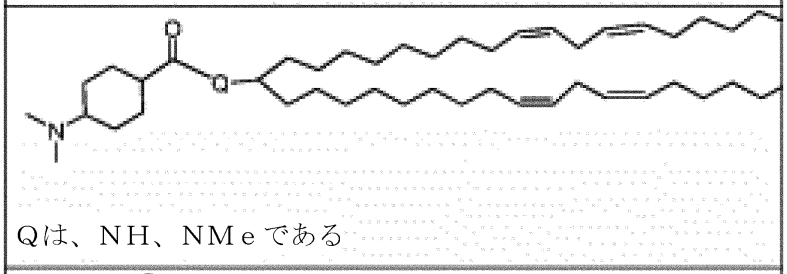

Qは、NH、NMeである


Qは、NH、NMeである

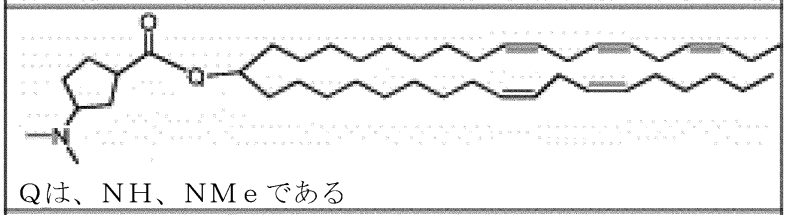
【表１１－６６】



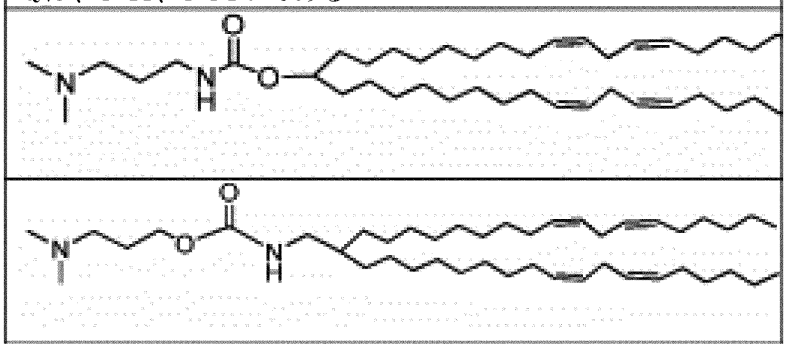
Ｑは、ＮＨ、ＮＭｅである

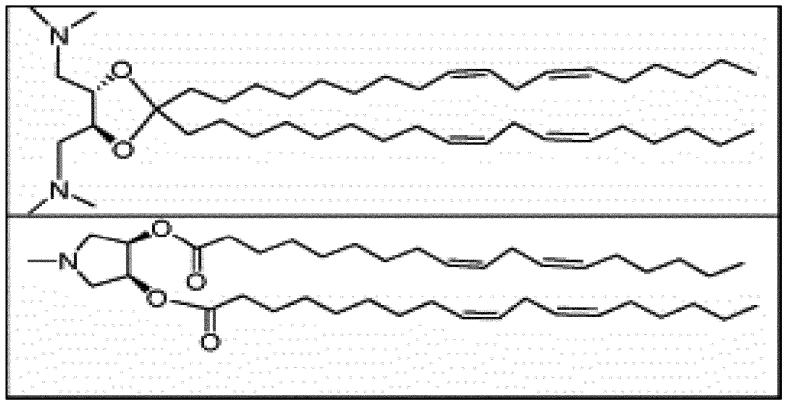


Ｑは、ＮＨ、ＮＭｅである

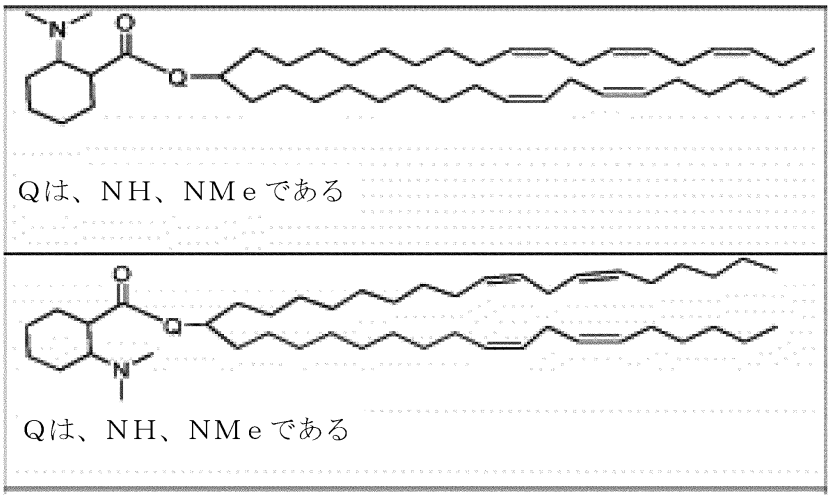


Ｑは、ＮＨ、ＮＭｅである

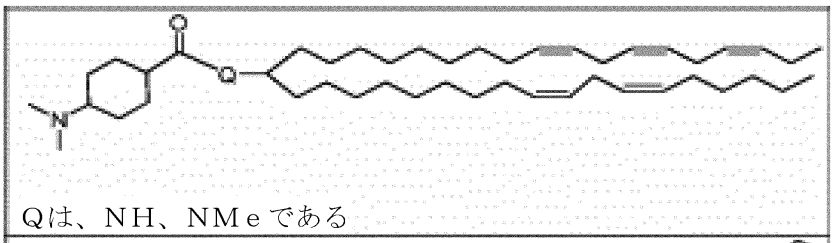


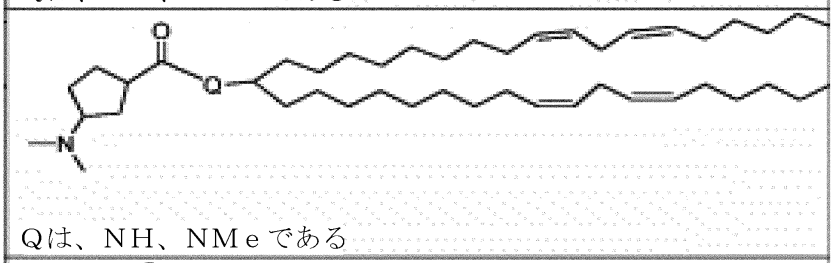


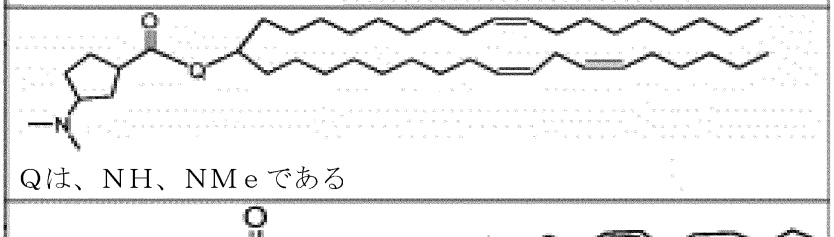
【表１１－６７】

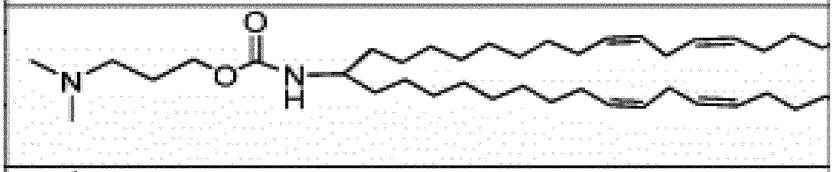

Ｑは、ＮＨ、ＮＭｅである

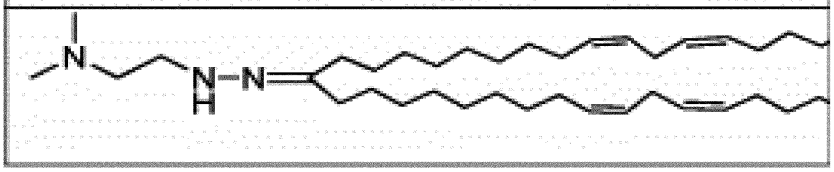

Ｑは、ＮＨ、ＮＭｅである


Ｑは、ＮＨ、ＮＭｅである

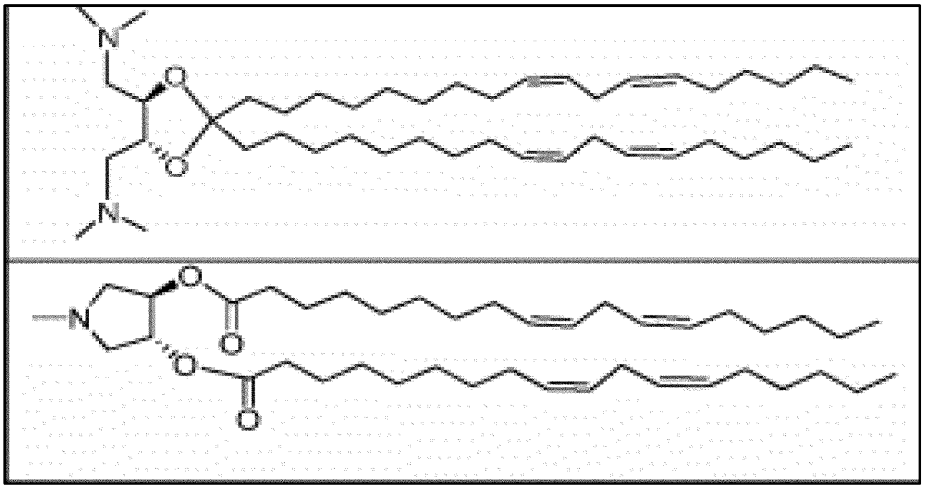

Ｑは、ＮＨ、ＮＭｅである


Ｑは、ＮＨ、ＮＭｅである

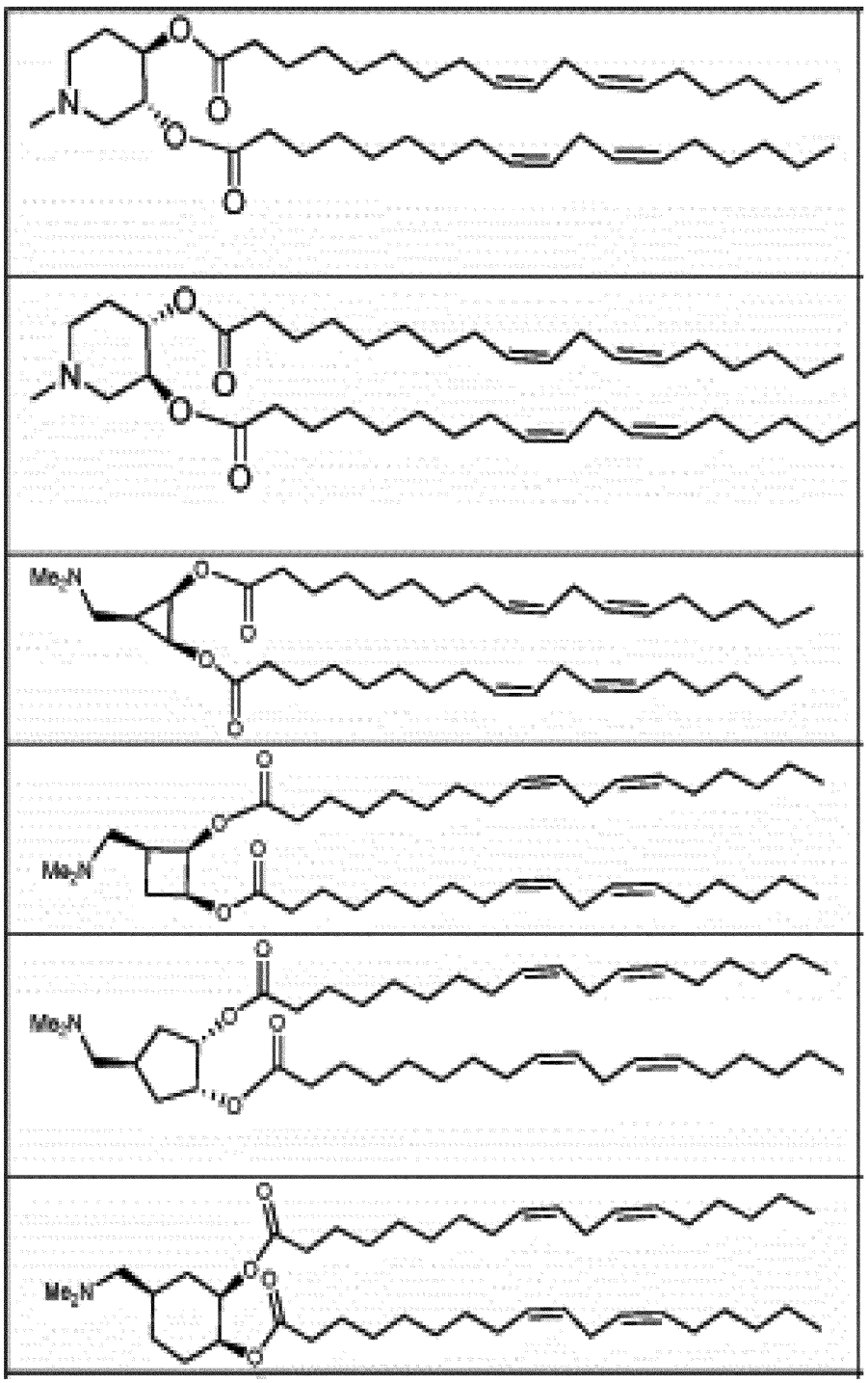




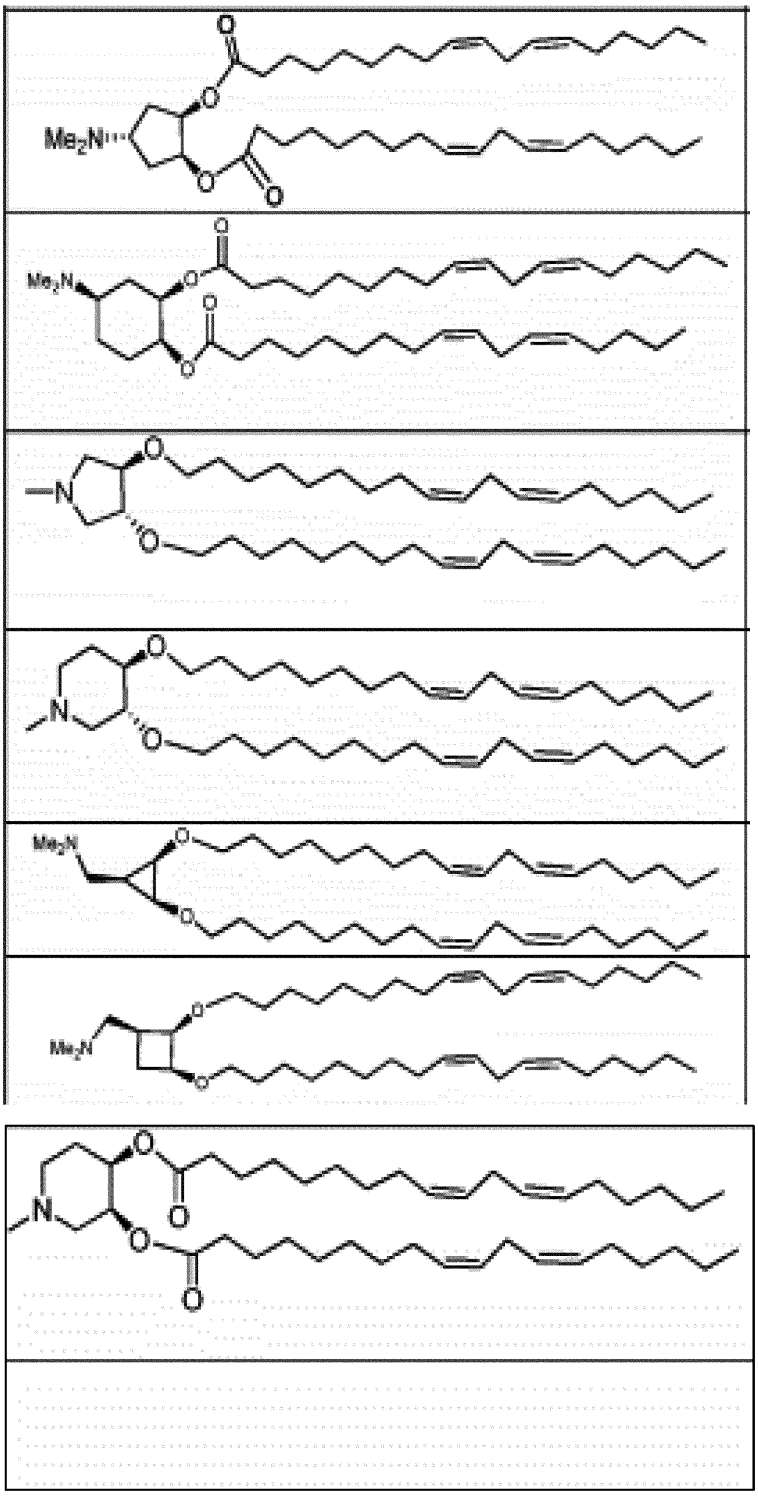
【表１１－６８】



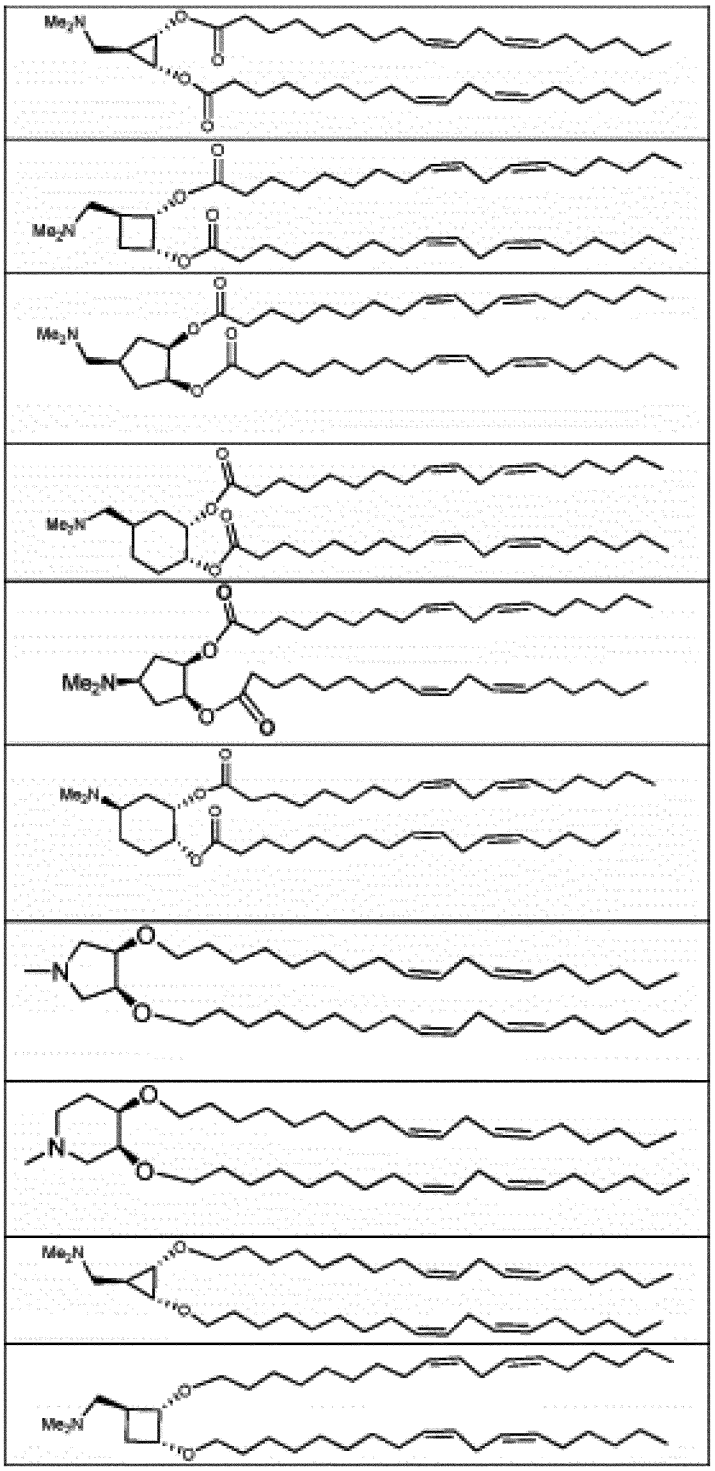
【表１１－６９】



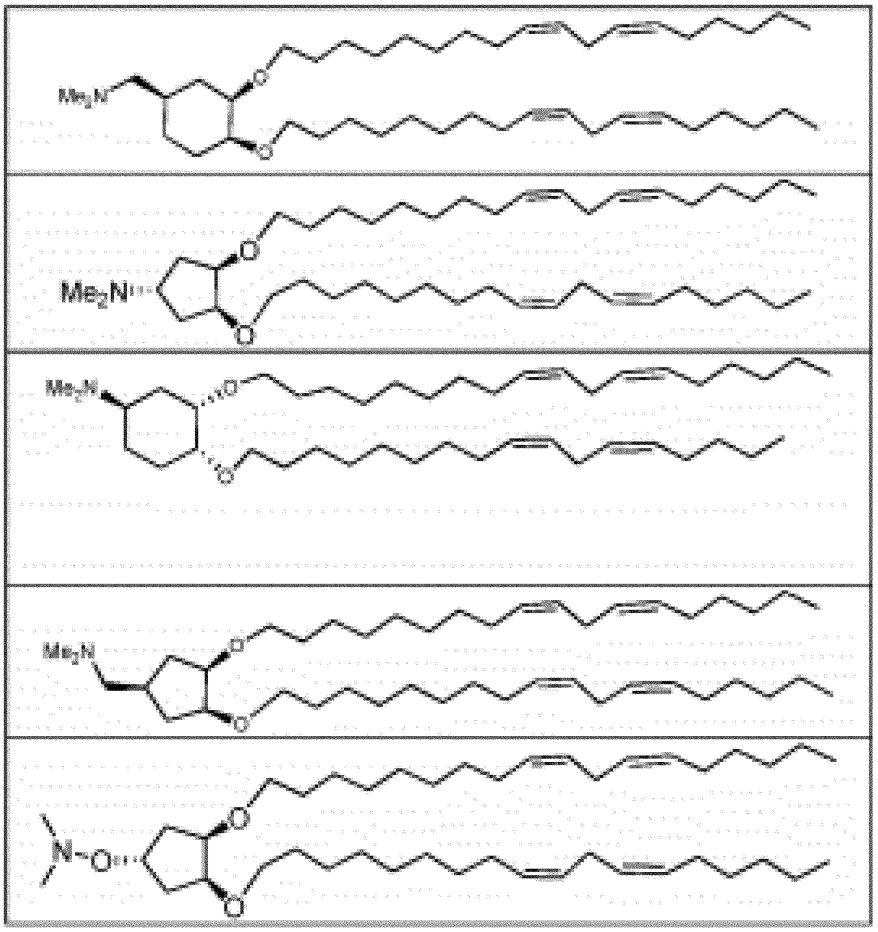
【表１１－７０】



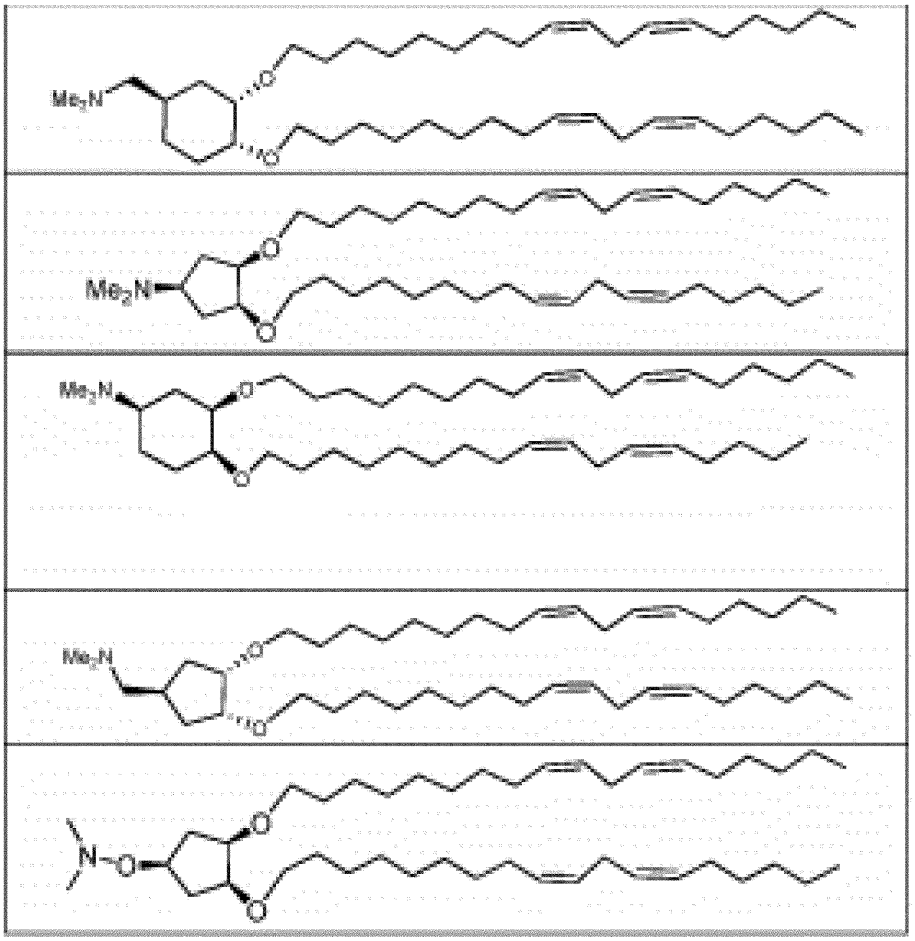
【表１１－７１】



【表１１－７２】

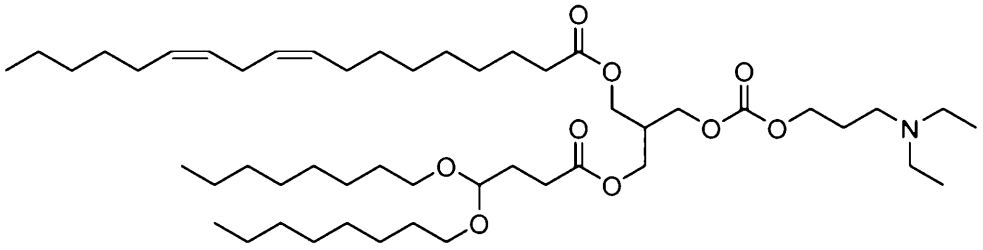


【表１１－７３】

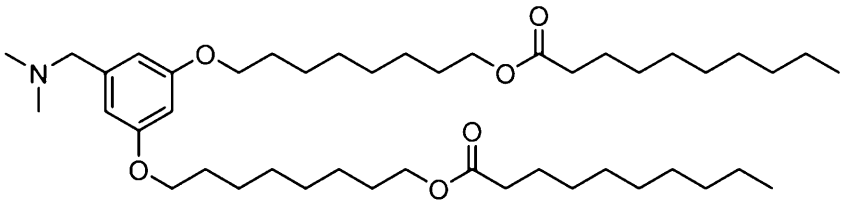


【０６１１】
いくつかの実施形態では、輸送ビヒクルは、脂質Ａ、脂質Ｂ、脂質Ｃ、及び／または脂質Ｄを含む。いくつかの実施形態では、脂質Ａ、脂質Ｂ、脂質Ｃ、及び／または脂質Ｄの包含は、封入及び／またはエンドソーム脱出を改善する。いくつかの実施形態では、脂質Ａ、脂質Ｂ、脂質Ｃ、及び／または脂質Ｄは、国際特許出願第ＰＣＴ／ＵＳ２０１７／０２８９８１号に記載されている。
【０６１２】
いくつかの実施形態では、イオン化可能脂質は、３－（（４，４４ビス（オクチルオキシ）ブタノイル）オキシ）－２－（（（（３－（ジエチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）メチル）プロピル（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ９，１２－ジエノエートとも呼ばれる（９Ｚ，１２Ｚ）－３－（（４，４４－ビス（オクチルオキシ）ブタノイル）オキシ）－２－（（（（３－（ジエチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）メチル）プロピルオクタデカ９，１２－ジエノエートである脂質Ａである。脂質Ａは、以下のように示され得る：

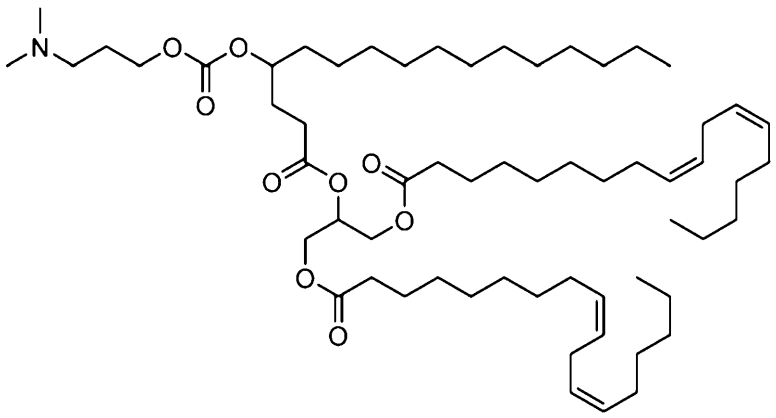
【化１００】



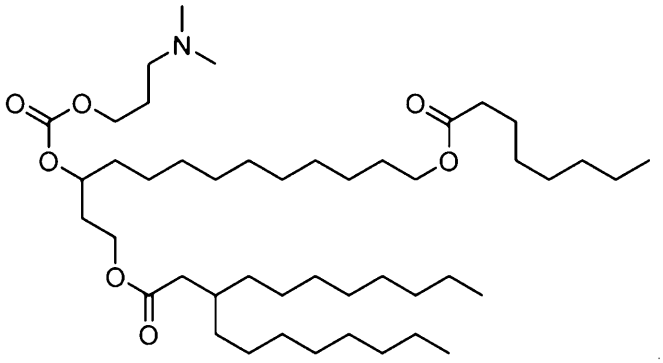
【０６１３】
脂質Ａは、ＷＯ２０１５／０９５３４０（例えば、８４～８６頁）に従って合成され得、その全体が参照により組み込まれる。
【０６１４】
いくつかの実施形態では、イオン化可能脂質は、（（５－（（ジメチルアミノ）メチル）－１，３－フェニレン）ビス（オキシ））ビス（オクタン－８，１－ジイル）ビス（デカノエート）である脂質Ｂである。脂質Ｂは、以下のように示され得る：
【化１０１】



【０６１５】
脂質Ｂは、ＷＯ２０１４／１３６０８６（例えば、１０７～０９頁）に従って合成され得、その全体が参照により組み込まれる。
【０６１６】
いくつかの実施形態では、イオン化可能脂質は、２－（（４－（（（３－（ジメチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）ヘキサデカノイル）オキシ）プロパン－１，３－ジイル（９Ｚ，９’Ｚ，１２Ｚ，１２’Ｚ）－ビス（オクタデカ－９，１２－ジエノエート）である脂質Ｃである。脂質Ｃは、以下のように示され得る：
【化１０２】



【０６１７】
いくつかの実施形態では、イオン化可能脂質は、３－（（（３－（ジメチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）－１３－（オクタノイルオキシ）トリデシル３－オクチルウンデカノエートである脂質Ｄである。脂質Ｄは、以下のように示され得る：
【化１０３】



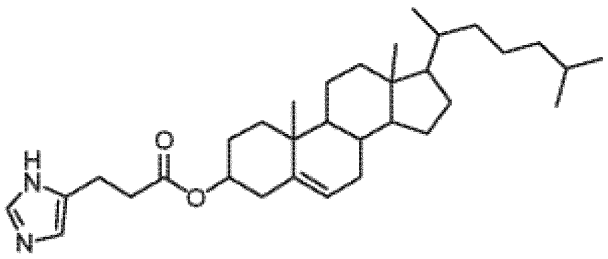
【０６１８】
脂質Ｃ及び脂質Ｄは、ＷＯ２０１５／０９５３４０に従って合成され得、その全体が参照により組み込まれる。
【０６１９】
いくつかの実施形態では、イオン化可能脂質は、米国特許公開第２０１９０３２１４８９号に記載されている。いくつかの実施形態では、イオン化可能脂質は、国際特許公開第ＷＯ２０１０／０５３５７２号に記載されており、参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、イオン化可能脂質は、ＷＯ２０１０／０５３５７２の段落［００２２５］に記載されているＣ１２－２００である。
【０６２０】
いくつかのイオン化可能脂質は、文献に記載されており、その多くは市販されている。特定の実施形態では、かかるイオン化可能脂質は、本明細書に記載の輸送ビヒクルに含まれる。いくつかの実施形態では、イオン化可能脂質Ｎ－［１－（２，３－ジオレイルオキシ）プロピル］－Ｎ，Ｎ，Ｎ－トリメチルアンモニウム塩化物または「ＤＯＴＭＡ」が使用される。（Ｆｅｌｇｎｅｒ　ｅｔ　ａｌ．Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ’ｌ　Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．８４，７４１３（１９８７）；米国特許第４，８９７，３５５号）。ＤＯＴＭＡは、単独で製剤化され得、または脂質ナノ粒子中に中性脂質、ジオレイルホスファチジルエタノールアミンもしくは「ＤＯＰＥ」または他のカチオン性もしくは非カチオン性脂質と組み合わされ得る。他の好適なカチオン性脂質には、例えば、２０１２年３月２９日に出願された米国仮特許出願第６１／６１７，４６８号（参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているイオン化可能なカチオン性脂質、例えば、（１５Ｚ，１８Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－６－（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イル）テトラコサ－１５，１８－ジエン－１－アミン（ＨＧＴ５０００）、（１５Ｚ，１８Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－６－（（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イル）テトラコサ－４，１５，１８－トリエン－１－アミン（ＨＧＴ５００１）、及び（１５Ｚ，１８Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－６－（（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イル）テトラコサ－５，１５，１８－トリエン－１－アミン（ＨＧＴ５００２）、Ｃ１２－２００（ＷＯ２０１０／０５３５７２に記載されている）、２－（２，２－ジ（（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イル）－１，３－ジオキソラン－４－イル）－Ｎ，Ｎ－ジメチルエタンアミン（ＤＬｉｎＫＣ２－ＤＭＡ））（ＷＯ２０１０／０４２８７７；Ｓｅｍｐｌｅ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈ．２８：１７２－１７６（２０１０）を参照されたい）、２－（２，２－ジ（（９Ｚ，２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イル）－１，３－ジオキソラン－４－イル）－Ｎ，Ｎ－

ジメチルエタンアミン（ＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡ）、（３Ｓ，１０Ｒ，１３Ｒ，１７Ｒ）－１０，１３－ジメチル－１７－（（Ｒ）－６－メチルヘプタン－２－イル）－２，３，４，７，８，９，１０，１１，１２，１３，１４，１５，１６，１７－テトラデカヒドロ－１Ｈ－シクロペンタ［ａ］フェナントレン－３－イル３－（１Ｈ－イミダゾール－４－イル）プロパノエート（ＩＣＥ）、（１５Ｚ，１８Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－６－（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イル）テトラコサ－１５，１８－ジエン－１－アミン（ＨＧＴ５０００）、（１５Ｚ，１８Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－６－（（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イル）テトラコサ－４，１５，１８－トリエン－１－アミン（ＨＧＴ５００１）、（１５Ｚ，１８Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－６－（（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イル）テトラコサ－５，１５，１８－トリエン－１－アミン（ＨＧＴ５００２）、５－カルボキシスペルミルグリシン－ジオクタデシルアミド（ＤＯＧＳ）、２，３－ジオレイルオキシ－Ｎ－［２（スペルミン－カルボキサミド）エチル］－Ｎ，Ｎ－ジメチル－１－プロパンアミニウム（ＤＯＳＰＡ）（Ｂｅｈｒ ｅｔ ａｌ．Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ．’ｌ Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．８６，６９８２（１９８９）；米国特許第５，１７１，６７８号；５，３３４，７６１）、１，２－ジオレオイル－３－ジメチルアンモニウム－プロパン（ＤＯＤＡＰ）、１，２－ジオレオイル－３－トリメチルアンモニウム－プロパンまたは（ＤＯＴＡＰ）が含まれる。企図されるイオン化可能脂質にはまた、１，２－ジストカリルオキシ－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－アミノプロパン（ＤＳＤＭＡ）、１，２－ジオレイルオキシ－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－アミノプロパン（ＤＯＤＭＡ）、１，２－ジリノレイルオキシ－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－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－３－アミノプロパン（ＤＬｅｎＤＭＡ）、Ｎ－ジオレイル－Ｎ，Ｎ－ジメチルアンモニウムクロリド（ＤＯＤＡＣ）、Ｎ，Ｎ－ジステアリル－Ｎ，Ｎ－ジメチルアンモニウムブロミド（ＤＤＡＢ）、Ｎ－（１，２－ジミリスチルオキシプロプ－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）、３－ジメチルアミノ－２－（コレスト－５－エン－３－ベーターオキシブタン－４－オキシ）－１－（ｃｉｓ，ｃｉｓ－９，１２－オクタデカジエノキシ）プロパン（ＣＬｉｎＤＭＡ）、２－［５’－（コレスト－５－エン－３－ベーターオキシ）－３’－オキサペントキシ）－３－ジメチル－１－（ｃｉｓ，ｃｉｓ－９’，１－２’－オクタデカジエノキシ）プロパン（ＣｐＬｉｎＤＭＡ）、Ｎ，Ｎ－ジメチル－３，４－ジオレイルオキシベンジルアミン（ＤＭＯＢＡ）、１，２－Ｎ，Ｎ’－ジオレイルカルバミル－３－ジメチルアミノプロパン（ＤＯｃａｒｂＤＡＰ）、２，３－ジリノレオイルオキシ－Ｎ，Ｎ－ジメチルプロピルアミン（ＤＬｉｎＤＡＰ）、１，２－Ｎ，Ｎ’－ジリノレイルカルバミル－３－ジメチルアムニノプロパン（ＤＬｉｎｃａｒｂＤＡＰ）、１，２－ジリノレオイルカルバミル－３－ジメチルアミノプロパン（ＤＬｉｎＣＤＡＰ）、２，２－ジリノレイル－４－ジメチルアミノメチル－［１，３］－ジオキソラン（ＤＬｉｎ－Ｋ－ＤＭＡ）、２，２－ジリノレイル－４－ジメチルアミノエチル－［１，３］－ジオキソラン（ＤＬｉｎ－Ｋ－ＸＴＣ２－ＤＭＡ）もしくはＧＬ６７、またはそれらの混合物が含まれる。（Ｈｅｙｅｓ，Ｊ．，ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ Ｒｅｌｅａｓｅ １０７：２７６－２８７（２００５）；Ｍｏｒｒｉｓｓｅｙ，Ｄ Ｖ．，ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２３（８）：１００３－１００７（２００５）；ＰＣＴ公開ＷＯ２００５／１２１３４８Ａ１）。輸送ビヒクル（例えば、脂質ナノ粒子）を製剤化するためのコレステロールベースのイオン化可能脂質の使用も本発明によって企図される。かかるコレステロールベースのイオン化可能脂質は、単独でまたは他の脂質と組み合わせて使用され得る。好適なコレステロールベースのイオン化可能脂質には、例えば、ＤＣ－コレステロール（Ｎ，Ｎ－ジメチル－Ｎ－エチルカルボキサミドコレステロール）、及び１，４－ビス（３－Ｎ－オレイルアミノ－プロピル）ピペラジン（Ｇａｏ，ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍ．１７９，２８０（１９９１）；Ｗｏｌｆ ｅｔ ａｌ．ＢｉｏＴｅｃｈｎｉｑｕｅｓ ２３，１３９（１９９７）；米国特許第５，７４４，３３５号）が含まれる。

【０６２１】
カチオン性脂質、例えば、ジアルキルアミノベース、イミダゾールベース、及びグアニジニウムベースの脂質も企図される。例えば、国際出願第ＰＣＴ／ＵＳ２０１０／０５８４５７号（参照により本明細書に組み込まれる）に開示されているイオン化可能脂質（３Ｓ，１０Ｒ，１３Ｒ，１７Ｒ）－１０，１３－ジメチル－１７－（（Ｒ）－６－メチルヘプタン－２－イル）－２，３，４，７，８，９，１０，１１，１２，１３，１４，１５，１６，１７－テトラデカヒドロ－１Ｈ－シクロペンタ［ａ］フェナントレン－３－イル３－（１Ｈ－イミダゾール－４－イル）プロパノエート（ＩＣＥ）の使用も企図される。

【０６２２】
イオン化可能脂質、例えば、ジアルキルアミノベース、イミダゾールベース、及びグアニジニウムベースの脂質も企図される。例えば、所定の実施形態は、１つ以上のイミダゾールベースのイオン化可能脂質、例えば、イミダゾールコレステロールエステルまたは「ＩＣＥ」脂質、（３Ｓ，１０Ｒ，１３Ｒ，１７Ｒ）－１０，１３－ジメチル－１７－（（Ｒ）－６－メチルヘプタン－２－イル）－２，３，４，７，８，９，１０，１１，１２，１３，１４，１５，１６，１７－テトラデカヒドロ－１Ｈ－シクロペンタ［ａ］フェナントレン－３－イル３－（１Ｈ－イミダゾール－４－イル）プロパノエート（以下の構造（ＸＩＩＩ）によって表される）を含む組成物に関する。ある実施形態では、ｃｉｒｃＲＮＡの送達のための輸送ビヒクルは、１つ以上のイミダゾールベースのイオン化可能脂質、例えば、イミダゾールコレステロールエステルまたは「ＩＣＥ」脂質（３Ｓ，１０Ｒ，１３Ｒ，１７Ｒ）－１０，１３－ジメチル－１７－（（Ｒ）－６－メチルヘプタン－２－イル）－２，３，４，７，９，１０，１１，１２，１３，１４，１５，１６，１７－テトラデカヒドロ－１Ｈ－シクロペンタ［ａ］フェナントレン－３－イル３－（１Ｈ－イミダゾール－４－イル）プロパノエート（構造（ＸＩＩＩ）によって表される）を含み得る。

【化１０４】



（ＸＩＩＩ）

【０６２３】
特定の理論に拘束されることを望まないが、イミダゾールベースのカチオン性脂質ＩＣＥの融合性は、従来のイオン化可能脂質と比べて低いｐＫａを有するイミダゾール基によって容易化されるエンドソーム破壊に関連すると考えられる。エンドソーム破壊は、ひいては、浸透圧膨張及びリポソーム膜の破壊を促進し、続いて、その中にロードされた核酸（複数可）含有物が標的細胞にトランスフェクションまたは細胞内放出される。

【０６２４】
イミダゾールベースのイオン化可能脂質はまた、他のイオン化可能脂質と比べてそれらの低下した毒性によって特性化される。

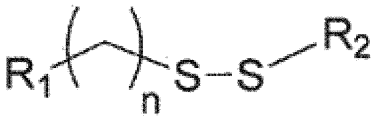
【０６２５】
いくつかの実施形態では、イオン化可能脂質は、米国特許公開第２０１９０３１４２８４号に記載されている。特定の実施形態では、イオン化可能脂質は、構造３、４、５、６、７、８、９、または１０（例えば、ＨＧＴ４００１、ＨＧＴ４００２、ＨＧＴ４００３、ＨＧＴ４００４及び／またはＨＧＴ４００５）によって表される。特定の実施形態では、１つ以上の切断可能な官能基（例えば、ジスルフィド）は、例えば、親水性機能的頭部基が、（例えば、酸化、還元または酸性条件への曝露により）化合物の脂溶性機能的尾部基から解離することを可能にし、それにより１つ以上の標的細胞の脂質二重層における相

転移を容易化する。例えば、輸送ビヒクル（例えば、脂質ナノ粒子）が構造３～１０の脂質の１つ以上を含む場合、１つ以上の標的細胞の脂質二重層における相転移は、１つ以上の標的細胞へのｃｉｒｃＲＮＡの送達を容易にする。

【０６２６】

特定の実施形態では、イオン化脂質は、構造（ＸＩＶ）によって表され、

【化１０５】



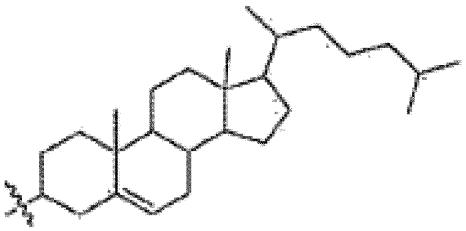
（ＸＩＶ）

式中、

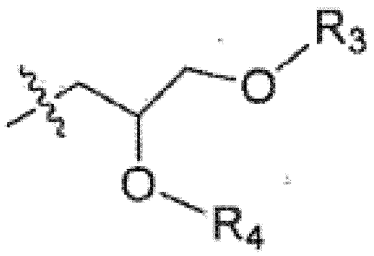
$R_1$は、イミダゾール、グアニジニウム、アミノ、イミン、エナミン、任意に置換されるアルキルアミノ（例えば、ジメチルアミノなどのアルキルアミノ）及びピリジルからなる群から選択され、

$R_2$は、構造ＸＶ及び構造ＸＶＩからなる群から選択され、

【化１０６】



ＸＶ



ＸＶＩ

式中、$R_3$及び$R_4$は、各々、独立して、任意に置換される可変的飽和または不飽和$C_6$－$C_{20}$アルキル及び任意に置換される可変的飽和または不飽和$C_6$－$C_{20}$アシルからなる群から選択され；ｎは、０または任意の正の整数（例えば、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０またはそれ以上）である。特定の実施形態では、$R_3$及び$R_4$は、各々、任意に置換される多不飽和$C_{18}$アルキルであるのに対し、他の実施形態では、$R_3$及び$R_4$は、各々、非置換多不飽和$C_{18}$アルキルである。特定の実施形態では、$R_3$及び$R_4$の１つ以上は、（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエンである。

【０６２７】

構造ＸＩＶ（式中、$R_1$は、イミダゾール、グアニジニウム、アミノ、イミン、エナミン、任意に置換されるアルキルアミノ（例えば、ジメチルアミノなどのアルキルアミノ）及びピリジルからなる群から選択され；$R_2$は、構造ＸＶであり；ｎは、０または任意の正の整数である）の化合物を含む薬学的組成物も本明細書に開示する。さらに、構造ＸＩＶ（式中、$R_1$は、イミダゾール、グアニジニウム、アミノ、イミン、エナミン、任意に置換されるアルキルアミノ（例えば、ジメチルアミノなどのアルキルアミノ）及びピリジ

ルからなる群から選択され；$R_2$は、構造ＸＶＩであり；Ｒ３及びＲ４は、各々、独立して、任意に置換される可変的飽和または不飽和$C_6$－$C_{20}$アルキル及び任意に置換される可変的飽和または不飽和$C_6$－$C_{20}$アシルからなる群から選択され；ｎは、０または任意の正の整数である）の化合物を含む薬学的組成物を本明細書に開示する。特定の実施形態では、$R_3$及び$R_4$は、各々、任意に置換される多不飽和$C_{18}$アルキルであるのに対し、他の実施形態では、$R_3$及び$R_4$は、各々、非置換多不飽和$C_{18}$アルキル（例えば、オクタデカ－９，１２－ジエン）である。

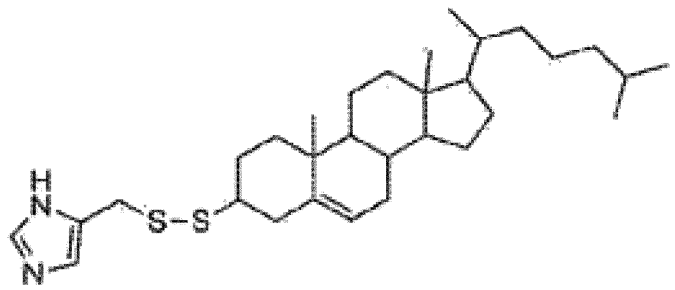
【０６２８】

特定の実施形態では、$R_1$基または頭部基は、極性または親水性基（例えば、イミダゾール、グアニジニウム及びアミノ基のうちの１つ以上）であり、例えば、構造ＸＩＶに示されるジスルフィド（Ｓ－Ｓ）切断性リンカー基によって$R_2$脂質基に結合されている）。他の企図される切断性リンカー基は、例えば、アルキル基（例えば、$C_1$～$C_{10}$アルキル）に結合（例えば、共有結合）した１つ以上のジスルフィド（Ｓ－Ｓ）リンカー基を含む組成物を含み得る。特定の実施形態では、Ｒ１基は、$C_1$－$C_{20}$アルキル基によって切断性リンカー基に共有結合され（例えば、ｎは１～２０である）、または代替的に、切断性リンカー基に直接的に結合され得る（例えば、ｎは０である）。特定の実施形態では、ジスルフィドリンカー基は、インビトロ及び／またはインビボで切断可能（例えば、酵素的に切断可能または酸性もしくは還元条件への曝露で切断可能）である。

【０６２９】

特定の実施形態では、本発明は、構造ＸＶＩＩ（本明細書で「ＨＧＴ４００１」と称される）を有する化合物５－（（（１０，１３－ジメチル－１７－（６－メチルヘプタン－２－イル）－２，３，４，７，８，９，１０，１１，１２，１３，１４，１５，１６，１７－テトラデカヒドロ－１Ｈ－シクロペンタ［ａ］フェナントレン－３－イル）ジスルファニル）メチル）－１Ｈ－イミダゾールに関する。

【化１０７】

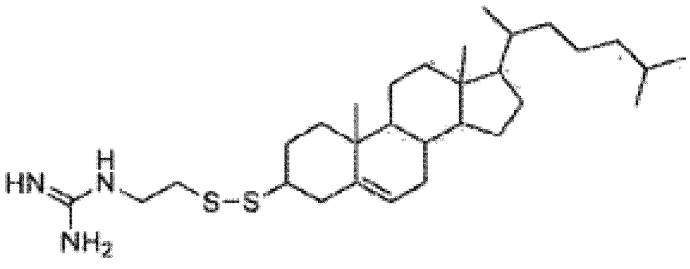


ＸＶＩＩ

【０６３０】

特定の実施形態では、本発明は、構造ＸＶＩＩＩ（本明細書で「ＨＧＴ４００２」と称される）を有する化合物１－（２－（（（３Ｓ，１０Ｒ，１３Ｒ）－１０，１３－ジメチル－１７－（（Ｒ）－６－メチルヘプタン－２－イル）－２，３，４，７，８，９，１０，１１，１２，１３，１４，１５，１６，１７－テトラデカヒドロ－１Ｈ－シクロペンタ［ａ］フェナントレン－３－イル）ジスルファニル）エチル）グアニジンに関する。

【化１０８】

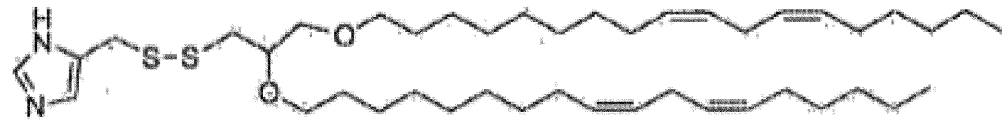


ＸＶＩＩＩ

【０６３１】
特定の実施形態では、本発明は、構造ＸＩＸ（本明細書で「ＨＧＴ４００３」と称される）を有する化合物２－（（２，３－ビス（（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イルオキシ）プロピル）ジスルファニル）－Ｎ，Ｎ－ジメチルエタンアミンに関する。
【化１０９】

ＸＩＸ

【０６３２】
他の実施形態では、本発明は、構造ＸＸ（本明細書で「ＨＧＴ４００４」と称される）の構造を有する化合物５－（（（２，３－ビス（（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イルオキシ）プロピル）ジスルファニル）メチル）－１Ｈ－イミダゾールに関する。
【化１１０】



ＸＸ

【０６３３】
さらに他の実施形態では、本発明は、構造ＸＸＩ（本明細書で「ＨＧＴ４００５」と称される）を有する化合物１－（（（２，３－ビス（（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イルオキシ）プロピル）ジスルファニル）メチル）グアニジンに関する。
【化１１１】

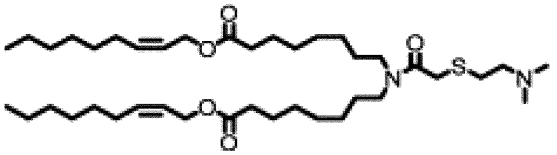
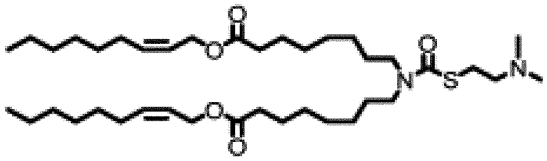
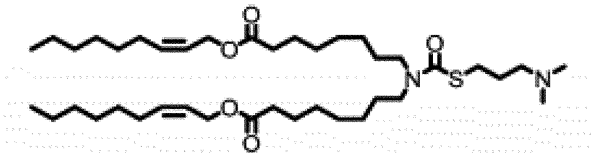
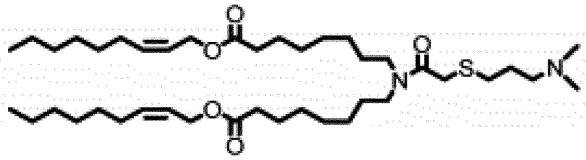
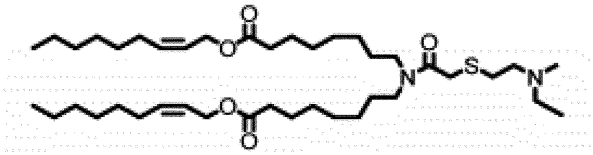
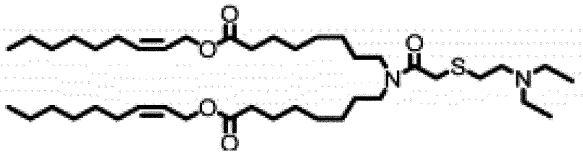
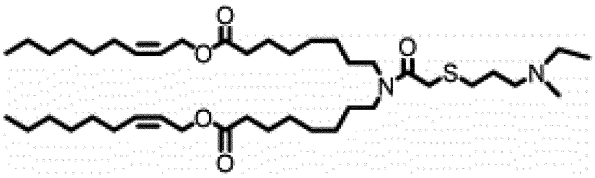
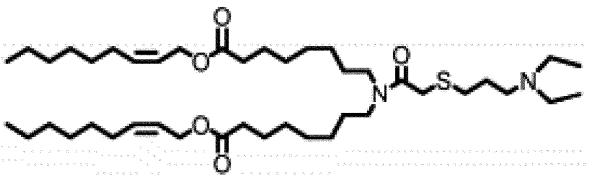
ＸＸＩ

【０６３４】
特定の実施形態では、構造３～１０として記載される化合物は、イオン化可能脂質である。
【０６３５】
化合物、及び特に構造３～８として記載されるイミダゾールベースの化合物（例えば、ＨＧＴ４００１及びＨＧＴ４００４）は、特に従来のイオン化可能脂質と比べて、それらの低減した毒性によって特性化される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の輸送ビヒクルは、かかる薬学的またはリポソーム組成物における他のより毒性のイオン化可能脂質の相対的濃度が低減され、またはそうでなければ排除され得るように、１つ以上のイミダゾールベースのイオン化可能脂質化合物を含む。
【０６３６】
イオン化可能脂質には、国際特許出願第ＰＣＴ／ＵＳ２０１９／０２５２４６号、ならびに米国特許公開第２０１７／０１９０６６１号及び同第２０１７／０１１４０１０号（参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる）に開示されているものが含まれる。

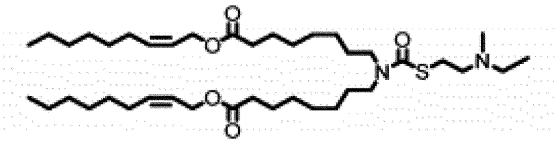
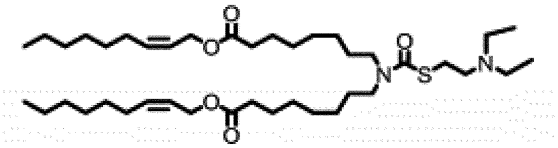
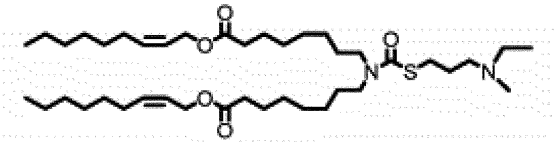
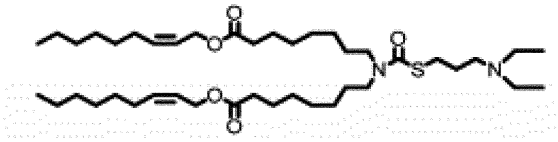
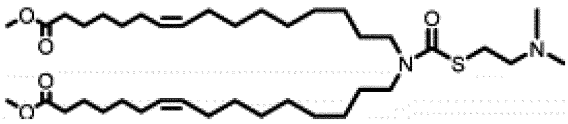
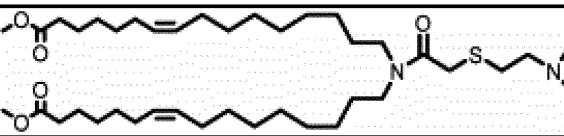
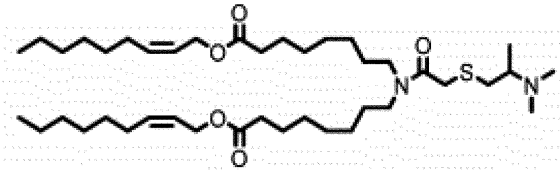
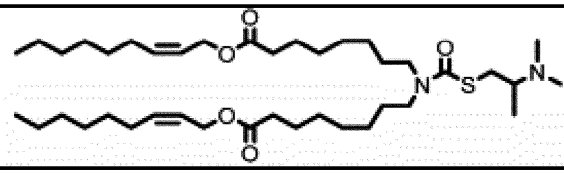
イオン化可能脂質は、以下の表１２、１３、１４、または１５ａから選択される脂質を含み得る。

【表１２－１】

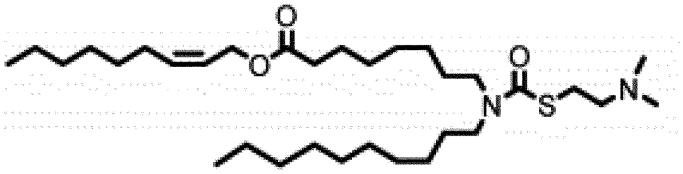
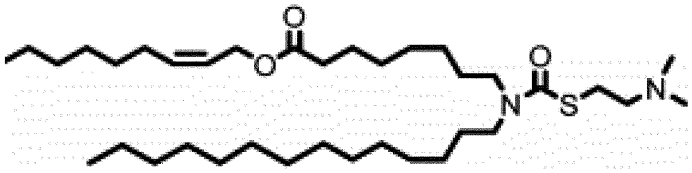
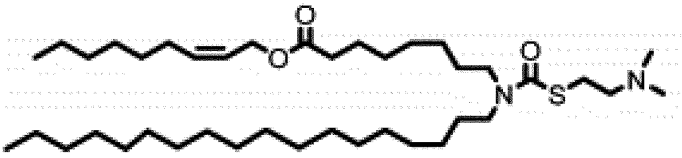
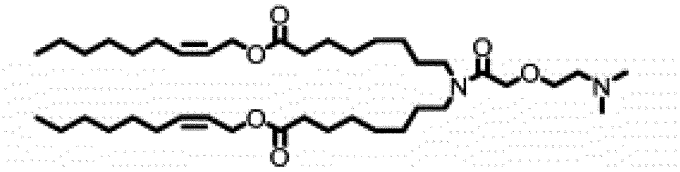
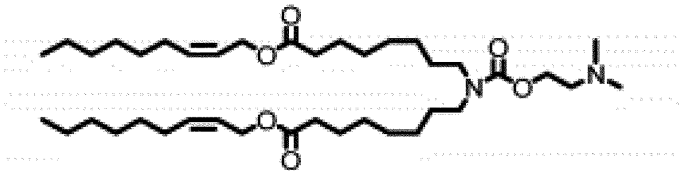
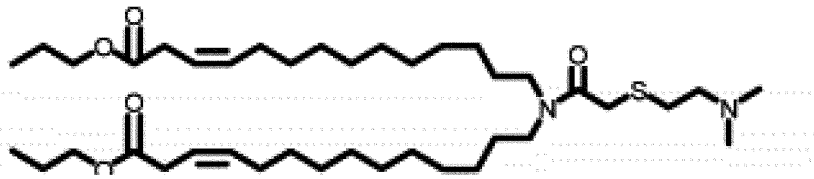
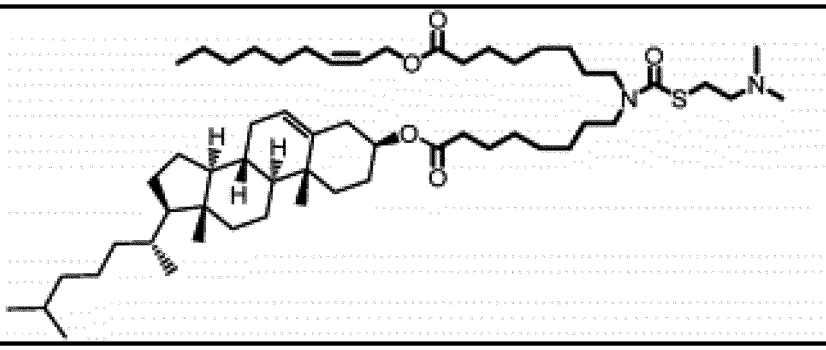
表１２

| | |
|---|---|
| ATX-001 |  |
| ATX-002 |  |
| ATX-003 |  |
| ATX-004 |  |
| ATX-005 |  |
| ATX-006 |  |
| ATX-007 |  |
| ATX-008 |  |

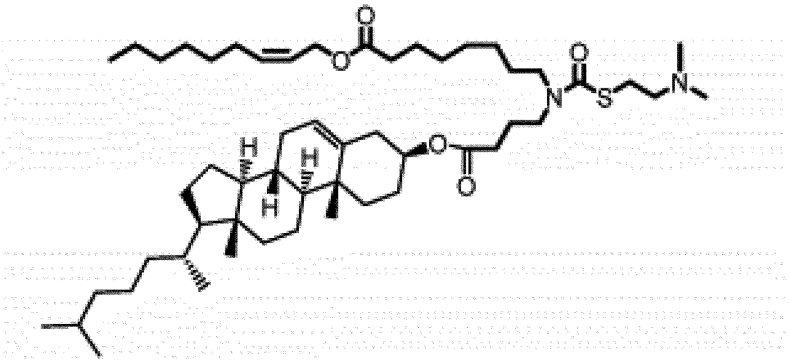
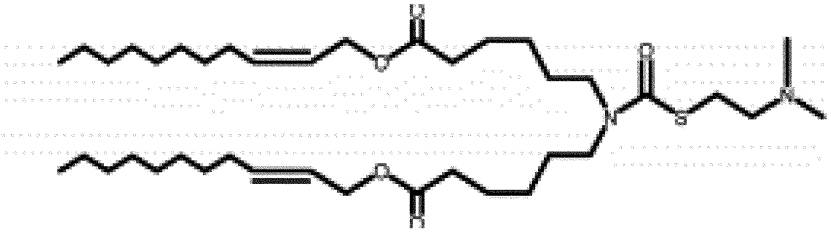
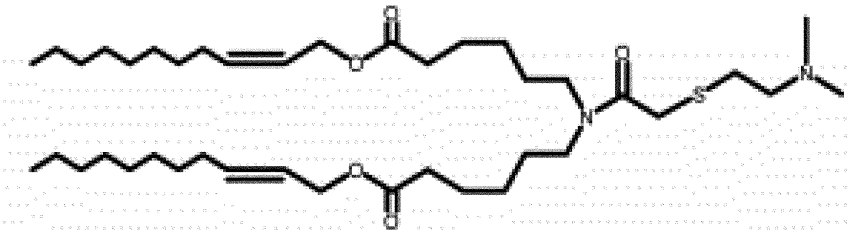
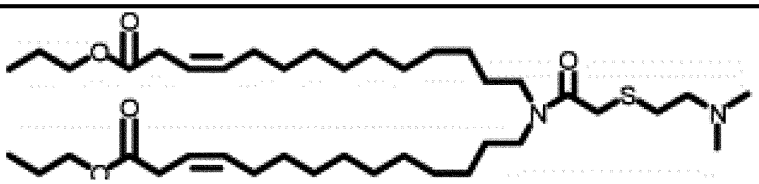
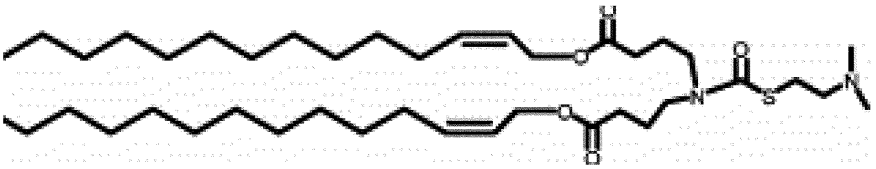
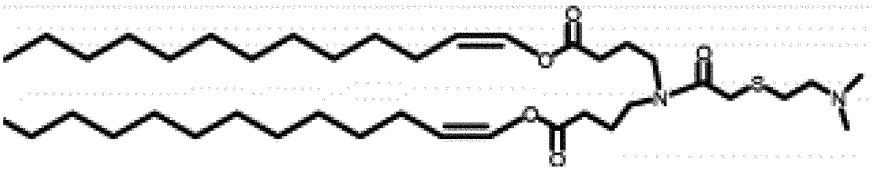
【表１２－２】

| | |
|---|---|
| ATX-009 |  |
| ATX-010 |  |
| ATX-011 |  |
| ATX-012 |  |
| ATX-013 |  |
| ATX-014 |  |
| ATX-015 | |
| ATX-016 |  |
| ATX-017 |  |

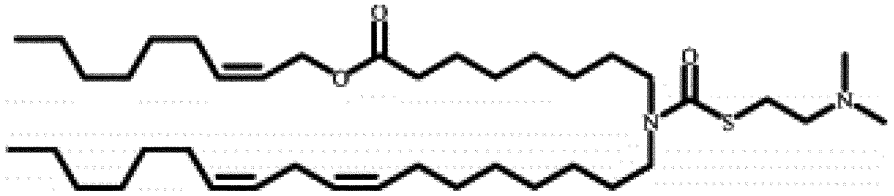
【表１２－３】

| | |
|---|---|
| ATX-018 |  |
| ATX-019 |  |
| ATX-020 |  |
| ATX-021 |  |
| ATX-022 |  |
| ATX-023 |  |
| ATX-024 |  |

【表１２－４】

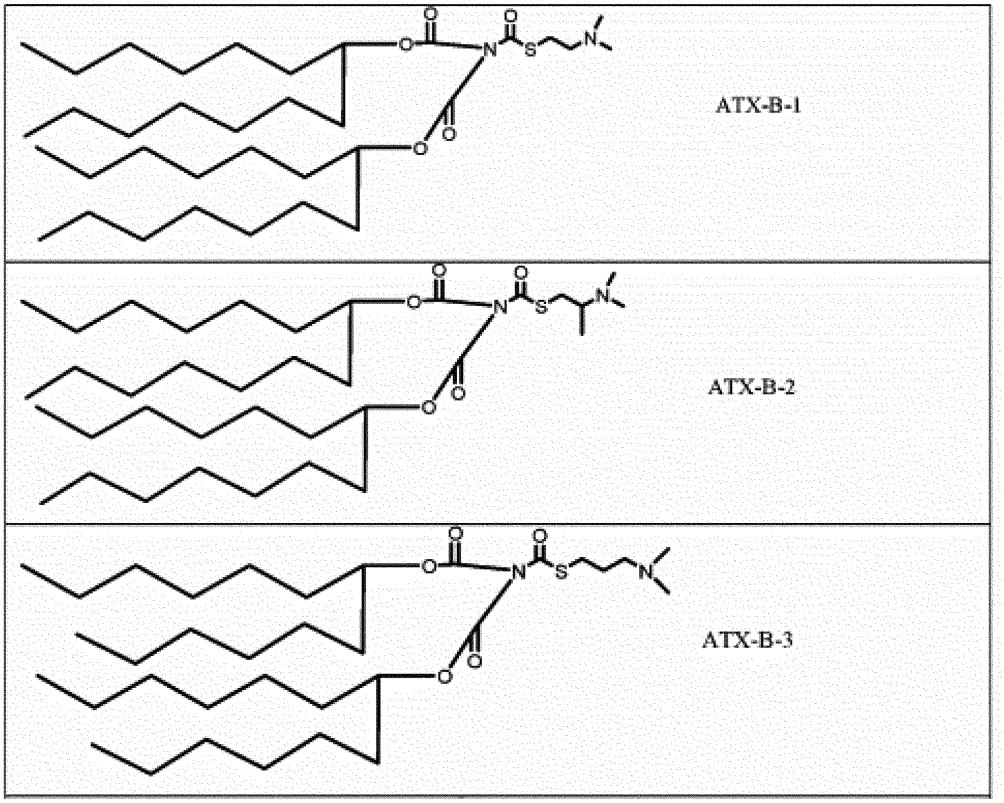
| | |
|---|---|
| ATX-025 |  |
| ATX-026 |  |
| ATX-027 |  |
| ATX-028 |  |
| ATX-029 |  |
| ATX-030 |  |

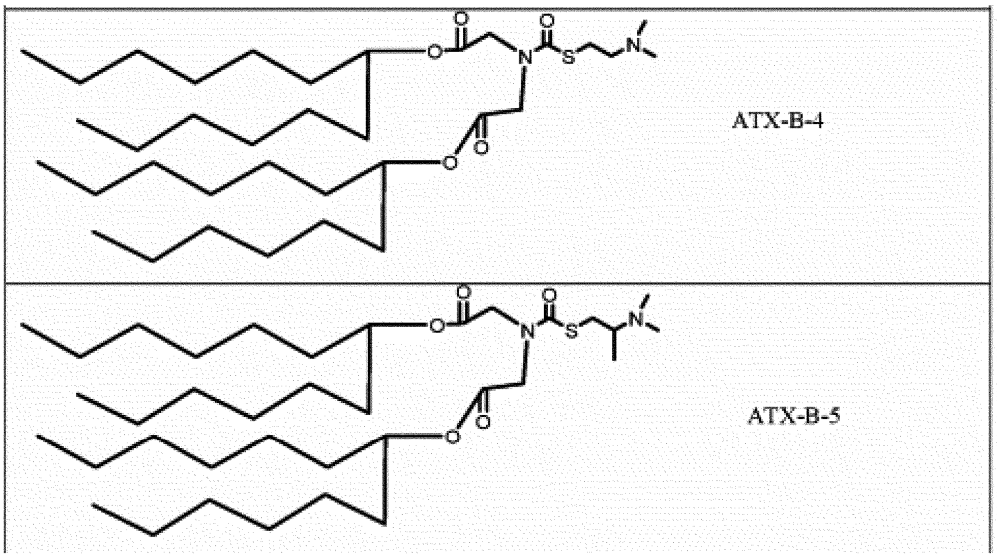
【表１２－５】

| | |
|---|---|
| ATX-031 |  |
| ATX-032 | |

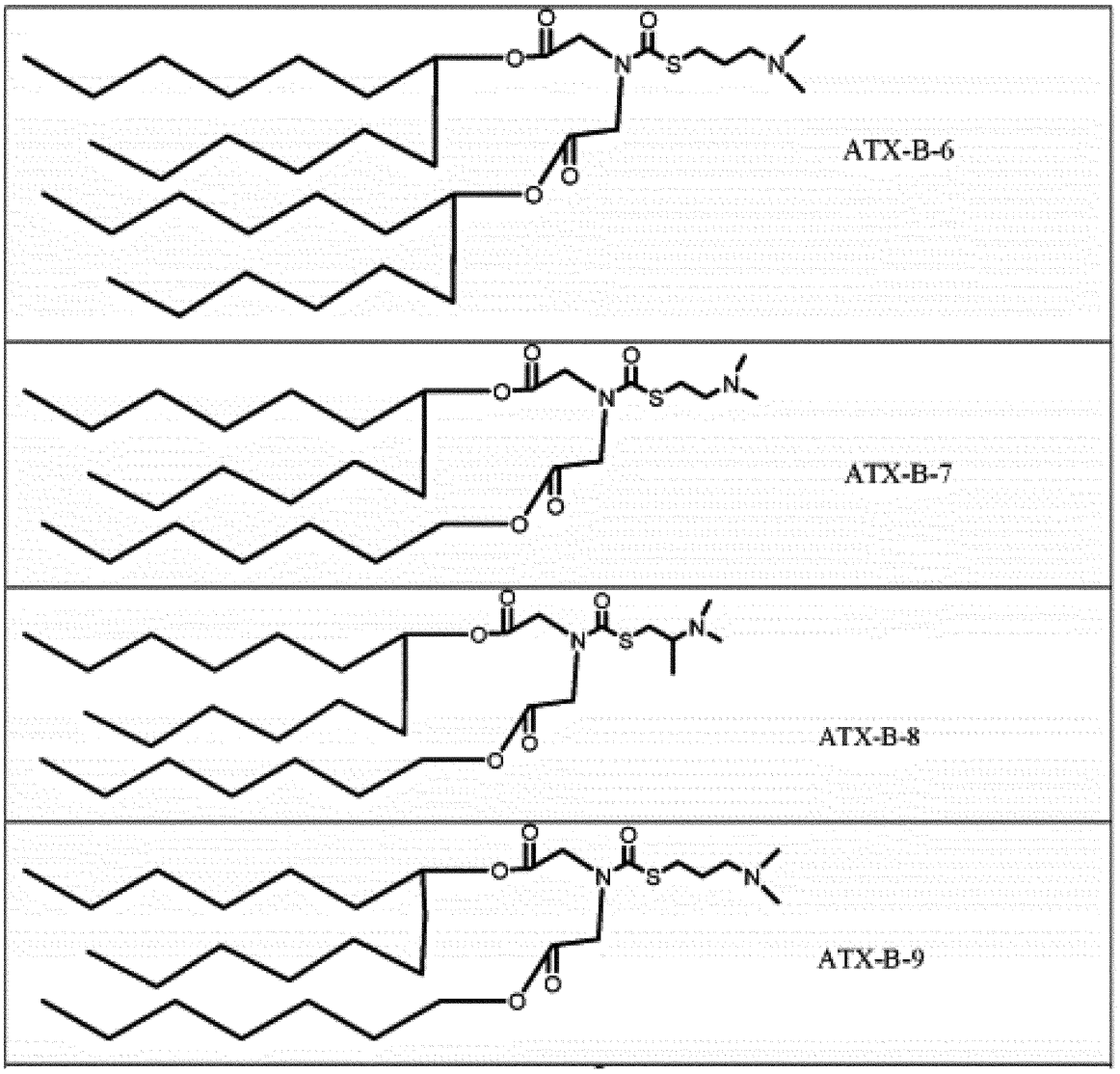
【表１３－１】

表１３

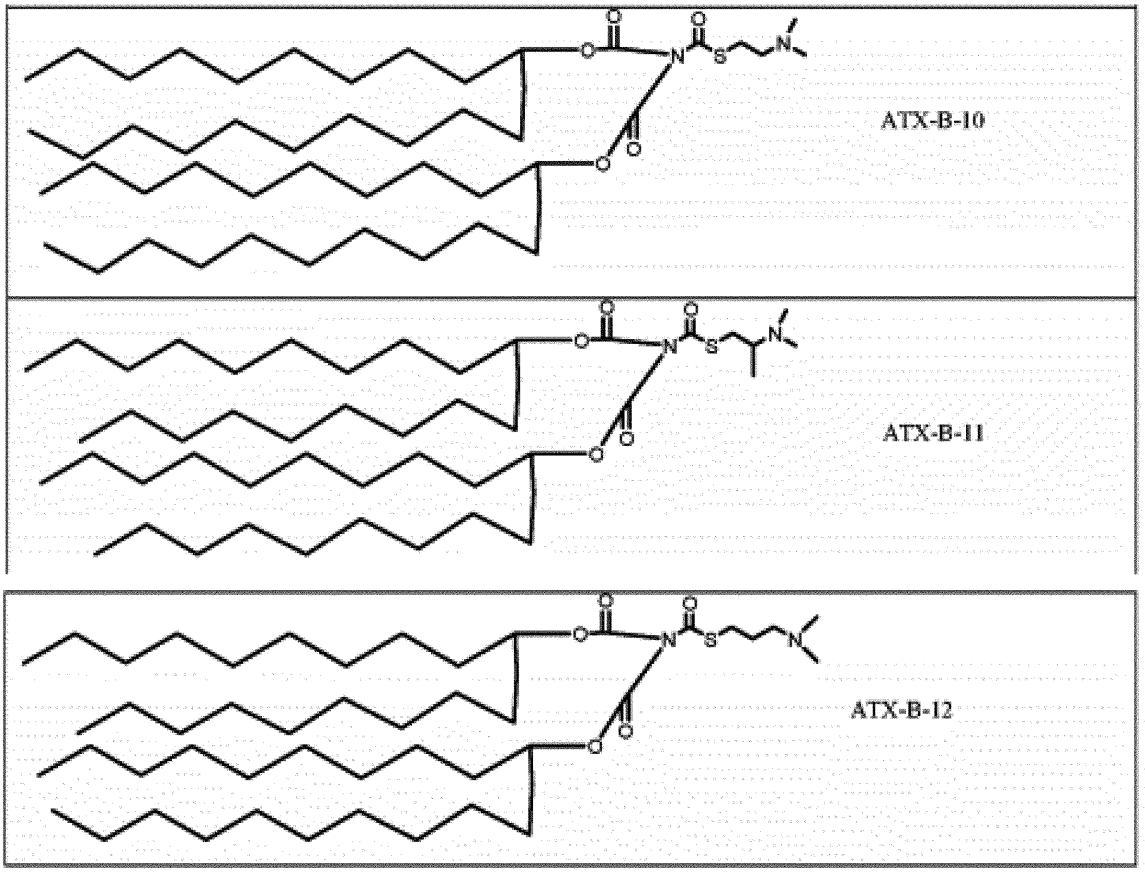


【表１３－２】

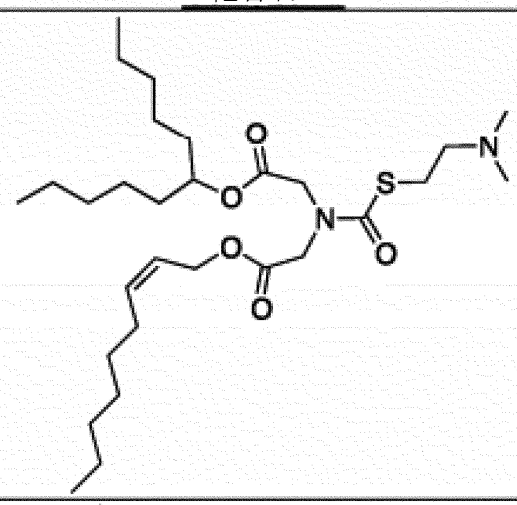
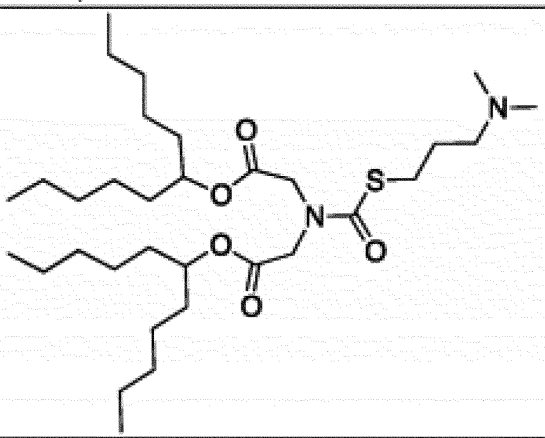
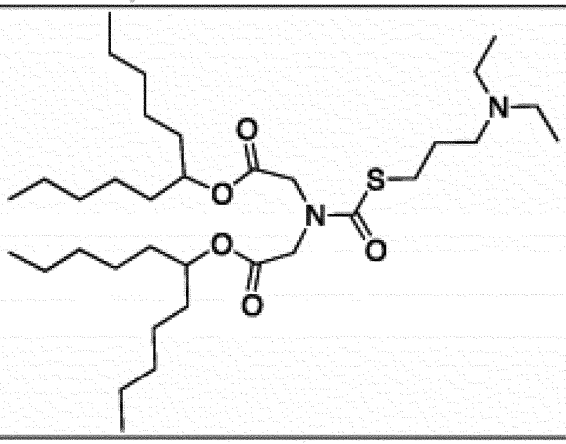


【表１３－３】

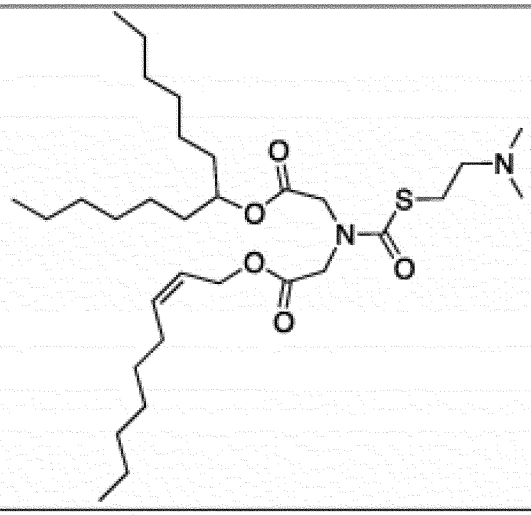
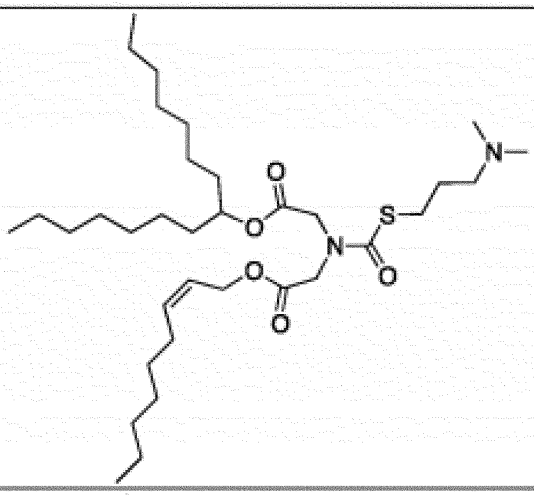
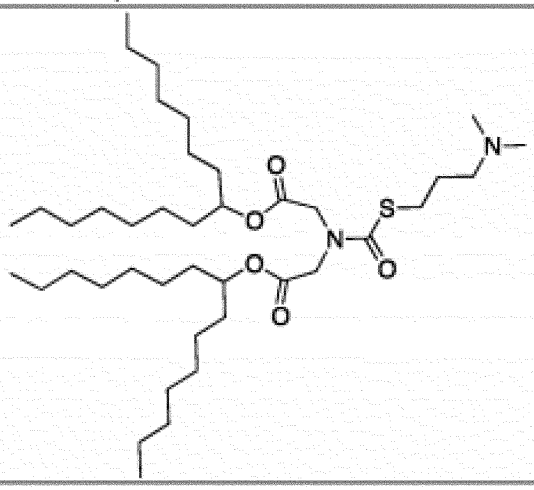


【表１４－１】

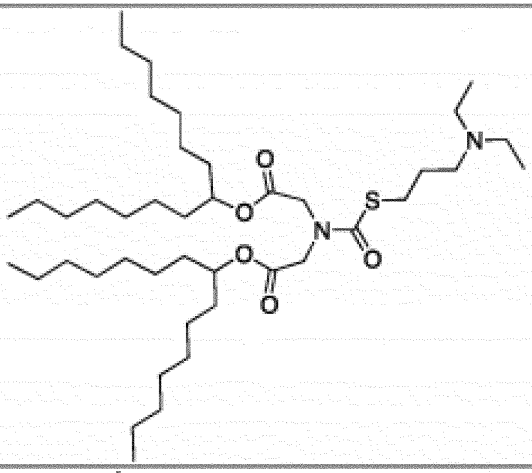
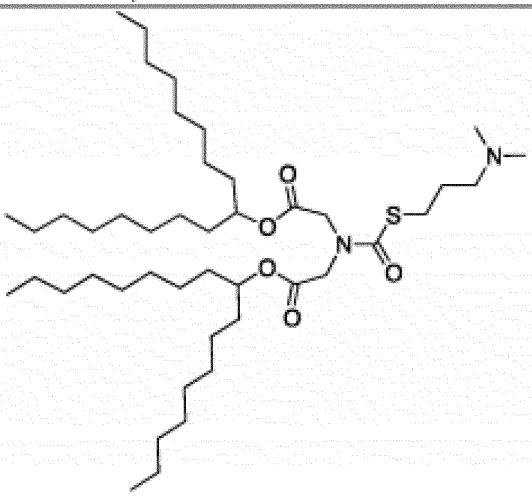
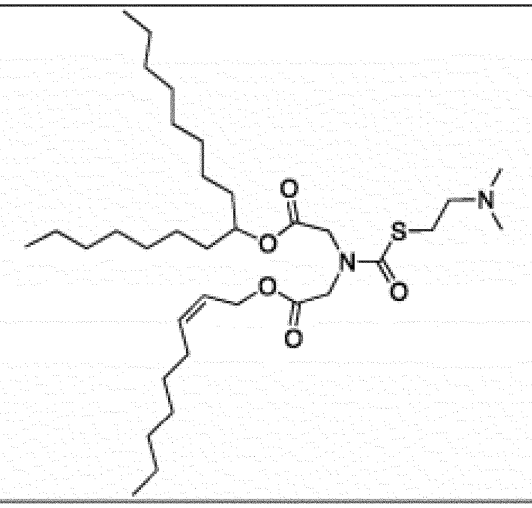
表１４

| 化合物 | ATX-# |
|---|---|
|  | 0063 |
|  | 0130 |
|  | 0131 |

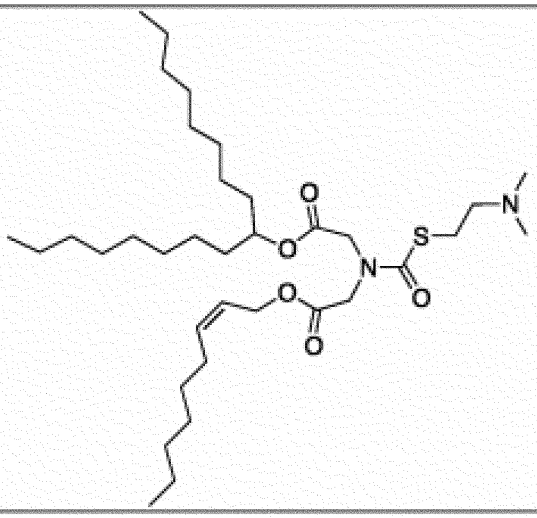
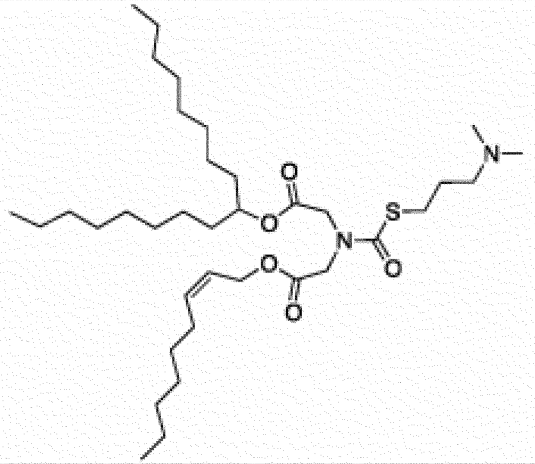
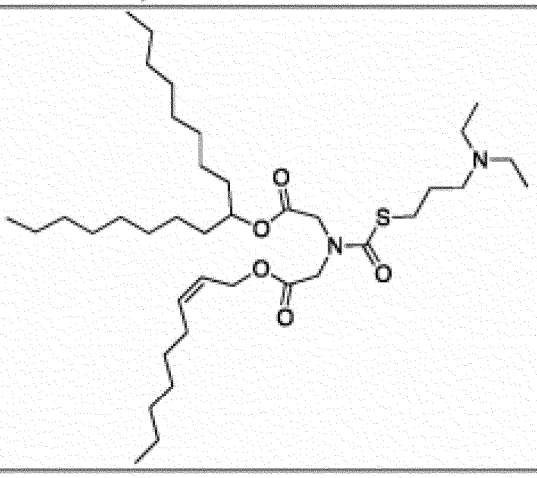
【表１４－２】

| | |
|---|---|
|  | 0044 |
|  | 0111 |
|  | 0132 |

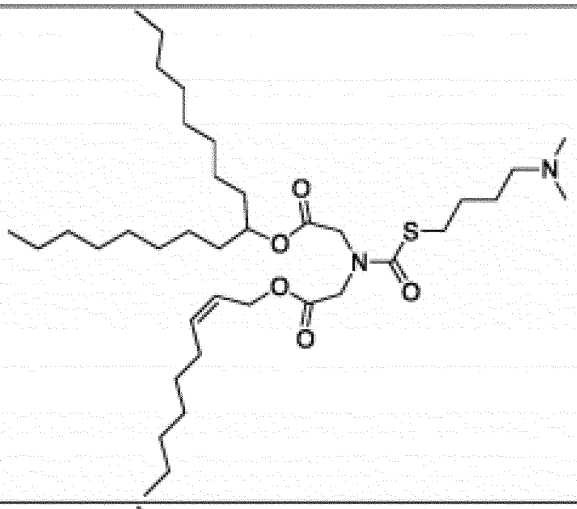
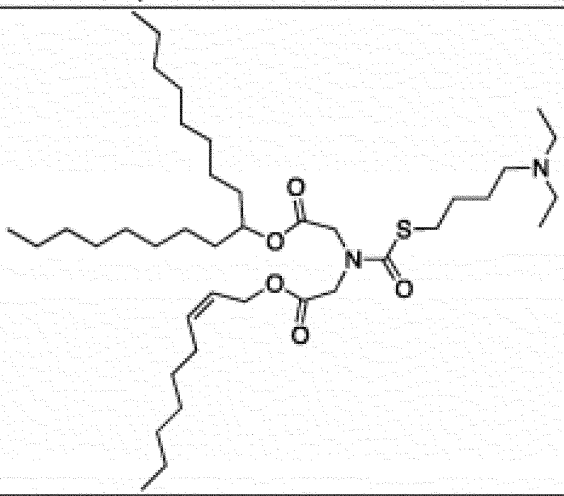
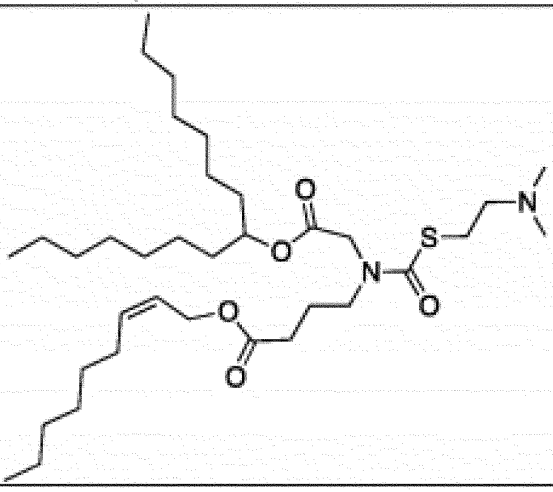
【表１４－３】

| | |
|---|---|
|  | 0134 |
|  | 0133 |
|  | 0064 |

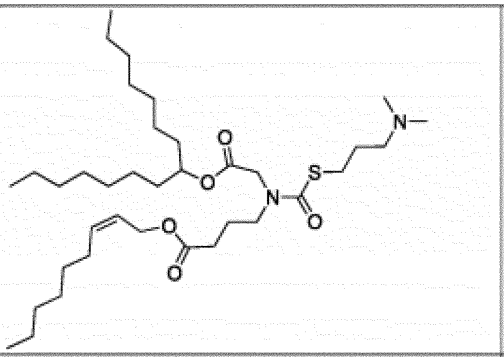
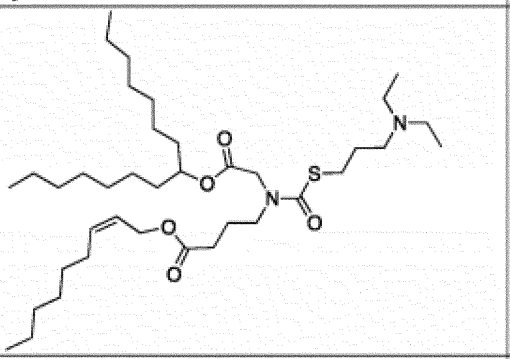
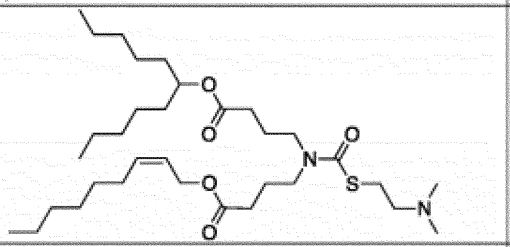
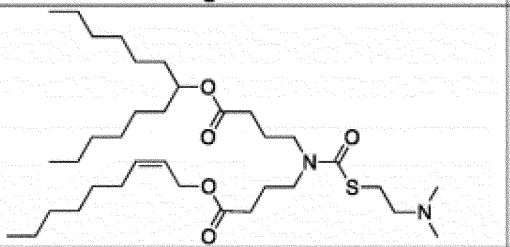
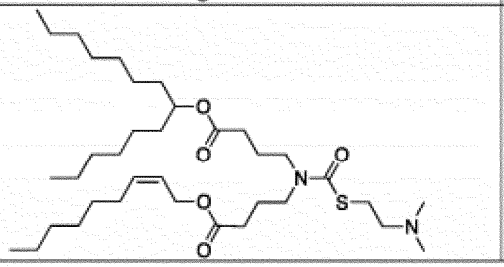
【表１４－４】

| | |
|---|---|
|  | 0061 |
|  | 0100 |
|  | 0117 |

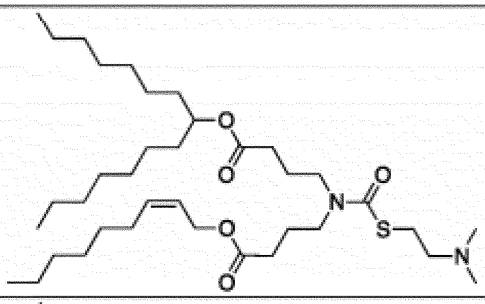
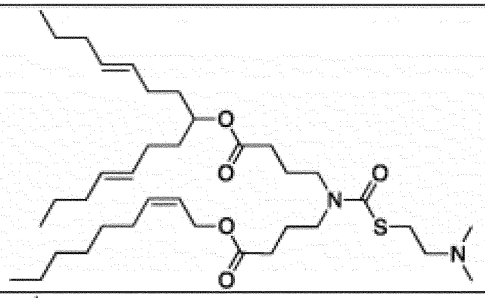
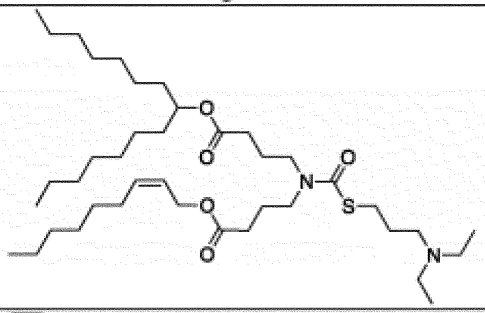
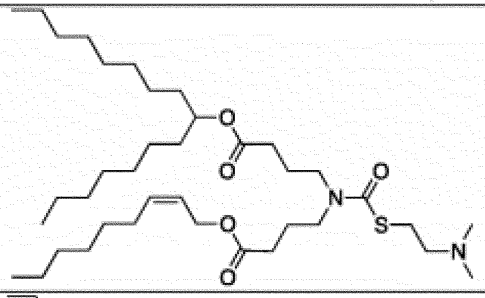
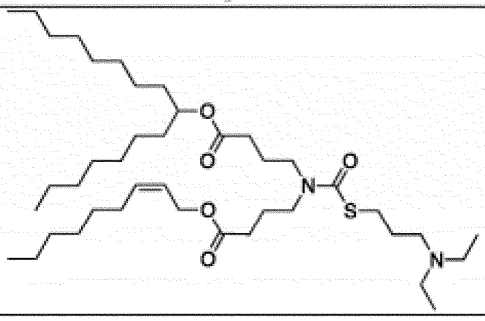
【表１４－５】

| | |
|---|---|
|  | 0114 |
|  | 0115 |
|  | 0101 |

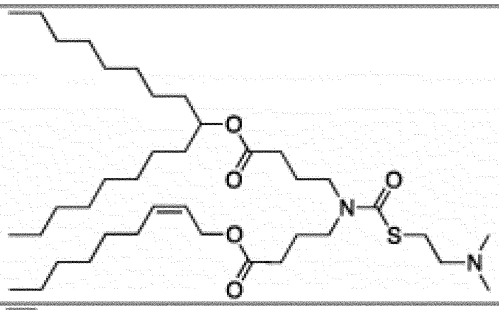
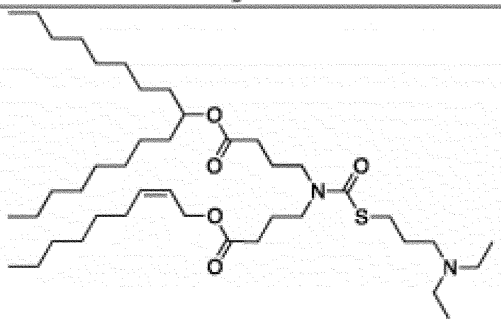
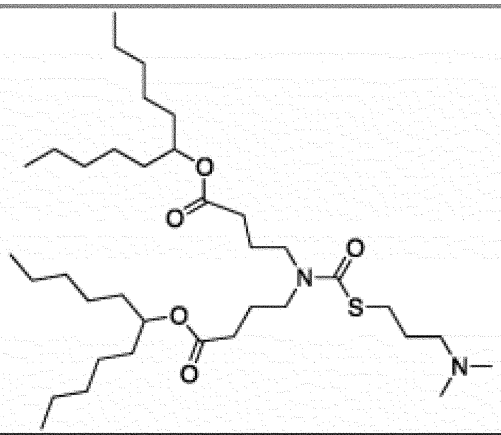
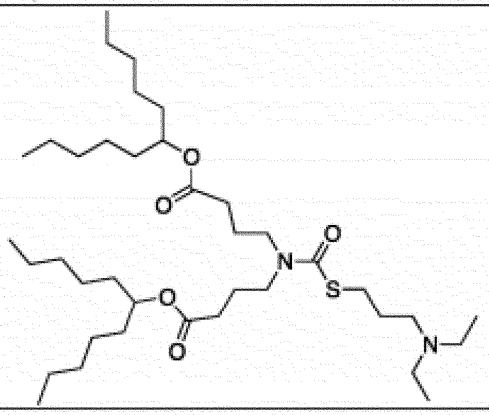
【表１４－６】

| | |
|---|---|
|  | 0106 |
|  | 0116 |
|  | 0043 |
|  | 0086 |
|  | 0058 |

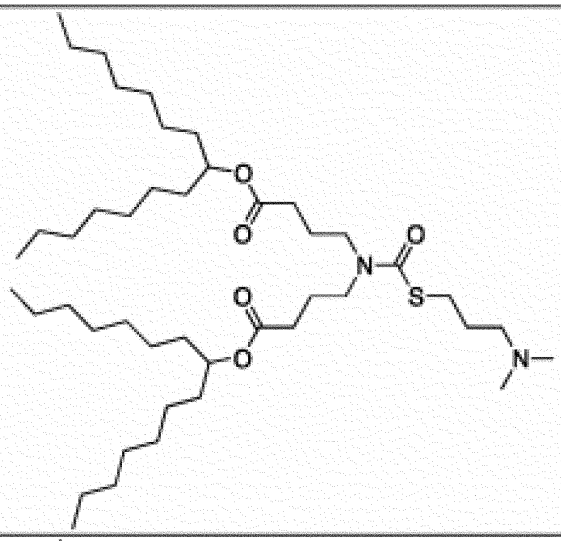
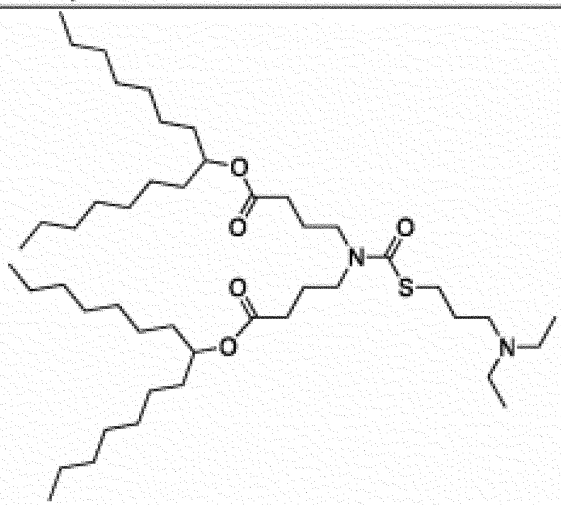
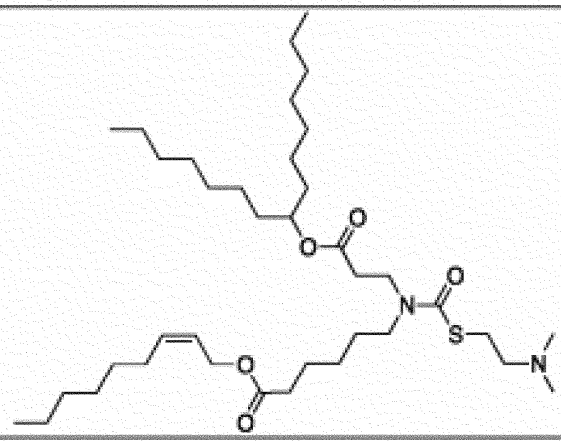
【表１４－７】

| | |
|---|---|
|  | 0081 |
|  | 0123 |
|  | 0122 |
|  | 0057 |
|  | 0088 |

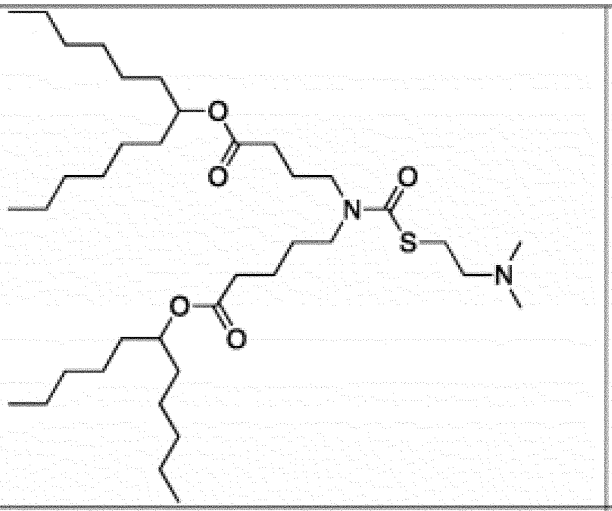
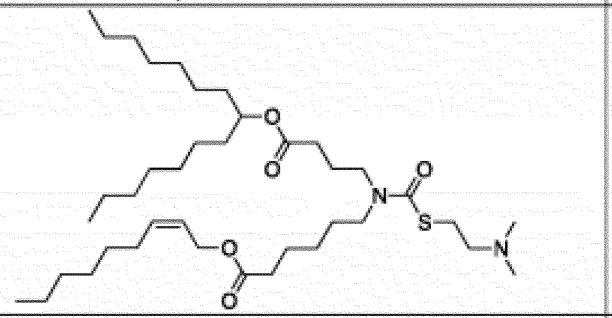
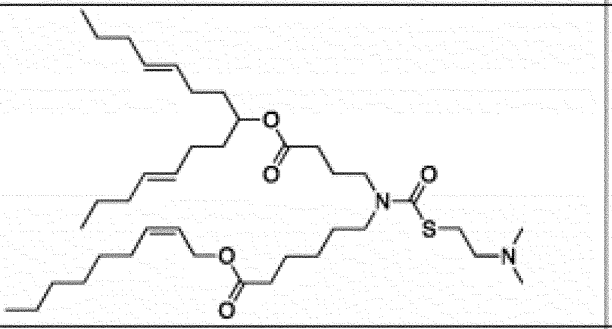
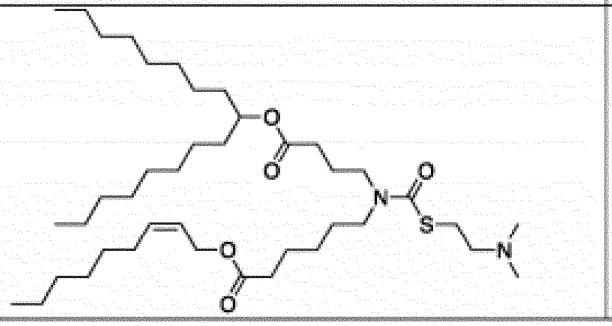
【表１４－８】

| | |
|---|---|
|  | 0087 |
|  | 0124 |
|  | 0128 |
|  | 0127 |

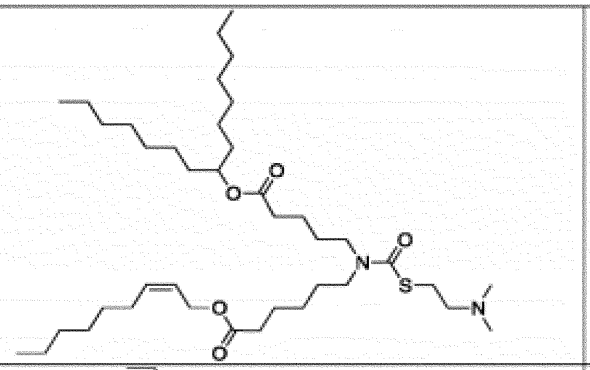
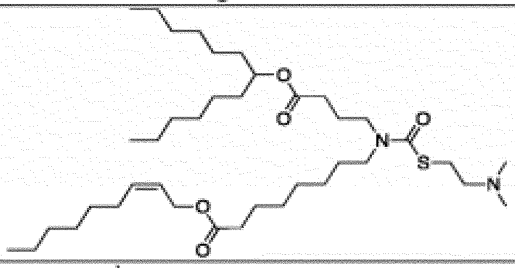
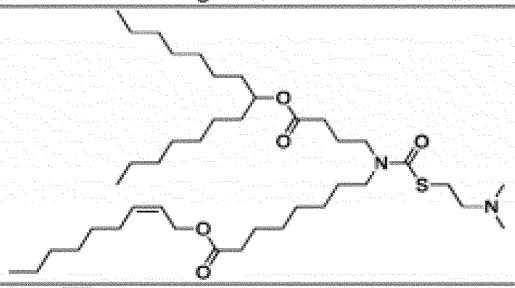
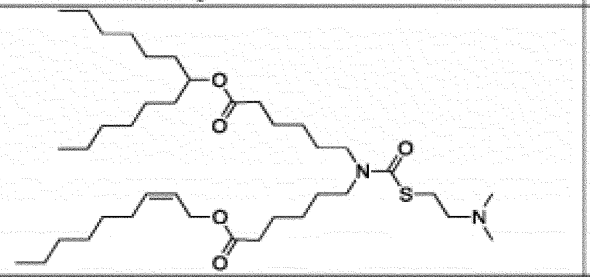
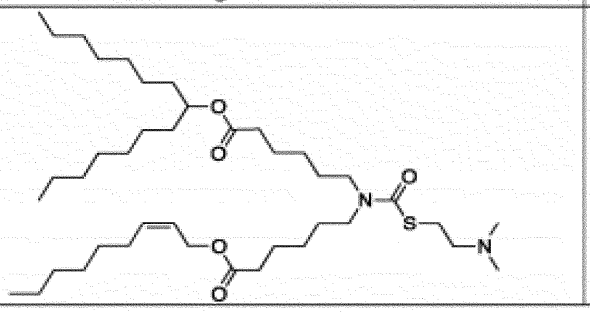
【表１４－９】

| | |
|---|---|
|  | 0126 |
|  | 0129 |
|  | 0082 |

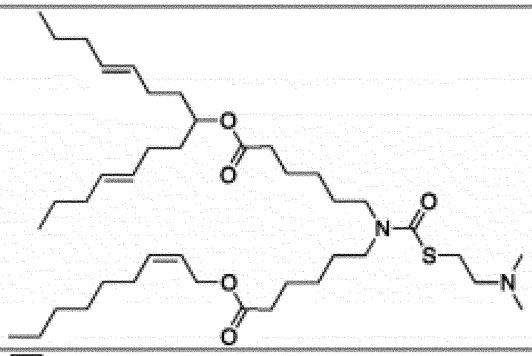
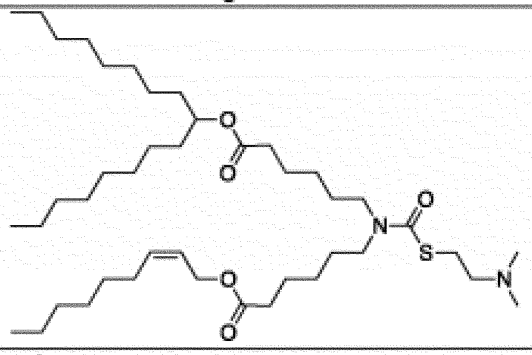
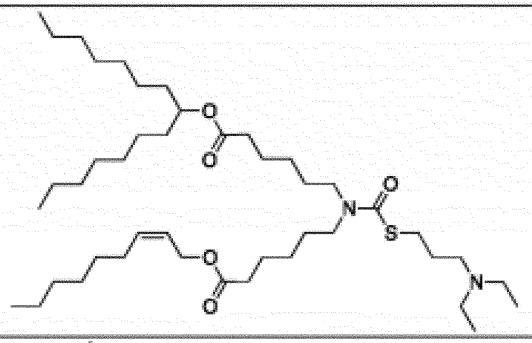
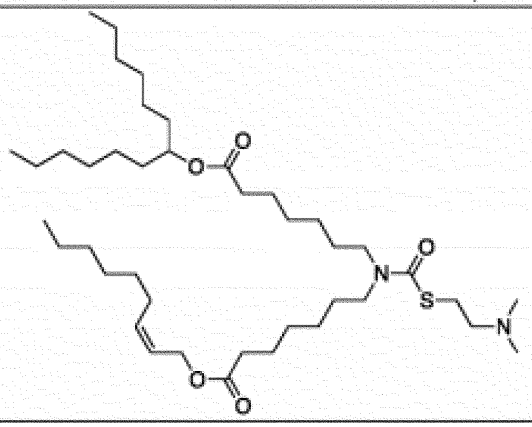
【表１４－１０】

| | |
|---|---|
|  | 0085 |
|  | 0083 |
|  | 0121 |
|  | 0091 |

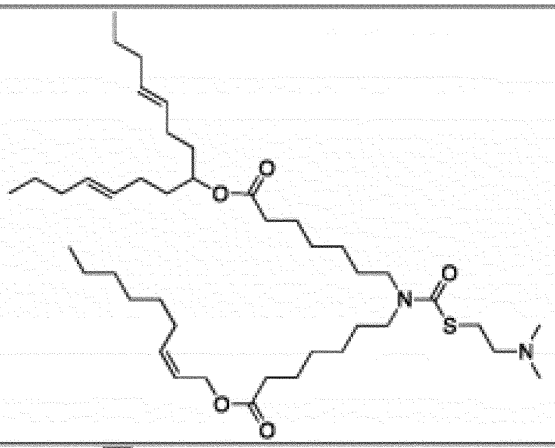
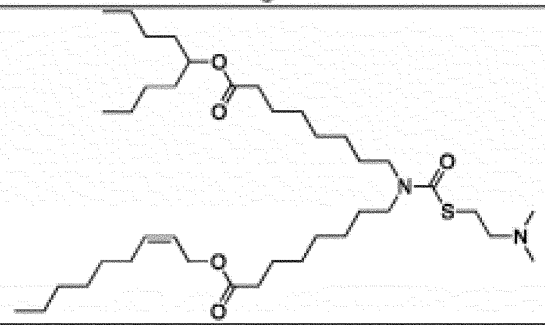
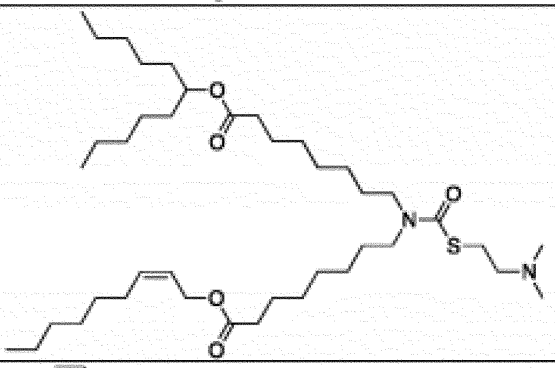
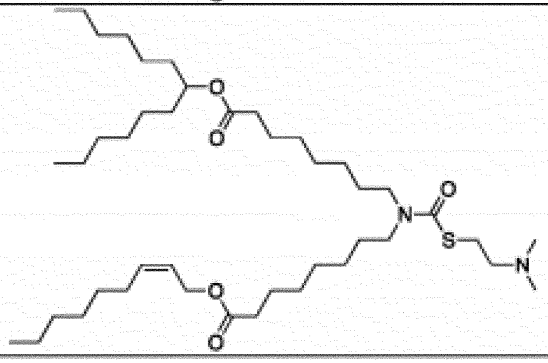
【表１４－１１】

| | |
|---|---|
|  | 0102 |
|  | 0098 |
|  | 0092 |
|  | 0084 |
|  | 0095 |

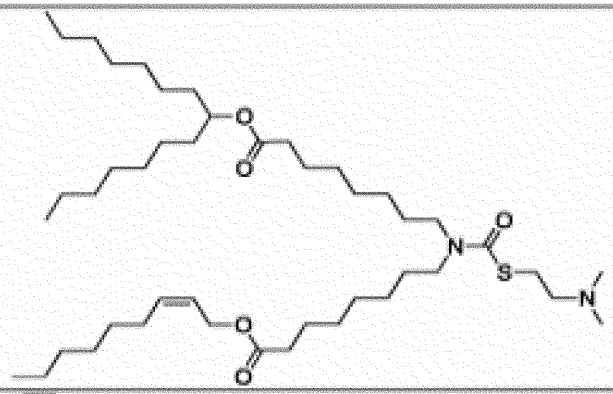
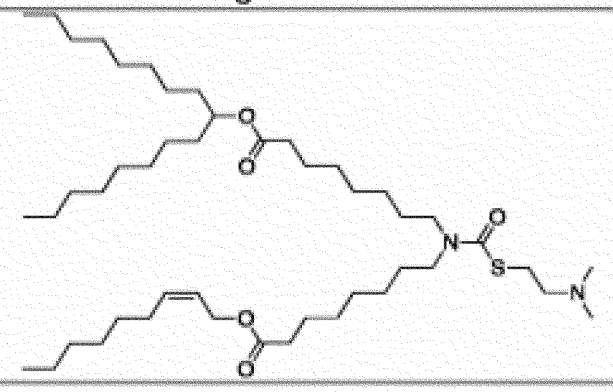
【表１４－１２】

| | |
|---|---|
|  | 0125 |
|  | 0094 |
|  | 0109 |
|  | 0110 |

【表１４－１３】

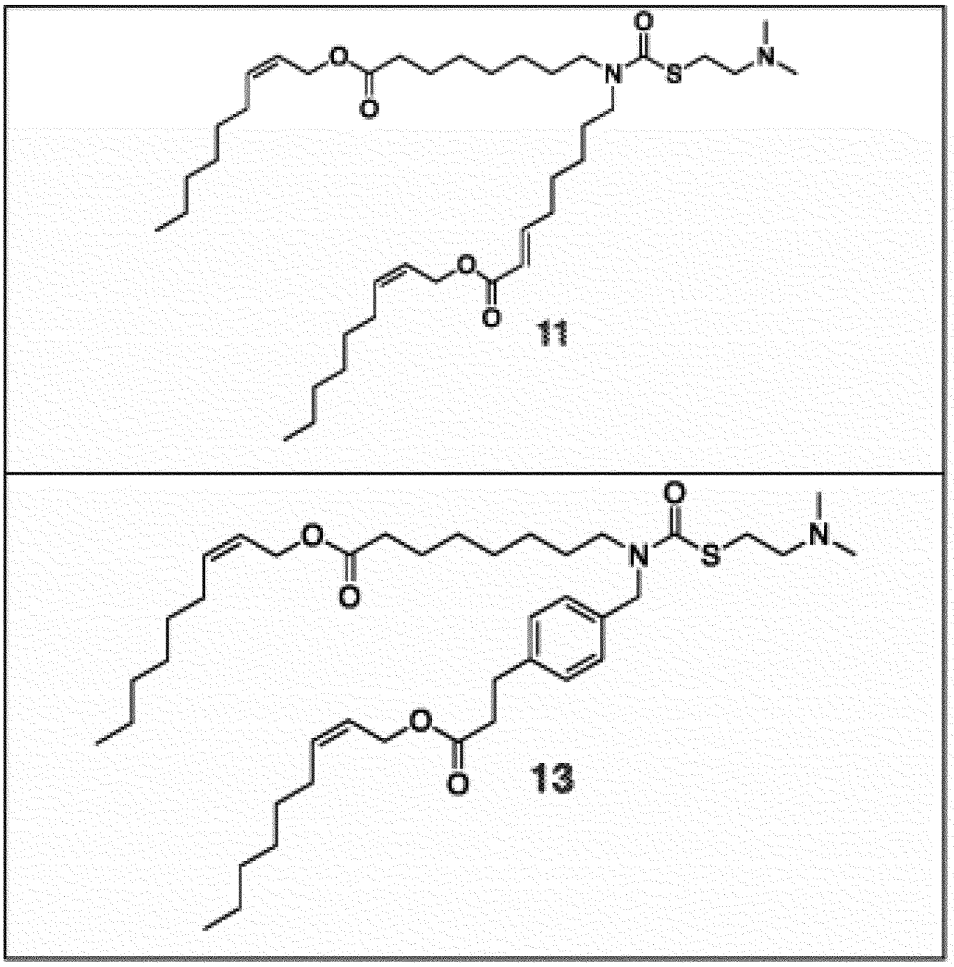
| | |
|---|---|
|  | 0118 |
|  | 0108 |
|  | 0107 |
|  | 0093 |

【表１４－１４】

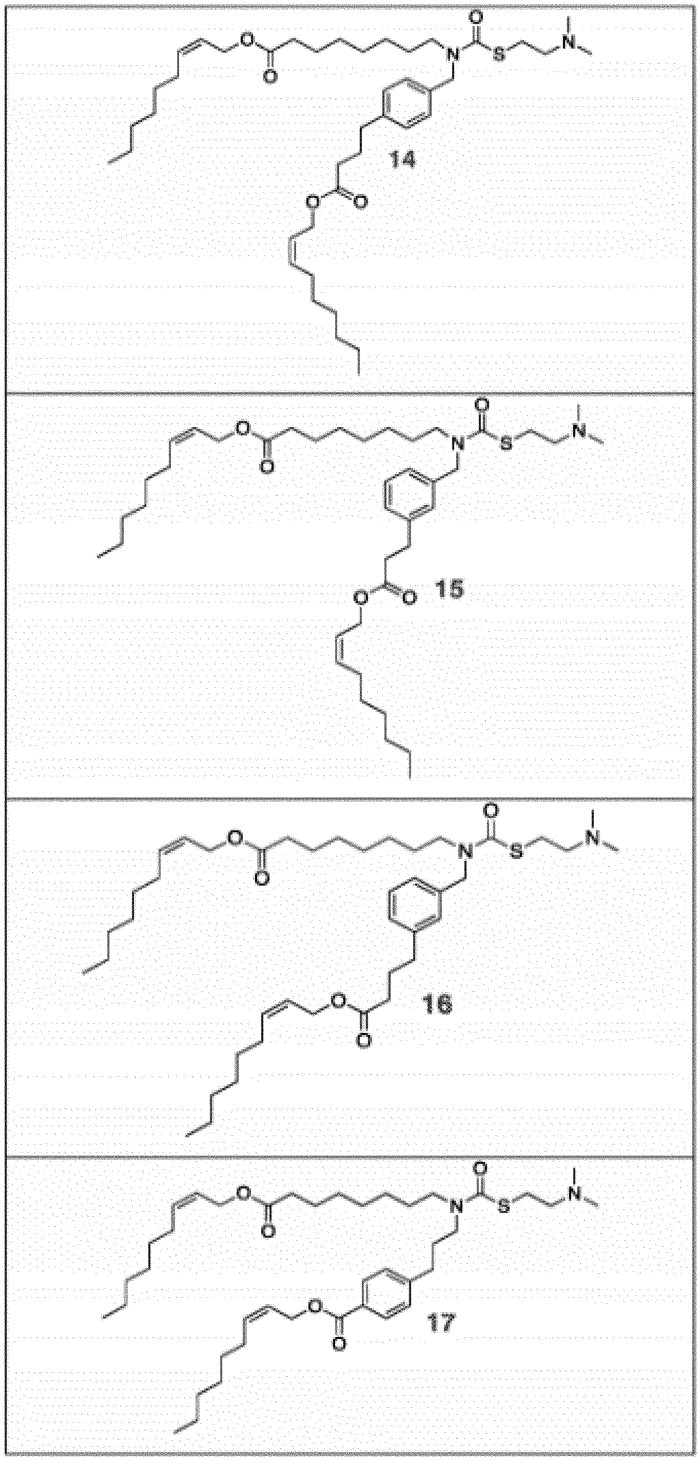
| | |
|---|---|
|  | 0097 |
|  | 0096 |

【表１５ａ－１】

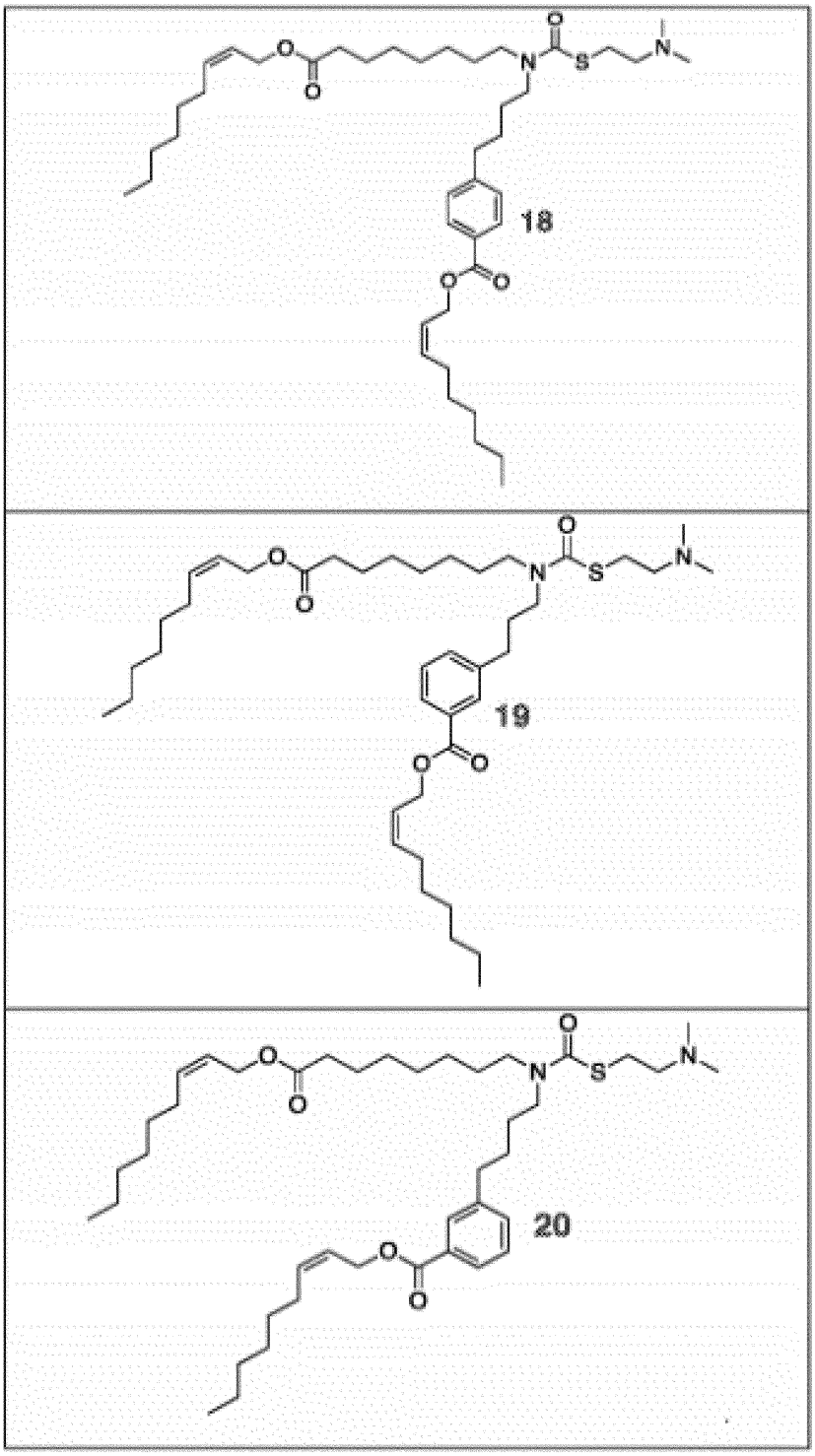
表１５ａ



【表１５ａ－２】



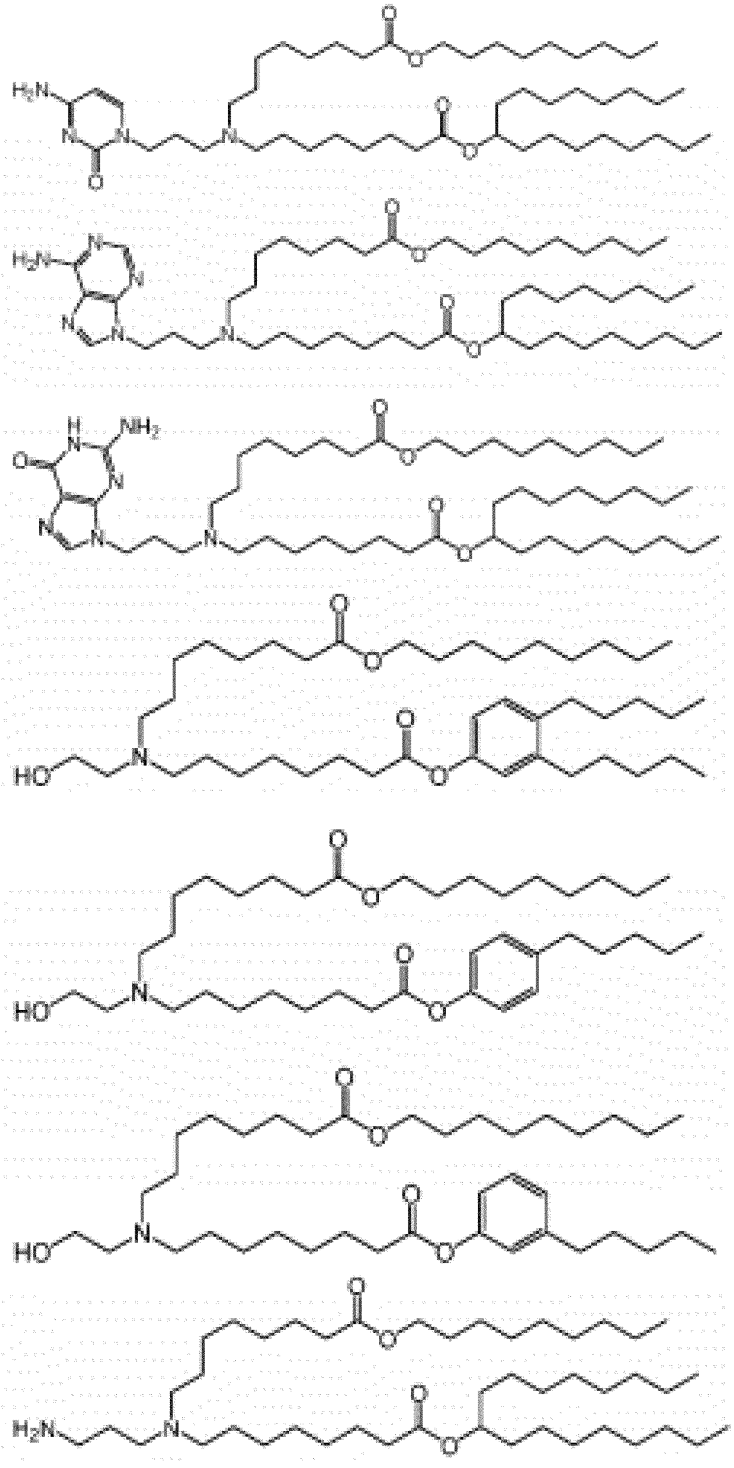
【表１５ａ－３】



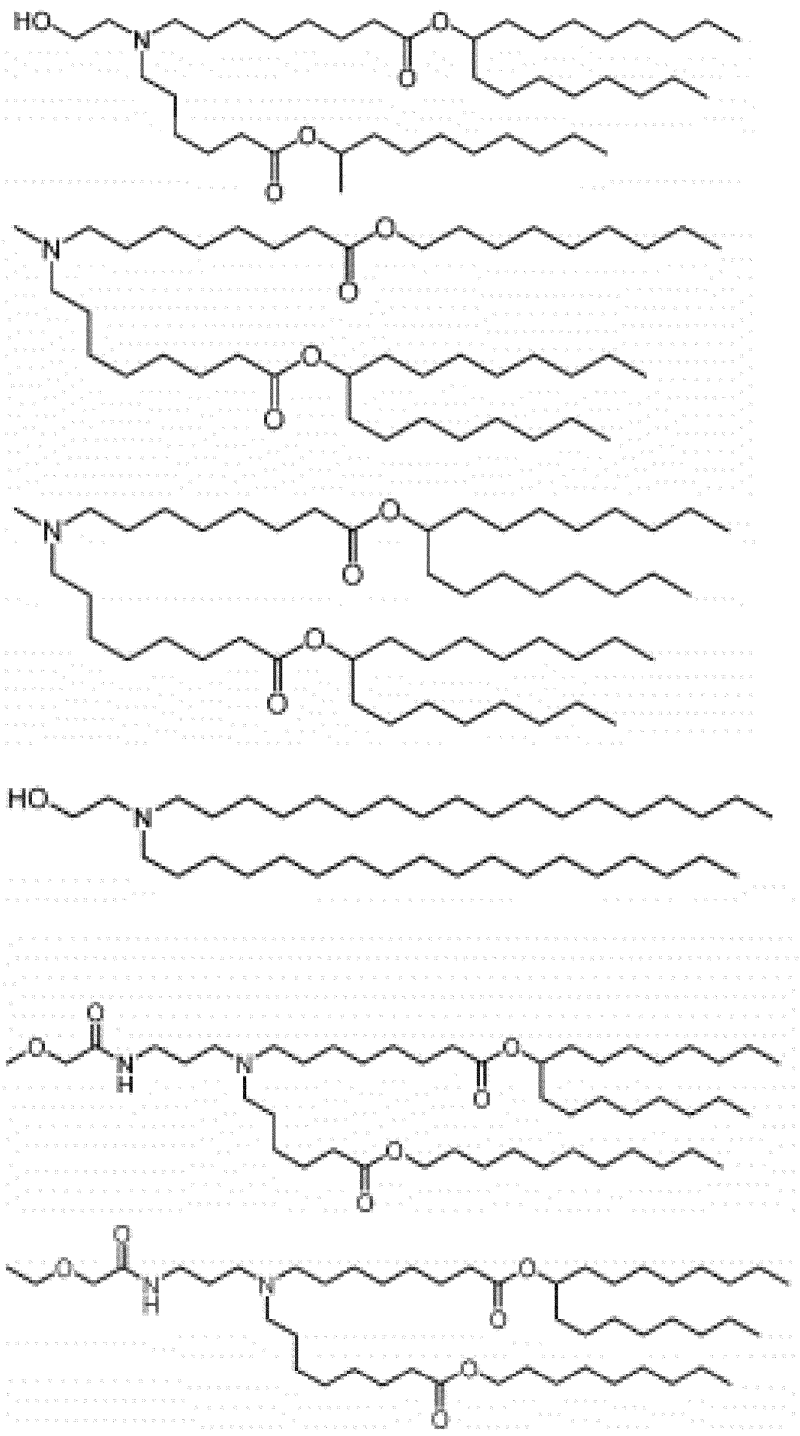

【０６３７】

いくつかの実施形態では、イオン化可能脂質は、国際特許出願第ＰＣＴ／ＵＳ２０１９／０１５９１３号に記載されているとおりである。いくつかの実施形態では、イオン化可能脂質は、以下から選択される：

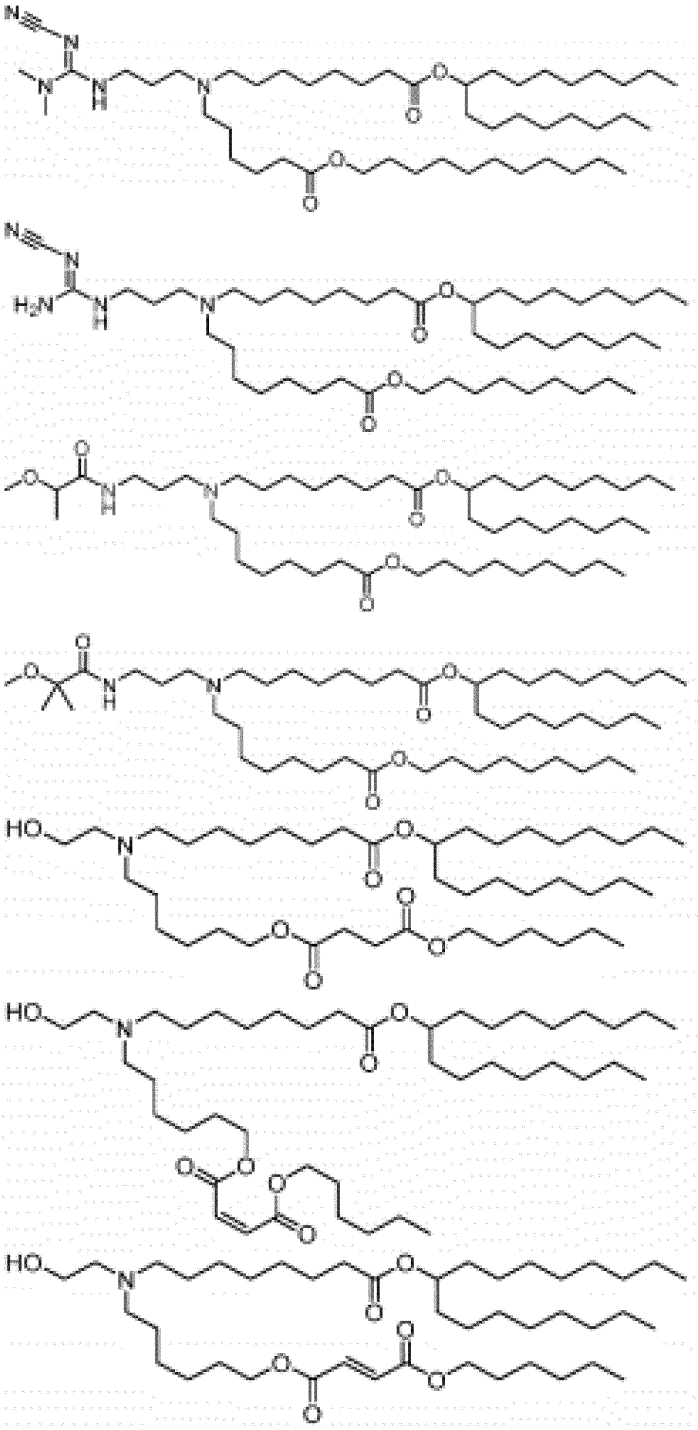
【化１１２－１】



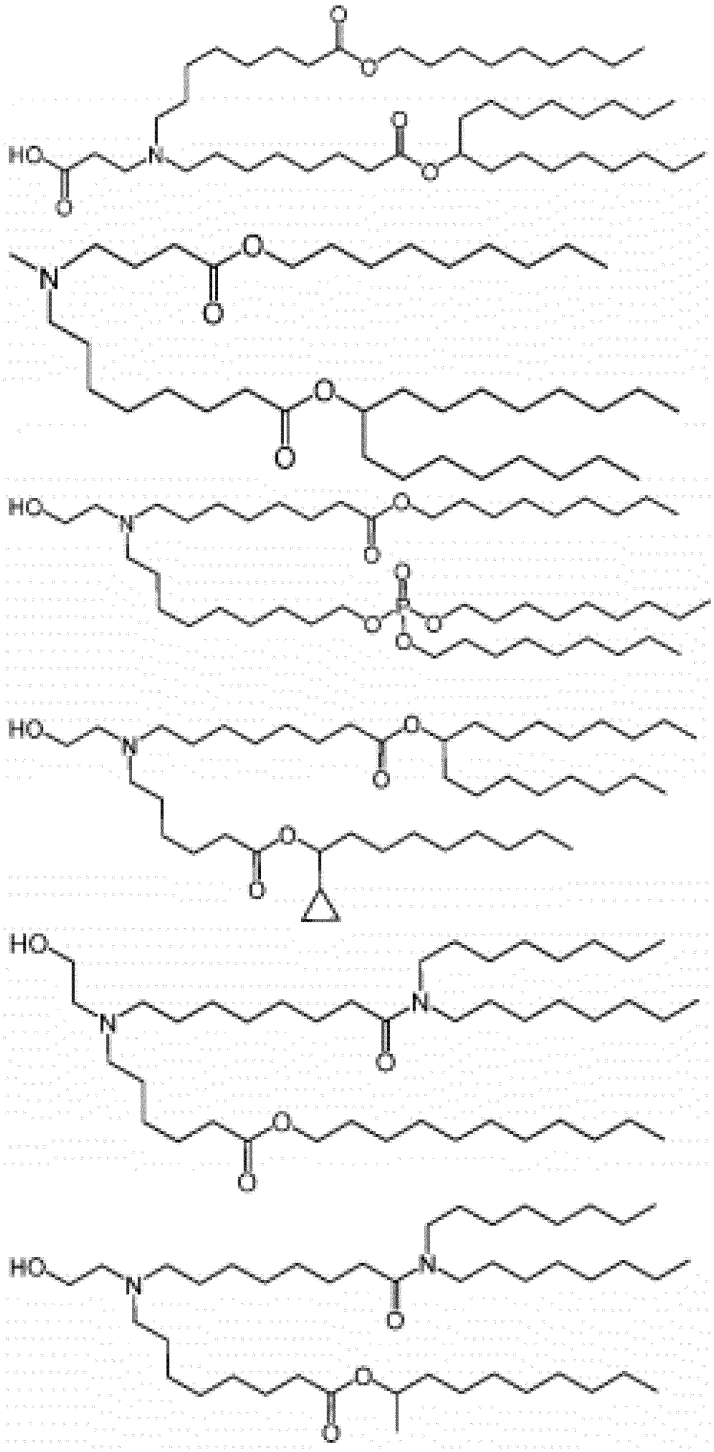
【化１１２－２】



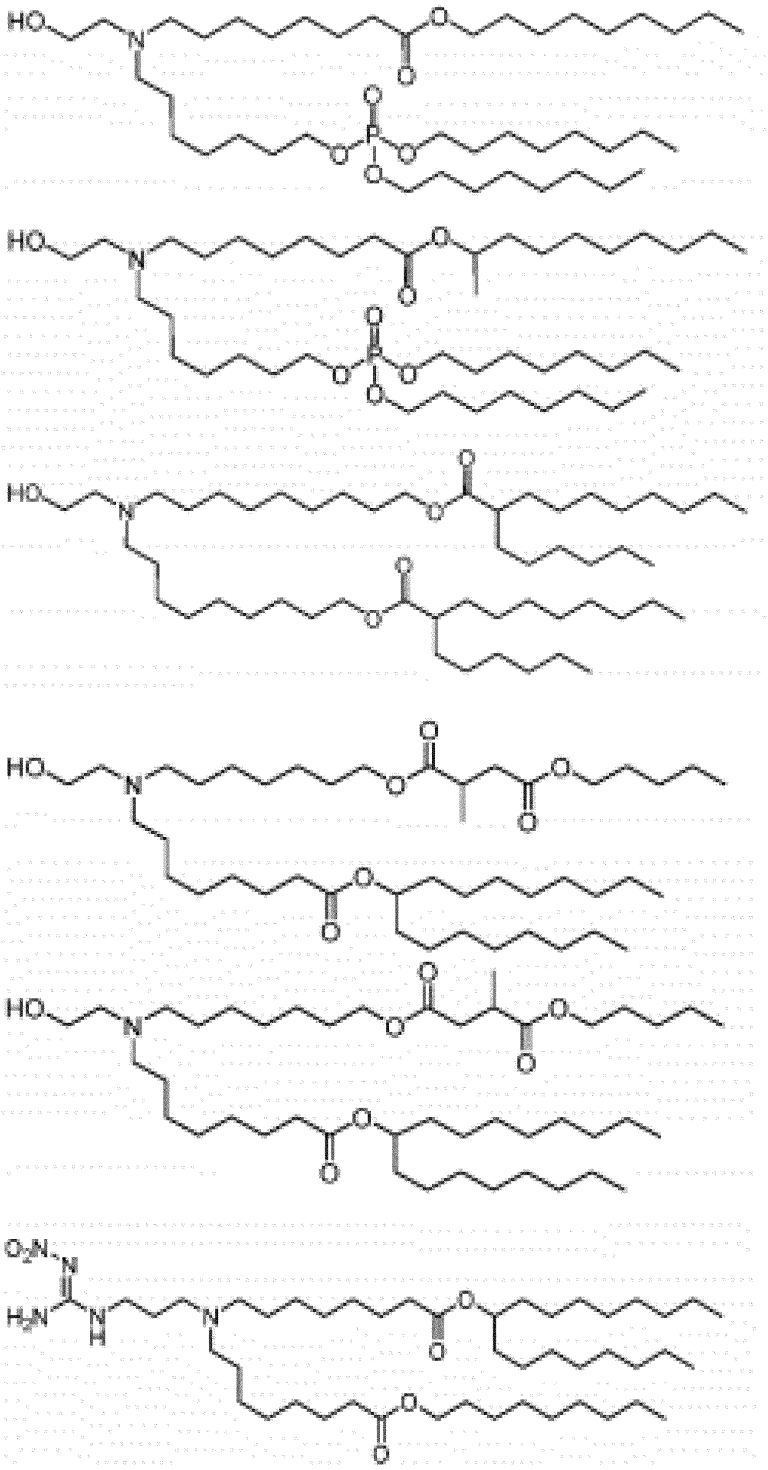
【化１１２－３】



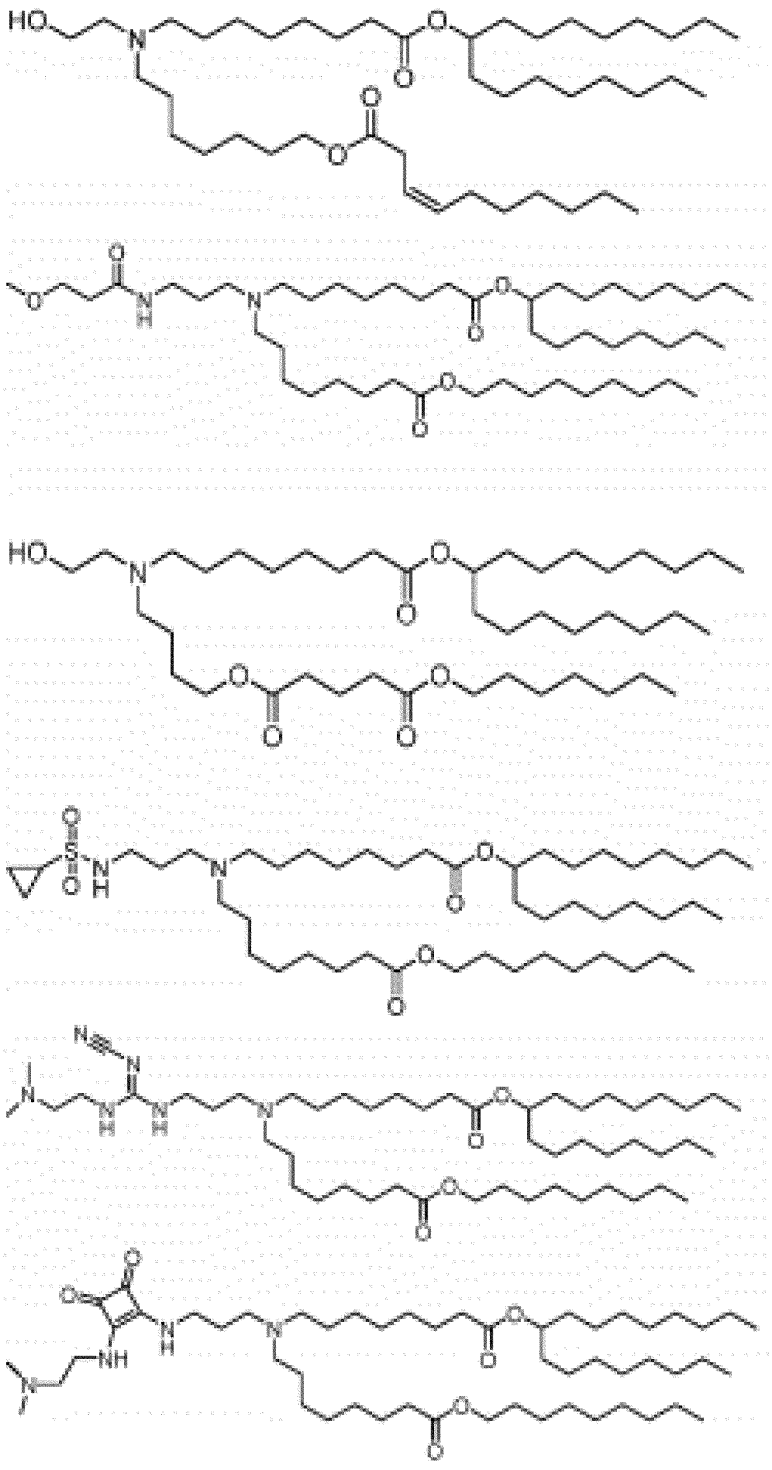
【化１１２－４】



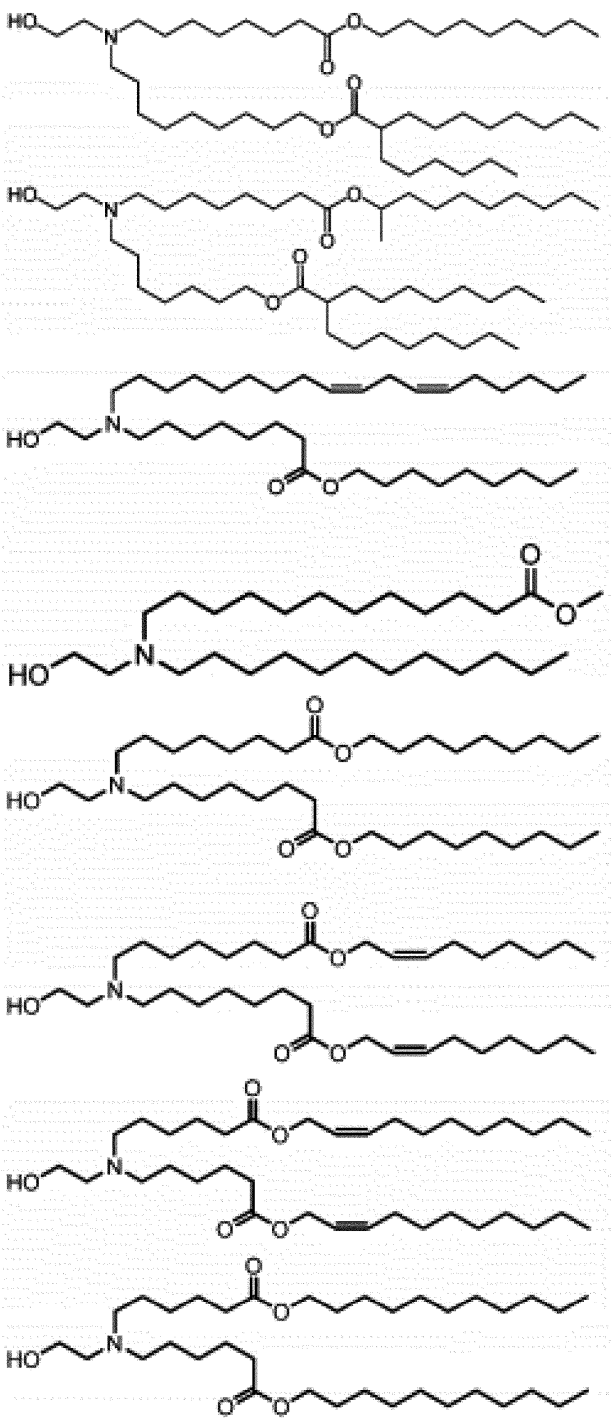
【化１１２－５】



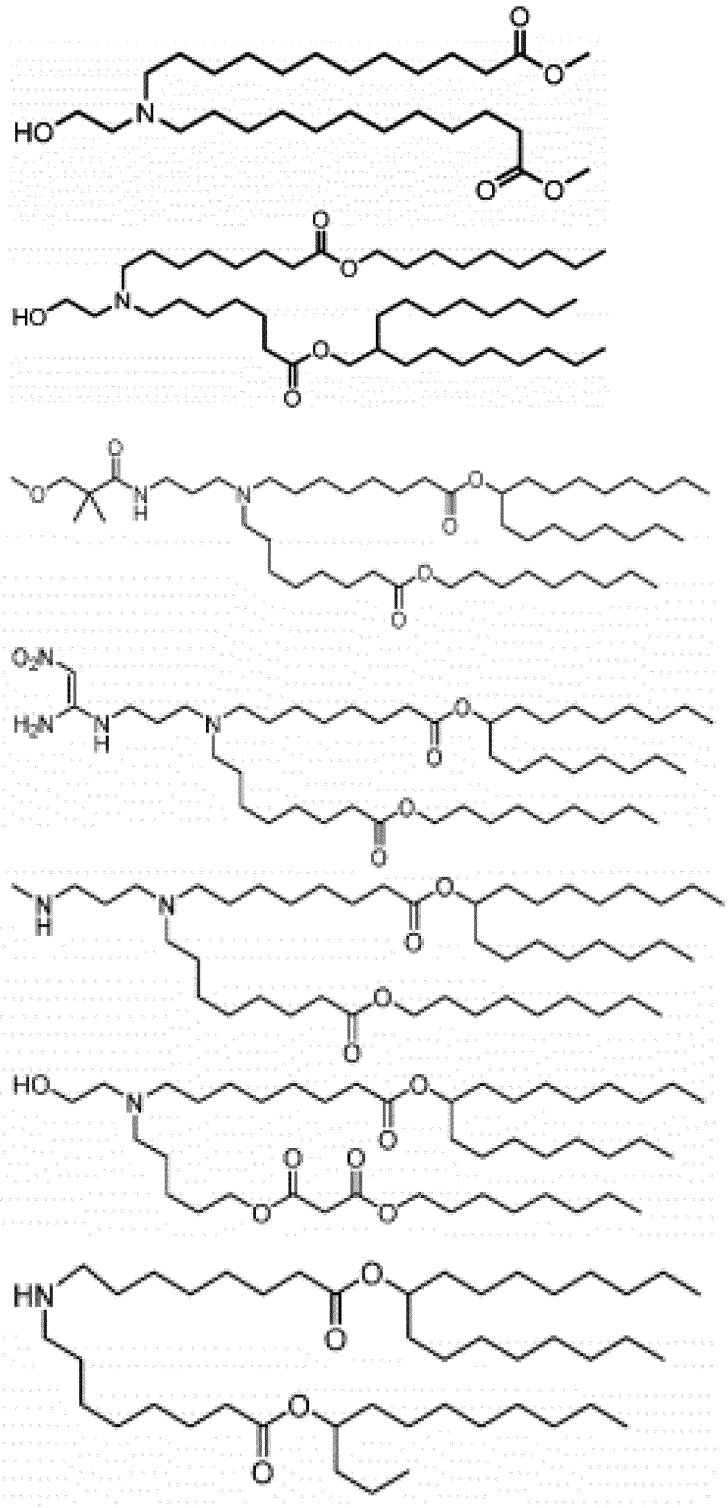
【化１１２－６】



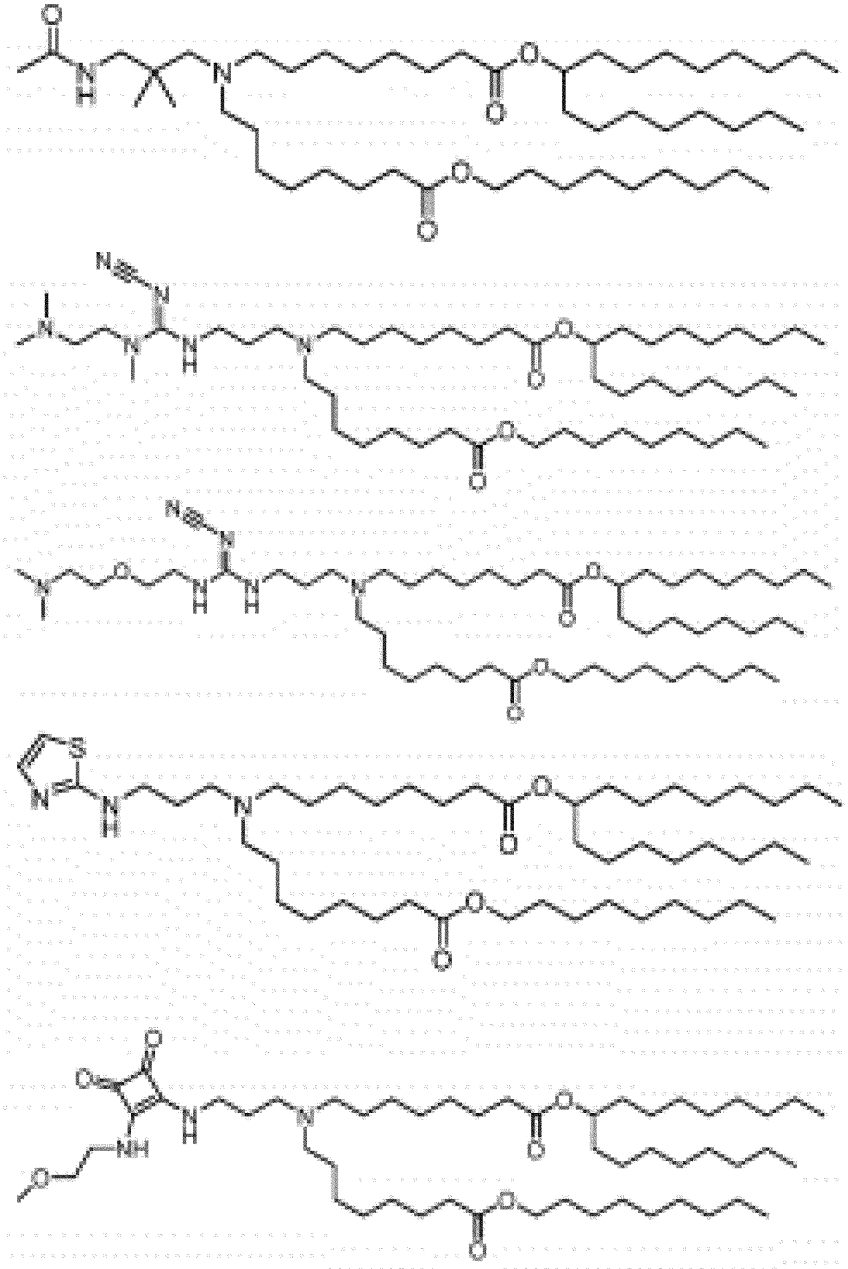
【化１１２－７】



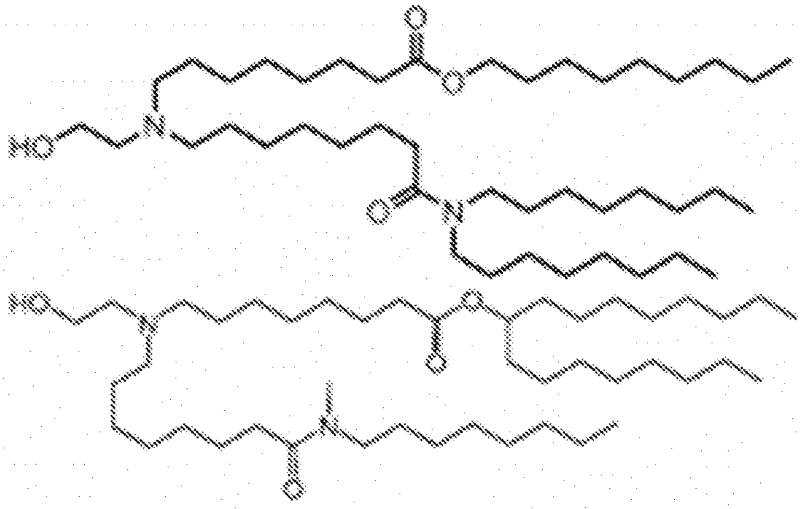
【化１１２－８】



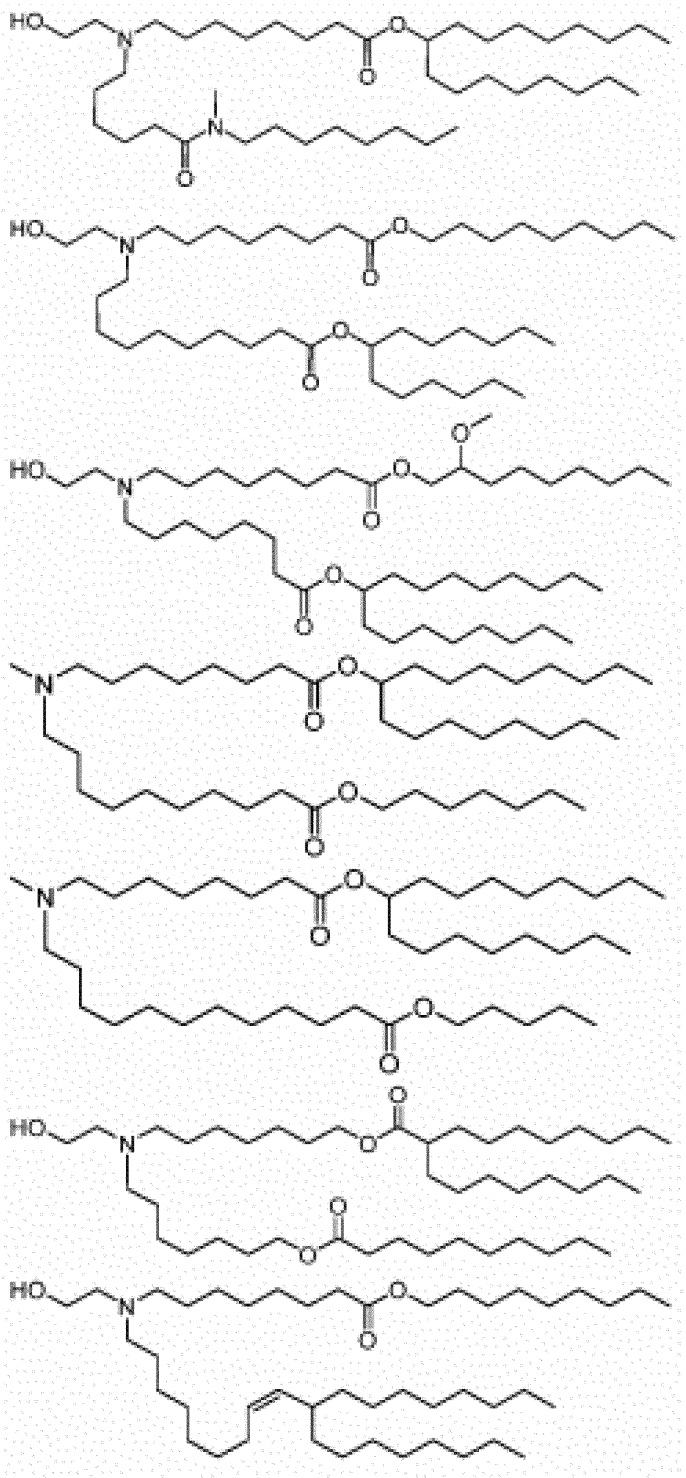
【化１１２－９】



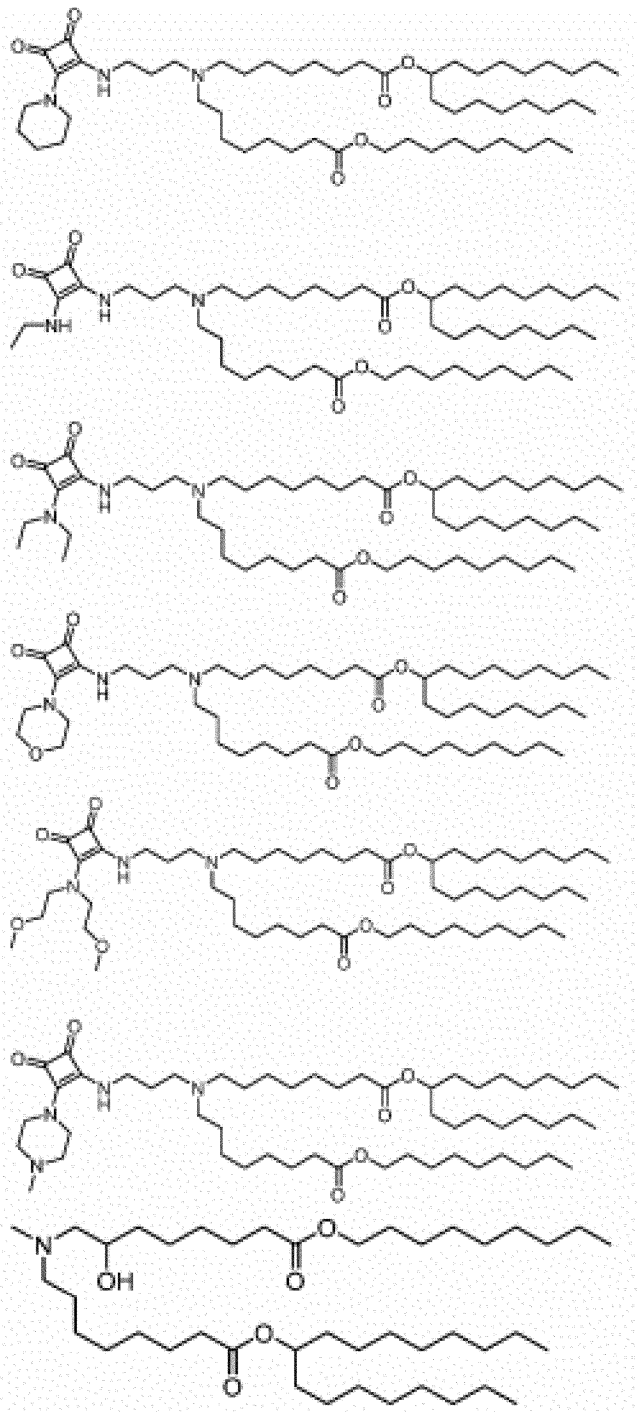
【化１１２－１０】



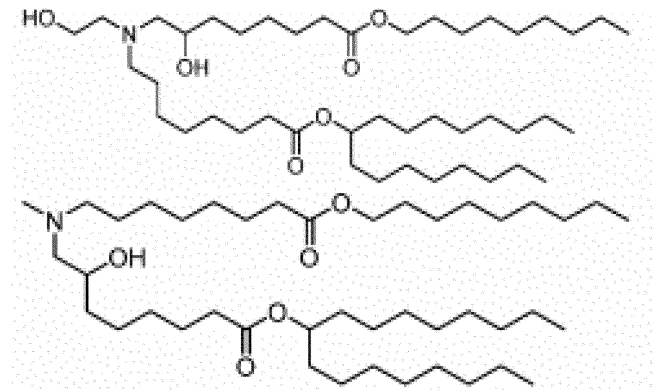
【化１１２－１１】

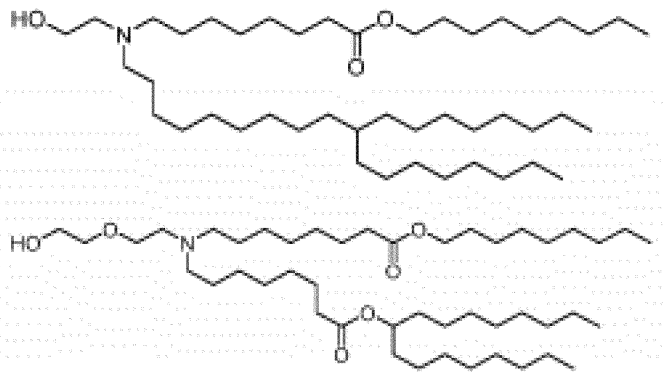


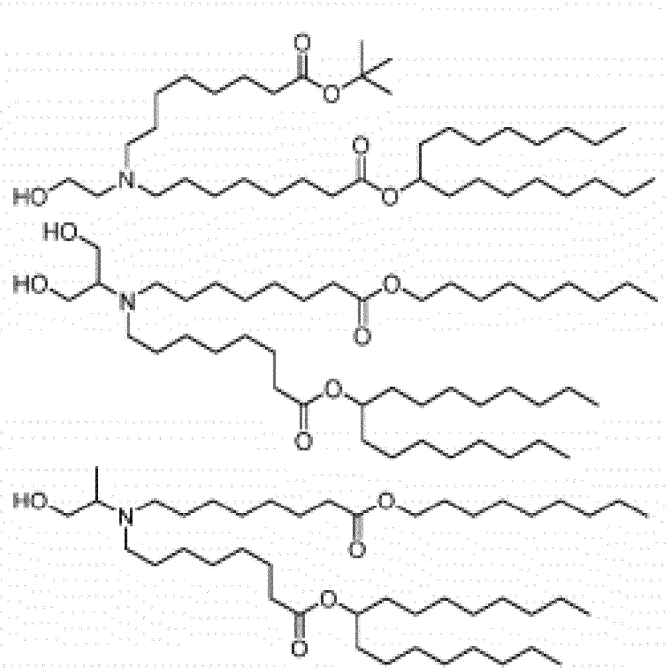
【化１１２－１２】



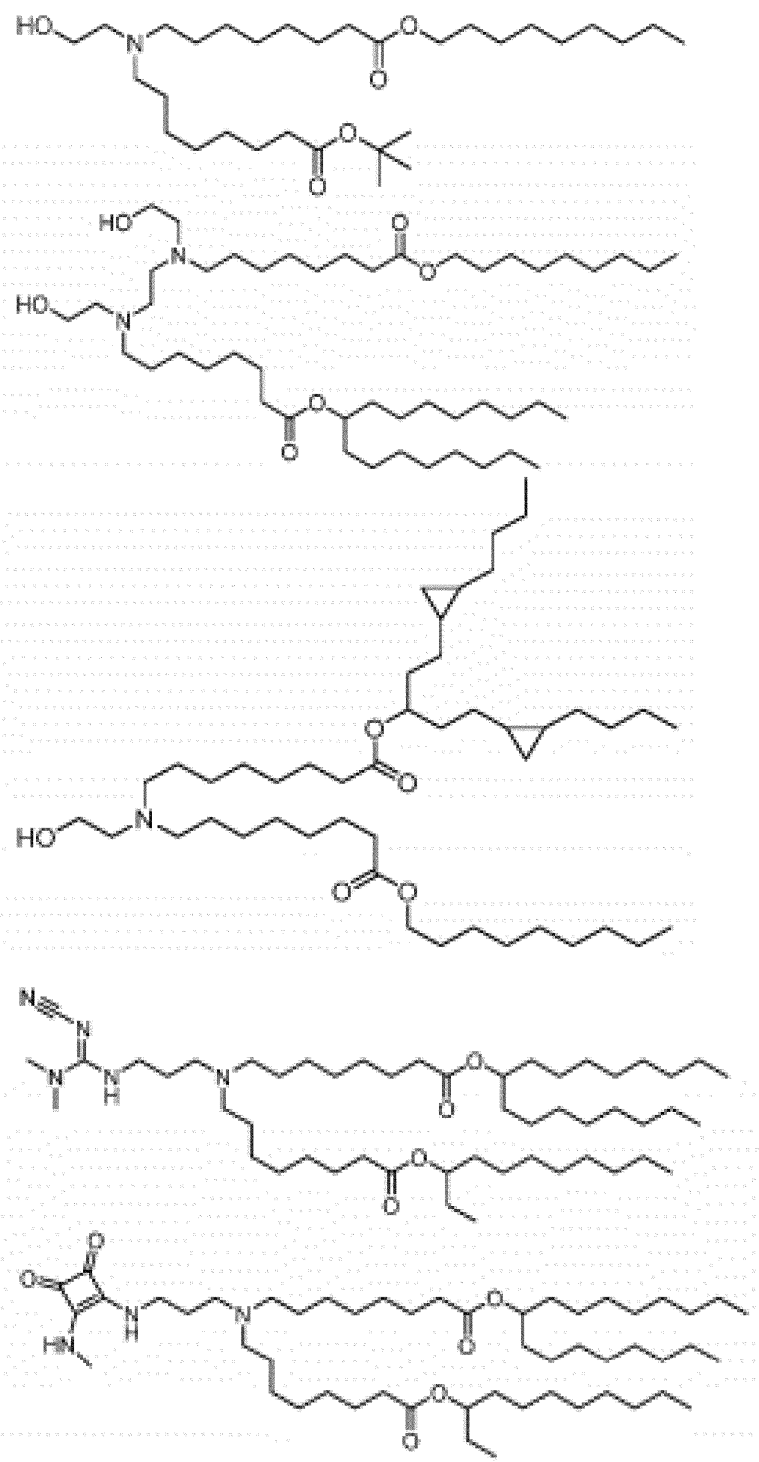
【化１１２－１３】



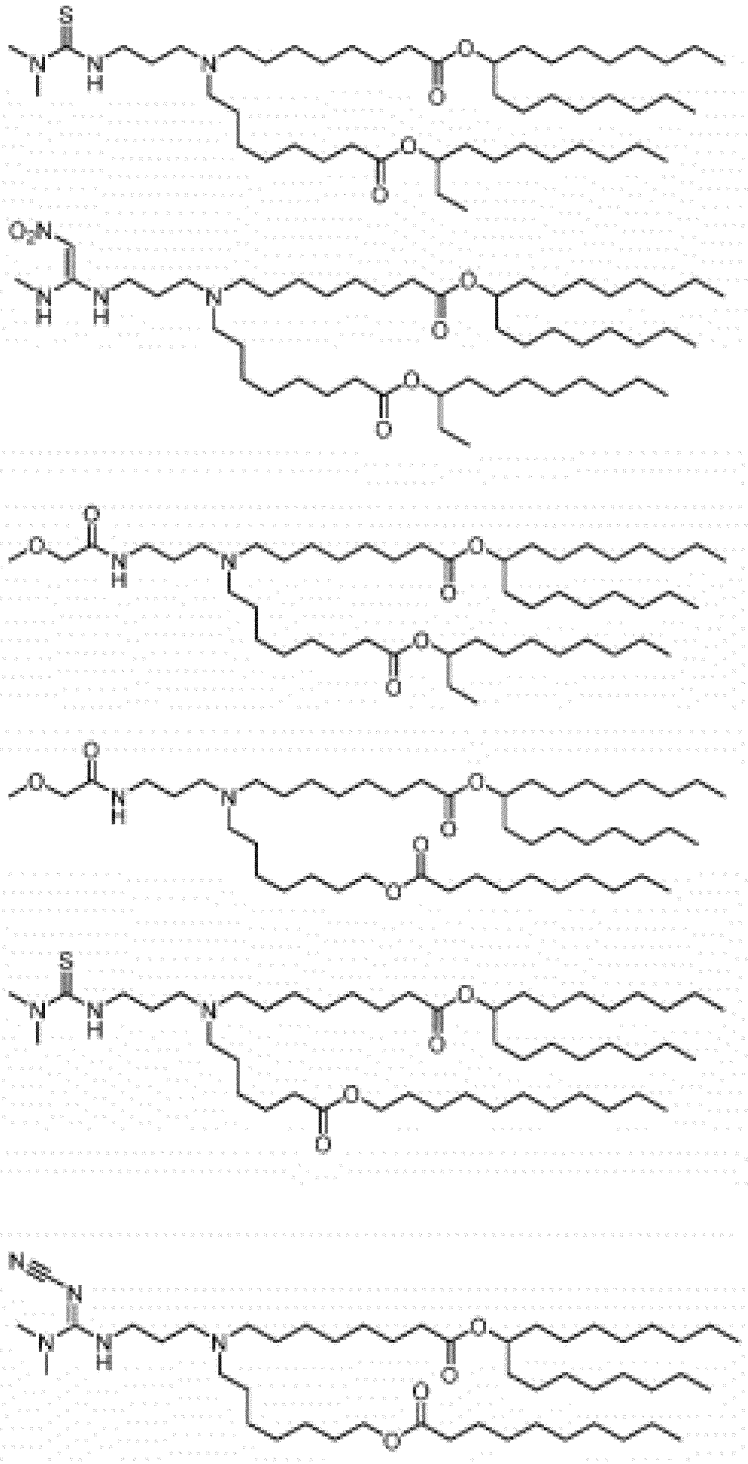




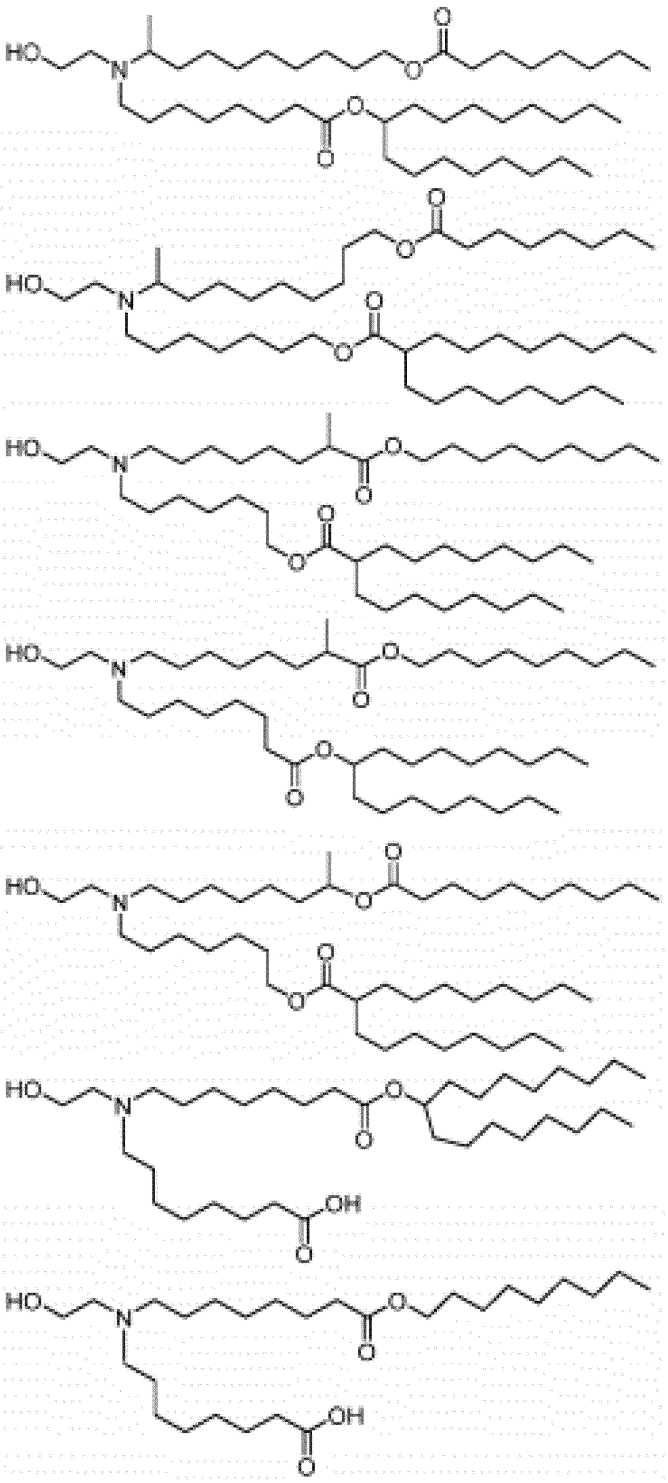
【化１１２－１４】



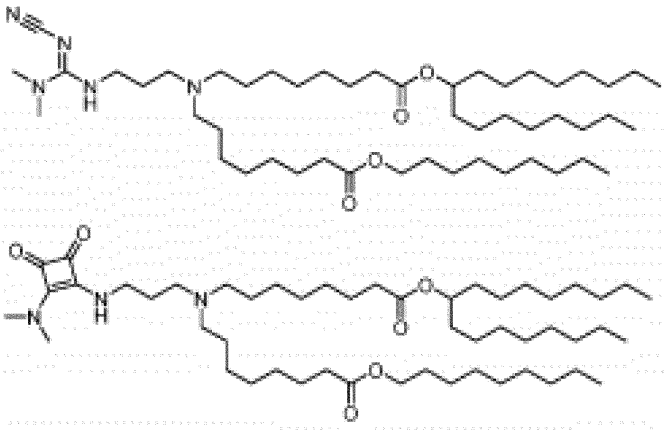
【化１１２－１５】

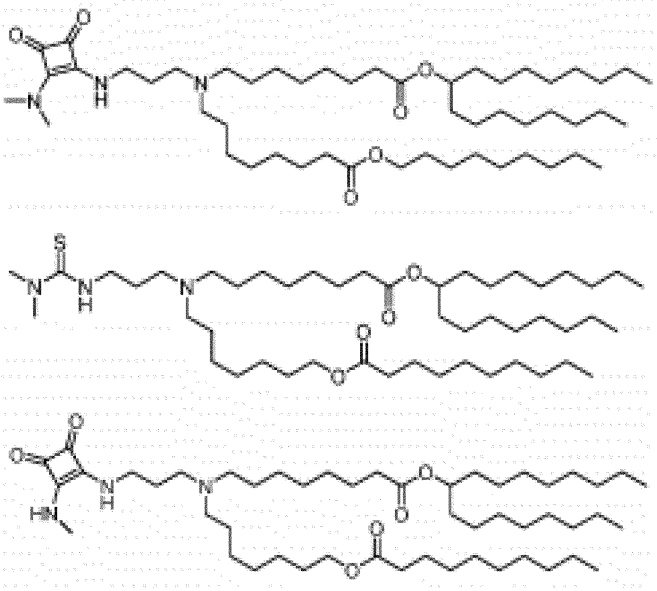


【化１１２－１６】



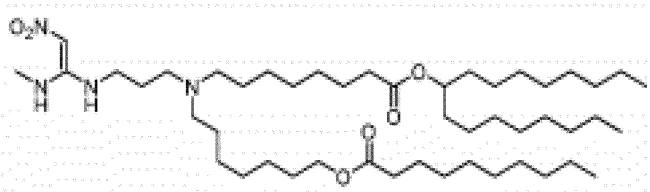
【化１１２－１７】

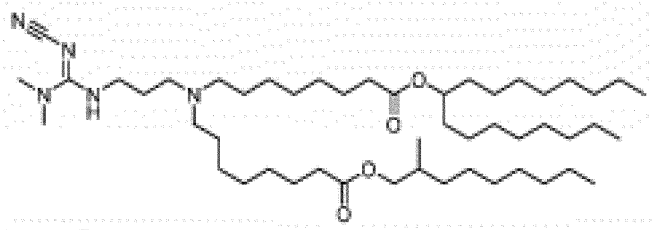


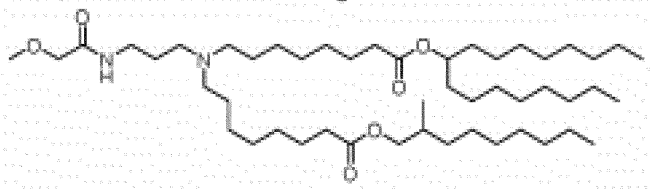




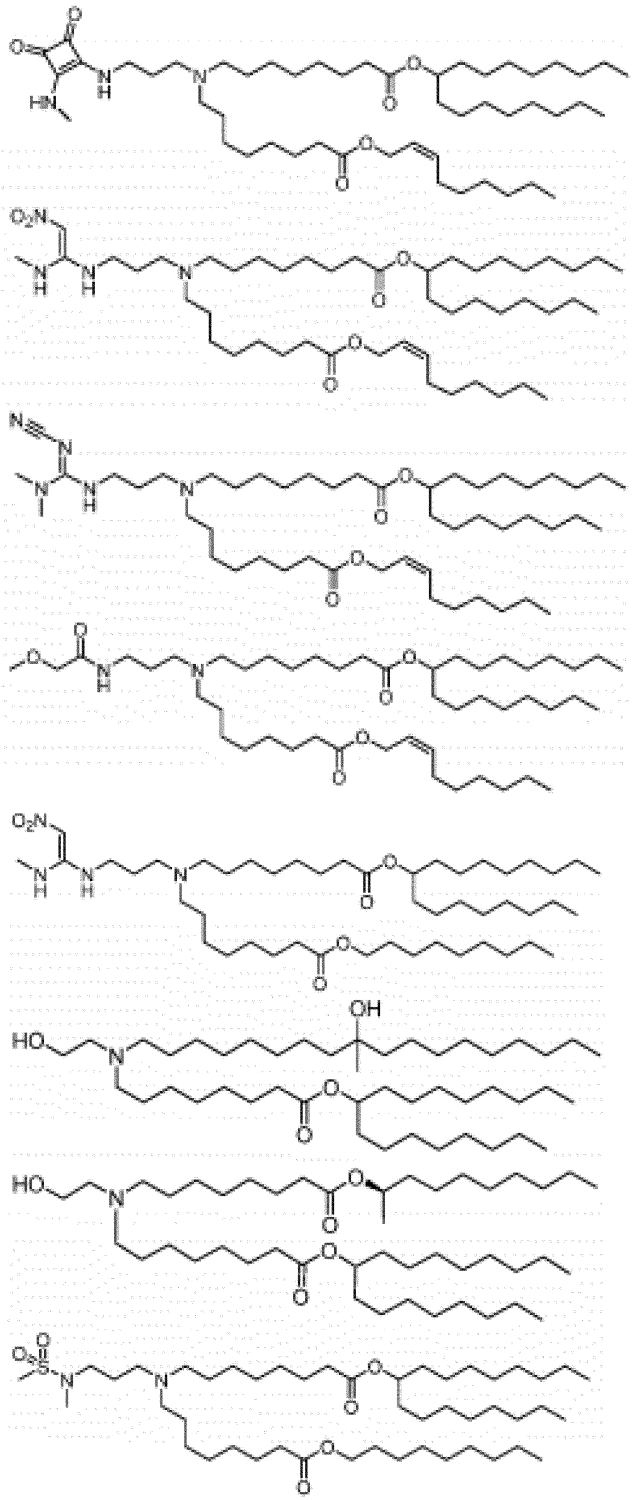




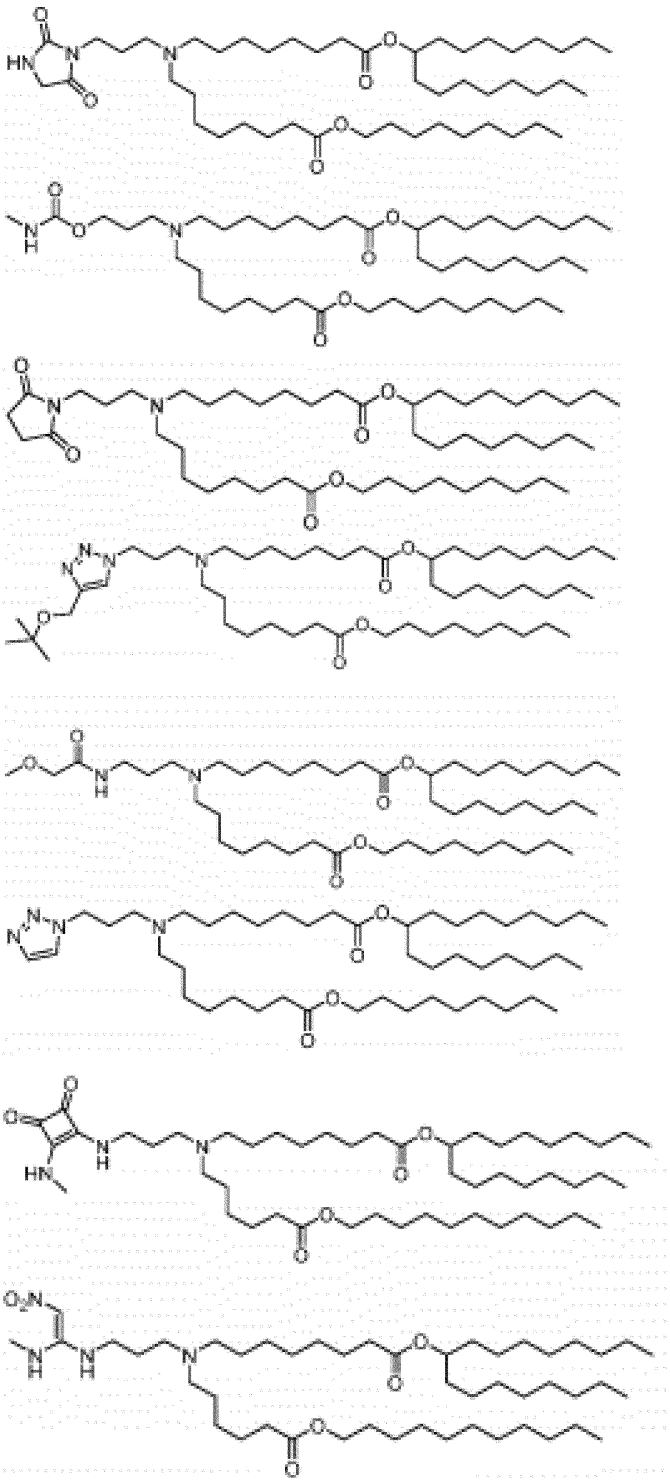




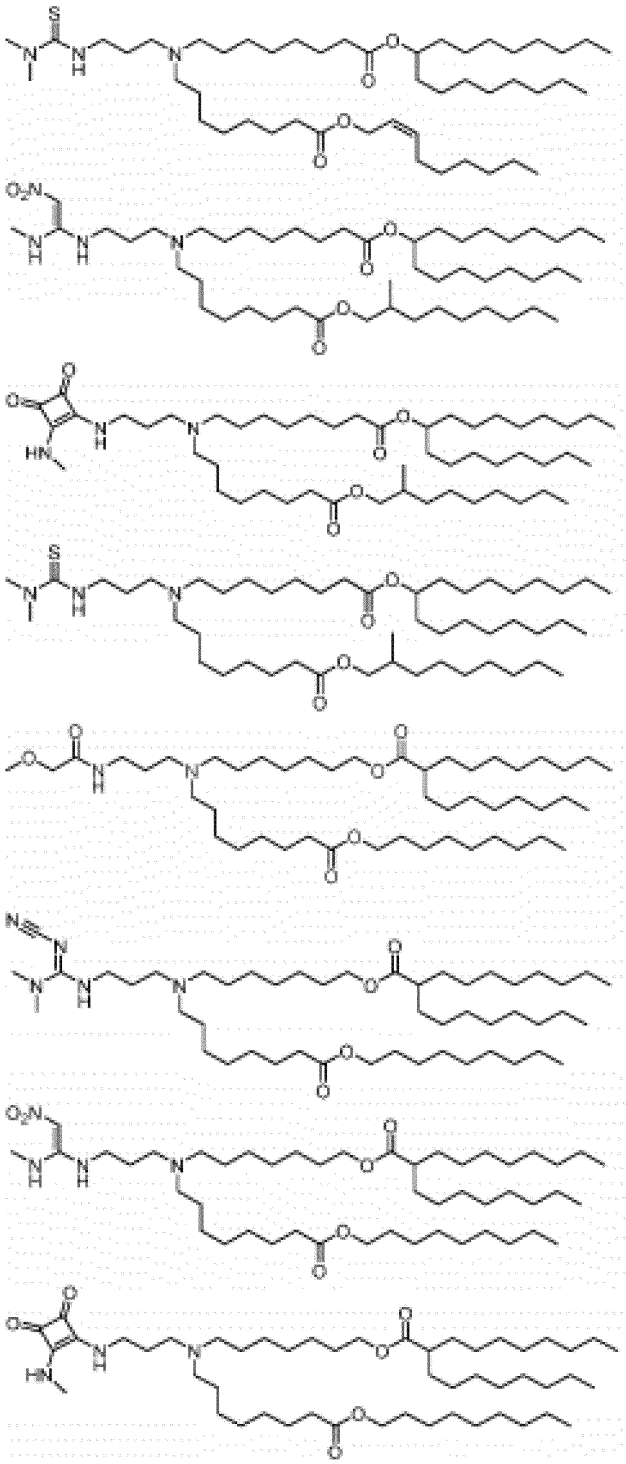
【化１１２－１８】



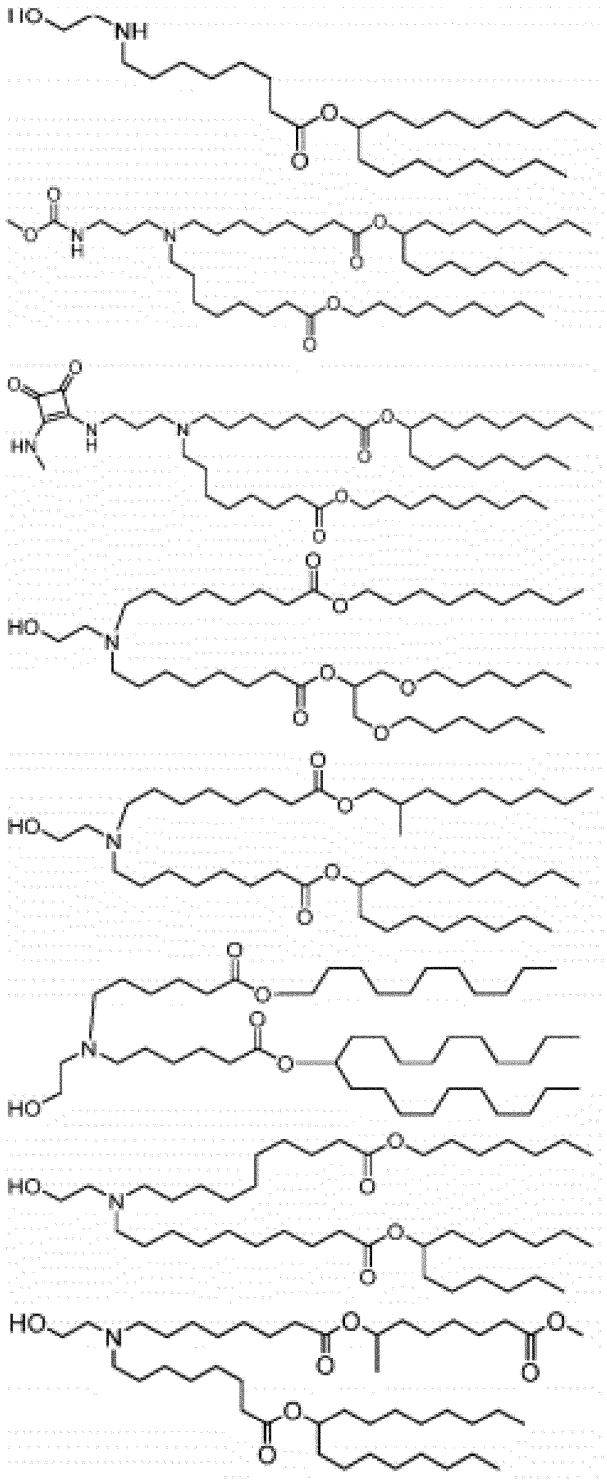
【化１１２－１９】



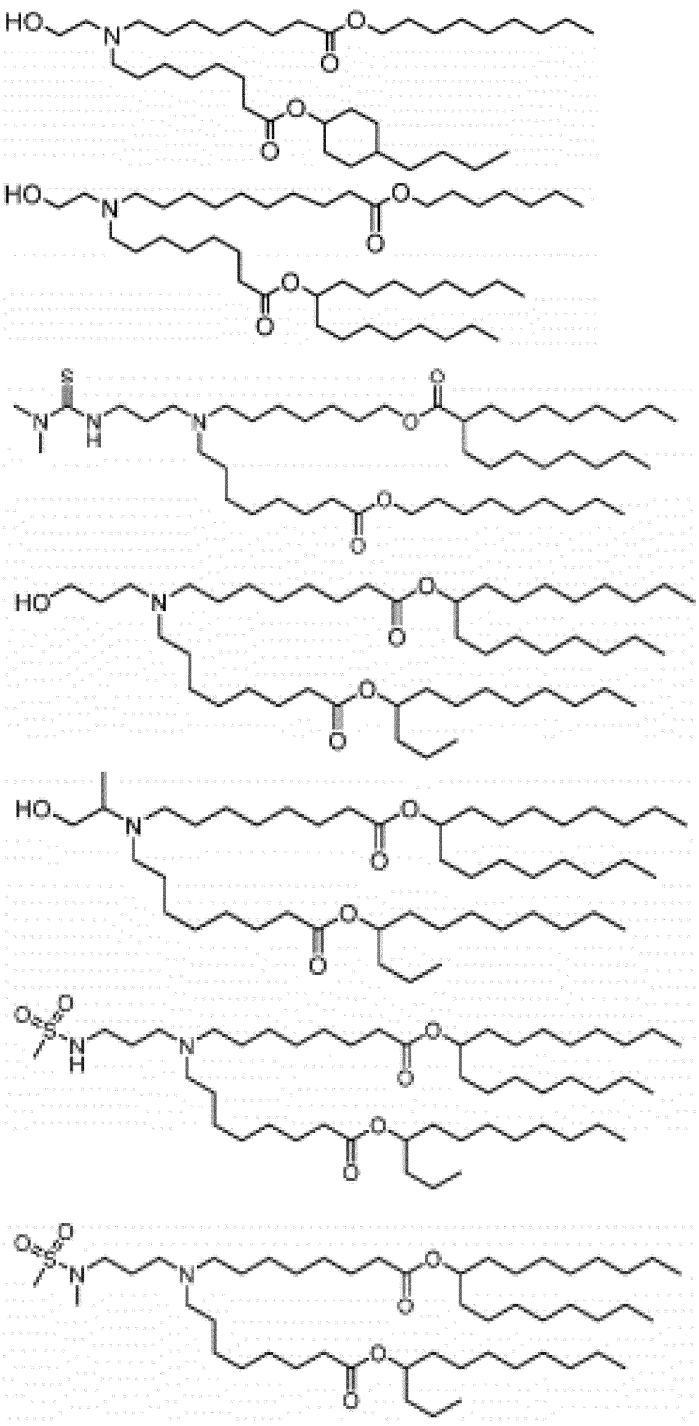
【化１１２－２０】



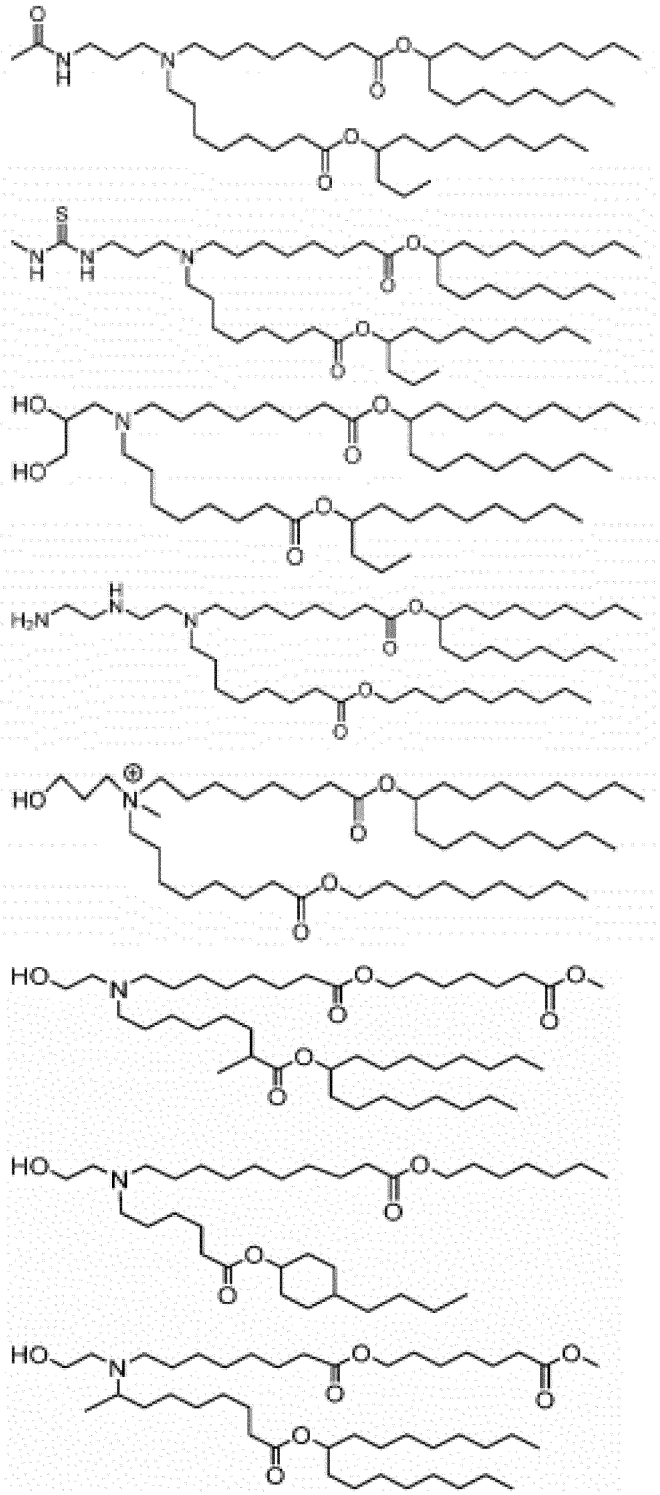
【化１１２－２１】



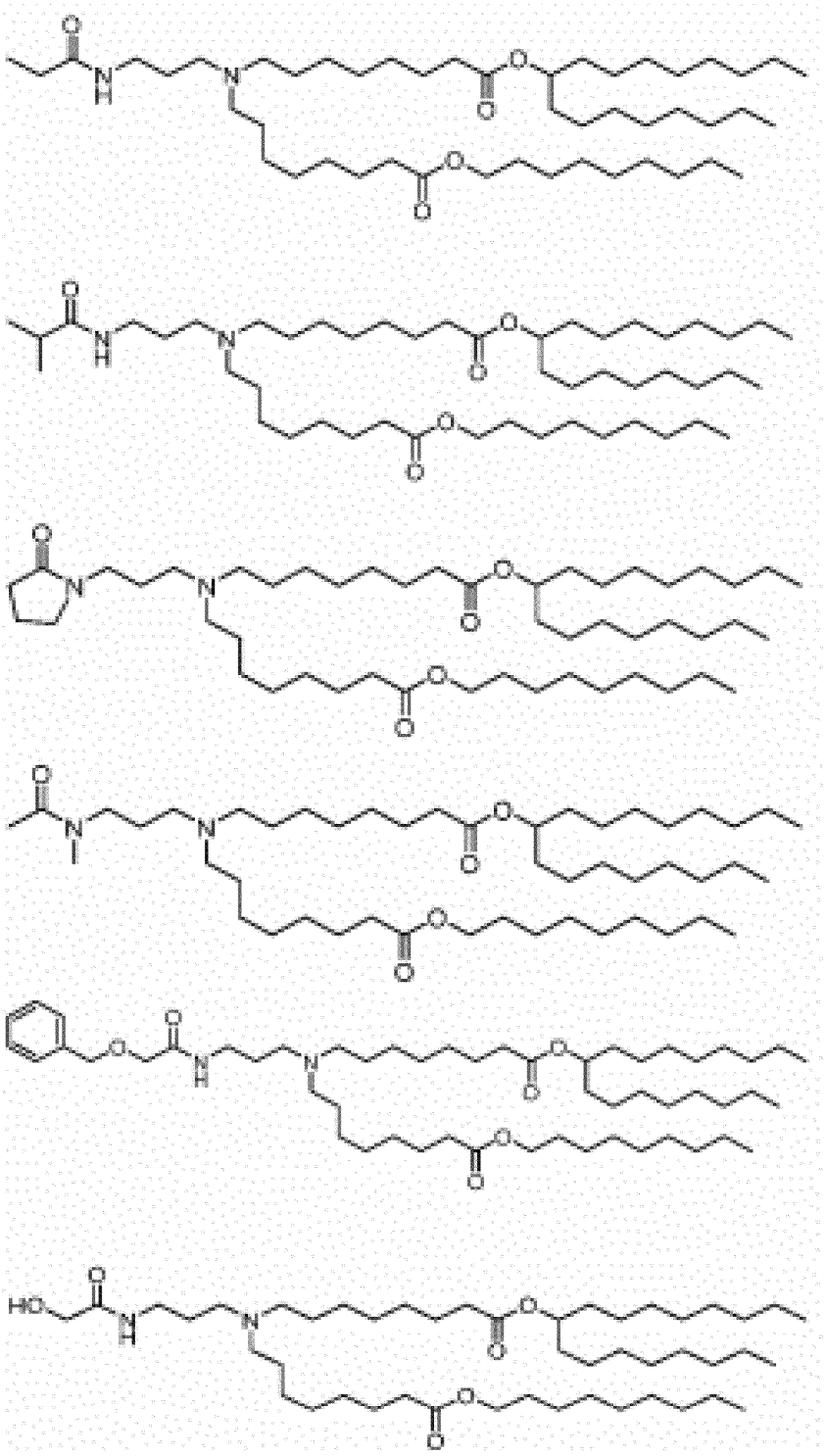
【化１１２－２２】



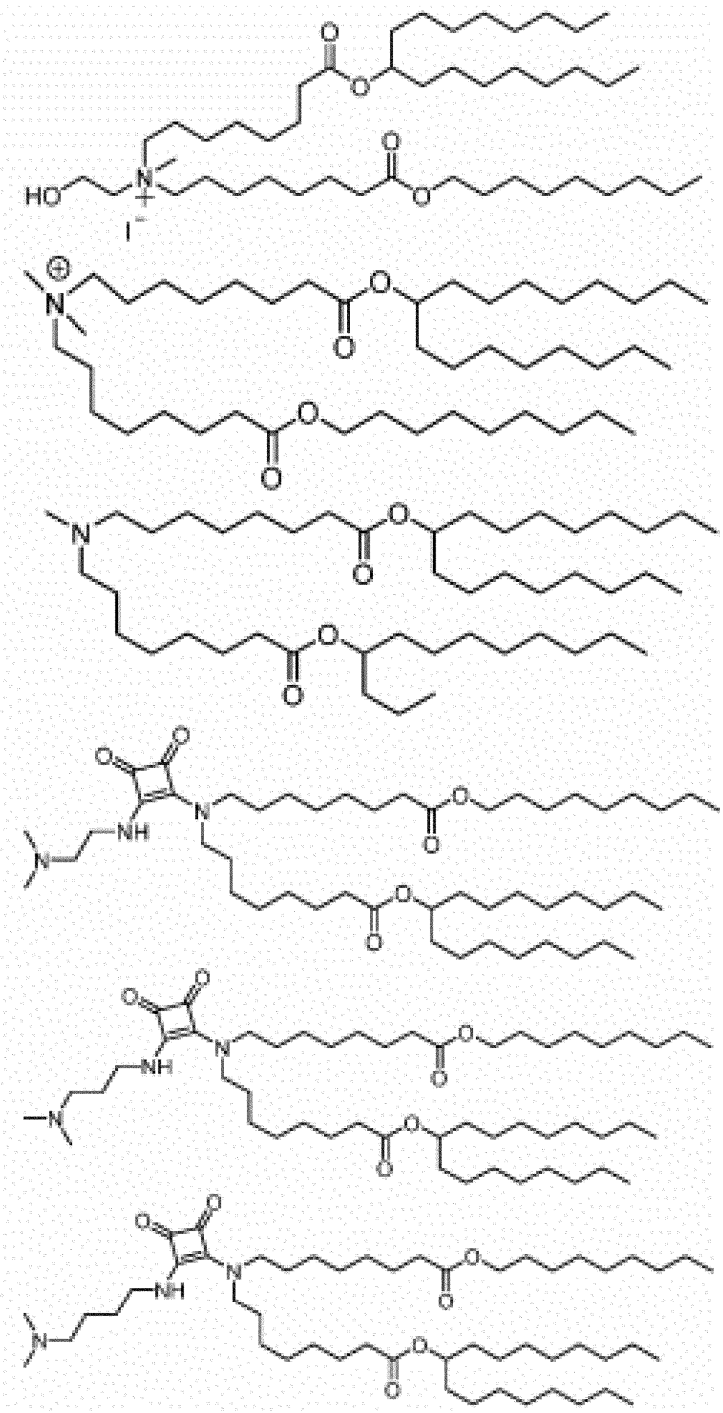
【化１１２－２３】



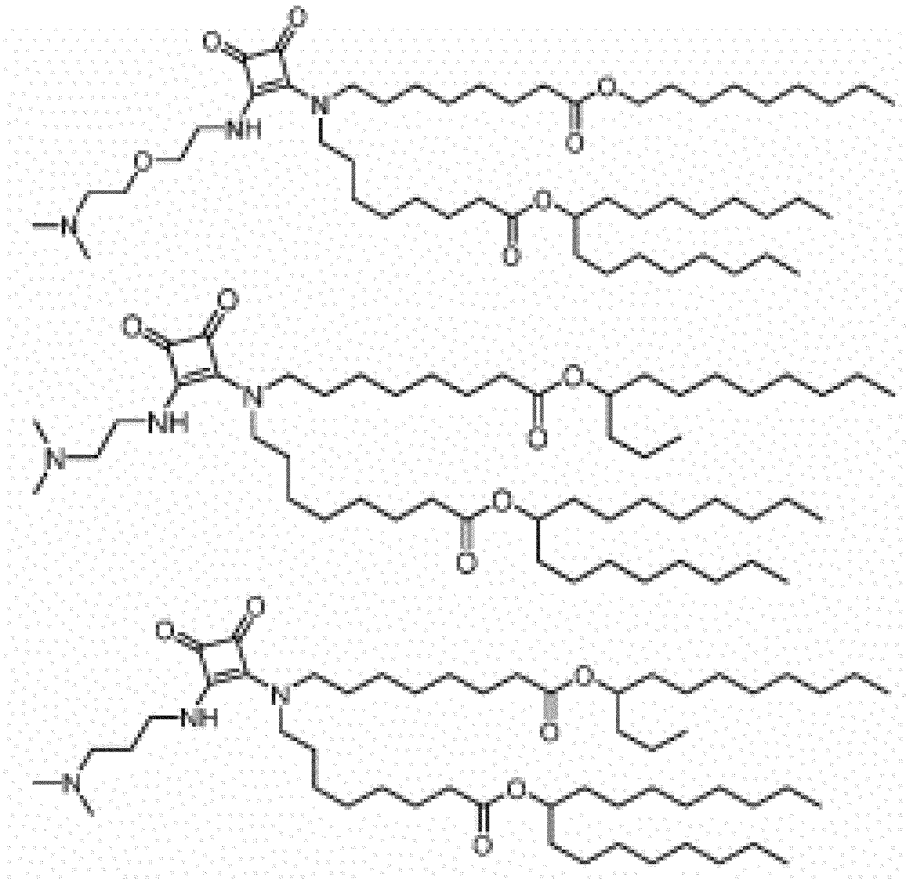
【化１１２－２４】

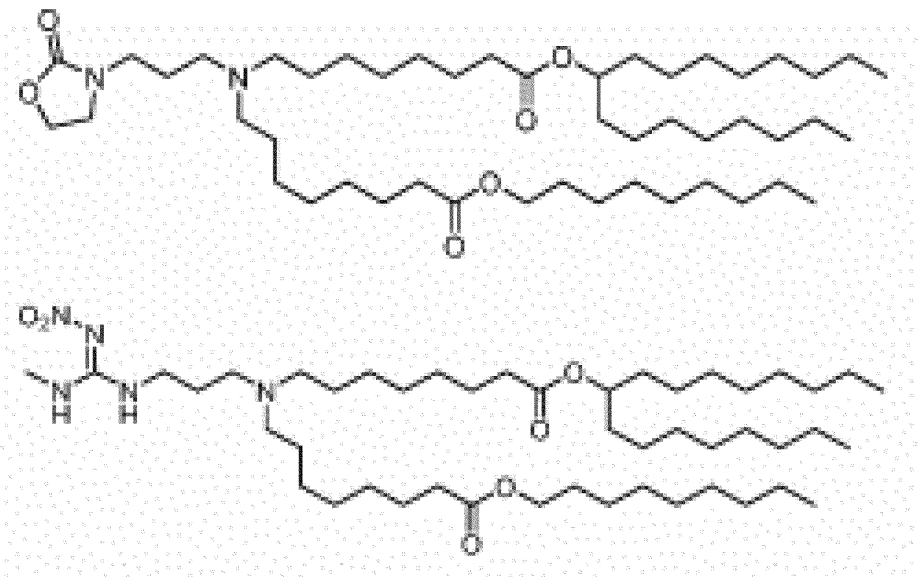


【化１１２－２５】

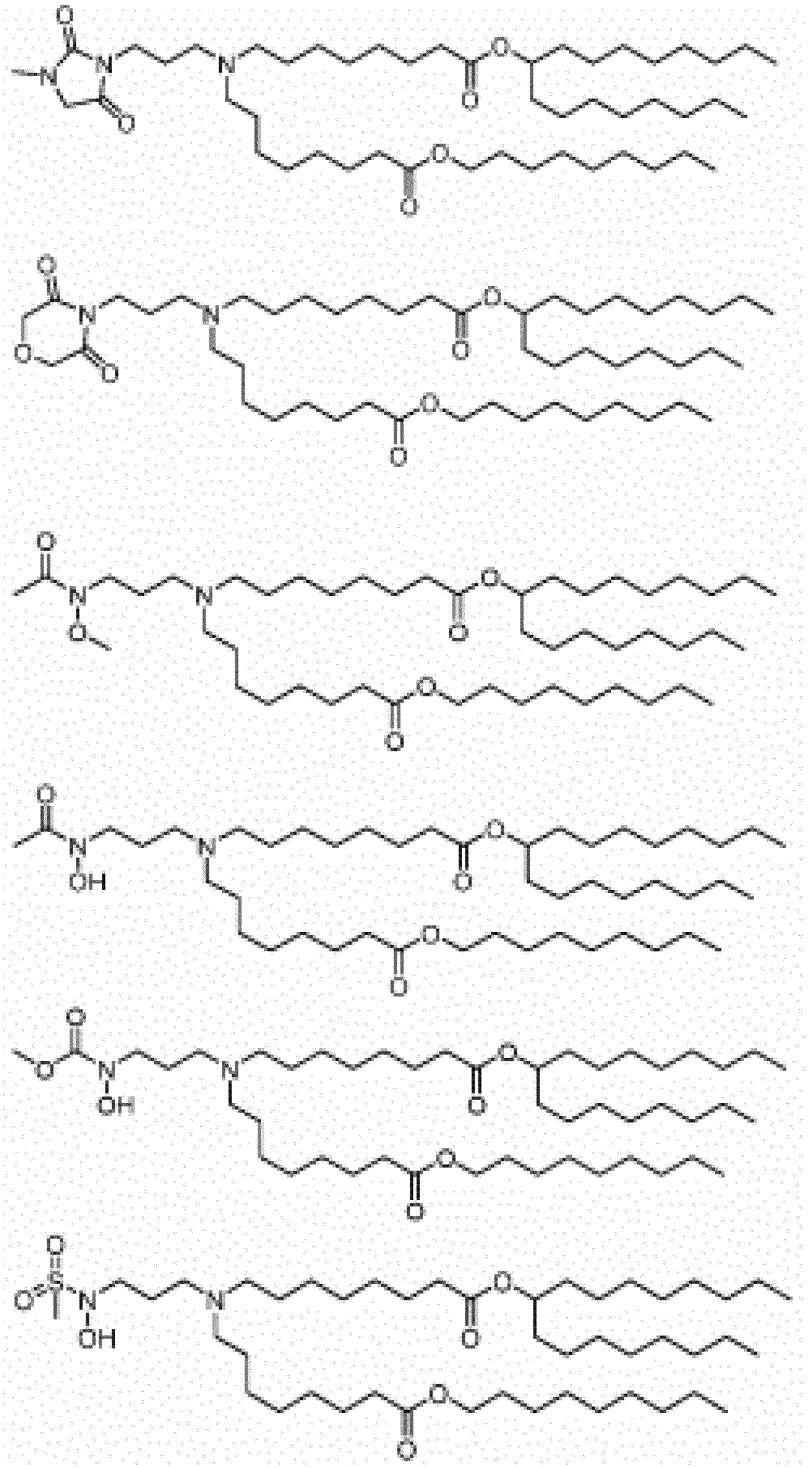


【化１１２－２６】

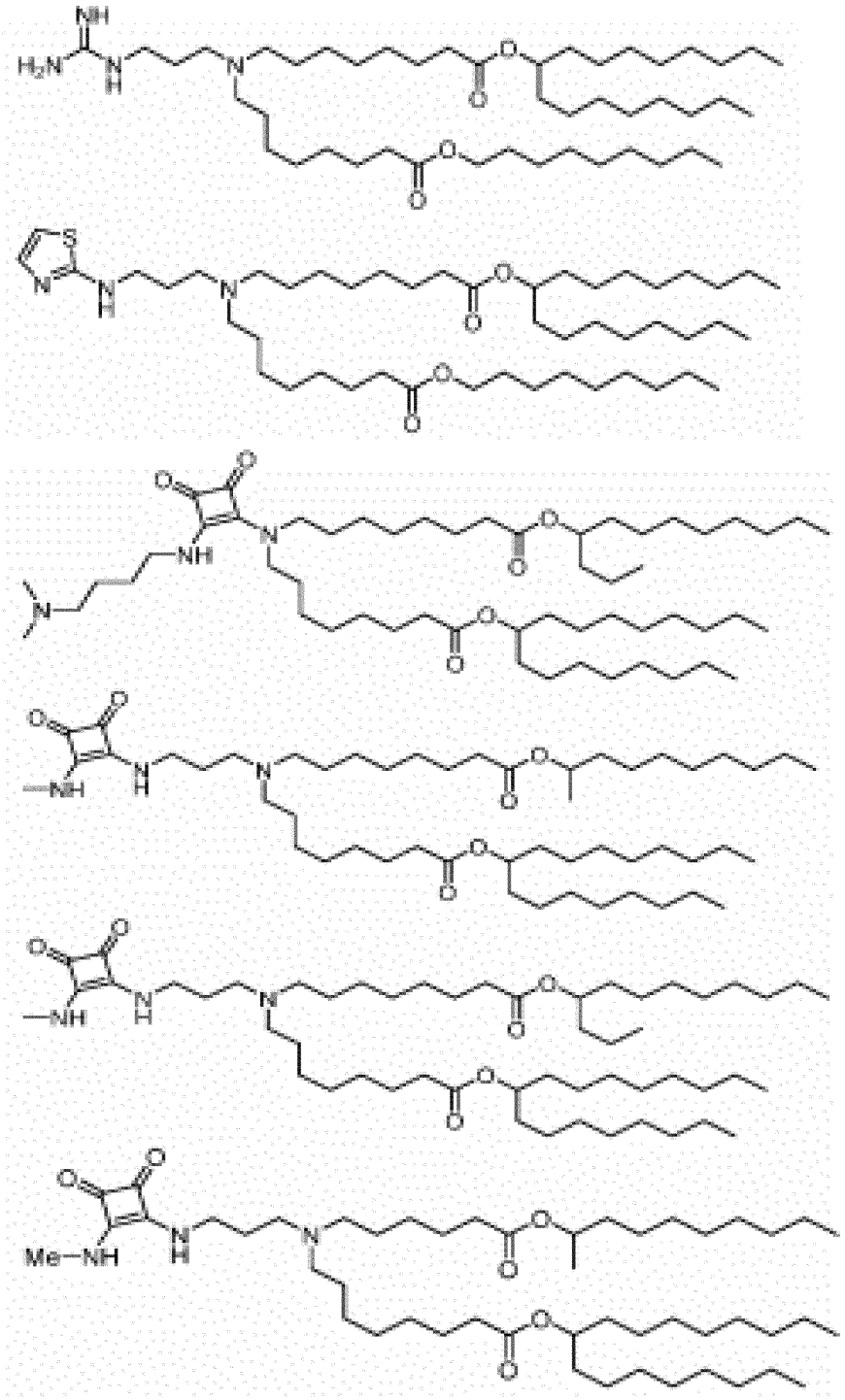




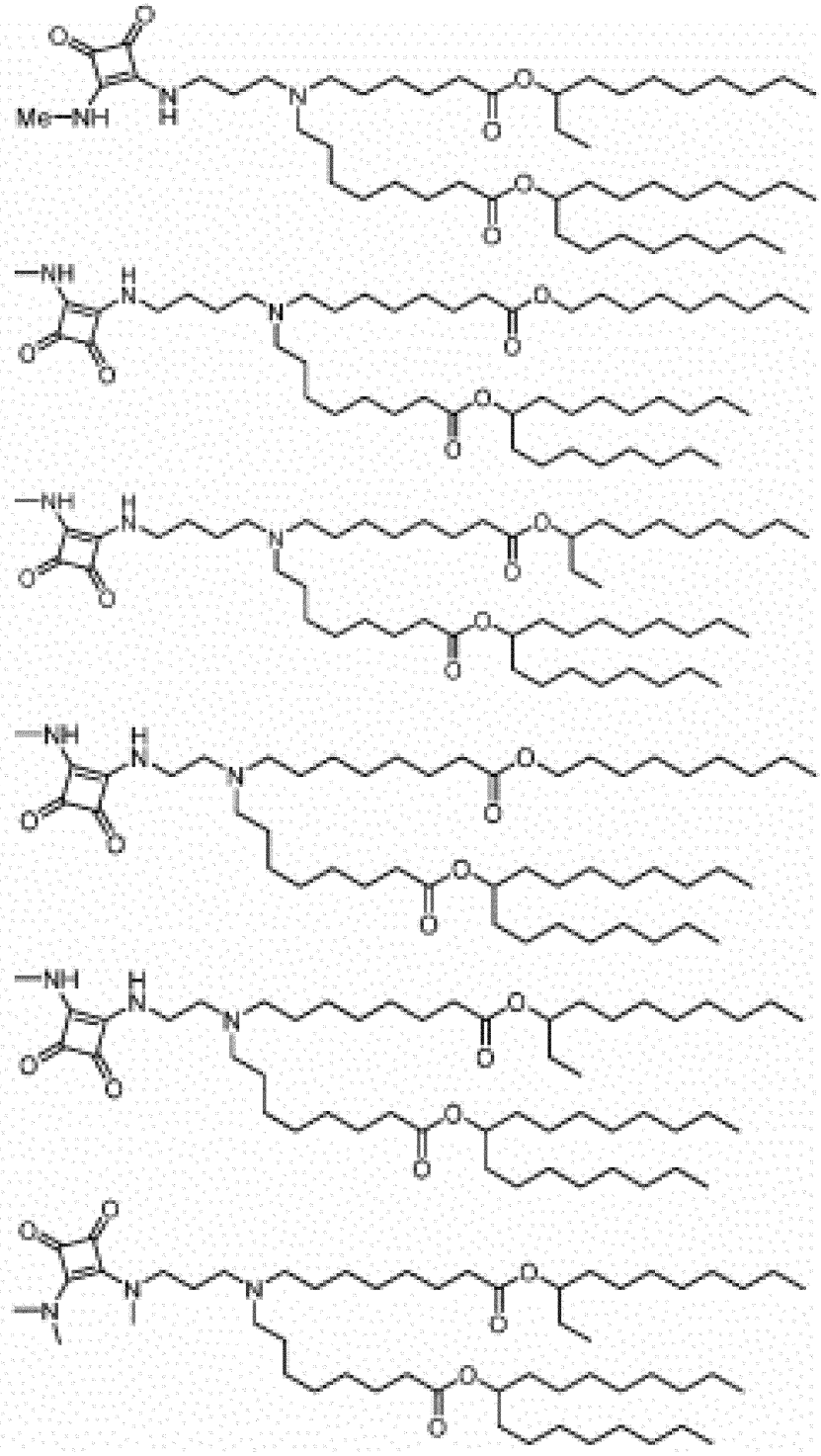
【化１１２－２７】



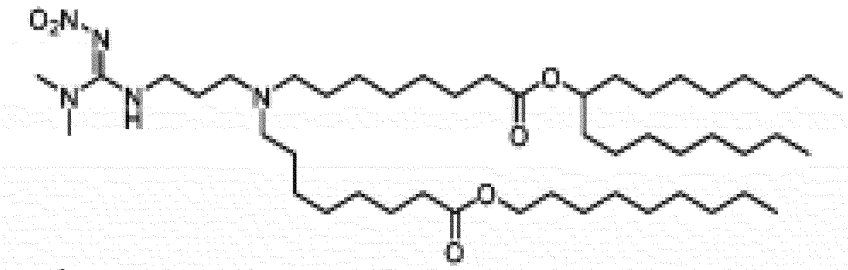
【化１１２－２８】

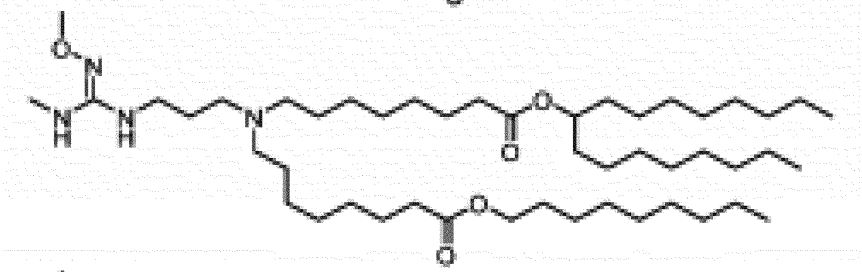


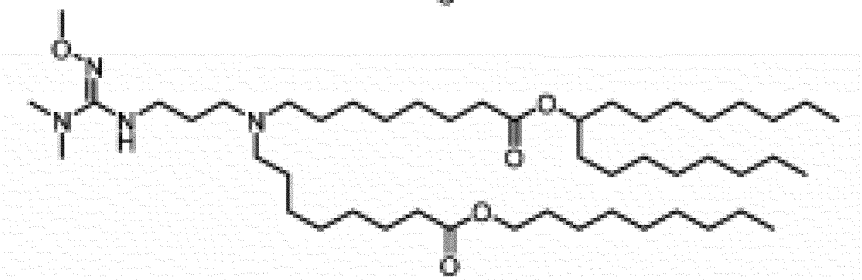
【化１１２－２９】

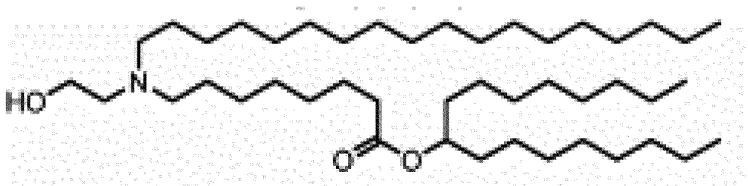


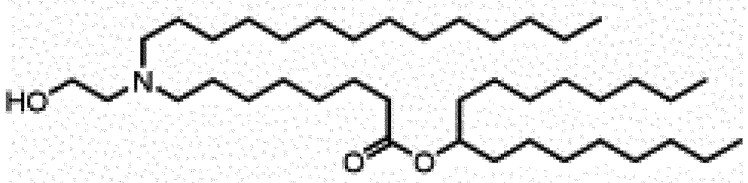
【化１１２－３０】

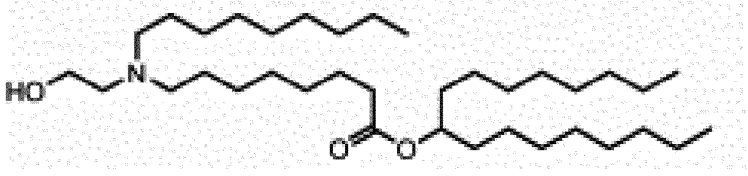




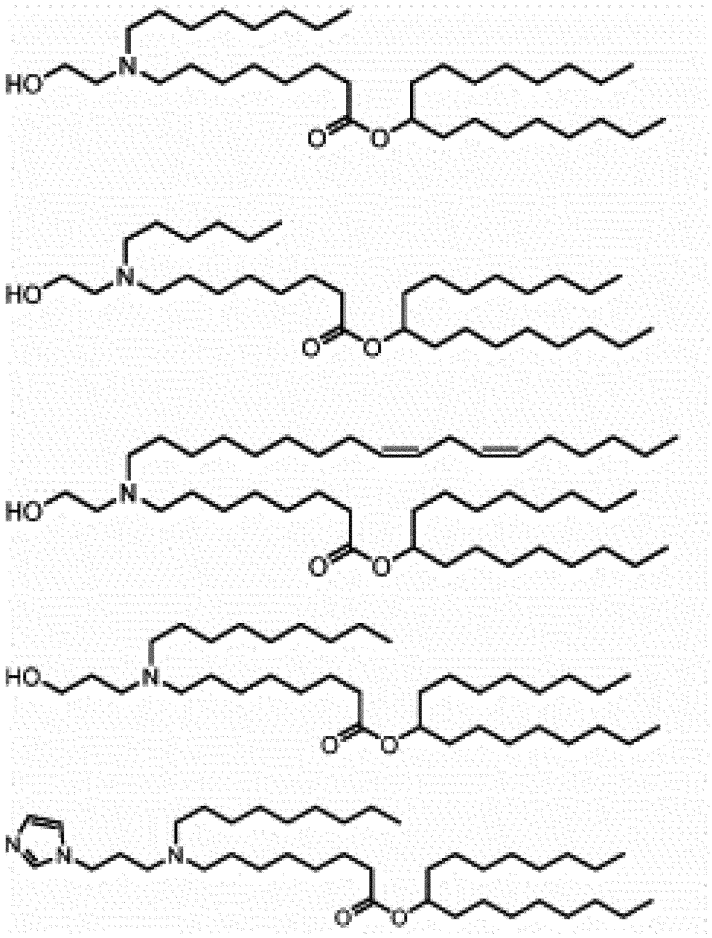


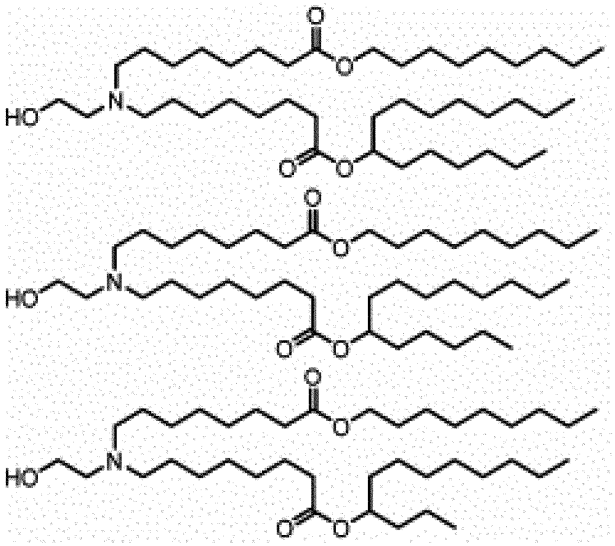




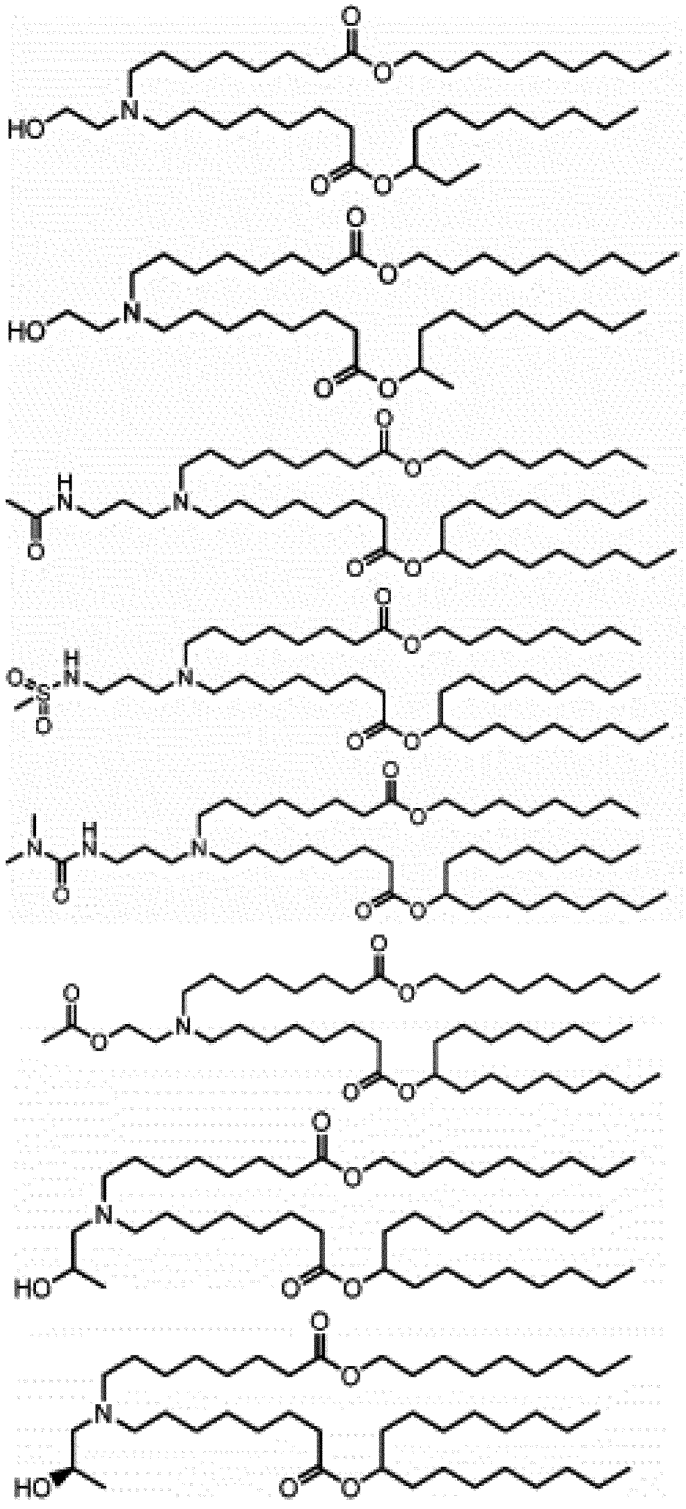


【化１１２－３１】

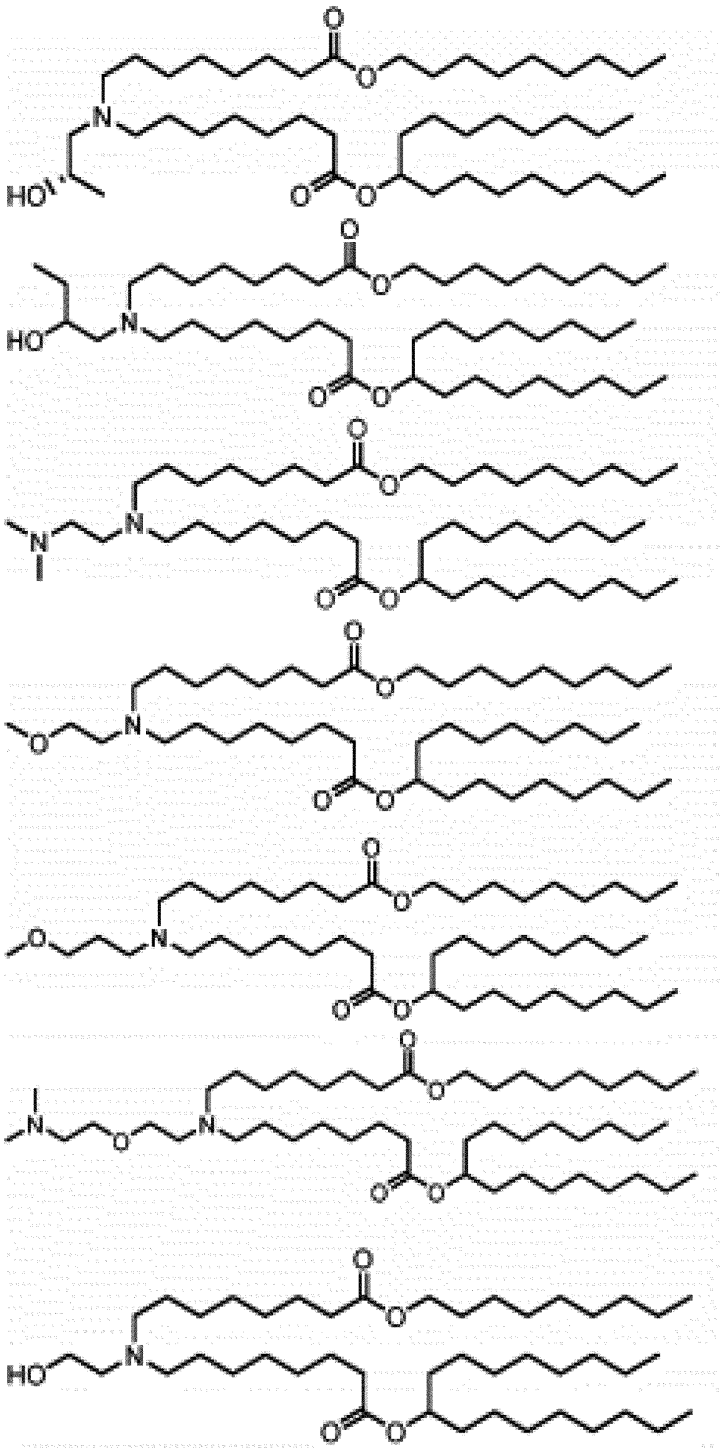




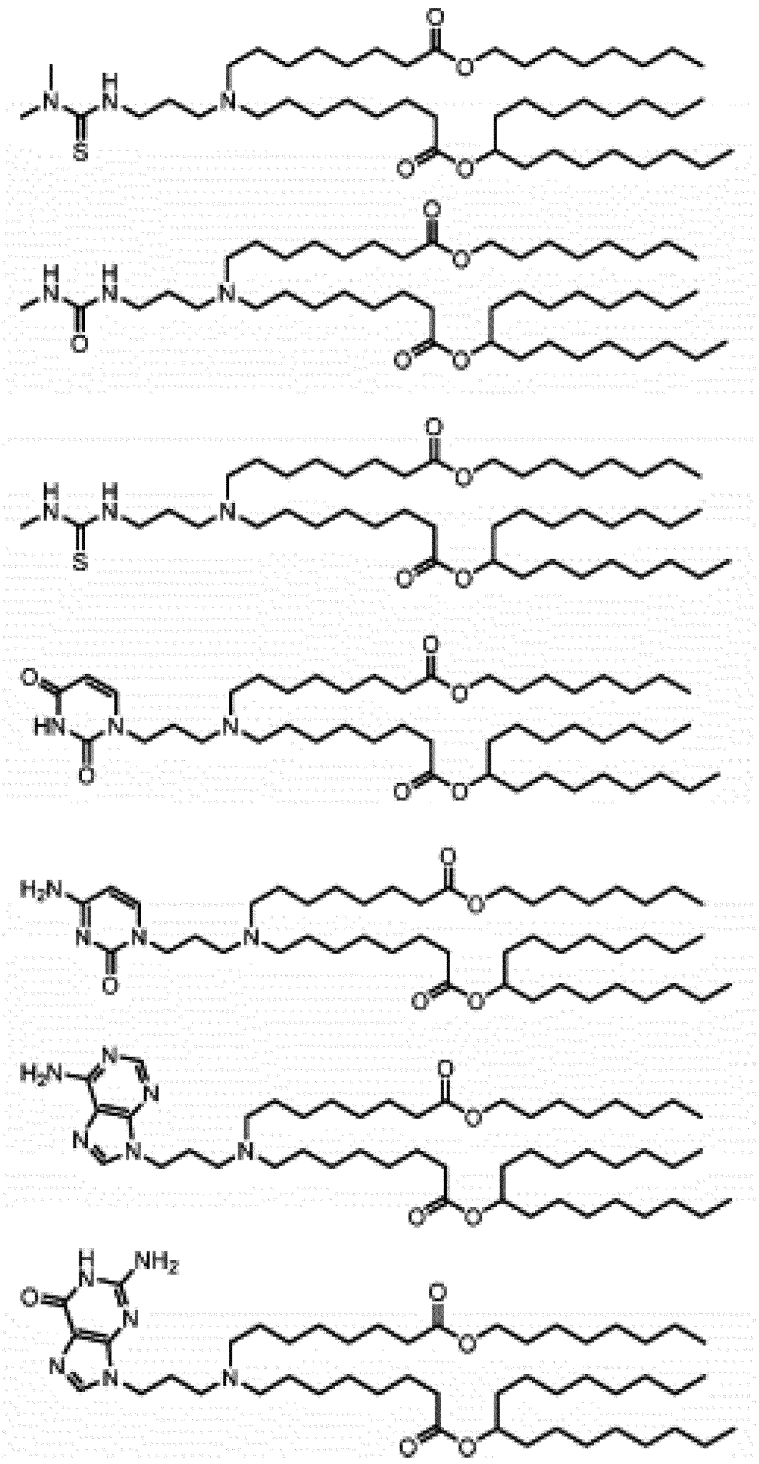
【化１１２－３２】



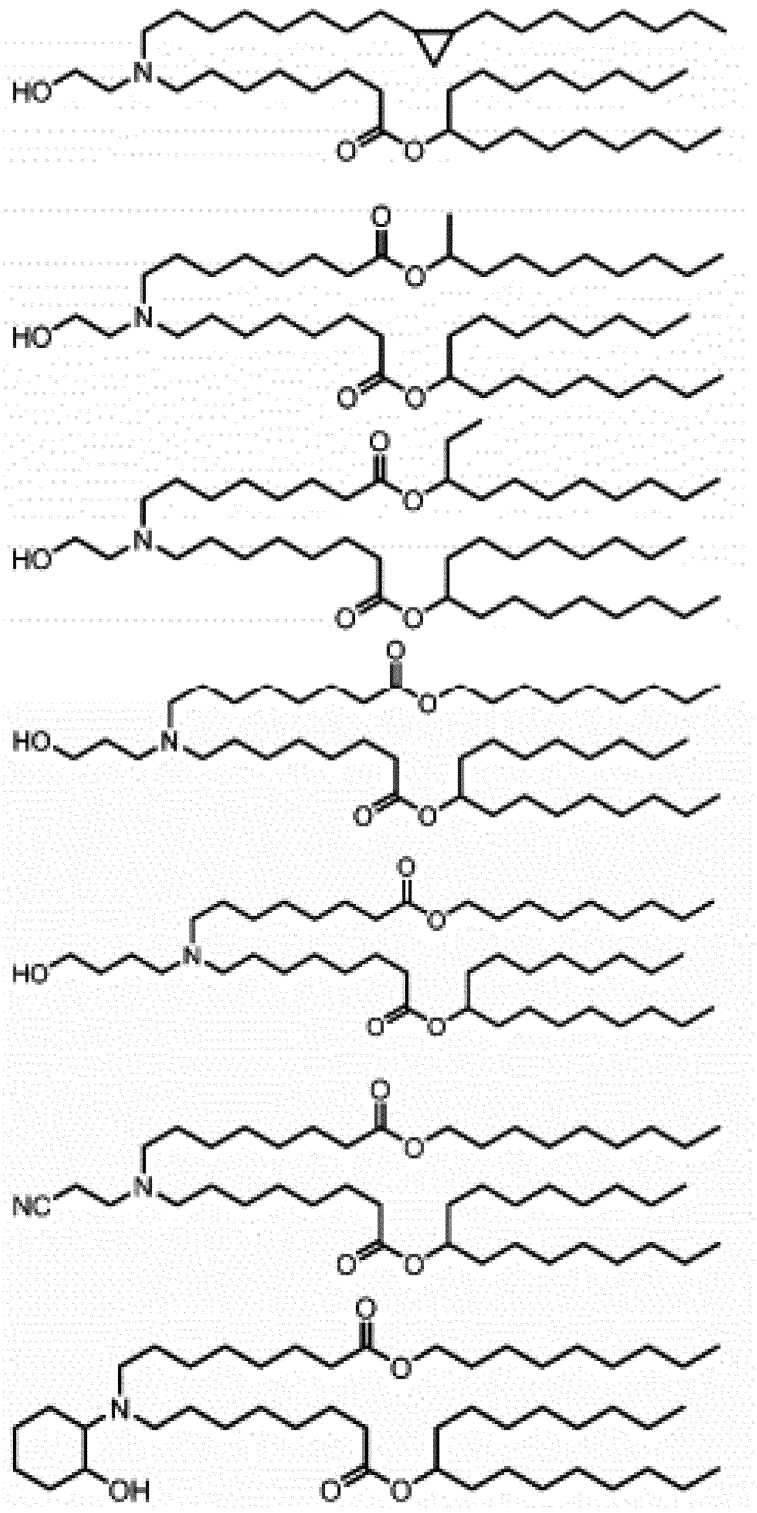
【化１１２－３３】



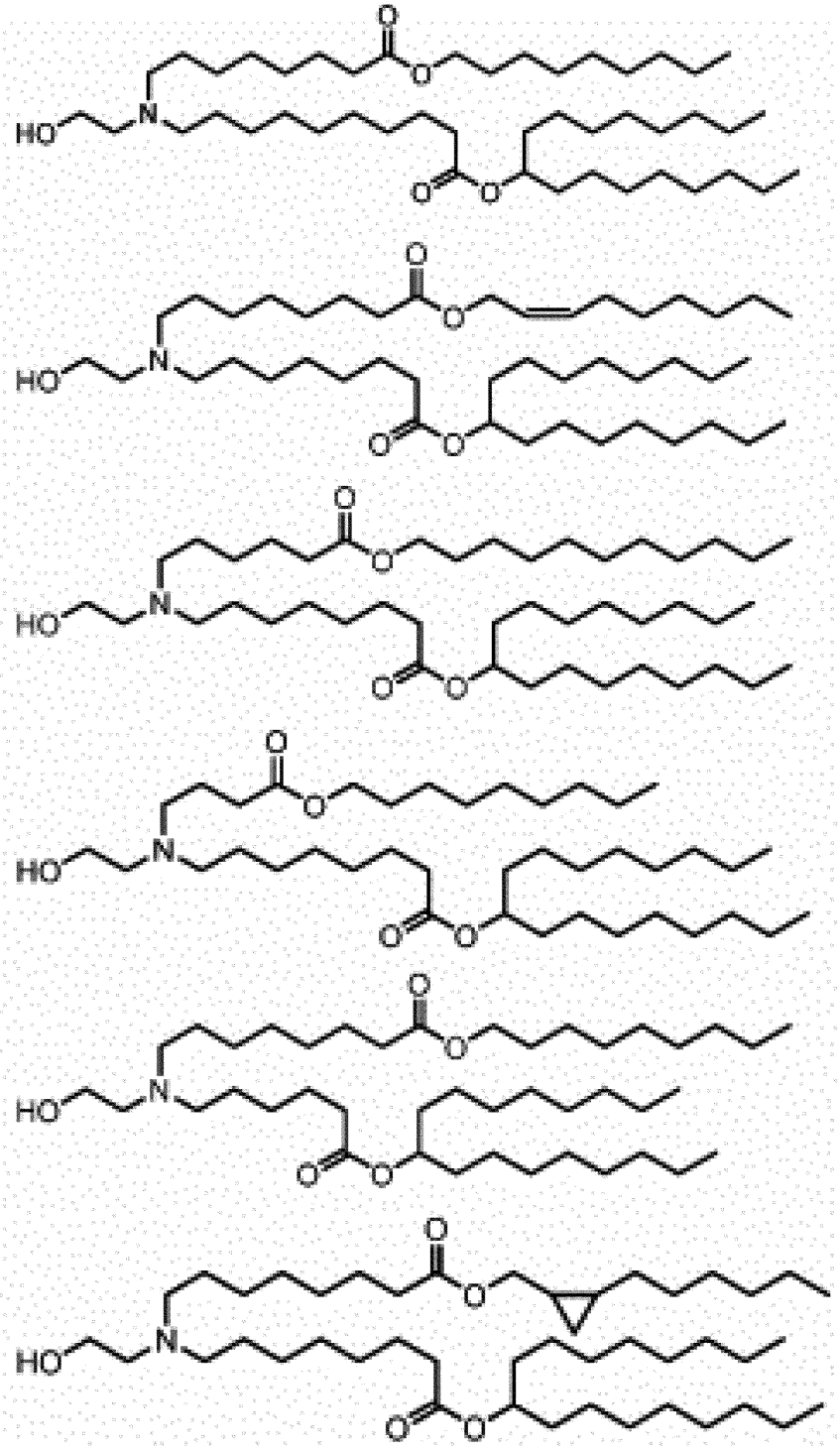
【化１１２－３４】



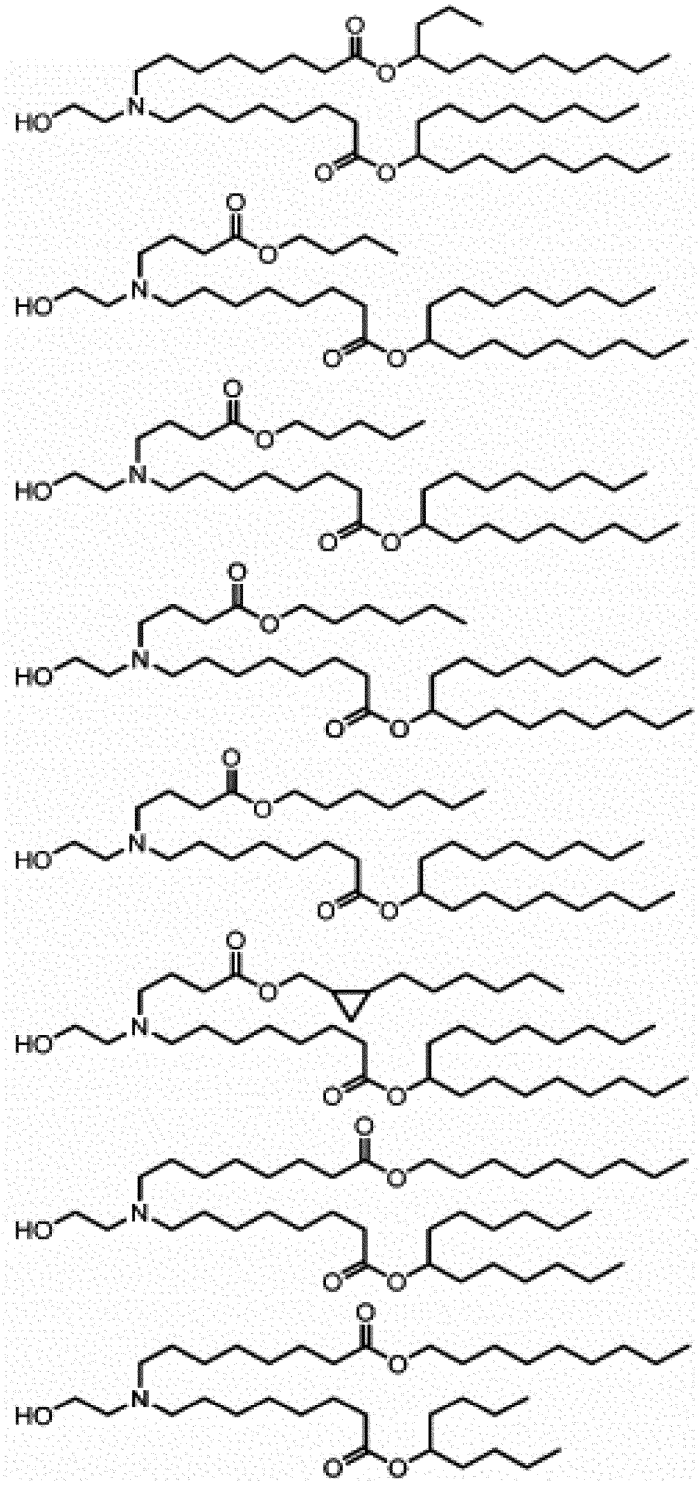
【化１１２－３５】



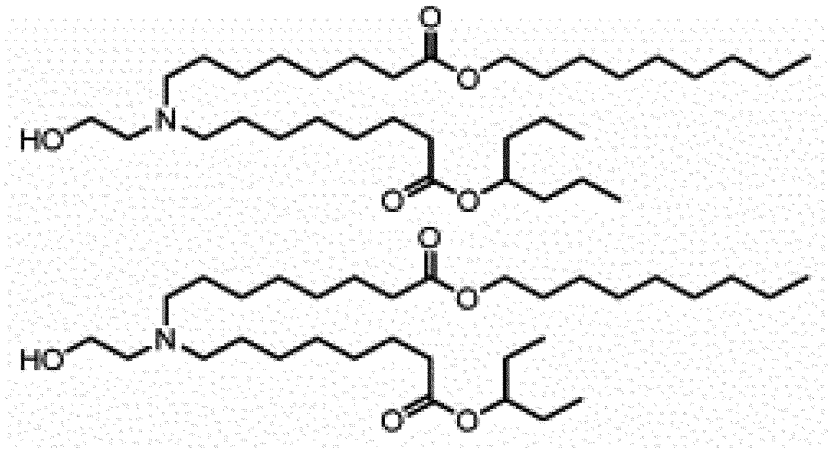
【化１１２－３６】

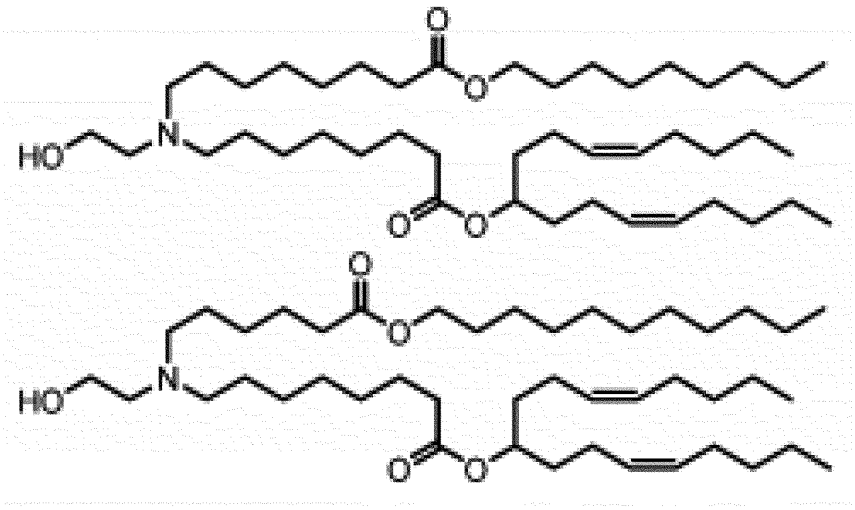


【化１１２－３７】

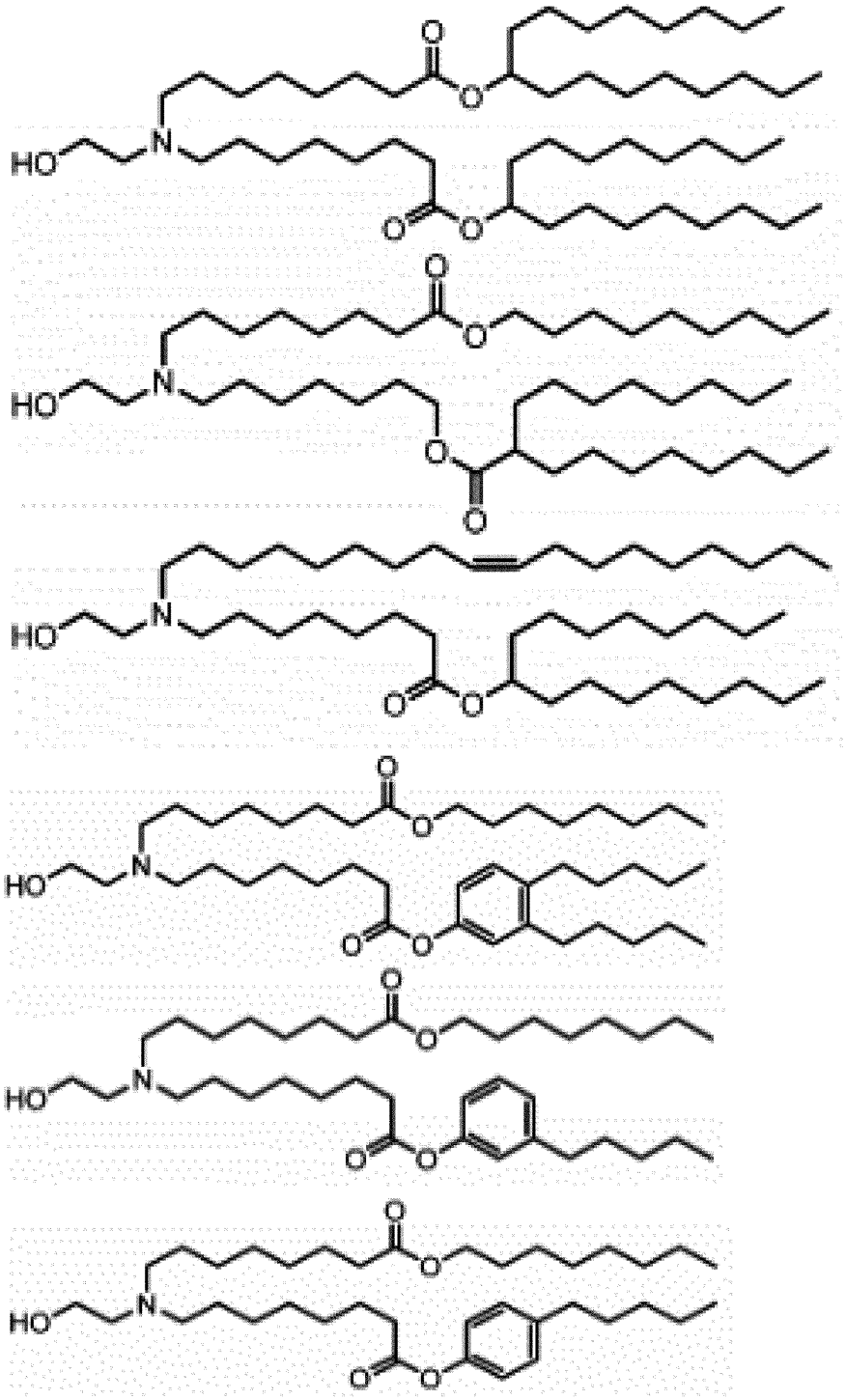


【化１１２－３８】

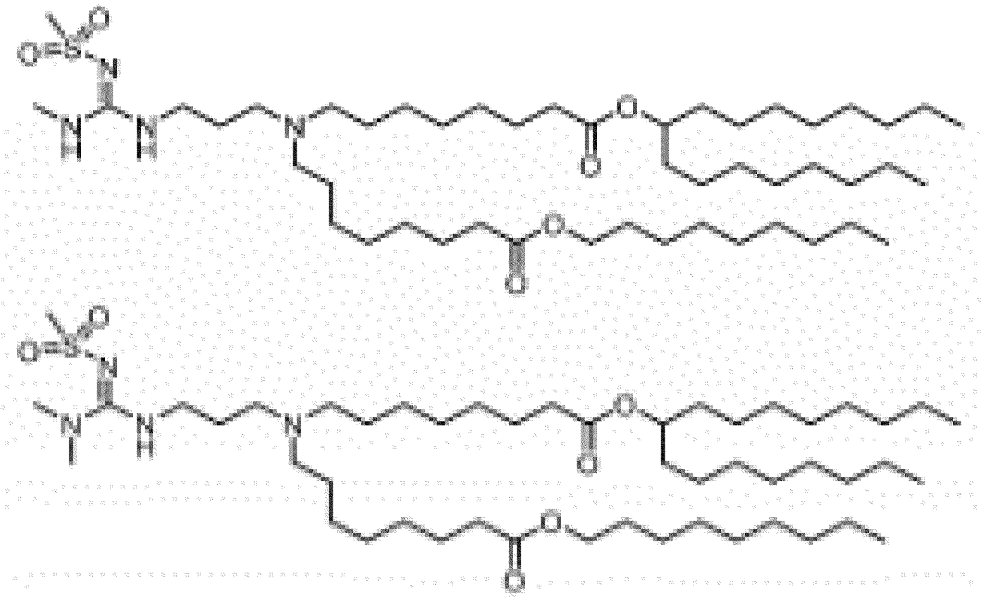


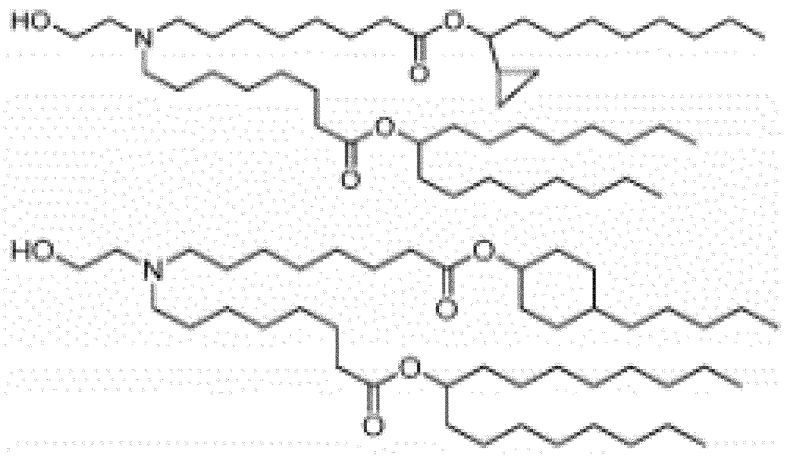


【化１１２－３９】

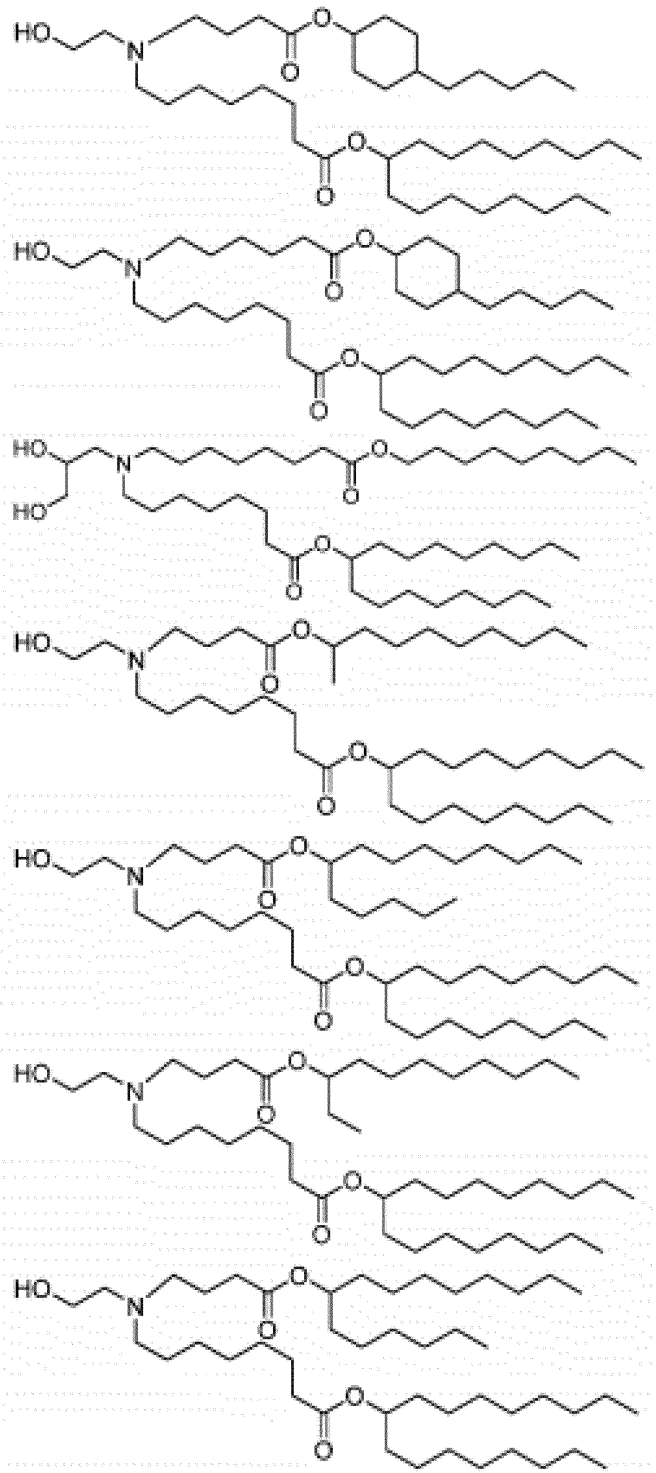


【化１１２－４０】

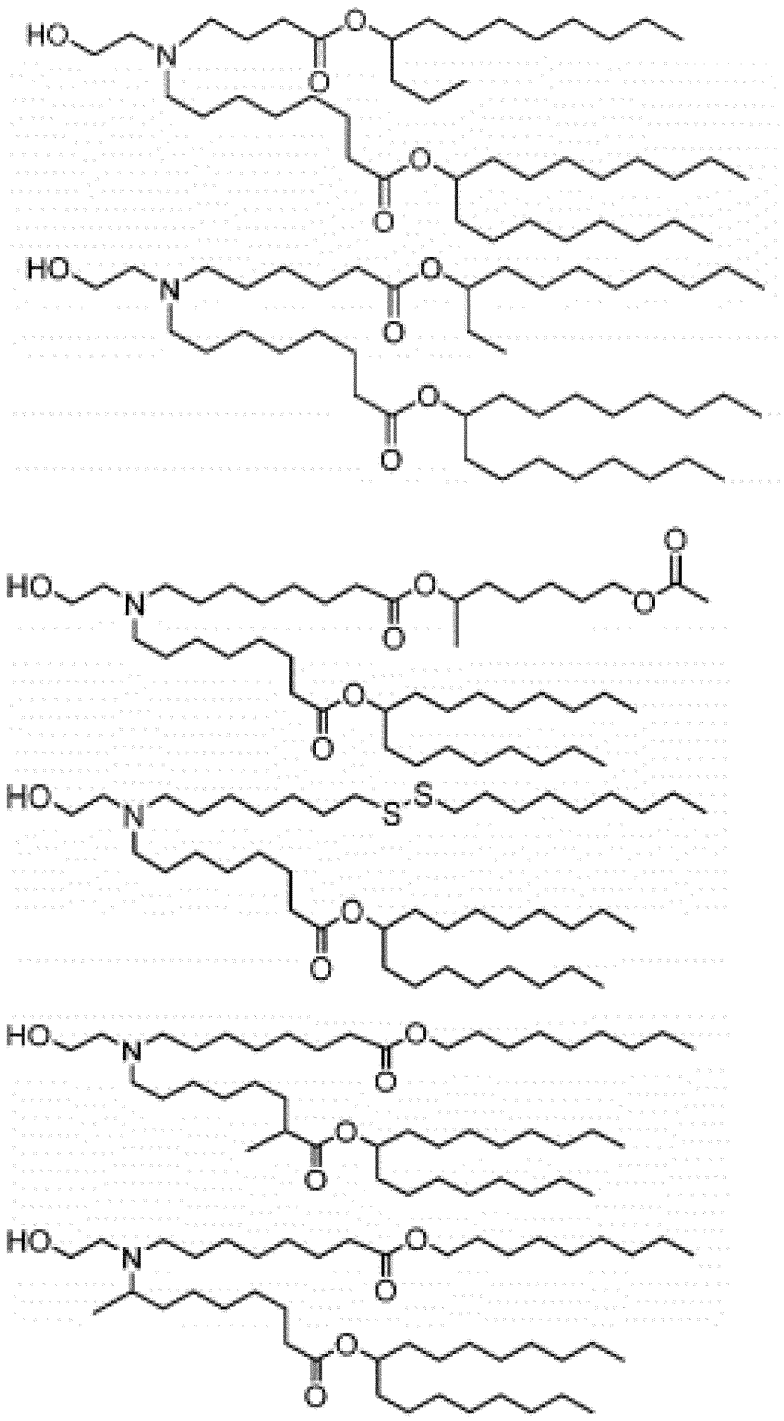




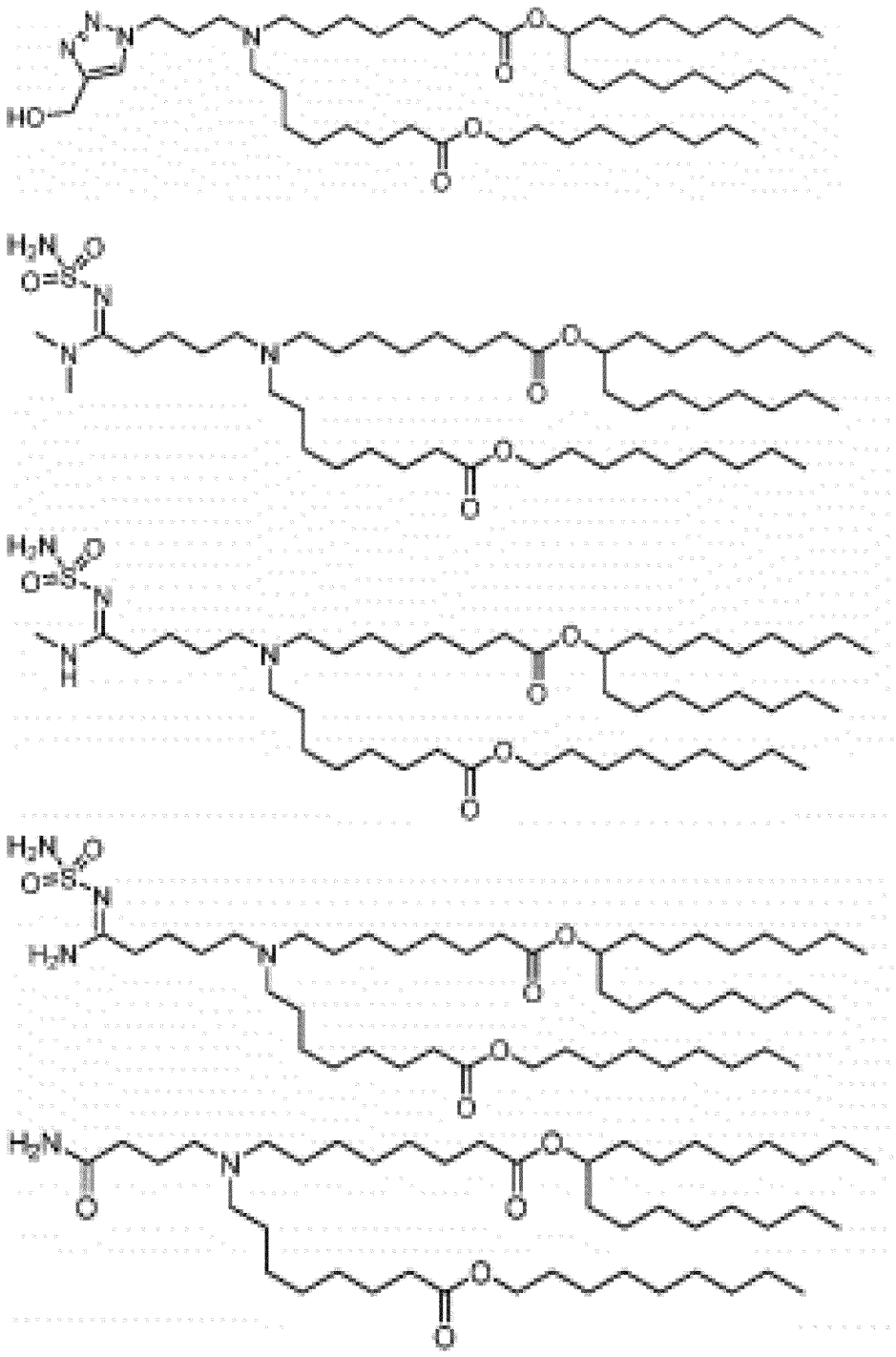
【化１１２－４１】



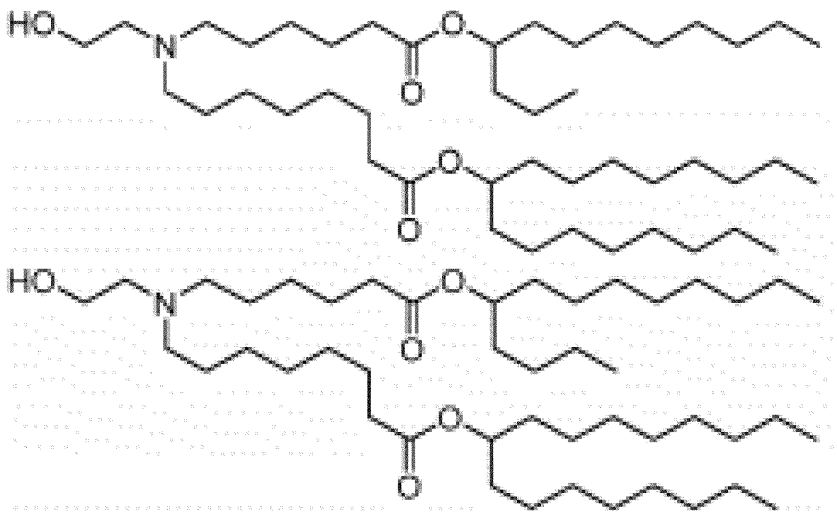
【化１１２－４２】



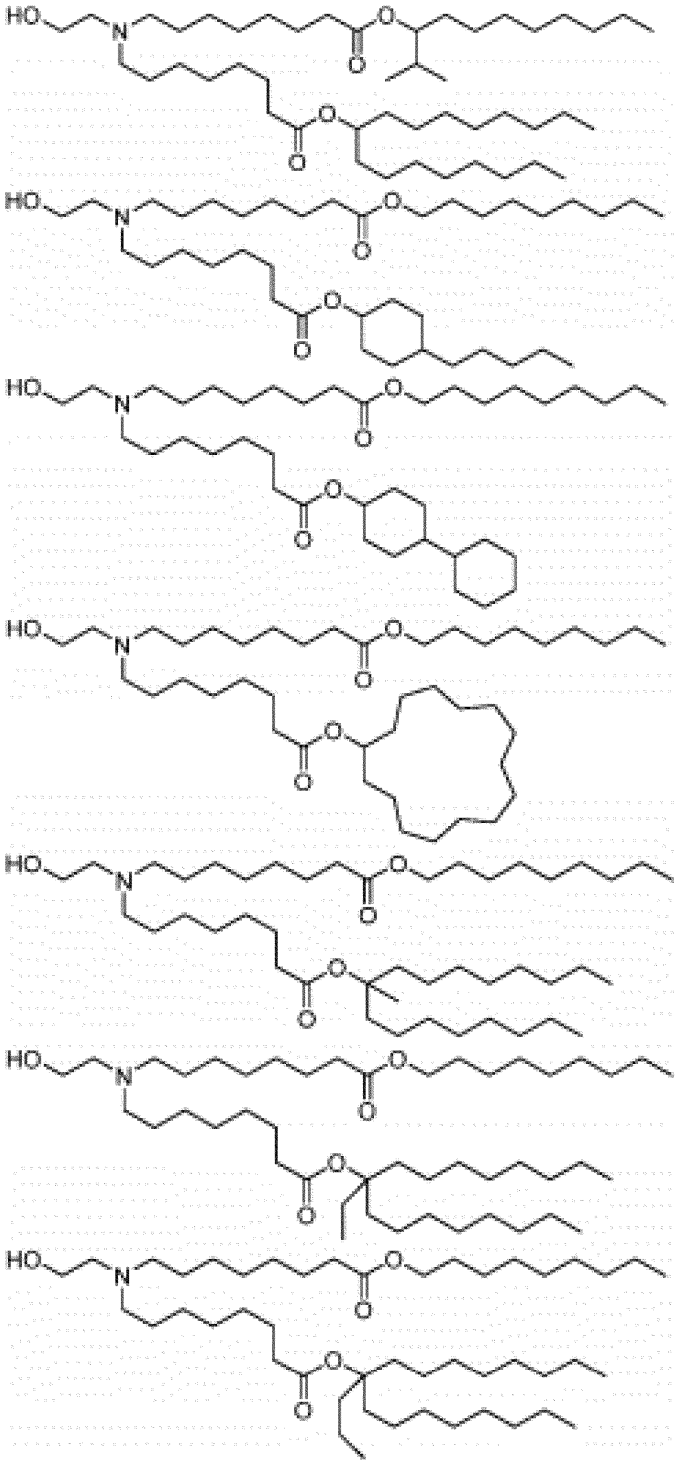
【化１１２－４３】



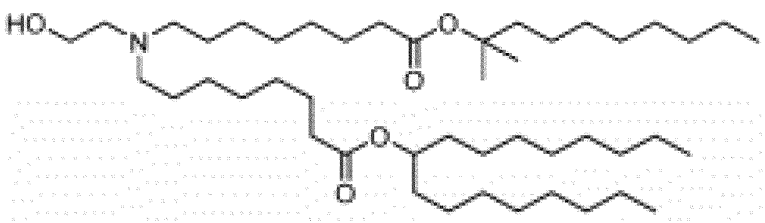
【化１１２－４４】

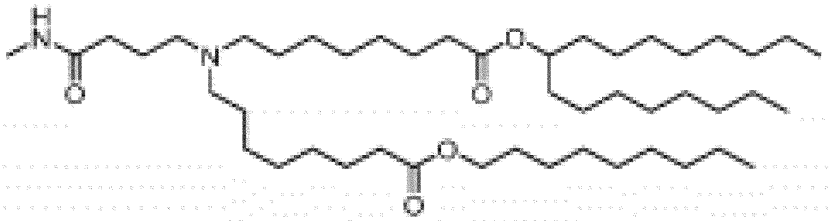


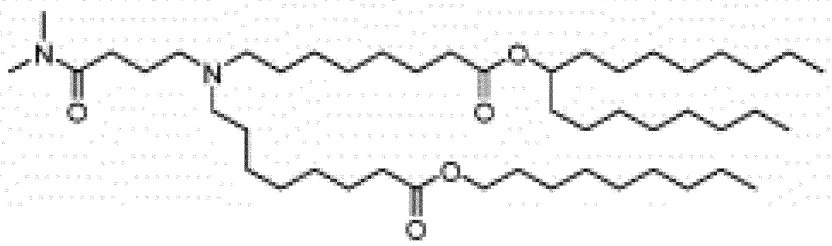
【化１１２－４５】

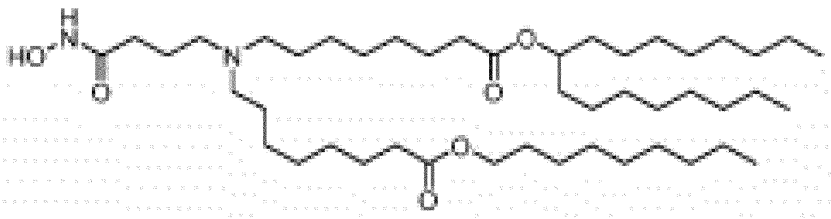


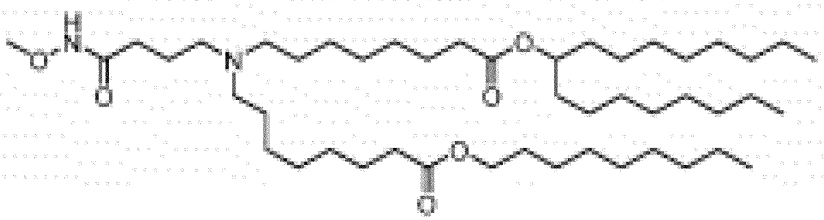
【化１１２－４６】

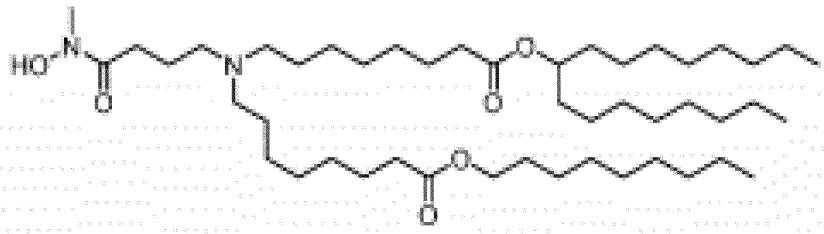




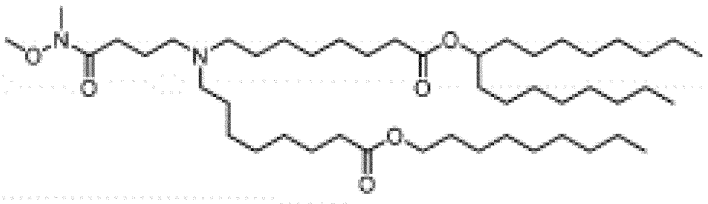


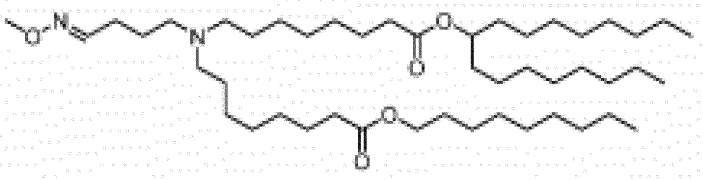


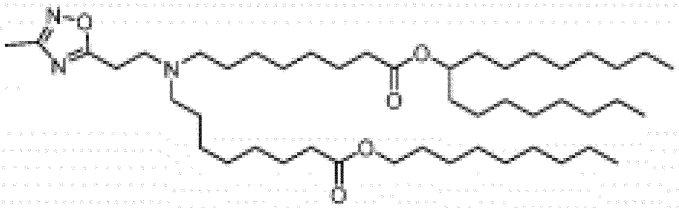


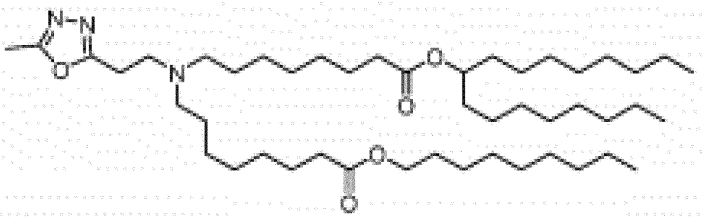


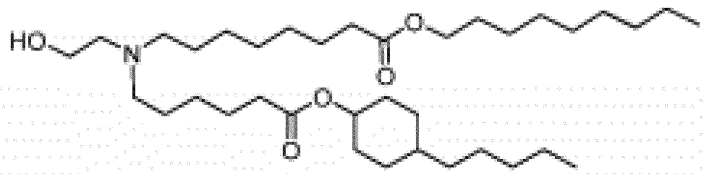
【化１１２－４７】

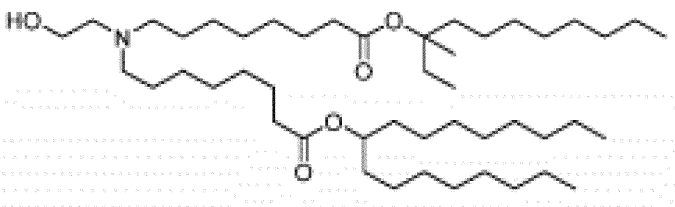


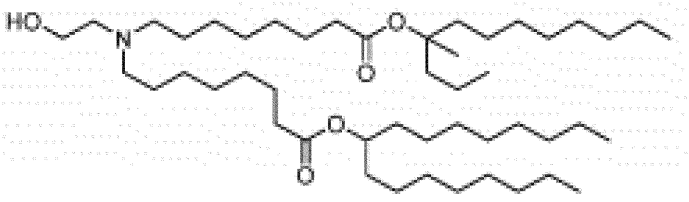




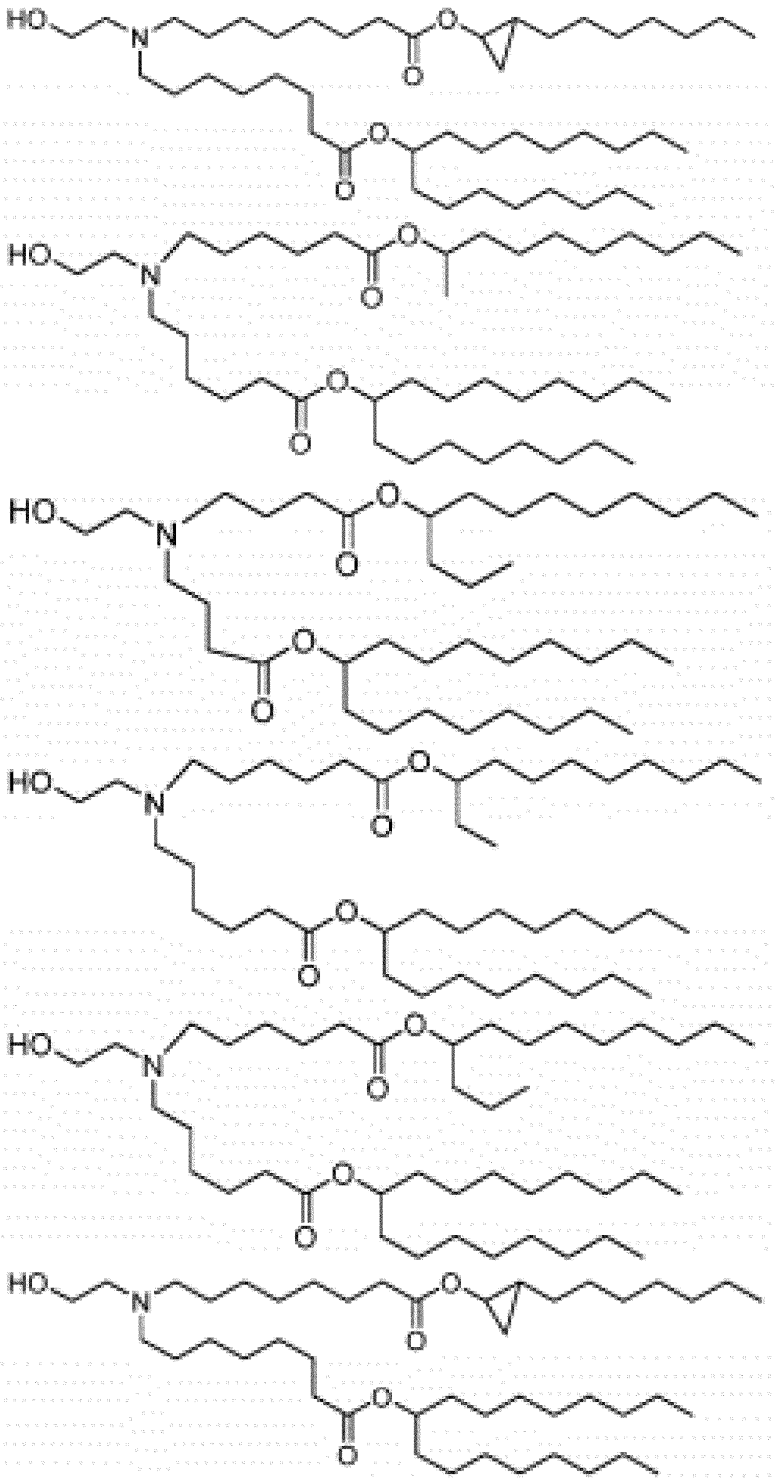




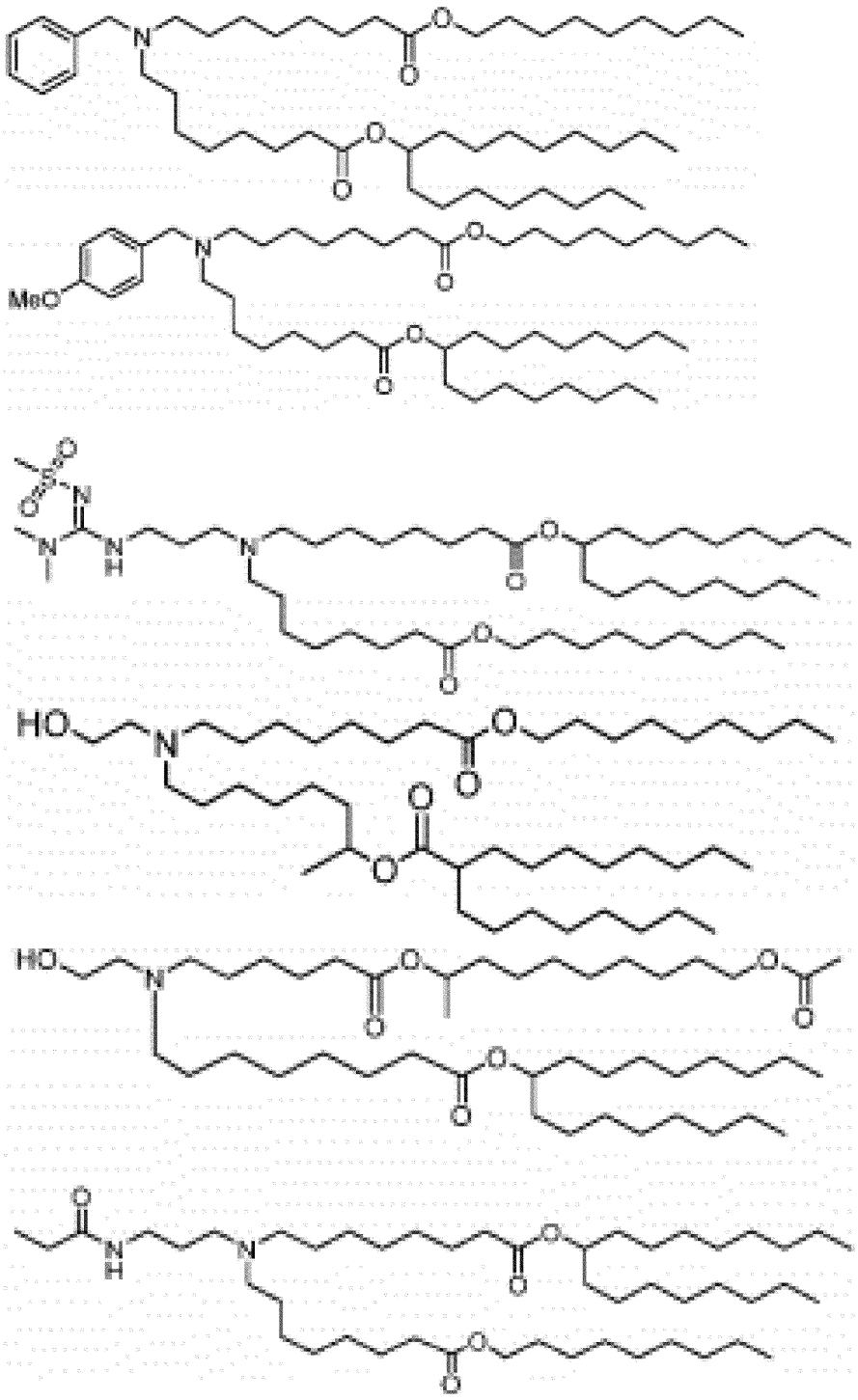




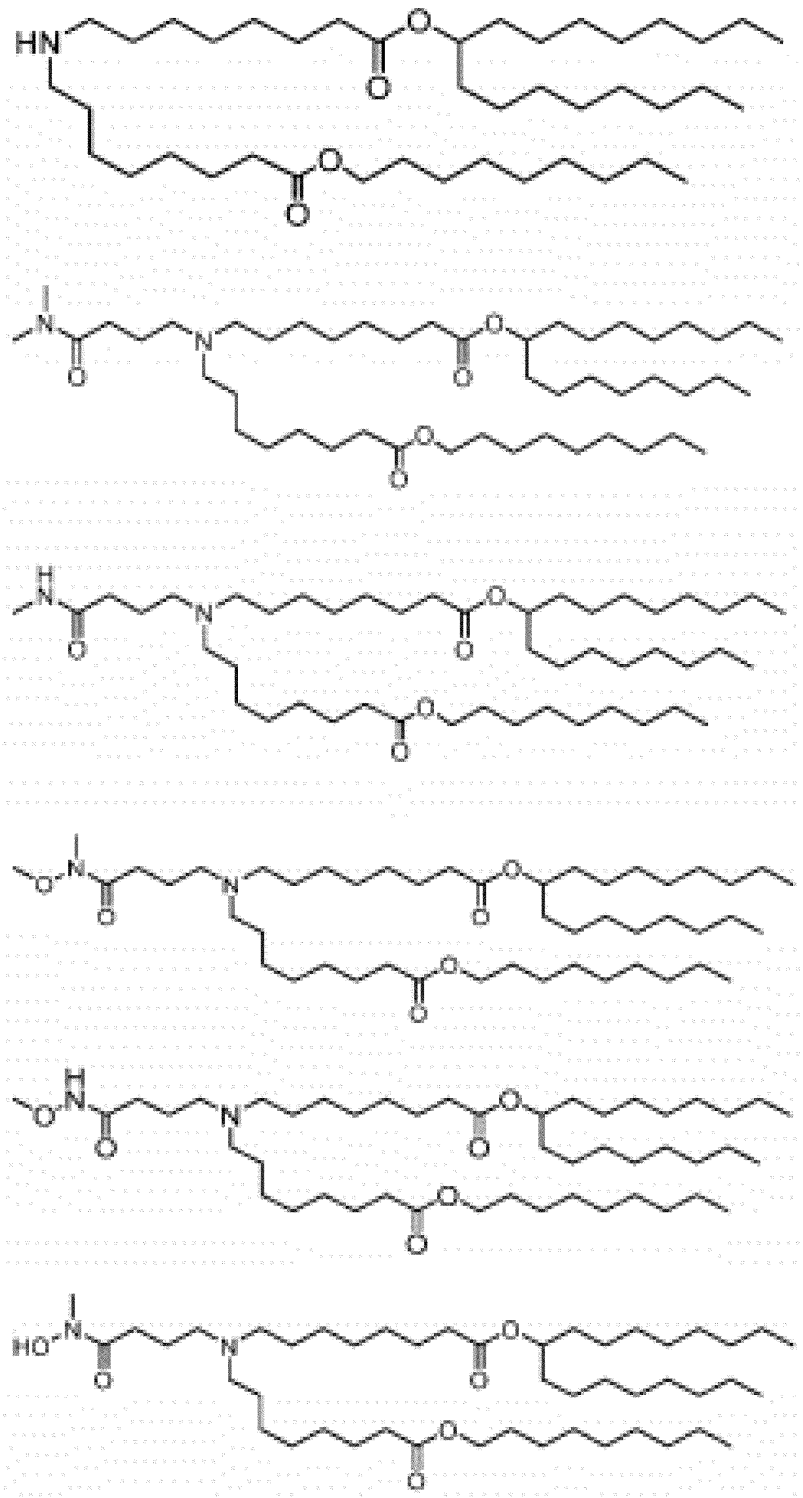
【化１１２－４８】



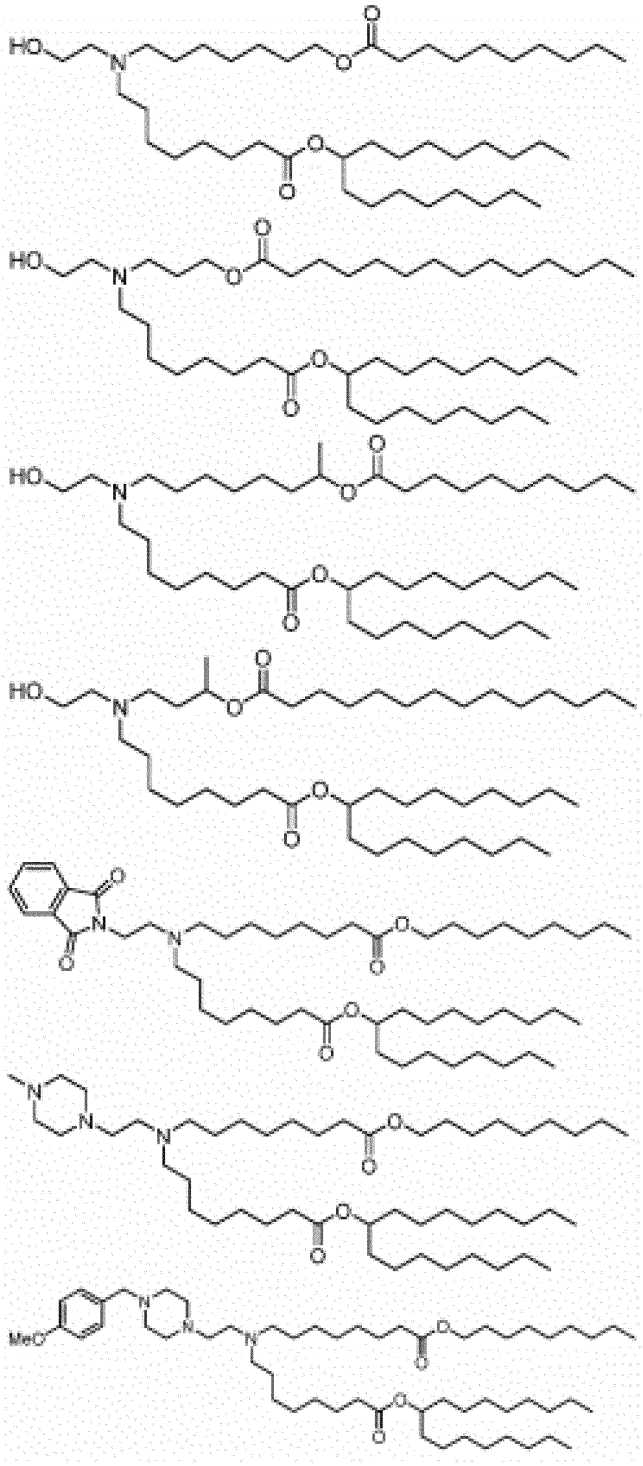
【化１１２－４９】



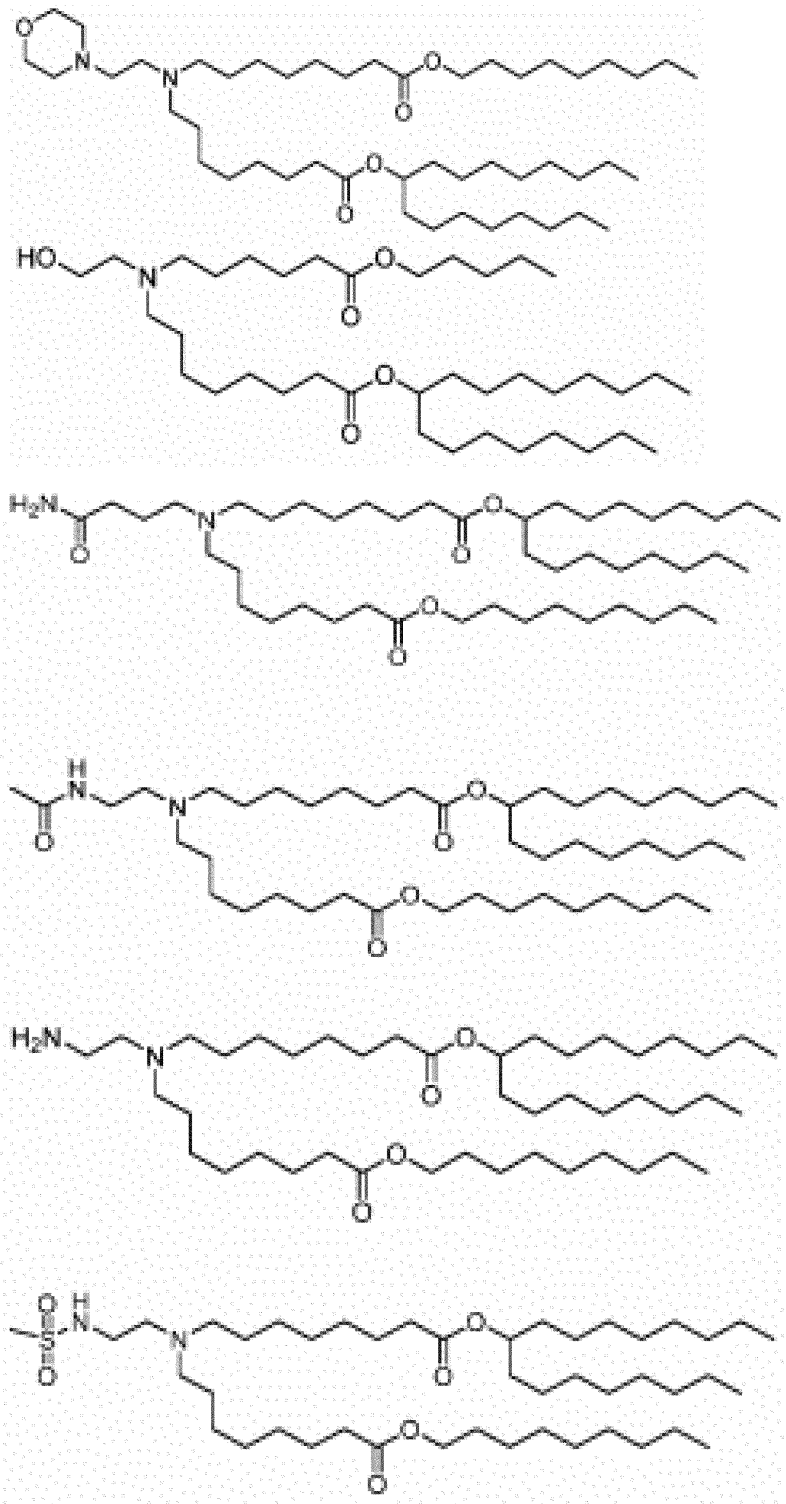
【化１１２－５０】



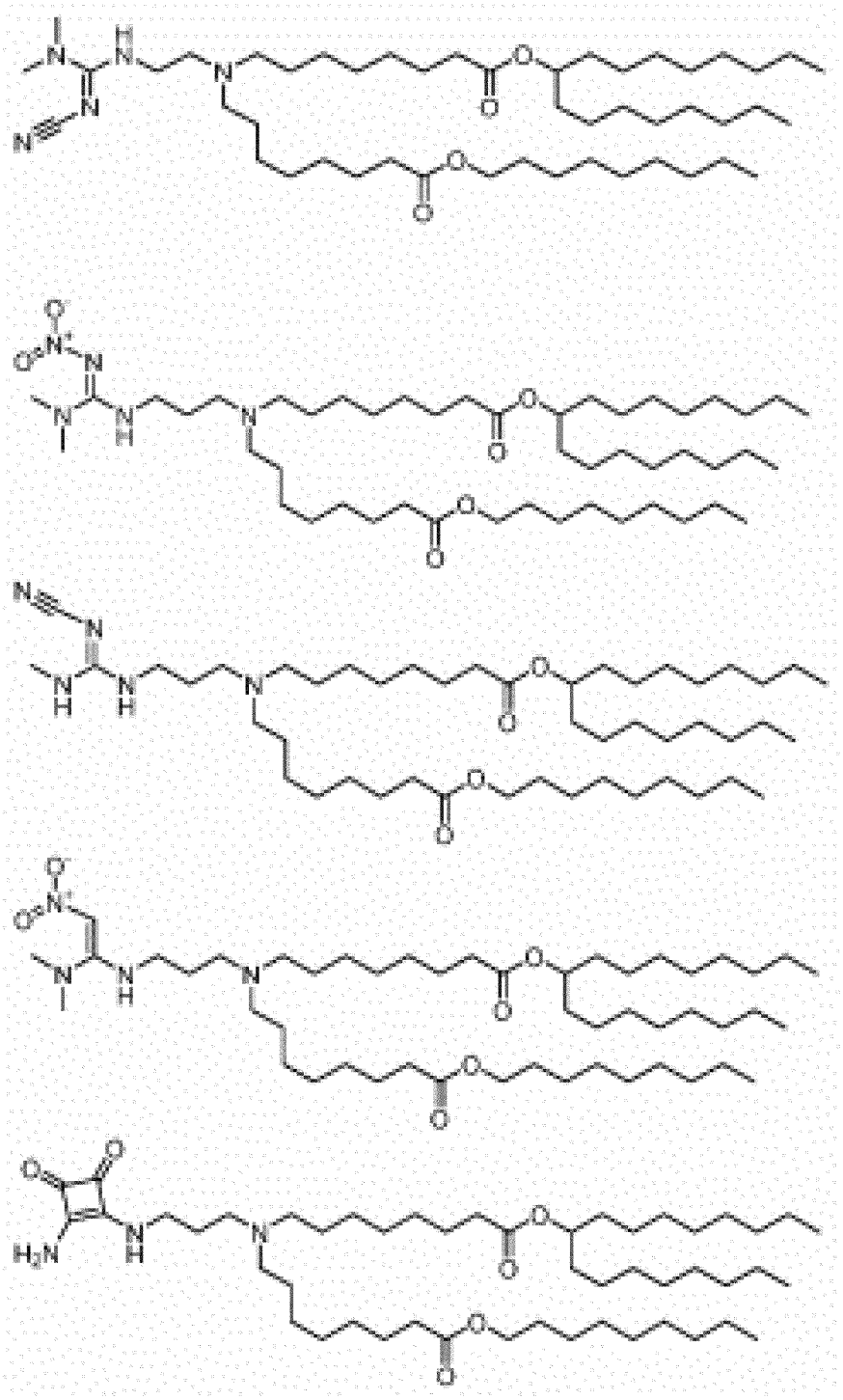
【化１１２－５１】



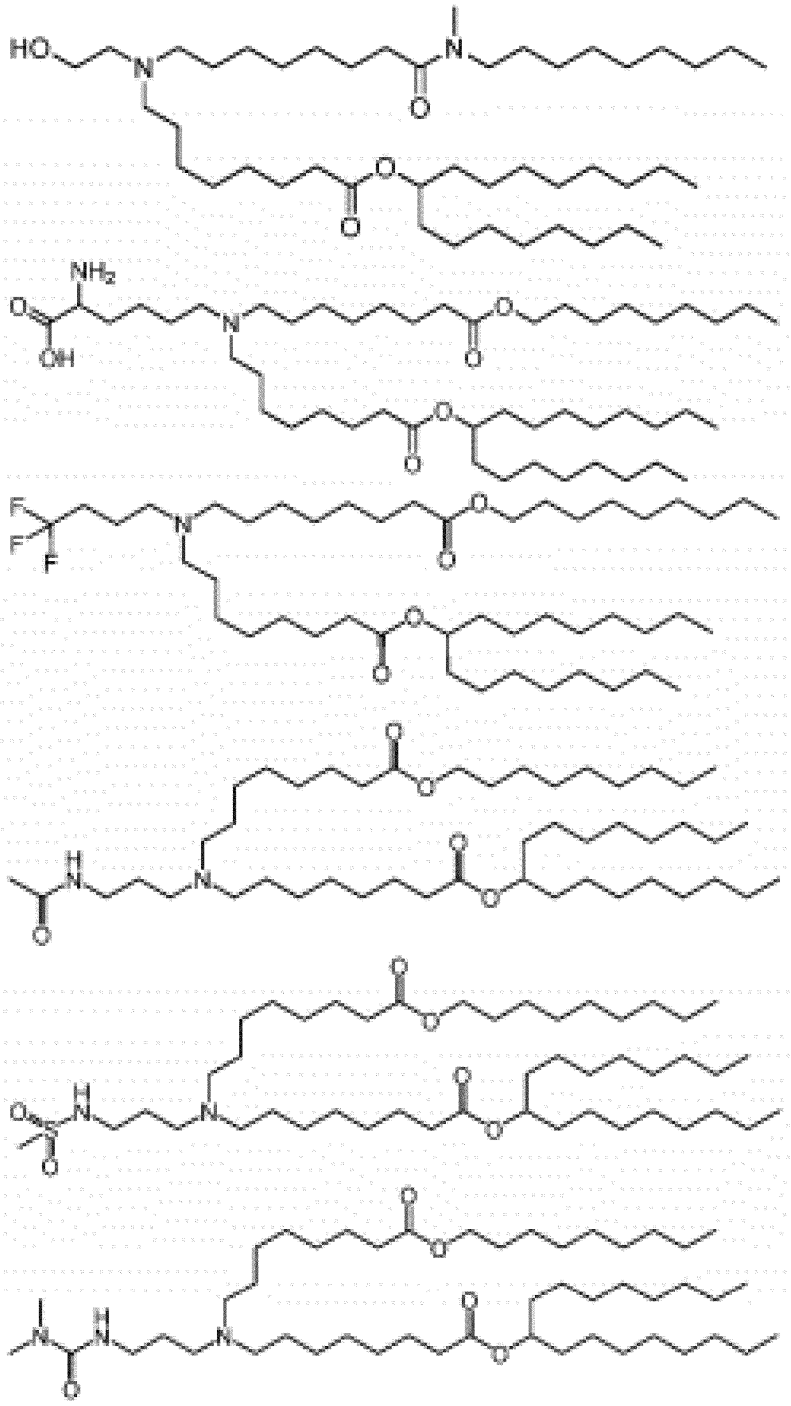
【化１１２－５２】



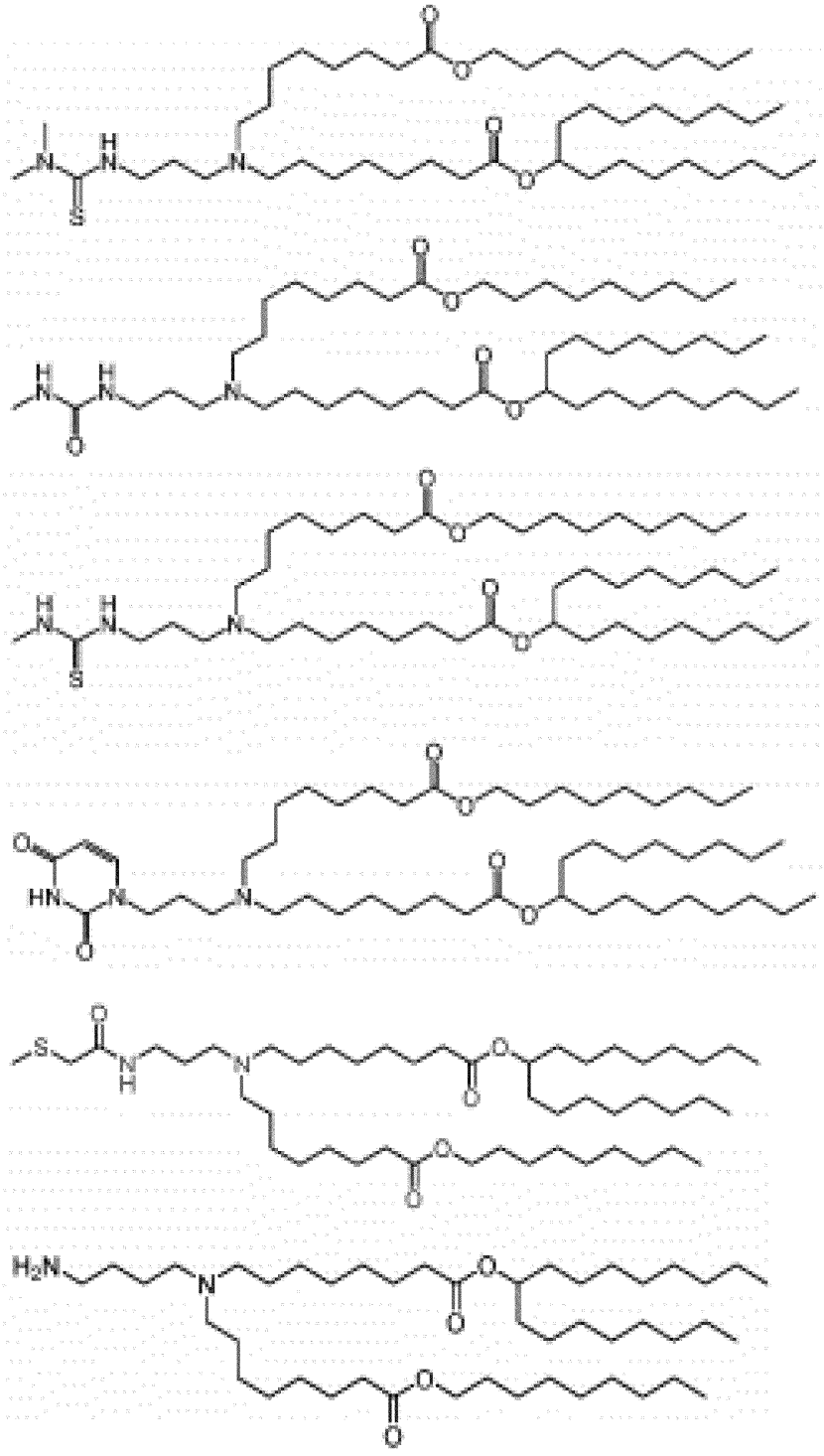
【化１１２－５３】



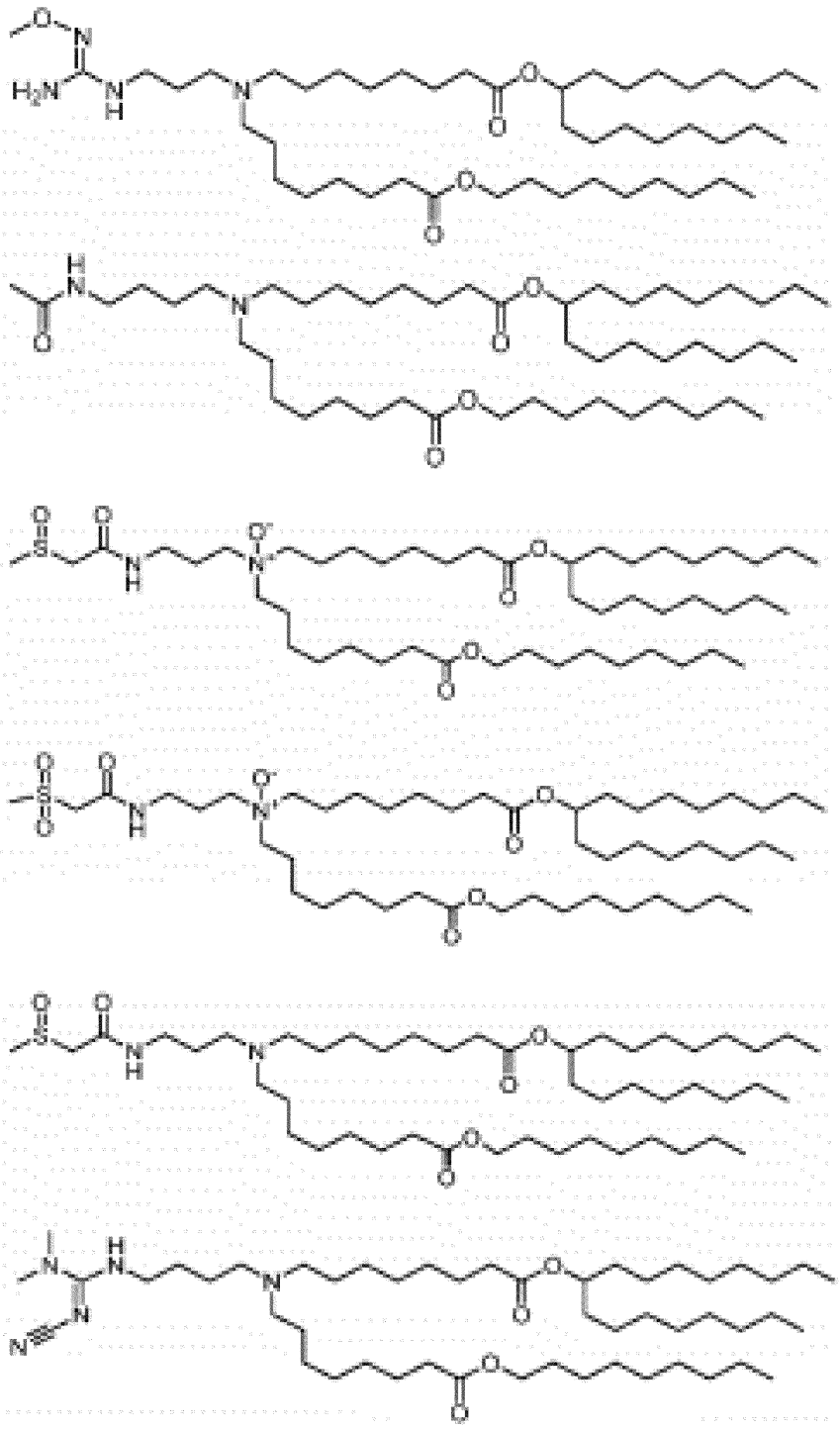
【化１１２－５４】



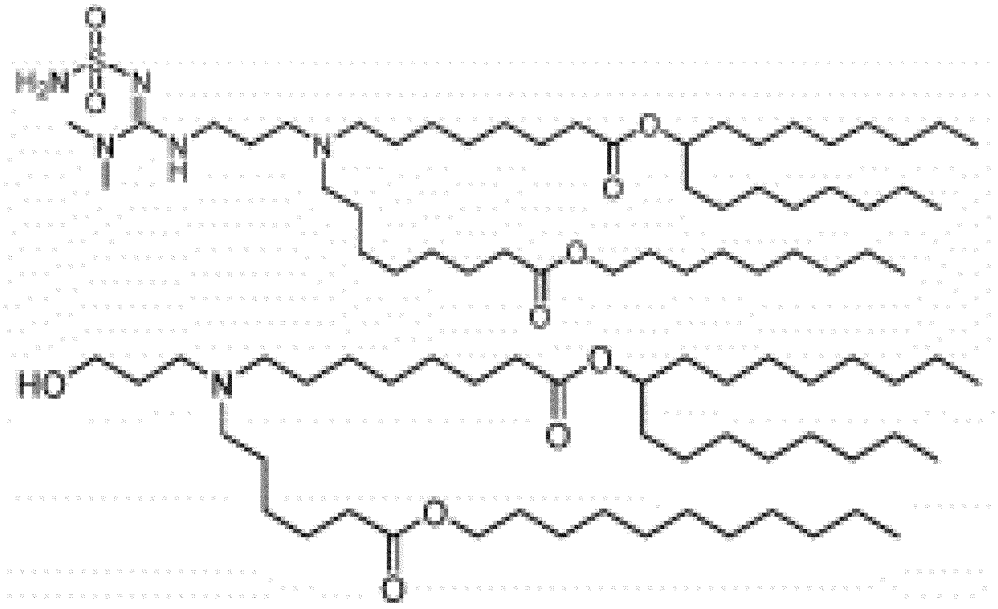
【化１１２－５５】



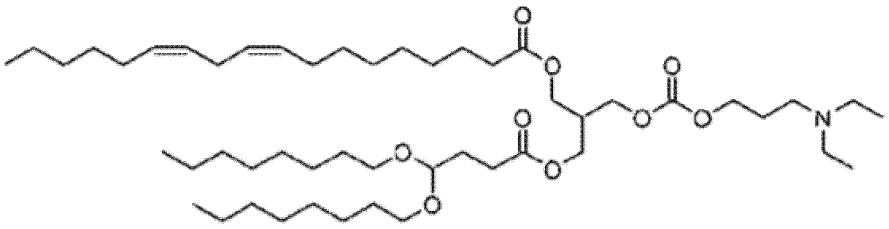
【化１１２－５６】



【化１１２－５７】



【０６３８】
ａ．アミン脂質
特定の実施形態では、環状ＲＮＡの送達のための輸送ビヒクル組成物は、アミン脂質を含む。特定の実施形態では、イオン化可能脂質は、アミン脂質である。いくつかの実施形態では、アミン脂質は、国際特許出願第ＰＣＴ／ＵＳ２０１８／０５３５６９号に記載されている。
【０６３９】
いくつかの実施形態では、アミン脂質は、（９Ｚ，１２Ｚ）－３－（（４，４－ビス（オクチルオキシ）ブタノイル）オキシ）－２－（（（（３－（ジエチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）メチル）プロピルオクタデカ－９，１２－ジエノエートである脂質Ｅである。
【０６４０】
脂質Ｅは、以下のように示され得る：
【化１１３】



【０６４１】
脂質Ｅは、ＷＯ２０１５／０９５３４０（例えば、８４～８６頁）に従って合成され得る。特定の実施形態では、アミン脂質は、脂質Ｅと同等である。
【０６４２】
特定の実施形態では、アミン脂質は、脂質Ｅの類似体である。特定の実施形態では、脂質Ｅ類似体は、脂質Ｅのアセタール類似体である。特定の輸送ビヒクル組成物において、アセタール類似体は、Ｃ４－Ｃ１２アセタール類似体である。いくつかの実施形態では、アセタール類似体は、Ｃ５－Ｃ１２アセタール類似体である。追加の実施形態では、アセタール類似体は、Ｃ５－Ｃ１０アセタール類似体である。さらなる実施形態では、アセタ

ール類似体は、Ｃ４、Ｃ５、Ｃ６、Ｃ７、Ｃ９、Ｃ１０、Ｃ１１及びＣ１２アセタール類似体から選択される。

【０６４３】

本明細書に記載の輸送ビヒクル、例えば、脂質ナノ粒子において使用するのに好適なアミン脂質及び他の生分解性脂質は、インビボで生分解性である。本明細書に記載のアミン脂質は、低い毒性を有する（例えば、１０ｍｇ／ｋｇよりも多いまたは同等の量で有害作用を伴わずに動物モデルにおいて忍容される）。特定の実施形態では、アミン脂質を構成する輸送ビヒクルには、アミン脂質の少なくとも７５％が８、１０、１２、２４、もしくは４８時間、または３、４、５、６、７、もしくは１０日以内に血漿から消失するものが含まれる。

【０６４４】

生分解性脂質には、例えば、ＷＯ２０１７／１７３０５４、ＷＯ２０１５／０９５３４０、及びＷＯ２０１４／１３６０８６の生分解性脂質が含まれる。

【０６４５】

脂質クリアランスは、当業者に知られている方法によって測定され得る。例えば、Ｍａｉｅｒ，Ｍ．Ａ．，ｅｔ ａｌ．Ｂｉｏｄｅｇｒａｄａｂｌｅ Ｌｉｐｉｄｓ Ｅｎａｂｌｉｎｇ Ｒａｐｉｄｌｙ Ｅｌｉｍｉｎａｔｅｄ Ｌｉｐｉｄ Ｎａｎｏｐａｒｔｉｃｌｅｓ ｆｏｒ Ｓｙｓｔｅｍｉｃ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ ｏｆ ＲＮＡｉ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ．Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒ．２０１３，２１（８），１５７０－７８を参照されたい。

【０６４６】

アミン脂質を含む輸送ビヒクル組成物は、上昇したクリアランス速度をもたらし得る。いくつかの実施形態では、クリアランス速度は、脂質クリアランス速度、例えば、脂質が血液、血清、または血漿から消失する速度である。いくつかの実施形態では、クリアランス速度は、ＲＮＡクリアランス速度、例えば、ｃｉｒｃＲＮＡが血液、血清、または血漿から消失する速度である。いくつかの実施形態では、クリアランス速度は、輸送ビヒクルが血液、血清、または血漿から消失する速度である。いくつかの実施形態では、クリアランス速度は、輸送ビヒクルが肝臓組織または脾臓組織などの組織から消失する速度である。特定の実施形態では、高いクリアランス速度は、実質的な有害作用を伴わずに安全性プロファイルをもたらす。アミン脂質及び生分解性脂質は、循環及び組織における輸送ビヒクル蓄積を低減し得る。いくつかの実施形態では、循環及び組織における輸送ビヒクル蓄積の低減は、実質的な有害作用を伴わずに安全性プロファイルをもたらす。

【０６４７】

脂質は、それらが入っている媒体のｐＨに応じてイオン化可能であり得る。例えば、わずかに酸性の媒体において、アミン脂質などの脂質は、プロトン化され、よって、正電荷を有し得る。逆に、例えば、ｐＨがおよそ７．３５である血液などのわずかに塩基性の媒体において、アミン脂質などの脂質は、プロトン化されず、よって、電荷を有さない場合がある。

【０６４８】

脂質が電荷を有する能力は、その固有のｐＫａに関連する。いくつかの実施形態では、本開示のアミン脂質は、各々、独立して、約５．１～約７．４の範囲のｐＫａを有し得る。いくつかの実施形態では、本開示の生物学的に利用可能な脂質は、各々、独立して、約５．１～約７．４の範囲のｐＫａを有し得る。例えば、本開示のアミン脂質は、各々、独立して、約５．８～約６．５の範囲のｐＫａを有し得る。約５．１～約７．４の範囲のｐＫａを有する脂質は、インビボで、例えば、肝臓へのカーゴの送達に有効である。さらに、約５．３～約６．４の範囲のｐＫａを有する脂質は、インビボ、例えば、腫瘍への送達に有効であることが判明した。例えば、ＷＯ２０１４／１３６０８６を参照されたい。

【０６４９】

ｂ．ジスルフィド結合を含む脂質

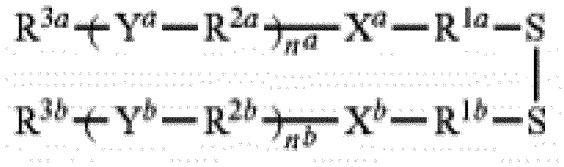
いくつかの実施形態では、イオン化可能脂質は、米国特許第９，７０８，６２８号に記

載されている。

【０６５０】

本発明は、構造（ＸＸＩＩ）によって表される脂質を提供する：

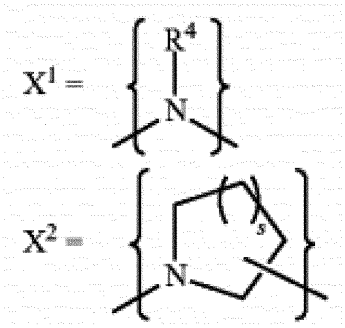
【化１１４】



【０６５１】

構造（ＸＸＩＩ）において、Ｘ$^{a}$及びＸ$^{b}$は、各々、独立して、以下に示されるＸ$^{1}$またはＸ$^{2}$である。

【化１１５】



【０６５２】

Ｘ$^{1}$におけるＲ$^{4}$は、直鎖状、分岐状または環状であり得る１～６個の炭素原子を有するアルキル基である。アルキル基は好ましくは、１～３の炭素数を有する。１～６個の炭素原子を有するアルキル基の具体的な例には、メチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、ｎ－ブチル基、ｓｅｃ－ブチル基、イソブチル基、ｔｅｒｔ－ブチル基、ペンチル基、イソペンチル基、ネオペンチル基、ｔ－ペンチル基、１，２－ジメチルプロピル基、２－メチルブチル基、２－メチルペンチル基、３－メチルペンチル基、２，２－ジメチルブチル基、２，３－ジメチルブチル基、シクロヘキシル基などが含まれる。Ｒ$^{4}$は好ましくは、メチル基、エチル基、プロピル基またはイソプロピル基、最も好ましくはメチル基である。

【０６５３】

Ｘ$^{2}$におけるｓは、１または２である。ｓが１である場合、Ｘ$^{2}$は、ピロリジニウム基であり、ｓが２である場合、Ｘ$^{2}$は、ピペリジニウム基である。ｓは２が好ましい。Ｘ$^{2}$の結合方向が限定されない場合、Ｘ$^{2}$における窒素原子は好ましくは、Ｒ$^{1a}$及びＲ$^{1b}$に結合する。

【０６５４】

Ｘ$^{a}$は、Ｘ$^{b}$と同じまたは異なり得、Ｘ$^{a}$は好ましくは、Ｘ$^{b}$と同じ基である。

【０６５５】

ｎ$^{a}$及びｎ$^{b}$は、各々、独立して、０または１、好ましくは１である。ｎ$^{a}$が１である場合、Ｒ$^{3a}$は、Ｙ$^{a}$及びＲ$^{2a}$を介してＸ$^{a}$に結合し、ｎ$^{a}$が０である場合、Ｒ$^{3a}$－Ｘ$^{a}$－Ｒ$^{1a}$－Ｓ－の構造がとられる。同様に、ｎ$^{b}$が１である場合、Ｒ$^{3b}$は、Ｙ$^{b}$及びＲ$^{2b}$を介してＸ$^{b}$に結合し、ｎ$^{b}$が０である場合、Ｒ$^{3b}$－Ｘ$^{b}$－Ｒ$^{1b}$－Ｓ－の構造がとられる。

【０６５６】

ｎ$^{a}$は、ｎ$^{b}$と同じまたは異なり得、ｎ$^{a}$は好ましくは、ｎ$^{b}$と同じである。

【０６５７】

$R^{1a}$及び$R^{1b}$は、各々、独立して、直鎖状または分岐状、好ましくは直鎖状であり得る１～６個の炭素原子を有するアルキレン基である。１～６個の炭素原子を有するアルキレン基の具体的な例には、メチレン基、エチレン基、トリメチレン基、イソプロピレン基、テトラメチレン基、イソブチレン基、ペンタメチレン基、ネオペンチレン基などが含まれる。$R^{1a}$及び$R^{1b}$は、それぞれ好ましくは、メチレン基、エチレン基、トリメチレン基、イソプロピレン基またはテトラメチレン基、最も好ましくはエチレン基である。

【０６５８】

$R^{1a}$は、$R^{1b}$と同じまたは異なり得、$R^{1a}$は好ましくは、$R^{1b}$と同じ基である。

【０６５９】

$R^{2a}$及び$R^{2b}$は、各々、独立して、直鎖状または分岐状、好ましくは直鎖状であり得る１～６個の炭素原子を有するアルキレン基である。１～６個の炭素原子を有するアルキレン基の例には、$R^{1a}$または$R^{1b}$について１～６個の炭素原子を有するアルキレン基の例として記述されているものが含まれる。$R^{2a}$及び$R^{2b}$は、それぞれ好ましくは、メチレン基、エチレン基、トリメチレン基、イソプロピレン基またはテトラメチレン基である。

【０６６０】

$X^a$及び$X^b$がそれぞれ$X^1$である場合、$R^{2a}$及び$R^{2b}$は好ましくは、トリメチレン基である。$X^a$及び$X^b$がそれぞれ$X^2$である場合、$R^{2a}$及び$R^{2b}$は好ましくは、エチレン基である。

【０６６１】

$R^{2a}$は、$R^{2b}$と同じまたは異なり得、$R^{2a}$は好ましくは、$R^{2b}$と同じ基である。

【０６６２】

$Y^a$及び$Y^b$は、各々、独立して、エステル結合、アミド結合、カルバメート結合、エーテル結合または尿素結合、好ましくはエステル結合、アミド結合またはカルバメート結合、最も好ましくはエステル結合である。$Y^a$及び$Y^b$の結合方向は限定されない一方で、$Y^a$がエステル結合である場合、$R^{3a}-CO-O-R^{2a}-$の構造が好ましく、$Y^b$がエステル結合である場合、$R^{3b}-CO-O-R^{2b}-$の構造が好ましい。

【０６６３】

$Y^a$は、$Y^b$と同じまたは異なり得、$Y^a$は好ましくは、$Y^b$と同じ基である。

【０６６４】

$R^{3a}$及び$R^{3b}$は、各々、独立して、ステロール残基、脂溶性ビタミン残基または１２～２２個の炭素原子を有する脂肪族炭化水素基、好ましくは脂溶性ビタミン残基または１２～２２個の炭素原子を有する脂肪族炭化水素基、最も好ましくは脂溶性ビタミン残基である。

【０６６５】

ステロール残基の例には、コレステリル基（コレステロール残基）、コレステタリル基（コレスタノール残基）、スチグマステリル基（スチグマステロール残基）、β－シトステリル基（ベータシトステロール残基）、ラノステリル基（ラノステロール残基）、及びエルゴステリル基（エルゴステロール残基）などが含まれる。ステロール残基は好ましくは、コレステリル基またはコレステタリル基である。

【０６６６】

脂溶性ビタミン残基として、脂溶性ビタミンに由来する残基、ならびに脂溶性ビタミンにおける官能基であるヒドロキシル基、アルデヒドまたはカルボン酸を他の反応性官能基に適切に変換することによって得られる誘導体に由来する残基が使用され得る。例えば、ヒドロキシル基を有する脂溶性ビタミンに関して、ヒドロキシル基は、コハク酸無水物、グルタル酸無水物などを反応させることによってカルボン酸に変換され得る。脂溶性ビタミンの例には、レチノイン酸、レチノール、レチナール、エルゴステロール、７－デヒドロコレステロール、カルシフェロール、コレカルシフェロール、ジヒドロエルゴカルシフェロール、ジヒドロタキステロール、トコフェロール、トコトリエノールなどが含まれる。脂溶性ビタミンの好ましい例には、レチノイン酸及びトコフェロールが含まれる。

【０６６７】
１２～２２個の炭素原子を有する脂肪族炭化水素基は、直鎖状または分岐状、好ましくは直鎖状であり得る。脂肪族炭化水素基は、飽和または不飽和であり得る。不飽和脂肪族炭化水素基の場合、脂肪族炭化水素基は通常、１～６、好ましくは１～３、より好ましくは１～２個の不飽和結合を含有する。不飽和結合が炭素－炭素二重結合及び炭素－炭素三重結合を含む一方で、それは好ましくは、炭素－炭素二重結合を含む。脂肪族炭化水素基は、好ましくは１２～１８、最も好ましくは１３～１７の炭素数を有する。脂肪族炭化水素基は、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基などを含む一方で、それは好ましくは、アルキル基またはアルケニル基である。１２～２２個の炭素原子を有する脂肪族炭化水素基の具体的な例には、ドデシル基、トリデシル基、テトラデシル基、ペンタデシル基、ヘキサデシル基、ヘプタデシル基、オクタデシル基、ノナデシル基、イコシル基、ヘニコシル基、ドコシル基、ドデセニル基、トリデセニル基、テトラデセニル基、ペンタデセニル基、ヘキサデセニル基、ヘプタデセニル基、オクタデセニル基、ノナデセニル基、イコセニル基、ヘニコセニル基、ドコセニル基、デカジエニル基、トリデカジエニル基、テトラデカジエニル基、ペンタデカジエニル基、ヘキサデカジエニル基、ヘプタデカジエニル基、オクタデカジエニル基、ノナデカジエニル基、イコサジエニル基、ヘニコサジエニル基、ドコサジエニル基、オクタデカトリエニル基、イコサトリエニル基、イコサテトラエニル基、イコサペンタエニル基、ドコサヘキサエニル基、イソステアリル基などが含まれる。１２～２２個の炭素原子を有する脂肪族炭化水素基は、好ましくはトリデシル基、テトラデシル基、ヘプタデシル基、オクタデシル基、ヘプタデカジエニル基またはオクタデカジエニル基、特に好ましくはトリデシル基、ヘプタデシル基またはヘプタデカジエニル基である。

【０６６８】
一実施形態では、脂肪酸、脂肪族アルコール、または脂肪族アミンに由来する１２～２２個の炭素原子を有する脂肪族炭化水素基が使用される。$R^{3a}$（または$R^{3b}$）が脂肪酸に由来する場合、$Y^{a}$（または$Y^{b}$）は、エステル結合またはアミド結合であり、脂肪酸由来カルボニル炭素は、$Y^{a}$（または$Y^{b}$）に含まれる。例えば、リノール酸が使用される場合、$R^{3a}$（または$R^{3b}$）は、ヘプタデカジエニル基である。

【０６６９】
$R^{3a}$は、$R^{3b}$と同じまたは異なり得、$R^{3a}$は好ましくは、$R^{3b}$と同じ基である。

【０６７０】
一実施形態では、$X^{a}$は、$X^{b}$と同じであり、$n^{a}$は、$n^{b}$と同じであり、$R^{1a}$は、$R^{1b}$と同じであり、$R^{2a}$は、$R^{2b}$と同じであり、$R^{3a}$は、$R^{3b}$と同じであり、$Y^{a}$は、$Y^{b}$と同じである。

【０６７１】
一実施形態では、
$X^{a}$及び$X^{b}$は、各々、独立して、$X^{1}$であり、
$R^{4}$は、１～３個の炭素原子を有するアルキル基であり、$n^{a}$及び$n^{b}$は、各々、１であり、
$R^{1a}$及び$R^{1b}$は、各々、独立して、１～６個の炭素原子を有するアルキレン基であり、
$R^{2a}$及び$R^{2b}$は、各々、独立して、１～６個の炭素原子を有するアルキレン基であり、
$Y^{a}$及び$Y^{b}$は、各々、エステル結合またはアミド結合であり、
$R^{3a}$及び$R^{3b}$は、各々、独立して、１２～２２個の炭素原子を有する脂肪族炭化水素基である。

【０６７２】
一実施形態では、
$X^{a}$及び$X^{b}$は、各々、$X^{1}$であり、
$R^{4}$は、１～３個の炭素原子を有するアルキル基であり、$n^{a}$及び$n^{b}$は、各々、１で

あり、
$R^{1a}$及び$R^{1b}$は、各々、１～６個の炭素原子を有するアルキレン基であり、
$R^{2a}$及び$R^{2b}$は、各々、１～６個の炭素原子を有するアルキレン基であり、
$Y^a$及び$Y^b$は、各々、エステル結合またはアミド結合であり、
$R^{3a}$及び$R^{3b}$は、各々、１２～２２個の炭素原子を有する脂肪族炭化水素基であり、
$X^a$は、$X^b$と同じであり、
$R^{1a}$は、$R^{1b}$と同じであり、
$R^{2a}$は、$R^{2b}$と同じであり、
$R^{3a}$は、$R^{3b}$と同じである。

【０６７３】
一実施形態では、
$X^a$及び$X^b$は、各々、$X^1$であり、
$R^4$は、メチル基であり、$n^a$及び$n^b$は、各々、１であり、
$R^{1a}$及び$R^{1b}$は、各々、エチレン基であり、
$R^{2a}$及び$R^{2b}$は、各々、トリメチレン基であり、
$Y^a$及び$Y^b$は、各々、－ＣＯ－Ｏ－であり、
$R^{3a}$及び$R^{3b}$は、各々、独立して、１３～１７個の炭素原子を有するアルキル基またはアルケニル基である。

【０６７４】
一実施形態では、
$X^a$及び$X^b$は、各々、$X^1$であり、
$R^4$は、メチル基であり、$n^a$及び$n^b$は、各々、１であり、
$R^{1a}$及び$R^{1b}$は、各々、エチレン基であり、
$R^{2a}$及び$R^{2b}$は、各々、トリメチレン基であり、
$Y^a$及び$Y^b$は、各々、－ＣＯ－Ｏ－であり、
$R^{3a}$及び$R^{3b}$は、各々、１３～１７個の炭素原子を有するアルキル基またはアルケニル基であり、
$R^{3a}$は、$R^{3b}$と同じである。

【０６７５】
一実施形態では、
$X^a$及び$X^b$は、各々、独立して、$X^1$であり、
$R^4$は、１～３個の炭素原子を有するアルキル基であり、$n^a$及び$n^b$は、各々、１であり、
$R^{1a}$及び$R^{1b}$は、各々、独立して、１～６個の炭素原子を有するアルキレン基であり、
$R^{2a}$及び$R^{2b}$は、各々、独立して、１～６個の炭素原子を有するアルキレン基であり、
$Y^a$及び$Y^b$は、各々、エステル結合またはアミド結合であり、
$R^{3a}$及び$R^{3b}$は、各々、独立して、脂溶性ビタミン残基（例えば、レチノイン酸残基、トコフェロール残基）である。

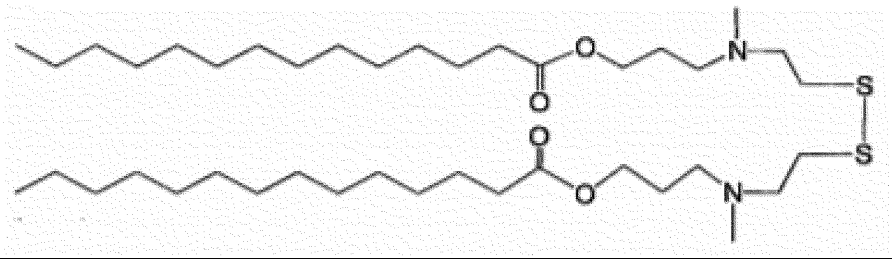
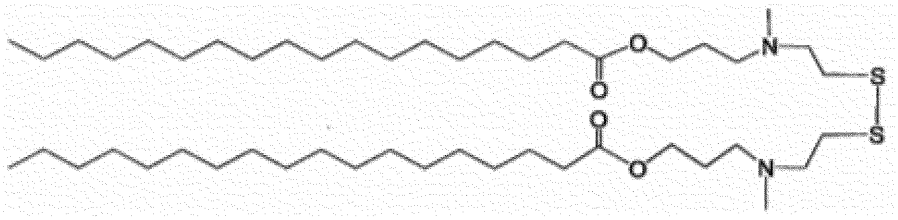
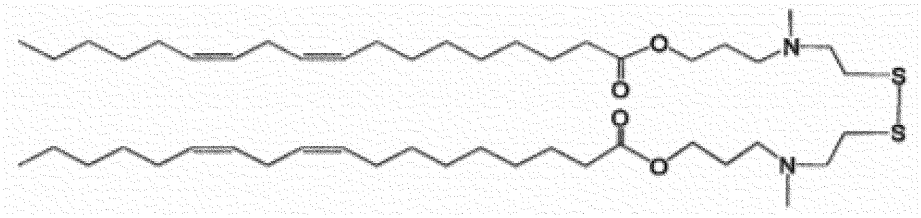
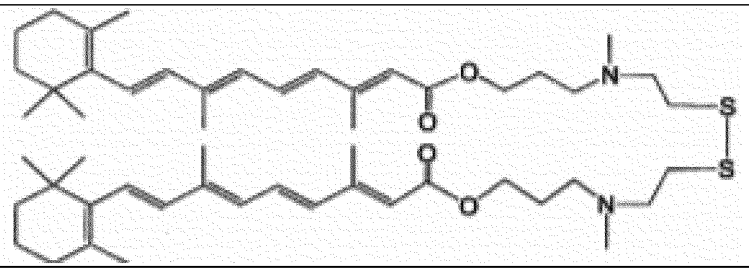
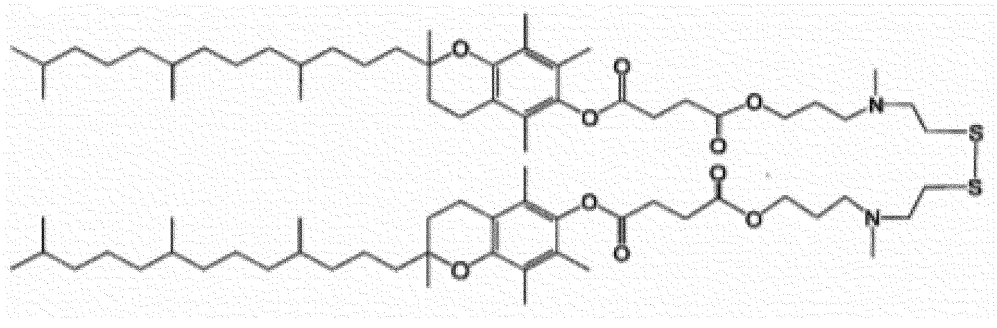
【０６７６】
一実施形態では、
$X^a$及び$X^b$は、各々、$X^1$であり、
$R^4$は、１～３個の炭素原子を有するアルキル基であり、$n^a$及び$n^b$は、各々、１であり、
$R^{1a}$及び$R^{1b}$は、各々、１～６個の炭素原子を有するアルキレン基であり、
$R^{2a}$及び$R^{2b}$は、各々、１～６個の炭素原子を有するアルキレン基であり、
$Y^a$及び$Y^b$は、各々、エステル結合またはアミド結合であり、
$R^{3a}$及び$R^{3b}$は、各々、脂溶性ビタミン残基（例えば、レチノイン酸残基、トコフ

ェロール残基）であり、
$X^a$は、$X^b$と同じであり、
$R^{1a}$は、$R^{1b}$と同じであり、
$R^{2a}$は、$R^{2b}$と同じであり、
$R^{3a}$は、$R^{3b}$と同じである。
【０６７７】
一実施形態では、
$X^a$及び$X^b$は、各々、$X^1$であり、
$R^4$は、メチル基であり、$n^a$及び$n^b$は、各々、１であり、
$R^{1a}$及び$R^{1b}$は、各々、エチレン基であり、
$R^{2a}$及び$R^{2b}$は、各々、トリメチレン基であり、
$Y^a$及び$Y^b$は、各々、－ＣＯ－Ｏ－であり、
$R^{3a}$及び$R^{3b}$は、各々、独立して、脂溶性ビタミン残基（例えば、レチノイン酸残基、トコフェロール残基）である。
【０６７８】
一実施形態では、
$X^a$及び$X^b$は、各々、$X^1$であり、
$R^4$は、メチル基であり、$n^a$及び$n^b$は、各々、１であり、
$R^{1a}$及び$R^{1b}$は、各々、エチレン基であり、
$R^{2a}$及び$R^{2b}$は、各々、トリメチレン基であり、
$Y^a$及び$Y^b$は、各々、－ＣＯ－Ｏ－であり、
$R^{3a}$及び$R^{3b}$は、各々、脂溶性ビタミン残基（例えば、レチノイン酸残基、トコフェロール残基）であり、
$R^{3a}$は、$R^{3b}$と同じである。
【０６７９】
一実施形態では、
$X^a$及び$X^b$は、各々、独立して、$X^2$であり、
ｔは、２であり、
$R^{1a}$及び$R^{1b}$は、各々、独立して、１～６個の炭素原子を有するアルキレン基であり、
$R^{2a}$及び$R^{2b}$は、各々、独立して、１～６個の炭素原子を有するアルキレン基であり、
$Y^a$及び$Y^b$は、各々、エステル結合であり、
$R^{3a}$及び$R^{3b}$は、各々、独立して、脂溶性ビタミン残基（例えば、レチノイン酸残基、トコフェロール残基）または１２～２２個の炭素原子を有する脂肪族炭化水素基（例えば、１２～２２個の炭素原子を有するアルキル基）である。
【０６８０】
一実施形態では、
$X^a$及び$X^b$は、各々、独立して、$X^2$であり、
ｔは、２であり、
$R^{1a}$及び$R^{1b}$は、各々、独立して、１～６個の炭素原子を有するアルキレン基であり、
$R^{2a}$及び$R^{2b}$は、各々、独立して、１～６個の炭素原子を有するアルキレン基であり、
$Y^a$及び$Y^b$は、各々、エステル結合であり、
$R^{3a}$及び$R^{3b}$は、各々、独立して、脂溶性ビタミン残基（例えば、レチノイン酸残基、トコフェロール残基）または１２～２２個の炭素原子を有する脂肪族炭化水素基（例えば、１２～２２個の炭素原子を有するアルキル基）であり、
$X^a$は、$X^b$と同じであり、
$R^{1a}$は、$R^{1b}$と同じであり、

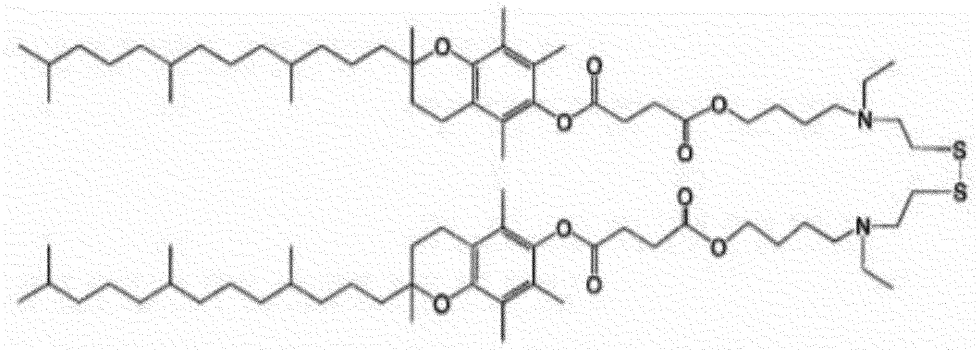
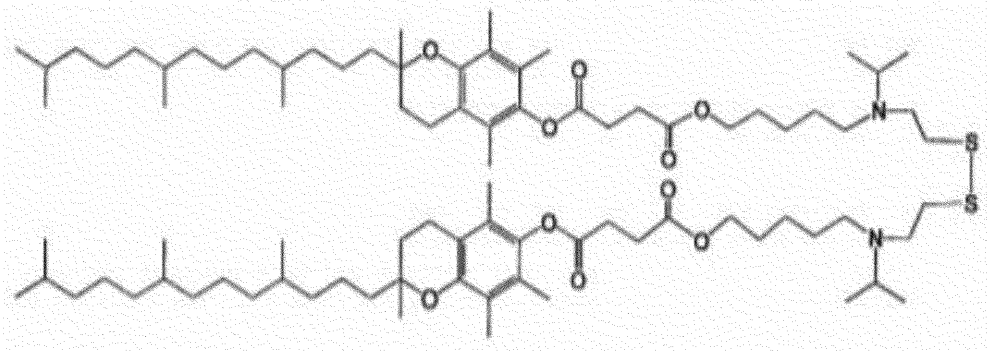
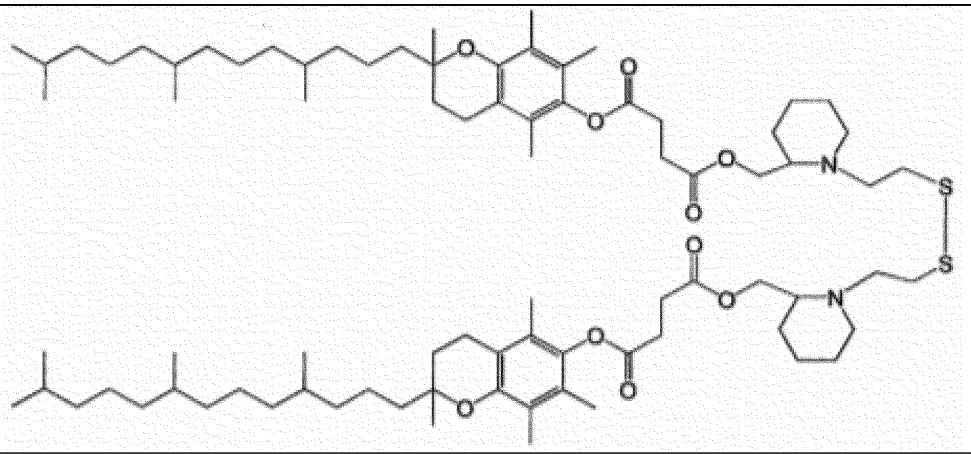
$R^{2a}$は、$R^{2b}$と同じであり、
$R^{3a}$は、$R^{3b}$と同じである。
【０６８１】
一実施形態では、
$X^a$及び$X^b$は、各々、独立して、$X^2$であり、
ｔは、２であり、
$R^{1a}$及び$R^{1b}$は、各々、エチレン基であり、
$R^{2a}$及び$R^{2b}$は、各々、独立して、１～６個の炭素原子を有するアルキレン基であり、
$Y^a$及び$Y^b$は、各々、エステル結合であり、
$R^{3a}$及び$R^{3b}$は、各々、独立して、脂溶性ビタミン残基（例えば、レチノイン酸残基、トコフェロール残基）または１２～２２個の炭素原子を有する脂肪族炭化水素基（例えば、１２～２２個の炭素原子を有するアルキル基）であり、
$X^a$は、$X^b$と同じであり、
$R^{2a}$は、$R^{2b}$と同じであり、
$R^{3a}$は、$R^{3b}$と同じである。
【０６８２】
いくつかの実施形態では、イオン化可能脂質は、以下の表１５ｂに示される構造のうちの１つを有する。

【表１５ｂ－１】

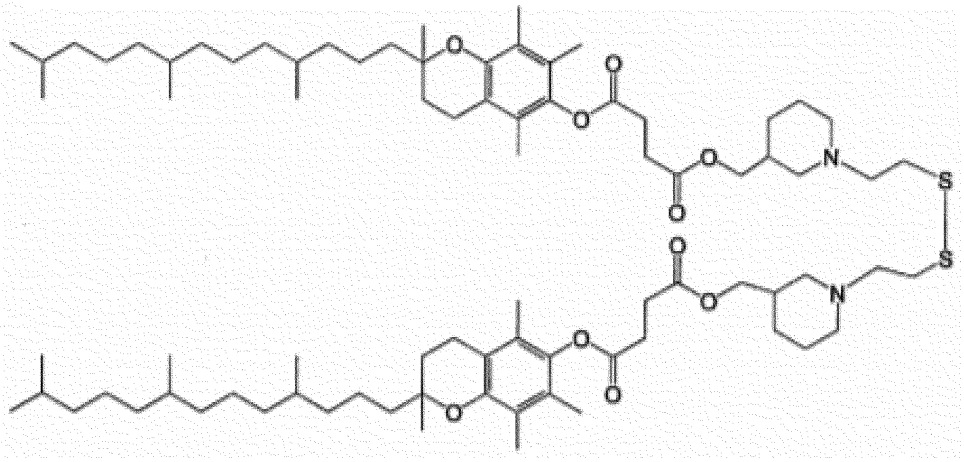
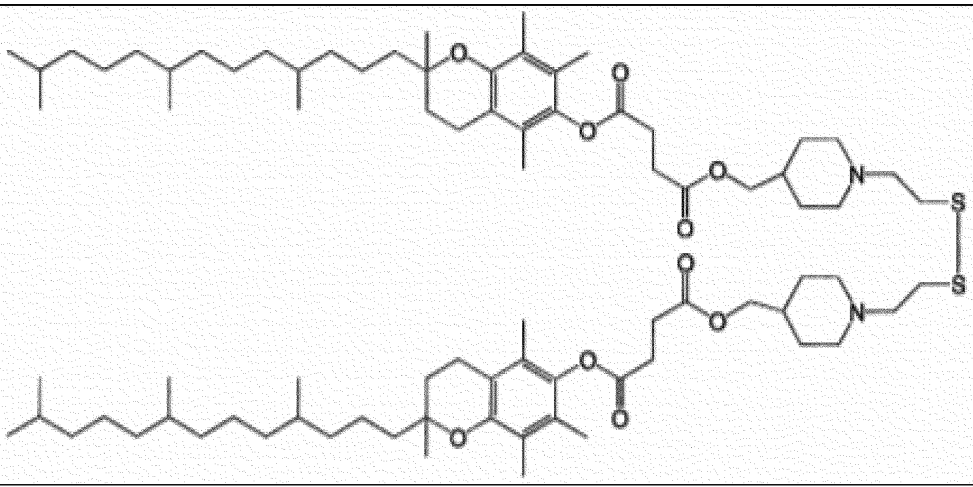
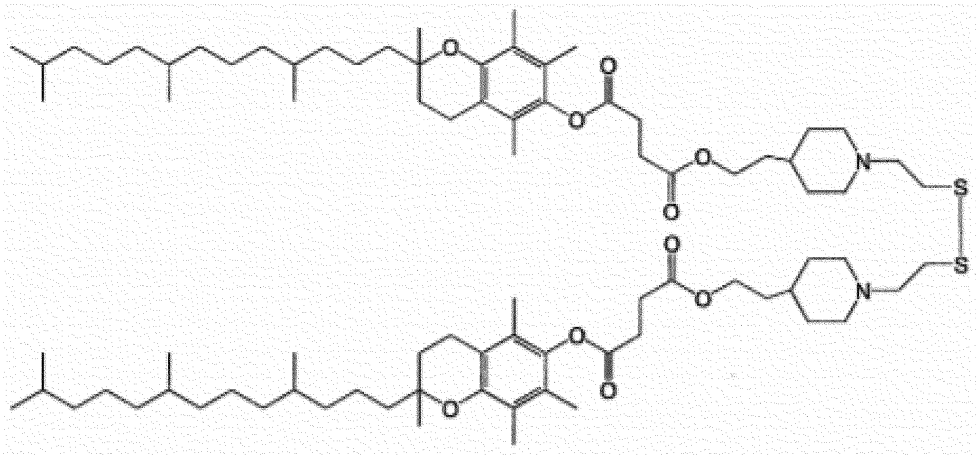
表１５ｂ

| 番号 | 構造 |
|---|---|
| 1 |  |
| 2 |  |
| 3 |  |
| 4 |  |
| 5 |  |

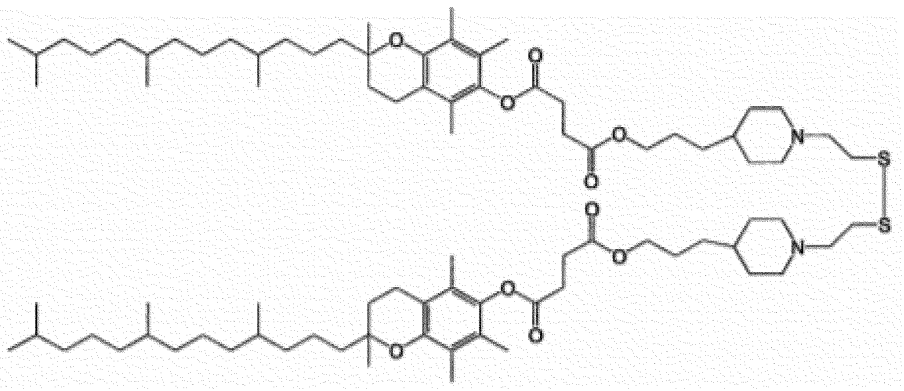
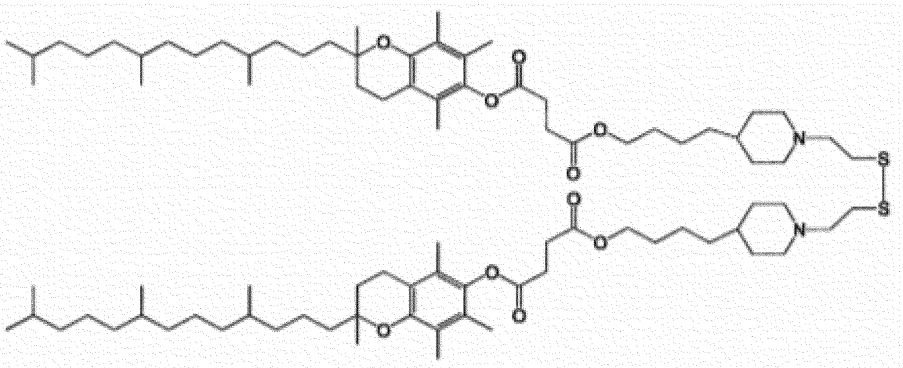
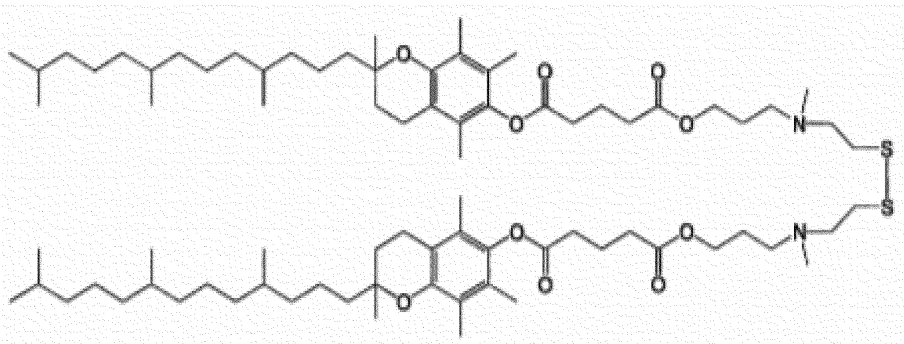
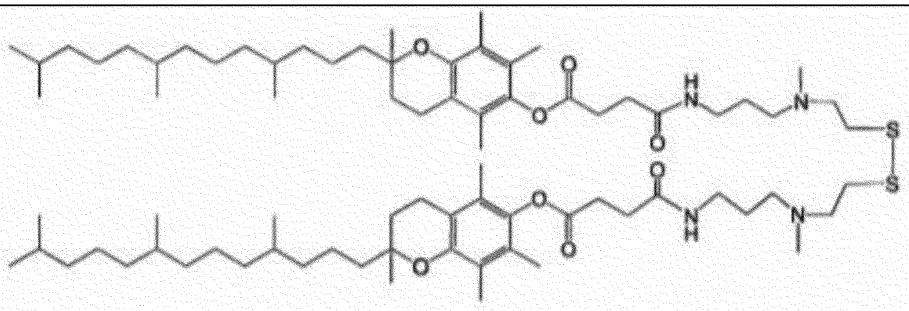
【表１５ｂ－２】

| | |
|---|---|
| 6 |  |
| 7 |  |
| 8 |  |

【表１５ｂ－３】

| | |
|---|---|
| 9 |  |
| 10 |  |
| 11 |  |

【表１５ｂ－４】

| | |
|---|---|
| 12 |  |
| 13 |  |
| 14 |  |
| 15 |  |

【０６８３】
本発明の脂質は、－Ｓ－Ｓ－（ジスルフィド）結合を有し得る。かかる化合物の生成方法には、例えば、
$R^{3a}-(Y^{a}-R^{2a})_{n^{a}}-X^{a}-R^{1a}-SH$、及び
$R^{3b}-(Y^{b}-R^{2b})_{n^{b}}-X^{b}-R^{1b}-SH$、
を生成すること、及びそれらを酸化（カップリング）に供して－Ｓ－Ｓ－を含有する化合物を得ることを含む方法、－Ｓ－Ｓ－を含有する化合物に必要な部分を順次結合させて最終的に本発明の化合物を得ることを含む方法などが含まれる。後者の方法が好ましい。
【０６８４】

後者の方法の具体的な例が以下に示されているが、これは限定として解釈されるべきではない。

【０６８５】

出発化合物の例には、－Ｓ－Ｓ－結合を含有する２末端カルボン酸、２末端カルボキシレート、２末端アミン、２末端イソシアネート、２末端アルコール、ＭｓＯ（メシレート基）などの脱離基を有する２末端アルコール、ｐＮＰ（ｐ－ニトロフェニルカルボネート基）などの脱離基を有する２末端カルボネートなどが含まれる。

【０６８６】

例えば、$X^a$及び$X^b$について$X^1$または$X^2$を含有する化合物を生成する場合、－Ｓ－Ｓ－結合を含有する化合物（１）の２つの末端官能基を、末端に－ＮＨ－基及び１つの官能基を有する化合物（２）における－ＮＨ－基と反応させ、反応に寄与しなかった化合物（２）における末端の官能基を、$R^3$を含有する化合物（３）における官能基と反応させ、それにより、－Ｓ－Ｓ－結合、$R^{1a}$及び$R^{1b}$、$X^a$及び$X^b$、$R^{2a}$及び$R^{2b}$、$Y^a$及び$Y^b$、ならびに$R^{3a}$及び$R^{3b}$を含有する本発明の化合物が得られ得る。

【０６８７】

化合物（１）及び化合物（２）の反応において、炭酸カリウム、炭酸ナトリウム、カリウムｔ－ブトキシドなどのアルカリ触媒が触媒として使用され得、または反応は、触媒を用いずに実施され得る。好ましくは、炭酸カリウムまたは炭酸ナトリウムが触媒として使用される。

【０６８８】

触媒の量は、化合物（１）に対して、０．１～１００モル当量、好ましくは、０．１～２０モル当量、より好ましくは０．１～５モル当量である。導入される化合物（２）の量は、化合物（１）に対して、１～５０モル当量、好ましくは１～１０モル当量である。

【０６８９】

化合物（１）及び化合物（２）の反応のために使用される溶媒は、それが反応を阻害しない溶媒または水溶液である限り特に限定されない。例えば、酢酸エチル、ジクロロメタン、クロロホルム、ベンゼン、トルエンなどが挙げられ得る。これらのうち、トルエン及びクロロホルムが好ましい。

【０６９０】

反応温度は、－２０～２００℃、好ましくは０～８０℃、より好ましくは２０～５０℃であり、反応時間は、１～４８時間、好ましくは２～２４時間である。

【０６９１】

化合物（１）及び化合物（２）の反応生成物を化合物（３）と反応させる場合、アルカリ触媒、例えば、炭酸カリウム、炭酸ナトリウム、カリウムｔ－ブトキシドなど、または酸触媒、例えば、ＰＴＳ（ｐ－トルエンスルホン酸）、ＭＳＡ（メタンスルホン酸）などが、化合物（１）及び化合物（２）の反応のために使用される触媒のように使用され得、または反応は、触媒を用いずに実施され得る。

【０６９２】

加えて、化合物（１）及び化合物（２）の反応生成物は、縮合剤、例えば、ＤＣＣ（ジシクロヘキシルカルボジイミド）、ＤＩＣ（ジイソプロピルカルボジイミド）、ＥＤＣ（１－エチル－３－（３－ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド塩酸塩）などを使用することによって化合物（３）と直接的に反応させられ得る。代替的に、化合物（３）は、縮合剤で処置されて無水物などに一旦変換され得、その後、それを化合物（１）及び化合物（２）の反応生成物と反応させる。

【０６９３】

導入される化合物（３）の量は、化合物（１）及び化合物（２）の反応生成物に対して、１～５０モル当量、好ましくは１～１０モル当量である。

【０６９４】

使用される触媒は、反応させる官能基に応じて適切に選択される。

【０６９５】

触媒の量は、化合物（１）に対して、０．０５～１００モル当量、好ましくは０．１～２０モル当量、より好ましくは０．２～５モル当量である。

【０６９６】

化合物（１）及び化合物（２）の反応生成物と化合物（３）との反応に使用される溶媒は、それが反応を阻害しない溶媒または水溶液である限り特に限定されない。例えば、酢酸エチル、ジクロロメタン、クロロホルム、ベンゼン、トルエンなどが挙げられ得る。これらのうち、トルエン及びクロロホルムが好ましい。

【０６９７】

反応温度は、０～２００℃、好ましくは０～１２０℃、より好ましくは２０～５０℃であり、反応時間は、１時間～４８時間、好ましくは２～２４時間である。

【０６９８】

上記反応によって得られる反応生成物は、一般的な精製方法、例えば、水での洗浄、シリカゲルカラムクロマトグラフィー、結晶化、再結晶化、液－液抽出、再沈殿、イオン交換カラムクロマトグラフィーなどによって適切に精製され得る。

【０６９９】

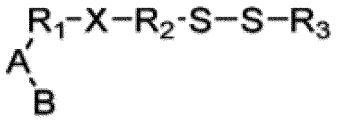
ｃ．構造ＸＸＩＩＩ脂質

いくつかの実施形態では、イオン化可能脂質は、米国特許第９，７６５，０２２号に記載されている。

【０７００】

本発明は、構造（ＸＸＩＩＩ）によって表される化合物を提供する：

【化１１６】

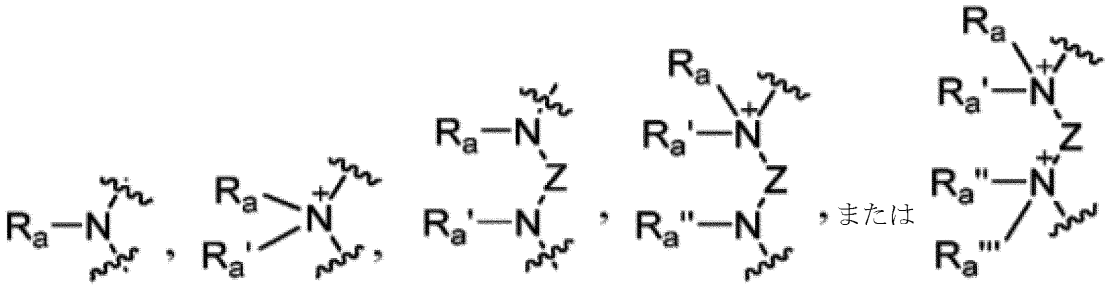


。

【０７０１】

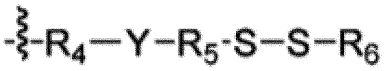
構造ＸＸＩＩＩにおいて、親水性及び任意で正に荷電した頭部は、以下であり、

【化１１７】



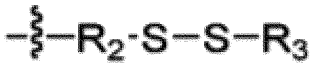
式中、Ｒａ、Ｒａ’、Ｒａ’’、及びＲ’’’の各々は、独立して、Ｈ、Ｃ１－Ｃ２０一価脂肪族ラジカル、Ｃ１－Ｃ２０一価ヘテロ脂肪族ラジカル、一価アリールラジカル、または一価ヘテロアリールラジカルであり、Ｚは、Ｃ１－Ｃ２０二価脂肪族ラジカル、Ｃ１－Ｃ２０二価ヘテロ脂肪族ラジカル、二価アリールラジカル、または二価ヘテロアリールラジカルであり；Ｂは、Ｃ１－Ｃ２４一価脂肪族ラジカル、Ｃ１－Ｃ２４一価ヘテロ脂肪族ラジカル、一価アリールラジカル、一価ヘテロアリールラジカル、または

【化１１８】



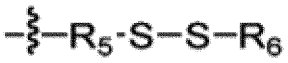
であり、$R_1$及び$R_4$の各々は、独立して、結合、$C_1-C_{10}$二価脂肪族ラジカル、$C_1-C_{10}$二価ヘテロ脂肪族ラジカル、二価アリールラジカル、または二価ヘテロアリールラジカルであり；$R_2$及び$R_5$の各々は、独立して、結合、$C_1-C_{20}$二価脂肪族ラジカル、$C_1-C_{20}$二価ヘテロ脂肪族ラジカル、二価アリールラジカル、または二価ヘテロアリールラジカルであり；$R_3$及び$R_6$の各々は、独立して、$C_1-C_{20}$一価脂肪族ラジカル、$C_1-C_{20}$一価ヘテロ脂肪族ラジカル、一価アリールラジカル、または一価ヘテロアリールラジカルであり、

【化１１９】



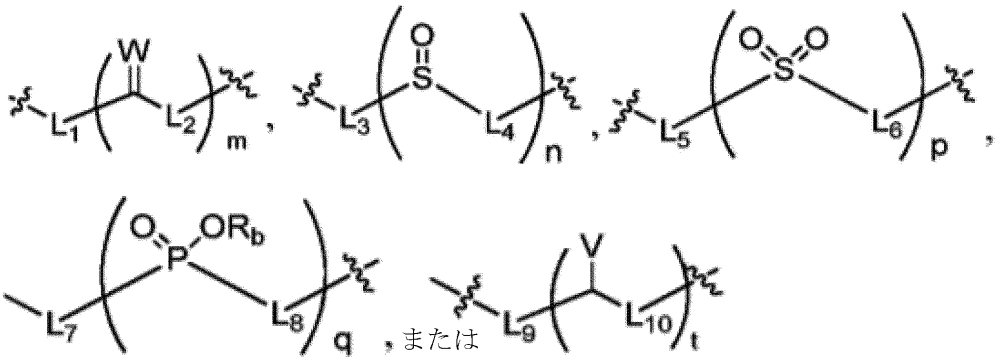
の疎水性尾部、さらに

【化１２０】



疎水性尾部の各々は、８～２４個の炭素原子を有し、Ｘ、リンカー、さらにＹ、リンカーの各々は、独立して、以下であり、

【化１２１】

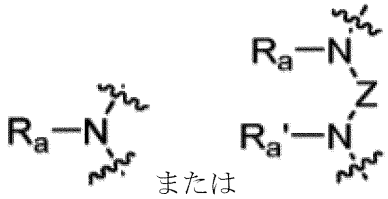


式中、ｍ、ｎ、ｐ、ｑ、及びｔの各々は、独立して、１～６であり、Ｗは、Ｏ、Ｓ、または$NR_c$であり、$R_1$、$R_2$、$R_4$、または$R_5$に直接的に連結されている$L_1$、$L_3$、$L_5$、$L_7$、及び$L_9$の各々は、独立して、結合、Ｏ、Ｓ、または$NR_d$であり、$L_2$、$L_4$、$L_6$、$L_8$、及び$L_{10}$の各々は、独立して、結合、Ｏ、Ｓ、または$NR_e$であり、Ｖは、$OR_f$、$SR_g$、または$NR_hR_i$であり、$R_b$、$R_c$、$R_d$、$R_e$、$R_f$、$R_g$、$R_h$、及び$R_i$の各々は、独立して、Ｈ、ＯＨ、$C_1-_{10}$オキシ脂肪族ラジカル、$C_1-C_{10}$一価脂肪族ラジカル、$C_1-C_{10}$一価ヘテロ脂肪族ラジカル、一価アリールラジカル、または一価ヘテロアリールラジカルである。

【０７０２】

上記の脂質様化合物のサブセットには、Ａが

【化１２２】

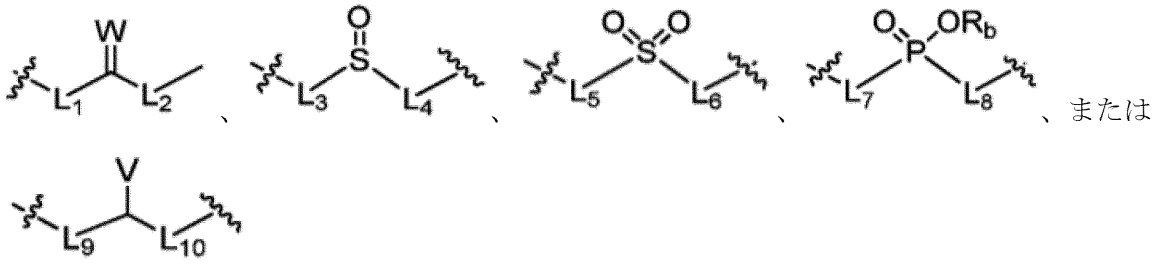

または

であるものが含まれ、$R_a$及び$R_a'$の各々が、独立して、$C_1-C_{10}$一価一価脂肪族ラジカル、$C_1-C_{10}$一価ヘテロ脂肪族ラジカル、一価アリールラジカル、または一価ヘテロアリールラジカルであり、Zが$C_1-C_{10}$二価脂肪族ラジカル、$C_1-C_{10}$二価ヘテロ脂肪族ラジカル、二価アリールラジカル、または二価ヘテロアリールラジカルであるものが含まれる。

【０７０３】

本発明のいくつかの脂質様化合物は、$R_1$及び$R_4$の各々が、独立して、$C_1-C_6$（例えば、$C_1-C_4$）二価脂肪族ラジカルまたは$C_1-C_6$（例えば、$C_1-C_4$）二価ヘテロ脂肪族ラジカルであり、$R_2$及び$R_3$の総炭素数が、１２～２０（例えば、１４～１８）であり、$R_5$及び$R_6$の総炭素数が、１２～２０（例えば、１４～１８）であり、X及びYの各々が、独立して、

【化１２３】

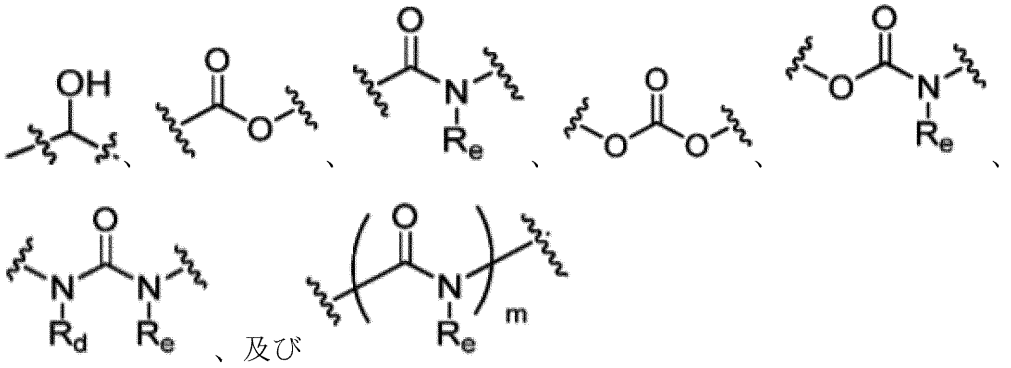

、または

である。

【０７０４】

X及びYの具体例には、

【化１２４】


、及び

が含まれ、mは２～６である。

【０７０５】

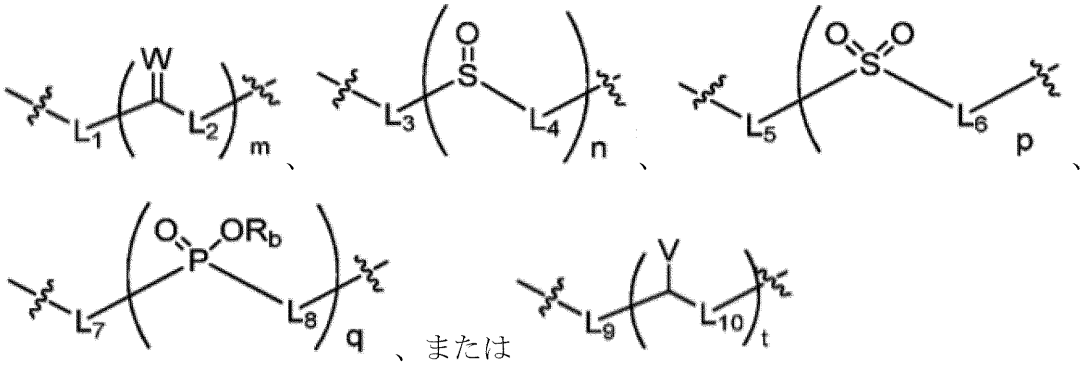
本発明の範囲内には、タンパク質及び生体内還元性化合物から形成されるナノコンプレックスを含有する薬学的組成物がさらに含まれる。この薬学的組成物において、ナノコンプレックスは、５０～５００ｎｍの粒子サイズを有し；生体内還元性化合物は、ジスルフィド疎水性部位、親水性部位、及びジスルフィド疎水性部位及び親水性部位を連結するリ

ンカーを含有し；タンパク質は、非共有結合性相互作用、共有結合、またはその両方を介して生体内還元性化合物に結合する。

【０７０６】

特定の実施形態では、ジスルフィド疎水性部位は、１つ以上の－Ｓ－Ｓ－基及び８～２４個の炭素原子を含有するヘテロ脂肪族ラジカルであり；親水性部位は、１つ以上の親水性基及び１～２０個の炭素原子を含有する脂肪族またはヘテロ脂肪族ラジカルであり、親水性基の各々は、アミノ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、トリアルキルアミノ、テトラアルキルアンモニウム、ヒドロキシアミノ、ヒドロキシル、カルボキシル、カルボキシレート、カルバメート、カルバミド、カルボネート、ホスフェート、ホスファイト、スルフェート、スルファイト、またはチオスルフェートであり；リンカーは、Ｏ、Ｓ、Ｓｉ、$C_1$－$C_6$アルキレン、

【化１２５】



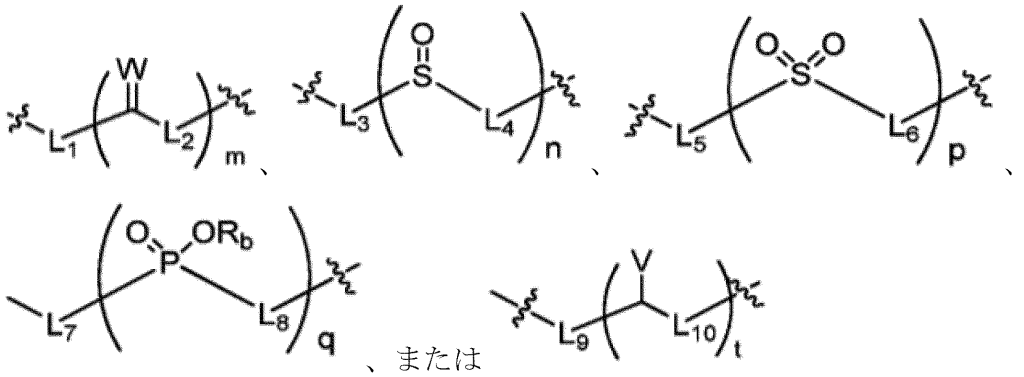

、または

であり、変数は上記で定義される。

【０７０７】

Ｘ及びＹの具体的な例には、Ｏ、Ｓ、Ｓｉ、$C_1$－$C_6$アルキレン、

【化１２６】




、または

が含まれる。

【０７０８】

いくつかの実施形態では、上の構造ＸＸＩＩＩで示される本発明の脂質様化合物は、（ｉ）親水性頭部であるＡ；（ｉｉ）疎水性尾部である$R_2$－Ｓ－Ｓ－$R_3$；及び（ｉｉｉ）リンカーであるＸを含む。任意で、これらの化合物は、第２の疎水性尾部である$R_5$－Ｓ－Ｓ－$R_6$及び第２のリンカーであるＹを含む。

【０７０９】

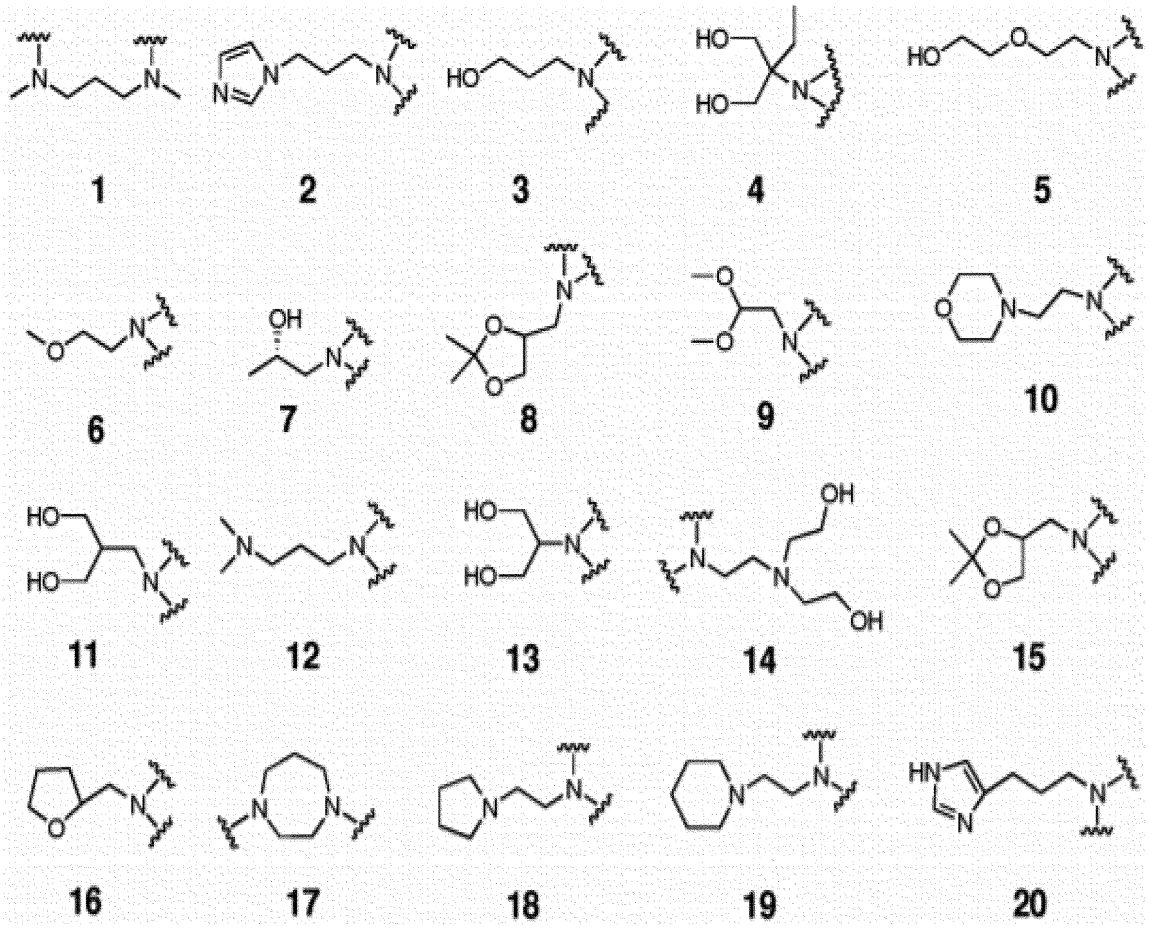
構造ＸＸＩＩＩの親水性頭部は、１つ以上の親水性官能基、例えば、ヒドロキシル、カルボニル、カルボキシル、アミノ、スルフヒドリル、ホスフェート、アミド、エステル、

エーテル、カルバメート、カルボネート、カルバミド、及びホスホジエステルを含有する。これらの基は、水素結合を形成し得、任意で正または負に荷電している。

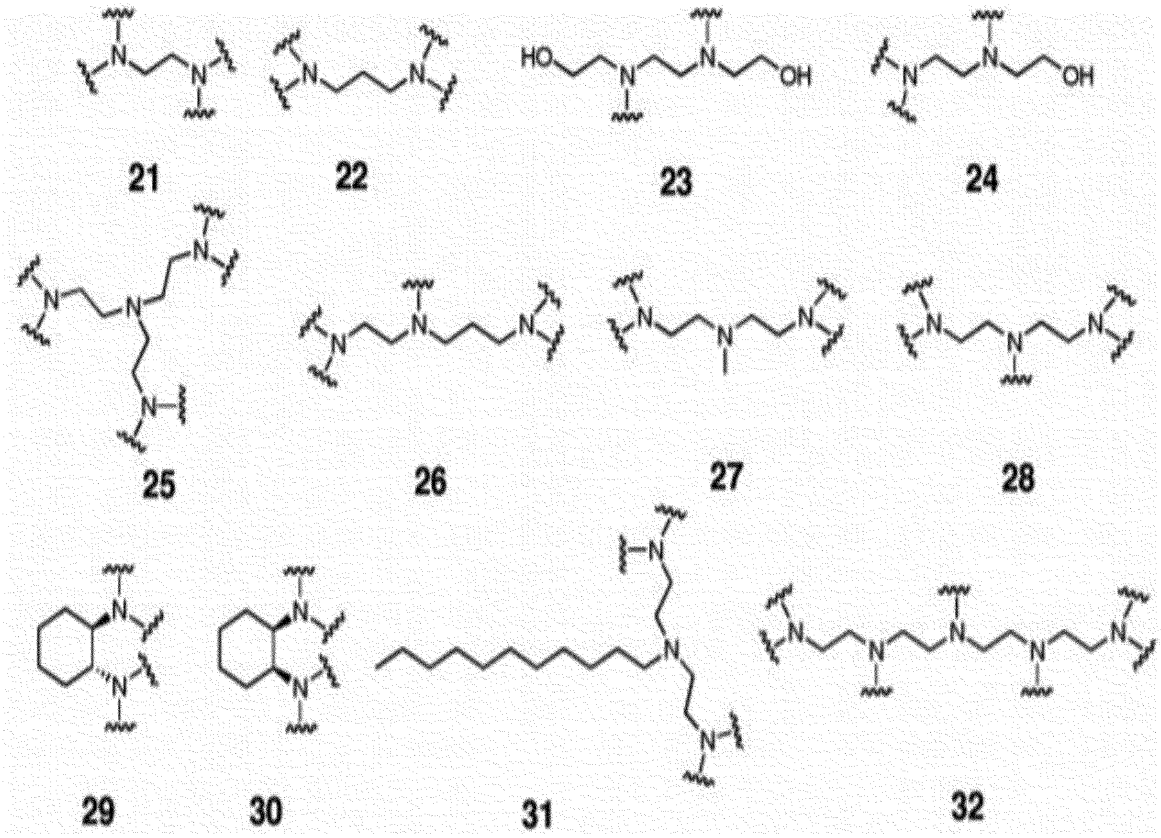
【０７１０】

親水性頭部の例には、以下が含まれる：

【化１２７－１】



【化１２７－２】

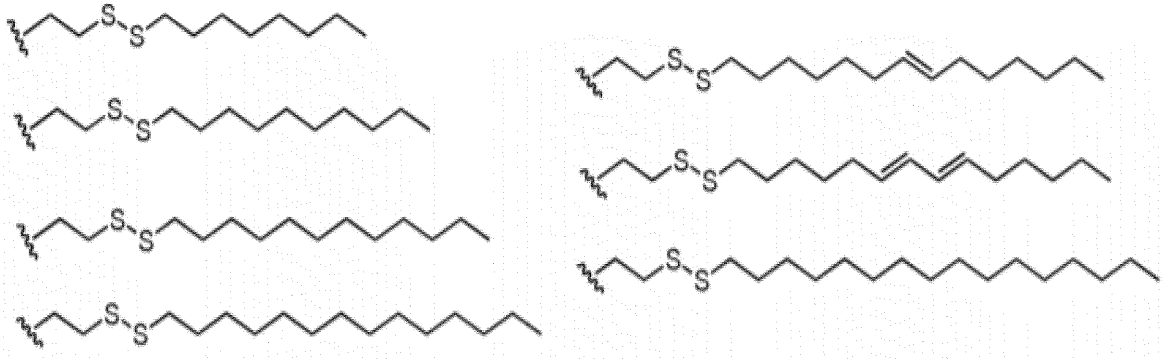



【０７１１】
他の例には、Ａｋｉｎｃ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，２６，５６１－６９（２００８）及びＭａｈｏｎ ｅｔ ａｌ．，米国特許出願公開第２０１１／０２９３７０３号に記載されているものが含まれる。

【０７１２】
構造ＸＸＩＩＩの疎水性尾部は、ジスルフィド結合及び８～２４個の炭素原子を含有する飽和または不飽和、直鎖状または分岐状、非環状または環状、芳香族または非芳香族炭化水素部位である。炭素原子の１つ以上は、Ｎ、Ｏ、Ｐ、Ｂ、Ｓ、Ｓｉ、Ｓｂ、Ａｌ、Ｓｎ、Ａｓ、Ｓｅ、及びＧｅなどのヘテロ原子で置換され得る。尾部は、上述した１つ以上の基で任意で置換される。このジスルフィド結合を含有する脂質様化合物は、生体内還元性であり得る。

【０７１３】
例には、以下が含まれる：

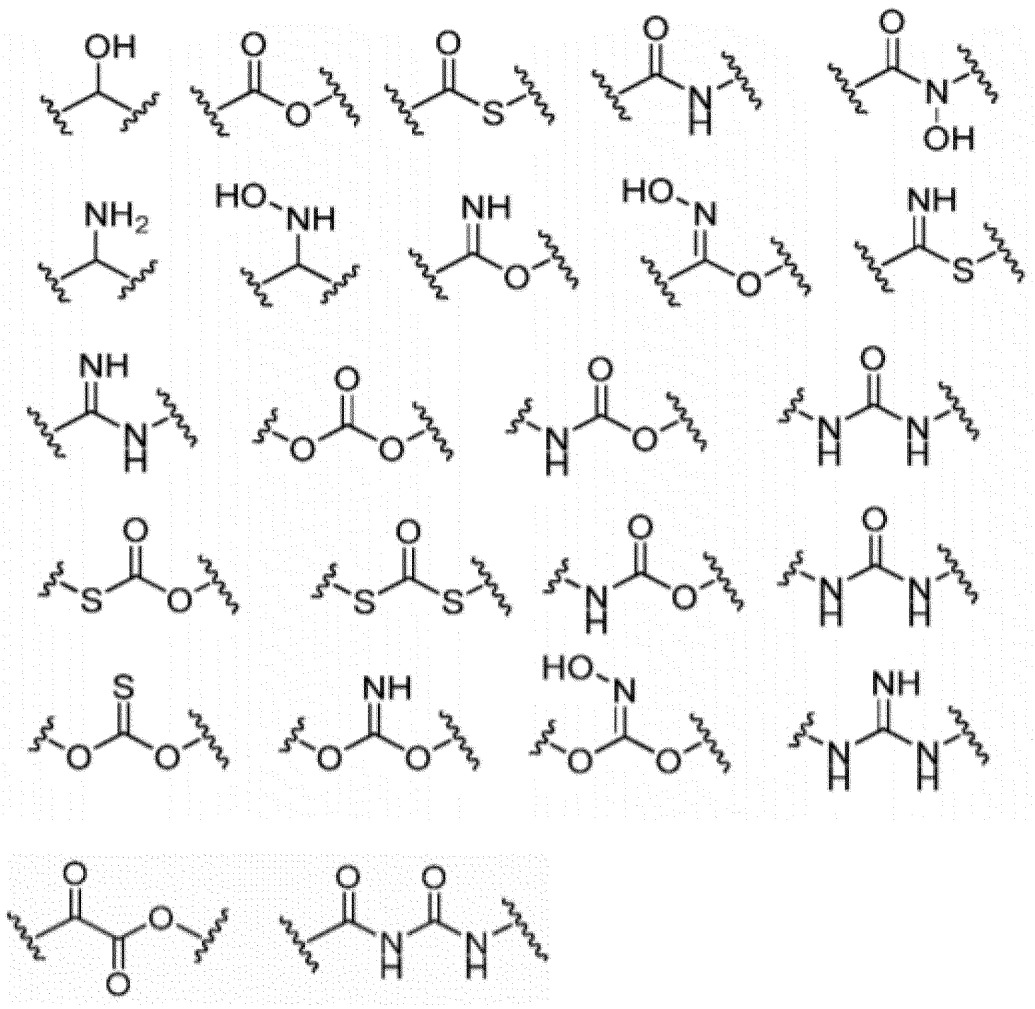
【化１２８】



【０７１４】

構造ＸＸＩＩＩのリンカーは、親水性頭部及び疎水性尾部を連結させる。リンカーは、親水性または疎水性、極性または非極性である任意の化学基、例えば、Ｏ、Ｓ、Ｓｉ、アミノ、アルキレン、エステル、アミド、カルバメート、カルバミド、カルボネート、ホスフェート、ホスファイト、スルフェート、スルファイト、及びチオスルフェートであり得る。例には、以下が含まれる：

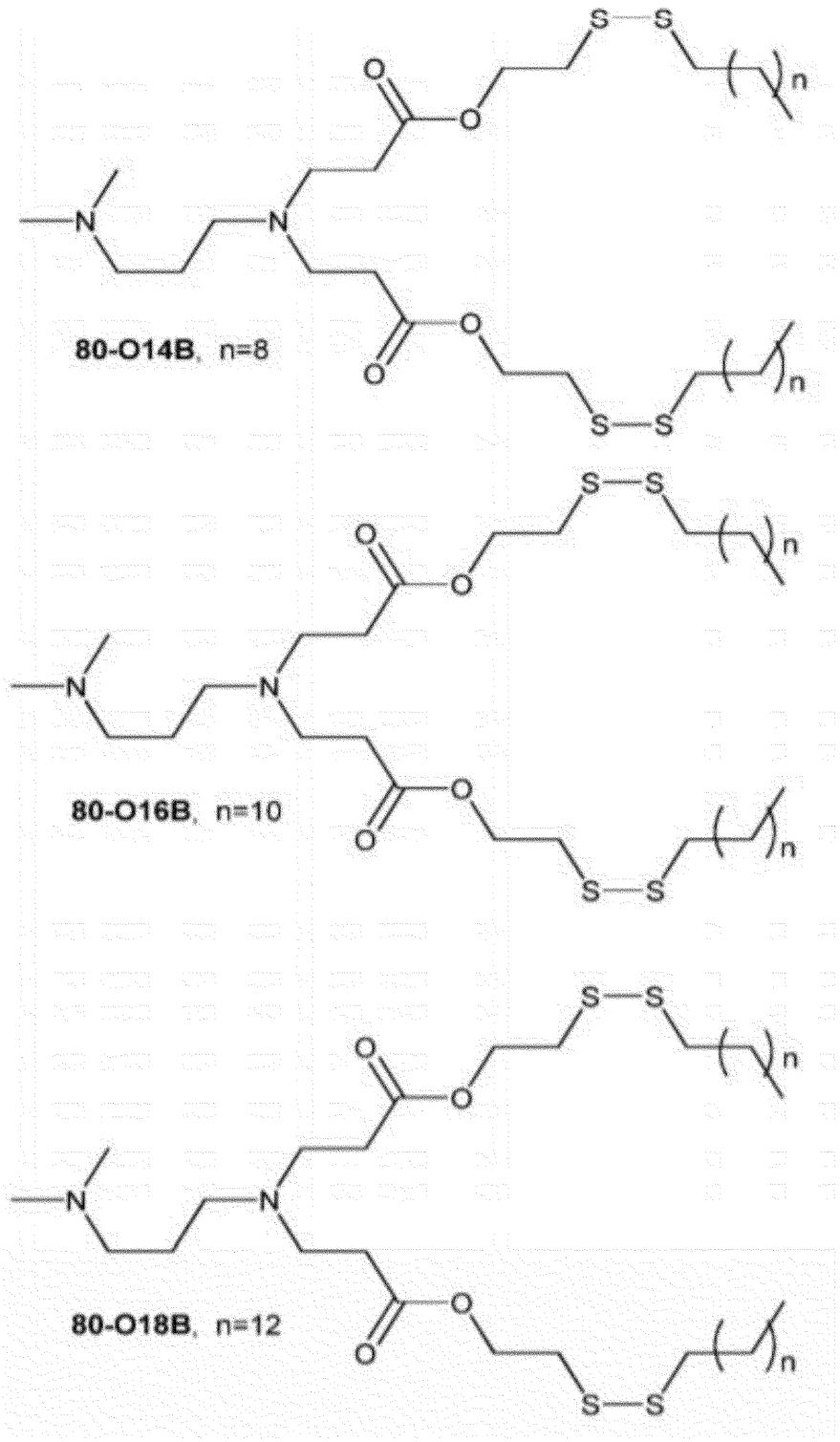
【化１２９】



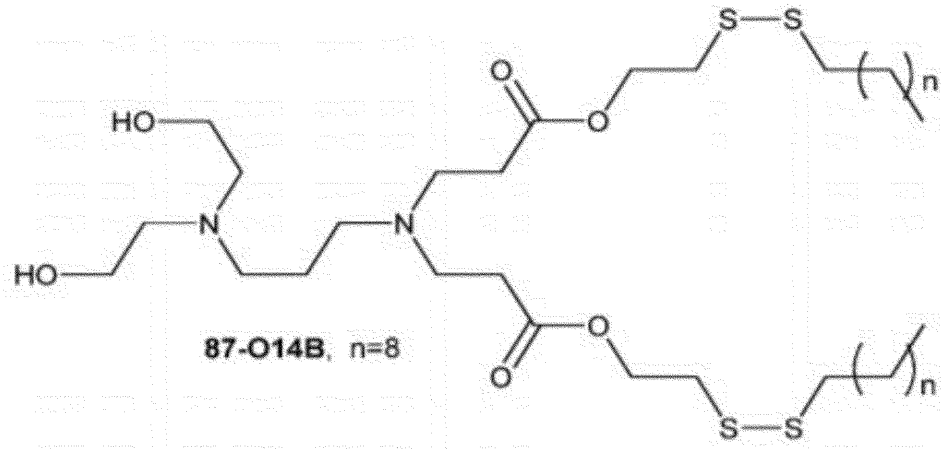
【０７１５】

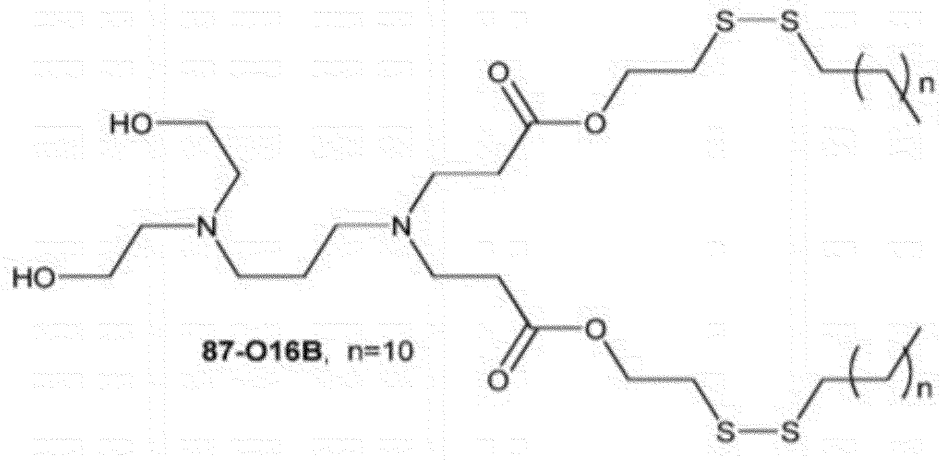
本発明の例示的な脂質様化合物が以下に示されている：

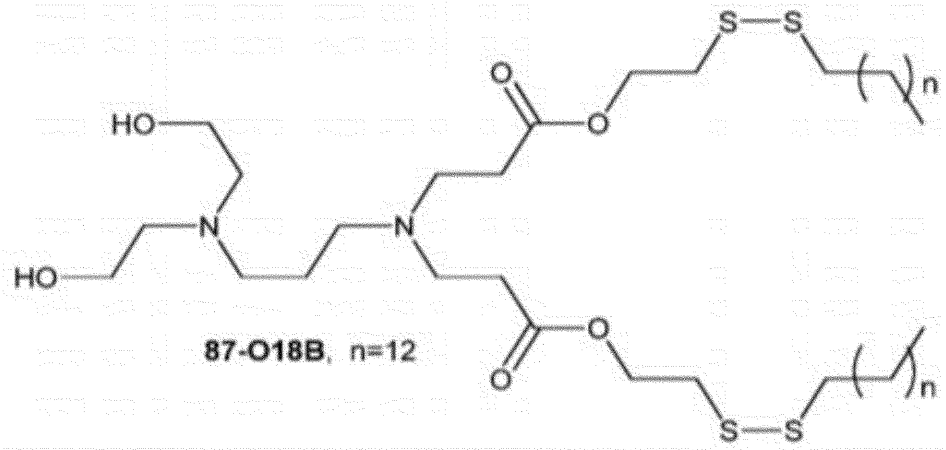
【化１３０－１】



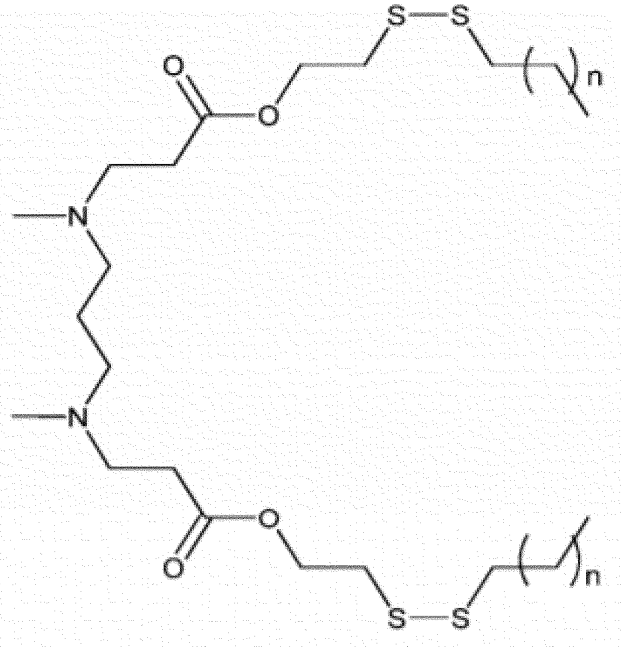
【化１３０－２】


HO
HO
N
N
O
O
O
O
S
S
n
87-O14B, n=8

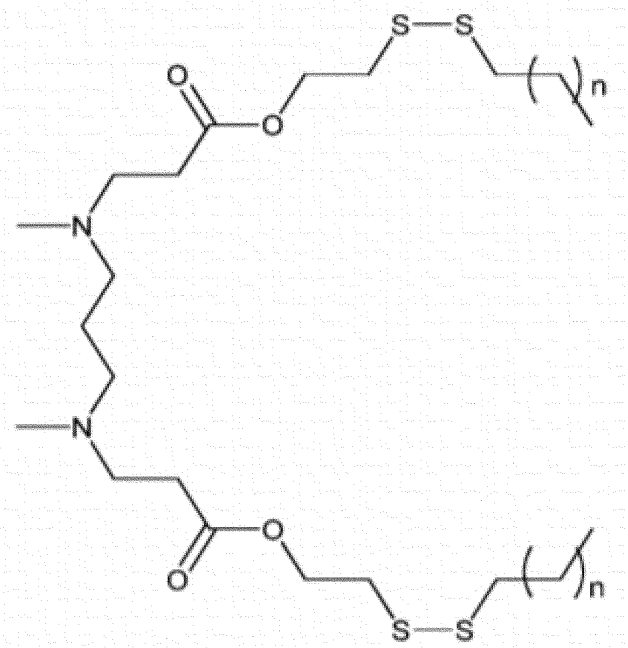

HO
HO
N
N
O
O
O
O
S
S
n
87-O16B, n=10


HO
HO
N
N
O
O
O
O
S
S
n
87-O18B, n=12

【化１３０－３】




1-O16B, n=10

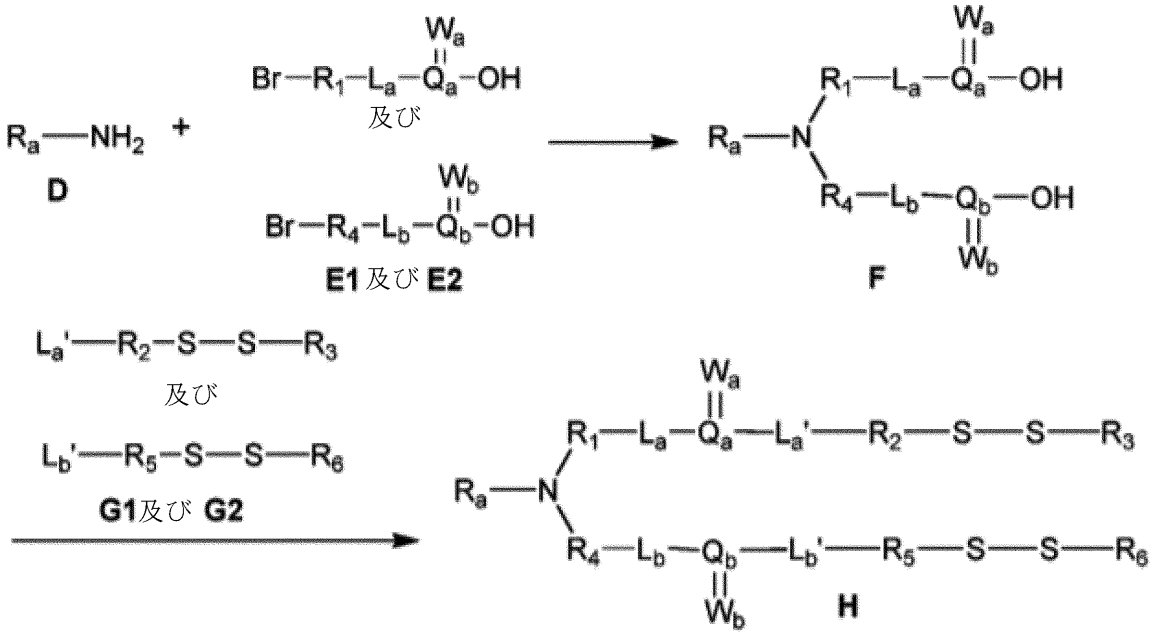



1-O18B, n=12

【０７１６】

構造ＸＸＩＩＩの脂質様化合物は、当該技術分野でよく知られている方法によって調製され得る。Ｗａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，ＡＣＳ　Ｓｙｎｔｈｅｔｉｃ　Ｂｉｏｌｏｇｙ，１，４０３－０７（２０１２）；Ｍａｎｏｈａｒａｎ，ｅｔ　ａｌ．，国際特許出願公開第ＷＯ　２００８／０４２９７３号；及びＺｕｇａｔｅｓ　ｅｔ　ａｌ．，米国特許第８，０７１，０８２号を参照されたい。以下に示される経路は、これらの脂質様化合物の合成を例示している：

【化１３１】




【０７１７】

Ｌａ、Ｌａ’、Ｌ、及びＬ’の各々は、$_1$Ｌ－Ｌ$_{10}$のうちの１つであり得；Ｗａ及びＷｂの各々は、独立して、ＷまたはＶであり得；Ｒａ及びＲ$_1$－Ｒ$_6$は、Ｌ$_1$－Ｌ$_{10}$、Ｗ、及びＶと同様に、上記で定義されている。

【０７１８】

この例示的な合成経路において、アミン化合物、すなわち、化合物Ｄは、臭化物Ｅ１及びＥ２と反応して化合物Ｆを形成し、これは次いで、Ｇ１及びＧ２の両方と結合して最終生成物、すなわち、化合物Ｈが生成される。この化合物（上に示されている）における二重結合の一方または両方は、１または２つの単結合に還元されて、構造ＸＸＩＩＩの異なる脂質様化合物が得られ得る。

【０７１９】

本発明の他の脂質様化合物は、上述した合成経路及び当該技術分野で知られている他のものを介して他の好適な出発物質を使用して調製され得る。上で示される方法は、脂質様化合物の合成を最終的に可能とするために、好適な保護基を付加または除去するために追加のステップ（複数可）を含み得る。加えて、所望の物質を得るために様々な合成ステップが代替シーケンスまたは順序で実施される。適用可能な脂質様化合物の合成において有用な合成化学変換及び保護基方法論（保護及び脱保護）は、例えば、Ｒ．Ｌａｒｏｃｋ，Ｃｏｍｐｒｅｈｅｎｓｉｖｅ Ｏｒｇａｎｉｃ Ｔｒａｎｓｆｏｒｍａｔｉｏｎｓ（２ｎｄ Ｅｄ．，ＶＣＨ Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ １９９９）、Ｐ．Ｇ．Ｍ．Ｗｕｔｓ ａｎｄ Ｔ．Ｗ．Ｇｒｅｅｎｅ，Ｇｒｅｅｎｅ’ｓ Ｐｒｏｔｅｃｔｉｖｅ Ｇｒｏｕｐｓ ｉｎ Ｏｒｇａｎｉｃ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ（４ｔｈ Ｅｄ．，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ａｎｄ Ｓｏｎｓ ２００７）、Ｌ．Ｆｉｅｓｅｒ ａｎｄ Ｍ．Ｆｉｅｓｅｒ，Ｆｉｅｓｅｒ ａｎｄ Ｆｉｅｓｅｒ’ｓ Ｒｅａｇｅｎｔｓ ｆｏｒ Ｏｒｇａｎｉｃ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ（Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ａｎｄ Ｓｏｎｓ １９９４）、及びＬ．Ｐａｑｕｅｔｔｅ，ｅｄ．，Ｅｎｃｙｃｌｏｐｅｄｉａ ｏｆ Ｒｅａｇｅｎｔｓ ｆｏｒ Ｏｒｇａｎｉｃ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ（２ｎｄ ｅｄ．，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ａｎｄ Ｓｏｎｓ ２００９）ならびにそれらの後続の編集物を含めて、当該技術分野で知られている。特定の脂質様化合物は、非芳香族二重結合及び１つ以上の不斉中心を含有し得る。ゆえに、それらは、ラセミ化合物及びラセミ混合物、単一のエナンチオマー、個々のジアステレオマー、ジアステレオマー混合物、ならびにシスまたはトランス異性体形態として存在し得る。全てのかかる異性体形態が企図される。

【０７２０】
上記のように、これらの脂質様化合物は、薬学的薬剤の送達に有用である。それらは、インビトロアッセイによって薬学的薬剤の送達におけるそれらの有効性について主にスクリーニングされ、次いで動物実験及び臨床試験によって確認され得る。他の方法が当業者に明らかになる。
【０７２１】
いかなる理論にも拘束されないが、構造ＸＸＩＩＩの脂質様化合物は、複合体、例えば、ナノコンプレックス及びマイクロ粒子を形成することによって薬学的薬剤の送達を容易化する。正または負に荷電したかかる脂質様化合物の親水性頭部は、反対に荷電した薬学的薬剤の部位に結合し、その疎水性部位は、薬学的薬剤の疎水性部位に結合する。いずれの結合も共有結合性または非共有結合性であり得る。
【０７２２】
上述した複合体は、Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．，ＡＣＳ Ｓｙｎｔｈｅｔｉｃ Ｂｉｏｌｏｇｙ，１，４０３－０７（２０１２）などの刊行物に記載されている手順を使用して調製され得る。通常、それらは、酢酸ナトリウム緩衝液またはリン酸緩衝生理食塩水（「ＰＢＳ」）などの緩衝液中で脂質様化合物及び薬学的薬剤をインキュベートすることによって得られる。
【０７２３】
ｉ．親水性基
特定の実施形態では、選択された親水性官能基または部位は、化合物またはかかる化合物が成分である輸送ビヒクルに対して特性を変化させ、またはそうでなければ特性を付与し得る（例えば、化合物が成分である脂質ナノ粒子のトランスフェクション効率を改善することによって）。例えば、本明細書に開示する化合物における親水性頭部基としてのグアニジニウムの組み込みは、かかる化合物の（またはかかる化合物が成分である輸送ビヒクルの）１つ以上の標的細胞の細胞膜との融合性を促進し得、それにより、例えば、かかる化合物のトランスフェクション効率を向上させる。親水性グアニジニウム部位からの窒素は、相互作用に対する安定性を与える６員環遷移状態を形成し、これにより、封入された物質の細胞取り込みを可能にすると仮定された。（Ｗｅｎｄｅｒ，ｅｔ ａｌ．，Ａｄｖ．Ｄｒｕｇ Ｄｅｌ．Ｒｅｖ．（２００８）６０：４５２－４７２）。同様に、開示される化合物への１つ以上のアミノ基または部位の（例えば、頭部基としての）組み込みは、かかるアミノ基の融合性を利用することによって標的細胞のエンドソーム／リソソーム膜の破壊をさらに促進し得る。これは、組成物のアミノ基のｐＫａだけでなく、アミノ基が六方相転移を受け、標的細胞表面、すなわち、ベシクル膜と融合する能力にも基づく。（Ｋｏｌｔｏｖｅｒ，ｅｔ ａｌ．Ｓｃｉｅｎｃｅ（１９９８）２８１：７８－８１）。結果は、ベシクル膜の破壊及び標的細胞への脂質ナノ粒子含有物の放出を促進すると考えられる。
【０７２４】
同様に、特定の実施形態では、例えば、本明細書に開示する化合物における親水性頭部基としてのイミダゾールの組み込みは、例えば、本発明の輸送ビヒクル（例えば、脂質ナノ粒子）に封入された内容物のエンドソームまたはリソソーム放出を促進する機能をし得る。かかる向上した放出は、プロトン－スポンジ媒介破壊メカニズム及び／または向上した融合性メカニズムの一方または両方によって達成され得る。プロトン－スポンジメカニズムは、化合物、特に化合物の機能的部位または基がエンドソームの酸性化を緩衝する能力に基づく。これは、化合物のまたはかかる化合物（例えば、イミダゾール）を含む官能基の１つ以上のｐＫａによって操作され、またはそうでなければ制御され得る。したがって、特定の実施形態では、例えば、本明細書に開示するイミダゾールベースの化合物（例えば、ＨＧＴ４００１及びＨＧＴ４００４）の融合性は、他の従来のイオン化可能脂質と比べて低いｐＫａを有するかかるイミダゾール基によって容易化されるエンドソーム破壊特性に関連する。かかるエンドソーム破壊は、ひいては、浸透圧膨張及びリポソーム膜の破壊を促進し、続いて、その中にロードされたまたは封入されたポリヌクレオチド物質が

標的細胞にトランスフェクションまたは細胞内放出される。この現象は、イミダゾール部位に加えて所望のｐＫａプロファイルを有する多様な化合物に当てはまり得る。かかる実施形態にはまた、多窒素ベースの官能基、例えば、ポリアミン、ポリ－ペプチド（ヒスチジン）、及び窒素ベースの樹状構造が含まれる。

【０７２５】

例示的なイオン化可能な及び／またはカチオン性脂質は、国際ＰＣＴ特許公開第ＷＯ２０１５／０９５３４０号、同第ＷＯ２０１５／１９９９５２号、同第ＷＯ２０１８／０１１６３３号、同第ＷＯ２０１７／０４９２４５号、同第ＷＯ２０１５／０６１４６７号、同第ＷＯ２０１２／０４０１８４号、同第ＷＯ２０１２／０００１０４号、同第ＷＯ２０１５／０７４０８５号、同第ＷＯ２０１６／０８１０２９号、同第ＷＯ２０１７／００４１４３号、同第ＷＯ２０１７／０７５５３１号、同第ＷＯ２０１７／１１７５２８号、同第ＷＯ２０１１／０２２４６０号、同第ＷＯ２０１３／１４８５４１号、同第ＷＯ２０１３／１１６１２６号、同第ＷＯ２０１１／１５３１２０号、同第ＷＯ２０１２／０４４６３８号、同第ＷＯ２０１２／０５４３６５号、同第ＷＯ２０１１／０９０９６５号、同第ＷＯ２０１３／０１６０５８号、同第ＷＯ２０１２／１６２２１０号、同第ＷＯ２００８／０４２９７３号、同第ＷＯ２０１０／１２９７０９号、同第ＷＯ２０１０／１４４７４０号、同第ＷＯ２０１２／０９９７５５号、同第ＷＯ２０１３／０４９３２８号、同第ＷＯ２０１３／０８６３２２号、同第ＷＯ２０１３／０８６３７３号、同第ＷＯ２０１１／０７１８６０号、同第ＷＯ２００９／１３２１３１号、同第ＷＯ２０１０／０４８５３６号、同第ＷＯ２０１０／０８８５３７号、同第ＷＯ２０１０／０５４４０１号、同第ＷＯ２０１０／０５４４０６号、同第ＷＯ２０１０／０５４４０５号、同第ＷＯ２０１０／０５４３８４号、同第ＷＯ２０１２／０１６１８４号、同第ＷＯ２００９／０８６５５８号、同第ＷＯ２０１０／０４２８７７号、同第ＷＯ２０１１／０００１０６号、同第ＷＯ２０１１／０００１０７号、同第ＷＯ２００５／１２０１５２号、同第ＷＯ２０１１／１４１７０５号、同第ＷＯ２０１３／１２６８０３号、同第ＷＯ２００６／００７７１２号、同第ＷＯ２０１１／０３８１６０号、同第ＷＯ２００５／１２１３４８号、同第ＷＯ２０１１／０６６６５１号、同第ＷＯ２００９／１２７０６０号、同第ＷＯ２０１１／１４１７０４号、同第ＷＯ２００６／０６９７８２号、同第ＷＯ２０１２／０３１０４３号、同第ＷＯ２０１３／００６８２５号、同第ＷＯ２０１３／０３３５６３号、同第ＷＯ２０１３／０８９１５１号、同第ＷＯ２０１７／０９９８２３号、同第ＷＯ２０１５／０９５３４６号、及び同第ＷＯ２０１３／０８６３５４号、及び米国特許公開第ＵＳ２０１６／０３１１７５９号、同第ＵＳ２０１５／０３７６１１５号、同第ＵＳ２０１６／０１５１２８４号、同第ＵＳ２０１７／０２１０６９７号、同第ＵＳ２０１５／０１４００７０号、同第ＵＳ２０１３／０１７８５４１号、同第ＵＳ２０１３／０３０３５８７号、同第ＵＳ２０１５／０１４１６７８号、同第ＵＳ２０１５／０２３９９２６号、同第ＵＳ２０１６／０３７６２２４号、同第ＵＳ２０１７／０１１９９０４号、同第ＵＳ２０１２／０１４９８９４号、同第ＵＳ２０１５／００５７３７３号、同第ＵＳ２０１３／００９０３７２号、同第ＵＳ２０１３／０２７４５２３号、同第ＵＳ２０１３／０２７４５０４号、同第ＵＳ２０１３／０２７４５０４号、同第ＵＳ２００９／００２３６７３号、同第ＵＳ２０１２／０１２８７６０号、同第ＵＳ２０１０／０３２４１２０号、同第ＵＳ２０１４／０２００２５７号、同第ＵＳ２０１５／０２０３４４６号、同第ＵＳ２０１８／０００５３６３号、同第ＵＳ２０１４／０３０８３０４号、同第ＵＳ２０１３／０３３８２１０号、同第ＵＳ２０１２／０１０１１４８号、同第ＵＳ２０１２／００２７７９６号、同第ＵＳ２０１２／００５８１４４号、同第ＵＳ２０１３／０３２３２６９号、同第ＵＳ２０１１／０１１７１２５号、同第ＵＳ２０１１／０２５６１７５号、同第ＵＳ２０１２／０２０２８７１号、同第ＵＳ２０１１／００７６３３５号、同第ＵＳ２００６／００８３７８０号、同第ＵＳ２０１３／０１２３３３８号、同第ＵＳ２０１５／００６４２４２号、同第ＵＳ２００６／００５１４０５号、同第ＵＳ２０１３／００６５９３９号、同第ＵＳ２００６／０００８９１０号、同第ＵＳ２００３／００２２６４９号、同第ＵＳ２０１０／０１３０５８８号、同第ＵＳ２０１３／０１１６３０７号、同第ＵＳ２０１０／００６２９

６７号、同第ＵＳ２０１３／０２０２６８４号、同第ＵＳ２０１４／０１４１０７０号、同第ＵＳ２０１４／０２５５４７２号、同第ＵＳ２０１４／００３９０３２号、同第ＵＳ２０１８／００２８６６４号、同第ＵＳ２０１６／０３１７４５８号、及び同第ＵＳ２０１３／０１９５９２０号に記載されており、これらの全ての内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。国際特許出願第ＷＯ２０１９／１３１７７０号もその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０７２６】

Ｂ．安定化脂質

ＬＮＰの構造を増強するために、安定化脂質または表面安定化脂質が使用され得る。本明細書で企図される安定化脂質は、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）修飾リン脂質であり得る。本明細書に記載のリポソーム及び薬学的組成物における、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）修飾リン脂質及び誘導体化脂質、例えば誘導体化セラミド（ＰＥＧ－ＣＥＲ）、例えば、Ｎ－オクタノイル－スフィンゴシン－１－［スクシニル（メトキシポリエチレングリコール）－２０００］（Ｃ８　ＰＥＧ－２０００セラミド）の、好ましくは、本明細書に開示する化合物及び脂質のうちの１つ以上と組み合わせた、使用及び包含が企図される。企図されるＰＥＧ修飾脂質には、Ｃ６～Ｃ２０長さのアルキル鎖（複数可）を伴う脂質に共有結合的に付着した最大５ｋＤａの長さのポリエチレングリコール鎖が含まれるが、これに限定されない。いくつかの実施形態では、本発明の組成物及び方法において採用されるＰＥＧ修飾脂質は、１，２－ジミリストイル－ｓｎ－グリセロール、メトキシポリエチレングリコール（２０００ＭＷ　ＰＥＧ）「ＤＭＧ－ＰＥＧ２０００」である。脂質送達ビヒクルへのＰＥＧ修飾脂質の追加は、複雑な凝集を防止し得、循環寿命を延ばし、標的組織への脂質－ポリヌクレオチド組成物の送達を増加させる手段も提供し得る（Ｋｌｉｂａｎｏｖ　ｅｔ　ａｌ．（１９９０）ＦＥＢＳ　Ｌｅｔｔｅｒｓ，２６８（１）：２３５－２３７）、またはそれらは、インビボで製剤から迅速に交換されるよう選択され得る（米国特許第５，８８５，６１３号を参照されたい）。特に有用な交換可能脂質は、より短いアシル鎖（例えば、Ｃ１４またはＣ１８）を有するＰＥＧ－セラミドである。本発明のＰＥＧ修飾リン脂質及び誘導体化脂質は、リポソーム脂質ナノ粒子に存在する総脂質の約０％～約２０％、約０．５％～約２０％、約１％～約１５％、約４％～約１０％、または約２％のモル比を構成し得る。

【０７２７】

ある実施形態では、ＰＥＧ修飾脂質は、国際特許出願第ＰＣＴ／ＵＳ２０１９／０１５９１３号に記載されており、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。ある実施形態では、輸送ビヒクルは、１つ以上のＰＥＧ修飾脂質を含む。

【０７２８】

ＰＥＧ修飾脂質の非限定的な例には、ＰＥＧ修飾ホスファチジルエタノールアミン及びホスファチジン酸、ＰＥＧ－セラミド複合（例えば、ＰＥＧ－ＣｅｒＣ１４またはＰＥＧ－ＣｅｒＣ２０）、ＰＥＧ修飾ジアルキルアミン及びＰＥＧ修飾１，２－ジアシルオキシプロパン－３－アミン）が含まれる。いくつかのさらなる実施形態では、ＰＥＧ修飾脂質は、例えば、ＰＥＧ－ｃ－ＤＯＭＧ、ＰＥＧ－ＤＭＧ、ＰＥＧ－ＤＬＰＥ、ＰＥＧ－ＤＭＰＥ、ＰＥＧ－ＤＰＰＣ、またはＰＥＧ－ＤＳＰＥであり得る。

【０７２９】

いくつかのさらに別の実施形態では、ＰＥＧ修飾脂質には、１，２－ジミリストイル－ｓｎ－グリセロールメトキシポリエチレングリコール（ＰＥＧ－ＤＭＧ）、１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン－Ｎ－［アミノ（ポリエチレングリコール）］（ＰＥＧ－ＤＳＰＥ）、ＰＥＧ－ジステリルグリセロール（ＰＥＧ－ＤＳＧ）、ＰＥＧ－ジパルメトレイル、ＰＥＧ－ジオレイル、ＰＥＧ－ジステアリル、ＰＥＧ－ジアシルグリカミド（ＰＥＧ－ＤＡＧ）、ＰＥＧ－ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン（ＰＥＧ－ＤＰＰＥ）、またはＰＥＧ－ｌ，２－ジミリスチルオキシルプロピル－３－アミン（ＰＥＧ－ｃ－ＤＭＡ）が含まれるがこれらに限定されない。

【０７３０】

様々な実施形態では、ＰＥＧ修飾脂質はまた、「ＰＥＧ化脂質」または「ＰＥＧ－脂質」と称され得る。

【０７３１】

一実施形態では、ＰＥＧ－脂質は、ＰＥＧ修飾ホスファチジルエタノールアミン、ＰＥＧ修飾ホスファチジン酸、ＰＥＧ修飾セラミド、ＰＥＧ修飾ジアルキルアミン、ＰＥＧ修飾ジアシルグリセロール、ＰＥＧ修飾ジアルキルグリセロール、及びそれらの混合物からなる群から選択される。

【０７３２】

いくつかの実施形態では、ＰＥＧ－脂質の脂質部位には、約$C_{14}$～約$C_{22}$、例えば、約$C_{14}$～約$C_{16}$の長さを有するものが含まれる。いくつかの実施形態では、ＰＥＧ部位、例えば、m$PEG-NH_2$は、約１０００、約２０００、約５０００、約１０，０００、約１５，０００または約２０，０００ダルトンのサイズを有する。一実施形態では、ＰＥＧ－脂質は、ＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧである。

【０７３３】

一実施形態では、本明細書に記載の脂質ナノ粒子は、非拡散性ＰＥＧで修飾された脂質を含み得る。非拡散性ＰＥＧの非限定的な例には、ＰＥＧ－ＤＳＧ及びＰＥＧ－ＤＳＰＥが含まれる。

【０７３４】

ＰＥＧ－脂質は、当該技術分野で知られており、例えば、米国特許第８，１５８，６０１号及び国際特許公開第ＷＯ２０１５／１３０５８４Ａ２号に記載されているものであり、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０７３５】

様々な実施形態では、本明細書に記載の脂質（例えば、ＰＥＧ－脂質）は、国際特許公開第ＰＣＴ／ＵＳ２０１６／０００１２９号に記載されているように合成され得、その全体が参照により組み込まれる。

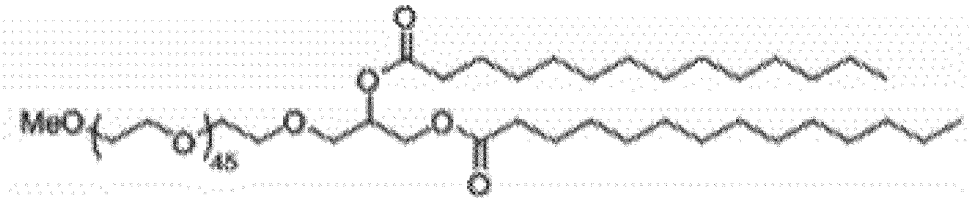
【０７３６】

脂質ナノ粒子組成物の脂質成分は、ＰＥＧまたはＰＥＧ修飾脂質などのポリエチレングリコールを含む１つ以上の分子を含み得る。かかる種は、ＰＥＧ化脂質と代替的に称され得る。ＰＥＧ脂質は、ポリエチレングリコールで修飾された脂質である。ＰＥＧ脂質は、ＰＥＧ修飾ホスファチジルエタノールアミン、ＰＥＧ修飾ホスファチジン酸、ＰＥＧ修飾セラミド、ＰＥＧ修飾ジアルキルアミン、ＰＥＧ修飾ジアシルグリセロール、ＰＥＧ修飾ジアルキルグリセロール、及びそれらの混合物を含む非限定的な群から選択され得る。例えば、ＰＥＧ脂質は、ＰＥＧ－ｃ－ＤＯＭＧ、ＰＥＧ－ＤＭＧ、ＰＥＧ－ＤＬＰＥ、ＰＥＧ－ＤＭＰＥ、ＰＥＧ－ＤＰＰＣ、またはＰＥＧ－ＤＳＰＥ脂質であり得る。

【０７３７】

いくつかの実施形態では、ＰＥＧ修飾脂質は、ＰＥＧ－ＤＭＧの修飾形態である。ＰＥＧ－ＤＭＧは、以下の構造を有する：

【化１３２】

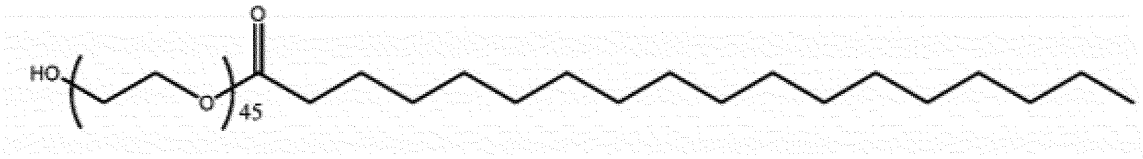



。

【０７３８】

いくつかの実施形態では、ＰＥＧ修飾脂質は、ＰＥＧ－Ｃ１８の修飾形態、またはＰＥＧ－１である。ＰＥＧ－１は、以下の構造を有する

【化１３３】



。

【０７３９】

一実施形態では、本発明において有用なＰＥＧ脂質は、国際公開第ＷＯ２０１２０９９７５５（その内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているＰＥＧ化脂質であり得る。本明細書に記載のこれらの例示的なＰＥＧ脂質のいずれかは、ＰＥＧ鎖上のヒドロキシル基を含むように修飾され得る。特定の実施形態では、ＰＥＧ脂質は、ＰＥＧ－ＯＨ脂質である。特定の実施形態では、ＰＥＧ－ＯＨ脂質は、ＰＥＧ鎖上に１つ以上のヒドロキシル基を含む。特定の実施形態では、ＰＥＧ－ＯＨまたはヒドロキシ－ＰＥＧ化脂質は、ＰＥＧ鎖の末端に－ＯＨ基を含む。各可能性は、本発明の別の実施形態を表す。

【０７４０】

いくつかの実施形態では、ＰＥＧ脂質は、式（Ｐ１）の化合物であるか、

【化１３４】

（Ｐ１）

またはその塩もしくは異性体であり、式中、

ｒは、１～１００の整数であり、

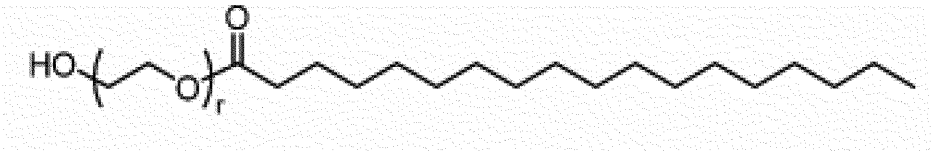
Ｒは、$C_{10-40}$アルキル、$C_{10-40}$アルケニル、または$C_{10-40}$アルキニルであり、任意でＲの１つ以上のメチレン基は、独立して、$C_{3-10}$カルボシクリレン、４～１０員ヘテロシクリレン、$C_{6-10}$アリーレン、４～１０員ヘテロアリーレン、－Ｎ（$R^N$）－、－Ｏ－、－Ｓ－、－Ｃ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｏ）Ｎ（$R^N$）－、－Ｎ$R^N$Ｃ（Ｏ）－、－Ｎ$R^N$Ｃ（Ｏ）Ｎ（$R^N$）－、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－ＯＣ（Ｏ）－、－ＯＣ（Ｏ）Ｏ－、－ＯＣ（Ｏ）Ｎ（$R^N$）－、－Ｎ$R^N$Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－Ｃ（Ｏ）Ｓ－、－ＳＣ（Ｏ）－、－Ｃ（＝Ｎ$R^N$）－、－Ｃ（＝Ｎ$R^N$）Ｎ（$R^N$）－、－Ｎ$R^N$Ｃ（＝Ｎ$R^N$）－、－Ｎ$R^N$Ｃ（＝Ｎ$R^N$）Ｎ（$R^N$）－、－Ｃ（Ｓ）－、－Ｃ（Ｓ）Ｎ（$R^N$）－、－Ｎ$R^N$Ｃ（Ｓ）－、－Ｎ$R^N$Ｃ（Ｓ）Ｎ（$R^N$）－、－Ｓ（Ｏ）－、－ＯＳ（Ｏ）－、－Ｓ（Ｏ）Ｏ－、－ＯＳ（Ｏ）Ｏ－、－ＯＳ（Ｏ）$_2$－、－Ｓ（Ｏ）$_2$Ｏ－、－ＯＳ（Ｏ）$_2$Ｏ－、－Ｎ（$R^N$）Ｓ（Ｏ）－、－Ｓ（Ｏ）Ｎ（$R^N$）－、－Ｎ（$R^N$）Ｓ（Ｏ）Ｎ（$R^N$）－、－ＯＳ（Ｏ）Ｎ（$R^N$）－、－Ｎ（$R^N$）Ｓ（Ｏ）Ｏ－、－Ｓ（Ｏ）２－、－Ｎ（$R^N$）Ｓ（Ｏ）２－、－Ｓ（Ｏ）$_2$Ｎ（$R^N$）－、－Ｎ（$R^N$）Ｓ（Ｏ）$_2$Ｎ（$R^N$）－、－ＯＳ（Ｏ）$_2$Ｎ（$R^N$）－、または－Ｎ（$R^N$）Ｓ（Ｏ）$_2$Ｏ－で置き換えられており、

$R^N$の各事例は、独立して、水素、$C_{1-6}$アルキル、または窒素保護基である。

【０７４１】

例えば、Ｒは、Ｃ１７アルキルである。例えば、ＰＥＧ脂質は、式（Ｐ１－ａ）の化合物であるか、

【化１３５】

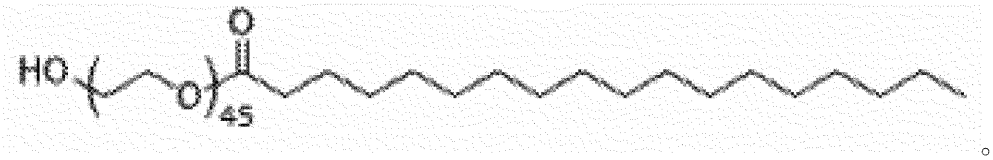


またはその塩もしくは異性体であり、式中、ｒは、１～１００の整数である。

【０７４２】

例えば、ＰＥＧ脂質は、以下の式の化合物である：

【化１３６】



。

【０７４３】

Ｃ．ヘルパー脂質

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の輸送ビヒクル（例えば、ＬＮＰ）は、１つ以上の非カチオン性ヘルパー脂質を含む。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、リン脂質またはリン脂質代替物は、例えば、１つ以上の飽和または（ポリ）不飽和リン脂質、またはリン脂質代替物、またはそれらの組み合わせであり得る。通常、リン脂質は、リン脂質部位及び１つ以上の脂肪酸部位を含む。

【０７４４】

リン脂質部位は、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－リソ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。

【０７４５】

脂肪酸部位は、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、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。

【０７４６】

リン脂質には、グリセロリン脂質、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、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジグリセロール、及びホスファチジン酸が含まれるがこれらに限定されない。リン脂質にはまた、スフィンゴミエリンなどのスフィンゴリン脂質が含まれる。

【０７４７】

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－１７７－グリセロ－３－ホスホコリン（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。

【０７４８】

いくつかの実施形態では、ヘルパー脂質は、非ホスファチジルコリン（ＰＣ）双性イオン性脂質、ＤＳＰＣ類似体、オレイン酸、オレイン酸類似体、またはＤＳＰＣ代替物である。

【０７４９】

いくつかの実施形態では、ヘルパー脂質は、ＰＣＴ／ＵＳ２０１８／０５３５６９に記載されている。本開示の脂質組成物において使用するのに好適なヘルパー脂質には、例え

ば、多様な中性、非荷電または双性イオン性脂質が含まれる。かかるヘルパー脂質は好ましくは、本明細書に開示する化合物及び脂質の１つ以上と組み合わせて使用される。ヘルパー脂質の例には、５－ヘプタデシルベンゼン－１，３－ジオール（レゾルシノール）、ジパルミトイルホスファチジルコリン（ＤＰＰＣ）、ジステアロイルホスファチジルコリン（ＤＳＰＣ）、ホスホコリン（ＤＯＰＣ）、ジミリストイルホスファチジルコリン（ＤＭＰＣ）、ホスファチジルコリン（ＰＬＰＣ）、１，２－ジステアロイルｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＡＰＣ）、ホスファチジルエタノールアミン（ＰＥ）、卵黄ホスファチジルコリン（ＥＰＣ）、ジラウリロイルホスファチジルコリン（ＤＬＰＣ）、ジミリストイルホスファチジルコリン（ＤＭＰＣ）、１－ミリストイル－２－パルミトイルホスファチジルコリン（ＭＰＰＣ）、１－パイミトイル－２－ミリストイルホスファチジルコリン（ＰＭＰＣ）、１－パルミトイル－２－ステアロイルホスファチジルコリン（ＰＳＰＣ）、１，２－ジアラキドイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＢＰＣ）、１－ステアロイル－２－パルミトイルホスファチジルコリン（ＳＰＰＣ）、１，２－ジエイコセノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＥＰＣ）、パイミトイイオイエオイルホスファチジルコリン（ＰＯＰＣ）、リソホスファチジルコリン、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＯＰＥ）ジリノレオイルホスファチジルコリンジステアロイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＳＰＥ）、ジミリストイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＭＰＥ）、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＰＰＥ）、パルミトイロレオイルホスファチジルエタノールアミン（ＰＯＰＥ）、リソホスファチジルエタノールアミン及びそれらの組み合わせが含まれるがこれらに限定されない。一実施形態では、ヘルパー脂質は、ジステアロイルホスファチジルコリン（ＤＳＰＣ）またはジミリストイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＭＰＥ）であり得る。別の実施形態では、ヘルパー脂質は、ジステアロイルホスファチジルコリン（ＤＳＰＣ）であり得る。ヘルパー脂質は、輸送ビヒクルの処理を安定化及び改善するように機能する。かかるヘルパー脂質は好ましくは、他の賦形剤、例えば、本明細書に開示するイオン化可能脂質の１つ以上と組み合わせて使用される。いくつかの実施形態では、イオン化可能脂質と組み合わせて使用される場合、ヘルパー脂質は、脂質ナノ粒子に存在する総脂質の５％～約９０％、または約１０％～約７０％のモル比を含み得る。

【０７５０】

Ｄ．構造脂質

ある実施形態では、構造脂質は、国際特許出願第ＰＣＴ／ＵＳ２０１９／０１５９１３号に記載されている。

【０７５１】

本明細書に記載の輸送ビヒクルは、１つ以上の構造脂質を含む。脂質ナノ粒子における構造脂質の組み込みは、粒子における他の脂質の凝集を軽減するのに役立ち得る。構造脂質には、コレステロール、フェコステロール、エルゴステロール、バシカステロール、トマチジン、トマチン、ウルソル、アルファ－トコフェロール、及びそれらの混合物が含まれ得るがこれらに限定されない。特定の実施形態では、構造脂質は、コレステロールである。特定の実施形態では、構造脂質には、コレステロール及びコルチコステロイド（例えば、プレドニゾロン、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が含まれる。

【０７５２】

いくつかの実施形態では、構造脂質は、ステロールである。特定の実施形態では、構造脂質は、ステロイドである。特定の実施形態では、構造脂質は、コレステロールである。特定の実施形態では、構造脂質は、コレステロールの類似体である。特定の実施形態では、構造脂質は、アルファ－トコフェロールである。

【０７５３】

本明細書に記載の輸送ビヒクルは、１つ以上の構造脂質を含む。輸送ビヒクル、例えば、脂質ナノ粒子における構造脂質の組み込みは、粒子における他の脂質の凝集を軽減するのに役立ち得る。特定の実施形態では、構造脂質には、コレステロール及びコルチコステ

ロイド（例えば、プレドニゾロン、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が含まれる。

【０７５４】

いくつかの実施形態では、構造脂質は、ステロールである。構造脂質には、ステロール（例えば、フィトステロールまたは動物ステロール）が含まれ得るがこれらに限定されない。

【０７５５】

特定の実施形態では、構造脂質は、ステロイドである。例えば、ステロールには、コレステロール、ベータシトステロール、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、またはアルファ－トコフェロールが含まれ得るがこれらに限定されない。

【０７５６】

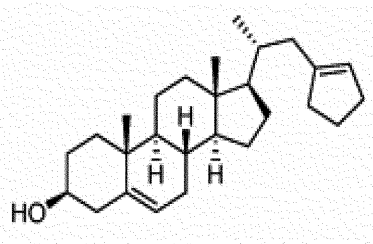
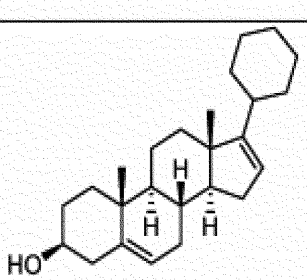
いくつかの実施形態では、輸送ビヒクルは、有効量の免疫細胞送達増強脂質、例えば、コレステロール類似体もしくはアミノ脂質またはそれらの組み合わせを含み得、これは、輸送ビヒクル、例えば、脂質ナノ粒子に存在する場合、免疫細胞送達増強脂質を欠く輸送ビヒクルと比べて、細胞会合及び／または取り込み、内在化、細胞内トラフィッキング及び／またはプロセシング、及び／またはエンドソーム脱出を増強することによって機能し得、及び／または免疫細胞による認識及び／または免疫細胞への結合を増強し得る。したがって、いかなる特定のメカニズムまたは理論によって拘束されることを意図するものではないが、一実施形態では、本開示の構造脂質または他の免疫細胞送達増強脂質は、Ｃ１ｑに結合し、またはかかる脂質を含む輸送ビヒクルのＣ１ｑへの結合を促進する。ゆえに、免疫細胞への核酸分子の送達のための本開示の輸送ビヒクルのインビトロ使用は、Ｃ１ｑを含む培養条件が使用される（例えば、血清、または外因性Ｃ１ｑの無血清培地への添加を含む培地の使用）。本開示の輸送ビヒクルのインビボ使用のため、Ｃ１ｑの必要性は、内因性Ｃ１ｑによって供給される。

【０７５７】

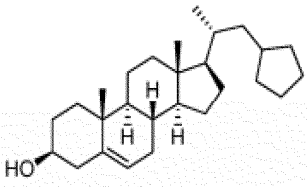
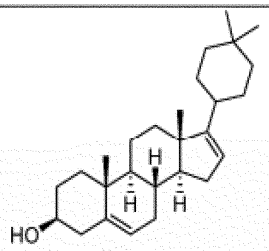
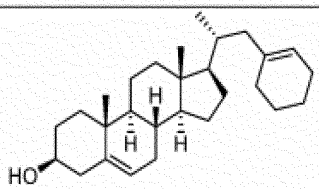
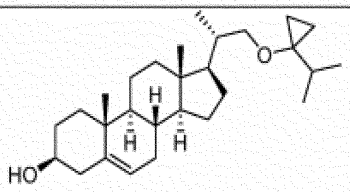
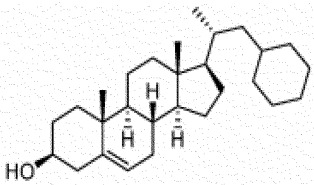
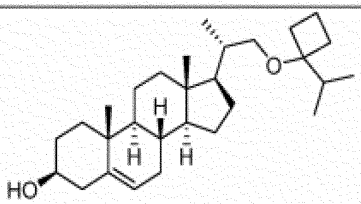
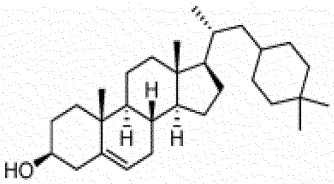
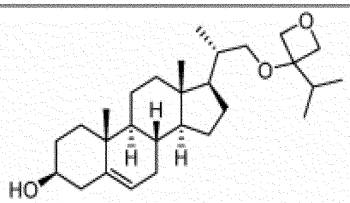
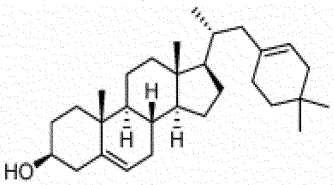
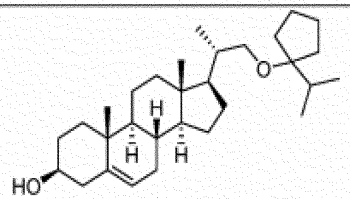
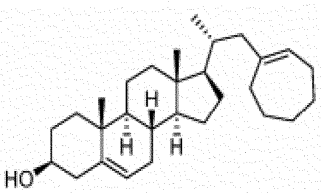
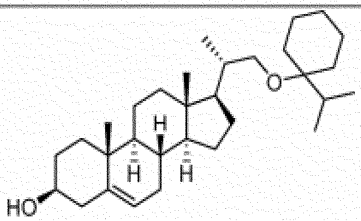
特定の実施形態では、構造脂質は、コレステロールである。特定の実施形態では、構造脂質は、コレステロールの類似体である。いくつかの実施形態では、構造脂質は表１６における脂質である：

【表１６－１】

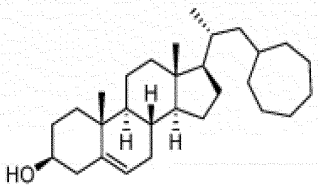
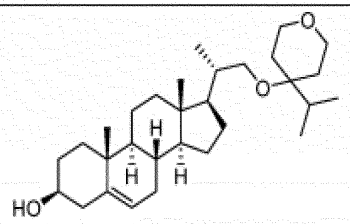
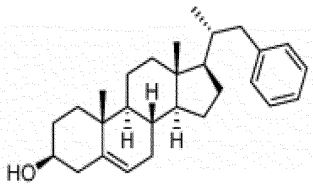
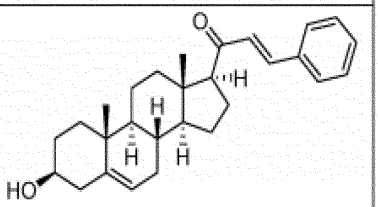
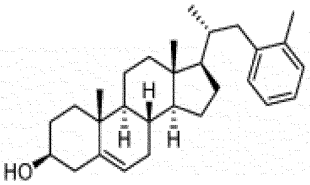
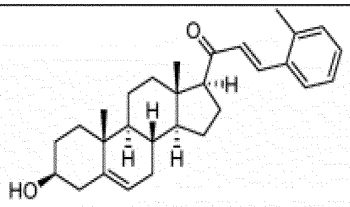
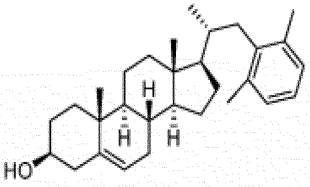
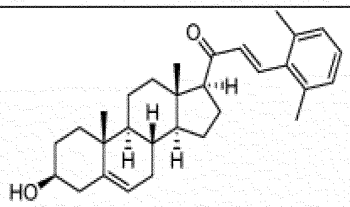
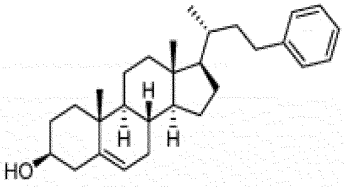
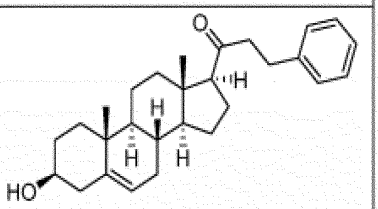
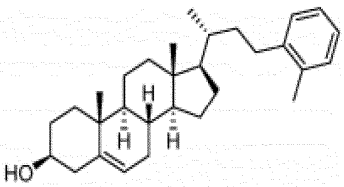
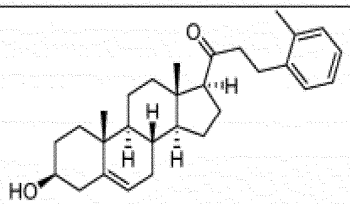
表１６

| 化合物番号S- | 構造 | 化合物番号S- | 構造 |
|---|---|---|---|
| 1 |  | 22 |  |

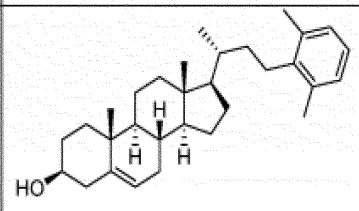
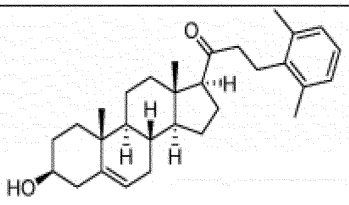
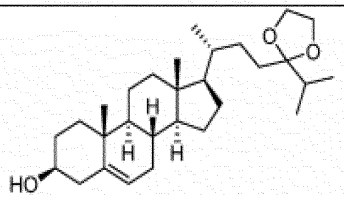
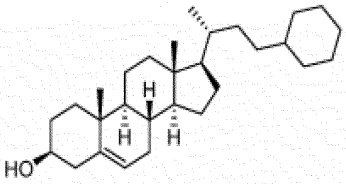
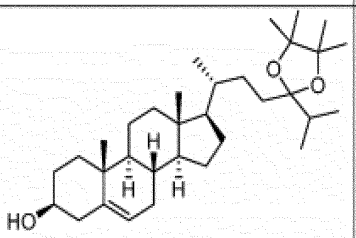
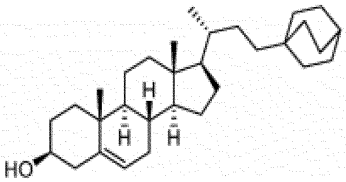
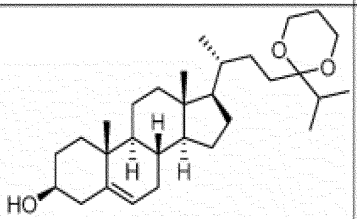
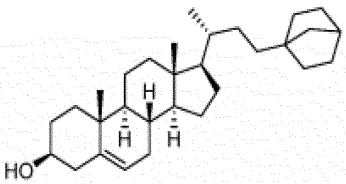
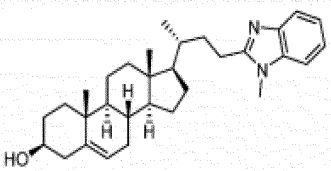
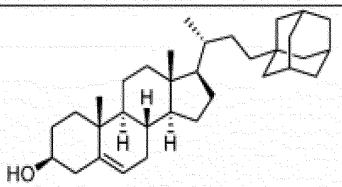
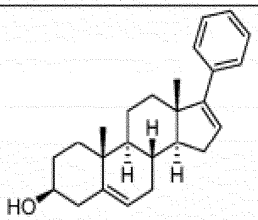
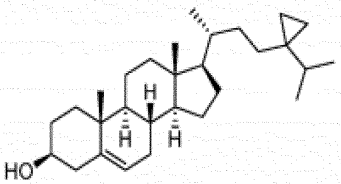
【表１６－２】

| 化合物番号S- | 構造 | 化合物番号S- | 構造 |
|---|---|---|---|
| 2 |  | 23 |  |
| 3 |  | 24 |  |
| 4 |  | 25 |  |
| 5 |  | 26 |  |
| 6 |  | 27 |  |
| 7 |  | 28 |  |

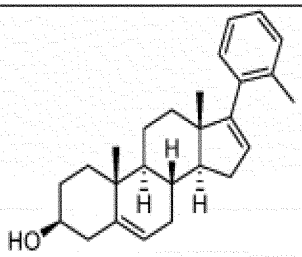
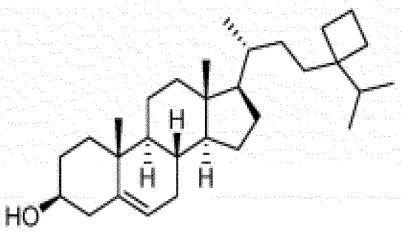
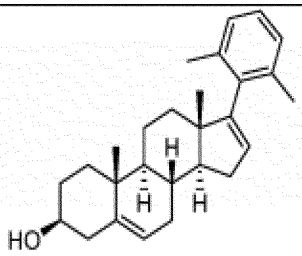
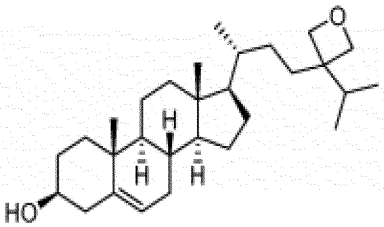
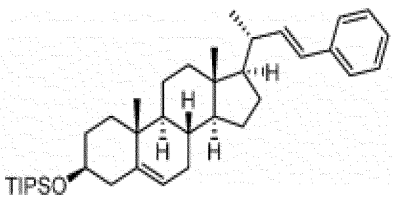
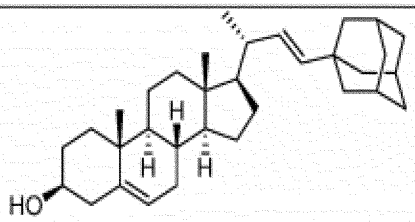
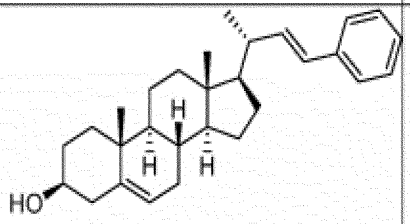
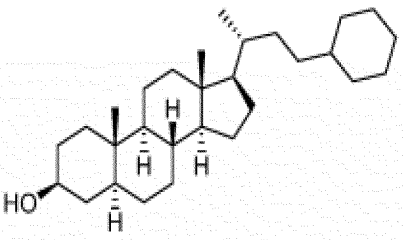
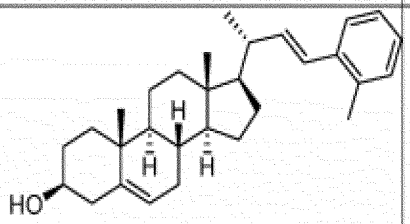
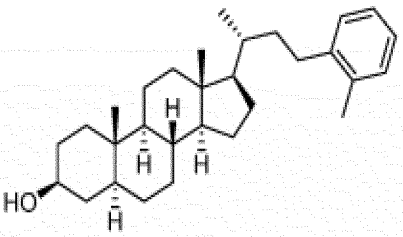
【表１６－３】

| 化合物番号S- | 構造 | 化合物番号S- | 構造 |
|---|---|---|---|
| 8 |  | 29 |  |
| 9 |  | 30 |  |
| 10 |  | 31 |  |
| 11 |  | 32 |  |
| 12 |  | 33 |  |
| 13 |  | 34 |  |

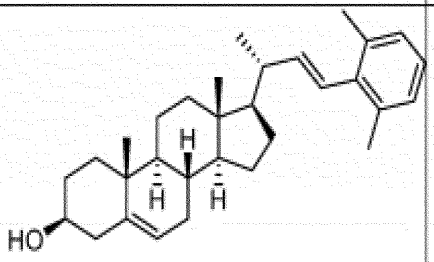
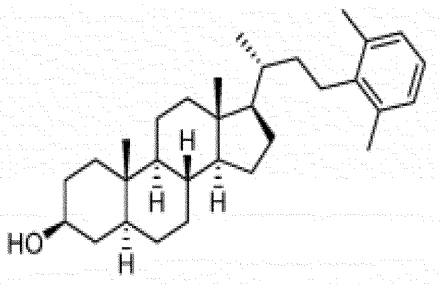
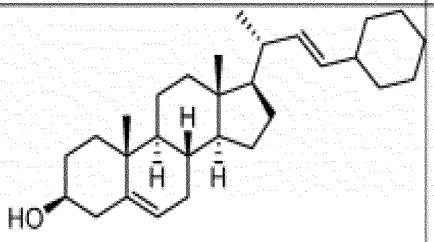
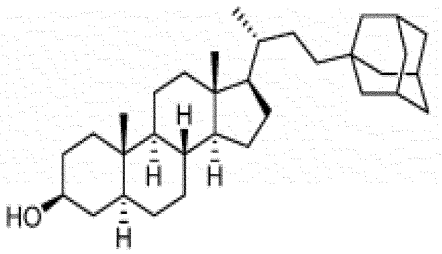
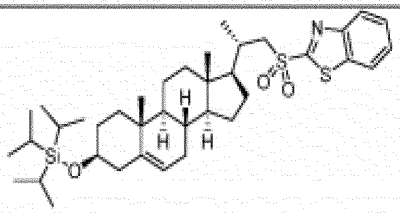
【表１６－４】

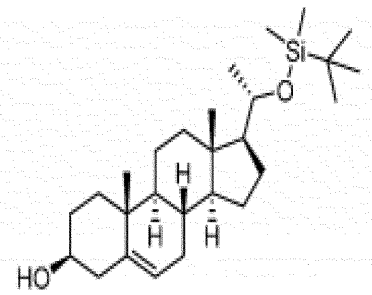
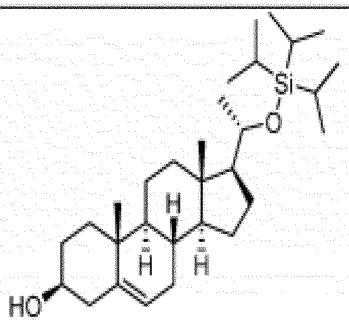
| 化合物番号S- | 構造 | 化合物番号S- | 構造 |
|---|---|---|---|
| 14 |  | 35 |  |
| 15 |  | 36 |  |
| 16 |  | 37 |  |
| 17 |  | 38 |  |
| 18 |  | 39 |  |
| 19 |  | 40 |  |

【表１６－５】

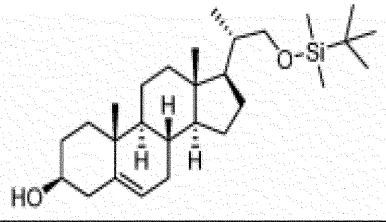
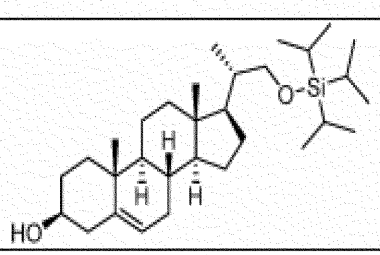
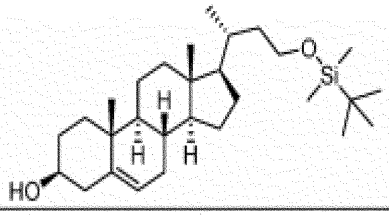
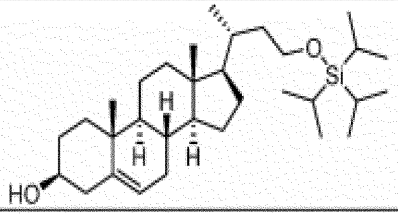
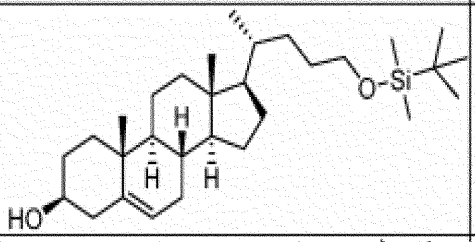
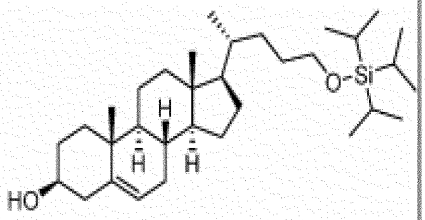
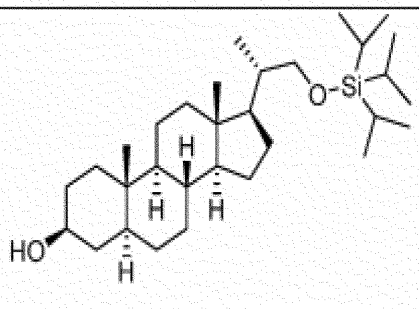
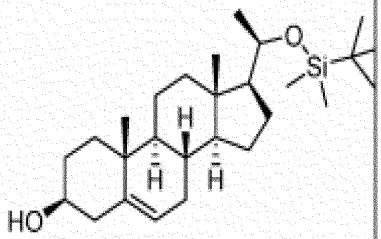
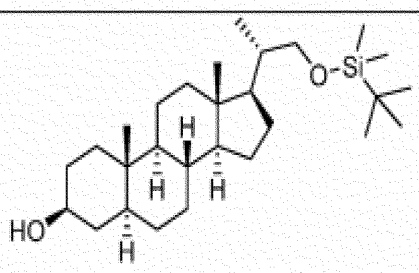
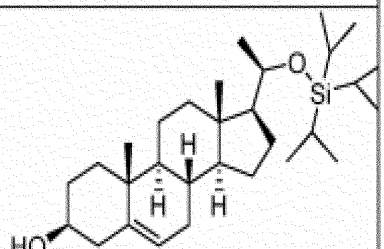
| 化合物番号S- | 構造 | 化合物番号S- | 構造 |
|---|---|---|---|
| 20 |  | 41 |  |
| 21 |  | 42 |  |
| 150 |  | 165 |  |
| 154 |  | 169 |  |
| 162 |  | 170 |  |

【表１６－６】

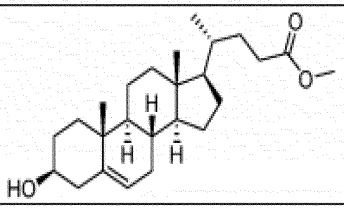
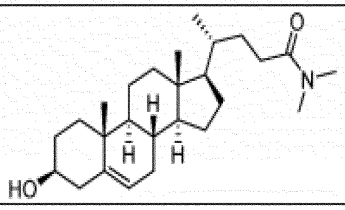
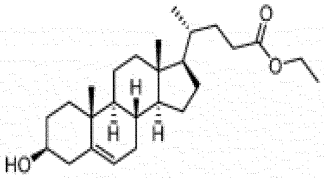
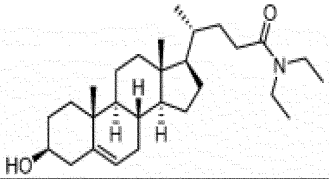
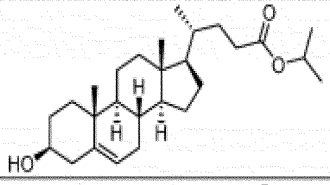
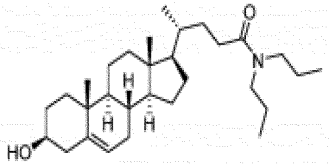
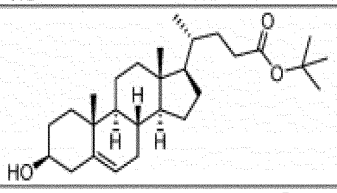
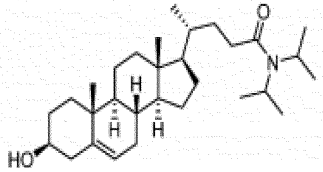
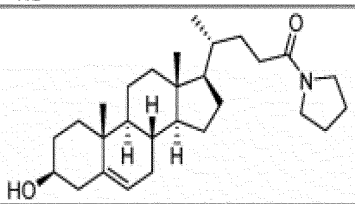
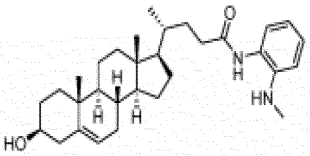
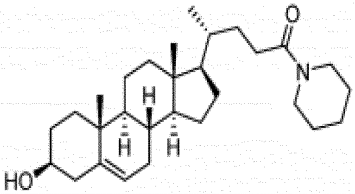
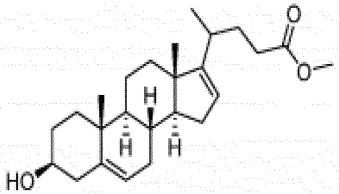
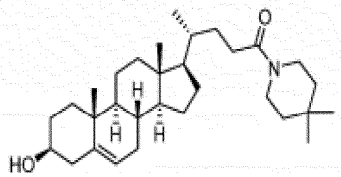
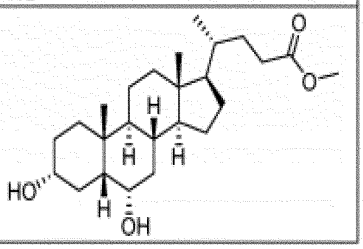
| 化合物番号S- | 構造 | 化合物番号S- | 構造 |
|---|---|---|---|
| 163 |  | 171 |  |
| 164 |  | 172 |  |
| 184 |  | | |

| 化合物番号S- | 構造 | 化合物番号S- | 構造 |
|---|---|---|---|
| 43 |  | 47 |  |

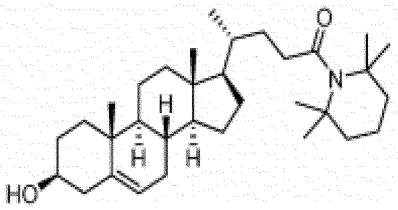
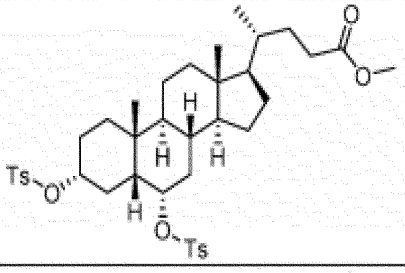
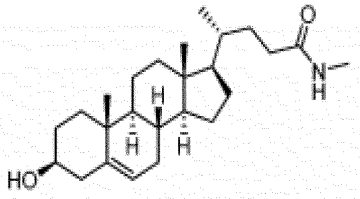
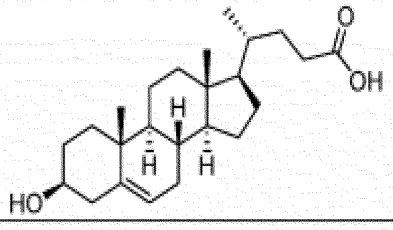
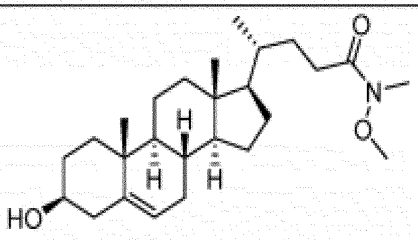
【表１６－７】

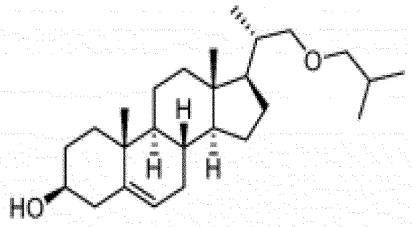
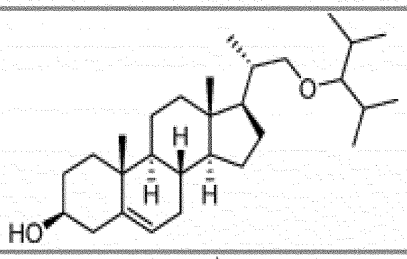
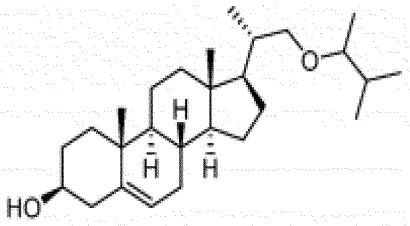
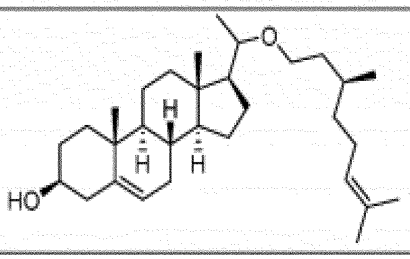
| 化合物番号S- | 構造 | 化合物番号S- | 構造 |
|---|---|---|---|
| 44 |  | 48 |  |
| 45 |  | 49 |  |
| 46 |  | 50 |  |
| 175 |  | 177 |  |
| 176 |  | 178 |  |

【表１６－８】

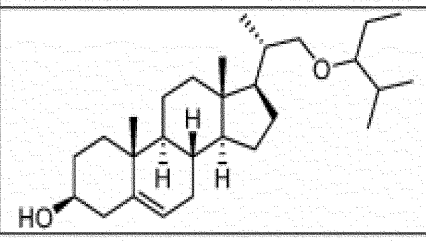
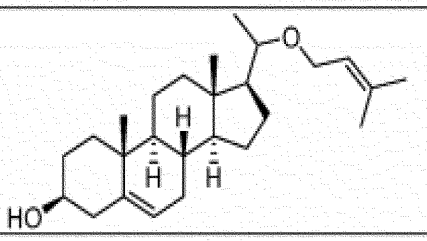
| 化合物番号S- | 構造 | 化合物番号S- | 構造 |
|---|---|---|---|
| 51 |  | 60 |  |
| 52 |  | 61 |  |
| 53 |  | 62 |  |
| 54 |  | 63 |  |
| 55 |  | 64 |  |
| 56 |  | 65 |  |
| 57 |  | 66 |  |

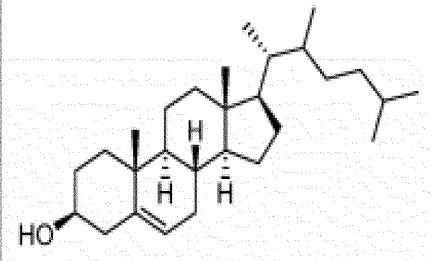
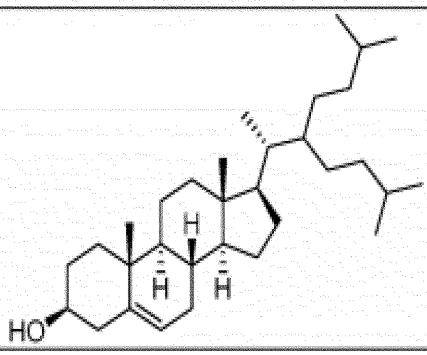
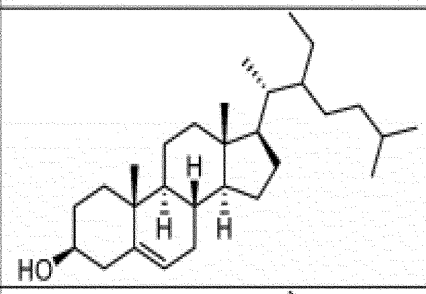
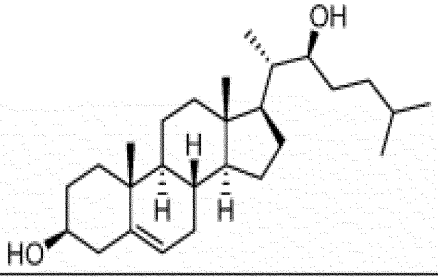
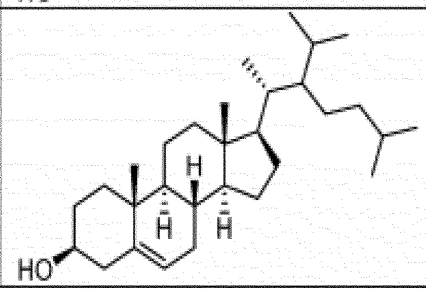
【表１６－９】

| 化合物番号S- | 構造 | 化合物番号S- | 構造 |
|---|---|---|---|
| 58 |  | 67 |  |
| 59 |  | 149 |  |
| 153 |  | | |

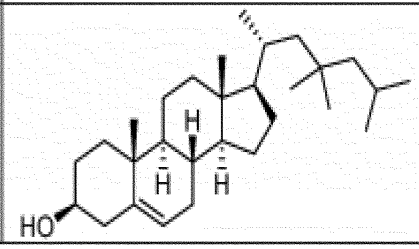
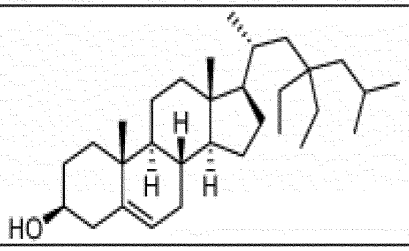
| 化合物番号S- | 構造 | 化合物番号S- | 構造 |
|---|---|---|---|
| 68 |  | 71 |  |
| 69 |  | 72 |  |

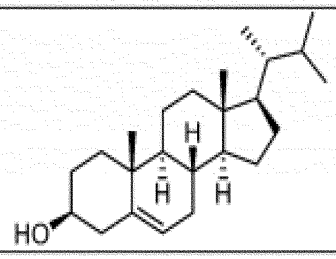
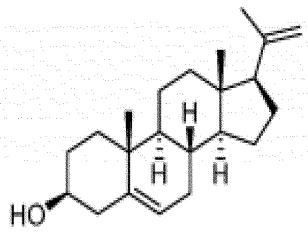
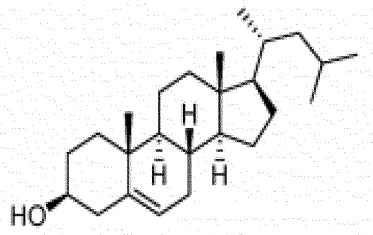
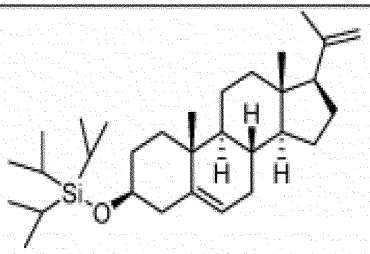
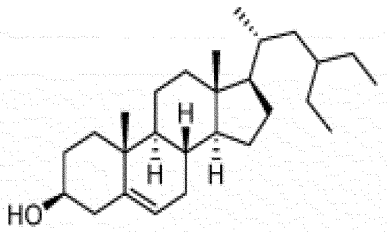
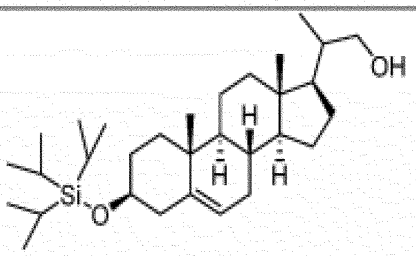
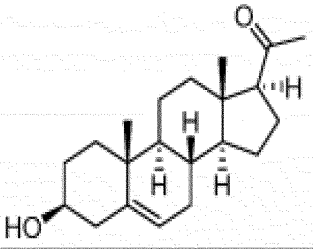
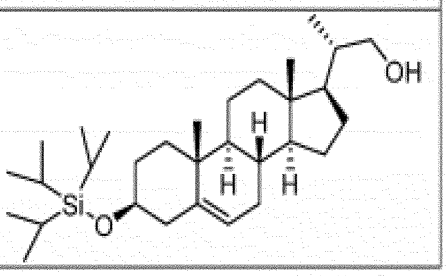
【表１６－１０】

| 化合物番号S- | 構造 | 化合物番号S- | 構造 |
|---|---|---|---|
| 70 |  | 73 |  |

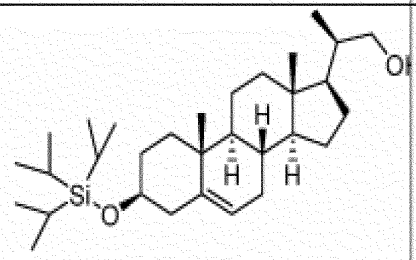
| 化合物番号S- | 構造 | 化合物番号S- | 構造 |
|---|---|---|---|
| 74 |  | 77 |  |
| 75 |  | 78 |  |
| 76 |  | | |

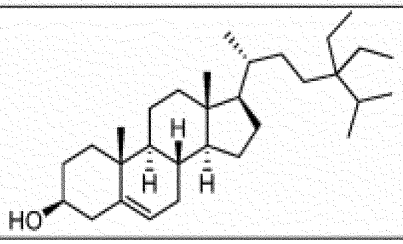
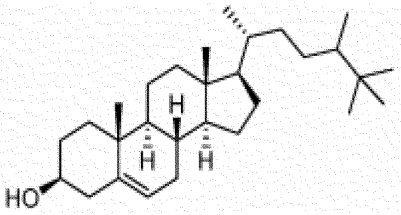
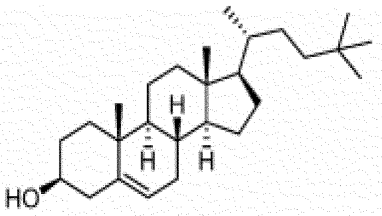
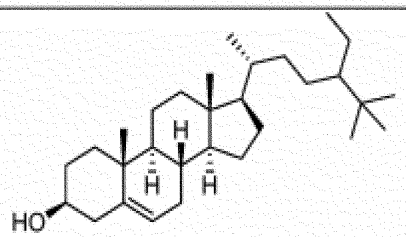
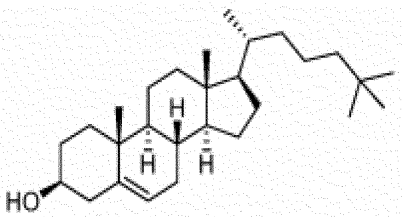
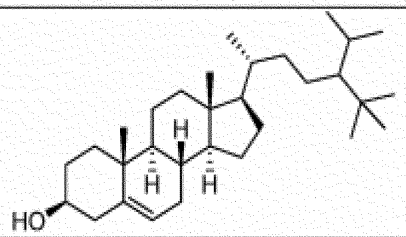
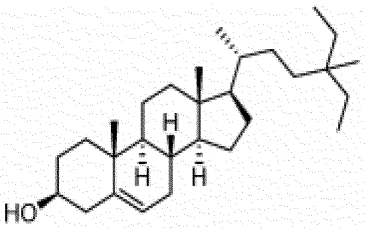
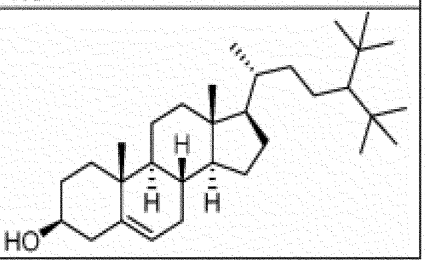
【表１６－１１】

| 化合物番号S- | 構造 | 化合物番号S- | 構造 |
|---|---|---|---|
| 79 |  | 80 |  |

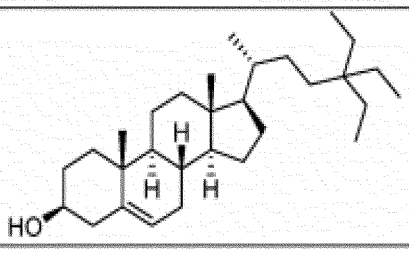
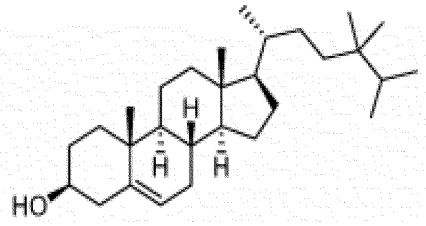
| 化合物番号S- | 構造 | 化合物番号S- | 構造 |
|---|---|---|---|
| 81 |  | 85 |  |
| 82 |  | 86 |  |
| 83 |  | 87 |  |
| 84 |  | 152 |  |

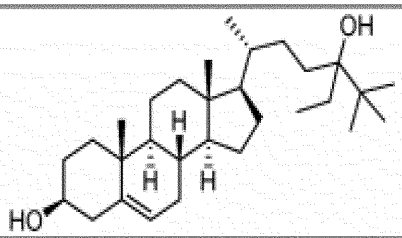
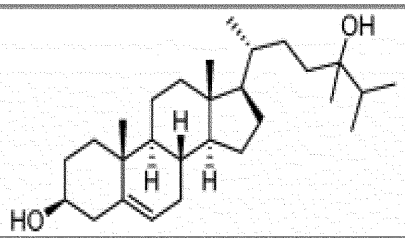
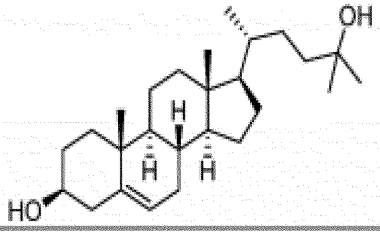
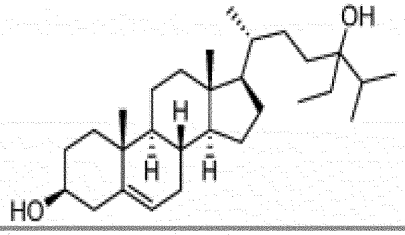
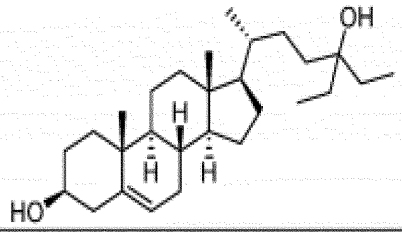
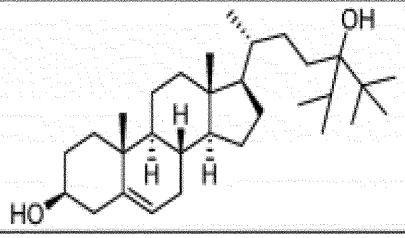
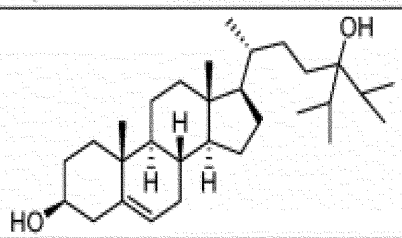
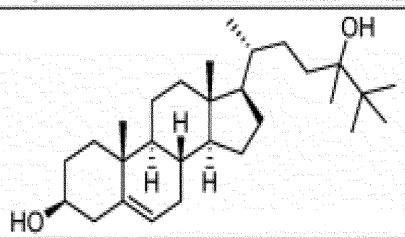
【表１６－１２】

| 化合物番号S- | 構造 | 化合物番号S- | 構造 |
|---|---|---|---|
| 157 |  | | |

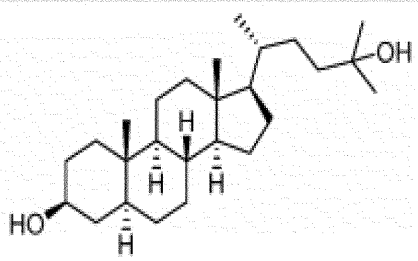
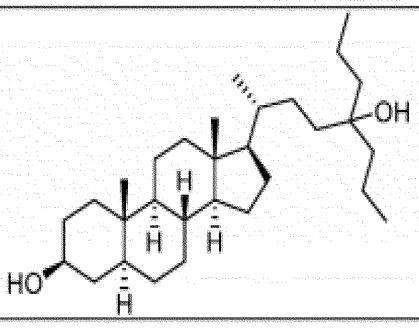
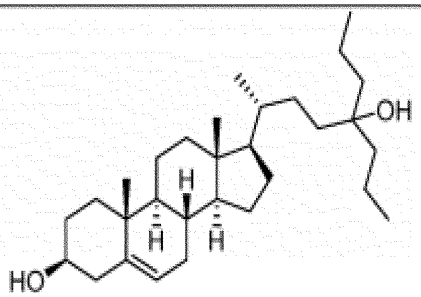
| 化合物番号S- | 構造 | 化合物番号S- | 構造 |
|---|---|---|---|
| 88 |  | 93 |  |
| 89 |  | 94 |  |
| 90 |  | 95 |  |
| 91 |  | 96 |  |

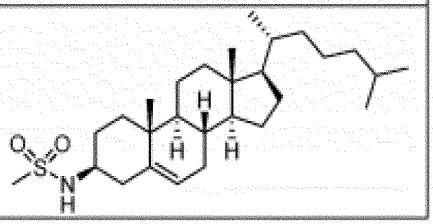
【表１６－１３】

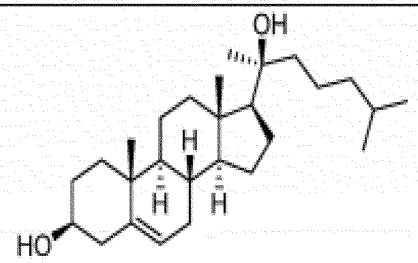
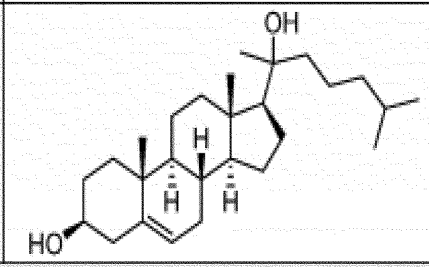
| 化合物番号S- | 構造 | 化合物番号S- | 構造 |
|---|---|---|---|
| 92 |  | 97 |  |

| 化合物番号S- | 構造 | 化合物番号S- | 構造 |
|---|---|---|---|
| 98 |  | 102 |  |
| 99 |  | 103 |  |
| 100 |  | 104 |  |
| 101 |  | 105 |  |

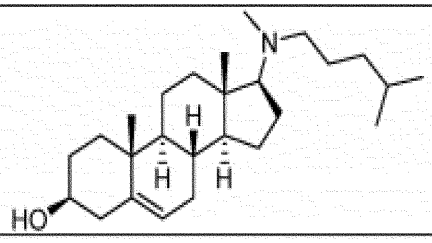
【表１６－１４】

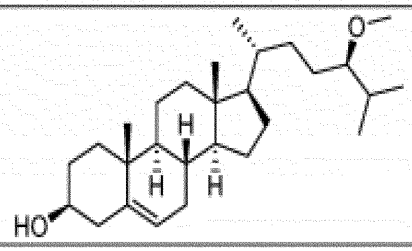
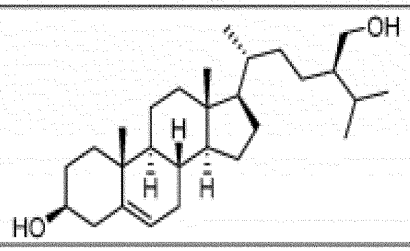
| 化合物番号S- | 構造 | 化合物番号S- | 構造 |
|---|---|---|---|
| 180 |  | 182 |  |
| 181 |  | | |

| 化合物番号S- | 構造 |
|---|---|
| 106 |  |

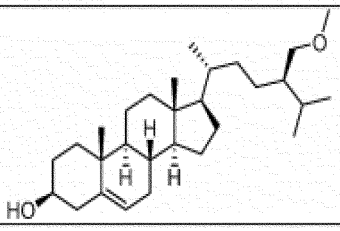
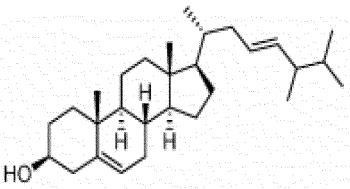
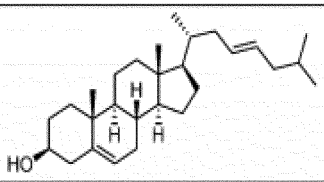
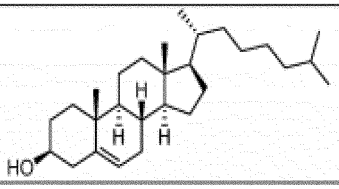
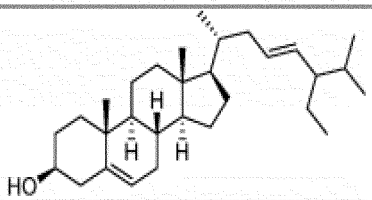
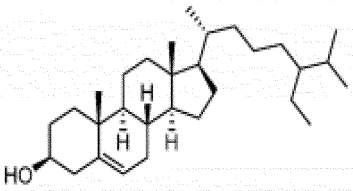
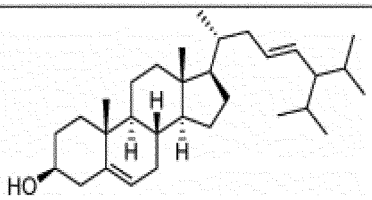
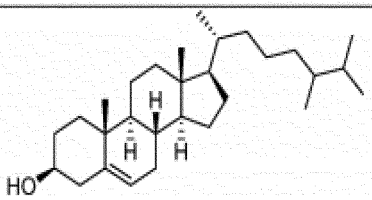
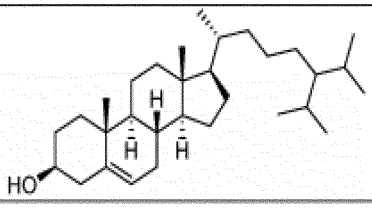
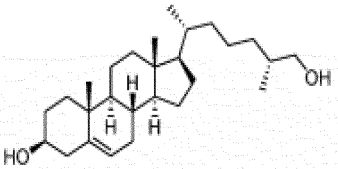
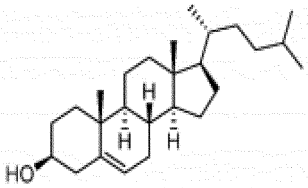
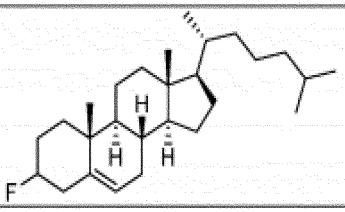
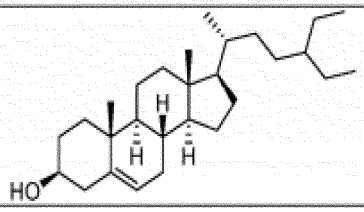
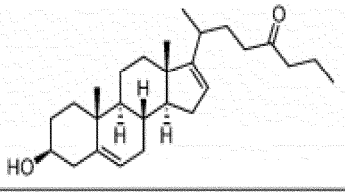
| 化合物番号S- | 構造 | 化合物番号S- | 構造 |
|---|---|---|---|
| 107 |  | 108 |  |

【表１６－１５】

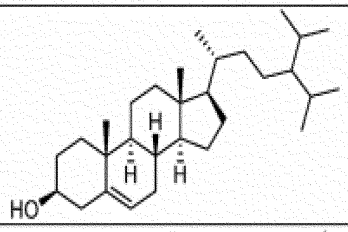
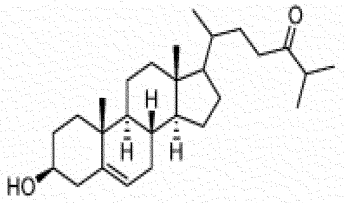
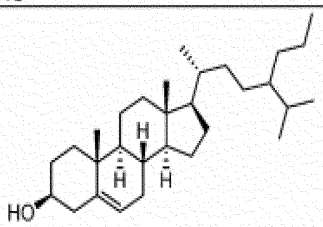
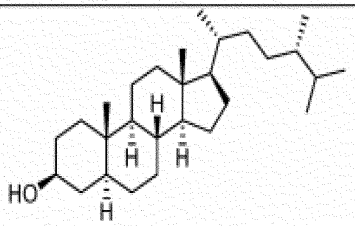
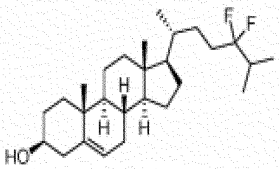
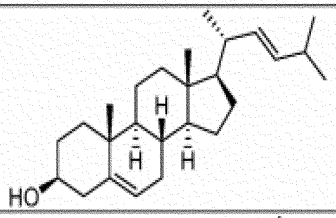
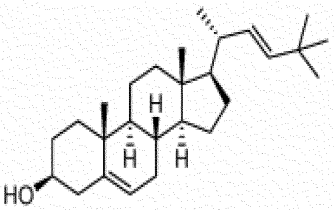
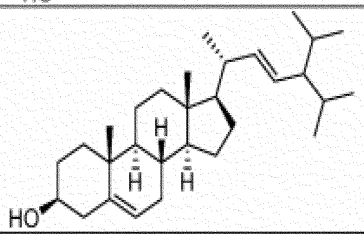
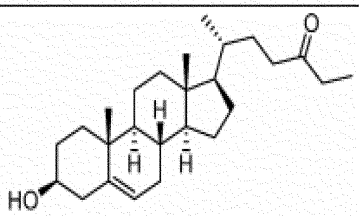
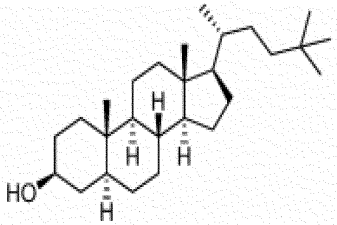
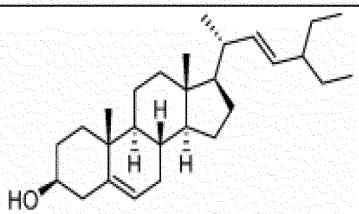
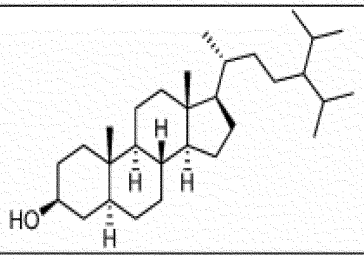
| 化合物番号S- | 構造 |
|---|---|
| 109 |  |

| 化合物番号S- | 構造 | 化合物番号S- | 構造 |
|---|---|---|---|
| 110 |  | 121 |  |

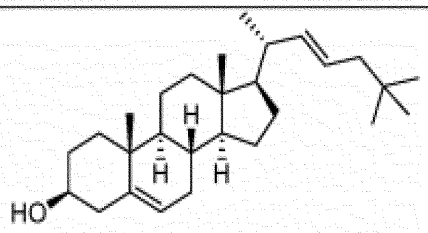
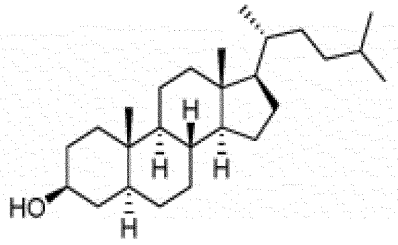
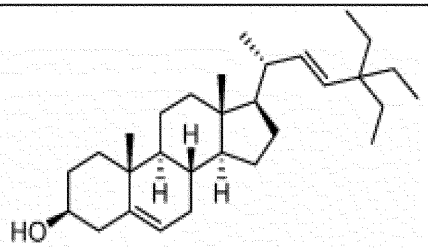
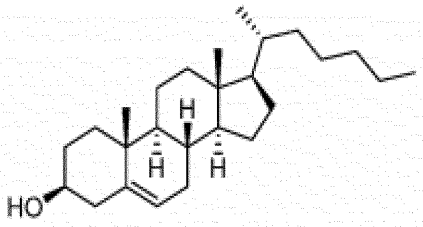
【表１６－１６】

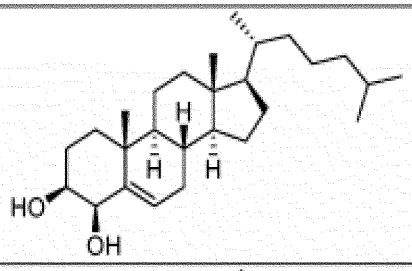
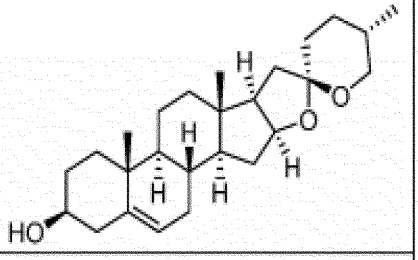
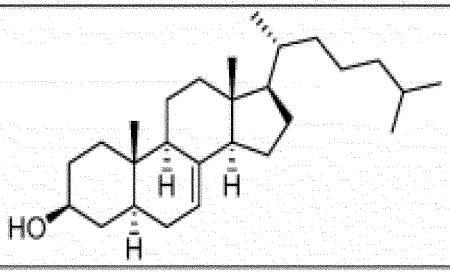
| 化合物番号S- | 構造 | 化合物番号S- | 構造 |
|---|---|---|---|
| 111 |  | 122 |  |
| 112 |  | 123 |  |
| 113 |  | 124 |  |
| 114 |  | 125 |  |
| 115 |  | 126 |  |
| 116 |  | 127 |  |
| 117 |  | 128 |  |

【表１６－１７】

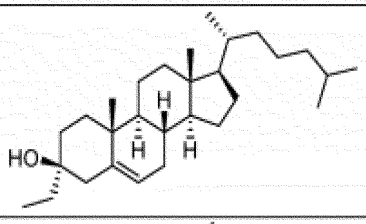
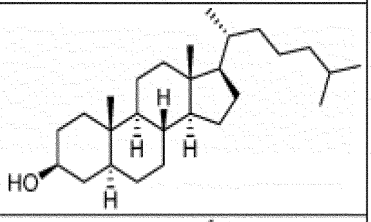
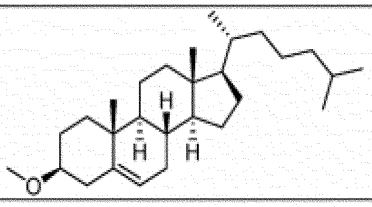
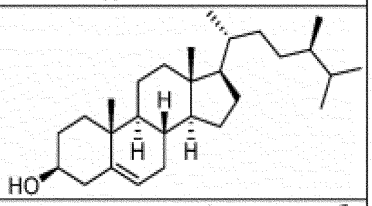
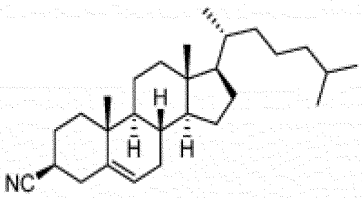
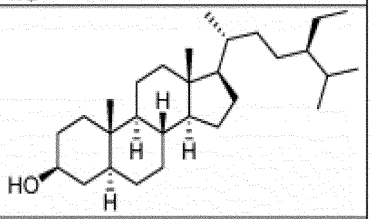
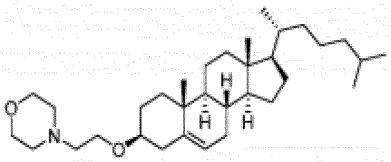
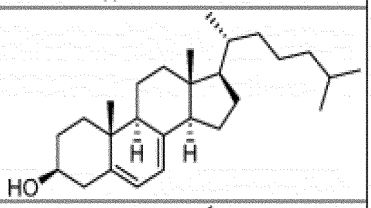
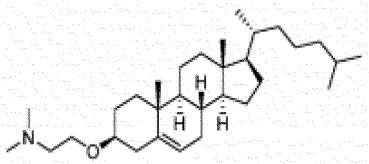
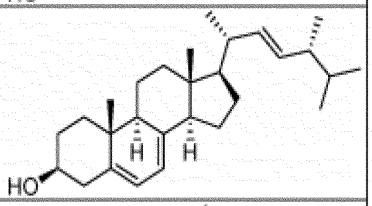
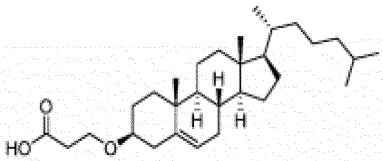
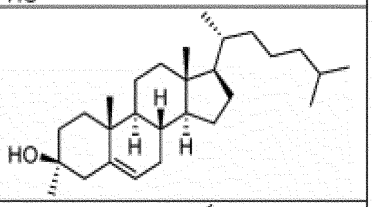
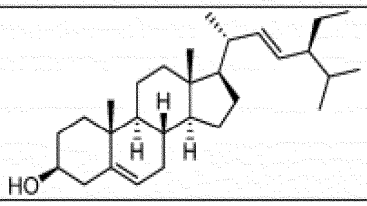
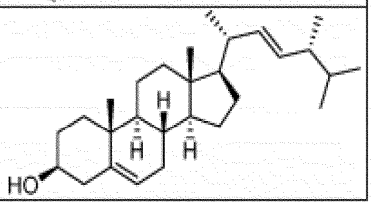
| 化合物番号S- | 構造 | 化合物番号S- | 構造 |
|---|---|---|---|
| 118 |  | 129 |  |
| 119 |  | 130 |  |
| 120 |  | 155 |  |
| 156 |  | 167 |  |
| 158 |  | 168 |  |
| 160 |  | 173 |  |

【表１６－１８】

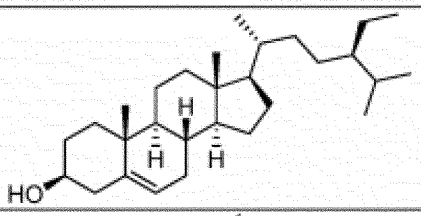
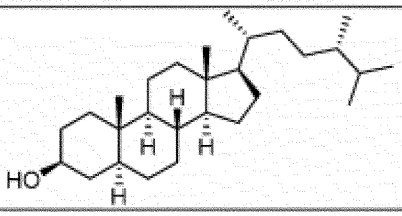
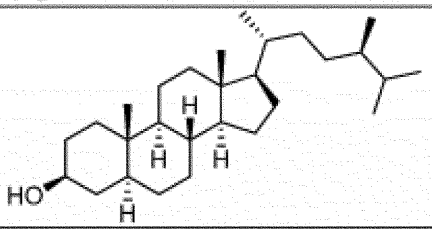
| 化合物番号S- | 構造 | 化合物番号S- | 構造 |
|---|---|---|---|
| 161 |  | 174 |  |
| 166 |  | 179 |  |

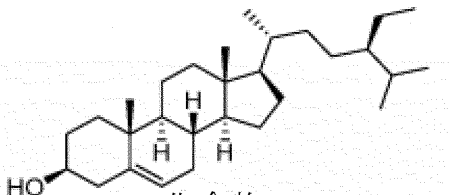
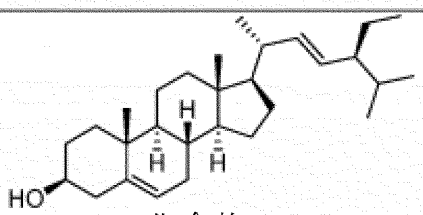
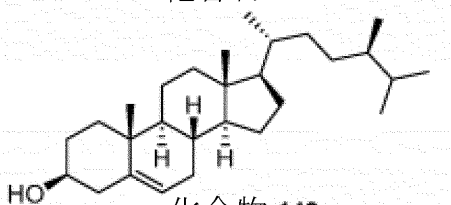
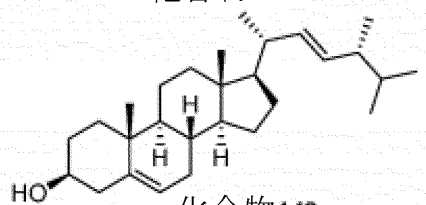
| 化合物番号S- | 構造 | 化合物番号S- | 構造 |
|---|---|---|---|
| 131 |  | 133 |  |
| 132 |  | | |

【表１６－１９】

| 化合物番号S- | 構造 | 化合物番号S- | 構造 |
|---|---|---|---|
| 134 |  | 142 |  |
| 135 |  | 143 |  |
| 136 |  | 144 |  |
| 137 |  | 145 |  |
| 138 |  | 146 |  |
| 139 |  | 147 |  |
| 140 |  | 148 |  |

【表１６－２０】

| 化合物番号S- | 構造 | 化合物番号S- | 構造 |
|---|---|---|---|
| 141 |  | 151 |  |
| 159 |  | | |

| 組成物Ｓ－番号 | 構造 |
|---|---|
| 183 |  化合物 141  化合物 140  化合物 143  化合物148 |

【０７５８】

Ｅ．脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）製剤

様々な実施形態では、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）は、開示される環状ＲＮＡを（例えば、１つ以上の標的細胞に）送達するための輸送ビヒクルとして使用され得る。

【０７５９】

本明細書に記載の脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）の形成は、当該技術分野で知られている任意の方法によって達成され得る。例えば、米国特許公開第ＵＳ２０１２／０１７８７０２Ａ１号に記載されており、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。脂質ナノ粒子組成物及びそれらを作製する方法の非限定的な例は、例えば、Ｓｅｍｐｌｅ ｅｔ ａｌ．（２０１０）Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２８：１７２－１７６；Ｊａｙａｒａｍａ ｅｔ ａｌ．（２０１２），Ａｎｇｅｗ．Ｃｈｅｍ．Ｉｎｔ．Ｅｄ．，５１：８５２９－８５３３；及びＭａｉｅｒ ｅｔ ａｌ．（２０１３）Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｔｈｅｒａｐｙ ２１，１５７０－１５７８に記載されており、これらの各々の内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０７６０】

一実施形態では、ＬＮＰ製剤は、例えば、国際特許公開第ＷＯ２０１１／１２７２５５号または同第ＷＯ２００８／１０３２７６号に記載されている方法によって調製され得、これらの各々の内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０７６１】
一実施形態では、本明細書に記載のＬＮＰ製剤は、ポリカチオン性組成物を含み得る。非限定的な例として、ポリカチオン性組成物は、米国特許公開第ＵＳ２００５／０２２２０６４Ａ１号の式１～６０から選択される組成物であり得、その内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。
【０７６２】
一実施形態では、脂質ナノ粒子は、米国特許公開第ＵＳ２０１３／０１５６８４５Ａ１号、及び国際特許公開第ＷＯ２０１３／０９３６４８Ａ２号または同第ＷＯ２０１２／０２４５２６Ａ２号に記載されている方法によって製剤化され得、これらの各々は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。
【０７６３】
一実施形態では、本明細書に記載の脂質ナノ粒子は、米国特許公開第ＵＳ２０１３／０１６４４００Ａ１号に記載されているシステム及び／または方法によって滅菌環境において作製され得、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。
【０７６４】
一実施形態では、ＬＮＰ製剤は、米国特許第８，４９２，３５９号に記載されている核酸－脂質粒子などのナノ粒子中で製剤化され得、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。
【０７６５】
ナノ粒子組成物は任意選択で、１つ以上のコーティングを含み得る。例えば、ナノ粒子組成物は、コーティングを有するカプセル、フィルム、または錠剤中で製剤化され得る。本明細書に記載の組成物を含むカプセル、フィルム、または錠剤は、任意の有用なサイズ、引張強度、硬度、または密度を有し得る。
【０７６６】
いくつかの実施形態では、本明細書に記載の脂質ナノ粒子は、マイクロ流体ミキサーを含む方法を使用して合成され得る。例示的なマイクロ流体ミキサーには、Ｐｒｅｃｉｓｉｏｎ Ｎａｎｏｓｙｓｔｅｍｓ（Ｖａｎｃｏｕｖｅｒ，ＢＣ，Ｃａｎａｄａ）、Ｍｉｃｒｏｉｎｎｏｖａ（Ａｌｌｅｒｈｅｉｌｉｇｅｎ ｂｅｉ Ｗｉｌｄｏｎ，Ａｕｓｔｒｉａ）によって製造されているものを含むがこれらに限定されないスリット指間マイクロミキサー及び／または交互ヘリングボーンマイクロミキサー（ＳＨＭ）（Ｚｈｉｇａｌｔｓｅｖ，Ｉ．Ｖ．ｅｔ ａｌ．（２０１２）Ｌａｎｇｍｕｉｒ．２８：３６３３－４０；Ｂｅｌｌｉｖｅａｕ，Ｎ．Ｍ．ｅｔ ａｌ．Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒ．Ｎｕｃｌｅｉｃ．Ａｃｉｄｓ．（２０１２）１：ｅ３７；Ｃｈｅｎ，Ｄ．ｅｔ ａｌ．Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．（２０１２）１３４（１６）：６９４８－５１が含まれ得るがこれらに限定されず、その各々は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。
【０７６７】
いくつかの実施形態では、ＳＨＭを含むＬＮＰ生成の方法は、少なくとも２つのインプットストリームの混合をさらに含み、混合は、マイクロ構造誘導性カオス的移流（ＭＩＣＡ）によって生じる。この方法によれば、流体ストリームは、回転流を引き起こし、互いの周りで流体を折り重ねるヘリングボーンパターンに存在するチャネルを通して流れる。この方法はまた、流体混合用の表面を含み得、その表面は、流体循環中に向きを変える。ＳＨＭを使用してＬＮＰを生成する方法には、米国特許公開第ＵＳ２００４／０２６２２３Ａ１号及び同第ＵＳ２０１２／０２７６２０９Ａ１号に開示されているものが含まれ、これらの各々は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。
【０７６８】
一実施形態では、脂質ナノ粒子は、マイクロミキサー、例えば、限定されないが、Ｉｎｓｔｉｔｕｔ ｆｕｒ Ｍｉｋｒｏｔｅｃｈｎｉｋ Ｍａｉｎｚ ＧｍｂＨ，Ｍａｉｎｚ Ｇｅｒｍａｎｙ）製のＳｌｉｔ Ｉｎｔｅｒｄｉｇｉｔａｌ Ｍｉｃｒｏｓｔｒｕｃｔｕｒｅｄ Ｍｉｘｅｒ（ＳＩＭＭ－Ｖ２）またはＳｔａｎｄａｒｄ Ｓｌｉｔ Ｉｎｔｅｒｄｉｇｉｔａｌ Ｍｉｃｒｏ Ｍｉｘｅｒ（ＳＳＩＭＭ）またはＣａｔｅｒｐｉｌｌａｒ

（ＣＰＭＭ）またはＩｍｐｉｎｇｉｎｇ－ｊｅｔ（ＩＪＭＭ）を使用して製剤化され得る。一実施形態では、脂質ナノ粒子は、マイクロ流体技術を使用して生成される（Ｗｈｉｔｅｓｉｄｅｓ（２００６）Ｎａｔｕｒｅ．４４２：３６８－３７３；及びＡｂｒａｈａｍ ｅｔ ａｌ．（２００２）Ｓｃｉｅｎｃｅ．２９５：６４７－６５１を参照されたく、その各々は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）。非限定的な例として、制御されたマイクロ流体製剤化は、マイクロチャネルにおいて低いレイノルズ数で安定した圧力駆動流のストリームを混合するための受動的方法を含む（例えば、Ａｂｒａｈａｍ ｅｔ ａｌ．（２００２）Ｓｃｉｅｎｃｅ．２９５：６４７６５１を参照されたく、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）。

【０７６９】

一実施形態では、本発明のｃｉｒｃＲＮＡは、マイクロミキサーチップ、例えば、限定されないが、Ｈａｒｖａｒｄ Ａｐｐａｒａｔｕｓ（Ｈｏｌｌｉｓｔｏｎ，ＭＡ）、Ｄｏｌｏｍｉｔｅ Ｍｉｃｒｏｆｌｕｉｄｉｃｓ（Ｒｏｙｓｔｏｎ，ＵＫ）、またはＰｒｅｃｉｓｉｏｎ Ｎａｎｏｓｙｓｔｅｍｓ（Ｖａｎ Ｃｏｕｖｅｒ，ＢＣ，Ｃａｎａｄａ）製のものを使用して生成された脂質ナノ粒子で製剤化され得る。マイクロミキサーチップは、分割及び混和メカニズムでの２つ以上の流体ストリームの急速混合のために使用され得る。

【０７７０】

一実施形態では、脂質ナノ粒子は、約１０～約１００ｎｍ、例えば、限定されないが、約１０～約２０ｎｍ、約１０～約３０ｎｍ、約１０～約４０ｎｍ、約１０～約５０ｎｍ、約１０～約６０ｎｍ、約１０～約７０ｎｍ、約１０～約８０ｎｍ、約１０～約９０ｎｍ、約２０～約３０ｎｍ、約２０～約４０ｎｍ、約２０～約５０ｎｍ、約２０～約６０ｎｍ、約２０～約７０ｎｍ、約２０～約８０ｎｍ、約２０～約９０ｎｍ、約２０～約１００ｎｍ、約３０～約４０ｎｍ、約３０～約５０ｎｍ、約３０～約６０ｎｍ、約３０～約７０ｎｍ、約３０～約８０ｎｍ、約３０～約９０ｎｍ、約３０～約１００ｎｍ、約４０～約５０ｎｍ、約４０～約６０ｎｍ、約４０～約７０ｎｍ、約４０～約８０ｎｍ、約４０～約９０ｎｍ、約４０～約１００ｎｍ、約５０～約６０ｎｍ、約５０～約７０ｎｍ約５０～約８０ｎｍ、約５０～約９０ｎｍ、約５０～約１００ｎｍ、約６０～約７０ｎｍ、約６０～約８０ｎｍ、約６０～約９０ｎｍ、約６０～約１００ｎｍ、約７０～約８０ｎｍ、約７０～約９０ｎｍ、約７０～約１００ｎｍ、約８０～約９０ｎｍ、約８０～約１００ｎｍ及び／または約９０～約１００ｎｍの直径を有し得る。一実施形態では、脂質ナノ粒子は、約１０～５００ｎｍの直径を有し得る。一実施形態では、脂質ナノ粒子は、１００ｎｍ超、１５０ｎｍ超、２００ｎｍ超、２５０ｎｍ超、３００ｎｍ超、３５０ｎｍ超、４００ｎｍ超、４５０ｎｍ超、５００ｎｍ超、５５０ｎｍ超、６００ｎｍ超、６５０ｎｍ超、７００ｎｍ超、７５０ｎｍ超、８００ｎｍ超、８５０ｎｍ超、９００ｎｍ超、９５０ｎｍ超または１０００ｎｍ超の直径を有し得る。各可能性は、本発明の別の実施形態を表す。

【０７７１】

いくつかの実施形態では、ナノ粒子（例えば、脂質ナノ粒子）は、１０～５００ｎｍ、２０～４００ｎｍ、３０～３００ｎｍ、または４０～２００ｎｍの平均直径を有する。いくつかの実施形態では、ナノ粒子（例えば、脂質ナノ粒子）は、５０～１５０ｎｍ、５０～２００ｎｍ、８０～１００ｎｍ、または８０～２００ｎｍの平均直径を有する。

【０７７２】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の脂質ナノ粒子は、０．１μｍ未満から最大で１ｍｍ、例えば、限定されないが、０．１μｍ未満、１．０μｍ未満、５μｍ未満、１０μｍ未満、１５μｍ未満、２０μｍ未満、２５μｍ未満、３０μｍ未満、３５μｍ未満、４０μｍ未満、５０μｍ未満、５５μｍ未満、６０μｍ未満、６５μｍ未満、７０μｍ未満、７５μｍ未満、８０μｍ未満、８５μｍ未満、９０μｍ未満、９５μｍ未満、１００μｍ未満、１２５μｍ未満、１５０μｍ未満、１７５μｍ未満、２００μｍ未満、２２５μｍ未満、２５０μｍ未満、２７５μｍ未満、３００μｍ未満、３２５μｍ未満、３５０μｍ未満、３７５μｍ未満、４００μｍ未満、４２５μｍ未満、４５０μｍ未満、４７

５μｍ未満、５００μｍ未満、５２５μｍ未満、５５０μｍ未満、５７５μｍ未満、６００μｍ未満、６２５μｍ未満、６５０μｍ未満、６７５μｍ未満、７００μｍ未満、７２５μｍ未満、７５０μｍ未満、７７５μｍ未満、８００μｍ未満、８２５μｍ未満、８５０μｍ未満、８７５μｍ未満、９００μｍ未満、９２５μｍ未満、９５０μｍ未満、９７５μｍ未満の直径を有し得る。

【０７７３】

別の実施形態では、ＬＮＰは、約１ｎｍ～約１００ｎｍ、約１ｎｍ～約１０ｎｍ、約１ｎｍ～約２０ｎｍ、約１ｎｍ～約３０ｎｍ、約１ｎｍ～約４０ｎｍ、約１ｎｍ～約５０ｎｍ、約１ｎｍ～約６０ｎｍ、約１ｎｍ～約７０ｎｍ、約１ｎｍ～約８０ｎｍ、約１ｎｍ～約９０ｎｍ、約５ｎｍ～約１００ｎｍ、約５ｎｍ～約１０ｎｍ、約５ｎｍ～約２０ｎｍ、約５ｎｍ～約３０ｎｍ、約５ｎｍ～約４０ｎｍ、約５ｎｍ～約５０ｎｍ、約５ｎｍ～約６０ｎｍ、約５ｎｍ～約７０ｎｍ、約５ｎｍ～約８０ｎｍ、約５ｎｍ～約９０ｎｍ、約１０～約５０ｎＭ、約２０～約５０ｎｍ、約３０～約５０ｎｍ、約４０～約５０ｎｍ、約２０～約６０ｎｍ、約３０～約６０ｎｍ、約４０～約６０ｎｍ、約２０～約７０ｎｍ、約３０～約７０ｎｍ、約４０～約７０ｎｍ、約５０～約７０ｎｍ、約６０～約７０ｎｍ、約２０～約８０ｎｍ、約３０～約８０ｎｍ、約４０～約８０ｎｍ、約５０～約８０ｎｍ、約６０～約８０ｎｍ、約２０～約９０ｎｍ、約３０～約９０ｎｍ、約４０～約９０ｎｍ、約５０～約９０ｎｍ、約６０～約９０ｎｍ及び／または約７０～約９０ｎｍの直径を有し得る。各可能性は、本発明の別の実施形態を表す。

【０７７４】

ナノ粒子組成物は、比較的均質であり得る。ナノ粒子組成物の均一性、例えば、ナノ粒子組成物の粒子サイズ分布を示すために多分散性指数が使用され得る。低い（例えば、０．３未満）多分散性指数は通常、狭い粒子サイズ分布を示す。ナノ粒子組成物は、約０～約０．２５、例えば、０．０１、０．０２、０．０３、０．０４、０．０５、０．０６、０．０７、０．０８、０．０９、０．１０、０．１　１、０．１２、０．１３、０．１４、０．１５、０．１６、０．１７、０．１８、０．１９、０．２０、０．２１、０．２２、０．２３、０．２４、または０．２５の多分散性指数を有し得る。いくつかの実施形態では、ナノ粒子組成物の多分散性指数は、約０．１０～約０．２０であり得る。各可能性は、本発明の別の実施形態を表す。

【０７７５】

組成物の界面動電位を示すためにナノ粒子組成物のゼータ電位が使用され得る。例えば、ゼータ電位は、ナノ粒子組成物の表面電荷を表し得る。より高く荷電した種は、細胞、組織、及び身体における他の要素と不要に相互作用し得るので、比較的低い正または負電荷を有するナノ粒子組成物が通常は所望である。いくつかの実施形態では、ナノ粒子組成物のゼータ電位は、約－２０ｍＶ～約＋２０ｍＶ、約－２０ｍＶ～約＋１５ｍＶ、約－２０ｍＶ～約＋１０ｍＶ、約－２０ｍＶ～約＋５ｍＶ、約－２０ｍＶ～約０ｍＶ、約－２０ｍＶ～約－５ｍＶ、約－２０ｍＶ～約－１０ｍＶ、約－２０ｍＶ～約－１５ｍＶ約－２０ｍＶ～約＋２０ｍＶ、約－２０ｍＶ～約＋１５ｍＶ、約－２０ｍＶ～約＋１０ｍＶ、約－２０ｍＶ～約＋５ｍＶ、約－２０ｍＶ～約０ｍＶ、約０ｍＶ～約＋２０ｍＶ、約０ｍＶ～約＋１５ｍＶ、約０ｍＶ～約＋１０ｍＶ、約０ｍＶ～約＋５ｍＶ、約＋５ｍＶ～約＋２０ｍＶ、約＋５ｍＶ～約＋１５ｍＶ、または約＋５ｍＶ～約＋１０ｍＶであり得る。各可能性は、本発明の別の実施形態を表す。

【０７７６】

治療剤の封入の効率は、提供された初期量と比べて、調製後にナノ粒子組成物に封入される、またはそうでなければ関連付けられる治療剤の量を表す。封入効率は、望ましくは高い（例えば、１００％に近い）。封入効率は、例えば、ナノ粒子組成物を１つ以上の有機溶媒または洗浄剤で分解する前及び後にナノ粒子組成物を含有する溶液中の治療剤の量を比較することによって測定され得る。蛍光は、溶液中の遊離治療剤（例えば、核酸）の量を測定するために使用され得る。本明細書に記載のナノ粒子組成物について、治療剤の封入効率は、少なくとも５０％、例えば、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７

５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％であり得る。いくつかの実施形態では、封入効率は、少なくとも８０％であり得る。特定の実施形態では、封入効率は、少なくとも９０％であり得る。各可能性は、本発明の別の実施形態を表す。いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子は、０．４未満の多重多様度を有する。いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子は、中性ｐＨで正味中性電荷を有する。いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子は、５０～２００ｎｍの平均直径を有する。

【０７７７】

脂質ナノ粒子製剤の特性は、カチオン性脂質成分の選択、カチオン性脂質飽和の程度、非カチオン性脂質成分の選択、非カチオン性脂質飽和の程度、構造脂質成分の選択、ＰＥＧ化の特質、全ての成分の比及びサイズなどの生物物理学的パラメータを含むがこれらに限定されない要因によって影響を受け得る。本明細書に記載されるように、ＰＥＧ脂質成分の純度もまた、ＬＮＰの特性及び性能にとって重要である。

【０７７８】

Ｆ．脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）製剤の調製方法

一実施形態では、脂質ナノ粒子製剤は、国際公開第ＷＯ２０１１１２７２５５号または同第ＷＯ２００８１０３２７６号に記載されている方法によって調製され得、これらの各々は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子製剤は、国際公開第ＷＯ２０１９１３１７７０号に記載されているとおりであり得、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０７７９】

いくつかの実施形態では、環状ＲＮＡは、米国特許出願第１５／８０９，６８０号に記載されているプロセスに従って製剤化される。いくつかの実施形態では、本発明は、輸送ビヒクルに環状ＲＮＡを封入するプロセスであって、事前に形成した輸送ビヒクル（すなわち、ＲＮＡの非存在下で形成した）内に脂質を形成し、次いで事前に形成した輸送ビヒクルをＲＮＡと組み合わせるステップを含む、プロセスを提供する。いくつかの実施形態では、新規の製剤化プロセスは、脂質ナノ粒子を予形成するステップを伴わずに調製された（例えば、脂質をＲＮＡと直接組み合わせた）同じＲＮＡ製剤と比較して、より高い効力（ペプチドまたはタンパク質発現）及びより高い有効性（生物学的に関連するエンドポイントの改善）を、インビトロ及びインビボの両方で有し、潜在的により良好な忍容性を伴う、ＲＮＡ製剤をもたらす。

【０７８０】

ＲＮＡの特定のカチオン性脂質ナノ粒子製剤の場合、ＲＮＡの高い封入を達成するために、緩衝液（例えば、クエン酸緩衝液）中のＲＮＡを加熱する必要がある。これらのプロセスまたは方法では、製剤化後（ナノ粒子の形成後）の加熱は脂質ナノ粒子へのＲＮＡの封入効率を増加させないため、製剤化プロセスの前に加熱を行う必要がある（すなわち、別箇の成分を加熱する）。対照的に、本発明の新規プロセスのいくつかの実施形態では、ＲＮＡの加熱の順序は、ＲＮＡ封入パーセンテージに影響を与えるようには見えない。いくつかの実施形態では、予形成脂質ナノ粒子を含む溶液、ＲＮＡを含む溶液、及び脂質ナノ粒子に封入されたＲＮＡを含む混合溶液のうちの１つ以上の加熱は、製剤化プロセスの前後で生じる必要がない（すなわち、周囲温度で維持される）。

【０７８１】

ＲＮＡは、ＲＮＡが脂質ナノ粒子に封入され得るように、脂質溶液と混合される溶液にて提供され得る。好適なＲＮＡ溶液は、様々な濃度で封入されるＲＮＡを含有する任意の水溶液であり得る。例えば、好適なＲＮＡ溶液は、約０．０１ｍｇ／ｍｌ、０．０５ｍｇ／ｍｌ、０．０６ｍｇ／ｍｌ、０．０７ｍｇ／ｍｌ、０．０８ｍｇ／ｍｌ、０．０９ｍｇ／ｍｌ、０．１ｍｇ／ｍｌ、０．１５ｍｇ／ｍｌ、０．２ｍｇ／ｍｌ、０．３ｍｇ／ｍｌ、０．４ｍｇ／ｍｌ、０．５ｍｇ／ｍｌ、０．６ｍｇ／ｍｌ、０．７ｍｇ／ｍｌ、０．８ｍｇ／ｍｌ、０．９ｍｇ／ｍｌ、または１．０ｍｇ／ｍｌ以上の濃度でＲＮＡを含有し得る。いくつかの実施形態では、好適なＲＮＡ溶液は、約０．０１～１．０ｍｇ／ｍｌ、０

．０１～０．９ｍｇ／ｍｌ、０．０１～０．８ｍｇ／ｍｌ、０．０１～０．７ｍｇ／ｍｌ、０．０１～０．６ｍｇ／ｍｌ、０．０１～０．５ｍｇ／ｍｌ、０．０１～０．４ｍｇ／ｍｌ、０．０１～０．３ｍｇ／ｍｌ、０．０１～０．２ｍｇ／ｍｌ、０．０１～０．１ｍｇ／ｍｌ、０．０５～１．０ｍｇ／ｍｌ、０．０５～０．９ｍｇ／ｍｌ、０．０５～０．８ｍｇ／ｍｌ、０．０５～０．７ｍｇ／ｍｌ、０．０５～０．６ｍｇ／ｍｌ、０．０５～０．５ｍｇ／ｍｌ、０．０５～０．４ｍｇ／ｍｌ、０．０５～０．３ｍｇ／ｍｌ、０．０５～０．２ｍｇ／ｍｌ、０．０５～０．１ｍｇ／ｍｌ、０．１～１．０ｍｇ／ｍｌ、０．２～０．９ｍｇ／ｍｌ、０．３～０．８ｍｇ／ｍｌ、０．４～０．７ｍｇ／ｍｌ、または０．５～０．６ｍｇ／ｍｌの範囲の濃度でＲＮＡを含有し得る。

【０７８２】

典型的には、好適なＲＮＡ溶液はまた、緩衝剤及び／または塩を含有し得る。通常、緩衝剤は、ＨＥＰＥＳ、トリス、硫酸アンモニウム、重炭酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、リン酸カリウムまたはリン酸ナトリウムを含み得る。いくつかの実施形態では、緩衝剤の好適な濃度は、約０．１ｍＭ～１００ｍＭ、０．５ｍＭ～９０ｍＭ、１．０ｍＭ～８０ｍＭ、２ｍＭ～７０ｍＭ、３ｍＭ～６０ｍＭ、４ｍＭ～５０ｍＭ、５ｍＭ～４０ｍＭ、６ｍＭ～３０ｍＭ、７ｍＭ～２０ｍＭ、８ｍＭ～１５ｍＭ、または９～１２ｍＭの範囲であり得る。

【０７８３】

例示的な塩には、塩化ナトリウム、塩化マグネシウム、及び塩化カリウムが含まれ得る。いくつかの実施形態では、ＲＮＡ溶液における塩の好適な濃度は、約１ｍＭ～５００ｍＭ、５ｍＭ～４００ｍＭ、１０ｍＭ～３５０ｍＭ、１５ｍＭ～３００ｍＭ、２０ｍＭ～２５０ｍＭ、３０ｍＭ～２００ｍＭ、４０ｍＭ～１９０ｍＭ、５０ｍＭ～１８０ｍＭ、５０ｍＭ～１７０ｍＭ、５０ｍＭ～１６０ｍＭ、５０ｍＭ～１５０ｍＭ、または５０ｍＭ～１００ｍＭの範囲であり得る。

【０７８４】

いくつかの実施形態では、好適なＲＮＡ溶液は、約３．５～６．５、３．５～６．０、３．５～５．５、３．５～５．０、３．５～４．５、４．０～５．５、４．０～５．０、４．０～４．９、４．０～４．８、４．０～４．７、４．０～４．６、または４．０～４．５の範囲のｐＨを有し得る。

【０７８５】

様々な方法が、本発明に好適なＲＮＡ溶液を調製するために使用され得る。いくつかの実施形態では、ＲＮＡは、本明細書に記載の緩衝溶液に直接的に溶解され得る。いくつかの実施形態では、ＲＮＡ溶液は、封入のための脂質溶液と混合する前に、ＲＮＡストック溶液を緩衝液と混合することによって生成され得る。いくつかの実施形態では、ＲＮＡ溶液は、封入のための脂質溶液と混合する直前に、ＲＮＡストック溶液を緩衝液と混合することによって生成され得る。

【０７８６】

本発明によれば、脂質溶液は、ＲＮＡの封入のための輸送ビヒクルを形成するのに好適な脂質の混合物を含有する。いくつかの実施形態では、好適な脂質溶液は、エタノールベースである。例えば、好適な脂質溶液は、純粋なエタノール（すなわち、１００％エタノール）に溶解した所望の脂質の混合物を含有し得る。別の実施形態では、好適な脂質溶液は、イソプロピルアルコールベースである。別の実施形態では、好適な脂質溶液は、ジメチルスルホキシドベースである。別の実施形態では、好適な脂質溶液は、エタノール、イソプロピルアルコール及びジメチルスルホキシドを含むがこれらに限定されない好適な溶媒の混合物である。

【０７８７】

好適な脂質溶液は、様々な濃度で所望の脂質の混合物を含有し得る。いくつかの実施形態では、好適な脂質溶液は、約０．１～１００ｍｇ／ｍｌ、０．５～９０ｍｇ／ｍｌ、１．０～８０ｍｇ／ｍｌ、１．０～７０ｍｇ／ｍｌ、１．０～６０ｍｇ／ｍｌ、１．０～５０ｍｇ／ｍｌ、１．０～４０ｍｇ／ｍｌ、１．０～３０ｍｇ／ｍｌ、１．０～２０ｍｇ／

ｍｌ、１．０～１５ｍｇ／ｍｌ、１．０～１０ｍｇ／ｍｌ、１．０～９ｍｇ／ｍｌ、１．０～８ｍｇ／ｍｌ、１．０～７ｍｇ／ｍｌ、１．０～６ｍｇ／ｍｌ、または１．０～５ｍｇ／ｍｌの範囲の総濃度で所望の脂質の混合物を含有し得る。

【０７８８】

Ｇ．リポソーム

特定の実施形態では、リポソームまたは他の脂質二重層小胞が本明細書に開示され、１つ以上の標的細胞への環状ＲＡＮの送達及び放出を促進または向上するための成分としてまたは輸送ビヒクル全体として使用され得る。リポソームは、通常、微細な袋または小胞を形成する１つ以上の二重層の膜によって外側の媒体から隔離された内部空間を有することを特徴とする。リポソームの二重層膜は、典型的には、脂質、すなわち、空間的に分離された疎水性または親水性ドメインを含む、合成または天然由来の両親媒性分子によって形成される（Ｌａｓｉｃ，Ｄ，ａｎｄ Ｐａｐａｈａｄｊｏｐｏｕｌｏｓ，Ｄ．，ｅｄｓ．Ｍｅｄｉｃａｌ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ ｏｆ Ｌｉｐｏｓｏｍｅｓ．Ｅｌｓｅｖｉｅｒ，Ａｍｓｔｅｒｄａｍ，１９９８）。

【０７８９】

いくつかの実施形態では、環状ＲＮＡは、封入されるか、またはリポソームは、機械的分散、溶媒分散、及び／または洗剤除去を含むが、これらに限定されない、様々な方法を使用して調製され得る。これらの方法はそれぞれ、有機溶媒から脂質を乾燥させ、脂質を水性媒体に分散させ、リポソームのサイズを変更し、／リポソーム懸濁液を精製するステップを含む（Ｇｏｍｅｚ ｅｔ ａｌ．，ＡＣＳ Ｏｍｅｇａ．２０１９．４（６）：１０８６６－１０８７６）。リポソーム調製の様々な他の方法は、Ａｋｂａｒｚａｄｅｈ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｎｏｓｃａｌｅ Ｒｅｓ Ｌｅｔｔ．２０１３；８（１）：１０２に見出すことができる。いくつかの実施形態では、環状ＲＮＡは、受動的に（すなわち、環状ＲＮＡは、リポソーム形成中に封入される）または能動的に（すなわち、リポソーム形成後に）装填され得る。

【０７９０】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示するリポソームは、１つ以上の二重層を含み得る。特定の実施形態では、リポソームは、多層小胞または単層小胞を含み得る。

【０７９１】

特定の実施形態では、本明細書に記載のリポソームは、天然由来または操作されたリン脂質を含む。いくつかの実施形態では、リポソームは、リポソーム全体の構造の安定性を補助するＰＥＧ脂質をさらに含むことができる。コルチコステロイド及び他のステロイドを含むがこれらに限定されない他の改善は、リポソームの構造及び安定性の維持を支援するために使用され得る。

【０７９２】

Ｈ．デンドリマー

特定の実施形態では、環状ＲＮＡを輸送するための輸送ビヒクルは、デンドリマーを含む。「デンドリマー」の使用は、輸送ビヒクルの構造的モチーフを説明する。いくつかの実施形態では、デンドリマーは、内部コア及び内部コアから伸びるまたは付着する１つ以上の層（すなわち、世代層）を含むが、これに限定されない。いくつかの実施形態では、世代層は、１つ以上の分岐点及び最も外側の世代層に付着する末端基の外部表面を含み得る。特定の実施形態では、分岐点は、主に単分散され得、内部コアの周りに構築された対称分岐ユニットを含有する。いくつかの実施形態では、内部コアは

【０７９３】

デンドリマーの合成は、発散法、収束成長、ハイパーコア及び分岐モノマー成長、二重指数成長、レゴ化学、クリック化学、ならびに当該技術分野で利用可能な他の方法を含み得る（Ｍｅｎｄｅｓ Ｌ． ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌｅｓ．２０１７．２２（９）：１４０１は、これらの方法をさらに説明する）。

【０７９４】

Ｉ．ポリマー系送達

特定の実施形態では、本明細書に記載されるように、環状ＲＮＡポリヌクレオチドのための輸送ビヒクルは、ポリマーナノ粒子を含む。いくつかの実施形態では、ポリマーナノ粒子は、ナノカプセル及びナノスフィアを含む。いくつかの実施形態では、ナノカプセルは、ポリマーシェルに囲まれた油性コアで構成される。いくつかの実施形態では、環状ＲＮＡは、コア内に含まれ、高分子シェルは、環状ＲＮＡの放出を制御する。一方、ナノスフィアは、環状ＲＮＡが表面に保持または吸収される連続的なポリマーネットワークを含む。いくつかの実施形態では、カチオン性ポリマーは、負荷電核酸及び細胞膜に対するカチオンの好ましい静電相互作用に起因して、環状ＲＮＡを封入するために使用される。

【０７９５】

ポリマーナノ粒子は、様々な方法によって調製され得る。いくつかの実施形態では、ポリマーナノ粒子は、ナノ沈殿、エマルション技術、溶媒蒸発、溶媒拡散、逆塩析、または当該技術分野で利用可能な他の方法によって調製され得る。

【０７９６】

Ｊ．ポリマー－脂質ハイブリッド

特定の実施形態では、本明細書に記載されるように、環状ＲＮＡポリヌクレオチドのための輸送ビヒクルは、ポリマー－脂質ハイブリッドナノ粒子（ＬＰＨＮＰ）を含む。いくつかの実施形態では、ＬＰＨＮＰは、脂質二重層内に包まれたポリマーコアを含む。いくつかの実施形態では、ポリマーコアは、環状ＲＮＡポリヌクレオチドを封入する。いくつかの実施形態では、ＬＰＨＮＰは、外側脂質二重層をさらに含む。特定の実施形態では、この外側脂質二重層は、脂質系ナノ粒子の安定性を補助するために、ＰＥＧ－脂質、ヘルパー脂質、コレステロールまたは当該技術分野で知られている他の分子を含む。ポリマーコアに最も近い脂質二重層は、ＬＰＨＮＰの形成中の閉じ込められた環状ＲＮＡの損失を緩和し、輸送ビヒクルの外側からポリマーコアへの水の拡散を防止することによって、ポリマーコアの分解から保護する（Ｍｕｋｈｅｒｊｅｅ　ｅｔ　ａｌ．，Ｉｎ　Ｊ．Ｎａｎｏｍｅｄｉｃｉｎｅ．２０１９；１４：１９３７－１９５２）。

【０７９７】

ＬＰＨＮＰを開発及び製剤化する様々な方法がある。特定の実施形態では、ＬＰＨＮＰは、当該技術分野で利用可能な１つのステップまたは２つのステップの方法を使用して開発される。いくつかの実施形態では、ＬＰＨＮＰを形成するための１つのステップの方法は、ナノ沈殿または乳化溶媒蒸発によるものである。特定の実施形態では、２つのステップの方法は、ナノ沈殿、乳化溶媒蒸発、高圧均質化、または当該技術分野で利用可能な他の方法を含む。

【０７９８】

Ｋ．ペプチド系送達

特定の実施形態では、環状ＲＮＡは、ペプチド系送達機構を使用して輸送することができる。いくつかの実施形態では、ペプチド系送達機構は、リポタンパク質を含む。送達される薬物のサイズに基づいて、リポタンパク質は、低密度（ＬＤＬ）または高密度リポタンパク質（ＨＤＬ）のいずれかであり得る。ＵＳ８７３４８５３Ｂ２に見られるように、高密度リポタンパク質は、インビボ及びインビトロで核酸を輸送することができる。

【０７９９】

特定の実施形態では、脂質成分は、コレステロールを含む。より具体的な実施形態では、脂質成分は、コレステロール及びコレステロールオレアートの組み合わせを含む。

【０８００】

ＨＤＬ－核酸粒子は、任意のサイズであり得るが、特定の実施形態では、粒子は、約１００オングストローム～約５００オングストロームの分子サイズを有する。より具体的な実施形態では、粒子は、約１００オングストローム～約３００オングストロームの分子サイズを有する。サイズは、粒子に組み込まれる核酸成分のサイズに依存し得る。

【０８０１】

ＨＤＬ－核酸粒子は、広範囲の分子量を有し得る。重量は、粒子に組み込まれる核酸のサイズに依存する。例えば、いくつかの実施形態では、粒子は、約１００，０００ダルト

ン～約１，０００，０００ダルトンの分子量を有する。より具体的な実施形態では、粒子は、約１００，０００ダルトン～約５００，０００ダルトンの分子量を有する。特定の実施形態では、粒子は、約１００，０００ダルトン～約３００，０００ダルトンの分子量を有する。

【０８０２】

本発明のＨＤＬ－核酸粒子は、様々な方法で作製することができる。例えば、核酸（例えば、ｓｉＲＮＡ）は、核酸を、連続した正荷電アミノ酸からなるペプチドまたはポリペプチドと組み合わせることによって中和され得る。例えば、上述したように、アミノ酸配列は、２つ以上の連続したリジン残基を含み得る。アミノ酸配列の正電荷は、負電荷を帯びた核酸分子を中和する。次いで、核酸は、Ｌａｃｋｏ ｅｔ ａｌ．（２００２）に記載される方法を使用して、ＨＤＬ粒子に封入することができる。

【０８０３】

Ｌ．炭水化物担体

特定の実施形態では、環状ＲＮＡポリヌクレオチドは、炭水化物担体または糖ナノカプセルを使用して輸送することができる。特定の実施形態では、炭水化物担体は、糖で装飾されたナノ粒子、ペプチド及び糖でコンジュゲートされたデンドリマー、多糖系ナノ粒子、及び当技術分野で利用可能な他の炭水化物系担体を含む。本明細書に記載されるように、炭水化物分子の組み込みは、合成手段を介してもよい。

【０８０４】

いくつかの実施形態では、炭水化物担体は、多糖類を含む。これらの多糖は、標的細胞の微生物細胞壁から作製され得る。例えば、マンナン炭水化物を含む炭水化物担体は、ｍＲＮＡを良好に送達することが示されている（Ｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｎｏ Ｌｅｔｔ．２０２０．２０（３）：１４９９－１５０９）。

【０８０５】

Ｍ．グリカン装飾ナノ粒子／グリコナノ粒子

特定の実施形態では、本明細書で提供されるように、環状ＲＮＡの転移ビヒクルは、グリコナノ粒子（ＧｌｙｃｏＮＰ）である。当技術分野で知られているように、グリコナノ粒子は、金、酸化鉄、半導体ナノ粒子、またはそれらの組み合わせを含むコアを含む。いくつかの実施形態では、グリコナノ粒子は、炭水化物を使用して官能化される。特定の実施形態では、グリコナノ粒子は、カーボンナノチューブまたはグラフェンを含む。一実施形態では、グリコナノ粒子は、多糖系ＧｌｙｃｏＮＰ（例えば、キトサン系ＧｌｙｃｏＮＰ）を含む。特定の実施形態では、グリコナノ粒子は、グリコデンドリマーである。

【０８０６】

Ｎ．エクソソーム、フソーム、及びオーガネル系送達システム

特定の実施形態では、本明細書で提供されるように、環状ＲＮＡは、細胞外小胞の一種であるエクソソームの使用を通じて転移される。エクソソームは、様々なタイプの細胞によって自然に分泌され、様々な形態のカーゴの輸送小胞として使用される。送達中に、エクソソームは特定のｍＲＮＡ、制御マイクロＲＮＡ、脂質、タンパク質を含み、それらを保護することができる（Ｌｕａｎ ｅｔ ａｌ．，Ａｃｔａ Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｉｃａ Ｓｉｎｉｃａ．２０１７．３８：７５４－７６３）。自然に、エクソソームは、３０ｎｍ～１２５ｎｍであり得る。

【０８０７】

いくつかの実施形態では、エクソソームは、免疫細胞から部分的に作製され得る。Ｈａｎｅｙ ｅｔ ａｌに示されるように、免疫細胞由来エクソソームの使用は、単核貪食細胞を回避することができる（Ｊ Ｃｏｎｔｒｏｌ Ｒｅｌｅａｓｅ．２０１５．２０７：１８－３０）。いくつかの実施形態では、エクソソームは、樹状細胞、マクロファージ、Ｔ細胞、Ｂ細胞であり得、または別の免疫細胞に由来し得る。ＷＯ／２０２１／０４１４７３Ａ１に見られるように、様々な長さの様々な形態のＲＮＡは、メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）、マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）、長い遺伝子間非コードＲＮＡ（ｌｉｎｃＲＮＡ）、長い非コードＲＮＡ（ｌｎｃＲＮＡ）、非コードＲＮＡ（ｎｃＲＮＡ）、非メ

ッセンジャーＲＮＡ（ｎｍＲＮＡ）、小さいＲＮＡ（ｓＲＮＡ）、小さい非メッセンジャーＲＮＡ（ｓｍｎＲＮＡ）、ＤＮＡ損傷応答ＲＮＡ（ＤＤ　ＲＮＡ）、細胞外ＲＮＡ（ｅｘＲＮＡ）、小さい核ＲＮＡ（ｓｎＲＮＡ）、小さい核小体ＲＮＡ（ｓｎｏＲＮＡ）、及び前駆メッセンジャーＲＮＡ（プレｍＲＮＡ）を含むエクソソーム送達を通して輸送され得る。

【０８０８】

他の実施形態では、転移ビヒクルは、全体的または部分的にフソームから構成され得る。いくつかの実施形態では、フソームは、生殖系列嚢胞の小胞体に由来する。特定の実施形態では、生殖細胞系嚢胞は、ショウジョウバエ卵巣に由来する。

【０８０９】

Ｏ．マイクロニードル、エレクトロポレーション、連続ポンプ、及び遺伝子銃

特定の実施形態では、環状ＲＮＡポリヌクレオチドは、非細胞を使用して輸送されてもよく、代わりに機械的送達機構を介して輸送されてもよい。いくつかの実施形態では、この送達方法は、マイクロニードル、エレクトロポレーション、連続ポンプ、及び／または遺伝子銃を含む。

【０８１０】

特定の細胞セットに核酸をマイクロニードルで導入するためのさまざまな方法及び装置が開発されている。生体組織にわたる生体材料の送達方法は、Ｋｏｄｇｕｌｅ　ｅｔ　ａｌによって記載されており、例えば、ＵＳ２０１１／０１９６３０８に教示されており、その内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。Ｋｏｄｇｕｌｅによれば、治療活性成分を含む複数の生分解性マイクロニードルは、タンパク質、炭水化物、核酸分子、脂質、及び他の薬学的に活性な成分、またはそれらの組み合わせを送達するデバイスに組み込まれる。

【０８１１】

ニードルを使用しない注入及びエレクトロポレーションによる生物活性剤の皮内送達は、Ｈｏｆｆｍａｎｎらによって記載されており、例えば、米国特許第７１７１，２６４号に教示されており、その内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。Ｈｏｆｆｍａｎｎによれば、１つ以上のニードルを使用しない注入がエレクトロポレーションデバイスに組み込まれ、ニードルを使用しない注入及びエレクトロポレーションの組み合わせは、薬剤を皮膚、筋肉または粘膜の細胞に導入するのに十分である。特定の実施形態では、エレクトロポレーションは、連続流マイクロ流体エレクトロポレーションによるものである。

【０８１２】

Ｐ．薬学的塩、緩衝液、及び溶液

いくつかの実施形態では、環状ＲＮＡポリヌクレオチドの輸送ビヒクルは、塩もしくは緩衝液を含む溶液または希釈剤である。

【０８１３】

７．タンパク質及びＩＲＥＳの組み合わせ

特定の実施形態では、本明細書に提供されるように、環状ＲＮＡポリヌクレオチドによってコードされるペイロードは、翻訳開始要素（ＴＩＥ）内の特定の配列内リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ）の使用を通じて最適化され得る。いくつかの実施形態では、環状ＲＮＡ内のＩＲＥＳ特異性は、コード要素内でコードされる特定のタンパク質の発現を有意に増強することができる。

【０８１４】

８．標的化

Ａ．標的化方法

本発明は、受動的及び能動的標的化手段の両方による標的細胞及び組織の差別的標的化も企図する。受動的標的化の現象は、標的細胞による輸送ビヒクルの認識を向上するための追加の賦形剤または手段の使用に依存することなく、インビボでの輸送ビヒクルの天然分布パターンを利用する。例えば、細網内皮系の細胞による食作用に供される輸送ビヒク

ルは、肝臓または脾臓に蓄積する可能性が高く、したがって、かかる標的細胞への組成物の送達を受動的に導く手段を提供し得る。

【０８１５】

代替的に、本発明は、輸送ビヒクルに（共有結合または非共有結合のいずれかで）結合し得る標的化部分を使用して、ある特定の標的細胞または標的組織でのかかる輸送ビヒクルの局在化を助長することを含む、能動的標的化を企図する。例えば、標的化は、標的細胞または組織への分布を助長するために、輸送ビヒクルの中または上に１つ以上の内因性標的化部分を含めることによって媒介され得る。標的組織による標的化部分の認識は、標的細胞及び組織における輸送ビヒクル及び／またはその内容物の組織分布及び細胞取り込みを能動的に容易にする（例えば、輸送ビヒクルの中または上にアポリポタンパク質－Ｅ標的化リガンドを含めることは、肝細胞によって発現される内因性低密度リポタンパク質受容体への輸送ビヒクルの認識及び結合を助長する）。本明細書に提供するように、組成物は、標的細胞に対する組成物の親和性を向上することができる部分を含むことができる。標的化部分は、製剤化中または製剤化後に脂質粒子の外側の二重層に連結され得る。これらの方法は、当該技術分野で周知である。加えて、一部の脂質粒子製剤は、融合性ポリマー、例えばＰＥＡＡ、血球凝集素、他のリポペプチド（米国特許出願第０８／８３５，２８１号、及び同第６０／０８３，２９４号を参照されたく、参照により本明細書に組み込まれる）ならびにインビボ及び／または細胞内送達に有用である他の特性を採用し得る。他のいくつかの実施形態では、本発明の組成物は、改善されたトランスフェクション効率を実証する、及び／または目的の標的細胞もしくは組織に対する選択性の向上を示す。したがって、標的細胞または組織に対する組成物及びその核酸内容物の親和性を向上することができる１つ以上の部分（例えば、ペプチド、アプタマー、オリゴヌクレオチド、ビタミンまたは他の分子）を含む組成物が企図される。好適な部分は、任意で、輸送ビヒクルの表面に結合または連結され得る。いくつかの実施形態では、標的化部分は、輸送ビヒクルの表面に広がり得る、または輸送ビヒクル内に封入され得る。好適な部分は、それらの物理的、化学的または生物学的特性（例えば、選択的親和性及び／または標的細胞表面マーカーもしくは特徴の認識）に基づいて選択される。細胞特異的標的部位及びその対応する標的化リガンドは、大きく異なり得る。好適な標的化部分は、標的細胞の固有の特徴を利用するように選択され、ゆえに、組成物が標的細胞と非標的細胞とを差別することを可能にする。例えば、本発明の組成物は、（例えば、かかる表面マーカーの受容体媒介認識及びかかる表面マーカーへの結合によって）肝細胞の認識、または肝細胞に対する親和性を選択的に向上する表面マーカー（例えば、アポリポタンパク質Ｂまたはアポリポタンパク質Ｅ）を含み得る。例として、標的化部分としてのガラクトースの使用は、本発明の組成物を、肝実質細胞に指向させると予想され得る、また代替的に標的化リガンドとしての糖残基を含有するマンノースの使用は、本発明の組成物を、肝臓内皮細胞に指向させると予想され得る（例えば、肝細胞に存在するアシアロ糖タンパク質受容体に優先的に結合し得る糖残基を含有するマンノース）。（Ｈｉｌｌｅｒｙ Ａ Ｍ，ｅｔ ａｌ．“Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ ａｎｄ Ｔａｒｇｅｔｉｎｇ：Ｆｏｒ Ｐｈａｒｍａｃｉｓｔｓ ａｎｄ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｔｉｓｔｓ”（２００２）Ｔａｙｌｏｒ ＆ Ｆｒａｎｃｉｓ，Ｉｎｃ．を参照されたい。）輸送ビヒクル（例えば、脂質ナノ粒子）に存在する部分に複合されているかかる標的化部分の提示はそれゆえ、標的細胞及び組織における本発明の組成物の認識及び取り込みを容易にする。好適な標的化部分の例としては、１つ以上のペプチド、タンパク質、アプタマー、ビタミン及びオリゴヌクレオチドが挙げられる。

【０８１６】

特定の実施形態では、輸送ビヒクルは、標的化部分を含む。いくつかの実施形態では、標的化部分は、受容体媒介性エンドサイトーシスを選択的に特定の細胞集団に媒介する。いくつかの実施形態では、標的化部分は、Ｔ細胞抗原に結合することができる。いくつかの実施形態では、標的化部分は、ＮＫ、ＮＫＴ、またはマクロファージ抗原に結合することができる。いくつかの実施形態では、標的化部分は、群ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ８、ＰＤ

－１、４－１ＢＢ、及びＣＤ２から選択されるタンパク質に結合することができる。いくつかの実施形態では、標的化部分は、一本鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）断片、ナノボディ、ペプチド、ペプチドベースの大環状化合物、ミニボディ、重鎖可変領域、軽鎖可変領域またはその断片である。いくつかの実施形態では、標的化部分は、Ｔ細胞受容体モチーフ抗体、Ｔ細胞α鎖抗体、Ｔ細胞β鎖抗体、Ｔ細胞γ鎖抗体、Ｔ細胞δ鎖抗体、ＣＣＲ７抗体、ＣＤ３抗体、ＣＤ４抗体、ＣＤ５抗体、ＣＤ７抗体、ＣＤ８抗体、ＣＤ１１ｂ抗体、ＣＤ１１ｃ抗体、ＣＤ１６抗体、ＣＤ１９抗体、ＣＤ２０抗体、ＣＤ２１抗体、ＣＤ２２抗体、ＣＤ２５抗体、ＣＤ２８抗体、ＣＤ３４抗体、ＣＤ３５抗体、ＣＤ４０抗体、ＣＤ４５ＲＡ抗体、ＣＤ４５ＲＯ抗体、ＣＤ５２抗体、ＣＤ５６抗体、ＣＤ６２Ｌ抗体、ＣＤ６８抗体、ＣＤ８０抗体、ＣＤ９５抗体、ＣＤ１１７抗体、ＣＤ１２７抗体、ＣＤ１３３抗体、ＣＤ１３７（４－１ＢＢ）抗体、ＣＤ１６３抗体、Ｆ４／８０抗体、ＩＬ－４Ｒα抗体、Ｓｃａ－１抗体、ＣＴＬＡ－４抗体、ＧＩＴＲ抗体、ＧＡＲＰ抗体、ＬＡＰ抗体、グランザイムＢ抗体、ＬＦＡ－１抗体、トランスフェリン受容体抗体、及びそれらの断片から選択される。いくつかの実施形態では、標的化部分は、リンパ球上のエクト酵素の小分子結合因子である。エクト酵素の小分子結合因子には、Ａ２Ａ阻害剤ＣＤ７３阻害剤、ＣＤ３９またはアデシン受容体Ａ２ａＲ及びＡ２ｂＲが含まれる。潜在的な小分子には、ＡＢ９２８が含まれる。

【０８１７】

いくつかの実施形態では、輸送ビヒクルは、Ｓｈｏｂａｋｉ Ｎ，Ｓａｔｏ Ｙ，Ｈａｒａｓｈｉｍａ Ｈ．Ｍｉｘｉｎｇ ｌｉｐｉｄｓ ｔｏ ｍａｎｉｐｕｌａｔｅ ｔｈｅ ｉｏｎｉｚａｔｉｏｎ ｓｔａｔｕｓ ｏｆ ｌｉｐｉｄ ｎａｎｏｐａｒｔｉｃｌｅｓ ｆｏｒ ｓｐｅｃｉｆｉｃ ｔｉｓｓｕｅ ｔａｒｇｅｔｉｎｇ．Ｉｎｔ Ｊ Ｎａｎｏｍｅｄｉｃｉｎｅ．２０１８；１３：８３９５－８４１０．２０１８年１２月１０日に公開に記載されるように、製剤化及び／または標的化される。いくつかの実施形態では、輸送ビヒクルは、３つの脂質タイプから構成される。いくつかの実施形態では、輸送ビヒクルは、４つの脂質タイプから構成される。いくつかの実施形態では、輸送ビヒクルは、５つの脂質タイプから構成される。いくつかの実施形態では、輸送ビヒクルは、６つの脂質タイプから構成される。

【０８１８】

Ｂ．標的細胞

核酸を免疫細胞に送達することが所望である場合、免疫細胞は、標的細胞を表す。いくつかの実施形態では、本発明の組成物は、標的細胞を差別的にトランスフェクションする（すなわち、非標的細胞をトランスフェクトしない）。本発明の組成物はまた、Ｔ細胞、Ｂ細胞、マクロファージ、及び樹状細胞が含まれるがこれらに限定されない多様な標的細胞を優先的に標的とするように調製され得る。

【０８１９】

いくつかの実施形態では、標的細胞は、目的のタンパク質または酵素が欠損している。例えば、核酸を肝細胞に送達することが望まれる場合、肝細胞は標的細胞を表す。いくつかの実施形態では、本発明の組成物は、標的細胞を差別的にトランスフェクトする（すなわち、非標的細胞をトランスフェクトしない）。本発明の組成物はまた、肝細胞、上皮細胞、造血細胞、上皮細胞、内皮細胞、肺細胞、骨細胞、幹細胞、間葉細胞、神経細胞（例えば、髄膜、星状膠細胞、運動ニューロン、後根神経節細胞及び前角運動ニューロン）、光受容体細胞（例えば、杆体及び錐体）、網膜色素上皮細胞、分泌細胞、心細胞、脂肪細胞、血管平滑筋細胞、心筋細胞、骨格筋細胞、ベータ細胞、下垂体細胞、滑膜ライニング細胞、卵巣細胞、精巣細胞、線維芽細胞、Ｂ細胞、Ｔ細胞、網状赤血球、白血球、顆粒球、及び腫瘍細胞を含むが、これに限定されない様々な標的細胞を優先的に標的とするように調製され得る。

【０８２０】

本発明の組成物は、心臓、肺、腎臓、肝臓、及び脾臓などの標的細胞に優先的に分布するように調製され得る。いくつかの実施形態では、本発明の組成物は、肝臓または脾臓の

細胞に分布して、肝臓の細胞（例えば、肝細胞）または脾臓の細胞（例えば、免疫細胞）による組成物に含まれるｃｉｒｃＲＮＡの送達及びその後の発現を容易にする。標的とされる細胞は、機能的タンパク質または酵素を産生する、及び全身的に排泄することができる生物学的「貯蔵所」または「デポー」として機能し得る。したがって、本発明の一実施形態では、輸送ビヒクルは、肝細胞または免疫細胞を標的とし得る及び／または送達時に肝臓または脾臓の細胞に優先的に分布される。ある実施形態では、標的肝細胞または免疫細胞のトランスフェクションに続いて、ビヒクルにロードされたｃｉｒｃＲＮＡが翻訳され、機能的タンパク質産物が産生され、排泄され、全身に分布される。他の実施形態では、肝細胞以外の細胞（例えば、肺、脾臓、心臓、眼球、または中枢神経系の細胞）は、タンパク質産生のためのデポー場所として機能することができる。

【０８２１】

一実施形態では、本発明の組成物は、１つ以上の機能的タンパク質及び／または酵素の対象の内因性産生を容易にする。本発明のある実施形態では、輸送ビヒクルは、欠損タンパク質または酵素をコードするｃｉｒｃＲＮＡを含む。かかる組成物の標的組織への分布、及び続くかかる標的細胞のトランスフェクションの際、輸送ビヒクル（例えば、脂質ナノ粒子）にロードされた外因性ｃｉｒｃＲＮＡは、インビボで翻訳されて、外因的に投与されたｃｉｒｃＲＮＡ（例えば、対象が欠損しているタンパク質または酵素）によってコードされる機能的タンパク質または酵素を産生し得る。したがって、本発明の組成物は、外因的にまたは組換えにより調製されたｃｉｒｃＲＮＡを翻訳して内因的に翻訳されたタンパク質または酵素を産生し、それによって機能的タンパク質または酵素を産生する（及び該当する場合は排泄する）対象の能力を利用する。発現または翻訳されたタンパク質または酵素は、組換えにより調製されたタンパク質または酵素にはしばしば存在しない場合がある天然の翻訳後修飾をインビボで含み、それにより、翻訳されたタンパク質または酵素の免疫原性がさらに低下することも特徴とし得る。

【０８２２】

欠損タンパク質または酵素をコードするｃｉｒｃＲＮＡの投与は、標的細胞内の特定の細胞小器官に核酸を送達する必要性を回避する。むしろ、標的細胞のトランスフェクション及び標的細胞の細胞質への核酸の送達の際に、輸送ビヒクルのｃｉｒｃＲＮＡ内容物が翻訳され、機能的タンパク質または酵素が発現され得る。

【０８２３】

いくつかの実施形態では、環状ＲＮＡは、１つ以上のｍｉＲＮＡ結合部位を含む。いくつかの実施形態では、環状ＲＮＡは、１つ以上の非標的細胞または非標的細胞型（例えば、クッパー細胞または肝細胞）に存在し、１つ以上の標的細胞または標的細胞型（例えば、肝細胞またはＴ細胞）に存在しないｍｉＲＮＡによって認識される１つ以上のｍｉＲＮＡ結合部位を含む。いくつかの実施形態では、環状ＲＮＡは、１つ以上の標的細胞または標的細胞型（例えば、肝細胞またはＴ細胞）と比較して、１つ以上の非標的細胞または非標的細胞型（例えば、クッパー細胞または肝細胞）にて増加した濃度で存在するｍｉＲＮＡによって認識される１つ以上のｍｉＲＮＡ結合部位を含む。ｍｉＲＮＡは、ＲＮＡ分子内の相補的な配列と対形成することによって機能し、遺伝子サイレンシングをもたらすと考えられている。

【０８２４】

いくつかの実施形態では、本発明の組成物は、標的細胞を差別的にトランスフェクションまたは分配する（すなわち、非標的細胞をトランスフェクトしない）。本発明の組成物はまた、肝細胞、上皮細胞、造血細胞、上皮細胞、内皮細胞、肺細胞、骨細胞、幹細胞、間葉細胞、神経細胞（例えば、髄膜、星状膠細胞、運動ニューロン、後根神経節細胞及び前角運動ニューロン）、光受容体細胞（例えば、杆体及び錐体）、網膜色素上皮細胞、分泌細胞、心細胞、脂肪細胞、血管平滑筋細胞、心筋細胞、骨格筋細胞、ベータ細胞、下垂体細胞、滑膜ライニング細胞、卵巣細胞、精巣細胞、線維芽細胞、Ｂ細胞、Ｔ細胞、網状赤血球、白血球、顆粒球、及び腫瘍細胞を含むが、これに限定されない様々な標的細胞を優先的に標的とするように調製され得る。

【０８２５】
９．薬学的組成物
特定の実施形態では、本明細書に提供する治療剤を含む組成物（例えば、薬学的組成物）を本明細書に提供する。いくつかの実施形態では、治療剤は、本明細書に提供する環状ＲＮＡポリヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、治療剤は、本明細書に提供するベクターである。いくつかの実施形態では、治療剤は、本明細書に提供する環状ＲＮＡまたはベクターを含む細胞（例えば、ヒトＴ細胞などのヒト細胞）である。特定の実施形態では、組成物は、薬学的に許容可能な担体をさらに含む。いくつかの実施形態では、本明細書に提供する組成物は、本明細書に提供する治療剤を、他の薬学的に活性な作用物質または薬物、例えば、Ｂ細胞抗原を標的とすることができる抗炎症薬物または抗体、例えば、抗ＣＤ２０抗体、例えば、リツキシマブと組み合わせて含む。
【０８２６】
薬学的組成物に関して、薬学的に許容可能な担体は、慣習的に使用されるものいずれかであることができ、化学物理的考慮、例えば溶解度及び活性剤（複数可）との反応性の欠如、ならびに投与経路によってのみ、限定される。本明細書に記載の薬学的に許容可能な担体、例えば、ビヒクル、アジュバント、賦形剤、及び希釈剤は、当業者に周知であり、一般に容易に入手可能である。薬学的に許容可能な担体は、治療剤（複数可）に対して化学的に不活性であり、使用条件下で有害な副作用または毒性を有さないものであることが好ましい。
【０８２７】
担体の選択は、特定の治療剤、ならびに治療剤を投与するために使用される特定の方法によって部分的に決定されるだろう。したがって、本明細書に提供する薬学的組成物の様々な好適な製剤が存在する。
【０８２８】
特定の実施形態では、薬学的組成物は、防腐剤を含む。特定の実施形態では、好適な防腐剤は、例えば、メチルパラベン、プロピルパラベン、安息香酸ナトリウム、及び塩化ベンザルコニウムを含み得る。任意で、２つ以上の防腐剤の混合物を使用し得る。防腐剤またはその混合物は、典型的には、総組成物の約０．０００１重量％～約２重量％の量で存在する。
【０８２９】
いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、緩衝剤を含む。いくつかの実施形態では、好適な緩衝剤には、例えば、クエン酸、クエン酸ナトリウム、リン酸、リン酸カリウム、ならびに様々な他の酸及び塩が含まれ得る。２つ以上の緩衝剤の混合物を、任意で使用してよい。緩衝剤またはその混合物は、典型的には、総組成物の約０．００１重量％～約４重量％の量で存在する。
【０８３０】
いくつかの実施形態では、薬学的組成物中の治療剤の濃度は、変動することができ、例えば、約１重量％未満、または少なくとも約１重量％、２重量％、３重量％、４重量％、５重量％、６重量％、７重量％、８重量％、９重量％、１０重量％、１５重量％、２０重量％、２５重量％、３０重量％、３５重量％、４０重量％、４５重量％、もしくは約５０重量％以上であることができ、選択された特定の投与様式に従って、流体容量、及び粘度によって主に選択することができる。
【０８３１】
経口、エアロゾル、非経口（例えば、皮下、静脈内、動脈内、筋肉内、皮内、腹腔内、及び髄腔内）、及び局所投与のための以下の製剤は、単なる例示であり、決して限定するものではない。本明細書に提供する治療剤を投与するために１つより多い経路を使用することができ、ある特定の例では、特定の経路は、別の経路よりも迅速及びより効果的な応答を提供することができる。
【０８３２】
経口投与に好適な製剤は、（ａ）液体溶液、例えば水、生理食塩水またはオレンジジュ

ースなどの希釈剤中に溶解させた有効量の治療剤；（ｂ）各々が所定量の活性成分を固体または顆粒として含有する、カプセル、サシェ、錠剤、舐剤及びトローチ；（ｃ）粉末；（ｄ）適切な液体中の懸濁液；ならびに（ｅ）好適なエマルジョンを含むまたはこれからなることができる。液体製剤は、希釈剤、例えば水及びアルコール、例えば、エタノール、ベンジルアルコール及びポリエチレンアルコールを、薬学的に許容可能な界面活性剤の添加を伴ってまたは伴わずに含み得る。カプセル形態は、例えば、界面活性剤、滑剤、ならびに不活性充填剤、例えばラクトース、スクロース、リン酸カルシウム及びコーンスターチを含有する通常のハードシェルまたはソフトシェルゼラチンタイプのものであることができる。錠剤形態は、ラクトース、スクロース、マンニトール、コーンスターチ、ジャガイモでんぷん、アルギン酸、微結晶性セルロース、アカシア、ゼラチン、グアーガム、コロイド状二酸化ケイ素、クロスカルメロースナトリウム、タルク、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸亜鉛、ステアリン酸、及び他の賦形剤、着色剤、希釈剤、緩衝剤、崩壊剤、湿潤剤、防腐剤、香味料、ならびに他の薬理学的に適合する賦形剤のうちの１つ以上を含むことができる。舐剤の形態は、香味料、通常はスクロース、アカシアまたはトラガカントを伴う治療剤を含むことができる。香錠は、当該技術分野で知られているような賦形剤に加えて、不活性塩基、例えばゲラチン及びグリセリン、またはスクロース及びアカシア、エマルジョン、ゲルなどを有する治療剤を含むことができる。

【０８３３】

非経口投与に好適な製剤には、製剤を意図されたレシピエントの血液と等張にする抗酸化剤、緩衝剤、制菌剤、及び溶質を含有し得る水性及び非水性の等張滅菌注射液、ならびに懸濁剤、可溶化剤、増粘剤、安定剤及び防腐剤を含み得る水性及び非水性の滅菌懸濁液が含まれる。いくつかの実施形態では、本明細書に提供する治療剤は、水、生理食塩水、デキストロース水溶液及び関連糖溶液、アルコール、例えばエタノールもしくはヘキサデシルアルコール、グリコール、例えばプロピレングリコールもしくはポリエチレングリコール、ジメチルスルホキシド、グリセロール、ケタール、例えば２，２－ジメチル－１，３－ジオキソラン－４－メタノール、エーテル、ポリ（エチレングリコール）４００、油、脂肪酸、脂肪酸エステルもしくはグリセリド、またはアセチル化脂肪酸グリセリドを含む滅菌の液体または液体の混合物などの医薬担体中の生理学的に許容可能な希釈剤にて、薬学的に許容可能な界面活性剤、例えば石鹸剤もしくは洗剤、懸濁剤、例えばペクチン、カルボマー、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、もしくはカルボキシメチルセルロース、または乳化剤及び他の医薬アジュバントの添加を、伴ってまたは伴わずに投与できる。

【０８３４】

油は、いくつかの実施形態では非経口製剤で使用することができ、石油、動物油、植物油、または合成油を含む。油の具体例としては、ピーナッツ、大豆、ゴマ、綿実、トウモロコシ、オリーブ、ワセリン、及び鉱油が含まれる。非経口製剤での使用に好適な脂肪酸には、オレイン酸、ステアリン酸、及びイソステアリン酸が含まれる。オレイン酸エチル及びミリスチン酸イソプロピルは、好適な脂肪酸エステルの例である。

【０８３５】

非経口製剤の特定の実施形態での使用に好適な石鹸には、脂肪アルカリ金属、アンモニウム、及びトリエタノールアミン塩が含まれ、好適な洗剤には、（ａ）カチオン性洗剤、例えば、ジメチルジアルキルアンモニウムハライド、及びアルキルピリジニウムハライド、（ｂ）アニオン性洗剤、例えば、アルキル、アリール、及びオレフィンスルホン酸塩、アルキル、オレフィン、エーテル、及びモノグリセリド硫酸塩、及びスルホサクシネート、（ｃ）非イオン性洗剤、例えば、脂肪アミン酸化物、脂肪酸アルカノールアミド、及びポリオキシエチレンポリプロピレンコポリマー、（ｄ）両性洗剤、例えば、アルキル－β－アミノプロピオネート、及び２－アルキル－イミダゾリン四級アンモニウム塩、ならびに（ｅ）その混合物が含まれる。

【０８３６】

いくつかの実施形態では、非経口製剤は、例えば、約０．５重量％～約２５重量％の治療剤を溶液中に含有するだろう。防腐剤及び緩衝液を使用してよい。注射部位での刺激を最小限に抑えるまたは排除するために、かかる組成物は、例えば、約１２～約１７の親水性－親油性バランス（ＨＬＢ）を有する１つ以上の非イオン性界面活性剤を含有し得る。かかる製剤中の界面活性剤の量は、典型的には、例えば、約５重量％～約１５重量％の範囲であるだろう。好適な界面活性剤には、ポリエチレングリコール、ソルビタン脂肪酸エステル、例えばソルビタンモノオレエート、及びプロピレンオキシドとプロピレングリコールとの縮合によって形成される疎水性塩基とのエチレンオキシドの高分子量付加物が含まれる。非経口製剤は、アンプル及びバイアルなどの単位用量または複数用量の密封コンテナで提供することができ、注射のために、使用直前に、滅菌液体賦形剤、例えば水の添加のみを必要とするフリーズドライ（凍結乾燥）状態で保管することができる。即時注射溶液及び懸濁液は、前述の種類の滅菌散剤、顆粒剤、及び錠剤から調製することができる。

【０８３７】

特定の実施形態では、注射可能な製剤を本明細書に提供する。注射可能な組成物のための有効な医薬担体の要件は、当業者に周知である（例えば、Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃｓ ａｎｄ Ｐｈａｒｍａｃｙ Ｐｒａｃｔｉｃｅ，Ｊ．Ｂ．Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ Ｃｏｍｐａｎｙ，Ｐｈｉｌａｄｅｌｐｈｉａ，ＰＡ，Ｂａｎｋｅｒ ａｎｄ Ｃｈａｌｍｅｒｓ，ｅｄｓ．，ｐａｇｅｓ ２３８－２５０（１９８２）、及びＡＳＨＰ Ｈａｎｄｂｏｏｋ ｏｎ Ｉｎｊｅｃｔａｂｌｅ Ｄｒｕｇｓ，Ｔｏｉｓｓｅｌ，４ｔｈ ｅｄ，ｐａｇｅｓ ６２２－６３０（１９８６）を参照されたい）。

【０８３８】

いくつかの実施形態では、局所製剤を本明細書に提供する。経皮薬物放出に有用なものを含む局所製剤は、皮膚への適用のために本明細書に提供する特定の実施形態の状況において好適である。いくつかの実施形態では、治療剤は、単独で、または他の好適な成分と組み合わせて、吸入を介して投与されるエアロゾル製剤にすることができる。これらのエアロゾル製剤は、ジクロロジフルオロメタン、プロパン、窒素などの加圧された許容可能な推進剤に入れることができる。それらはまた、ネブライザーまたはアトマイザーなどの非加圧調製物用の医薬品として製剤化され得る。かかる噴霧製剤も、粘膜を噴霧するために使用され得る。

【０８３９】

特定の実施形態では、本明細書に提供する治療剤は、包接複合体、例えばシクロデキストリン包接複合体、またはリポソームとして製剤化することができる。リポソームは、治療剤が特定の組織を標的とするのに役立ち得る。リポソームは、治療剤の半減期を延長するために使用することもできる。リポソームを調製するために多くの方法が利用可能であり、例えば、Ｓｚｏｋａ ｅｔ ａｌ．，Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｂｉｏｅｎｇ．，９，４６７（１９８０）ならびに米国特許第４，２３５，８７１号、同第４，５０１，７２８号、同第４，８３７，０２８号、及び同第５，０１９，３６９号に記載のとおりである。

【０８４０】

いくつかの実施形態では、本明細書に提供する治療剤は、組成物の送達が処置される部位の感作の前に、それを引き起こすのに十分な時間で起こるように、時間放出、遅延放出、または持続放出送達システムで製剤化される。かかるシステムは、治療剤の反復投与を回避することができ、それにより、対象及び医師に対する利便性が増加し、本明細書に提供するある特定の組成物の実施形態に特に好適であり得る。一実施形態では、本発明の組成物は、そこに含有されるｃｉｒｃＲＮＡの徐放に好適であるように製剤化される。かかる徐放性組成物は、対象に、延長された投薬間隔で好都合に投与され得る。例えば、一実施形態では、本発明の組成物は、対象に、１日２回、毎日または隔日で投与される。ある実施形態では、本発明の組成物は、対象に、週２回、週１回、１０日毎に、２週毎に、３週毎に、４週毎に、月１回、６週毎に、８週毎に、３か月毎に、４か月毎に、６か月毎に

、８か月毎に、９か月毎に、または毎年投与される。

【０８４１】

いくつかの実施形態では、本発明のポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質は、持続量の時間にわたって、標的細胞によって産生される。例えば、タンパク質は、投与後１時間より長く、４時間より長く、６時間より長く、１２時間より長く、２４時間より長く、４８時間より長く、または７２時間より長く産生され得る。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、投与から約６時間後にピークレベルで発現される。いくつかの実施形態では、ポリペプチドの発現は、少なくとも治療レベルで持続される。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、少なくとも治療レベルで、投与後１時間より長く、４時間より長く、６時間より長く、１２時間より長く、２４時間より長く、４８時間より長く、または７２時間より長く発現される。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、患者の組織（例えば、肝臓または肺）において治療レベルで検出可能である。いくつかの実施形態では、検出可能なポリペプチドのレベルは、投与後１時間より長く、４時間より長く、６時間より長く、１２時間より長く、２４時間より長く、４８時間より長く、または７２時間より長い時間にわたる、ｃｉｒｃＲＮＡ組成物からの継続的な発現からである。

【０８４２】

特定の実施形態では、本発明のポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質は、正常な生理学的レベルを超えるレベルで産生される。タンパク質のレベルは、対照と比較して増加し得る。いくつかの実施形態では、対照は、正常な個体または正常な個体の集団におけるポリペプチドのベースライン生理学的レベルである。他の実施形態では、対照は、関連するタンパク質もしくはポリペプチドに欠損を有する個体または関連するタンパク質もしくはポリペプチドに欠損を有する個体の集団におけるポリペプチドのベースライン生理学的レベルである。いくつかの実施形態では、対照は、組成物が投与される個体における関連するタンパク質またはポリペプチドの正常レベルであることができる。他の実施形態では、対照は、１つ以上の比較可能な時点での、他の治療的介入時、例えば、対応するポリペプチドの直接注射時のポリペプチドの発現レベルである。

【０８４３】

特定の実施形態では、本発明のポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質のレベルは、投与後３日、４日、５日、または１週間以上で検出可能である。組織（例えば、肝臓または肺）においてタンパク質のレベルの増加が観察され得る。

【０８４４】

いくつかの実施形態では、本方法は、本発明のポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質の持続的な循環半減期をもたらす。例えば、タンパク質は、タンパク質またはタンパク質をコードするｍＲＮＡの皮下注射を介して観察される半減期よりも長い時間または日数にわたって検出され得る。いくつかの実施形態では、タンパク質の半減期は、１日、２日、３日、４日、５日、または１週間以上である。

【０８４５】

多くのタイプの放出送達システムが利用可能であり、当業者に公知である。それらは、ポリマーをベースとしたシステム、例えばポリ（ラクチド－グリコリド）、コポリオキサレート、ポリカプロラクトン、ポリエステルアミド、ポリオルトエステル、ポリヒドロキシブチル酸、及びポリ無水物を含む。薬剤を含有する前述のポリマーのマイクロカプセルが、例えば、米国特許第５，０７５，１０９号に記載されている。送達システムはまた、コレステロール、コレステロールエステル及び脂肪酸などのステロールまたはモノ－ジ－及びトリ－グリセリドなどの中性脂肪を含む脂質；ヒドロゲル放出システム；シラスティックシステム；ペプチドをベースとしたシステム；ワックス被覆剤；従来の結合剤及び賦形剤を使用する圧縮錠剤；部分的に融合した移植片；などを含む非ポリマーシステムを含む。具体例としては、これに限定されないが、（ａ）侵食システム、ここで、活性組成物は、米国特許第４，４５２，７７５号、同第４，６６７，０１４号、同第４，７４８，０３４号、及び同第５，２３９，６６０号に記載のものなどのマトリックス内の形状にて含有される、ならびに（ｂ）拡散システムが含まれ、ここで、活性成分は、米国特許第３，

８３２，２５３号及び同第３，８５４，４８０号に記載されるようなポリマーから制御された速度で浸透する。加えて、ポンプをベースとしたハードウェア送達システムを使用することができ、そのうちいくつかは、移植に適合している。

【０８４６】

いくつかの実施形態では、治療剤は、標的化部分に連結部分を通して直接的または間接的に複合することができる。治療剤を標的化部分に複合するための方法は、当該技術分野で公知である。例えば、Ｗａｄｗａ ｅｔ ａｌ．，Ｊ，Ｄｒｕｇ Ｔａｒｇｅｔｉｎｇ３：１１１（１９９５）及び米国特許第５，０８７，６１６号を参照されたい。

【０８４７】

いくつかの実施形態では、本明細書に提供する治療剤は、治療剤が、それが投与される体内に放出される様式が、体内の時間及び位置に関して制御されるように、デポー形態へと製剤化される（例えば、米国特許第４，４５０，１５０号を参照されたい）。治療剤のデポー形態は、例えば、治療剤及びポリマーなどの多孔質または非多孔質物質を含む埋め込み型組成物であることができ、治療剤は物質によって封入される、もしくは物質全体に拡散される、及び／または非多孔質物質の分解。デポーは次に体内の所望の位置に埋め込まれ、治療剤は、埋め込み物から所定の速度で放出される。

【０８４８】

１０．処置方法

Ａ．処置領域及び関連する疾患／障害

特定の態様では、状態、例えば、自己免疫障害またはがんを処置及び／または予防する方法を本明細書において提供する。

【０８４９】

特定の実施形態では、本明細書に提供する治療剤は、１つ以上の追加の治療剤と（例えば、同じ薬学的組成物にて、または別個の薬学的組成物にて）共投与される。いくつかの実施形態では、本明細書に提供する治療剤を最初に投与することができ、１つ以上の追加の治療剤を次に投与することができ、またはその逆も可能である。代替的に、本明細書に提供する治療剤及び１つ以上の追加の治療剤を同時に投与することができる。

【０８５０】

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、本明細書で言及される哺乳動物は、げっ歯目の哺乳動物、例えばマウス及びハムスター、またはウサギ目（Ｌｏｇｏｍｏｒｐｈａ）の哺乳動物、例えばウサギを含むがこれに限定されない任意の哺乳動物であり得る。哺乳動物は、ネコ科（ネコ）及びイヌ科（イヌ）を含む食肉目からであり得る。哺乳動物は、ウシ科（ウシ）及びイノシシ科（ブタ）を含む偶蹄目、またはウマ科（ウマ）を含む奇蹄目からであり得る。哺乳動物は、霊長目、セボイド目、もしくはシモイド目（サル）、または類人猿目（ヒト及び類人猿）であり得る。好ましくは、哺乳動物は、ヒトである。

【実施例】

【０８５１】

Ｗｅｓｓｅｌｈｏｅｆｔ ｅｔ ａｌ．（２０１９）ＲＮＡ Ｃｉｒｃｕｌａｒｉｚａｔｉｏｎ Ｄｉｍｉｎｉｓｈｅｓ Ｉｍｍｕｎｏｇｅｎｉｃｉｔｙ ａｎｄ Ｃａｎ Ｅｘｔｅｎｄ Ｔｒａｎｓｌａｔｉｏｎ Ｄｕｒａｔｉｏｎ Ｉｎ ｖｉｖｏ．Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｅｌｌ．７４（３），５０８－５２０及びＷｅｓｓｅｌｈｏｅｆｔ ｅｔ ａｌ．（２０１８）Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ ｃｉｒｃｕｌａｒ ＲＮＡ ｆｏｒ Ｐｏｔｅｎｔ ａｎｄ Ｓｔａｂｌｅ Ｔｒａｎｓｌａｔｉｏｎ ｉｎ Ｅｕｋａｒｙｏｔｉｃ Ｃｅｌｌｓ．Ｎａｔｕｒｅ Ｃｏｍｍｕｎｉｃａｔｉｏｎｓ．９，２６２９は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【０８５２】

本発明は、以下の実施例を参照することによってさらに詳細に説明されるが、以下の実施例に限定されることを意図するものではない。これらの実施例は、主題の発明の作製方法及び使用方法を当業者に完全な開示及び説明を提供することを目的として例示のありと

あらゆる変形を包含し、本発明とみなすものの範囲を限定することを意図しない。

【０８５３】

実施例１

実施例１Ａ：外部二重鎖領域は、順列置換イントロンエクソン（ＰＩＥ）環状化戦略を使用して長いＲＮＡ前駆体の環状化を可能にする。

全長脳心筋炎ウイルス（ＥＭＣＶ）ＩＲＥＳを含有する１．１ｋｂ配列、ガウシアルシフェラーゼ（ＧＬｕｃ）発現配列、及び順列置換イントロン－エクソン（ＰＩＥ）構築物の２つの短いエクソン断片を、Ｔ４ファージのチミジル酸シンターゼ（Ｔｄ）遺伝子の順列置換グループＩ触媒イントロンの３’と５’イントロンとの間に挿入した。ＲＮＡ前駆体は、ランオフ転写によって合成した。環状化を、ＲＮＡ前駆体を、マグネシウムイオン及びＧＴＰの存在下で加熱することにより試みたが、スプライシング産物は得られなかった。

【０８５４】

完全に相補的な９ヌクレオチド及び１９ヌクレオチド長の二重鎖領域を設計し、ＲＮＡ前駆体の５’及び３’末端に追加した。これらの相同アームの追加により、ＲＮＡ前駆体バンドの消失によって評価されるように、スプライシング効率が、９ヌクレオチド二重鎖領域で０から１６％に、１９ヌクレオチド二重鎖領域で４８％に増加した。

【０８５５】

スプライシング産物をＲＮａｓｅ　Ｒで処理した。ＲＮａｓｅ　Ｒで処理したスプライシング反応物の推定スプライスジャンクションにわたって配列決定すると、ライゲーションされたエクソンが明らかになり、ＲＮａｓｅ　Ｒで処理したスプライシング反応物を、オリゴヌクレオチドを標的としたＲＮａｓｅ　Ｈで消化すると、ＲＮａｓｅ　Ｈで消化された直鎖状前駆体によって得られた２つのバンドとは対照的に、単一のバンドが産生された。これは、環状ＲＮＡが、９または１９ヌクレオチド長の外部二重鎖領域を含有するＲＮＡ前駆体のスプライシング反応物の主要な産物であることを示す。

【０８５６】

実施例１Ｂ：ＩＲＥＳ及びＰＩＥスプライス部位の二次構造を保存するスペーサーは、環状化の効率を増加する。

一連のスペーサーを設計し、３’ＰＩＥスプライス部位とＩＲＥＳとの間に挿入した。これらのスペーサーは、ＩＲＥＳ、３’ＰＩＥスプライス部位、及び／または５スプライス部位のイントロン配列内の二次構造を保存するまたは破壊するように設計した二次構造を保存するように設計された。スペーサー配列の追加は、８７％スプライシング効率をもたらしたが、破壊的なスペーサー配列の追加は、検出可能なスプライシングをもたらさなかった。

【０８５７】

実施例２

実施例２Ａ：外部二重鎖領域に加えて内部二重鎖領域は、スプライシングバブルを作製し、いくつかの発現配列の翻訳を可能にする。

スペーサーは、非構造化、イントロン及びＩＲＥＳ配列に非相同であり、スペーサー－スペーサー二重鎖領域を含有するように設計した。これらを、外部二重鎖領域、ＥＭＣＶ　ＩＲＥＳ、及びガウシアルシフェラーゼ（全長：１２８９ｎｔ）、ホタルルシフェラーゼ（２３８４ｎｔ）、ｅＧＦＰ（１４５１ｎｔ）、ヒトエリスロポエチン（１３１３ｎｔ）、及びＣａｓ９エンドヌクレアーゼ（４９３４ｎｔ）の発現配列を含有する構築物の５’エクソンとＩＲＥＳとの間ならびに３’エクソン及び発現配列間に挿入した。５つの構築物全ての環状化を達成した。Ｔ４ファージ及びアナベナイントロンを利用した構築物の環状化は、ほぼ同等であった。環状化効率は、配列が短いほど高かった。翻訳を測定するために、各構築物を、ＨＥＫ２９３細胞にトランスフェクトした。ガウシア及びホタルルシフェラーゼをトランスフェクトした細胞は、発光によって測定されるように強い応答を示し、ヒトエリスロポエチンは、エリスロポエチンｃｉｒｃＲＮＡでトランスフェクトした細胞の培地で検出可能であり、ＥＧＦＰ蛍光は、ＥＧＦＰ　ｃｉｒｃＲＮＡでトランスフ

ェクトした細胞から観察された。Ｃａｓ９　ｃｉｒｃＲＮＡとＧＦＰに対するｓｇＲＮＡの、ＧＦＰを構成的に発現する細胞への同時トランスフェクションにより、ｓｇＲＮＡのみの対照と比較して、細胞の最大９７％で蛍光が消失した。

【０８５８】

実施例２Ｂ：ＣＶＢ３　ＩＲＥＳの使用は、タンパク質産生を増加させる。

内部及び外部二重鎖領域、ならびにガウシアルシフェラーゼまたはホタルルシフェラーゼ発現配列のいずれかを含有する異なるＩＲＥＳを有する構築物を作製した。タンパク質産生は、トランスフェクションから２４時間後のＨＥＫ２９３細胞の上清における発光によって測定した。コクサッキーウイルスＢ３（ＣＶＢ３）ＩＲＥＳ構築物は、両方の場合において最も多くのタンパク質を産生した。

【０８５９】

実施例２Ｃ：ポリＡまたはポリＡＣスペーサーの使用は、タンパク質産生を増加させる。

３０ヌクレオチド長のポリＡまたはポリＡＣスペーサーを、実施例２Ｂでタンパク質を産生した各ＩＲＥＳを伴う構築物のＩＲＥＳとスプライスジャンクションとの間に追加した。ガウシアルシフェラーゼ活性は、トランスフェクションから２４時間後のＨＥＫ２９３細胞の上清における発光によって測定した。両方のスペーサーは、スペーサーを伴わない対照構築物よりも、全ての構築物で発現を改善した。

【０８６０】

実施例３

環状ＲＮＡでトランスフェクトされたＨＥＫ２９３またはＨｅＬａ細胞は、同等の未修飾または修飾直鎖状ＲＮＡでトランスフェクトされた細胞よりも多くのタンパク質を産生する。

【０８６１】

ＨＰＬＣで精製したガウシアルシフェラーゼをコードするｃｉｒｃＲＮＡ（ＣＶＢ３－ＧＬｕｃ－ｐＡＣ）を、標準的な未修飾５’メチルグアノシンキャップ及び３’ポリＡテール直鎖状ＧＬｕｃ　ｍＲＮＡ、ならびに市販のヌクレオシド修飾（シュードウリジン、５－メチルシトシン）直鎖状ＧＬｕｃ　ｍＲＮＡ（Ｔｒｉｌｉｎｋ製）と比較した。トランスフェクション２４時間後に発光を測定し、ｃｉｒｃＲＮＡが、ＨＥＫ２９３細胞において未修飾直鎖状ｍＲＮＡより８１１．２％多いタンパク質を産生し、修飾ｍＲＮＡより５４．５％多いタンパク質を産生したことが明らかになった。同様の結果が、ＨｅＬａ細胞、及びヒトエリスロポエチンをコードする最適化されたｃｉｒｃＲＮＡと５－メトキシウリジンで修飾された直鎖状ｍＲＮＡとの比較において得られた。

【０８６２】

発光データは、６日間にわたって収集した。ＨＥＫ２９３細胞では、ｃｉｒｃＲＮＡトランスフェクションは８０時間のタンパク質産生半減期をもたらし、それに対し、未修飾直鎖状ｍＲＮＡは４３時間、及び修飾直鎖状ｍＲＮＡは４５時間であった。ＨｅＬａ細胞では、ｃｉｒｃＲＮＡトランスフェクションは１１６時間のタンパク質産生半減期をもたらし、それに対し、未修飾直鎖状ｍＲＮＡは４４時間、及び修飾直鎖状ｍＲＮＡは４９時間であった。ＣｉｒｃＲＮＡは、両方の細胞型においてその寿命にわたって、未修飾及び修飾直鎖状ｍＲＮＡの両方よりも実質的に多くのタンパク質を産生した。

【０８６３】

実施例４

実施例４Ａ：ＲＮａｓｅ消化、ＨＰＬＣ精製、及びホスファターゼ処理によるｃｉｒｃＲＮＡの精製は、免疫原性を低減する。完全に精製された環状ＲＮＡは、未精製または部分的に精製された環状ＲＮＡよりも免疫原性が有意に低い。タンパク質発現安定性及び細胞生存率は、細胞型及び環状ＲＮＡ純度に依存する。

ヒト胎児腎臓２９３（ＨＥＫ２９３）及びヒト肺癌Ａ５４９細胞を、

ａ．未精製ＧＬｕｃ環状ＲＮＡスプライシング反応物の産物、

ｂ．スプライシング反応物のＲＮａｓｅ　Ｒ消化の産物、

ｃ．スプライシング反応物のＲＮａｓｅ　Ｒ消化及びＨＰＬＣ精製の産物、または
ｄ．スプライシング反応物のＲＮａｓｅ消化、ＨＰＬＣ精製、及びホスファターゼ処理の産物。

【０８６４】
スプライシング反応物のＲＮａｓｅ　Ｒ消化は、トランスフェクトされていない対照と比較して、Ａ５４９細胞においてサイトカイン放出を防ぐには不十分であった。

【０８６５】
ＨＰＬＣ精製の追加は、またサイトカイン放出を防ぐには不十分であったが、未精製スプライシング反応物と比較して、インターロイキン－６（ＩＬ－６）が有意に低下し、インターフェロン－α１（ＩＦＮα１）が有意に増加した。

【０８６６】
ＨＰＬＣ精製後及びＲＮａｓｅ　Ｒ消化前にホスファターゼ処理を追加すると、Ａ５４９細胞において評価された全ての上方制御されたサイトカインの発現が劇的に低下した。分泌された単球化学誘引物質タンパク質１（ＭＣＰ１）、ＩＬ－６、ＩＦＮα１、腫瘍壊死因子α（ＴＮＦα）、及びＩＦＮγ誘導性タンパク質－１０（ＩＰ－１０）は、検出不可能またはトランスフェクトされていないベースラインレベルまで低下した。

【０８６７】
ＨＥＫ２９３細胞では実質的なサイトカイン放出はなかった。Ａ５４９細胞は、より高純度の環状ＲＮＡでトランスフェクトすると、ＧＬｕｃ発現安定性及び細胞生存率が増加した。完全に精製された環状ＲＮＡは、トランスフェクトされた２９３細胞と同様の安定性表現型を有した。

【０８６８】
実施例４Ｂ：環状ＲＮＡは、有意な免疫原性を引き起こさず、ＲＩＧ－Ｉリガンドではない。
Ａ５４９細胞を以下でトランスフェクトした：
ａ．未精製環状ＲＮＡ、
ｂ．高分子量（直鎖状及び環状連結）ＲＮＡ、
ｃ．環状（ニックの入った）ＲＮＡ、
ｄ．精製環状ＲＮＡの初期画分（ニックの入ったＲＮＡピークとの重複が多い）、
ｅ．精製環状ＲＮＡの後期画分（ニックの入ったＲＮＡピークとの重複が少ない）、
ｆ．環状化中に切除されたイントロン、または
ｇ．ビヒクル（すなわち、トランスフェクトされていない対照）。

【０８６９】
ＲＮＡ前駆体は、スプライシング反応物から好適に純粋な直鎖状ＲＮＡ前駆体を取得することが困難なため、スプライス部位欠失変異体（ＤＳ）の形態で別個で合成及び精製した。サイトカイン放出及び細胞生存率を、各場合において測定した。

【０８７０】
スプライシング反応物内に存在する大半の種、ならびにＲＮＡ前駆体に応答して、強力なＩＬ－６、ＲＡＮＴＥＳ、及びＩＰ－１０の放出が観察された。初期ｃｉｒｃＲＮＡ画分は、他の非ｃｉｒｃＲＮＡ画分に匹敵するサイトカイン応答を誘発した。これは、比較的少量の直鎖状ＲＮＡ夾雑物でさえ、Ａ５４９細胞において実質的な細胞性免疫応答を誘発できることを示す。後期ｃｉｒｃＲＮＡ画分は、トランスフェクトされていない対照からのサイトカイン応答を超えるサイトカイン応答を誘発しなかった。トランスフェクション３６時間後のＡ５４９細胞生存率は、他の全ての画分と比較して、後期ｃｉｒｃＲＮＡ画分で有意に大きかった。

【０８７１】
後期ｃｉｒｃＲＮＡ　ＨＰＬＣ画分、ＲＮＡ前駆体または未精製スプライシング反応物を用いたＡ５４９細胞のトランスフェクション時のＲＩＧ－Ｉ及びＩＦＮ－β１転写産物誘導を分析した。ＲＩＧ－Ｉ及びＩＦＮ－β１両方の転写産物の誘導は、ＲＮＡ前駆体及び未精製スプライシング反応物よりも後期ｃｉｒｃＲＮＡ画分で弱かった。スプライシン

グ反応物のＲＮａｓｅ　Ｒ処理だけでは、この効果を取り除くのに十分ではなかった。非常に少量のＲＩＧ－Ｉリガンド３ｐ－ｈｐＲＮＡを環状ＲＮＡに加えると、実質的なＲＩＧ－Ｉ転写が誘導された。ＨｅＬａ細胞では、ＲＮａｓｅ　Ｒで消化したスプライシング反応物のトランスフェクションは、ＲＩＧ－Ｉ及びＩＦＮ－β１を誘導したが、精製ｃｉｒｃＲＮＡでは誘導されなかった。全体として、ＨｅＬａ細胞は、Ａ５４９細胞よりも夾雑ＲＮＡ種に対する感受性が低かった。

【０８７２】

スプライシング反応物または完全に精製されたｃｉｒｃＲＮＡを用いたＡ５４９細胞のトランスフェクションから最初の８時間以内のＲＩＧ－Ｉ、ＩＦＮ－β１、ＩＬ－６、及びＲＡＮＴＥＳ転写産物誘導をモニタリングする経時的実験では、ｃｉｒｃＲＮＡに対する一過性の応答は明らかにならなかった。精製されたｃｉｒｃＲＮＡも同様に、ＲＡＷ２６４．７マウスマクロファージにおいて炎症促進性転写物を誘導できなかった。

【０８７３】

Ａ５４９細胞を、ＥＭＣＶ　ＩＲＥＳ及びＥＧＦＰ発現配列を含有する精製ｃｉｒｃＲＮＡでトランスフェクトした。これは、炎症促進性転写物の実質的な誘導を産生することはできなかった。これらのデータは、スプライシング反応物の非環状成分が、以前の研究で観察された免疫原性の原因であり、ｃｉｒｃＲＮＡがＲＩＧ－Ｉの天然リガンドではないことを実証する。

【０８７４】

実施例５

環状ＲＮＡは、ＴＬＲによる検出を回避する。

ＴＬＲ３、７、及び８レポーター細胞株を、複数の直鎖状または環状ＲＮＡ構築物でトランスフェクトし、分泌された胚性アルカリホスファターゼ（ＳＥＡＰ）を測定した。

【０８７５】

直鎖状化ＲＮＡは、イントロン及び相同アームの配列を欠失させることによって構築した。次に、直鎖状ＲＮＡ構築物を、ホスファターゼで処理し（キャップされたＲＮＡの場合、キャップした後）、ＨＰＬＣによって精製した。

【０８７６】

試みたトランスフェクションのいずれも、ＴＬＲ７レポーター細胞において応答を産生しなかった。ＴＬＲ３及びＴＬＲ８レポーター細胞は、キャップされた直鎖状化ＲＮＡ、ポリアデニル化直鎖状化ＲＮＡ、ニックの入ったｃｉｒｃＲＮＡ　ＨＰＬＣ画分、及び初期ｃｉｒｃＲＮＡ画分によって活性化された。後期ｃｉｒｃＲＮＡ画分及びｍ１ψ－ｍＲＮＡは、どの細胞株でもＴＬＲ媒介応答を誘発しなかった。

【０８７７】

２番目の実験では、ｃｉｒｃＲＮＡを、２つの方法：マグネシウムイオンの存在下での熱を用いたｃｉｒｃＲＮＡの処理、ならびにＤＮＡオリゴヌクレオチド誘導ＲＮａｓｅ　Ｈ消化を使用して直鎖状化した。どちらの方法でも、大部分の完全長直鎖状ＲＮＡと、少量のインタクトなｃｉｒｃＲＮＡが得られた。ＴＬＲ３、７、及び８レポーター細胞を、環状ＲＮＡ、熱により分解された環状ＲＮＡ、またはＲＮａｓｅ　Ｈにより分解された環状ＲＮＡでトランスフェクトし、ＳＥＡＰ分泌をトランスフェクションから３６時間後に測定した。ＴＬＲ８レポーター細胞は、分解された環状ＲＮＡの両方の形態に応答してＳＥＡＰを分泌したが、モックトランスフェクションよりも環状ＲＮＡトランスフェクションに対して大きな応答を産生しなかった。インビトロで転写された直鎖状化ＲＮＡによるＴＬＲ３の活性化にもかかわらず、分解またはインタクト条件では、ＴＬＲ３及びＴＬＲ７レポーター細胞における活性化は観察されなかった。

【０８７８】

実施例６

未修飾環状ＲＮＡは、直鎖状ＲＮＡよりも増加した持続的なインビボタンパク質発現を産生する。

未修飾及びｍ１ψ修飾ヒトエリスロポエチン（ｈＥｐｏ）直鎖状ｍＲＮＡ及びｃｉｒｃ

ＲＮＡを用いて、マウスに注射し、ＨＥＫ２９３細胞をトランスフェクトした。ｍ１ψ－ｍＲＮＡ及び未修飾ｃｉｒｃＲＮＡの等モルトランスフェクションにより、ＨＥＫ２９３細胞で強力なタンパク質発現がもたらされた。ｈＥｐｏ直鎖状ｍＲＮＡ及びｃｉｒｃＲＮＡは、ＨＥＫ２９３及びＡ５４９細胞の等重量トランスフェクション時のＧＬｕｃ直鎖状ｍＲＮＡ及びｃｉｒｃＲＮＡと比較して、同様の相対的なタンパク質発現パターン及び細胞生存率を示した。

【０８７９】

マウスでは、ｈＥｐｏ　ｃｉｒｃＲＮＡまたは直鎖状ｍＲＮＡを内臓脂肪に注射した後、ｈＥｐｏが血清中に検出された。未修飾ｃｉｒｃＲＮＡの注射後に検出されたｈＥｐｏは、未修飾またはｍ１ψ－ｍＲＮＡからのものよりもゆっくりと減衰し、注射後４２時間でも依然として存在していた。血清ｈＥｐｏは、未精製ｃｉｒｃＲＮＡスプライシング反応物または未修飾直鎖状ｍＲＮＡの注射時には急速に下降した。未精製スプライシング反応物の注射は、血清中で検出可能なサイトカイン応答を産生し、これは精製ｃｉｒｃＲＮＡを含む他のＲＮＡでは観察されなかった。

【０８８０】

実施例７

環状ＲＮＡは、脂質ナノ粒子を介してインビボまたはインビトロで効果的に送達されることができる。

精製環状ＲＮＡを、イオン化可能なリピドイドｃＫＫ－Ｅ１２を用いて脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）へと製剤化した（Ｄｏｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，２０１４；Ｋａｕｆｆｍａｎ　ｅｔ　ａｌ．，２０１５）。粒子は、５ｍｏＵで修飾された市販の対照直鎖状ｍＲＮＡを含有する粒子と同様の平均サイズ、多分散度指数、及び封入効率を備えた均一なマルチラメラ構造を形成した。

【０８８１】

精製ｈＥｐｏ　ｃｉｒｃＲＮＡは、ＬＮＰに封入し、ＨＥＫ２９３細胞に加えた場合、５ｍｏＵ－ｍＲＮＡよりも高い発現を示した。ＨＥＫ２９３細胞におけるＬＮＰ－ＲＮＡからの発現安定性は、５ｍｏＵ－ｍＲＮＡ及びｃｉｒｃＲＮＡの両方に関する減衰のわずかな遅延を除いて、トランスフェクション試薬によって送達されたＲＮＡの発現安定性と同様であった。未修飾ｃｉｒｃＲＮＡ及び５ｍｏＵ－ｍＲＮＡは両方とも、インビトロでＲＩＧ－Ｉ／ＩＦＮ－β１を活性化できなかった。

【０８８２】

マウスでは、ＬＮＰ－ＲＮＡは、内臓脂肪組織への局所注射または肝臓への静脈内送達によって送達された。どちらの場合も、送達から６時間後、ｃｉｒｃＲＮＡからの血清ｈＥｐｏ発現は低かったが、５ｍｏＵ－ｍＲＮＡからの発現と同等であった。未修飾ＬＮＰ－ｃｉｒｃＲＮＡの脂肪注射後に検出された血清ｈＥｐｏは、ＬＮＰ－５ｍｏＵ－ｍＲＮＡからのものよりもゆっくりと減衰し、血清中に存在する発現減衰の遅延はインビトロで認められたものと同様であったが、ＬＮＰ－ｃｉｒｃＲＮＡまたはＬＮＰ－５ｍｏＵ－ｍＲＮＡの静脈内注射後の血清ｈＥｐｏは、およそ同じ速度で減衰した。これらの場合のいずれにおいても、血清サイトカインまたは局所ＲＩＧ－Ｉ、ＴＮＦα、もしくはＩＬ－６転写産物誘導において増加はなかった。

【０８８３】

実施例８

ＨＥＫ２９３、ＨｅｐＧ２、及び１Ｃ１Ｃ７細胞におけるＩＲＥＳによる発現と機能安定性。

アナベナイントロン／エクソン領域、ガウシアルシフェラーゼ発現配列、及び様々なＩＲＥＳを含む構築物を環状化した。１００ｎｇの各環状化反応物を、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　ＭｅｓｓｅｎｇｅｒＭａｘを使用して、２０，０００個のＨＥＫ２９３細胞、ＨｅｐＧ２細胞、及び１Ｃ１Ｃ７細胞に別個にトランスフェクトした。各上清における発光は、タンパク質発現の尺度として２４時間後に評価した。ＨＥＫ２９３細胞では、クロヒウイルスＢ、サリウイルスＦＨＢ、アイチウイルス、サリウイルスＨＧ－Ｊ１、及びエ

ンテロウイルスＪ　ＩＲＥＳを含む構築物が、２４時間で最も多くの発光を産生した（図１Ａ）。ＨｅｐＧ２細胞では、アイチウイルス、サリウイルスＦＨＢ、ＥＭＣＶ－Ｃｆ、ＣＶＡ３　ＩＲＥＳを含む構築物が、２４時間で高い発光を産生した（図１Ｂ）。１Ｃ１Ｃ７細胞では、サリウイルスＦＨＢ、アイチウイルス、サリウイルスＮＧ－Ｊ１、及びサリウイルスＡ　ＳＺ－１　ＩＲＥＳを含む構築物が、２４時間で高い発光を産生した（図１Ｃ）。

【０８８４】

より大きなＩＲＥＳが、２４時間でより大きな発光を産生する傾向が観察された。総配列長が短いと環状化効率が増加する傾向があるため、高い発現及び比較的短いＩＲＥＳの選択は、構築物の改善をもたらし得る。ＨＥＫ２９３細胞では、クロヒウイルスＢ　ＩＲＥＳを使用した構築物が、特に同様の長さの他のＩＲＥＳと比較して、最も高い発光を産生した（図２Ａ）。ＩＲＥＳサイズに対してプロットされたＨｅｐＧ２及び１Ｃ１Ｃ７細胞におけるＩＲＥＳ構築物からの発現を、図２Ｂ及び２Ｃに示す。

【０８８５】

ＨｅｐＧ２及び１Ｃ１Ｃ７細胞における選択されたＩＲＥＳ構築物の機能安定性を、３日間にわたって測定した。上清中の分泌されたガウシアルシフェラーゼからの発光を、２０，０００個の細胞を１００ｎｇの各環状化反応物でトランスフェクトした後２４時間毎に測定し、その後完全に培地を交換した。サリウイルスＡ　ＧＵＴ及びサリウイルスＦＨＢは、ＨｅｐＧ２細胞で最も高い機能安定性を呈し、サリウイルスＮ－Ｊ１及びサリウイルスＦＨＢは、１Ｃ１Ｃ７細胞で最も安定した発現を産生した（図３Ａ及び３Ｂ）。

【０８８６】

実施例９

Ｊｕｒｋａｔ細胞におけるＩＲＥＳによる発現及び機能安定性。

アナベナイントロン／エクソン領域、ガウシアルシフェラーゼ発現配列、及び以前に試験したＩＲＥＳのサブセットを含む２セットの構築物を環状化した。６０，０００個のＪｕｒｋａｔ細胞を、１μｇの各環状化反応物でエレクトロポレーションした。エレクトロポレーションから２４時間後に、上清中の分泌されたガウシアルシフェラーゼからの発光を測定した。セット間の比較及び以前に定義されたＩＲＥＳの有効性との比較のために、ＣＶＢ３　ＩＲＥＳ構築物を両方のセットに含んだ。ＣＶＢ１及びサリウイルスＡ　ＳＺ１　ＩＲＥＳ構築物は、２４時間で最も多くの発現を産生した。データは、図４Ａ及び４Ｂに見出すことができる。

【０８８７】

各ラウンドのエレクトロポレーションしたＪｕｒｋａｔ細胞におけるＩＲＥＳ構築物の機能安定性を、３日間にわたって測定した。上清中の分泌されたガウシアルシフェラーゼからの発光を、６０，０００個の細胞を１μｇの各環状化反応物でエレクトロポレーションした後２４時間毎に測定し、その後完全に培地を交換した（図５Ａ及び５Ｂ）。

【０８８８】

サリウイルスＡ　ＳＺ１及びサリウイルスＡ　ＢＮ２　ＩＲＥＳ構築物は、他の構築物と比較して高い機能安定性を有した。

【０８８９】

実施例１０

Ｊｕｒｋａｔ細胞における環状及び直鎖状ＲＮＡの発現、機能安定性、及びサイトカイン放出。

アナベナイントロン／エクソン領域、ガウシアルシフェラーゼ発現配列、及びサリウイルスＦＨＢ　ＩＲＥＳを含む、構築物を環状化した。ガウシアルシフェラーゼ発現配列及び約１５０ｎｔポリＡテールを含むｍＲＮＡ（例えば、配列番号３２７９）、ならびに１００％のウリジンを５－メトキシウリジン（５ｍｏＵ）に置き換えるように修飾されたものは市販されており、Ｔｒｉｌｉｎｋから購入した。５ｍｏＵヌクレオチド修飾は、ｍＲＮＡの安定性及び発現を改善することが示されている（Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇ　Ｃｈｅｍ．２０１６　Ｍａｒ　１６；２７（３）：８４９－５３）。Ｊｕｒｋａｔ細胞における修飾

ｍＲＮＡの発現、環状化反応物（未純化）、及びサイズ排除ＨＰＬＣによって精製されたｃｉｒｃＲＮＡ（純粋）を測定し、比較した（図６Ａ）。上清中の分泌されたガウシアルシフェラーゼからの発光を、６０，０００個の細胞を１μｇの各ＲＮＡ種でエレクトロポレーションしてから２４時間後に測定した。

【０８９０】

上清中の分泌されたガウシアルシフェラーゼからの発光は、６０，０００個の細胞を１ｕｇの各ＲＮＡ種でエレクトロポレーションした後２４時間毎に測定し、その後完全に培地を交換した。３日間にわたるＪｕｒｋａｔ細胞における修飾ｍＲＮＡ及びｃｉｒｃＲＮＡの機能安定性データの比較を、図６Ｂに示す。

【０８９１】

ＩＦＮγ（図７Ａ）、ＩＬ－６（図７Ｂ）、ＩＬ－２（図７Ｃ）、ＲＩＧ－Ｉ（図７Ｄ）、ＩＦＮ－β１（図７Ｅ）、及びＴＮＦα（図７Ｆ）転写産物誘導を、６０，０００個のＪｕｒｋａｔ細胞を１μｇの上記の各ＲＮＡ種及び３ｐ－ｈｐＲＮＡ（ＲＩＧ－Ｉアゴニストとして知られる５’三リン酸ヘアピンＲＮＡ）でエレクトロポレーションしてから１８時間後に測定した。

【０８９２】

実施例１１

単球及びマクロファージにおける環状及び直鎖状ＲＮＡの発現。

アナベナイントロン／エクソン領域、ガウシアルシフェラーゼ発現配列、及びサリウイルスＦＨＢ　ＩＲＥＳを含む構築物を環状化した。ガウシアルシフェラーゼ発現配列及び約１５０ｎｔポリＡテールを含むｍＲＮＡ（例えば、配列番号３２７９）、ならびに１００％のウリジンを５－メトキシウリジン（５ｍｏＵ）に置き換えるように修飾されたものは、Ｔｒｉｌｉｎｋから購入した。環状及び修飾ｍＲＮＡの発現を、ヒト初代単球（図８Ａ）及びヒト初代マクロファージ（図８Ｂ）において測定した。上清中の分泌されたガウシアルシフェラーゼからの発光を、６０，０００個の細胞を１μｇの各ＲＮＡ種でエレクトロポレーションしてから２４時間後に測定した。発光は、ヒト初代マクロファージをエレクトロポレーションしてから４日後にも測定し、培地は２４時間毎に交換した（図８Ｃ）。発光における差異は、いずれの場合も統計的に有意であった（ｐ＜０．０５）。

【０８９３】

実施例１２

初代Ｔ細胞におけるＩＲＥＳによる発現及び機能安定性。

アナベナイントロン／エクソン領域、ガウシアルシフェラーゼ発現配列、及び以前に試験したＩＲＥＳのサブセットを含む構築物を環状化し、反応産物をサイズ排除ＨＰＬＣによって精製した。１５０，０００個の初代ヒトＣＤ３＋Ｔ細胞を、１μｇの各ｃｉｒｃＲＮＡでエレクトロポレーションした。エレクトロポレーションから２４時間後に、上清中の分泌されたガウシアルシフェラーゼからの発光を測定した（図９Ａ）。アイチウイルス及びＣＶＢ３　ＩＲＥＳ構築物は、２４時間で最も多く発現した。

【０８９４】

発光はまた、各構築物の機能安定性を比較するために、エレクトロポレーション後２４時間毎に３日間にわたって測定した（図９Ｂ）。サリウイルスＡ　ＳＺ１　ＩＲＥＳを伴う構築物が最も安定していた。

【０８９５】

実施例１３

初代Ｔ細胞及びＰＢＭＣにおける環状及び直鎖状ＲＮＡの発現及び機能安定性。

アナベナイントロン／エクソン領域、ガウシアルシフェラーゼ発現配列、及びサリウイルスＡ　ＳＺ１　ＩＲＥＳまたはサリウイルスＦＨＢ　ＩＲＥＳを含む構築物を環状化した。ガウシアルシフェラーゼ発現配列及び約１５０ｎｔポリＡテールを含むｍＲＮＡ（例えば、配列番号３２７９）、ならびに１００％のウリジンを５－メトキシウリジン（５ｍｏＵ）に置き換えるように修飾されたものは、Ｔｒｉｌｉｎｋから購入した。サリウイルスＡ　ＳＺ１　ＩＲＥＳ　ＨＰＬＣ精製環状及び修飾ｍＲＮＡの発現を、ヒト初代ＣＤ３

＋Ｔ細胞において測定した。サリウイルスＦＨＢ　ＨＰＬＣ精製環状、未精製環状及び修飾ｍＲＮＡの発現を、ヒトＰＢＭＣにおいて測定した。上清中の分泌されたガウシアルシフェラーゼからの発光を、１５０，０００個の細胞を１μｇの各ＲＮＡ種でエレクトロポレーションしてから２４時間後に測定した。初代ヒトＴ細胞に関するデータを図１０Ａ及び１０Ｂに示し、ＰＢＭＣに関するデータを図１０Ｃに示す。精製環状ＲＮＡ及び未精製環状ＲＮＡまたは直鎖状ＲＮＡ間の発現における差異は、いずれの場合も有意であった（ｐ＜０．０５）。

【０８９６】

初代Ｔ細胞上清中の分泌されたガウシアルシフェラーゼからの発光を、構築物の機能安定性を比較するために、エレクトロポレーション後２４時間毎に３日間にわたって測定した。データを、図１０Ｂに示す。精製環状ＲＮＡと直鎖状ＲＮＡとの間の１日目の測定からの相対発光における差異は、初代Ｔ細胞に関して２日目及び３日目の両方で有意であった。

【０８９７】

実施例１４

アナベナイントロンにおける順列置換部位による環状化効率。

ＣＶＢ３　ＩＲＥＳ、ガウシアルシフェラーゼ発現配列、アナベナイントロン／エクソン領域、スペーサー、内部二重鎖領域、及び相同アームを含むＲＮＡ構築物を産生した。従来のアナベナイントロン順列置換部位及びＰ９における５つの連続した順列置換部位を使用した構築物の環状化効率を、ＨＰＬＣによって測定した。Ｐ９における５つの連続した順列置換部位に関するＨＰＬＣクロマトグラムを、図１１Ａに示す。

【０８９８】

環状化効率は、様々な順列置換部位で測定した。環状化効率は、ｃｉｒｃＲＮＡ／（ｃｉｒｃＲＮＡ＋ＲＮＡ前駆体）のそれぞれに関するＨＰＬＣクロマトグラム曲線下面積として定義する。各順列置換部位での環状化効率のランク付けされた定量化を、図１１Ｂに示す。３つの順列置換部位（図１１Ｂに示している）を、さらなる調査のために選択した。

【０８９９】

この実施例における環状ＲＮＡは、インビトロ転写（ＩＶＴ）によって環状化し、次にスピンカラムを介して精製した。環状化効率は、全ての構築物に関して、$Mg^{2+}$及びグアノシンヌクレオチドとのインキュベーションの追加ステップを含めると、高くなる可能性があり得る；ただし、このステップの除去は、環状ＲＮＡ構築物間の比較、及び環状ＲＮＡ構築物の最適化を可能にした。このレベルの最適化は、キメラ抗原受容体をコードするものなどの大きなＲＮＡ構築物で高い環状化効率を維持するのに特に有用である。

【０９００】

実施例１５

代替イントロンの環状化効率。

様々な種起源の順列置換グループ１イントロンまたは順列置換部位及び、ＣＶＢ３　ＩＲＥＳ、ガウシアルシフェラーゼ発現配列、スペーサー、内部二重鎖領域、及び相同アームを含むいくつかの定常要素を含有するＲＮＡ前駆体を作製した。環状化データは、図１２に見出すことができる。図１２Ａは、前駆体、ＣｉｒｃＲＮＡ及びイントロンを分解するクロマトグラムを示す。図１２Ｂは、イントロン構築物の関数として、図１２Ａに示されるクロマトグラムに基づいて、環状化効率のランク付けされた定量化を提供する。

【０９０１】

この実施例における環状ＲＮＡは、インビトロ転写（ＩＶＴ）によって環状化し、次にスピンカラム精製を行った。環状化効率は、全ての構築物に関して、$Mg^{2+}$及びグアノシンヌクレオチドとのインキュベーションの追加ステップを含めると、高くなる可能性があり得る；ただし、このステップの除去は、環状ＲＮＡ構築物間の比較、及び環状ＲＮＡ構築物の最適化を可能にする。このレベルの最適化は、キメラ抗原受容体をコードするものなどの大きなＲＮＡ構築物で高い環状化効率を維持するのに特に有用である。

【０９０２】
実施例１６
相同アームの存在または長さによる環状化効率。
ＣＶＢ３　ＩＲＥＳ、ガウシアルシフェラーゼ発現配列、アナベナイントロン／エクソン領域、スペーサー、及び内部二重鎖領域を含むＲＮＡ構築物を産生した。３つのアナベナイントロン順列置換部位を表す構築物を、３０ｎｔ、２５％ＧＣ相同アームを用いて、または相同アームを用いずに（「ＮＡ」）試験した。これらの構築物は、$Mg^{2+}$とのインキュベーションするステップを伴わずに環状化することが可能であった。環状化効率を測定し、比較した。データは、図１３に見出すことができる。環状化効率は、相同アームを欠く各構築物でより高かった。図１３Ａは、環状化効率のランク付けされた定量化を提供する；図１３Ｂは、前駆体、ｃｉｒｃＲＮＡ及びイントロンを分解するクロマトグラムを提供する。
【０９０３】
３つの順列置換部位のそれぞれについて、構築物を、１０ｎｔ、２０ｎｔ、及び３０ｎｔのアーム長ならびに２５％、５０％、及び７５％ＧＣで作製した。これらの構築物のスプライシング効率を測定し、相同アームを伴わない構築物と比較した（図１４）。スプライシング効率は、スプライシング反応物における総ＲＮＡに対する遊離イントロンの割合として定義する。
【０９０４】
図１５Ａ（左）は、スプライシング効率の改善に対する強い相同アームの寄与を示すＨＰＬＣクロマトグラムを含む。左上：７５％ＧＣ含量、１０ｎｔ相同アーム。中央左：７５％ＧＣ含量、２０ｎｔ相同アーム。左下：７５％ＧＣ含量、３０ｎｔ相同アーム。
【０９０５】
図１５Ａ（右）は、ニッキングの増加と対になったスプライシング効率の増加を示すＨＰＬＣクロマトグラムを示し、ｃｉｒｃＲＮＡピークのショルダーとして現れている。右上：７５％ＧＣ含量、１０ｎｔ相同アーム。中央右：７５％ＧＣ含量、２０ｎｔ相同アーム。右下：７５％ＧＣ含量、３０ｎｔ相同アーム。
【０９０６】
図１５Ｂ（左）は、改善された環状化効率を実証すると仮定された順列置換部位及び相同アームの選択された組み合わせを示す。
【０９０７】
図１５Ｂ（右）は、Ｅ．ｃｏｌｉポリＡポリメラーゼで処理された、改善された環状化効率を実証すると仮定された順列置換部位及び相同アームの選択された組み合わせを示す。
【０９０８】
この実施例における環状ＲＮＡは、インビトロ転写（ＩＶＴ）によって環状化し、次にスピンカラム精製を行った。環状化効率は、全ての構築物に関して、グアノシンヌクレオチドとの追加の$Mg^{2+}$インキュベーションステップを含めると、高くなる可能性があり得る；ただし、このステップの除去は、環状ＲＮＡ構築物間の比較、及び環状ＲＮＡ構築物の最適化を可能にした。このレベルの最適化は、キメラ抗原受容体をコードするものなどの大きなＲＮＡ構築物で高い環状化効率を維持するのに特に有用である。
【０９０９】
実施例１７
キメラ抗原受容体をコードする環状ＲＮＡ
アナベナイントロン／エクソン領域、キムリアキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）発現配列、及びＣＶＢ３　ＩＲＥＳを含む構築物を環状化した。１００，０００個のヒト初代ＣＤ３＋Ｔ細胞を、５００ｎｇのｃｉｒｃＲＮＡでエレクトロポレーションし、ＧＦＰ及びホタルルシフェラーゼを安定して発現するＲａｊｉ細胞と２４時間共培養した。エフェクター対標的比（Ｅ：Ｔ比）０．７５：１。１００，０００個のヒト初代ＣＤ３＋Ｔ細胞を、モックエレクトロポレーションし、対照として共培養した（図１６）。

【０９１０】
１００，０００個のヒト初代ＣＤ３＋Ｔ細胞のセットを、モックエレクトロポレーションした、または１μｇのｃｉｒｃＲＮＡでエレクトロポレーションし、次にＧＦＰ及びホタルルシフェラーゼを安定して発現するＲａｊｉ細胞と４８時間共培養した。Ｅ：Ｔ比１０：１（図１７）。
【０９１１】
Ｒａｊｉ標的細胞の特異的溶解の定量化は、ホタル発光の検出によって決定した（図１８）。モックエレクトロポレーションした、または異なるＣＡＲ配列をコードするｃｉｒｃＲＮＡでエレクトロポレーションした１００，０００個のヒト初代ＣＤ３＋Ｔ細胞を、ＧＦＰ及びホタルルシフェラーゼを安定して発現するＲａｊｉ細胞と４８時間共培養した。特異的溶解％を１－［ＣＡＲ条件発光］／［モック条件発光］として定義した。Ｅ：Ｔ比１０：１。
【０９１２】
実施例１８
Ｊｕｒｋａｔ細胞及び休止ヒトＴ細胞における環状及び直鎖状ＲＮＡの発現及び機能安定性。
アナベナイントロン／エクソン領域、ガウシアルシフェラーゼ発現配列、及び以前に試験したＩＲＥＳのサブセットを含む構築物を環状化し、反応産物をサイズ排除ＨＰＬＣによって精製した。１５０，０００個のＪｕｒｋａｔ細胞を、１μｇの環状ＲＮＡまたは５ｍｏＵ－ｍＲＮＡでエレクトロポレーションした。エレクトロポレーションから２４時間後に、上清中の分泌されたガウシアルシフェラーゼからの発光を測定した（図１９Ａ左）。１５０，０００個の休止初代ヒトＣＤ３＋Ｔ細胞（刺激後１０日）を、１μｇの環状ＲＮＡまたは５ｍｏＵ－ｍＲＮＡでエレクトロポレーションした。エレクトロポレーションから２４時間後に、上清中の分泌されたガウシアルシフェラーゼからの発光を測定した（図１９Ａ右）。
【０９１３】
上清中の分泌されたガウシアルシフェラーゼからの発光は、エレクトロポレーション後２４時間毎に測定し、その後完全に培地を交換した。機能的安定性データを図１９Ｂに示す。環状ＲＮＡは、いずれの場合も直鎖状ＲＮＡよりも機能安定性が高く、Ｊｕｒｋａｔ細胞においてより顕著な差異があった。
【０９１４】
実施例１９
直鎖状ＲＮＡまたは様々な環状ＲＮＡ構築物でエレクトロポレーションした細胞のＩＦＮ－β１、ＲＩＧ－Ｉ、ＩＬ－２、ＩＬ－６、ＩＦＮγ、及びＴＮＦα転写産物誘導。
アナベナイントロン／エクソン領域、ガウシアルシフェラーゼ発現配列、及び以前に試験したＩＲＥＳのサブセットを含む構築物を環状化し、反応産物をサイズ排除ＨＰＬＣによって精製した。１５０，０００個のＣＤ３＋ヒトＴ細胞を、１μｇの環状ＲＮＡ、５ｍｏＵ－ｍＲＮＡ、または免疫刺激陽性対照ポリイノシン：シトシンでエレクトロポレーションした。ＩＦＮ－β１（図２０Ａ）、ＲＩＧ－Ｉ（図２０Ｂ）、ＩＬ－２（図２０Ｃ）、ＩＬ－６（図２０Ｄ）、ＩＦＮ－γ（図２０Ｅ）、及びＴＮＦ－α（図２０Ｆ）転写誘導をエレクトロポレーションの１８時間後に測定した。
【０９１５】
実施例２０
異なる量の環状または直鎖状ＲＮＡでエレクトロポレーションしたＣＡＲ発現細胞による標的細胞の特異的溶解及びＩＦＮγ転写産物誘導；異なるＥ：Ｔ比でのＣＡＲ発現細胞による標的及び非標的細胞の特異的溶解。
アナベナイントロン／エクソン領域、抗ＣＤ１９　ＣＡＲ発現配列、及びＣＶＢ３　ＩＲＥＳを含む構築物を環状化し、反応産物をサイズ排除ＨＰＬＣによって精製した。モックエレクトロポレーションした、または抗ＣＤ１９　ＣＡＲ配列をコードする異なる量のｃｉｒｃＲＮＡでエレクトロポレーションした１５０，０００個のヒト初代ＣＤ３＋Ｔ細

胞を、２：１のＥ：Ｔ比にて、ＧＦＰ及びホタルルシフェラーゼを安定して発現するＲａｊｉ細胞と１２時間共培養した。Ｒａｊｉ標的細胞の特異的溶解率は、ホタル発光の検出によって決定した（図２１Ａ）。特異的溶解％を、１－［ＣＡＲ条件発光］／［モック条件発光］として定義した。ＩＦＮγ転写産物誘導は、エレクトロポレーションから２４時間後に測定した（図２１Ｂ）。

【０９１６】

１５０，０００個のヒト初代ＣＤ３＋Ｔ細胞を、モックエレクトロポレーションした、または抗ＣＤ１９　ＣＡＲ配列をコードする５００ｎｇのｃｉｒｃＲＮＡもしくはｍ１ψ－ｍＲＮＡでエレクトロポレーションし、次に異なるＥ：Ｔ比にて、ホタルルシフェラーゼを安定して発現するＲａｊｉ細胞と２４時間共培養した。Ｒａｊｉ標的細胞の特異的溶解％をホタル発光の検出によって決定した（図２２Ａ）。特異的溶解％を、１－［ＣＡＲ条件発光］／［モック条件発光］として定義した。

【０９１７】

ＣＡＲを発現するＴ細胞をさらに、異なるＥ：Ｔ比にて、ホタルルシフェラーゼを安定して発現するＲａｊｉまたはＫ５６２細胞と２４時間共培養した。Ｒａｊｉ標的細胞またはＫ５６２非標的細胞の特異的溶解は、ホタル発光の検出によって決定した（図２２Ｂ）。特異的溶解％を、１－［ＣＡＲ条件発光］／［モック条件発光］として定義した。

【０９１８】

実施例２１

ＣＡＲをコードする環状ＲＮＡまたは直鎖状ＲＮＡでエレクトロポレーションしたＴ細胞による標的細胞の特異的溶解。

アナベナイントロン／エクソン領域、抗ＣＤ１９　ＣＡＲ発現配列、及びＣＶＢ３　ＩＲＥＳを含む構築物を環状化し、反応産物をサイズ排除ＨＰＬＣによって精製した。ヒト初代ＣＤ３＋Ｔ細胞を、５００ｎｇの環状ＲＮＡまたは等モル量のｍ１ψ－ｍＲＮＡでエレクトロポレーションし、それぞれがＣＤ１９を標的としたＣＡＲをコードした。Ｒａｊｉ細胞をＣＡＲ－Ｔ細胞培養物に７日間にわたって１０：１のＥ：Ｔ比にて加えた。特異的溶解％を、両方の構築物について、１、３、５、及び７日目に測定した（図２３）。

【０９１９】

実施例２２

抗ＣＤ１９　ＣＡＲまたは抗ＢＣＭＡ　ＣＡＲを発現するＴ細胞によるＲａｊｉ細胞の特異的溶解。

アナベナイントロン／エクソン領域、抗ＣＤ１９または抗ＢＣＭＡ　ＣＡＲ発現配列、及びＣＶＢ３　ＩＲＥＳを含む構築物を環状化し、反応産物をサイズ排除ＨＰＬＣによって精製した。１５０，０００個の初代ヒトＣＤ３＋Ｔ細胞を、５００ｎｇのｃｉｒｃＲＮＡでエレクトロポレーションし、次にＲａｊｉ細胞と２：１のＥ：Ｔ比にて共培養した。特異的溶解％をエレクトロポレーションの１２時間後に測定した（図２４）。

【０９２０】

実施例２３

抗原を発現する環状及び直鎖状ＲＮＡ発現の発現、機能安定性、及びサイトカイン転写誘導。

１つ以上の抗原発現配列を含む構築物を環状化し、反応産物をサイズ排除ＨＰＬＣによって精製した。抗原提示細胞を環状ＲＮＡまたはｍＲＮＡでエレクトロポレーションした。

【０９２１】

インビトロでの抗原産生を、ＥＬＩＳＡを介して測定した。任意に、抗原産生を、エレクトロポレーション後２４時間毎に測定した。サイトカイン転写物の誘導または放出を、抗原をコードする環状または直鎖状ＲＮＡによる抗原提示細胞のエレクトロポレーションの１８時間後に測定した。試験したサイトカインには、ＩＦＮ－β１、ＲＩＧ－Ｉ、ＩＬ－２、ＩＬ－６、ＩＦＮγ、ＲＡＮＴＥＳ、及びＴＮＦαが含まれ得る。

【０９２２】

インビトロでの抗原産生及びサイトカイン誘導は、発現及び免疫刺激を最もよく維持する比率を見出すために、精製ｃｉｒｃＲＮＡ、精製ｃｉｒｃＲＮＡ＋アンチセンスｃｉｒｃＲＮＡ、及び未精製のｃｉｒｃＲＮＡを使用して測定した。

【０９２３】

実施例２４

動物モデルにおけるインビボでの抗原及び抗体発現。

インビボでの抗原発現及び抗体産生を促進する、ｃｉｒｃＲＮＡをコードする抗原の能力を評価するために、１つ以上の抗原をコードするＲＮＡの漸増用量を、筋肉内注射を介してマウスに導入した。

【０９２４】

マウスに１回注射し、２８日後に血液を採取し、その後再び注射して、１４日後に血液を採取した。目的の抗原に対する中和抗体を、ＥＬＩＳＡを介して測定した。

【０９２５】

実施例２５

感染からの保護。

感染を予防または治癒するためのｃｉｒｃＲＮＡをコードする抗原の能力を評価するために、ウイルス（インフルエンザなど）の１つ以上の抗原をコードするＲＮＡを、筋肉内注射を介してマウスに導入した。

【０９２６】

マウスは、１つ以上の抗原をコードするｃｉｒｃＲＮＡの初回注射及び追加注射を受けた。インフルエンザなどのウイルスからの保護は、２週間にわたる体重減少及び死亡率によって決定した。

【０９２７】

実施例２６

実施例２６Ａ：化合物の合成

本発明の代表的なイオン化可能脂質の合成は、ＰＣＴ出願ＰＣＴ／ＵＳ２０１６／０５２３５２、ＰＣＴ／ＵＳ２０１６／０６８３００、ＰＣＴ／ＵＳ２０１０／０６１０５８、ＰＣＴ／ＵＳ２０１８／０５８５５５、ＰＣＴ／ＵＳ２０１８／０５３５６９、ＰＣＴ／ＵＳ２０１７／０２８９８１、ＰＣＴ／ＵＳ２０１９／０２５２４６、ＰＣＴ／ＵＳ２０１８／０３５４１９、ＰＣＴ／ＵＳ２０１９／０１５９１３、ならびに米国出願公開第２０１９０３１４５２４号、同第２０１９０３２１４８９号、及び同第２０１９０３１４２８４号に記載されており、それぞれの内容が、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【０９２８】

実施例２６Ｂ：化合物の合成

本発明の代表的なイオン化可能脂質の合成は、米国特許公開第ＵＳ２０１７０２１０６９７Ａ１号に記載されており、その内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

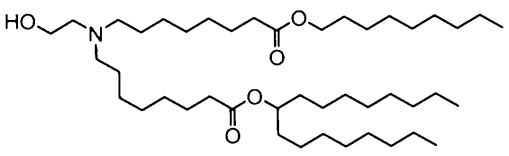
【０９２９】

実施例２７

器官によるタンパク質発現

ＦＬｕｃをコードする環状または直鎖状ＲＮＡを生成し、以下の配合：５０％の

【化１３７】




で表されるイオン化脂質１０ｂ－１５、１０％のＤＳＰＣ、１．５％のＰＥＧ－ＤＭＧ、

３８．５％のコレステロールともに輸送ビヒクルにロードした。ＣＤ－１マウスに０．２ｍｇ／ｋｇで投薬し、発光を６時間（生ＩＶＩＳ）及び２４時間（生ＩＶＩＳ及びエクスビボＩＶＩＳ）の時点で測定した。肝臓、脾臓、腎臓、肺、及び心臓の総フラックス（目的の領域にわたる光子／秒）を測定した（図２５及び２６）。

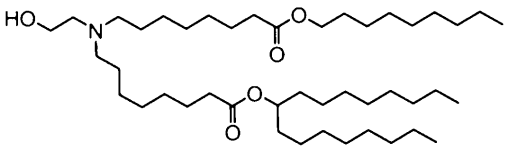
【０９３０】

実施例２８

脾臓における発現の分布

ＧＦＰをコードする環状または直鎖状ＲＮＡを生成し、以下の配合：５０％の

【化１３８】



で表されるイオン化脂質１０ｂ－１５、１０％のＤＳＰＣ、１．５％のＰＥＧ－ＤＭＧ、３８．５％のコレステロールともに輸送ビヒクルにロードした。製剤をＣＤ－１マウスに投与する。細胞タイプにわたる発現の分布を決定するために脾臓細胞についてフローサイトメトリーを実行する。

【０９３１】

実施例２９

実施例２９Ａ：ナノ粒子組成物の産生

細胞への環状ＲＮＡの送達に使用するための安全及び効果的なナノ粒子組成物を調査するために、一連の製剤を調製し、試験する。具体的には、ナノ粒子組成物の脂質成分中の特定の要素及びその比率を最適化する。

【０９３２】

ナノ粒子は、１つの流体ストリーム中で、または一方が環状ＲＮＡを含有し、他方が脂質成分を有する２つの流体ストリームの混合プロセス、例えばマイクロフルイディクス及びＴジャンクション混合で作製できる。

【０９３３】

脂質組成物は、イオン化可能脂質、任意でヘルパー脂質（例えばＡｖａｎｔｉ　Ｐｏｌａｒ　Ｌｉｐｉｄｓ，Ａｌａｂａｓｔｅｒ，ＡＬから入手可能な、ＤＯＰＥ、ＤＳＰＣ、またはオレイン酸）、ＰＥＧ脂質（例えばＡｖａｎｔｉ　Ｐｏｌａｒ　Ｌｉｐｉｄｓ，Ａｌａｂａｓｔｅｒ，ＡＬから入手可能な、１，２－ジミリストイル－ｓｎ－グリセロールメトキシポリエチレングリコール、ＰＥＧ－ＤＭＧとしても知られる）、及び構造脂質、例えばコレステロールを、約、例えば、溶媒、例えば、エタノール中４０または５０ｍＭの濃度にて組み合わせることにより調製される。溶液は、例えば、－２０℃で保管するために冷蔵するべきである。脂質を組み合わせて、所望のモル比を生成し（例えば、下の表１７ａ及び１７ｂを参照されたい）、水及びエタノールで希釈して、最終脂質濃度を、例えば、約５．５ｍＭ及び約２５ｍＭ間にする。

【表１７ａ－１】

表１７ａ

| 製剤番号 | 説明 |
|---|---|
| 1 | C12-200、DOPE、Chol、及びDMG-PEG2K(40:30:25:5)の50mg/mLエタノール溶液のアリコートを混合し、エタノールで希釈して、最終体積を3mLにした。別に、circRNAの緩衝水溶液(10mMクエン酸/150mM NaCl、pH4.5)を、1mg/mLのストックから調製した。脂質溶液をcircRNA水溶液に急速に注入し、振盪して、20%エタノール中の最終懸濁液を得た。得られたナノ粒子懸濁液を濾過し、1×PBS(pH7.4)で濾過し、濃縮して、2~8℃で保存した。 |
| 2 | DODAP、DOPE、コレステロール、及びDMG-PEG2K(18:56:20:6)の50mg/mLエタノール溶液のアリコートを混合し、エタノールで希釈して、最終体積を3mLにした。別に、EPO circRNAの緩衝水溶液(10mMクエン酸/150mM NaCl、pH4.5)を、1mg/mLのストックから調製した。脂質溶液をcircRNA水溶液に急速に注入し、振盪して、20%エタノール中の最終懸濁液を得た。得られたナノ粒子懸濁液を濾過し、1×PBS(pH7.4)で濾過し、濃縮して、2~8℃で保存した。最終濃度=1.35mg/mL EPO circRNA(封入)。Zave=75.9nm(Dv(50)=57.3nm;Dv(90)=92.1nm)。 |
| 3 | HGT4003、DOPE、コレステロール、及びDMG-PEG2K(50:25:20:5)の50mg/mLエタノール溶液のアリコートを混合し、エタノールで希釈して、最終体積を3mLにした。別に、circRNAの緩衝水溶液(10mMクエン酸/150mM NaCl、pH4.5)を、1mg/mLのストックから調製した。脂質溶液をcircRNA水溶液に急速に注入し、振盪して、20%エタノール中の最終懸濁液を得た。得られたナノ粒子懸濁液を濾過し、1×PBS(pH7.4)で濾過し、濃縮して、2~8℃で保存した。 |
| 4 | ICE、DOPE、及びDMG-PEG2K(70:25:5)の50mg/mLエタノール溶液のアリコートを混合し、エタノールで希釈して、最終体積を3mLにした。別に、circRNAの緩衝水溶液(10mMクエン酸/150mM NaCl、pH4.5)を、1mg/mLのストックから調製した。脂質溶液をcircRNA水溶液に急速に注入し、振盪して、20%エタノール中の最終懸濁液を得た。得られたナノ粒子懸濁液を濾過し、1×PBS(pH7.4)で濾過し、濃縮して、2~8℃で保存した。 |
| 5 | HGT5000、DOPE、コレステロール、及びDMG-PEG2K(40:20:35:5)の50mg/mLエタノール溶液のアリコートを混合し、エタノールで希釈して、最終体積を3mLにした。別に、EPO circRNAの緩衝水溶液(10mMクエン酸/150mM NaCl、pH4.5)を、1mg/mLのストックから調製した。脂質溶液をcircRNA水溶液に急速に注入し、振盪して、20%エタノール中の最終懸濁液を得た。得られたナノ粒子懸濁液を濾過し、1×PBS(pH7.4)で濾過し、濃縮して、2~8℃で保存した。最終濃度=1.82mg/mL EPO mRNA(封入)。Zave=105.6nm(Dv(50)=53.7nm;Dv(90)=157nm)。 |

【表１７ａ－２】

| | |
|---|---|
| 6 | HGT5001、DOPE、コレステロール、及び DMG-PEG2K(40:20:35:5)の 50mg/mL エタノール溶液のアリコートを混合し、エタノールで希釈して、最終体積を 3mL にした。別に、EPO circRNA の緩衝水溶液(10mM クエン酸/150mM NaCl、pH4.5)を、1mg/mL のストックから調製した。脂質溶液を circRNA 水溶液に急速に注入し、振盪して、20%エタノール中の最終懸濁液を得た。得られたナノ粒子懸濁液を濾過し、1×PBS(pH7.4)で濾過し、濃縮して、2~8℃で保存した。 |
| 7 | HGT5001、DOPE、コレステロール、及び DMG-PEG2K(35:16:46.5:2.5)の 50mg/mL エタノール溶液のアリコートを混合し、エタノールで希釈して、最終体積を 3mL にした。別に、EPO circRNA の緩衝水溶液(10mM クエン酸/150mM NaCl、pH4.5)を、1mg/mL のストックから調製した。脂質溶液を circRNA 水溶液に急速に注入し、振盪して、20%エタノール中の最終懸濁液を得た。得られたナノ粒子懸濁液を濾過し、1×PBS(pH7.4)で濾過し、濃縮して、2~8℃で保存した。 |
| 8 | HGT5001、DOPE、コレステロール、及び DMG-PEG2K(40:10:40:10)の 50mg/mL エタノール溶液のアリコートを混合し、エタノールで希釈して、最終体積を 3mL にした。別に、EPO circRNA の緩衝水溶液(10mM クエン酸/150mM NaCl、pH4.5)を、1mg/mL のストックから調製した。脂質溶液を circRNA 水溶液に急速に注入し、振盪して、20%エタノール中の最終懸濁液を得た。得られたナノ粒子懸濁液を濾過し、1×PBS(pH7.4)で濾過し、濃縮して、2~8℃で保存した。 |
| 9 | LP-01、DSPC、コレステロール、及び DMG-PEG2K(45:9:44:2)の 50mg/mL エタノール溶液のアリコートを混合し、エタノールで希釈して、最終体積を 3mL にした。別に、FLuc、hEPO、マイクロジストロフィン、ミニジストロフィン、またはジストロフィン circRNA の緩衝水溶液(50mM Na アセテート、pH4.5)を、1 mg/mL のストックから調製した。脂質溶液を circRNA 水溶液に急速に注入し、振盪して、25%エタノール中の最終懸濁液を得た。得られたナノ粒子懸濁液を濾過し、1×PBS(pH7.4)で濾過し、濃縮して、2~8℃で保存した。 |
| 10 | LP-01、DSPC、コレステロール、及び DMG-PEG2K、ならびにエチルラウロイルアルジネートの DMSO 溶液(38.25:7.65:37.4:1.7:15)の 50mg/mL エタノール溶液のアリコートを混合し、エタノールで希釈して、最終体積を 3mL にした。別に、FLuc、hEPO、マイクロジストロフィン、ミニジストロフィン、またはジストロフィン circRNA の緩衝水溶液(50mM Bis-Tris、pH7.0)を、1 mg/mL のストックから調製した。脂質溶液を circRNA 水溶液に急速に注入し、振盪して、25%エタノール中の最終懸濁液を得た。得られたナノ粒子懸濁液を濾過し、1×PBS(pH7.4)で濾過し、濃縮して、2~8℃で保存した。 |

【表１７ａ－３】

| | |
|---|---|
| 11 | SM-102、DSPC、コレステロール、及びDMG-PEG2K(50:10:38.5:1.5)の50mg/mLエタノール溶液のアリコートを混合し、エタノールで希釈して、最終体積を3mLにした。別に、FLuc、hEPO、マイクロジストロフィン、ミニジストロフィン、またはジストロフィンcircRNAの緩衝水溶液(6.25mM Naアセテート、pH4.5)を、1 mg/mLのストックから調製した。脂質溶液をcircRNA水溶液に急速に注入し、振盪して、25%エタノール中の最終懸濁液を得た。得られたナノ粒子懸濁液を濾過し、1×PBS(pH7.4)で濾過し、濃縮して、2~8℃で保存した。 |
| 12 | SM-102、DSPC、コレステロール、及びDMG-PEG2K、ならびにエチルラウロイルアルジネートのDMSO溶液(42.5:8.5:32.73:1.275:15)の50mg/mLエタノール溶液のアリコートを混合し、エタノールで希釈して、最終体積を3mLにした。別に、FLuc、hEPO、マイクロジストロフィン、ミニジストロフィン、またはジストロフィンcircRNAの緩衝水溶液(20mM Naアセテート、pH4.5)を、1 mg/mLのストックから調製した。脂質溶液をcircRNA水溶液に急速に注入し、振盪して、25%エタノール中の最終懸濁液を得た。得られたナノ粒子懸濁液を濾過し、1×PBS(pH7.4)で濾過し、濃縮して、2~8℃で保存した。 |

【０９３４】

いくつかの実施形態では、輸送ビヒクルは、表１７ａに記載するような製剤を有する。

【表１７ｂ－１】

表１７ｂ

| 組成物(mol %) | 成分 |
|---|---|
| 40:20:38.5:1.5 | 化合物：リン脂質：フィトステロール*：PEG-DMG |
| 45:15:38.5:1.5 | 化合物：リン脂質：フィトステロール*：PEG-DMG |
| 50:10:38.5:1.5 | 化合物：リン脂質：フィトステロール*：PEG-DMG |
| 55:5:38.5:1.5 | 化合物：リン脂質：フィトステロール*：PEG-DMG |

【表１７ｂ－２】

| 組成物(mol %) | 成分 |
|---|---|
| 60:5:33.5:1.5 | 化合物：リン脂質：フィトステロール*:PEG-DMG |
| 45:20:33.5:1.5 | 化合物：リン脂質：フィトステロール*:PEG-DMG |
| 50:20:28.5:1.5 | 化合物：リン脂質：フィトステロール*:PEG-DMG |
| 55:20:23.5:1.5 | 化合物：リン脂質：フィトステロール*:PEG-DMG |
| 60:20:18.5:1.5 | 化合物：リン脂質：フィトステロール*:PEG-DMG |
| 40:15:43.5:1.5 | 化合物：リン脂質：フィトステロール*:PEG-DMG |
| 50:15:33.5:1.5 | 化合物：リン脂質：フィトステロール*:PEG-DMG |
| 55:15:28.5:1.5 | 化合物：リン脂質：フィトステロール*:PEG-DMG |
| 60:15:23.5:1.5 | 化合物：リン脂質：フィトステロール*:PEG-DMG |
| 40:10:48.5:1.5 | 化合物：リン脂質：フィトステロール*:PEG-DMG |
| 45:10:43.5:1.5 | 化合物：リン脂質：フィトステロール*:PEG-DMG |
| 55:10:33.5:1.5 | 化合物：リン脂質：フィトステロール*:PEG-DMG |
| 60:10:28.5:1.5 | 化合物：リン脂質：フィトステロール*:PEG-DMG |
| 40:5:53.5:1.5 | 化合物：リン脂質：フィトステロール*:PEG-DMG |
| 45:5:48.5:1.5 | 化合物：リン脂質：フィトステロール*:PEG-DMG |
| 50:5:43.5:1.5 | 化合物：リン脂質：フィトステロール*:PEG-DMG |
| 40:20:40:0 | 化合物：リン脂質：フィトステロール*:PEG-DMG |
| 45:20:35:0 | 化合物：リン脂質：フィトステロール*:PEG-DMG |
| 50:20:30:0 | 化合物：リン脂質：フィトステロール*:PEG-DMG |
| 55:20:25:0 | 化合物：リン脂質：フィトステロール*:PEG-DMG |
| 60:20:20:0 | 化合物：リン脂質：フィトステロール*:PEG-DMG |
| 40:15:45:0 | 化合物：リン脂質：フィトステロール*:PEG-DMG |

【０９３５】
いくつかの実施形態では、輸送ビヒクルは、表１７ｂに記載するような製剤を有する。
【０９３６】
ｃｉｒｃＲＮＡを含むナノ粒子組成物の場合、脱イオン水中０．１ｍｇ／ｍｌの濃度のｃｉｒｃＲＮＡの溶液を、緩衝液、例えば、ｐＨ３～４の５０ｍＭクエン酸ナトリウム緩衝液に希釈して、ストック溶液を形成する。代替的に、脱イオン水中０．１５ｍｇ／ｍｌの濃度のｃｉｒｃＲＮＡの溶液を、緩衝液、例えば、ｐＨ３～４．５の６．２５ｍＭ酢酸ナトリウム緩衝液に希釈して、ストック溶液を形成する。
【０９３７】

環状ＲＮＡ及び脂質成分を含むナノ粒子組成物を、脂質溶液を、環状ＲＮＡを約５：１～約５０：１の脂質成分対ｃｉｒｃＲＮＡの重量：重量比率にて含む溶液と組み合わせることによって調製する。脂質溶液は、例えば、ＮａｎｏＡｓｓｅｍｂｌｒマイクロ流体ベースのシステムを使用して、約１０ｍｌ／分～約１８ｍｌ／分または約５ｍｌ／分～約１８ｍｌ／分の流速でｃｉｒｃＲＮＡ溶液に迅速に注射して、約１：１～約４：１間の水対エタノール比率を伴う懸濁液を産生する。

【０９３８】

ナノ粒子組成物を、透析によって処理して、エタノールを除去して、緩衝液交換を達成することができる。製剤を、分子量カットオフが１０ｋＤａまたは２０ｋＤａのＳｌｉｄｅ－Ａ－Ｌｙｚｅｒカセット（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ Ｉｎｃ．，Ｒｏｃｋｆｏｒｄ，ＩＬ）を使用して、一次生成物の２００倍の容量のリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）、ｐＨ７．４に対して、２回透析する。次いで製剤を４℃で一晩透析した。結果得られたナノ粒子懸濁液を、０．２μｍの滅菌フィルター（Ｓａｒｓｔｅｄｔ，Ｎｕｍｂｒｅｃｈｔ，Ｇｅｒｍａｎｙ）を通してガラスバイアルに濾過し、圧着クロージャーで密閉する。０．０１ｍｇ／ｍｌ～０．１５ｍｇ／ｍｌのナノ粒子組成物溶液が、一般的に取得される。

【０９３９】

上記の方法は、ナノ沈殿及び粒子形成を誘導する。

【０９４０】

Ｔジャンクション及び直接注射を含むがこれに限定されない代替的なプロセスを使用して、同じナノ沈殿を達成し得る。Ｂ．ナノ粒子組成物の特徴評価

【０９４１】

Ｚｅｔａｓｉｚｅｒ Ｎａｎｏ ＺＳ（Ｍａｌｖｅｒｎ Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ Ｌｔｄ，Ｍａｌｖｅｒｎ，Ｗｏｒｃｅｓｔｅｒｓｈｉｒｅ，ＵＫ）を使用して、ナノ粒子組成物の粒径、多分散性指数（ＰＤＩ）及びゼータ電位を、粒径の決定においては１×ＰＢＳ、及びゼータ電位の決定においては１５ｍＭのＰＢＳで決定することができる。

【０９４２】

紫外可視分光法を使用して、ナノ粒子組成物中のｃｉｒｃＲＮＡの濃度を決定することができる。１×ＰＢＳに希釈した１００μＬの製剤を４：１（ｖ／ｖ）のメタノール及びクロロホルムの混合物９００μＬに加える。混合後、溶液の吸光度スペクトルを、例えば、ＤＵ ８００分光光度計（Ｂｅｃｋｍａｎ Ｃｏｕｌｔｅｒ，Ｂｅｃｋｍａｎ Ｃｏｕｌｔｅｒ，Ｉｎｃ．，Ｂｒｅａ，ＣＡ）で、２３０ｎｍ～３３０ｎｍで記録する。ナノ粒子組成物中のｃｉｒｃＲＮＡの濃度は、その組成物中に使用されているｃｉｒｃＲＮＡの吸光係数ならびに、波長、例えば、２６０ｎｍでの吸光度及び、波長、例えば、３３０ｎｍでのベースライン値間の差に基づいて計算することができる。

【０９４３】

ＱＵＡＮＴ－ＩＴ（商標）ＲＩＢＯＧＲＥＥＮ（登録商標）ＲＮＡアッセイ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）を使用して、ナノ粒子組成物によるｃｉｒｃＲＮＡの封入を評価することができる。試料を、ＴＥ緩衝液（１０ｍＭトリス－ＨＣｌ、１ｍＭ ＥＤＴＡ、ｐＨ７．５）中およそ約５μｇ／ｍＬまたは１μｇ／ｍＬの濃度まで希釈する。５０μＬの希釈試料を、ポリスチレン９６ウェルプレートに移し、５０μＬのＴＥ緩衝液または５０μＬの２～４％Ｔｒｉｔｏｎ（登録商標）Ｘ－１００溶液のいずれかをウェルに加える。プレートを、３７℃の温度にて１５分間インキュベートした。ＲＩＢＯＧＲＥＥＮ（登録商標）試薬を、１：１００または１：２００でＴＥ緩衝液に希釈し、１００μＬのこの溶液を各ウェルに加える。蛍光強度は、蛍光プレートリーダー（Ｗａｌｌａｃ Ｖｉｃｔｏｒ １４２０ Ｍｕｌｔｉｌａｂｅｌ Ｃｏｕｎｔｅｒ；Ｐｅｒｋｉｎ Ｅｌｍｅｒ，Ｗａｌｔｈａｍ，ＭＡ）を使用して、励起波長、例えば、約４８０ｎｍ及び発光波長、例えば、約５２０ｎｍにて測定することができる。試薬ブランクの蛍光値を試料の各値から引き、遊離ｃｉｒｃＲＮＡのパーセンテージを、インタクトな試料（Ｔｒｉｔｏｎ（登録商標） Ｘ－１００を添加しない）の蛍光強

度を破壊試料（Ｔｒｉｔｏｎ（登録商標）　Ｘ－１００の添加によって生じる）の蛍光値で除することで決定した。Ｃ．

【０９４４】

実施例２９Ｂ：インビボ製剤研究

様々なナノ粒子組成物がどのように効果的にｃｉｒｃＲＮＡを標的細胞に送達するのかをモニターするために、ｃｉｒｃＲＮＡを含む異なるナノ粒子組成物を調製し、げっ歯類集団に投与する。マウスに、脂質ナノ粒子製剤を伴うナノ粒子組成物を含む単一用量を、静脈内、筋肉内、動脈内、または腫瘍内投与する。一部の例では、マウスに用量を吸入させ得る。用量サイズは、０．００１ｍｇ／ｋｇ～１０ｍｇ／ｋｇの範囲であってよく、この場合１０ｍｇ／ｋｇは、マウスの体質量１ｋｇ毎にナノ粒子組成物に１０ｍｇのｃｉｒｃＲＮＡを含む用量を説明する。ＰＢＳを含む対照組成物も採用し得る。

【０９４５】

ナノ粒子組成物をマウスに投与する際、特定の製剤及びその用量の用量送達プロファイル、用量応答、及び毒性を、酵素結合免疫吸着測定法（ＥＬＩＳＡ）、生物発光イメージング、または他の方法によって測定することができる。タンパク質発現の時間経過も評価することができる。評価のためにげっ歯類から収集した試料には、血液及び組織（例えば、筋肉内注射部位からの筋肉組織及び内部組織）が含まれ得る；試料収集には、動物の犠牲が含まれ得る。

【０９４６】

ｃｉｒｃＲＮＡを含む組成物の投与によって誘導されるより高いレベルのタンパク質発現は、より高いｃｉｒｃＲＮＡ翻訳及び／またはナノ粒子組成物ｃｉｒｃＲＮＡ送達効率を示すだろう。非ＲＮＡ成分は翻訳機構自体に影響を与えるとは考えられていないため、タンパク質発現のレベルが高いことは、他のナノ粒子組成物またはその非存在と比べて、所与のナノ粒子組成物によるｃｉｒｃＲＮＡの送達効率が高いことを示している可能性が高い。

【０９４７】

実施例３０

ナノ粒子組成物の特徴評価

Ｚｅｔａｓｉｚｅｒ　Ｎａｎｏ　ＺＳ（Ｍａｌｖｅｒｎ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ　Ｌｔｄ，Ｍａｌｖｅｒｎ，Ｗｏｒｃｅｓｔｅｒｓｈｉｒｅ，ＵＫ）を使用して、輸送ビヒクル組成物の粒径、多分散性指数（ＰＤＩ）及びゼータ電位を、粒径の決定においては１×ＰＢＳ、及びゼータ電位の決定においては１５ｍＭのＰＢＳで決定することができる。

【０９４８】

紫外可視分光法を使用して、輸送ビヒクル組成物中の治療剤及び／または予防剤（例えば、ＲＮＡ）の濃度を決定することができる。１×ＰＢＳに希釈した１００μＬの製剤を４：１（ｖ／ｖ）のメタノール及びクロロホルムの混合物９００μＬに加える。混合後、溶液の吸光度スペクトルを、例えば、ＤＵ　８００分光光度計（Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ，Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ，Ｉｎｃ．，Ｂｒｅａ，ＣＡ）で、２３０ｎｍ～３３０ｎｍで記録する。輸送ビヒクル組成物中の治療剤及び／または予防剤の濃度は、その組成物中に使用されている治療剤及び／または予防剤の吸光係数ならびに、波長、例えば、２６０ｎｍでの吸光度及び、波長、例えば、３３０ｎｍでのベースライン値間の差に基づいて計算することができる。

【０９４９】

ＲＮＡを含む輸送ビヒクル組成物の場合、ＱＵＡＮＴ－ＩＴ（商標）ＲＩＢＯＧＲＥＥＮ（登録商標）ＲＮＡアッセイ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ　Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）を使用して、輸送ビヒクル組成物によるＲＮＡの封入を評価することができる。試料を、ＴＥ緩衝液（１０ｍＭトリス－ＨＣｌ、１ｍＭ　ＥＤＴＡ、ｐＨ７．５）中およそ約５μｇ／ｍＬまたは１μｇ／ｍＬの濃度まで希釈する。５０μＬの希釈試料を、ポリスチレン９６ウェルプレートに移し、５０μＬのＴＥ緩衝液または５０μＬの２～４％Ｔｒｉｔｏｎ（登録商標）　Ｘ－１００溶液のいずれかをウェルに加える。プ

レートを、３７℃の温度にて１５分間インキュベートした。ＲＩＢＯＧＲＥＥＮ（登録商標）試薬を、１：１００または１：２００でＴＥ緩衝液に希釈し、１００μＬのこの溶液を各ウェルに加える。蛍光強度は、蛍光プレートリーダー（Ｗａｌｌａｃ　Ｖｉｃｔｏｒ１４２０　Ｍｕｌｔｉｌａｂｌｅｌ　Ｃｏｕｎｔｅｒ；Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ，Ｗａｌｔｈａｍ，ＭＡ）を使用して、励起波長、例えば、約４８０ｎｍ及び発光波長、例えば、約５２０ｎｍにて測定することができる。試薬ブランクの蛍光値を試料の各値から引き、遊離ＲＮＡのパーセンテージを、インタクトな試料（Ｔｒｉｔｏｎ（登録商標）　Ｘ－１００を添加しない）の蛍光強度を破壊試料（Ｔｒｉｔｏｎ（登録商標）　Ｘ－１００の添加によって生じる）の蛍光値で除することで決定した。

【０９５０】

実施例３１

Ｔ細胞標的化

輸送ビヒクルをＴ細胞に標的するために、Ｔ細胞抗原結合剤、例えば、抗ＣＤ８抗体を、輸送ビヒクルの表面にカップリングする。抗Ｔ細胞抗原抗体は、ＰＢＳ中のＥＤＴＡの存在下で過剰なＤＴＴにより穏やかに還元され、遊離ヒンジ領域チオールを露出させる。ＤＴＴを除去するために、抗体を、脱塩カラムに通過させる。ヘテロ二官能性クロスリンカーＳＭ（ＰＥＧ）２４を使用して、抗体を、ｃｉｒｃＲＮＡをロードした輸送ビヒクルの表面に係留する（アミン基は、ＰＥＧ脂質の頭部基に存在し、抗体上の遊離チオール基は、ＤＴＴによって作製され、ＳＭ（ＰＥＧ）２４は、アミン及びチオール基間で架橋する）。輸送ビヒクルを最初に過剰のＳＭ（ＰＥＧ）２４とインキュベートし、遠心分離して、未反応のクロスリンカーを除去する。次いで、活性化輸送ビヒクルを、過剰の還元抗Ｔ細胞抗原抗体とともにインキュベートした。未結合抗体は、遠心濾過デバイスを使用して除去した。

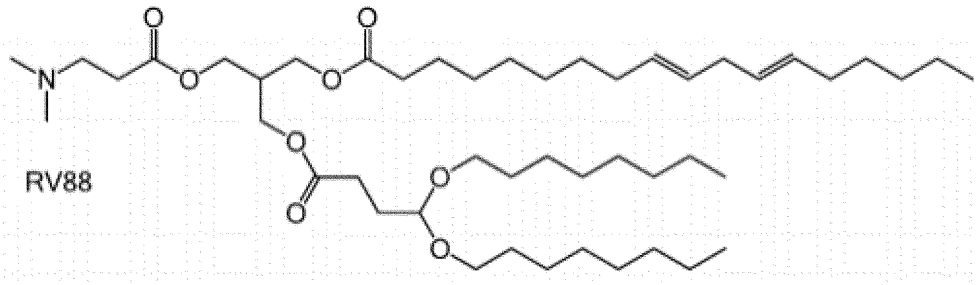
【０９５１】

実施例３２

ＲＶ８８を使用するＲＮＡ含有輸送ビヒクル。

この実施例では、ＲＮＡ含有輸送ビヒクルを、ｃｉｒｃＲＮＡの送達のためにカチオン性脂質ＲＶ８８を含む２－Ｄボルテックスマイクロ流体チップを使用して合成した。

【化１３９】



【表１８ａ】

表１８ａ

| 材料及び機器 | ベンダー | カタログ番号 |
|---|---|---|
| 1M Tris-HCl、pH 8.0、滅菌 | Teknova | T1080 |
| 5M 塩化ナトリウム溶液 | Teknova | S0250 |
| QB クエン酸緩衝液、pH 6.0 (100 mM) | Teknova | Q2446 |
| ヌクレアーゼフリー水 | Ambion | AM9937 |
| Triton X-100 | Sigma-Aldrich | T8787-100ML |
| RV88 | GVK bio | |
| DSPC | Lipoid | 556500 |
| コレステロール | Sigma | C3045-5G |
| PEG2K | Avanti Polar Lipids | 880150 |
| エタノール | Acros Organic | 615090010 |
| | | |
| 5 mL ホウケイ酸塩ガラスバイアル | Thermo Scientific | ST5-20 |
| PD MiniTrap G-25 脱塩カラム | GE Healthcare | VWRカタログ番号 95055-984 |
| Quant-iT RiboGreen RNAアッセイキット | Molecular Probes/ Life Technologies | R11490 |
| ブラック９６ウェルマイクロプレート | Greiner | 655900 |

【０９５２】

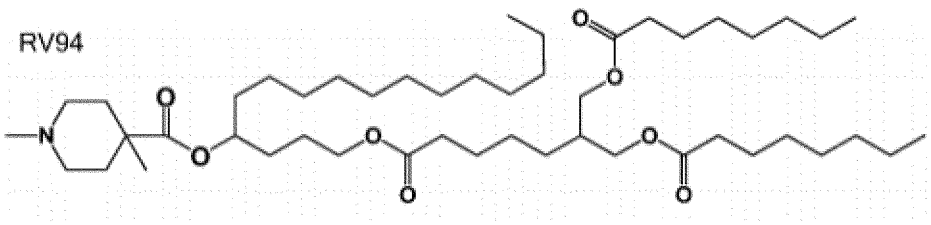
ＲＶ８８、ＤＳＰＣ、及びコレステロールを全て、ホウケイ酸バイアル中１０ｍｇ／ｍｌの濃度にてエタノール中で調製する。脂質１４：０－ＰＥＧ２Ｋ　ＰＥは、ホウケイ酸ガラスバイアル中４ｍｇ／ｍｌの濃度にて調製する。ストック濃度での脂質の溶解は、脂質をエタノール中で２分間超音波処理することによって達成した。次に、溶液を、１７０ｒｐｍに設定したオービタル傾斜シェーカー上で、３℃にて１０分間加熱した。次に、バイアルを２６℃で最低４５分間平衡化した。次に、表１８ｂに示される量のストック脂質を添加することによって脂質を混合した。次に、溶液をエタノールで調整して、最終脂質濃度を７．９２ｍｇ／ｍｌとした。

【表１８ｂ】

表１８ｂ

| 組成物 | MW | % | ｎモル | mg | ストック（ｍｇ／ｍｌ） | ul | エタノール（ｕｌ） |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| RV88 | 794.2 | 40% | 7200 | 5.72 | 10 | 571.8 | 155.3 |
| DSPC | 790.15 | 10% | 1800 | 1.42 | 10 | 142.2 | |
| コレステロール | 386.67 | 48% | 8640 | 3.34 | 10 | 334.1 | |
| PEG2K | 2693.3 | 2% | 360 | 0.97 | 4 | 242.4 | |

【０９５３】
ＲＮＡを、ｐＨ６．０の７５ｍＭクエン酸緩衝液を用いて、ＲＮＡの濃度は１．２５０ｍｇ／ｍｌで、ストック溶液として調製する。次に、ＲＮＡの濃度を、ｐＨ６．０の７５ｍＭクエン酸緩衝液を用いて０．１０３７ｍｇ／ｍｌに調整し、２６℃に平衡化する。次に、溶液を、２６℃にて最低２５分間インキュベートする。
【０９５４】
マイクロ流体チャンバーを、エタノールで洗浄し、ｎｅＭＹＳＩＳシリンジポンプを、シリンジにＲＮＡ溶液をロードし、別のシリンジにエタノール脂質をロードすることによって調製する。両方のシリンジはロードされ、ｎｅＭＥＳＹＳソフトウェアの制御下にある。次に、溶液を、２の水相対有機相比率で、２２ｍｌ／分の総流速（ＲＮＡに関しては１４．６７ｍｌ／分及び脂質溶液に関しては７．３３ｍｌ／分で、混合チップに適用する。両方のポンプを同期して起動した。マイクロ流体チップから流出したミキサー溶液は、４×１ｍｌ画分で収集し、最初の画分は廃棄物として廃棄する。ＲＮＡ－リポソームを含有する残りの溶液は、Ｇ－２５ミニ脱塩カラムを使用して、１０ｍＭトリス－ＨＣＩ、１ｍＭ　ＥＤＴＡ、ｐＨ７．５に交換する。緩衝液の交換後、物質を、サイズ及びＲＮＡ捕捉について、それぞれ、ＤＬＳ分析及びＲｉｂｏｇｒｅｅｎアッセイを通して特徴評価する。
【０９５５】
実施例３３
ＲＶ９４を使用するＲＮＡ含有輸送ビヒクル。
この実施例では、ＲＮＡ含有リポソームを、ｃｉｒｃＲＮＡの送達のためにカチオン性脂質ＲＶ９４を含む２－Ｄボルテックスマイクロ流体チップを使用して合成する。
【化１４０】



【表１９】

表１９

| 材料及び機器 | ベンダー | カタログ番号 |
|---|---|---|
| 1M Tris-HCl、pH 8.0、滅菌 | Teknova | T1080 |
| 5M 塩化ナトリウム溶液 | Teknova | S0250 |
| QBクエン酸緩衝液、pH 6.0 (100 mM) | Teknova | Q2446 |
| ヌクレアーゼフリー水 | Ambion | AM9937 |
| Triton X-100 | Sigma-Aldrich | T8787-100ML |
| RV94 | GVKbio | |
| DSPC | Lipoid | 556500 |
| コレステロール | Sigma | C3045-5G |
| PEG2K | Avanti Polar Lipids | 880150 |
| エタノール | Acros Organic | 615090010 |
| | | |
| 5 mL ホウケイ酸塩ガラスバイアル | Thermo Scientific | ST5-20 |
| PD MiniTrap G-25 脱塩カラム | GE Healthcare | VWRカタログ番号 95055-984 |
| Quant-iT RiboGreen RNAアッセイキット | Molecular Probes/Life Technologies | R11490 |
| ブラック９６ウェルマイクロプレート | Greiner | 655900 |

【０９５６】

脂質は、実施例３２と同様に調製し、表１９に挙げた物質量を使用して、最終脂質濃度を７．９２ｍｇ／ｍｌとした。

【表２０】

表２０

| 組成物 | MW | % | ｎモル | mg | ストック（ｍｇ／ｍｌ） | ul | エタノール（ｕｌ） |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| RV94 | 808.22 | 40% | 2880 | 2.33 | 10 | 232.8 | 155.3 |
| DSPC | 790.15 | 10% | 720 | 0.57 | 10 | 56.9 | |
| コレステロール | 386.67 | 48% | 3456 | 1.34 | 10 | 133.6 | |
| PEG2K | 2693.3 | 2% | 144 | 0.39 | 4 | 97.0 | |

【０９５７】

ｃｉｒｃＲＮＡの水溶液を、ｐＨ６．０の７５ｍＭクエン酸緩衝液を用いて、ｃｉｒｃＲＮＡは１．２５０ｍｇ／ｍｌで、ストック溶液として調製する。次に、ＲＮＡの濃度を、ｐＨ６．０の７５ｍＭクエン酸緩衝液を用いて０．１０３７ｍｇ／ｍｌに調整し、２６℃に平衡化する。次に、溶液を、２６℃にて最低２５分間インキュベートする。

【０９５８】

マイクロ流体チャンバーを、エタノールで洗浄し、ｎｅＭＹＳＩＳシリンジポンプを、

シリンジにＲＮＡ溶液をロードし、別のシリンジにエタノール脂質をロードすることによって調製する。両方のシリンジはロードされ、ｎｅＭＥＳＹＳソフトウェアの制御下にある。次に、溶液を、２の水相対有機相比率で、２２ｍｌ／分の総流速（ＲＮＡに関しては１４．６７ｍｌ／分及び脂質溶液に関しては７．３３ｍｌ／分で、混合チップに適用する。両方のポンプを同期して起動した。マイクロ流体チップから流出したミキサー溶液は、４×１ｍｌ画分で収集し、最初の画分は廃棄物として廃棄する。ｃｉｒｃＲＮＡ輸送ビヒクルを含有する残りの溶液は、Ｇ－２５ミニ脱塩カラムを使用して、上記のように、１０ｍＭ　トリス－ＨＣＩ、１ｍＭ　ＥＤＴＡ、ｐＨ７．５に交換する。緩衝液の交換後、物質を、サイズ及びＲＮＡ捕捉について、それぞれ、ＤＬＳ分析及びＲｉｂｏｇｒｅｅｎアッセイを通して特徴評価する。リポソームの生物物理学的分析を、表２１に示す。

【表２１】

表２１

| 試料名 | Ｎ：Ｐ比 | TFR | 比 | ＲＮＡ封入量 | ＲＮＡ封入収率 | サイズ | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | ｍｌ／分 | （水性／有機相） | (μg/ml) | % | d.nm | PDI |
| SAM-RV94 | 8 | 22 | 2 | 31,46 | 86,9 | 113,1 | 0,12 |

【０９５９】

実施例３４

インライン混合の一般的プロトコル。

個々及び別個のストック溶液を調製する－１つは脂質を含有し、他方はｃｉｒｃＲＮＡを含有する。所望の脂質または脂質混合物、ＤＳＰＣ、コレステロール及びＰＥＧ脂質を含有する脂質ストックを、９０％エタノールに可溶化することによって調製する。残りの１０％は、低ｐＨクエン酸緩衝液である。脂質ストックの濃度は、４ｍｇ／ｍＬである。このクエン酸緩衝液のｐＨは、採用する脂質の種類に応じて、ｐＨ３～ｐＨ５の範囲であることができる。ｃｉｒｃＲＮＡも、４ｍｇ／ｍＬの濃度にてクエン酸緩衝液に可溶化する。５ｍＬの各ストック溶液を調製する。

【０９６０】

ｃｉｒｃＲＮＡと組み合わせる前、ストック溶液は完全に透明であり、脂質は完全に可溶化されることが確認されている。ストック溶液を加熱して、脂質を完全に可溶化し得る。このプロセスで使用されるｃｉｒｃＲＮＡは、未修飾または修飾オリゴヌクレオチドであってよく、コレステロールなどの親油性部分と複合し得る。

【０９６１】

個々のストックは、各溶液をＴジャンクションにポンプで送り込むことによって組み合わされる。デュアルヘッドのＷａｔｓｏｎ－Ｍａｒｌｏｗポンプを使用して、２つのストリームの開始と停止を同時に制御した。１．６ｍｍポリプロピレンチューブを、線流速を増加させるために、０．８ｍｍチューブにさらにサイズを小さくする。ポリプロピレンライン（ＩＤ＝０．８ｍｍ）を、Ｔジャンクションのいずれかの側に取り付ける。ポリプロピレンＴは、１．６ｍｍの直鎖状先端を有して、４．１$mm^3$の容量を結果得る。ポリプロピレンラインの大きい端（１．６ｍｍ）の各々を、可溶化脂質ストックまたは可溶化ｃｉｒｃＲＮＡのいずれかを含有する。試験管の中に入れるＴジャンクションの後に、組み合わされたストリームが流れ出る単一のチューブを配置する。次に、チューブを、２×容量のＰＢＳを含有する容器に伸ばし入れ、これを急速撹拌する。ポンプの流速は、３００ｒｐｍまたは１１０ｍＬ／分の設定とする。エタノールを除去し、透析によってＰＢＳに

交換する。次に、脂質製剤を、遠心分離またはダイアフィルトレーションを使用して、適切な作業濃度に濃縮する。

【０９６２】

Ｃ５７ＢＬ／６マウス（Ｃｈａｒｌｅｓ Ｒｉｖｅｒ Ｌａｂｓ，ＭＡ）に、尾静脈注射を介して生理食塩水または製剤化されたｃｉｒｃＲＮＡのいずれかを与える。投与後の様々な時点で、血清試料を後眼窩採血によって収集する。第ＶＩＩ因子タンパク質の血清レベルは、発色アッセイ（Ｂｉｏｐｈｅｎ ＦＶＴＩ，Ａｎｉａｒａ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ，ＯＨ）を使用して試料中で決定する。第ＶＩＩ因子の肝臓ＲＮＡレベルを決定するために、動物を犠牲にし、肝臓を採取して液体窒素で瞬間凍結する。組織溶解物を、凍結組織から調製し、第ＶＩＩ因子の肝臓ＲＮＡレベルを分岐ＤＮＡアッセイ（ＱｕａｎｔｉＧｅｎｅ Ａｓｓａｙ，Ｐａｎｏｍｉｃｓ，ＣＡ）を使用して定量化する。

【０９６３】

ＦＶＩＩ活性を、Ｃ５７ＢＬ／６マウスにおける静脈内（ボーラス）注射から４８時間後に、ＦＶＴＩ ｓｉＲＮＡ処理動物において評価する。ＦＶＩＩは、マイクロプレートスケールで、製造元の指示に従って、血清または組織中のタンパク質レベルを決定するための市販のキットを使用して測定する。ＦＶＩＩの低下を、未処置対照マウスに対して決定し、結果を残存ＦＶＩＩ率（％）として表す。２つの用量レベル（０．０５及び０．０５ｍｇ／ｋｇ ＦＶＩＩ ｓｉＲＮＡ）を、各新規リポソーム組成物のスクリーニングに使用する。

【０９６４】

実施例３６

予形成ベシクルを使用するｃｉｒｃＲＮＡ製剤。

カチオン性脂質含有輸送ビヒクルを、予形成ベシクル法を使用して作製する。カチオン性脂質、ＤＳＰＣ、コレステロール及びＰＥＧ－脂質を、エタノールに、それぞれ、４０／１０／４０／１０のモル比にて可溶化する。脂質混合物を、水性緩衝液（５０ｍＭクエン酸塩、ｐＨ４）に混合しながら加えて、それぞれ、最終エタノール濃度が３０％（容量／容量）、最終脂質濃度が６．１ｍｇ／ｍＬになるようにし、室温で２分間平衡化してから押し出す。Ｎｉｃｏｍｐ分析によって決定して、ベシクルの直径が７０～９０ｎｍになるまで、Ｌｉｐｅｘ Ｅｘｔｒｕｄｅｒ（Ｎｏｒｔｈｅｒｎ Ｌｉｐｉｄｓ，Ｖａｎｃｏｕｖｅｒ，ＢＣ）を使用して、２２℃にて、ポアサイズ８０ｎｍのフィルター（Ｎｕｃｌｅｐｏｒｅ）を２枚積み重ねたものに水和脂質を通して押し出し、取得する。小ベシクルを形成しないカチオン性脂質混合物では、脂質混合物を低ｐＨ緩衝液（５０ｍＭクエン酸塩、ｐＨ３）で水和させて、ＤＳＰＣ頭部基上のホスフェート基をプロトン化することによって、安定的な７０～９０ｎｍのベシクルの形成を助ける。

【０９６５】

ＦＶＩＩ ｃｉｒｃＲＮＡ（５０ｍＭクエン酸塩に可溶化した、３０％エタノールを含有するｐＨ４水溶液）を、混合しながら、３５℃に予め平衡化したベシクルに、約５ｍＬ／分の速度で加える。最終的な標的ｃｉｒｃＲＮＡ／脂質比０．０６（ｗｔ ｗｔ）を達成した後、混合物をさらに３０分間、３５℃にてインキュベートして、ベシクルの再構成及びＦＶＩＩ ＲＮＡの封入を可能にする。次に、エタノールを除去し、透析またはタンジェンシャルフローダイアフィルトレーションのいずれかによって、外部緩衝液をＰＢＳ（１５５ｍＭ ＮａＣｌ、３ｍＭ Ｎａ２ＨＰＯ４、１ｍＭ ＫＨ２ＰＯ４、ｐＨ７．５）と置き換える。サイズ排除スピンカラムまたはイオン交換スピンカラムを使用して、非封入ＲＮＡを除去した後、封入ｃｉｒｃＲＮＡ対脂質の最終的な比率を決定する。

【０９６６】

実施例３７

実施例３７Ａ：操作された環状ＲＮＡからの三重特異性抗原結合タンパク質の発現

環状ＲＮＡを、（１）３’スプライシング後グループＩイントロン断片；（２）配列内リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ）；（３）三重特異性抗原結合タンパク質コード領域；及び（４）３’相同性領域を含むように設計する。三重特異性抗原結合タンパク質領域を、

標的抗原、例えば、ＧＰＣ３に結合する例示的な三重特異性抗原結合タンパク質を産生するように構築する。

【０９６７】

実施例３７Ｂ：ｓｃＦｖ　ＣＤ３結合ドメインの生成

ヒトＣＤ３イプシロン鎖標準配列は、Ｕｎｉｐｒｏｔアクセッション番号Ｐ０７７６６である。ヒトＣＤ３ガンマ鎖標準配列は、Ｕｎｉｐｒｏｔアクセッション番号Ｐ０９６９３である。ヒトＣＤ３デルタ鎖標準配列は、Ｕｎｉｐｒｏｔアクセッション番号Ｐ０４３２３４である。ＣＤ３イプシロン、ＣＤ３ガンマまたはＣＤ３デルタに対する抗体を、親和性成熟などの既知の技術を介して生成する。ネズミ抗ＣＤ３抗体を出発物質として使用する場合、マウス特異的残基が、本明細書に記載の三重特異性抗原結合タンパク質の処置を受けた対象においてヒト－抗マウス抗原（ＨＡＭＡ）反応を誘導し得る場合、ネズミ抗ＣＤ３抗体のヒト化が臨床環境のために所望である。ヒト化は、適切なヒト生殖系列アクセプターフレームワークに対するネズミ抗ＣＤ３抗体からのＣＤＲ領域のグラフト化（任意でＣＤＲ及び／またはフレームワーク領域に対する他の修飾を含む）によって達成される。

【０９６８】

そのため、ヒトまたはヒト化抗ＣＤ３抗体を使用して、三重特異性抗原結合タンパク質のＣＤ３結合ドメインのためのｓｃＦｖ配列を生成する。ヒトまたはヒト化ＶＬ及びＶＨドメインをコードするＤＮＡ配列を得て、構築物のためのコドンを、ホモサピエンスからの細胞における発現のために任意で最適化する。ｓｃＦｖにおいてＶＬ及びＶＨドメインが現れる順序は様々であり（すなわち、ＶＬ－ＶＨ、またはＶＨ－ＶＬ配向）、３コピーの「Ｇ４Ｓ」（配列番号３２８０）サブユニット（$G_4S$）$_3$（配列番号３２８１）が可変ドメインを接続させてｓｃＦｖドメインを生成する。抗ＣＤ３ｓｃＦｖプラスミド構築物は、任意のＦｌａｇ、Ｈｉｓまたは他の親和性タグを有し得、ＨＥＫ２９３または他の好適なヒトまたは哺乳動物細胞株にエレクトロポレーションし、精製する。バリデーションアッセイには、ＦＡＣＳによる結合分析、Ｐｒｏｔｅｏｎを使用する動態分析、及びＣＤ３を発現する細胞の染色が含まれる。

【０９６９】

実施例３７Ｃ：ｓｃＦｖグリピカン－３（ＧＰＣ３）結合ドメインの生成

グリピカン－３（ＧＰＣ３）は、肝細胞癌に存在するが、健康な正常な肝臓組織には存在しない細胞表面タンパク質の１つである。それは肝細胞癌において上昇することが頻繁に観察され、ＨＣＣ患者にとって予後不良に関連する。それは、Ｗｎｔシグナル伝達を活性化することが知られている。ＭＤＸ－１４１４、ＨＮ３、ＧＣ３３、及びＹＰ７を含むＧＰＣ３抗体が生成されている。

【０９７０】

ＧＰＣ－３または別の標的抗原に結合するｓｃＦｖは、ＣＤ３に対するｓｃＦｖ結合ドメインの生成のための上記方法と同様に生成される。

【０９７１】

実施例３７Ｄ：インビトロでの三重特異性抗原結合タンパク質の発現

ＣＨＯ－Ｋ１チャイニーズハムスター卵巣細胞（ＡＴＣＣ，ＣＣＬ－６１）（Ｋａｏ ａｎｄ Ｐｕｃｋ，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ １９６８；６０（４）：１２７５－８１）の誘導体であるＣＨＯ細胞発現システム（Ｆｌｐ－Ｉｎ（登録商標），Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を使用する。Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓによって提供される標準的な細胞培養プロトコルに従って接着細胞を継代培養する。

【０９７２】

懸濁液における成長に対する適合のため、細胞を組織培養フラスコから脱着させ、無血清培地に入れる。１０％ＤＭＳＯを有する培地中で懸濁液適合細胞を凍結保存する。

【０９７３】

分泌される三重特異性抗原結合タンパク質を安定的に発現する組換えＣＨＯ細胞株を、

懸濁液適合細胞のトランスフェクションによって生成する。抗生物質ハイグロマイシンＢでの選択中に生存細胞密度を週２回測定し、細胞を遠心分離し、新たな選択培地に０．１×１０$^{6}$生存細胞／ｍＬの最大密度で再懸濁する。三重特異性抗原結合タンパク質を安定的に発現する細胞プールを選択から２～３週間後に回収し、その時点で細胞を振盪フラスコ中の標準培地に移す。組換え分泌タンパク質の発現は、タンパク質ゲル電気泳動またはフローサイトメトリーを実施することによって確認する。安定な細胞プールをＤＭＳＯ含有培地中で凍結乾燥する。

【０９７４】

三重特異性抗原結合タンパク質を、安定的にトランスフェクトされたＣＨＯ細胞株の１０日流加培養物において細胞培養上清への分泌によって産生する。細胞培養上清を１０日後に典型的には＞７５％の培養生存率で採取する。試料を産生培養物から１日おきに収集し、細胞密度及び生存率を評価する。採取の日に、細胞培養上清を、さらなる使用の前に遠心分離及び真空濾過によって清浄化する。

【０９７５】

細胞培養上清におけるタンパク質発現力価及び産物全体性をＳＤＳ－ＰＡＧＥによって分析する。

【０９７６】

実施例３７Ｅ：三重特異性抗原結合タンパク質の精製

三重特異性抗原結合タンパク質を、２ステップの手順でＣＨＯ細胞培養上清から精製する。構築物を、第１のステップにおけるアフィニティークロマトグラフィーと、第２のステップにおけるＳｕｐｅｒｄｅｘ　２００での分取サイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）に共する。試料を緩衝液交換し、限外濾過によって＞１ｍｇ／ｍＬの純度の典型的な濃度まで濃縮し、最終試料の均一性（典型的には＞９０％）を還元及び非還元条件下でＳＤＳ　ＰＡＧＥによって評価し、続いて抗（半減期延長ドメイン）または抗イディオタイプ抗体を使用した免疫ブロット及び分析的ＳＥＣをそれぞれ行う。精製されたタンパク質を、使用するまで一定分量で、－８０℃で保存する。

【０９７７】

実施例３８

半減期延長ドメインを有する操作された環状ＲＮＡの発現は、半減期延長ドメインを有さないものと比べて改善した薬物動態パラメータを有する。

実施例２３のｃｉｒｃＲＮＡ分子でコードされた三重特異性抗原結合タンパク質を、０．５ｍｇ／ｋｇボーラス注射としてカニクイザルに筋肉内投与する。別のカニクイザル群に、ＣＤ３及びＧＰＣ－３に対する結合ドメインを有するが半減期延長ドメインを欠くサイズのｃｉｒｃＲＮＡ分子でコードされる同等のタンパク質を与える。第３及び第４の群に、ＣＤ３及び半減期延長ドメイン結合ドメインを有するｃｉｒｃＲＮＡ分子でコードされるタンパク質及びＧＰＣ－３及び半減期延長ドメインを有するタンパク質をそれぞれ与える。ｃｉｒｃＲＮＡによってコードされる両方のタンパク質は、サイズが三重特異性抗原結合タンパク質と同等である。各試験群は、５匹のサルからなる。血清試料を示された時点で採取し、段階希釈し、タンパク質の濃度を、ＣＤ３及び／またはＧＰＣ－３に対する結合ＥＬＩＳＡを使用して決定する。

【０９７８】

薬物動態分析を、試験品血漿濃度を使用して実施する。各試験品についての群平均血漿データは、投薬後の時間に対してプロットした場合、多指数プロファイルに適合する。データを、ボーラスインプットならびに分配相及び排泄相についての一次速度定数を用いて標準的な２コンパートメントモデルによってフィッティングさせる。静脈内投与についてのデータの最良あてはめのための一般方程式は、ｃ（ｔ）＝Ａｅ～$^{ａｔ}$＋Ｂｅ～$^{ｐｔ}$（式中、ｃ（ｔ）は時間ｔにおける血漿濃度であり、Ａ及びＢはＹ軸上の切片であり、α及びβは、各々、分布相及び消失相の見かけの一次速度定数である）である。α相はクリアランスの初期相であり、動物の全ての細胞外液へのタンパク質の分布を反映する一方で、減衰曲線の第２またはβ相の部分は真の血漿クリアランスを表す。かかる方式を当てはめる

ための方法は、当該技術分野でよく知られている。例えば、Ａ＝Ｄ／Ｖ（ａ－ｋ２１）／（ａ－ｐ）、Ｂ＝Ｄ／Ｖ（ｐ－ｋ２１）／（ａ－ｐ）、ａ及びβ（α＞βの場合）は、二次方程式：$r^2$＋（ｋ１２＋ｋ２１＋ｋ１０）ｒ＋ｋ２１ｋ１０＝０の根であり、Ｖ＝分布容積、ｋ１０＝排出速度、ｋ１２＝コンパートメント１からコンパートメント２への移動速度及びｋ２１＝コンパートメント２からコンパートメント１への移動速度、及びＤ＝投与された用量の推定されるパラメータを使用する。

【０９７９】

データ分析：濃度対時間プロファイルのグラフをＫａｌｅｉｄａＧｒａｐｈ（ＫａｌｅｉｄａＧｒａｐｈ（商標）Ｖ．３．０９ Ｃｏｐｙｒｉｇｈｔ １９８６－１９９７．Ｓｙｎｅｒｇｙ Ｓｏｆｔｗａｒｅ．Ｒｅａｄｉｎｇ，Ｐａ．）を使用して作製する。報告可能ではない（ＬＴＲ）ものとして報告された値は、ＰＫ分析に含めず、グラフで表されない。薬物動態パラメータは、ＷｉｎＮｏｎｌｉｎソフトウェア（ＷｉｎＮｏｎｌｉｎ（登録商標）Ｐｒｏｆｅｓｓｉｏｎａｌ Ｖ．３．１ ＷｉｎＮｏｎｌｉｎ（商標）Ｃｏｐｙｒｉｇｈｔ １９９８－１９９９．Ｐｈａｒｓｉｇｈｔ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ．Ｍｏｕｎｔａｉｎ Ｖｉｅｗ，Ｃａｌｉｆ）を使用してコンパートメント分析によって決定する。薬物動態パラメータは、Ｒｉｔｓｃｈｅｌ Ｗ Ａ ａｎｄ Ｋｅａｒｎｓ Ｇ Ｌ，１９９９，ＥＳＴ：Ｈａｎｄｂｏｏｋ Ｏｆ Ｂａｓｉｃ Ｐｈａｒｍａｃｏｋｉｎｅｔｉｃｓ Ｉｎｃｌｕｄｉｎｇ Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ，５ｔｈ ｅｄｉｔｉｏｎ，Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ａｓｓｏｃ．，Ｗａｓｈｉｎｇｔｏｎ，Ｄ Ｃ記載されているように計算する。

【０９８０】

実施例２３のｃｉｒｃＲＮＡ分子でコードされる三重特異性抗原結合タンパク質は、半減期延長ドメインを欠くタンパク質と比較して、消失半減期の延長などの改善した薬物動態パラメータを有することが予期される。

【０９８１】

実施例３９

三重特異性抗原結合タンパク質の細胞傷害

実施例２３のｃｉｒｃＲＮＡ分子でコードされる三重特異性抗原結合タンパク質を、ＧＰＣ－３＋標的細胞に対するＴ細胞依存性細胞傷害のその媒介についてインビトロで評価する。

【０９８２】

蛍光標識されたＧＰＣ３標的細胞を、実施例２３の三重特異性抗原結合タンパク質の存在下で、エフェクター細胞としてのランダムドナーの単離されたＰＢＭＣまたはＴ細胞とインキュベートする。加湿インキュベーター内での３７℃で４時間のインキュベーション後、標的細胞から上清への蛍光色素の放出を蛍光光度計で決定する。実施例２３の三重特異性抗原結合タンパク質を用いずにインキュベートされた標的細胞及びインキュベーションの最後にサポニンの添加によって全体的に溶解した標的細胞は、それぞれ陰性対照及び陽性対照として機能する。

【０９８３】

測定された残存する生存標的細胞に基づいて、特異的細胞溶解のパーセンテージを、以下の式：［１－（生存標的の数（試料）／生存標的の数（自発））］×１００％に従って計算する。シグモイド用量反応曲線及びＥＣ５０値を、ＧｒａｐｈＰａｄ Ｓｏｆｔｗａｒｅを使用して非線形回帰／４パラメータロジスティックフィットによって計算する。所与の抗体濃度について得られた溶解値を使用して、Ｐｒｉｓｍソフトウェアを使用して４パラメータロジスティックフィット分析によってシグモイド用量－反応曲線を計算する。

【０９８４】

実施例４０

イオン化可能脂質の合成

４０．１（（３－（２－メチル－１Ｈ－イミダゾール－１－イル）プロピル）アザネジル）ビス（ヘキサン－６，１－ジイル）ビス（２－ヘキシルデカノエート）（脂質１０ａ

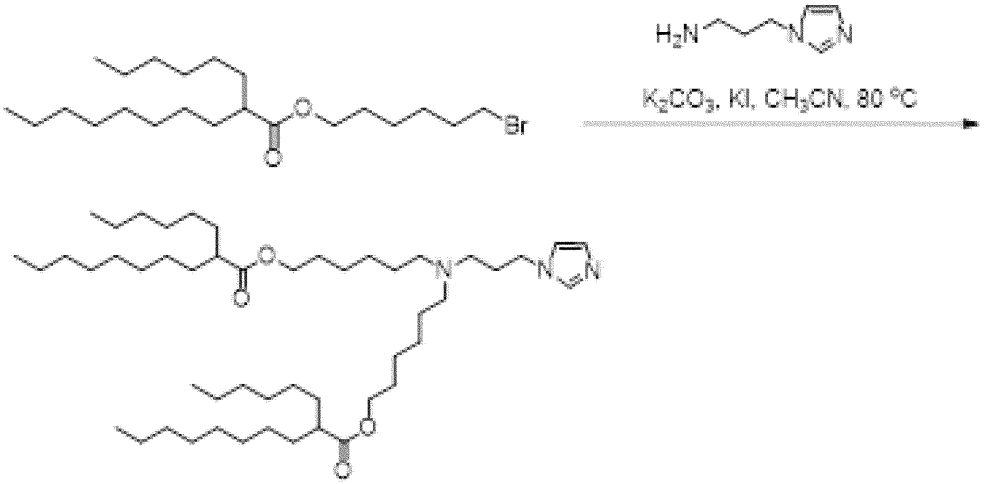
－２７）及び（（３－（１Ｈ－イミダゾール－１－イル）プロピル）アザネジル）ビス（ヘキサン－６，１－ジイル）ビス（２－ヘキシルデカノエート））（脂質１０ａ－２６）の合成

冷却器と接続された１００ｍＬの丸底フラスコ内で、３－（１Ｈ－イミダゾール－１－イル）プロパン－１－アミン（１００ｍｇ、０．７９９ｍｍｏｌ）または３－（２－メチル－１Ｈ－イミダゾール－１－イル）プロパン－１－アミン（０．７９９ｍｍｏｌ）、６－ブロモヘキシル２－ヘキシルデカノエート（７３７．２ｍｇ、１．７５７ｍｍｏｌ）、炭酸カリウム（４８５ｍｇ、３．５１５ｍｍｏｌ）及びヨウ化カリウム（１３ｍｇ、０．０８ｍｍｏｌ）をアセトニトリル（３０ｍＬ）中で混合し、反応混合物を８０℃に４８時間加熱した。混合物を室温に冷却し、セライトのパッドを介して濾過した。濾液を酢酸エチルで希釈した。水、ブラインで洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。溶媒を蒸発させ、粗残渣をフラッシュクロマトグラフィー（$SiO_2$：$CH_2Cl_2$＝$CH_2Cl_2$中の１００％～１０％のメタノール）によって精製し、無色の油生成物が得られた（９２ｍｇ、１５％）。（（３－（１Ｈ－イミダゾール－１－イル）プロピル）アザネジル）ビス（ヘキサン－６，１－ジイル）ビス（２－ヘキシルデカノエート））の分子式は$C_{50}H_{95}N_3O_4$であり、分子量（$M_w$）は８０１．７である。

【０９８５】

（（３－（１Ｈ－イミダゾール－１－イル）プロピル）アザネジル）ビス（ヘキサン－６，１－ジイル）ビス（２－ヘキシルデカノエート））（脂質１０ａ－２６）の合成のための反応スキーム。

【化１４１】




【０９８６】

脂質１０ａ－２６の特徴評価をＬＣ－ＭＳによって実施した。図２７Ａ～Ｃは、脂質１０ａ－２６の特徴評価を示している。図２７Ａは、脂質１０ａ－２６について観察されたプロトンＮＭＲを示している。図２７Ｂは、示される総イオン及びＵＶクロマトグラムを伴う脂質１０ａ－２６についての代表的なＬＣ／ＭＳトレースである。

【０９８７】

４０．２　脂質２２－Ｓ１４の合成

４０．２．１　２－（テトラデシルチオ）エタン－１－オールの合成

アセトニトリル（２００ｍＬ）中の２－スルファニルエタノール（５．４０ｇ、６９．１１ｍｍｏｌ、４．８２ｍＬ、０．８７１ｅｑ）の混合物に１－ブロモテトラデカン（２２ｇ、７９．３４ｍｍｏｌ、２３．６６ｍＬ、１ｅｑ）及び炭酸カリウム（１７．５５ｇ、１２６．９５ｍｍｏｌ、１．６ｅｑ）を２５℃で添加した。反応混合物を４０℃に加温し、１２時間撹拌した。ＴＬＣ（酢酸エチル／石油エーテル＝２５／１、$R_f$＝０．３、$I_2$によって染色）は、出発物質が完全に消費され、新たな主要なスポットが生成されたことを示した。反応混合物を濾過し、フィルターケーキをアセトニトリル（５０ｍＬ）で

洗浄し、次いで濾液を真空下で濃縮して残渣を得、これをシリカゲル上のカラム（酢酸エチル／石油エーテル＝１／１００～１／２５）によって精製して２－（テトラデシルチオ）エタン－１－オール（１４ｇ、収率６４．２８％）を白色の固体として得た。

【０９８８】

$^1$Ｈ ＮＭＲ （ＥＴ３６３８７－４５－Ｐ１Ａ，４００ ＭＨｚ，クロロホルム－ｄ） δ ０．８７ － ０．９１ （ｍ，３ Ｈ） １．２７ （ｓ，２０ Ｈ） １．３５ － １．４３ （ｍ，２ Ｈ） １．５３ － １．６４ （ｍ，２ Ｈ） ２．１６ （ｂｒ ｓ，１ Ｈ） ２．４９ － ２．５６ （ｍ，２ Ｈ） ２．７４ （ｔ，Ｊ ＝ ５．９３ Ｈｚ，２ Ｈ） ３．７２ （ｂｒ ｄ，Ｊ ＝ ４．８９ Ｈｚ，２ Ｈ）．図２８は、対応する核磁気共鳴（ＮＭＲ）スペクトルを示している。

【０９８９】

４０．２．２ ２－（テトラデシルチオ）エチルアクリレートの合成

ジクロロメタン（２４０ｍＬ）中の２－（テトラデシルチオ）エタン－１－オール（１４ｇ、５１．００ｍｍｏｌ、１ｅｑ）の溶液にトリエチルアミン（７．７４ｇ、７６．５０ｍｍｏｌ、１０．６５ｍＬ、１．５ｅｑ）及びプロプ－２－エノイルクロリド（５．５４ｇ、６１．２０ｍｍｏｌ、４．９９ｍＬ、１．２ｅｑ）を０℃で、窒素下で滴下して添加した。反応混合物を２５℃に温め、１２時間撹拌した。ＴＬＣ（酢酸エチル／石油エーテル＝２５／１、Ｒｆ＝０．５、$I_2$によって染色）は、出発物質が完全に消費され、新たな主要なスポットが生成されたことを示した。反応溶液を真空下で濃縮して残渣を得、これをシリカゲル上のカラム（酢酸エチル／石油エーテル＝１／１００～１／２５）によって精製して２－（テトラデシルチオ）エチルアクリレート（１２ｇ、収率７１．６１％）を無色の油として得た。

【０９９０】

$^1$Ｈ ＮＭＲ （ＥＴ３６３８７－４９－Ｐ１Ａ，４００ ＭＨｚ，クロロホルム－ｄ） δ ０．８５ － ０．９３ （ｍ，３ Ｈ） １．２６ （ｓ，１９ Ｈ） １．３５ － １．４３ （ｍ，２ Ｈ） １．５３ － １．６５ （ｍ，２ Ｈ） ２．５３ － ２．６２ （ｍ，２ Ｈ） ２．７９ （ｔ，Ｊ ＝ ７．０３ Ｈｚ，２ Ｈ） ４．３２ （ｔ，Ｊ ＝ ７．０３ Ｈｚ，２ Ｈ） ５．８６ （ｄｄ，Ｊ ＝ １０．３９，１．４７ Ｈｚ，１ Ｈ） ６．０９ － ６．１９ （ｍ，１ Ｈ） ６．４３ （ｄｄ，Ｊ ＝ １７．３０，１．４１ Ｈｚ，１ Ｈ）．図２９は、対応する核磁気共鳴（ＮＭＲ）スペクトルを示している。

【０９９１】

４０．２．３ ビス（２－（テトラデシルチオ）エチル）３，３’－（（３－（２－メチル－１Ｈ－イミダゾール－１－イル）プロピル）アザネジル）ジプロピオネート（脂質２２－Ｓ１４）の合成

フラスコに３－（２－メチル－１Ｈ－イミダゾール－１－イル）プロパン－１－アミン（３００ｍｇ、２．１６ｍｍｏｌ）及び２－（テトラデシルチオ）エチルアクリレート（１．７０ｇ、５．１７ｍｍｏｌ）を入れた。そのままの反応混合物を８０℃に加熱し、４８時間撹拌した。ＴＬＣ（酢酸エチル、$R_f$＝０．３、$I_2$によって染色、１滴の水酸化アンモニウムを添加）は、出発物質が完全に消費され、新たな主要なスポットが形成されたことを示した。反応混合物をジクロロメタン（４ｍＬ）で希釈し、シリカゲル上のカラム（石油エーテル／酢酸エチル＝３／１～０／１、０．１％水酸化アンモニウムを添加）によって精製してビス（２－（テトラデシルチオ）エチル）３，３’－（（３－（２－メチル－１Ｈ－イミダゾール－１－イル）プロピル）アザネジル）ジプロピオネート（５０１ｍｇ、収率２９．１％）を無色の油として得た。

【０９９２】

$^1$Ｈ ＮＭＲ （ＥＴ３６３８７－５１－Ｐ１Ａ，４００ ＭＨｚ，クロロホルム－ｄ） δ ０．８７ （ｔ，Ｊ ＝ ６．７３ Ｈｚ，６ Ｈ） １．２５ （ｓ，４０ Ｈ） １．３３ － １．４０ （ｍ，４ Ｈ） １．５２ － １．６１ （ｍ

，４Ｈ）１．８１－１．９０（ｍ，２Ｈ）２．３６（ｓ，３Ｈ）２．３９－２．４６（ｍ，６Ｈ）２．５３（ｔ，Ｊ＝７．３９Ｈｚ，４Ｈ）２．７０－２．７８（ｍ，８Ｈ）３．８４（ｔ，Ｊ＝７．１７Ｈｚ，２Ｈ）４．２１（ｔ，Ｊ＝６．９５Ｈｚ，４Ｈ）６．８５（ｓ，１Ｈ）６．８９（ｓ，１Ｈ）．図３０は、対応する核磁気共鳴（ＮＭＲ）スペクトルを示している。

【０９９３】

４０．３　ビス（２－（テトラデシルチオ）エチル）３，３’－（（３－（１Ｈ－イミダゾール－１－イル）プロピル）アザネジル）ジプロピオネート（脂質９３－Ｓ１４）の合成

フラスコに３－（１Ｈ－イミダゾール－１－イル）プロパン－１－アミン（３００ｍｇ、２．４０ｍｍｏｌ、１ｅｑ）及び２－（テトラデシルチオ）エチルアクリレート（１．８９ｇ、５．７５ｍｍｏｌ、２．４ｅｑ）を入れた。そのままの反応混合物を８０℃に加熱し、４８時間撹拌した。ＴＬＣ（酢酸エチル、$R_f$＝０．３、$I_2$によって染色、１滴の水酸化アンモニウムを添加）は、出発物質が完全に消費され、新たな主要なスポットが形成されたことを示した。反応混合物をジクロロメタン（４ｍＬ）で希釈し、シリカゲル上のカラム（石油エーテル／酢酸エチル＝１／２０～０／１００、０．１％水酸化アンモニウムを添加）によって精製してビス（２－（テトラデシルチオ）エチル）３，３’－（（３－（１Ｈ－イミダゾール－１－イル）プロピル）アザネジル）ジプロピオネート（５１２ｍｇ、収率２７．２２％）を無色の油として得た。

【０９９４】

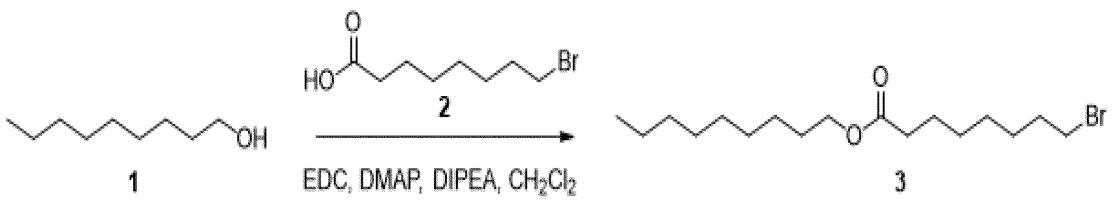
$^1$Ｈ　ＮＭＲ（ＥＴ３６３８７－５４－Ｐ１Ａ，４００ＭＨｚ，クロロホルム－ｄ）δ０．８９（ｔ，Ｊ＝６．８４Ｈｚ，６Ｈ）１．２６（ｓ，４０Ｈ）１．３４－１．４１（ｍ，４Ｈ）１．５８（ｂｒｔ，Ｊ＝７．５０Ｈｚ，４Ｈ）１．９２（ｔ，Ｊ＝６．６２Ｈｚ，２Ｈ）２．３６－２．４６（ｍ，６Ｈ）２．５５（ｔ，Ｊ＝７．５０Ｈｚ，４Ｈ）２．７５（ｑ，Ｊ＝６．８４Ｈｚ，８Ｈ）３．９７（ｔ，Ｊ＝６．９５Ｈｚ，２Ｈ）４．２３（ｔ，Ｊ＝６．９５Ｈｚ，４Ｈ）６．９５（ｓ，１Ｈ）７．０６（ｓ，１Ｈ）７．５１（ｓ，１Ｈ）．図３１は、対応する核磁気共鳴（ＮＭＲ）スペクトルを示している。

【０９９５】

４０．４　ヘプタデカン－９－イル８－（（３－（２－メチル－１Ｈ－イミダゾール－１－イル）プロピル）（８－（ノニルオキシ）－８－オキソオクチル）アミノ）オクタノエート（脂質１０ａ－５４）の合成

４０．４．１　ノニル８－ブロモオクタノエート（３）の合成

【化１４２】




【０９９６】

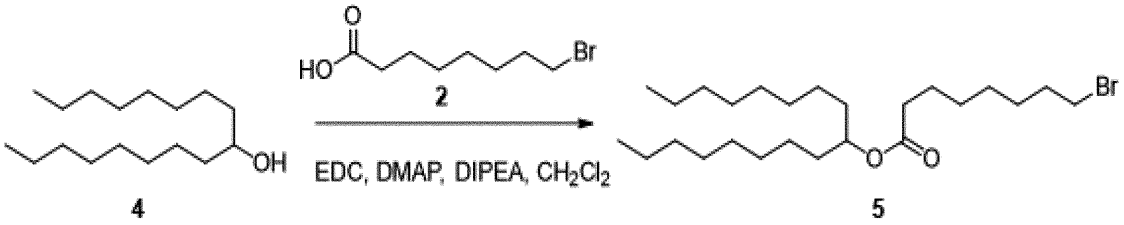
$CH_2Cl_2$（５００ｍＬ）中の８－ブロモオクタン酸（２）（１８．６ｇ、８３．１８ｍｍｏｌ）及びノナン－１－オール（１）（１０ｇ、６９．３２ｍｍｏｌ）の混合物にＤＭＡＰ（１．７ｇ、１３．８６ｍｍｏｌ）、ＤＩＰＥＡ（４８ｍＬ、２７７．３ｍｍｏｌ）及びＥＤＣ（１６ｇ、８３．１８ｍｍｏｌ）を添加した。反応物を室温で一晩撹拌した。反応混合物の濃縮後、粗残渣を酢酸エチル（５００ｍＬ）に溶解し、１ＮのＨＣｌ、

飽和ＮａＨＣＯ$_3$、水及びブラインで洗浄した。有機層を無水Ｎａ$_2$ＳＯ$_4$で乾燥させた。溶媒を蒸発させ、粗残渣をフラッシュクロマトグラフィー（ＳｉＯ$_2$：ヘキサン＝ヘキサン中の１００％～３０％のＥｔＯＡｃ）によって精製し、無色の油生成物３が得られた（９ｇ、３７％）。

【０９９７】

４０．４．２　ヘプタデカン－９－イル８－ブロモオクタノエート（５）の合成

【化１４３】




ＣＨ$_2$Ｃｌ$_2$（３００ｍＬ）中の８－ブロモオクタン酸（２）（１０ｇ、４４．８２ｍｍｏｌ）及びヘプタデカン－９－オール（４）（９．６ｇ、３７．３５ｍｍｏｌ）の混合物にＤＭＡＰ（９００ｍｇ、７．４８ｍｍｏｌ）、ＤＩＰＥＡ（２６ｍＬ、１４９．７ｍｍｏｌ）及びＥＤＣ（１０．７ｇ、５６．０３ｍｍｏｌ）を添加した。反応物を室温で一晩撹拌した。反応混合物の濃縮後、粗残渣を酢酸エチル（３００ｍＬ）に溶解し、１ＮのＨＣｌ、飽和ＮａＨＣＯ$_3$、水及びブラインで洗浄した。有機層を無水Ｎａ$_2$ＳＯ$_4$で乾燥させた。溶媒を蒸発させ、粗残渣をフラッシュクロマトグラフィー（ＳｉＯ$_2$：ヘキサン＝ヘキサン中の１００％～３０％のＥｔＯＡｃ）によって精製し、無色の油生成物５が得られた（５ｇ、２９％）。

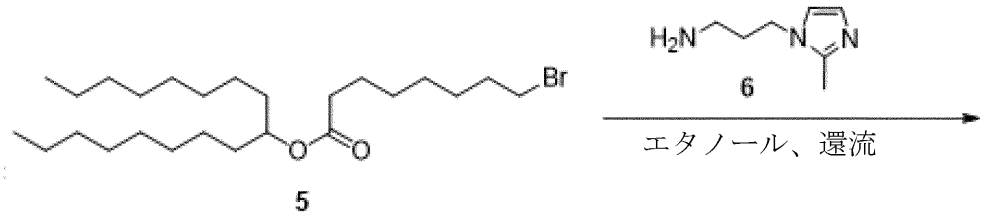
【０９９８】

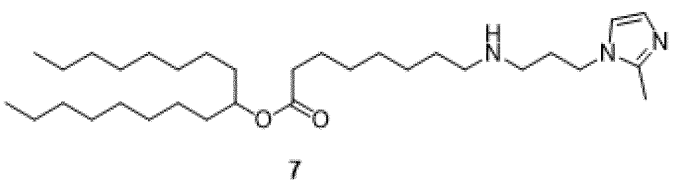
$^1$Ｈ　ＮＭＲ　（３００　ＭＨｚ，　ＣＤＣｌ$_3$）：　δ　ｐｐｍ　４．８６　（ｍ，　１Ｈ），　３．３９　（ｔ，　Ｊ　＝　７．０　Ｈｚ，　２Ｈ），　２．２７　（ｔ，　Ｊ　＝　７．６　Ｈｚ，　２Ｈ），　１．８４　（ｍ，　２Ｈ），　１．６２　（ｍ，　２Ｈ），　１．５－１．４　（ｍ，　８Ｈ），１．３５－１．２　（ｍ，　２６Ｈ）　０．８７　（ｔ，　Ｊ　＝　６．７　Ｈｚ，　６Ｈ）．

【０９９９】

４０．４．３　ヘプタデカン－９－イル８－（（３－（２－メチル－１Ｈ－イミダゾール－１－イル）プロピル）アミノ）オクタノエート（７）の合成

【化１４４】



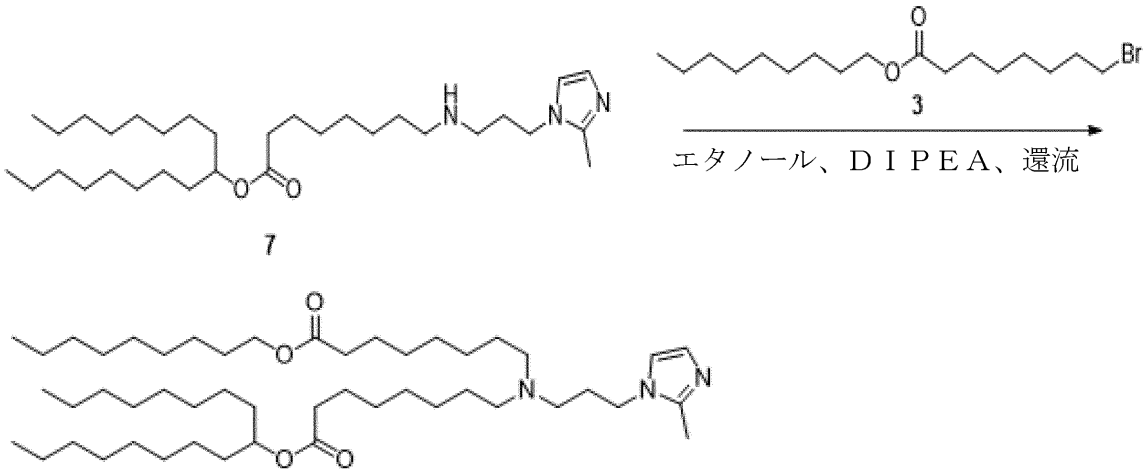

冷却器に接続された１００ｍＬの丸底フラスコ内で、ヘプタデカン－９－イル８－ブロ

モオクタノエート（５）（８６０ｍｇ、１．８６８ｍｍｏｌ）及び３－（２－メチル－１Ｈ－イミダゾール－１－イル）プロパン－１－アミン（６）（１．３ｇ、９．３３９ｍｍｏｌ）をエタノール（１０ｍＬ）中で混合した。反応混合物を一晩加熱して還流した。ＭＳ（ＡＰＣＩ）は、予期された生成物を示した。混合物を室温に冷却し、濃縮した。粗残渣をフラッシュクロマトグラフィー（$SiO_2$：$CH_2Cl_2$＝$CH_2Cl_2$中の１００％～１０％のメタノール＋１％$NH_4OH$）によって精製し、無色の油生成物７が得られた（６６５ｍｇ、６９％）。

【１０００】

４０．４．４　ヘプタデカン－９－イル８－（（３－（２－メチル－１Ｈ－イミダゾール－１－イル）プロピル）（８－（ノニルオキシ）－８－オキソオクチル）アミノ）オクタノエート（脂質１０ａ－５４）の合成

【化１４５】

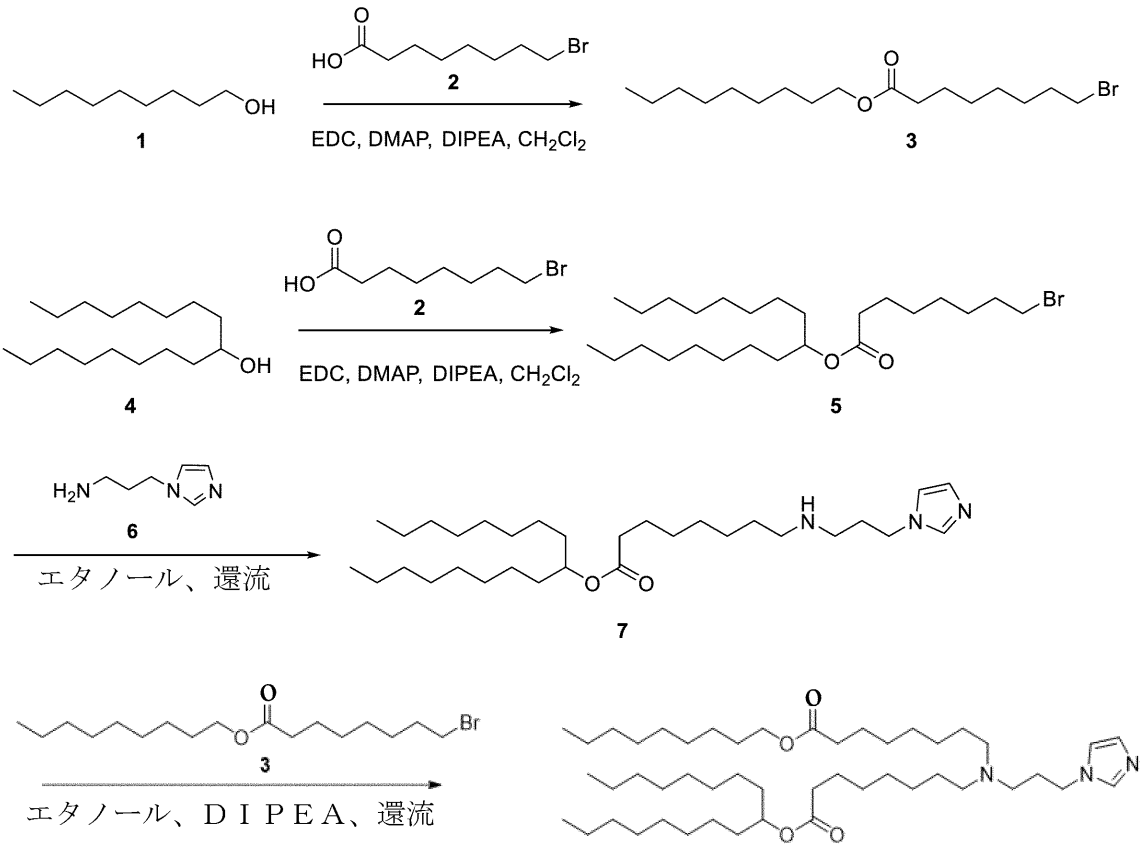



冷却器に接続された１００ｍＬの丸底フラスコ内で、ヘプタデカン－９－イル８－（（３－（２－メチル－１Ｈ－イミダゾール－１－イル）プロピル）アミノ）オクタノエート（７）（６６５ｍｇ、１．２７９ｍｍｏｌ）及びノニル８－ブロモオクタノエート（３）（５３６ｍｇ、１．５３５ｍｍｏｌ）をエタノール（１０ｍＬ）中で混合し、次いでＤＩＰＥＡ（０．５５ｍＬ、３．１９８ｍｍｏｌ）を添加した。反応混合物を一晩加熱して還流した。ＭＳ（ＡＰＣＩ）及びＴＬＣ（$CH_2Cl_2$中の１０％ＭｅＯＨ＋１％$NH_4OH$）はいずれも、生成物及びいくつかの未反応出発物質を示した。混合物を室温に冷却し、濃縮した。粗残渣をフラッシュクロマトグラフィー（$SiO_2$：$CH_2Cl_2$＝$CH_2Cl_2$中の１００％～１０％のメタノール＋１％$NH_4OH$）によって精製し、無色の油が得られた（１７０ｍｇ、１７％）。

【１００１】

４０．５　ヘプタデカン－９－イル８－（（３－（１Ｈ－イミダゾール－１－イル）プロピル）（８－（ノニルオキシ）－８－オキソオクチル）アミノ）オクタノエート（脂質１０ａ－５３）の合成

【化１４６】



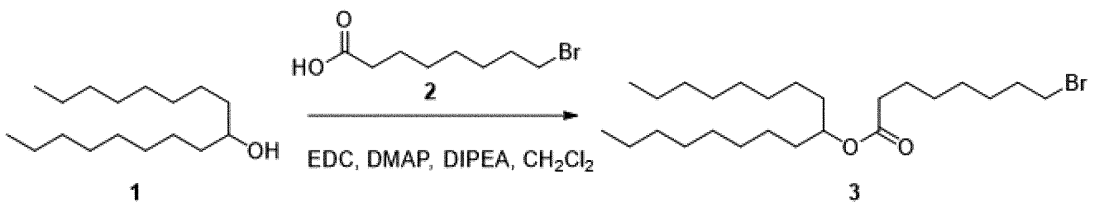

脂質１０ａ－５３を上のスキームに従って合成する。反応条件は、イミダゾールアミンとしての３－（１Ｈ－イミダゾール－１－イル）プロパン－１－アミンを除き、脂質１０ａ－５４と同一である。

【１００２】

４０．６　ヘプタデカン－９－イル８－（（３－（１Ｈ－イミダゾール－１－イル）プロピル）（８－（ノニルオキシ）－８－オキソオクチル）アミノ）オクタノエート（脂質１０ａ－４５）の合成

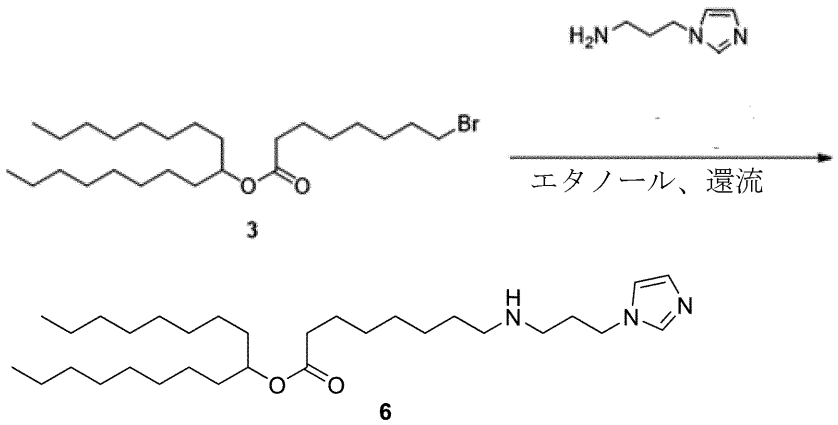
４０．６．１　ヘプタデカン－９－イル８－ブロモオクタノエート（３）の合成

【化１４７】

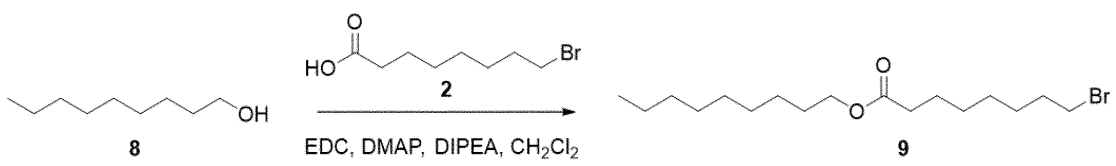



$CH_2Cl_2$（３００ｍＬ）中の８－ブロモオクタン酸（２）（１０ｇ、４４．８２ｍｍｏｌ）及びヘプタデカン－９－オール（１）（９．６ｇ、３７．３５ｍｍｏｌ）の混合物にＤＭＡＰ（９００ｍｇ、７．４８ｍｍｏｌ）、ＤＩＰＥＡ（２６ｍＬ、１４９．７ｍｍｏｌ）及びＥＤＣ（１０．７ｇ、５６．０３ｍｍｏｌ）を添加した。反応物を室温で一晩撹拌した。反応混合物の濃縮後、粗残渣を酢酸エチル（３００ｍＬ）に溶解し、１ＮのＨＣｌ、飽和$NaHCO_3$、水及びブラインで洗浄した。有機層を無水$Na_2SO_4$で乾燥させた。溶媒を蒸発させ、粗残渣をフラッシュクロマトグラフィー（$SiO_2$：ヘキサン＝ヘキサン中の１００％～３０％のＥｔＯＡｃ）によって精製し、無色の油生成物３が得られた（５ｇ、２９％）。

【１００３】
$^1$Ｈ ＮＭＲ （３００ ＭＨｚ， ＣＤＣｌ$_3$）： δ ｐｐｍ ４．８６ （ｍ， １Ｈ）， ３．３９ （ｔ， Ｊ ＝ ７．０ Ｈｚ， ２Ｈ）， ２．２７ （ｔ， Ｊ ＝ ７．６ Ｈｚ， ２Ｈ）， １．８４ （ｍ， ２Ｈ）， １．６２ （ｍ， ２Ｈ）， １．５－１．４ （ｍ， ８Ｈ），１．３５－１．２ （ｍ， ２６Ｈ） ０．８７ （ｔ， Ｊ ＝ ６．７ Ｈｚ， ６Ｈ）．
【１００４】
４０．６．２ ヘプタデカン－９－イル８－（（３－（１Ｈ－イミダゾール－１－イル）プロピル）アミノ）オクタノエート（６）の合成
【化１４８】




冷却器に接続された１００ｍＬの丸底フラスコ内で、ヘプタデカン－９－イル８－ブロモオクタノエート（３）（１ｇ、２．１６７ｍｍｏｌ）及び３－（１Ｈ－イミダゾール－１－イル）プロパン－１－アミン（４）（１．３ｍＬ、１０．８３ｍｍｏｌ）をエタノール（１０ｍＬ）中で混合した。反応混合物を一晩加熱して還流した。ＭＳ（ＡＰＣＩ）は、予期された生成物を示した。混合物を室温に冷却し、濃縮した。粗残渣をフラッシュクロマトグラフィー（ＳｉＯ$_2$：ＣＨ$_2$Ｃｌ$_2$＝ＣＨ$_2$Ｃｌ$_2$中の１００％～１０％のメタノール＋１％ＮＨ$_4$ＯＨ）によって精製し、無色の油生成物６が得られた（４９８ｍｇ、４５％）。
【１００５】
$^1$Ｈ ＮＭＲ （３００ ＭＨｚ， ＣＤＣｌ$_3$）： δ ｐｐｍ ７．４７ （ｓ， １Ｈ）， ７．０４ （ｓ， １Ｈ）， ６．９１ （ｓ， １Ｈ）， ４．８５ （ｍ， １Ｈ）， ４．０３ （ｔ， Ｊ ＝ ７．０ Ｈｚ， ２Ｈ）， ２．５６ （ｄｄ， Ｊ ＝ １４．５， ７．４ Ｈｚ， ４Ｈ）， ２．２７ （ｔ， Ｊ ＝ ７．４ Ｈｚ， ２Ｈ）， １．９２ （ｍ， ２Ｈ）， １．６０ （ｍ， ２Ｈ）， １．４８ （ｍ， ６Ｈ）， １．３０－１．２０ （ｍ， ３１Ｈ）， ０．８６ （ｔ， Ｊ ＝ ６．６ Ｈｚ， ６Ｈ）．ＭＳ （ＡＰＣＩ$^+$）：５０６．４ （Ｍ＋１）．
【１００６】
４０．６．３ ノニル８－ブロモオクタノエート（９）の合成
【化１４９】




ＣＨ$_2$Ｃｌ$_2$（５００ｍＬ）中の８－ブロモオクタン酸（２）（１８．６ｇ、８３．１８ｍｍｏｌ）及びノナン－１－オール（８）（１０ｇ、６９．３２ｍｍｏｌ）の混合物にＤＭＡＰ（１．７ｇ、１３．８６ｍｍｏｌ）、ＤＩＰＥＡ（４８ｍＬ、２７７．３ｍｍｏ

ｌ）及びＥＤＣ（１６ｇ、８３．１８ｍｍｏｌ）を添加した。反応物を室温で一晩撹拌した。反応混合物の濃縮後、粗残渣を酢酸エチル（５００ｍＬ）に溶解し、１ＮのＨＣｌ、飽和ＮａＨＣＯ$_3$、水及びブラインで洗浄した。有機層を無水Ｎａ$_2$ＳＯ$_4$で乾燥させた。溶媒を蒸発させ、粗残渣をフラッシュクロマトグラフィー（ＳｉＯ$_2$：ヘキサン＝ヘキサン中の１００％～３０％のＥｔＯＡｃ）によって精製し、無色の油生成物９が得られた（９ｇ、３７％）。

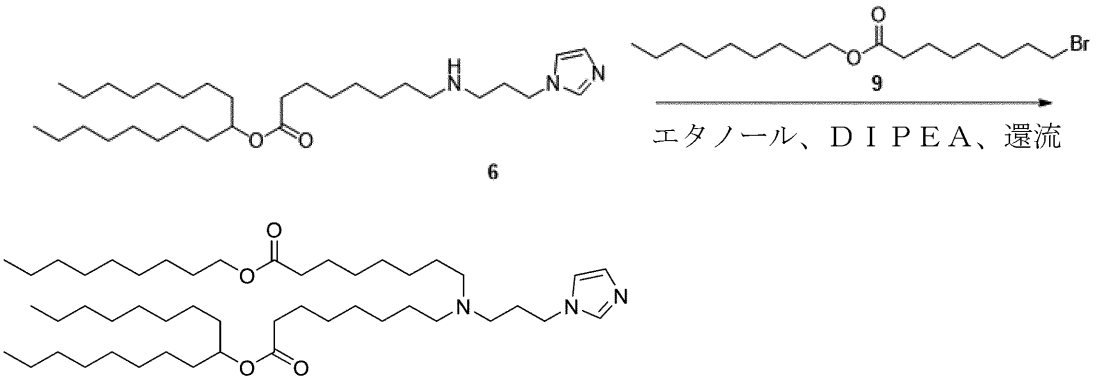
【１００７】

$^1$Ｈ ＮＭＲ （３００ ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_3$）：δ ｐｐｍ ４．０５ （ｔ，Ｊ＝７．０ Ｈｚ，２Ｈ），３．３９ （ｔ，Ｊ＝７．０ Ｈｚ，２Ｈ），２．２９ （ｔ，Ｊ＝７．６ Ｈｚ，２Ｈ），１．８４ （ｍ，２Ｈ），１．６２－１．５６ （ｍ，６Ｈ），１．４０－１．２０ （ｍ，１６Ｈ），０．８７ （ｔ，Ｊ＝６．７ Ｈｚ，３Ｈ）．

【１００８】

４０．６．４ ヘプタデカン－９－イル８－（（３－（１Ｈ－イミダゾール－１－イル）プロピル）（８－（ノニルオキシ）－８－オキソオクチル）アミノ）オクタノエートの合成

【化１５０】




冷却器に接続された１００ｍＬの丸底フラスコ内で、ヘプタデカン－９－イル８－（（３－（１Ｈ－イミダゾール－１－イル）プロピル）アミノ）オクタノエート（６）（２４２ｍｇ、０．４７８ｍｍｏｌ）、及びノニル８－ブロモオクタノエート９（２００ｍｇ、０．５７４ｍｍｏｌ）をエタノール（１０ｍＬ）中で混合し、次いでＤＩＰＥＡ（０．２ｍＬ、１．１９６ｍｍｏｌ）を添加した。反応混合物を一晩加熱して還流した。ＭＳ（ＡＰＣＩ）及びＴＬＣ（ＣＨ$_2$Ｃｌ$_2$中の１０％ＭｅＯＨ＋１％ＮＨ$_4$ＯＨ）はいずれも、生成物及びいくつかの未反応出発物質を示した。混合物を室温に冷却し、濃縮した。粗残渣をフラッシュクロマトグラフィー（ＳｉＯ$_2$：ＣＨ$_2$Ｃｌ$_2$＝ＣＨ$_2$Ｃｌ$_2$中の１００％～１０％のメタノール＋１％ＮＨ$_4$ＯＨ）によって精製し、無色の油が得られた（３５ｍｇ、１０％）。

【１００９】

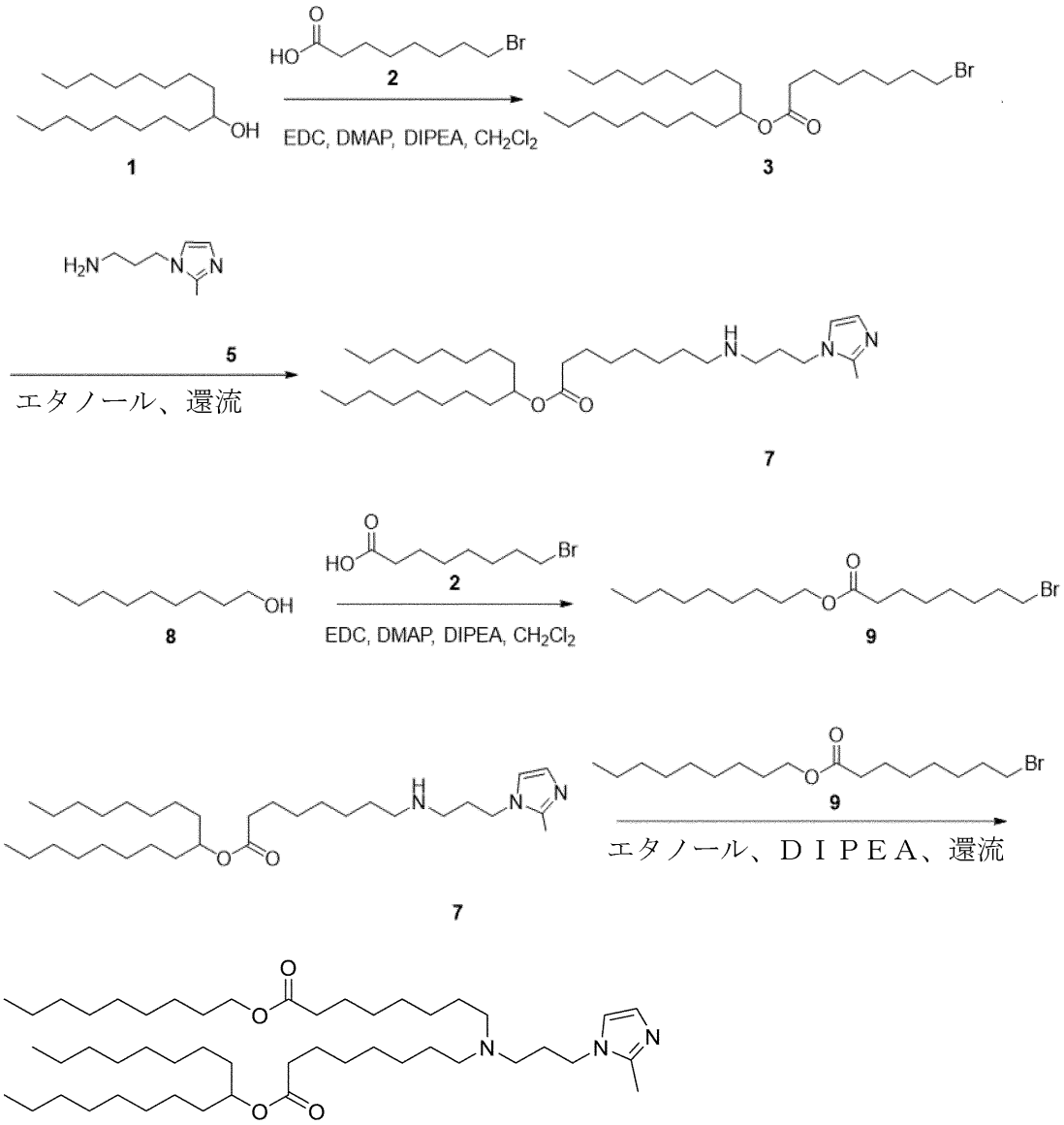
$^1$Ｈ ＮＭＲ （３００ ＭＨｚ，ＣＤＣｌ3）：δ ｐｐｍ ７．４６ （ｓ，１Ｈ），７．０５ （ｓ，１Ｈ），６．９０ （ｓ，１Ｈ），４．８５ （ｍ，１Ｈ），４．０４ （ｔ，Ｊ＝６．６ Ｈｚ，２Ｈ），４．０１ （ｔ，Ｊ＝６．６ Ｈｚ，２Ｈ），２．３８ （ｍ，６Ｈ），２．２７ （ｔ，Ｊ＝３．８ Ｈｚ，４Ｈ），１．８９ （ｍ，２Ｈ），１．６０－１．５８ （ｍ，１２Ｈ），１．４８ （ｍ，６Ｈ），１．３０－１．２０ （ｍ，４７Ｈ），０．８７ （ｔ，Ｊ＝７．１ Ｈｚ，９Ｈ）．ＭＳ （ＡＰＣＩ＋）：７７４．６（Ｍ＋１）．

【１０１０】

４０．７ ヘプタデカン－９－イル８－（（３－（２－メチル－１Ｈ－イミダゾール－１－イル）プロピル）（８－（ノニルオキシ）－８－オキソオクチル）アミノ）オクタノ

エート（脂質１０ａ－４６）の合成

【化１５１】




脂質１０ａ－４６を上のスキームに従って合成する。反応条件は、イミダゾールアミンとして３－（２－メチル－１Ｈ－イミダゾール－１－イル）プロパン－１－アミンを使用することを除き、脂質１０ａ－４５と同一である。

【１０１１】

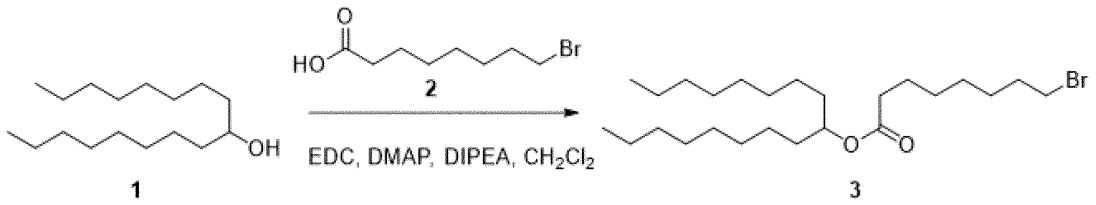
$^{1}$Ｈ ＮＭＲ （３００ ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）：δ ｐｐｍ ６．８９ （ｓ，１Ｈ），６．８１ （ｓ，１Ｈ），４．８６ （ｍ，１Ｈ），４．０４ （ｔ，Ｊ ＝ ６．８ Ｈｚ，２Ｈ），３．８５ （ｔ，Ｊ ＝ ７．４ Ｈｚ，２Ｈ），２．３８－２．３６ （ｍ，９Ｈ），２．２８ （ｍ，４Ｈ），１．８２ （ｍ，２Ｈ），１．７２－１．５６ （ｍ，１２Ｈ），１．４８ （ｍ，４Ｈ），１．３０－１．２０ （ｍ，４６Ｈ），０．８６ （ｔ，Ｊ ＝ ６．６ Ｈｚ，９Ｈ）．ＭＳ （ＡＰＣＩ$^{+}$）：７８９．７ （Ｍ＋１）．

【１０１２】

４０．８ ヘプタデカン－９－イル８－（（３－（１Ｈ－イミダゾール－１－イル）プロピル）（８－オキソ－８－（ウンデカン－３－イルオキシ）オクチル）アミノ）オクタノエート（脂質１０ａ－１３７）の合成

４０．８．１ ヘプタデカン－９－イル８－ブロモオクタノエート（３）の合成

【化１５２】




$CH_2Cl_2$（３００ｍＬ）中の８－ブロモオクタン酸（２）（１０ｇ、４４．８２ｍｍｏｌ）及びヘプタデカン－９－オール（１）（９．６ｇ、３７．３５ｍｍｏｌ）の混合物にＤＭＡＰ（９００ｍｇ、７．４８ｍｍｏｌ）、ＤＩＰＥＡ（２６ｍＬ、１４９．７ｍｍｏｌ）及びＥＤＣ（１０．７ｇ、５６．０３ｍｍｏｌ）を添加した。反応物を室温で一晩撹拌した。反応混合物の濃縮後、粗残渣を酢酸エチル（３００ｍＬ）に溶解し、１ＮのＨＣｌ、飽和$NaHCO_3$、水及びブラインで洗浄した。有機層を無水$Na_2SO_4$で乾燥させた。溶媒を蒸発させ、粗残渣をフラッシュクロマトグラフィー（$SiO_2$：ヘキサン＝ヘキサン中の１００％～３０％のＥｔＯＡｃ）によって精製し、無色の油生成物３が得られた（５ｇ、２９％）。

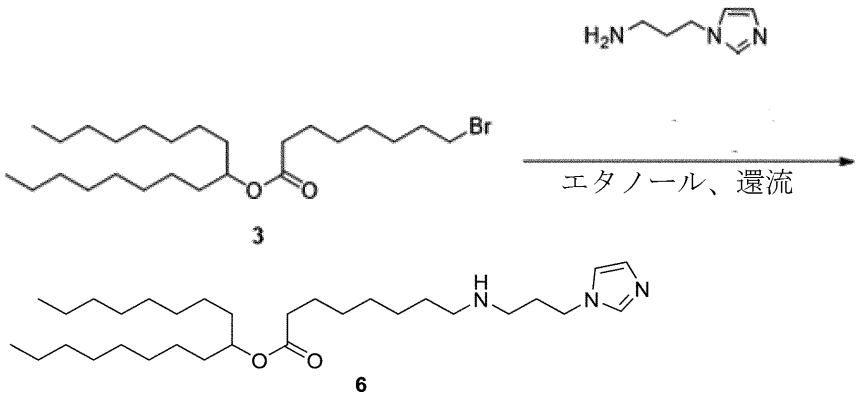
【１０１３】

１Ｈ ＮＭＲ（３００ ＭＨｚ，ＣＤＣｌ３）：δ ｐｐｍ ４．８６（ｍ，１Ｈ），３．３９（ｔ，Ｊ＝７．０ Ｈｚ，２Ｈ），２．２７（ｔ，Ｊ＝７．６ Ｈｚ，２Ｈ），１．８４（ｍ，２Ｈ），１．６２（ｍ，２Ｈ），１．５－１．４（ｍ，８Ｈ），１．３５－１．２（ｍ，２６Ｈ）０．８７（ｔ，Ｊ＝６．７ Ｈｚ，６Ｈ）．

【１０１４】

４０．８．２ ヘプタデカン－９－イル８－（（３－（１Ｈ－イミダゾール－１－イル）プロピル）アミノ）オクタノエート（６）の合成

【化１５３】




冷却器に接続された１００ｍＬの丸底フラスコ内で、ヘプタデカン－９－イル８－ブロモオクタノエート（３）（１ｇ、２．１６７ｍｍｏｌ）及び３－（１Ｈ－イミダゾール－１－イル）プロパン－１－アミン（４）（１．３ｍＬ、１０．８３ｍｍｏｌ）をエタノール（１０ｍＬ）中で混合した。反応混合物を一晩加熱して還流した。ＭＳ（ＡＰＣＩ）は、予期された生成物を示した。混合物を室温に冷却し、濃縮した。粗残渣をフラッシュクロマトグラフィー（$SiO_2$：$CH_2Cl_2$＝$CH_2Cl_2$中の１００％～１０％のメタノール＋１％$NH_4OH$）によって精製し、無色の油生成物６が得られた（４９８ｍｇ、４５％）。

【１０１５】

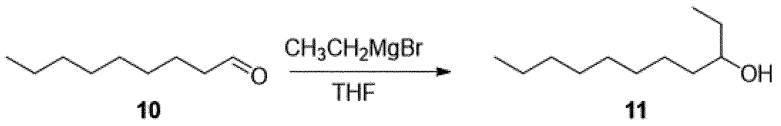
$^1$Ｈ ＮＭＲ（３００ ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_3$）：δ ｐｐｍ ７．４７（ｓ，１Ｈ），７．０４（ｓ，１Ｈ），６．９１（ｓ，１Ｈ），４．８５（ｍ，

１Ｈ），４．０３（ｔ，Ｊ＝７．０Ｈｚ，２Ｈ），２．５６（ｄｄ，Ｊ＝１４．５，７．４Ｈｚ，４Ｈ），２．２７（ｔ，Ｊ＝７．４Ｈｚ，２Ｈ），１．９２（ｍ，２Ｈ），１．６０（ｍ，２Ｈ），１．４８（ｍ，６Ｈ），１．３０－１．２０（ｍ，３１Ｈ），０．８６（ｔ，Ｊ＝６．６Ｈｚ，６Ｈ）．ＭＳ（ＡＰＣＩ$^{+}$）：５０６．４（Ｍ＋１）．

【１０１６】

４０．８．３　ウンデカン－３－オール（１１）の合成

【化１５４】




無水ＴＨＦ（１００ｍＬ）中のノナナール（１０）（５ｇ、３５．２ｍｍｏｌ）の混合物に、０℃の氷水浴でエチルマグネシウムブロミド（４７ｍＬ、４２．２ｍｍｏｌ、ＴＨＦ中０．９Ｍ）を滴下して加えた。反応物を室温で一晩撹拌した。反応物を氷でクエンチし、酢酸エチル（５００ｍＬ）で希釈し、１Ｎ　ＨＣｌ、飽和ＮａＨＣＯ$_3$、水、及びブラインで洗浄した。有機層を無水Ｎａ$_2$ＳＯ$_4$で乾燥させた。溶媒を蒸発させ、粗残渣をフラッシュクロマトグラフィー（ＳｉＯ$_2$：ヘキサン＝ヘキサン中の１００％～５０％のＥｔＯＡｃ）によって精製し、無色の油生成物１１が得られた（４ｇ、６６％）。

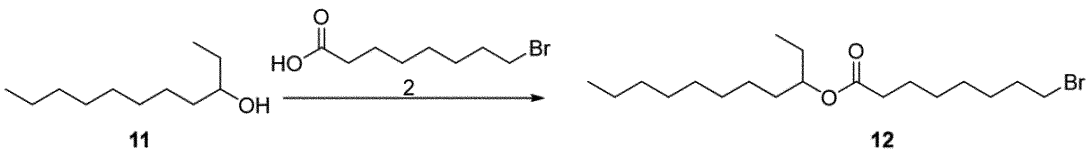
【１０１７】

$^{1}$Ｈ　ＮＭＲ（３００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_3$）：δ ｐｐｍ ３．５２（ｍ，１Ｈ），１．５６－１．３（ｍ，４Ｈ），１．３－１．２０（ｍ，１２Ｈ），０．９３（ｔ，Ｊ＝７．４Ｈｚ，３Ｈ），０．８７（ｔ，Ｊ＝７．４Ｈｚ，３Ｈ）．

【１０１８】

４０．８．４　ウンデカン－３－イル８－ブロモオクタノエート（１２）の合成

【化１５５】




ＣＨ$_2$Ｃｌ$_2$（１００ｍＬ）中の８－ブロモオクタン酸（２）（６．２ｇ、２７．９ｍｍｏｌ）及びウンデカン－３－オール（１１）（４ｇ、２３．２ｍｍｏｌ）の混合物にＤＭＡＰ（５６７．２ｍｇ、４．６４ｍｍｏｌ）、ＤＩＰＥＡ（１６．２ｍＬ、９２．９ｍｍｏｌ）、及びＥＤＣ（６．７ｇ、３４．８ｍｍｏｌ）を添加した。反応物を室温で一晩撹拌した。反応混合物の濃縮後、粗残渣を酢酸エチル（５００ｍＬ）に溶解し、１ＮのＨＣｌ、飽和ＮａＨＣＯ$_3$、水及びブラインで洗浄した。有機層を無水Ｎａ$_2$ＳＯ$_4$で乾燥させた。溶媒を蒸発させ、粗残渣をフラッシュクロマトグラフィー（ＳｉＯ$_2$：ヘキサン＝ヘキサン中の１００％～３０％のＥｔＯＡｃ）によって精製し、無色の油生成物１２が得られた（７．３ｇ、８３％）。

【１０１９】

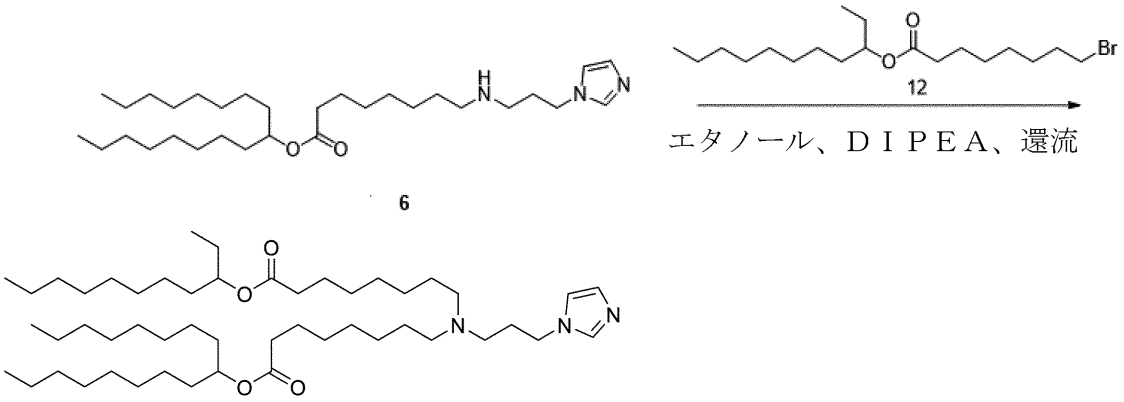
$^{1}$Ｈ　ＮＭＲ（３００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_3$）：δ ｐｐｍ ４．８０（ｍ，１Ｈ），３．３９（ｔ，Ｊ＝６．８Ｈｚ，２Ｈ），２．２８（ｔ，Ｊ＝７．７Ｈｚ，２Ｈ），１．８４（ｍ，２Ｈ），１．６－１．３５（ｍ，８Ｈ），１．３５－１．２（ｍ，１６Ｈ），０．８７（ｔ，Ｊ＝７．４Ｈｚ，６Ｈ）．

【１０２０】

４０．８．４　ヘプタデカン－９－イル８－（（３－（１Ｈ－イミダゾール－１－イル

）プロピル）（８－（ノニルオキシ）－８－オキソオクチル）アミノ）オクタノエートの合成

【化１５６】




冷却器に接続された１００ｍＬの丸底フラスコ内で、ヘプタデカン－９－イル８－（（３－（１Ｈ－イミダゾール－１－イル）プロピル）アミノ）オクタノエート（６）（２４２ｍｇ、０．４７８ｍｍｏｌ）、及びウンデカン－３－イル　８－ブロモオクタノエート（１２）（２００ｍｇ、０．５７４ｍｍｏｌ）をエタノール（１０ｍＬ）中で混合し、次いでＤＩＰＥＡ（０．２ｍＬ、１．１９６ｍｍｏｌ）を添加した。反応混合物を一晩加熱して還流した。ＭＳ（ＡＰＣＩ）及びＴＬＣ（$CH_2Cl_2$中の１０％ＭｅＯＨ＋１％$NH_4OH$）はいずれも、生成物及びいくつかの未反応出発物質を示した。混合物を室温に冷却し、濃縮した。粗残渣をフラッシュクロマトグラフィー（$SiO_2$：$CH_2Cl_2$＝$CH_2Cl_2$中の１００％～１０％のメタノール＋１％$NH_4OH$）によって精製し、無色の油が得られた（３５ｍｇ、１０％）。

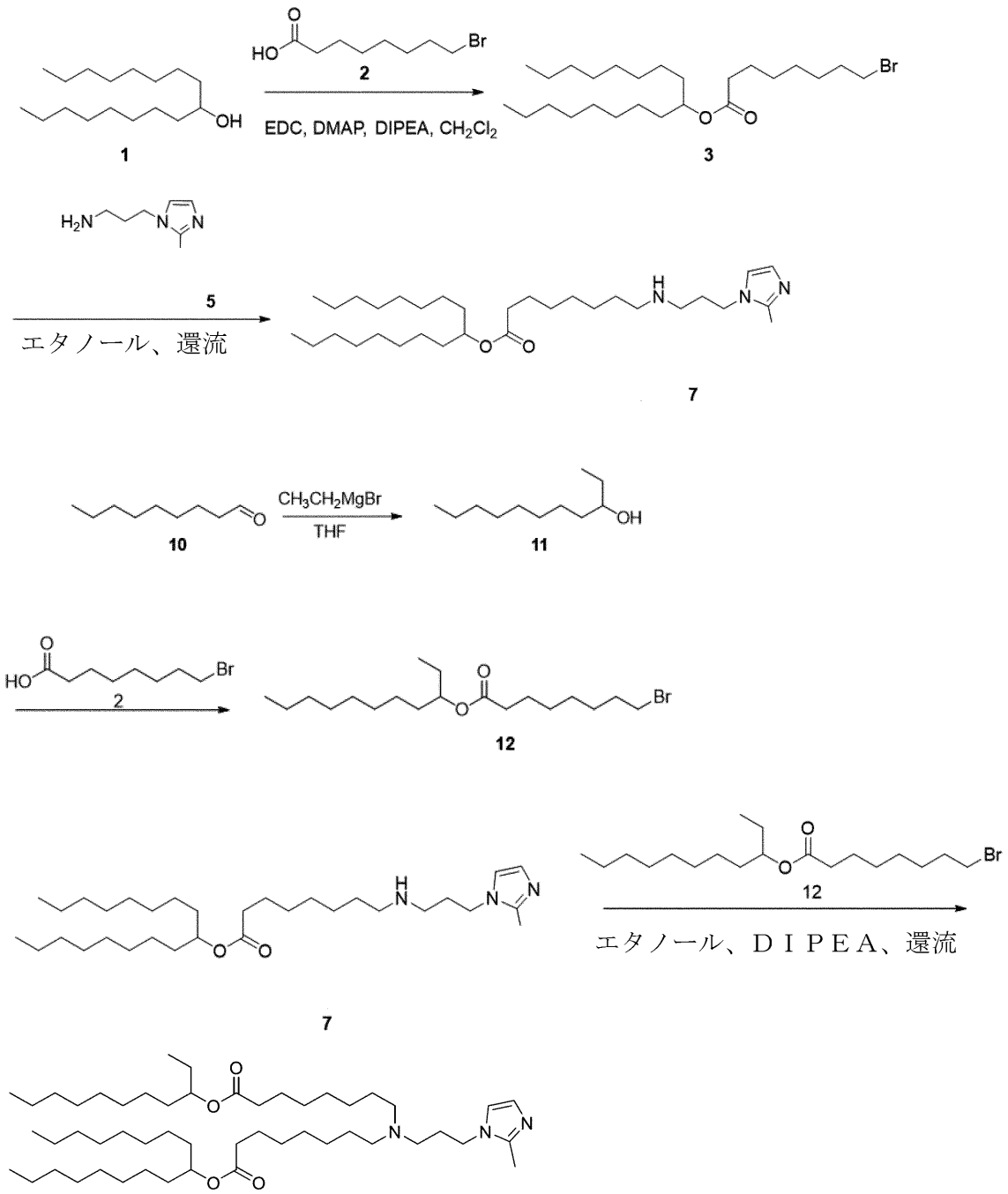
【１０２１】

$^1$Ｈ　ＮＭＲ　（３００　ＭＨｚ，　ＣＤＣｌ３）：　δ　ｐｐｍ　７．４５　（ｓ，　１Ｈ），　７．０４　（ｓ，　１Ｈ），　６．９０　（ｓ，　１Ｈ），　４．８２　（ｍ，　２Ｈ），　３．９７　（ｔ，　Ｊ　＝　６．８　Ｈｚ，　２Ｈ），　２．３５　（ｍ，　６Ｈ），　２．２７　（ｔ，　Ｊ　＝　３．８　Ｈｚ，　４Ｈ），　１．８９　（ｍ，　２Ｈ），　１．６０－１．４８　（ｍ，　１４Ｈ），　１．３０－１．２０　（ｍ，　５０Ｈ），　０．８７　（ｍ，　１２Ｈ）．ＭＳ　（ＡＰＣＩ＋）：８０２．８

【１０２２】

４０．９　ヘプタデカン－９－イル８－（（３－（２－メチル－１Ｈ－イミダゾール－１－イル）プロピル）（８－（ノニルオキシ）－８－オキソオクチル）アミノ）オクタノエート（脂質１０ａ－１３８）の合成

【化１５７】




脂質１０ａ－１３８を上のスキームに従って合成する。反応条件は、イミダゾールアミンとして３－（２－メチル－１Ｈ－イミダゾール－１－イル）プロパン－１－アミンを使用することを除き、脂質１０ａ－１３７と同一である。

【１０２３】

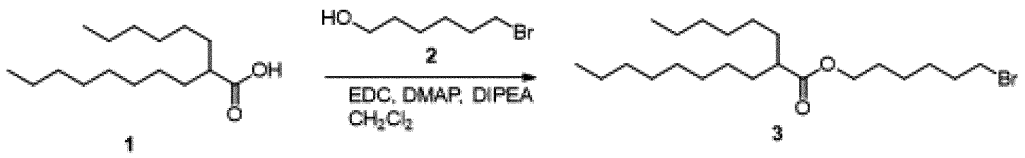
$^1$Ｈ ＮＭＲ （３００ ＭＨｚ， ＣＤＣｌ３）： δ ｐｐｍ ６．８９ （ｓ， １Ｈ）， ６．８１ （ｓ， １Ｈ）， ４．８２ （ｍ， ２Ｈ）， ３．８６ （ｔ， Ｊ ＝ ７．１ Ｈｚ， ２Ｈ）， ２．３８－２．３ （ｍ， ９Ｈ）， ２．２７ （ｔ， Ｊ ＝ ３．８ Ｈｚ， ４Ｈ）， １．８４ （ｍ， ２Ｈ）， １．６０－１．３７ （ｍ， １４Ｈ）， １．３０－１．２０ （ｍ， ５０Ｈ）， ０．８７ （ｍ， １２Ｈ）．ＭＳ （ＡＰＣＩ＋）：８１６．８ （Ｍ＋１）．

【１０２４】

４０．１０（（（２－（２－メチル－１Ｈ－イミダゾール－１－イル）エチル）アザンジイル）ビス（ヘキサン－６，１－ジイル）ビス（２－ヘキシルデカノエート（脂質１０ａ－１３９）の合成

４０．１０．１　６－ブロモヘキシル２－ヘキシルデカノエート（３）の合成

【化１５８】




$CH_2Cl_2$（１Ｌ）中の２－ヘキシルデカン酸（１）（１０２ｇ、０．３９８ｍｏｌ）及び６－ブロモ－１－ヘキサノール（２）（６０ｇ、０．３３１ｍｏｌ）の混合物にＤＭＡＰ（８．１ｇ、６６ｍｍｏｌ）、ＤＩＰＥＡ（２３０ｍＬ、１．３２５ｍｏｌ）、及びＥＤＣ（７６ｇ、０．３９８ｍｏｌ）を添加した。反応物を室温で一晩撹拌した。反応混合物の濃縮後、粗残渣を酢酸エチル（１Ｌ）に溶解し、１ＮのＨＣｌ、飽和$NaHCO_3$、水及びブラインで洗浄した。有機層を無水$Na_2SO_4$で乾燥させた。溶媒を蒸発させ、粗残渣をフラッシュクロマトグラフィー（$SiO_2$：ヘキサン＝ヘキサン中の１００％～３０％のＥｔＯＡｃ）によって精製し、無色の油生成物３が得られた（６７ｍｇ、４８％）。

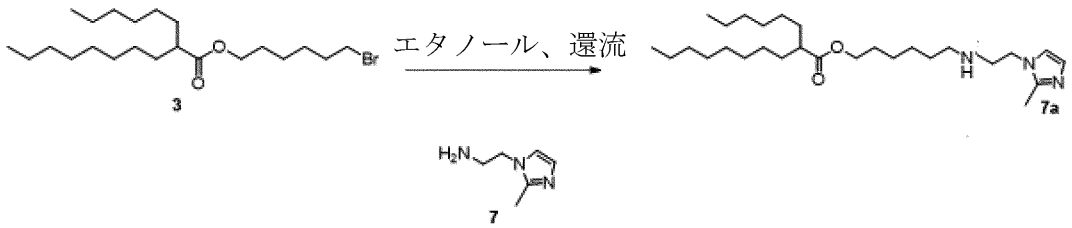
【１０２５】

$^1$Ｈ ＮＭＲ（３００ ＭＨｚ，$CDCl_3$）：δ ｐｐｍ ４．０６（ｔ，Ｊ＝６．６ Ｈｚ，２Ｈ），３．４（ｔ，Ｊ＝６．８ Ｈｚ，２Ｈ），２．３（ｍ，１Ｈ），１．８６（ｍ，２Ｈ），１．６４（ｍ，２Ｈ），１．５－１．４（ｍ，２Ｈ），１．３５－１．２（ｍ，２６Ｈ）０．８７（ｔ，Ｊ＝６．７ Ｈｚ，６Ｈ）．

【１０２６】

４０．１０．２　６－（（３－（１Ｈ－イミダゾール－１－イル）ブチル）アミノ）ヘキシル　２－ヘキシルデカノエート（７ａ）の合成

【化１５９】




冷却器に接続された１００ｍＬの丸底フラスコ内で、６－ブロモヘキシル２－ヘキシルデカノエート（３）（１．２ｇ、２．８７ｍｍｏｌ）及び３－（１Ｈ－イミダゾール－１－イル）ブタン－１－アミン（７）（２ｇ、１４．３７ｍｍｏｌ）をエタノール（２０ｍＬ）中で混合した。反応混合物を一晩加熱して還流した。ＭＳ（ＡＰＣＩ）は、予期された生成物を示した。混合物を室温に冷却し、濃縮した。粗残渣をフラッシュクロマトグラフィー（$SiO_2$：$CH_2Cl_2$＝$CH_2Cl_2$中の１００％～１０％のメタノール＋１％$NH_4OH$）によって精製し、無色の油生成物７ａが得られた（６２６ｍｇ、４６％）。

【１０２７】

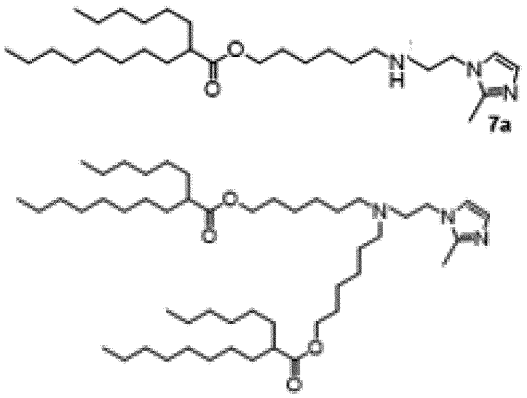
$^1$Ｈ ＮＭＲ（３００ ＭＨｚ，$CDCl_3$）：δ ｐｐｍ ７．５１（ｓ，１Ｈ），７．０５（ｓ，１Ｈ），６．９３（ｓ，１Ｈ），４．３５（ｍ，

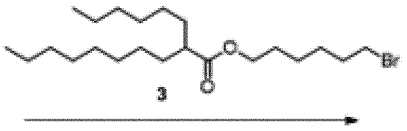
１Ｈ），４．０４（ｔ，Ｊ＝６．６Ｈｚ，２Ｈ），２．６－２．４（ｍ，４Ｈ），２．２９（ｍ，１Ｈ），１．９４（ｔｄ，Ｊ＝１４，６．８Ｈｚ，２Ｈ），１．６４－１．５６（ｍ，４Ｈ），１．４７（ｓ，３Ｈ），１．４２－１．２０（ｍ，２９Ｈ），０．８６（ｍ，６Ｈ）．ＭＳ（ＡＰＣＩ$^{+}$）：４７８．８（Ｍ＋１）

【１０２８】

４０．１０．２（（（２－（２－メチル－１Ｈ－イミダゾール－１－イル）エチル）アザンジイル）ビス（ヘキサン－６，１－ジイル）ビス（２－ヘキシルデカノエートの合成

【化１６０】




エタノール、ＤＩＰＥＡ、還流

冷却器に接続された１００ｍＬの丸底フラスコ内で、６－（（３－（１Ｈ－イミダゾール－１－イル）ブチル）アミノ）ヘキシル　２－ヘキシルデカノエート（７ａ）（６２６ｍｇ、１．３１ｍｍｏｌ）及び６－ブロモヘキシル２－ヘキシルデカノエート（３）（５５０ｍｇ、１．３１ｍｍｏｌ）をエタノール（２０ｍＬ）中で混合し、次いでＤＩＰＥＡ（０．６ｍＬ、３．２７６ｍｍｏｌ）を添加した。反応混合物を一晩加熱して還流した。ＭＳ（ＡＰＣＩ）及びＴＬＣ（$CH_2Cl_2$中の１０％ＭｅＯＨ＋１％$NH_4OH$）はいずれも、生成物及び未反応出発物質７ａを示した。混合物を室温に冷却し、濃縮した。粗残渣をフラッシュクロマトグラフィー（$SiO_2$：$CH_2Cl_2$＝$CH_2Cl_2$中の１００％～１０％のメタノール＋１％$NH_4OH$）によって精製し、得られた生成物をＣ１８逆相クロマトグラフィー（$CH_3CN$＝１００％中の$H_2O$＝９５％～０．１％ＴＦＡ）でさらに精製し、無色の油（ＴＦＡ塩）が得られた（１４０ｍｇ、１３％）。

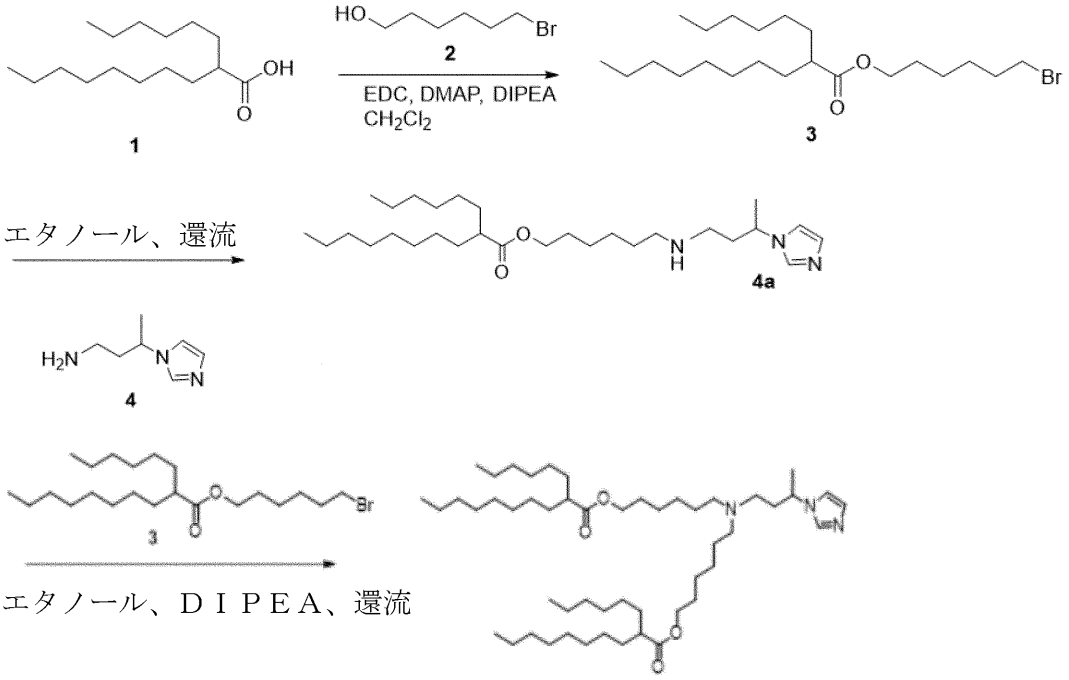
【１０２９】

$^{1}$Ｈ－ＮＭＲ（３００ＭＨｚ，$CDCl_3$）：δ６．８７（ｓ，１Ｈ），６．８３（ｓ，１Ｈ），４，０５（ｔ，Ｊ＝６．７Ｈｚ，４Ｈ），３．８４（ｔ，Ｊ＝６．９Ｈｚ，２Ｈ），２．６６（ｔ，Ｊ＝６．９Ｈｚ，２Ｈ），２．４５－２．２０（ｍ，６Ｈ），２．３７（ｓ，３Ｈ），１．６５－１．５０（ｍ，８Ｈ），１．５－１．１（ｍ，５６Ｈ），０．８６（ｔ，Ｊ＝６．５Ｈｚ，１２Ｈ）．ＭＳ（ＡＰＣＩ$^{+}$）：８０２．６（Ｍ＋１）．

【１０３０】

４０．１１（（（１－メチル－１Ｈ－イミダゾール－２－イル）メチル）アザンジイル）ビス（ヘキサン－６，１－ジイル）ビス（２－ヘキシルデカノアート）（脂質１０ａ－１３０）の合成

【化１６１】

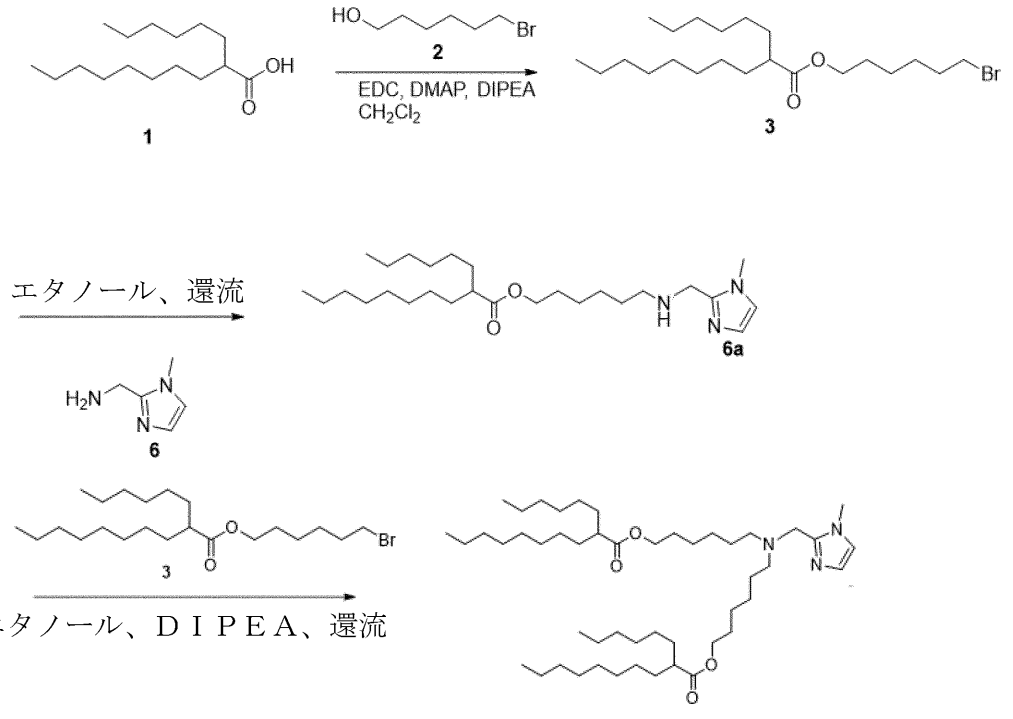



脂質１０ａ－１３０を上のスキームに従って合成する。反応条件は、イミダゾールアミンとして３－（１Ｈ－イミダゾール－１－イル）ブチルアミンを使用することを除き、脂質１０ａ－１３９と同一である。

【１０３１】

４０．１２（（（１－メチル－１Ｈ－イミダゾール－２－イル）メチル）アザンジイル）ビス（ヘキサン－６，１－ジイル）ビス（２－ヘキシルデカノアート）（脂質１０ａ－１２８）の合成

【化１６２】




脂質１０ａ－１２８を上のスキームに従って合成する。反応条件は、イミダゾールアミンとして１－メチル－１Ｈ－イミダゾール－２－イル）メチルアミンを使用することを除

き、脂質１０ａ－１３９と同一である。
【１０３２】
$^{1}$Ｈ－ＮＭＲ（３００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）：δ６．８９（ｄ，Ｊ＝１．４Ｈｚ，１Ｈ），６．８１（ｄ，Ｊ＝１．４Ｈｚ，１Ｈ），４，０３（ｔ，Ｊ＝６．７Ｈｚ，４Ｈ），３．６８（ｓ，３Ｈ），３．６２（ｓ，２Ｈ），２．４５－２．２０（ｍ，６Ｈ），１．６５－１．５０（ｍ，８Ｈ），１．５－１．３５（ｍ，８Ｈ），１．３５－１．１０（ｍ，４８Ｈ），０．８６（ｔ，Ｊ＝６．５Ｈｚ，１２Ｈ）．ＭＳ（ＡＰＣＩ$^{+}$）：７８７．６（Ｍ＋１）．
【１０３３】
実施例４１
環状ＲＮＡを有する脂質ナノ粒子製剤
脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）を「ＮｅｘｔＧｅｎ」混合チャンバーを有するＰｒｅｃｉｓｉｏｎ Ｎａｎｏｓｙｓｔｅｍｓ Ｉｇｎｉｔｅ装置を使用して形成した。イオン化可能脂質１０ａ－２６、ＤＳＰＣ、コレステロール、及びＤＳＰＥ－ＰＥＧ ２０００（Ａｖａｎｔｉ Ｐｏｌａｒ Ｌｉｐｉｄｓ Ｉｎｃ．）を１６：１：４：１の重量比または６２：４：３３：１のモル比で含有していたエタノール相を、環状ＲＮＡ及び２５ｍＭ酢酸ナトリウム緩衝液を含有する水相とｐＨ５．２で組み合わせた。３：１の水対エタノールの混合比を使用した。次いで製剤化されたＬＮＰを１Ｌの水で透析し、１８時間にわたって２回交換した。透析したＬＮＰを０．２μｍフィルターで濾過した。インビボ投薬の前に、ＬＮＰをＰＢＳに希釈した。ＬＮＰサイズは、動的光散乱によって決定した。１ｍＬのＰＢＳ（ｐＨ７．４）中の２０μｇ／ｍＬのＬＮＰを有するキュベットをＭａｌｖｅｒｎ Ｐａｎａｌｙｔｉｃａｌ Ｚｅｔａｓｉｚｅｒ Ｐｒｏを使用してＺ平均について測定した。Ｚ平均及び多分散性指数を記録した。
【１０３４】
４１．１ 脂質１０ａ－２６及び１０ａ－２７の製剤
脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）を「ＮｅｘｔＧｅｎ」混合チャンバーを有するＰｒｅｃｉｓｉｏｎ Ｎａｎｏｓｙｓｔｅｍｓ Ｉｇｎｉｔｅ装置を使用して形成した。イオン化可能脂質１０ａ－２６または脂質１０ａ－２７、ＤＯＰＥ、コレステロール、及びＤＳＰＥ－ＰＥＧ ２０００（Ａｖａｎｔｉ Ｐｏｌａｒ Ｌｉｐｉｄｓ Ｉｎｃ．）を１６：１：４：１の重量比または６２：４：３３：１のモル比で含有していたエタノール相を、環状ＲＮＡ及び２５ｍＭ酢酸ナトリウム緩衝液を含有する水相とｐＨ５．２で組み合わせた。３：１の水対エタノールの混合比を使用した。次いで製剤化されたＬＮＰを１Ｌの水で透析し、１８時間にわたって２回交換した。透析したＬＮＰを０．２μｍフィルターで濾過した。インビボ投薬の前に、ＬＮＰをＰＢＳに希釈した。ＬＮＰサイズは、動的光散乱によって決定した。１ｍＬのＰＢＳ（ｐＨ７．４）中の２０μｇ／ｍＬのＬＮＰを有するキュベットをＭａｌｖｅｒｎ Ｐａｎａｌｙｔｉｃａｌ Ｚｅｔａｓｉｚｅｒ Ｐｒｏを使用してＺ平均について測定した。Ｚ平均及び多分散性指数を記録した。
【１０３５】
４１．２ 脂質１０ａ－５３及び１０ａ－５４の製剤
脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）を「ＮｅｘｔＧｅｎ」混合チャンバーを有するＰｒｅｃｉｓｉｏｎ Ｎａｎｏｓｙｓｔｅｍｓ Ｉｇｎｉｔｅ装置を使用して形成した。イオン化可能脂質１０ａ－５３または脂質１０ａ－５４、ＤＯＰＥ、コレステロール、及びＤＳＰＥ－ＰＥＧ ２０００（Ａｖａｎｔｉ Ｐｏｌａｒ Ｌｉｐｉｄｓ Ｉｎｃ．）を５０：１０：３８．５：１．５のモル比で含有していたエタノール相を、環状ＲＮＡ及び２５ｍＭ酢酸ナトリウム緩衝液を含有する水相とｐＨ５．２で組み合わせた。３：１の水対エタノールの混合比を使用した。次いで製剤化されたＬＮＰを１Ｌの１ｘＰＢＳで透析し、１８時間にわたって２回交換した。透析したＬＮＰを０．２μｍフィルターで濾過した。インビボ投薬の前に、ＬＮＰをＰＢＳに希釈した。ＬＮＰサイズは、動的光散乱によって決定した。１ｍＬのＰＢＳ（ｐＨ７．４）中の２０μｇ／ｍＬのＬＮＰを有するキュベットをＭａ

ｌｖｅｒｎ Ｐａｎａｌｙｔｉｃａｌ Ｚｅｔａｓｉｚｅｒ Ｐｒｏを使用してＺ平均について測定した。Ｚ平均及び多分散性指数を記録した。

【１０３６】

ＬＮＰのゼータ電位は、Ｍａｌｖｅｒｎ Ｐａｎａｌｙｔｉｃａｌ Ｚｅｔａｓｉｚｅｒ Ｐｒｏを使用して測定した。水中の２００μＬの粒子溶液及び８００μＬの蒸留したＲＮＡｓｅ非含有水を含有する混合物（４００μｇ／ｍＬの最終粒子濃度を有する）を分析のためのゼータサイザーキャピラリーセルにロードした。

【１０３７】

ＲＮＡ封入を、Ｒｉｂｏｇｒｅｅｎアッセイを使用して決定した。ナノ粒子溶液を２μｇ／ｍＬの理論的ｃｉｒｃＲＮＡ濃度でトリス－エチレンジアミン四酢酸（ＴＥ）緩衝液に希釈した。２μｇ／ｍＬ～０．１２５μｇ／ｍＬの範囲の、ＴＥ緩衝液に希釈された標準ｃｉｒｃＲＮＡ溶液を作製した。粒子及び標準を全てのウェルに添加し、第２のインキュベーションを実施した（３分間３５０ｒｐｍで３７℃）。蛍光を、ＳＰＥＣＴＲＡｍａｘ（登録商標）ＧＥＭＩＮＩ ＸＳマイクロプレート蛍光光度計を使用して測定した。各粒子溶液中の環状ＲＮＡの濃度を、標準曲線を使用して計算した。封入効率を、溶解した粒子と溶解していない粒子の間で検出されたｃｉｒｃＲＮＡの比から計算した。

【表２２ａ】

表２２ａ．ＬＮＰの特徴評価

| イオン化可能脂質 | サイズ(nm) | PDI | 封入化効率(%) | ゼータデータ電位(mV) |
|---|---|---|---|---|
| 22-S14 | 88 | 0.09 | 96 | 3.968 |
| 93-S14 | 119 | 0.02 | 96 | -6.071 |
| 脂質 10a-26 | 86 | 0.08 | 92 | -15.24 |

【表２２ｂ】

表２２ｂ．ＬＮＰの特徴評価

| イオン化可能脂質 | Z 平均(nm) | PDI | RNA 封入(%) |
|---|---|---|---|
| 22-S14 | 64 | 0.05 | 97 |
| 93-S14 | 74 | 0.04 | 95 |
| 脂質 10a-26 | 84 | 0.04 | 96 |

【１０３８】

実施例４２

インビボ分析

２２～２５ｇの範囲の雌ＣＤ－１または雌ｃ５７ＢＬ／６Ｊマウスに０．５ｍｇ／ｋｇのＲＮＡを静脈内に投薬した。注射から６時間後、マウスに２００μＬのＤ－ルシフェリンを１５ｍｇ／ｍＬ濃度で腹腔内に注射した。注射から５分後、マウスを、イソフルランを使用して麻酔し、ＩＶＩＳ Ｓｐｅｃｔｒｕｍ インビボ Ｉｍａｇｉｎｇ Ｓｙｓｔｅｍ（Ｐｅｒｋｉｎ Ｅｌｍｅｒ）内に背面を上にして入れた。脂質２２－Ｓ１４、９３－Ｓ１４、脂質１０ａ－２６の全身総ＩＶＩＳフラックスを図３２Ａに示す。注射から１０分後、マウスを発光についてスキャンした。マウスを安楽死させ、器官をルシフェリン注射から２５分以内に抽出して肝臓、脾臓、腎臓、肺、及び心臓における発光についてスキャンした。画像（図３３Ａ～Ｂ、３４Ａ～Ｂ、３５Ａ～Ｂ）をＬｉｖｉｎｇ Ｉｍａｇｅｓ（Ｐｅｒｋｉｎ Ｅｌｍｅｒ）ソフトウェアを使用して分析した。目的の領域を描画

してフラックス及び平均輝度を得、タンパク質発現の生体内分布について分析した（図３２Ａ～Ｂ）。

【１０３９】

図３２Ａは、脂質２２－Ｓ１４及び９３－Ｓ１４を用いて作製されたＬＮＰと比較して、脂質１０ａ－２６　ＬＮＰを有するルシフェラーゼｃｉｒｃＲＮＡから観察された増加した全身総フラックスを示している。図３２Ｂは、発現を改善するために設計された有意な構造変化にもかかわらず、脂質２２－Ｓ１４及び９３－Ｓ１４で観察された所望の脾臓対肝臓比を維持しながら、脂質１０ａ－２６を用いて増加した全体的発現をさらに強調する組織のエクスビボＩＶＩＳ分析を示している。これらのデータは、先行して報告された脂質と比較して、脂質１０ａ－２６によって得られた改善を強調する。

【１０４０】

脂質１０ｂ－１５または脂質１０ａ－５３もしくは１０ａ－５４で形成されたＬＮＰに封入されたｃｉｒｃＲＮＡで上述した同様の分析も実施した。図３６Ａ～Ｃは、発現を改善するために設計された有意な構造変化にもかかわらず、所望の脾臓対肝臓比を維持しながら、脂質１０ｂ－１５、１０ａ－５３、及び１０ａ－５４を用いて全体的発現をそれぞれ強調する組織のエクスビボＩＶＩＳ分析を示している。図３６Ｄは、ＰＢＳ対照についての結果を示している。これらのデータは、９３－Ｓ１４及び２２－Ｓ１４などの先行して報告された脂質と比較した、脂質１０ｂ－１５、１０ａ－５３、及び１０ａ－５４によって得られる改善を実証している。

【１０４１】

実施例４３

ルシフェラーゼの送達

ヒト末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）（Ｓｔｅｍｃｅｌｌ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を、ホタルルシフェラーゼ（ｆ．ｌｕｃ）環状ＲＮＡを封入している脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）でトランスフェクトし、ルシフェラーゼ発現について試験した。２人の異なるドナーからのＰＢＭＣを、ＲＰＭＩ、２％ヒト血清、ＩＬ－２（１０ｎｇ／ｍＬ）、及び５０ｕＭのＢＭＥ中で３７℃で、ホタルルシフェラーゼをコードする環状ＲＮＡ（２００ｎｇ）を含有する５つの異なるＬＮＰ組成物とインキュベートした。ＬＮＰを用いずにインキュベートされたＰＢＭＣを陰性対照として使用した。２４時間後、細胞を溶解し、生物発光（Ｐｒｏｍｅｇａ　ＢｒｉｇｈｔＧｌｏ）に基づいてホタルルシフェラーゼ発現について分析した。

【１０４２】

代表的なデータが図３７Ａ及び３７Ｂに示されており、試験されたＬＮＰは、初代ヒト免疫細胞へ環状ＲＮＡを送達し、タンパク質発現をもたらすことが可能であることを示している。

【１０４３】

実施例４４

緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）またはキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）のインビトロ送達

ヒトＰＢＭＣ（Ｓｔｅｍｃｅｌｌ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）をＧＦＰを封入しているＬＮＰでトランスフェクトし、フローサイトメトリーによって試験した。５人の異なるドナーからのＰＢＭＣ（ＰＢＭＣ　Ａ～Ｅ）を、ＲＰＭＩ、２％ヒト血清、ＩＬ－２（１０ｎｇ／ｍＬ）、及び５０ｕＭのＢＭＥ中で３７℃で、ＧＦＰまたはＣＤ１９－ＣＡＲのいずれかをコードする環状ＲＮＡ（２００ｎｇ）を含有する１つのＬＮＰ組成物とインキュベートした。ＬＮＰを用いずにインキュベートされたＰＢＭＣを陰性対照として使用した。ＬＮＰインキュベーションから２４、４８、または７２時間後、細胞をＣＤ３、ＣＤ１９、ＣＤ５６、ＣＤ１４、ＣＤ１１ｂ、ＣＤ４５、固定可能ライブデッド（ｌｉｖｅ　ｄｅａｄ）、及びペイロード（ＧＦＰまたはＣＤ１９－ＣＡＲ）について分析した。

【１０４４】

代表的なデータが図３８Ａ及び３８Ｂに示されており、試験されたＬＮＰは、初代ヒト免疫細胞へ環状ＲＮＡを送達し、タンパク質発現をもたらすことが可能であることを示し

ている。
【１０４５】
実施例４５
複数のＩＲＥＳバリアントは、インビトロでネズミＣＤ１９ ＣＡＲの発現を媒介し得る
抗ネズミＣＤ１９ ＣＡＲをコードする複数の環状ＲＮＡ構築物は、独自のＩＲＥＳ配列を含有し、これを１Ｃ１Ｃ７細胞株にリポトランスフェクトした。リポトランスフェクションの前に、１Ｃ１Ｃ７細胞を完全ＲＰＭＩで数日間増殖させ、細胞が適切な数に増殖したら、１Ｃ１Ｃ７細胞を４つの異なる環状ＲＮＡ構築物でリポトランスフェクトした（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ ＲＮＡｉＭＡＸ）。２４時間後、１Ｃ１Ｃ７細胞をＨｉｓタグ化組換えネズミＣＤ１９（Ｓｉｎｏ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ）タンパク質とインキュベートし、次いで二次抗Ｈｉｓ抗体で染色した。その後、細胞をフローサイトメトリーで分析した。
【１０４６】
代表的なデータが図３９に示されており、示されたウイルス（セスジネズミピコルナウイルス、ヤギコブウイルス、パラボウイルス、及びサリウイルス）に由来するＩＲＥＳは、ネズミＴ細胞において抗マウスＣＤ１９ ＣＡＲの発現を誘導することが可能であることを示している。
【１０４７】
実施例４６
ネズミＣＤ１９ ＣＡＲは、インビトロで腫瘍細胞殺傷を媒介する
抗マウスＣＤ１９ ＣＡＲをコードする環状ＲＮＡをネズミＴ細胞にエレクトロポレーションしてＣＡＲ媒介細胞傷害を評価した。エレクトロポレーションのため、ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒのＮｅｏｎ Ｔｒａｎｓｆｅｃｔｉｏｎ Ｓｙｓｔｅｍを使用してＴ細胞を抗マウスＣＤ１９ ＣＡＲをコードする環状ＲＮＡでエレクトロポレーションし、次いで一晩放置した。細胞傷害アッセイのため、エレクトロポレーションされたＴ細胞を、１０％ＦＢＳ、ＩＬ－２（１０ｎｇ／ｍＬ）、及び５０ｕＭのＢＭＥを含有する完全ＲＰＭＩ中でＦｌｕｃ＋標的及び非標的細胞と１：１の比で共培養し、３７℃で一晩インキュベートした。Ｆｌｕｃ＋標的及び非標的細胞の溶解を検出するために、共培養から２４時間後にルシフェラーゼアッセイシステム（Ｐｒｏｍｅｇａ Ｂｒｉｇｈｔｇｌｏ Ｌｕｃｉｆｅｒａｓｅ Ｓｙｓｔｅｍ）を使用して細胞傷害を測定した。示された値は、トランスフェクトされていないモックシグナルと比べて計算される。
【１０４８】
代表的なデータが図４０に示されており、環状ＲＮＡから発現した抗マウスＣＤ１９ ＣＡＲは、インビトロでネズミＴ細胞において機能的であることを示している。
【１０４９】
実施例４７
ネズミＣＤ１９ ＣＡＲをコードする脂質封入環状ＲＮＡでのＢ細胞の機能的枯渇
Ｃ５７ＢＬ／６Ｊマウスに、抗ネズミＣＤ１９ ＣＡＲをコードする環状ＲＮＡを封入している、脂質１０ｂ－１５を用いて形成されたＬＮＰを注射した。対照として、ホタルルシフェラーゼ（ｆ．Ｌｕｃ）をコードする環状ＲＮＡを封入している脂質１０ｂ－１５を異なる群のマウスに注射した。２０～２５ｇの範囲の雌のＣ５７ＢＬ．６Ｊに、０．５ｍｇ／ｋｇのＬＮＰの５用量を１日おきに静脈内に注射した。注射間で、採血物を固定可能ライブ／デッド、ＣＤ４５、ＴＣＲｖｂ、Ｂ２２０、ＣＤ１１ｂ、及び抗ネズミＣＡＲについてフローサイトメトリーを介して分析した。最後の注射から２日後、脾臓を採取し、フローサイトメトリー分析のために処理した。脾細胞を固定可能ライブ／デッド、ＣＤ４５、ＴＣＲｖｂ、Ｂ２２０、ＣＤ１１ｂ、ＮＫ１．１、Ｆ４／８０、ＣＤ１１ｃ、及び抗ネズミＣＡＲで染色した。抗ネズミＣＤ１９ ＣＡＲ ＬＮＰを注射したマウスからのデータを、ｆ．Ｌｕｃ ＬＮＰを摂取したマウスに対して正規化した。
【１０５０】
代表的なデータが図４１Ａ、４１Ｂ、及び４１Ｃに示されており、ＬＮＰを用いてイン

ビボで送達された環状ｃｉｒｃＲＮＡから発現した抗マウスＣＤ１９　ＣＡＲは、インビボでネズミＴ細胞において機能的であることを示している。

【１０５１】

実施例４８

環状ＲＮＡから発現したＣＤ１９　ＣＡＲは、ｍＲＮＡから発現したものと比較してより高い収率及び高い細胞傷害効果を有する。

Ｎ末端からＣ末端まで、ＦＭＣ６３由来ｓｃＦｖ、ＣＤ８膜貫通ドメイン、４－１ＢＢ共刺激ドメイン、及びＣＤ３ζ細胞内ドメインを含む、抗ＣＤ１９キメラ抗原受容体をコードする環状ＲＮＡをヒト末梢Ｔ細胞にエレクトロポレーションして、表面発現及びＣＡＲ媒介細胞傷害を評価した。比較のため、環状ＲＮＡがエレクトロポレーションされたＴ細胞を、この実験ではｍＲＮＡがエレクトロポレーションされたＴ細胞と比較した。エレクトロポレーションのため、ドナーヒトＰＢＭＣから市販のＴ細胞単離キット（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ）を使用してＣＤ３＋Ｔ細胞をヒトＰＢＭＣから単離した。単離後、Ｔ細胞を抗ＣＤ３／抗ＣＤ２８（Ｓｔｅｍｃｅｌｌ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）で刺激し、１０％ＦＢＳ、ＩＬ－２（１０ｎｇ／ｍＬ）、及び５０ｕＭのＢＭＥを含有する完全ＲＰＭＩ中で３７℃で５日にわたって増殖させた。刺激から５日後、Ｔ細胞を、ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒのＮｅｏｎ　Ｔｒａｎｓｆｅｃｔｉｏｎ　Ｓｙｓｔｅｍを使用して抗ヒトＣＤ１９　ＣＡＲをコードする環状ＲＮＡでエレクトロポレーションし、次いで一晩放置した。細胞傷害アッセイのため、エレクトロポレーションされたＴ細胞を、１０％ＦＢＳ、ＩＬ－２（１０ｎｇ／ｍＬ）、及び５０ｕＭのＢＭＥを含有する完全ＲＰＭＩ中でＦｌｕｃ＋標的及び非標的細胞と１：１の比で共培養し、３７℃で一晩インキュベートした。Ｆｌｕｃ＋標的及び非標的細胞の溶解を検出するために、共培養から２４時間後にルシフェラーゼアッセイシステム（Ｐｒｏｍｅｇａ　Ｂｒｉｇｈｔｇｌｏ　Ｌｕｃｉｆｅｒａｓｅ　Ｓｙｓｔｅｍ）を使用して細胞傷害を測定した。さらに、エレクトロポレーションされたＴ細胞の一定分量を採取し、分析の日にライブデッド固定可能染色、ＣＤ３、ＣＤ４５、及びキメラ抗原受容体（ＦＭＣ６３）について染色した。

【１０５２】

代表的なデータが図４２及び４３に示されている。図４２Ａ及び４２Ｂは、環状ＲＮＡから発現した抗ヒトＣＤ１９　ＣＡＲが、直鎖状ｍＲＮＡから発現した抗ヒトＣＤ１９　ＣＡＲより高いレベル及び長いレベルで発現することを示している。図４３Ａ及び４３Ｂは、環状ＲＮＡから発現した抗ヒトＣＤ１９　ＣＡＲが、直鎖状ｍＲＮＡから発現した抗ヒトＣＤ１９　ＣＡＲと比べて高い細胞傷害効果を発揮することを示している。

【１０５３】

実施例４９

単一の環状ＲＮＡからの２つのＣＡＲの機能的発現

キメラ抗原受容体をコードする環状ＲＮＡをヒト末梢Ｔ細胞にエレクトロポレーションして表面発現及びＣＡＲ媒介細胞傷害を評価した。この研究の目的は、２つのＣＡＲをコードする環状ＲＮＡが、２Ａ（Ｐ２Ａ）またはＩＲＥＳ配列で確率的に発現し得るかどうかを評価することである。エレクトロポレーションのため、ＣＤ３＋Ｔ細胞を商業的に購入し（Ｃｅｌｌｅｒｏ）、抗ＣＤ３／抗ＣＤ２８（Ｓｔｅｍｃｅｌｌ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）で刺激し、１０％ＦＢＳ、ＩＬ－２（１０ｎｇ／ｍＬ）、及び５０ｕＭのＢＭＥを含有する完全ＲＰＭＩ中で３７℃で５日にわたって増殖させた。刺激から４日後、Ｔ細胞を、ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒのＮｅｏｎ　Ｔｒａｎｓｆｅｃｔｉｏｎ　Ｓｙｓｔｅｍを使用して抗ヒトＣＤ１９　ＣＡＲ、抗ヒトＣＤ１９　ＣＡＲ－２Ａ－抗ヒトＢＣＭＡ　ＣＡＲ、及び抗ヒトＣＤ１９　ＣＡＲ－ＩＲＥＳ－抗ヒトＢＣＭＡ　ＣＡＲをコードする環状ＲＮＡでエレクトロポレーションし、次いで一晩放置した。細胞傷害アッセイのため、エレクトロポレーションされたＴ細胞を、１０％ＦＢＳ、ＩＬ－２（１０ｎｇ／ｍＬ）、及び５０ｕＭのＢＭＥを含有する完全ＲＰＭＩ中でヒトＣＤ１９またはＢＣＭＡ抗原を発現するＦｌｕｃ＋Ｋ５６２細胞と１：１の比で共培養し、３７℃で一晩インキュベートした。Ｆｌｕｃ＋標的細胞の溶解を検出するために、共培養から２４時間後にルシフェラ

ーゼアッセイシステム（Ｐｒｏｍｅｇａ　ＢｒｉｇｈｔＧｌｏ　Ｌｕｃｉｆｅｒａｓｅ　Ｓｙｓｔｅｍ）を使用して細胞傷害を測定した。

【１０５４】

代表的なデータが図４４に示されており、２つのＣＡＲが、同じ環状ＲＮＡ構築物から機能的に発現し、細胞傷害性エフェクター機能を発揮し得ることを示している。

【１０５５】

実施例５０

Ｃｒｅレポーターマウスを使用したインビボ環状ＲＮＡトランスフェクション

Ｃｒｅリコンビナーゼ（Ｃｒｅ）をコードする環状ＲＮＡを前述したように脂質ナノ粒子に封入する。雌の６～８週齢のＢ６．Ｃｇ－Ｇｔ（ＲＯＳＡ）２６Ｓｏｒｔｍ９（ＣＡＧ－ｔｄＴｏｍａｔｏ）Ｈｚｅ／Ｊ（Ａｉ９）マウスに脂質ナノ粒子を０．５ｍｇ／ｋｇのＲＮＡで静脈内に投薬した。蛍光ｔｄＴｏｍａｔｏタンパク質は、Ｃｒｅ組換えによりＡｉ９マウスにおいて転写及び翻訳され、これは、環状ＲＮＡがｔｄＴｏｍａｔｏ＋細胞に送達され、そこで翻訳されたことを意味する。４８時間後、マウスを安楽死させ、脾臓を採取し、シングルセル懸濁液へと処理し、フローサイトメトリーによるイムノフェノタイピングのための様々なフルオロフォアが複合された抗体で染色した。

【１０５６】

図４５Ａは、脂質１０ａ－２７もしくは１０ａ－２６または脂質１０ｂ－１５を用いて形成されたＬＮＰでの処置後の総骨髄（ＣＤ１１ｂ＋）、Ｂ細胞（ＣＤ１９＋）、及びＴ細胞（ＴＣＲ－Ｂ＋）を含む様々な脾臓免疫細胞（ＣＤ４５＋、生）サブセットにおけるｔｄＴｏｍａｔｏ発現の頻度とともに代表的なＦＡＣＳプロットを示している。ＰＢＳが注射されたＡｉ９マウスは、バックグラウンドのｔｄＴｏｍａｔｏ蛍光を表していた。図４５Ｂは、ｔｄＴｏｍａｔｏを発現する骨髄細胞、Ｂ細胞、及びＴ細胞の割合を定量し（平均＋標準偏差、ｎ＝３）、これは、Ｃｒｅ環状ＲＮＡで成功裏にトランスフェクトされた各細胞集団の割合と同等である。脂質１０ａ－２７及び１０ａ－２６で作製されたＬＮＰは、脂質９３－Ｓ１４と比較して有意に高い骨髄及びＴ細胞トランスフェクションを示し、脂質構造修飾によって付与される改善を強調している。

【１０５７】

図４５Ｃは、脂質１０ａ－２７及び１０ａ－２６とともにｔｄＴｏｍａｔｏを発現する追加の脾臓免疫細胞集団の割合を示しており（平均＋標準偏差、ｎ＝３）、それにはまた、ＮＫ細胞（ＮＫｐ４６＋、ＴＣＲ－Ｂ－）、古典的単球（ＣＤ１１ｂ＋、Ｌｙ－６Ｇ－、Ｌｙ－６Ｃ＿ｈｉ）、非古典的単球（ＣＤ１１ｂ＋、Ｌｙ－６Ｇ－、Ｌｙ－６Ｃ＿ｌｏ）、好中球（ＣＤ１１ｂ＋、Ｌｙ－６Ｇ＋）、及び樹状細胞（ＣＤ１１ｃ＋、ＭＨＣ－ＩＩ＋）が含まれる。これらの実験は、脂質１０ａ－２７及び１０ａ－２６ならびに脂質１０ｂ－１５で作製されたＬＮＰが、マウスにおいて環状ＲＮＡを多くの脾臓免疫細胞サブセットに送達するのに有効であり、それらの細胞において環状ＲＮＡからの成功したタンパク質発現をもたらすことを実証している。

【１０５８】

実施例５１

実施例５１Ａ：免疫抑制環状ＲＮＡを産生するためのビルトインポリＡ配列及び親和性精製

ポリＡ配列（２０～３０ｎｔ）をＲＮＡ構築物（イントロンにおいてビルトインポリＡ配列を有するＲＮＡ前駆体）の５’及び３’末端に挿入した。例えば、図９７Ａを参照されたい。ＲＮＡ前駆体及びイントロンは、代替的に、例えば、Ｅ　ｃｏｌｉ、ポリＡポリメラーゼまたは酵母ポリＡポリメラーゼを使用して転写後にポリアデニル化され得、これは追加の酵素の使用を必要とする。

【１０５９】

この実施例における環状ＲＮＡは、インビトロ転写（ＩＶＴ）によって環状化し、市販のオリゴ－ｄＴ樹脂で洗浄することによって親和性精製して、スプライシング反応からポリＡタグ化配列（フリーのイントロン及びＲＮＡ前駆体を含む）を選択的に取り除いた。

例えば、図９８を参照されたい。ＩＶＴは、市販のＩＶＴキット（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ）またはカスタマイズされたＩＶＴミックス（Ｏｒｎａ　Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ）（グアノシン一リン酸（ＧＭＰ）及びグアノシン三リン酸（ＧＴＰ）を異なる比（ＧＭＰ：ＧＴＰ＝８、１２．５、または１３．７５）で含有する）を用いて実施した。いくつかの実施形態では、高いＧＭＰ：ＧＴＰ比のＧＭＰが第１のヌクレオチドとして優先的に含まれ、大多数の一リン酸でキャップされたＲＮＡ前駆体を生成し得る。比較として、環状ＲＮＡ産物を代替的に、Ｘｒｎ１、Ｒｎａｓｅ　Ｒ、及びＤｎａｓｅ　Ｉでの処置（酵素精製）によって精製した。例えば、図１００を参照されたい。

【１０６０】

次いで親和性精製または酵素精製プロセスを使用して調製された環状ＲＮＡの免疫原性を評価した。簡潔には、調製された環状ＲＮＡをＡ５４９細胞にトランスフェクトした。２４時間後、細胞を溶解し、モック試料に対するインターフェロンベーター１誘導をｑＰＣＲによって測定した。三リン酸化ＲＮＡである３ｐ－ｈｐＲＮＡを陽性対照として使用した。

【１０６１】

図４６Ｂ及び４６Ｃならびに図９９Ａ及び９９Ｂは、スプライシング中に取り除かれ、スプライシングされていない前駆体分子に存在する要素にポリＡ配列が含まれる場合、ネガティブセレクション親和性精製がスプライシング反応から非環状産物を取り除くことを示している。図４６Ｄは、試験されたＩＶＴ条件及び精製方法で調製された環状ＲＮＡが全て免疫不活性であることを示す。これらの結果は、ネガティブセレクション親和性精製が、環状ＲＮＡ精製のための酵素精製と同等または優れていること、及びカスタマイズされた環状ＲＮＡ合成条件（ＩＶＴ条件）がＧＭＰ余剰に対する依存性を低下させて、最大の免疫不活性を達成し得ることを示唆している。

【１０６２】

実施例５１Ｂ：環状ＲＮＡ産生のための特殊結合部位及び親和性精製

ポリＡタグの代わりに、特殊設計配列（ＤＢＳ、専用結合部位）を含めることができる。例えば、図４７Ａを参照されたい。

【１０６３】

ポリＡタグの代わりに、樹脂に結合し得る特殊設計された相補性オリゴヌクレオチドなどの専用結合部位（ＤＢＳ）を使用して、ＲＮＡ前駆体及びフリーのイントロンを選択的に枯渇させ得る。この実施例では、図４７Ａに示すように、ＤＢＳ配列（３０ｎｔ）を、ＴＡＴＡＡＴＴＣＴＡＣＣＣＴＡＴＴＧＡＧＧＣＡＴＴＧＡＣＴＡ（配列番号３２６９）などのＲＮＡ前駆体の５’及び３’末端に挿入した。ＲＮＡを転写し、転写された産物を樹脂に連結されたカスタム相補性オリゴヌクレオチド上で洗浄した。

【１０６４】

図４７Ｂ及び４７Ｃは、スプライシング中に除去される要素に設計されたＤＢＳ配列を含めることにより、ネガティブ親和性精製を介して、スプライシング反応においてスプライシングされていないＲＮＡ前駆体及びフリーのイントロン成分を取り除くことが可能になることを実証している。

【１０６５】

実施例５１Ｃ：ジストロフィンをコードする環状ＲＮＡの産生

ジストロフィンをコードする１２ｋｂ１２，０００ｎｔ環状ＲＮＡを、ＲＮＡ前駆体のインビトロ転写と、それに続く、残存する直鎖状成分を分解するためのＸｒｎ１、ＤＮａｓｅ　１、及びＲＮａｓｅ　Ｒの混合物を使用する酵素精製によって産生した。図４８は、ジストロフィンをコードする環状ＲＮＡが成功裏に産生されたことを示している。

【１０６６】

実施例５１Ｄ：環状ＲＮＡのネガティブセレクション親和性精製

実施例５１Ａ及び５１Ｂに記載されているように、親和性配列をＲＮＡ前駆体に付加し、環状ＲＮＡをインビトロ転写（ＩＶＴ）によって産生した。親和性配列と１００％相補的である配列を含むオリゴヌクレオチドを樹脂とコンジュゲートさせるか、または親和性

配列と相補的なオリゴヌクレオチドとコンジュゲートされる市販の樹脂を得た。ＩＶＴ反応混合物は、樹脂に直接添加されてもよい。あるいは、ＩＶＴ反応溶液を、１ｍＭを超えるＮａＣｌまたはＫＣｌなどの１つ以上の一価塩を含む、Ｔｒｉｓ緩衝液などの結合緩衝液に緩衝液交換するか、または１つ以上の一価塩を、ＩＶＴ反応混合物を樹脂に添加する前に、ＩＶＴ反応混合物に単純に添加する。次に、親和性配列を含まない環状ＲＮＡを、直鎖状ＲＮＡ及び環状ＲＮＡを含む溶液を樹脂上で洗浄することによって親和性精製した。異常にハイブリダイゼーションした配列を変性させるために、溶液を、このプロセス中に加熱してもよい。ビーズからの溶出液を回収し、１０～３００ｋＤａの濾過閾値を使用して、水または１ｍＭクエン酸ナトリウム、ｐＨ６．５を含む保存緩衝液に緩衝液交換した。

【１０６７】

実施例５２

３’イントロン断片とＩＲＥＳとの間の５’スペーサーは、環状ＲＮＡ発現を改善する

Ｊｕｒｋａｔ細胞における３’イントロン断片とＩＲＥＳとの間に異なる５’スペーサーを有する精製されたｃｉｒｃＲＮＡの発現レベルを比較した。簡潔には、２５０ｎｇの各ＲＮＡ種での６０，０００細胞のエレクトロポレーションから２４時間後に上清において分泌されたガウシアルシフェラーゼからの発光を測定した。

【１０６８】

また、Ｊｕｒｋａｔ細胞における３’イントロン断片とＩＲＥＳとの間に異なる５’スペーサーを有する精製されたｃｉｒｃＲＮＡの安定性を比較した。簡潔には、２５０ｎｇの各ＲＮＡ種での６０，０００細胞のエレクトロポレーションから２日にわたって上清において分泌されたガウシアルシフェラーゼからの発光を測定し、１日目の発現に対して正規化した。

【１０６９】

結果が図４９Ａ及び４９Ｂに示されており、スペーサーの付加が、ＩＲＥＳ機能ならびに付加されたスペーサーの配列同一性及び長さの重要性を向上させ得ることを示している。スペーサーは、ＩＲＥＳの直前に付加され、おそらく、ＩＲＥＳがイントロン断片などの他の構造化要素から孤立して折り畳まれることを可能にすることによって機能するということが潜在的な説明である。

【１０７０】

実施例５３

この実施例は、ヤギコブウイルスＩＲＥＳの５’または３’末端からの欠失スキャンを説明する。ＩＲＥＳボーダーは通常、十分に特性化されておらず、経験的分析を必要とし、この実施例は、翻訳を誘導するために必要とされるコアの機能的配列を突き止めるために使用され得る。簡潔には、環状ＲＮＡ構築物を、ガウシアルシフェラーゼをコードする配列に機能可能に連結された切断されたＩＲＥＳ要素を用いて生成した。切断されたＩＲＥＳ要素は、５’または３’末端から除去された示された長さのヌクレオチド配列を有していた。ＲＮＡでの初代ヒトＴ細胞のエレクトロポレーションから２４及び４８時間後に上清において分泌されたガウシアルシフェラーゼからの発光を測定した。発現の安定性を、２４時間の時点における発現レベルに対する４８時間時点における発現レベルの比として計算した。

【１０７１】

図５０に示されているように、ＩＲＥＳの５’末端からの４０超のヌクレオチドの欠失は、発現を減少させ、ＩＲＥＳ機能を崩壊させた。発現の安定性は、ＩＲＥＳ要素の切断によって比較的影響を受けなかったが、発現レベルは、ＩＲＥＳの３’末端から１４１ヌクレオチドの欠失によって実質的に低下した一方で、３’末端からの５７または１２２ヌクレオチドの欠失は、発現レベルに対して良好な影響を及ぼした。

【１０７２】

６ヌクレオチドプレ開始配列の欠失は、ルシフェラーゼレポーターの発現レベルを低下させることも観察された。その６ヌクレオチド配列の古典的コザック配列（ＧＣＣＡＣＣ

）での置き換えは、有意な影響を有さなかったが、少なくとも発現は維持した。
【１０７３】
実施例５４
この実施例は、ヤギコブウイルス（ＣＫＶ）ＩＲＥＳ、パラボウイルスＩＲＥＳ、アポデムスピコルナウイルス（ＡＰ）ＩＲＥＳ、コブウイルスＳＺＡＬ６　ＩＲＥＳ、クロヒウイルスＢ（ＣｒＶＢ）ＩＲＥＳ、ＣＶＢ３　ＩＲＥＳ、及びＳＡＦＶ　ＩＲＥＳを含む、選択された選択されたＩＲＥＳ配列の修飾（例えば、切断）を記載する。簡潔には、環状ＲＮＡ構築物を、ガウシアルシフェラーゼをコードする配列に機能可能に連結された切断されたＩＲＥＳ要素を用いて生成した。ＨｅｐＧ２細胞を環状ＲＮＡでトランスフェクトした。上清における発光をトランスフェクションから２４及び４８時間後に評価した。発現の安定性を、２４時間の時点における発現レベルに対する４８時間時点における発現レベルの比として計算した。
【１０７４】
図５１に示されているように、切断は、ＩＲＥＳの同一性に応じて多様な効果を有し、これは、ＩＲＥＳ間でしばしば異なる、翻訳に使用される開始メカニズム及びタンパク質因子に依存し得る。５’及び３’欠失は、例えば、ＣＫＶ　ＩＲＥＳとの関連で有効に組み合わされ得る。標準的なコザック配列の付加は、いくつかの場合では、有意に発現を改善し（ＳＡＦＶにおけるＦｕｌｌ対Ｆｕｌｌ＋Ｋのように）、または発現を減弱させた（ＣＫＶにおける５ｄ４０／３ｄ１２２対５ｄ４０／３ｄ１２２＋Ｋのように）。
【１０７５】
実施例５５
この実施例は、変異代替翻訳開始部位を含む、ＣＫ－７３９、ＡＰ－７４８、及びＰＶ－７４３　ＩＲＥＳ配列の修飾を記載する。簡潔には、環状ＲＮＡ構築物を、ガウシアルシフェラーゼをコードする配列に機能可能に連結された修飾されたＩＲＥＳ要素を用いて生成した。ＲＮＡでの１Ｃ１Ｃ７細胞のトランスフェクションから２４及び４８時間後に上清において分泌されたガウシアルシフェラーゼからの発光を測定した。
【１０７６】
ＣＵＧは、最も一般的に見られる代替開始部位であるが、他の多くのものも特徴評価した。これらのトリプレットは、開始コドンの前のＩＲＥＳスキャニングトラクトに存在し得、正確なポリペプチドの翻訳に影響を及ぼし得る。配列番号３２８２の配列を有するＩＲＥＳの４つの代替開始部位変異を作製した。図５２に示されているように、ＣＫ－７３９　ＩＲＥＳにおける代替翻訳開始部位の変異は、正確なポリペプチドの翻訳に、いくつかの例では正の、他の例では負の影響を及ぼした。全ての代替翻訳開始部位の変異は、翻訳のレベルを低下させた。
【１０７７】
開始コドンの前の６ヌクレオチドの代替コザック配列も発現レベルに影響を及ぼし得る。開始コドンの上流の６ヌクレオチド配列は、ＣＫ－７３９　ＩＲＥＳ及び「６ｎｔプレ開始」群における試料番号１～５においてそれぞれ、ｇＴｃａｃＧ、ａａａｇｔｃ、ｇＴｃａｃＧ、ｇｔｃａｔｇ、ｇｃａａａｃ、及びａｃａａｃｃであった。図５２に示されているように、開始コドンの前の所定の６ヌクレオチド配列の置換は、翻訳に影響を及ぼした。
【１０７８】
ＡＰ－７４８及びＰＶ－７４３　ＩＲＥＳ配列における５’及び３’末端欠失が発現を減少させたことも観察された。しかしながら、長いスキャニングトラクトを有していたＣＫ－７３９　ＩＲＥＳでは、翻訳は、スキャニングトラクトにおける欠失によって比較的影響を受けなかった。
【１０７９】
実施例５６
この実施例は、５’及び／または３’非翻訳領域（ＵＴＲ）を挿入し、ＩＲＥＳハイブリッドを生成することによる選択されたＩＲＥＳ配列の修飾を記載する。簡潔には、環状Ｒ

ＮＡ構築物を、ガウシアルシフェラーゼをコードする配列に機能可能に連結された修飾されたＩＲＥＳ要素を用いて生成した。ＲＮＡでのＨｅｐＧ２細胞のトランスフェクションから２４及び４８時間後に上清において分泌されたガウシアルシフェラーゼからの発光を測定した。

【１０８０】

ＵＴＲが挿入されたＩＲＥＳ配列は、配列番号３１９２～３１９９から選択される配列を含み得る。図５３に示されているように、ＩＲＥＳの３’末端の直後かつ開始コドンの前の５’ＵＴＲの挿入は、ヤギコブウイルス（ＣＫ）ＩＲＥＳからの翻訳をわずかに増加させたが、いくつかの例では、サリウイルスＳＺ１　ＩＲＥＳからの翻訳を阻害した。終止カセットの直後の３’ＵＴＲの挿入は、いずれのＩＲＥＳ配列にも影響を有さなかった。

【１０８１】

ＣＫ　ＩＲＥＳは、ＣＫ　ＩＲＥＳをベースとして作製し、ＣＫ　ＩＲＥＳの特定の領域を、他のＩＲＥＳ配列、例えば、ＳＺ１及びＡＶ（アイチウイルス）からの同様の外観の構造で置き換えた。図５３に示されているように、所定のハイブリッド合成ＩＲＥＳ配列は機能的であり、ハイブリッドＩＲＥＳが、同様の予測される構造を示す異なるＩＲＥＳ配列に由来する部分を使用して構築され得る一方で、これらの構造の欠失はＩＲＥＳ機能を完全に停止させたことを示している。

【１０８２】

実施例５７

この実施例は、終止コドンまたはカセットバリアントを導入することによる環状ＲＮＡの修飾を記載する。簡潔には、環状ＲＮＡ構築物を、ガウシアルシフェラーゼをコードする配列に機能可能に連結されたＩＲＥＳ要素と、それに続く可変終止コドンカセットを用いて生成し、その可変終止コドンカセットは、各フレームにおける終止コドン及びガウシアルシフェラーゼをコードする配列のリーディングフレームにおける２つの終始コドンを含んでいた。１Ｃ１Ｃ７細胞を環状ＲＮＡでトランスフェクトした。上清における発光をトランスフェクションから２４及び４８時間後に評価した。

【１０８３】

終止コドンカセットの配列は、配列番号３２０３～３２０９に示されている。図５４に示されているように、所定の終止コドンカセットは、発現レベルを改善したが、それらは、発現安定性に対してほとんど影響を有さなかった。特に、２つのフレーム１（ガウシアルシフェラーゼをコードする配列のリーディングフレーム）終止コドン（１つ目はＴＡＡである）と、それに続くフレーム２終止コドン及びフレーム３終止コドンを有する終止カセットは、機能的翻訳を促進するのに有効である。

【１０８４】

実施例５８

この実施例は、５’ＵＴＲバリアント挿入することによる環状ＲＮＡの修飾を記載する。簡潔には、環状ＲＮＡ構築物を、ＩＲＥＳの３’末端と開始コドンとの間に挿入された５’ＵＴＲバリアントを有するＩＲＥＳ要素を用いて生成した（ＩＲＥＳは、ガウシアルシフェラーゼをコードする配列に機能可能に連結されている）。１Ｃ１Ｃ７細胞を環状ＲＮＡでトランスフェクトした。上清における発光をトランスフェクションから２４及び４８時間後に評価した。

【１０８５】

５’ＵＴＲバリアントの配列は、配列番号３１９７及び３２００～３２０２に示されている。図５５に示されているように、標準コザック配列（ＵＴＲ４）を有するＣＫ　ＩＲＥＳは、３６ヌクレオチドの非構造化／低ＧＣスペーサー配列が付加された場合（ＵＴＲ２）、より有効であり、ＧＣリッチのコザック配列が、コアのＩＲＥＳの折り畳みと干渉し得ることを示唆している。コザック配列を有するより高いＧＣ／構造化スペーサーを使用すると、同じ利益を示さず（ＵＴＲ３）、これはおそらく、スペーサー自体によるＩＲＥＳの折り畳みとの干渉に起因する。コザック配列のｇＴｃａｃＧへの変異（ＵＴＲ１）は、スペーサーを必要とせずにコザック＋スペーサー代替物と同じレベルまで翻訳を向上

させた。

【１０８６】

実施例５９

この実施例は、発現レベルに対する環状ＲＮＡにおけるｍｉＲＮＡ標的部位の影響を記載する。簡潔には、環状ＲＮＡ構築物を、ヒトエリスロポエチン（ｈＥＰＯ）をコードする配列に機能可能に連結されたＩＲＥＳ要素を用いて生成し、２つのタンデムｍｉＲ－１２２標的部位が構築物に挿入された。ｍｉＲ－１２２を発現するＨｕｈ７細胞に環状ＲＮＡをトランスフェクトした。上清中のｈＥＰＯ発現を、トランスフェクションの２４時間後及び４８時間後にサンドイッチＥＬＩＳＡによって評価した。

【１０８７】

図５６に示されているように、ｈＥＰＯ発現レベルは、ｍｉＲ－１２２標的部位が環状ＲＮＡに挿入された場合に阻止された。この結果は、環状ＲＮＡからの発現がｍｉＲＮＡによって制御され得ることを実証している。このように、細胞タイプまたは組織特異的発現は、組換えタンパク質の発現が望ましくない細胞タイプにおいて発現するｍｉＲＮＡの標的部位を組み込むことによって達成され得る。

【１０８８】

実施例６０

この実施例は、インビトロでのＬＮＰによるヒト腫瘍細胞のトランスフェクションを示す。ＳｕｐＴ１細胞（ヒトＴ細胞腫瘍株）及びＭＶ４－１１細胞（ヒトマクロファージ腫瘍株）を、９６ウェルプレート中に一晩、それぞれ１００，０００細胞／ウェル及び１００，０００細胞／ウェルで播種した。次に、ホタルルシフェラーゼ（ＦＬｕｃ）をコードするｃｉｒｃＲＮＡを含むＬＮＰを２００ｎｇ　ＲＮＡ／ウェルで細胞に添加した。２４時間のインキュベーション後、発光を、製造元の指示に従ってＢｒｉｇｈｔ－Ｇｌｏルシフェラーゼアッセイシステム（Ｐｒｏｍｅｇａ）を使用して定量化し、ＬＮＰで処理していない細胞からのバックグラウンド発光を差し引いた。図５７は、測定されたホタルの発光を定量化し、脂質１０ａ－２７（１０ａ－２７（４．５Ｄ）ＬＮＰ、実施例７０を参照されたい）または脂質１０ａ－２６（１０ａ－２６（４．５Ｄ）ＬＮＰ、実施例７０を参照されたい）を含むＬＮＰが、インビトロでヒトＴ細胞及びマクロファージ腫瘍株の両方においてｃｉｒｃＲＮＡをトランスフェクトし、発現できることを示している。１０ａ－２７（４．５Ｄ）ＬＮＰは、１０ａ－２６（４．５Ｄ）ＬＮＰよりも高い発光をもたらし、ヒト腫瘍細胞へのＬＮＰのトランスフェクションのレベルが製剤によって影響を受け得ることを示している。

【１０８９】

実施例６１

この実施例は、インビトロでの初代ヒト活性化Ｔ細胞のトランスフェクションを示している。独立したドナー由来の初代ヒトＴ細胞を、ａＣＤ３／ａＣＤ２８で刺激し、ヒト血清及びＩＬ－２の存在下で６日間増殖させた。次いで、１００，０００個の細胞を９６ウェルプレートに播種し、ホタルルシフェラーゼ（ＦＬｕｃ）をコードするｃｉｒｃＲＮＡを含むＬＮＰを、２００ｎｇ　ＲＮＡ／ウェルで、アポリポタンパク質Ｅ３（ＡｐｏＥ３）を含むかまたは含まずに細胞に添加した。２４時間のインキュベーション後、発光を、製造元の指示に従ってＢｒｉｇｈｔ－Ｇｌｏルシフェラーゼアッセイシステム（Ｐｒｏｍｅｇａ）を使用して定量化し、ＬＮＰで処理していない細胞からのバックグラウンド発光を差し引いた。図５８は、４つの独立したドナーにわたって測定されたホタル発光を示し、試験した全てのＬＮＰがインビトロで初代ヒトＴ細胞をトランスフェクトしたことを示している。脂質１０ａ－２７を含むＬＮＰは、概して、脂質１０ａ－２６を含むＬＮＰよりも高い発光を生じた。さらに、ＡｐｏＥ３の添加は、概して、１０ａ－２７（５．７Ａ）及び１０ａ－２６（５．７Ａ）（４つのドナーにわたってそれぞれ４．４倍及び９．３倍の平均）について、１０ａ－２７（４．５Ｄ）及び１０ａ－２６（４．５Ｄ）（それぞれ３．１倍及び２．６倍）と比較して、ルシフェラーゼの発現をより増加させた。これは、ヘルパー脂質、ＰＥＧ脂質、及びイオン化可能脂質：リン酸比が全て、同じイオン化可

能脂質で作製された異なる製剤のＡｐｏＥ依存性に寄与することを示唆する。（ＬＮＰ製剤手順、例えば、１０ａ－２７（５．７Ａ）、１０ａ－２６（５．７Ａ）、１０ａ－２７（４．５Ｄ）、及び１０ａ－２６（４．５Ｄ）ＬＮＰについては、実施例７０を参照されたい）。

【１０９０】

実施例６２

この実施例は、ＬＮＰの異なる尾部化学が、Ｔ細胞への異なる取り込みメカニズムをもたらすことを示す。ｃｉｒｃＲＮＡを発現するヒトＴ細胞の割合を定量化するために、ｅＧＦＰ　ｃｉｒｃＲＮＡを含むＬＮＰを、２００ｎｇのＲＮＡ／ウェルで、ＡｐｏＥ３を含むまたは含まずに、活性化された初代ヒトＴ細胞（実施例６１に記載されるように調製した）に添加した。２４時間のインキュベーション後、細胞をフローサイトメトリーによって分析し、生ＧＦＰ＋Ｔ細胞のパーセンテージを定量した。図５９は、２つの独立したドナーについてのＧＦＰ＋Ｔ細胞％をグラフ化し、脂質１０ａ－２７を含むＬＮＰ（１０ａ－２７（４．５Ｄ）ＬＮＰ、実施例７０を参照されたい）及び脂質１０ａ－４６を含むＬＮＰ（１０ａ－４６（５．７Ａ）ＬＮＰ、実施例７０を参照されたい）については、細胞の５～１０％がＧＦＰ＋であった。ＡｐｏＥ３の添加は、１０ａ－２７（４．５Ｄ）ＬＮＰについてのトランスフェクションの増加をもたらしたが、１０ａ－４６（５．７Ａ）ＬＮＰについてのトランスフェクションの増加は見られず、脂質１０ａ－２７と１０ａ－４６との間の異なる尾部化学が、Ｔ細胞への異なる取り込みメカニズムを媒介し得ることを示唆している。

【１０９１】

実施例６３

この実施例は、Ｃｒｅレポーターマウスモデルにおける Ｃｒｅの免疫細胞発現を記載する。

【１０９２】

Ａｉ９マウス（Ｂ６．Ｃｇ－Ｇｔ（ＲＯＳＡ）２６Ｓｏｒｔｍ９（ＣＡＧ－ｔｄＴｏｍａｔｏ）Ｈｚｅ／Ｊ、雌、６～８週、群当たりｎ＝３）に、０．５ｍｇ／ｋｇのＣｒｅ　ｃｉｒｃＲＮＡ　ＬＮＰまたはＰＢＳをｉ．ｖ．注射した。Ａｉ９マウスは、Ｃｒｅ組換え時に蛍光レポーターｔｄＴｏｍａｔｏを転写及び翻訳し、つまり、ｔｄＴｏｍａｔｏ＋である細胞は、Ｃｒｅ　ｃｉｒｃＲＮＡで正常にトランスフェクトされたことを意味する。４８時間後、マウスを安楽死させ、それらの脾臓を採取し、手動で単一細胞懸濁液へと処理した。脾細胞を、死細胞（ＬｉｖｅＤｅａｄ　Ｆｉｘａｂｌｅ　Ａｑｕａ、Ｔｈｅｒｍｏ）について、及び抗マウス抗体（ＴＣＲ－Ｂ鎖、ＢＶ４２１、Ｈ５７－５９７；ＣＤ４５、ＢＶ７１１、３０－Ｆ１１；ＣＤ１１ｂ、ＢＶ７８５、ＩＣＲＦ４４；ＮＫｐ４６、ＡＦ６４７、２９Ａ１．４；ＣＤ１９、ＡＰＣ／７５０、６Ｄ５；ＴｒｕＳｔａｉｎ　ＦｃＸ、９３；全ての抗体をＢｉｏｌｅｇｅｎｄから入手）で１：２００の比率で染色した。フローサイトメトリーを、Ａｔｔｕｎｅ　Ｎｘｔフローサイトメーター（Ｔｈｅｒｍｏ）を使用して実施した。

【１０９３】

脾臓骨髄細胞（ＣＤ１１ｂ＋）、Ｂ細胞（ＣＤ１９＋）、及びＴ細胞（ＴＣＲ－Ｂ＋）におけるｔｄＴｏｍａｔｏ＋細胞の割合を図６０に示す。脂質１０ａ－２７及び脂質１０ａ－４６は、それらの尾部化学によってのみ異なり、脂質１０ａ－２７で作製された製剤は、脂質１０ａ－４６で作製された製剤よりも有意に多くの脾臓免疫細胞をトランスフェクトする。さらに、Ｃｒｅ　ｃｒｉｃＲＮＡで製剤化された１０ａ－２７（４．５Ｄ）ＬＮＰ（実施例７０を参照されたい）は、Ｃｒｅ直鎖状ｍＲＮＡを配合したものよりも約２倍多くのＴ細胞をトランスフェクトし、直鎖状ｍＲＮＡと比較して、ｃｒｉｃＲＮＡが脾臓Ｔ細胞における改善されたタンパク質発現をもたらし得ることを示唆している。

【表２３】

表２３．ＬＮＰの特徴評価

| 製剤 | Z 平均(nm) | PDI | RNA 封入化効率(%) |
|---|---|---|---|
| 10a-27(4.5D)、研究 1 | 65 | 0.07 | 96 |
| 10a-26(4.5D)、研究 1 | 74 | 0.06 | 94 |
| 10a-27(4.5D)、mCre を用いた、研究 1 | 75 | 0.05 | 93 |
| 10a-46(5.7A)、研究 2 | 86 | 0.01 | 94 |

【１０９４】

実施例６４

この実施例は、野生型マウスにおけるｍＯＸ４０Ｌ　ｃｉｒｃＲＮＡの免疫細胞発現を示す。

【１０９５】

Ｃ５７ＢＬ／６マウス（雌、６～８週、群当たりｎ＝３または４）に、０．５ｍｇ／ｋｇのｍＯＸ４０Ｌ　ｃｉｒｃＲＮＡ　ＬＮＰまたはＰＢＳをｉ．ｖ．注射した。２４時間後、マウスを安楽死させ、それらの脾臓を採取し、手動で単一細胞懸濁液へと処理した。脾細胞を、死細胞（ＬｉｖｅＤｅａｄ　Ｆｉｘａｂｌｅ　Ａｑｕａ、Ｔｈｅｒｍｏ）について、及び抗マウス抗体（ＴＣＲ－Ｂ鎖、ＰａｃＢｌｕｅ、Ｈ５７－５９７；ＣＤ１１ｂ、ＦＩＴＣ、ＩＣＲＦ４４；Ｂ２２０、ＰＥ、ＲＡ３－６Ｂ２；ＣＤ４５、ＰｅｒＣＰ、３０－Ｆ１１；ｍＯＸ４０Ｌ、ＡＦ６４７、ＲＭ１３４Ｌ；ＮＫ１．１、ＡＰＣ／７５０、ＰＫ１３６；ＴｒｕＳｔａｉｎ　ＦｃＸ、９３；全ての抗体をＢｉｏｌｅｇｅｎｄから入手）で１：２００で染色した。フローサイトメトリーを、Ａｔｔｕｎｅ　ＮｘＴフローサイトメーター（Ｔｈｅｒｍｏ）を使用して実施した。

【１０９６】

脾臓骨髄（ＣＤ１１ｂ＋）、Ｔ細胞（ＴＣＲ－Ｂ＋）、及びＮＫ細胞（ＮＫ１．１＋）におけるｍＯＸ４０Ｌ＋細胞の割合を図６１に示す。注目すべきことに、異なる緩衝液（低張性ＰＢＳ、等張性ＰＢＳ、及び等張性ＴＢＳ）中で静脈内注射された同じ製剤の間で、有意に異なるトランスフェクション効率が観察された。低張性ＰＢＳ中の１０ａ－２７４．５Ｄ　ＬＮＰは、脾臓における約１４％の骨髄細胞トランスフェクション、６％のＴ細胞トランスフェクション、及び２１％のＮＫ細胞トランスフェクションをもたらす。等張性緩衝液中で注入された製剤のうち、１０ａ－２７　ＤＳＰＣ　５．７Ａ　ＬＮＰは、脾臓における骨髄、Ｔ細胞、及びＮＫ細胞のトランスフェクションを示す（それぞれ９％、３％、及び８％）。（ＬＮＰ製剤手順、例えば、１０ａ－２７（４．５Ｄ）ＬＮＰ及び１０ａ－２７　ＤＳＰＣ（５．７Ａ）ＬＮＰについては、実施例７０を参照されたい）。

【表２４】

表２４．ＬＮＰの特徴評価

| 製剤 | Z 平均(nm) | PDI | RNA 封入化効率(%) |
|---|---|---|---|
| 10a-27(4.5D) | 63 | 0.02 | 93 |
| 10a-26(4.5D) | 67 | 0.07 | 94 |
| 10a-27 DSPC(5.7A) | 82 | 0.05 | 96 |

【１０９７】

実施例６５

この実施例は、野生型マウスにおけるｍＯＸ４０Ｌ　ｃｉｒｃＲＮＡ－ＬＮＰの単一用量漸増を示す。

【１０９８】

５７ＢＬ／６マウス（雌、６～８週、群当たりｎ＝３）に、１ｍｇ／ｋｇまたは３ｍｇ／ｋｇのｍＯＸ４０Ｌ　ｃｉｒｃＲＮＡ　ＬＮＰまたは緩衝液対照をｉ．ｖ．注射した。２４時間後、マウスを安楽死させ、それらの脾臓を採取し、手動で単一細胞懸濁液へと処理した。脾細胞を死細胞（ＬｉｖｅＤｅａｄ　Ｆｉｘａｂｌｅ　Ｂｌｕｅ、Ｔｈｅｒｍｏ）について染色し、抗マウス抗体（ＴＣＲ－Ｂ鎖、ＢＶ４２１、Ｈ５７－５９７；ＣＤ１９、ＢＶ６０５、６Ｄ５；ＣＤ４５、ＢＶ７１１、３０－Ｆ１１；ＣＤ１１ｂ、ＢＶ７８５、ＩＣＲＦ４４；ＣＤ１１ｃ、ＦＩＴＣ、Ｎ４１８；ＣＤ８ａ、ＰｅｒＣＰ、５３－６．７；ｍＯＸ４０Ｌ、ＰＥ、ＲＭ１３４Ｌ；ＮＫｐ４６、ＡＦ６４７、２９Ａ１．４；ＣＤ４、ＡＰＣ／７５０、ＧＫ１．５；ＴｒｕＳｔａｉｎ　ＦｃＸ、９３；全ての抗体をＢｉｏｌｅｇｅｎｄから入手）で１：２００で染色した。フローサイトメトリーを、ＢＤ　ＦＡＣＳＳｙｍｐｈｏｎｙフローサイトメーターを使用して実施した。

【１０９９】

脾臓Ｔ細胞（全てＴＣＲ－Ｂ＋）、ＣＤ４＋Ｔ細胞（ＴＣＲ－Ｂ＋、ＣＤ４＋）、ＣＤ８＋Ｔ細胞（ＴＣＲ－Ｂ＋、ＣＤ８ａ＋）、Ｂ細胞（ＣＤ１９＋）、ＮＫ細胞（ＮＫｐ４６＋）、樹状細胞（ＣＤ１１ｃ＋）、及び他の骨髄細胞（ＣＤ１１ｂ＋、ＣＤ１１ｃ－）におけるｍＯＸ４０Ｌ＋細胞の割合を図６２Ａ及び図６２Ｂに示し、対応するマウスの体重変化を図６２Ｃに示す。免疫細胞サブセットトランスフェクションの用量依存的な増加は、１０ａ－２７（４．５Ｄ）ＬＮＰ　１×ＰＢＳ群を除き、１ｍｇ／ｋｇ及び３ｍｇ／ｋｇにわたって全ての群について観察された。３ｍｇ／ｋｇ用量では、３つの異なるＬＮＰ（ＴＢＳ中の１０ａ－２７（４．５Ｄ）、ＰＢＳ中の１０ａ－２６（４．５Ｄ）、及びＴＢＳ中の１０ａ－２７　ＤＳＰＣ（５．７Ａ）；製剤手順については実施例７０を参照されたい）は、ＣＤ４＋及びＣＤ８＋サブセットの間で観察される同様のトランスフェクション率で、脾臓Ｔ細胞において１０～２０％のｍＯＸ４０Ｌトランスフェクションを達成する。これら３つの製剤はまた、３ｍｇ／ｋｇで、脾臓において約２０％のＢ細胞、６０～７０％の樹状細胞、６０～７０％のＮＫ細胞、及び３０～４０％の他の骨髄細胞のｍＯＸ４０Ｌトランスフェクションをもたらす。これらの３つの製剤は、３ｍｇ／ｋｇの単一用量で２４時間でわずかな（０～３％）マウスの体重減少のみをもたらし、報告された臨床所見はない。

【表２５】

表２５．ＬＮＰの特徴評価

| 製剤 | Z 平均(nm) | PDI | RNA 封入化効率(%) |
|---|---|---|---|
| 10a-27(4.5D) | 76 | 0.06 | 91 |
| 10a-26(4.5D) | 67 | 0.01 | 88 |
| 10a-27 DSPC(5.7A) | 77 | 0.01 | 93 |

【１１００】

実施例６６

この実施例は、マウスにおけるｃｉｒｃＲＮＡ－ＬＮＰ　ＣＡＲ媒介性Ｂ細胞枯渇を示す。

【１１０１】

Ｃ５７ＢＬ／６マウス（雌、６～８週、群当たりｎ＝５）に、０日目、２日目、５日目、７日目、及び９日目に、０．５ｍｇ／ｋｇのａＣＤ１９－ＣＡＲ　ｃｉｒｃＲＮＡ　ＬＮＰまたは対照ＦＬｕｃ　ｃｉｒｃＲＮＡ　ＬＮＰをｉ．ｖ．注射した。－１日目、１日目、８日目、及び１２日目に、顎下出血を実施して血液を採取した。３０μＬの血液をＡ

ＣＫ溶解緩衝液で溶解し、ＭＡＣＳ緩衝液で洗浄して免疫細胞を単離した。１２日目に、マウスを安楽死させ、それらの脾臓を採取し、手動で単一細胞懸濁液へと処理した。血液及び脾臓におけるＢ細胞の程度を評価するために、これらの単一細胞懸濁液を死細胞（ＬｉｖｅＤｅａｄ　Ｆｉｘａｂｌｅ　Ａｑｕａ、Ｔｈｅｒｍｏ）について染色し、抗マウス抗体（ＴＣＲ－Ｂ鎖、ＰａｃＢｌｕｅ、Ｈ５７－５９７；ＣＤ１１ｂ、ＦＩＴＣ、ＩＣＲＦ４４；Ｂ２２０、ＰＥ、ＲＡ３－６Ｂ２；ＣＤ４５、ＰｅｒＣＰ、３０－Ｆ１１；ＴｒｕＳｔａｉｎ　ＦｃＸ、９３；全ての抗体をＢｉｏｌｅｇｅｎｄから入手）で１：２００で染色した。フローサイトメトリーを、Ａｔｔｕｎｅ　ＮｘＴフローサイトメーター（Ｔｈｅｒｍｏ）を使用して実施した。

【１１０２】

図６３Ａは、生ＣＤ４５＋免疫細胞のＢ２２０＋Ｂ細胞の割合によって定義される、この研究で観察されたＢ細胞枯渇を定量化する。ａＣＤ１９－ＣＡＲ　ｃｉｒｃＲＮＡ　ＬＮＰ群におけるＢ細胞枯渇を、８日目及び１２日目（血液について）ならびに１２日目（脾臓について）のそれぞれのＦＬｕｃ　ｃｒｉｃＲＮＡ　ＬＮＰ対照と比較した。血液では、ａＣＤ１９－ＣＡＲ　１０ａ－２７（４．５Ｄ）及び１０ａ－２６（４．５Ｄ）ＬＮＰは、ＦＬｕｃ対照と比較して、８日目に、生ＣＤ４５＋のＢ２２０＋％において、それぞれ約２８％及び１７％の減少をもたらした。脾臓では、図６３Ｂに示すように、ａＣＤ１９－ＣＡＲ　１０ａ－２７（４．５Ｄ）及び１０ａ－２６（４．５Ｄ）ＬＮＰは、ＦＬｕｃ対照と比較して、１２日目に、生ＣＤ４５＋のＢ２２０＋％において、約５％及び９％の減少をもたらした。全体として、これらの結果は、脂質１０ａ－２７（４．５Ｄ）及び脂質１０ａ－２６（４．５Ｄ）について、ａＣＤ１９－ＣＡＲ　ｃｒｉｃＲＮＡ　ＬＮＰで処置したマウスにおいて、ＣＡＲ媒介性Ｂ細胞枯渇が生じていることを示唆している。

【１１０３】

加えて、図６３Ｃは、この研究におけるマウスの体重増加率を示す。１０ａ－２７　４．５Ｄまたは１０ａ－２６　４．５Ｄ　ＬＮＰで処置したマウス（９日間で５×０．５ｍｇ／ｋｇ）からの平均で有意な体重減少はなく、これらのＬＮＰがこの用量及びスケジュールでマウスにおいて十分に許容的であり得ることを示唆している。

【表２６】

表２６．ＬＮＰの特徴評価

| 製剤 | Z 平均(nm) | PDI | RNA 封入化効率(%) |
|---|---|---|---|
| 10a-27(4.5D)、oLuc | 65 | 0.03 | 93 |
| 10a-27(4.5D)、oaCD19-CAR | 74 | 0.02 | 96 |
| 10a-26(4.5D)、oLuc | 71 | 0.04 | 91 |
| 10a-26、(4.5D)、oaCD19-CAR | 71 | 0.04 | 93 |

【１１０４】

実施例６７

抗ＣＤ１９　ＣＡＲを含むＬＮＰ及び環状ＲＮＡ構築物は、インビボで血液及び脾臓におけるＢ細胞を低減する。

抗ＣＤ１９　ＣＡＲ発現をコードする環状ＲＮＡ構築物を、上述したように脂質ナノ粒子内に封入した。比較のため、ルシフェラーゼ発現をコードする環状ＲＮＡを別の脂質ナノ粒子内に封入した。

【１１０５】

６～８週齢のＣ５７ＢＬ／６マウスに、１日おきにいずれかのＬＮＰ溶液を注射し、各マウス内に合計４回のＬＮＰ注射を行った。最後のＬＮＰ注射から２４時間後、マウスの

脾臓及び血液を採取し、染色し、フローサイトメトリーを介して分析した。図６４Ａ及び図６４Ｂに示されるように、抗ＣＤ１９　ＣＡＲをコードするＬＮＰ－環状ＲＮＡ構築物を含むマウスは、ルシフェラーゼをコードするＬＮＰ－環状ＲＮＡで処理したマウスと比較して、末梢血及び脾臓におけるＣＤ１９＋Ｂ細胞の統計的に有意な減少をもたらした。

【１１０６】

実施例６８

ＣＡＲをコードする環状ＲＮＡ内に含まれるＩＲＥＳ配列は、ＣＡＲ発現及びＴ細胞の細胞毒性を改善する。

活性化されたネズミＴ細胞を、固有のＩＲＥＳ及びマウス抗ＣＤ１９　１Ｄ３ζ　ＣＡＲ発現配列を含む２００ｎｇの環状ＲＮＡ構築物でエレクトロポレーションした。これらの構築物に含まれるＩＲＥＳは、全体的または部分的に、ヤギコブウイルス、アポデムスピコルナウイルス、パラボウイルス、またはサリウイルスのいずれかに由来した。ヤギコブウイルス由来ＩＲＥＳをさらにコドン最適化した。対照として、ＩＲＥＳを有しない野生型ゼータマウスＣＡＲを含む環状ＲＮＡを比較のために使用した。Ｔ細胞を、エレクトロポレーションの２４時間後にＣＤ－１９　ＣＡＲについて染色して表面発現を評価し、次いでＡ２０　Ｆｌｕｃ標的細胞と共培養した。次いで、Ｔ細胞を標的細胞と共培養した２４時間後のＦｌｕｃ＋Ａ２０細胞の細胞傷害性殺傷についてアッセイを評価した。

【１１０７】

図６５Ａ、６５Ｂ、６５Ｃ、及び６６に見られるように、固有のＩＲＥＳは、Ｔ細胞がＣＡＲタンパク質を発現する頻度及び細胞の表面でのＣＡＲ発現のレベルを増加させることができた。細胞表面でのＣＡＲタンパク質の発現頻度及びＣＡＲ発現レベルの増加は、改善された抗腫瘍応答をもたらす。

【１１０８】

実施例６９

初代ヒトＴ細胞において環状ＲＮＡ構築物から発現した細胞質及び表面タンパク質。

環状ＲＮＡ構築物は、蛍光細胞質レポーターまたは表面抗原レポーターのいずれかをコードする配列が含まれた。蛍光レポーターには、緑色蛍光タンパク質、ｍＣｉｔｒｉｎｅ、ｍＷａｓａｂｉ、Ｔｓａｐｐｈｉｒｅが含まれた。表面レポーターには、ＣＤ５２及びＴｈｙ１．１$^{ｂｉｏ}$が含まれた。初代ヒトＴ細胞を抗ＣＤ３／抗ＣＤ２８抗体で活性化し、レポーター配列を含む環状ＲＮＡの活性化の６日後にエレクトロポレーションした。Ｔ細胞を収集し、エレクトロポレーションの２４時間後にフローサイトメトリーで分析した。表面抗原は、市販の抗体（例えば、Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、Ｍｉｌｔｅｎｙｉ、及びＢＤ）で染色した。

【１１０９】

図６７Ａ及び図６７Ｂに見られるように、細胞質及び表面タンパク質は、初代ヒトＴ細胞内のタンパク質をコードする環状ＲＮＡから発現することができる。

【１１１０】

実施例７０

固有のＩＲＥＳ配列を含有する環状ＲＮＡは、直鎖状ｍＲＮＡよりも改善された翻訳発現を有する。

環状ＲＮＡ構築物は、ホタルルシフェラーゼ（ＦＬｕｃ）の発現配列とともに、固有のＩＲＥＳが含まれた。

【１１１１】

２人のドナー由来のヒトＴ細胞を濃縮し、抗ＣＤ３／抗ＣＤ２８抗体で刺激した。数日間の増殖後、活性化Ｔ細胞を採取し、等モルのｍＲＮＡまたはＦＬｕｃペイロードを発現する環状ＲＮＡのいずれかでエレクトロポレーションした。ヤギコブウイルス、アポデムスピコルナウイルス、及びパラボウイルスに由来するものを含む様々なＩＲＥＳ配列を研究し、７日間にわたるペイロード発現レベル及び耐久性を評価した。７日間にわたって、Ｔ細胞をＰｒｏｍｅｇａ　Ｂｒｉｇｈｔｇｌｏで溶解して、生物発光について評価した。

【１１１２】

図６８Ｃ、６８Ｄ、６８Ｅ、６８Ｆ、及び６８Ｇに示されるように、環状ＲＮＡ内のＩＲＥＳの存在は、細胞質タンパク質の翻訳及び発現を数桁増加させることができ、直鎖状ｍＲＮＡと比較して発現を改善することができる。これは、複数のヒトＴ細胞ドナーにわたって一致することが見出された。

【１１１３】

実施例７１

実施例７１Ａ：抗ＣＤ１９をコードするＬＮＰ環状ＲＮＡは、Ｋ５６２細胞のヒトＴ細胞死を媒介する。

環状ＲＮＡ構築物は、抗ＣＤ１９抗体をコードする配列が含まれた。次に、環状ＲＮＡ構築物を脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）内に封入した。

【１１１４】

ヒトＴ細胞を抗ＣＤ３／抗ＣＤ２８で刺激し、例えば、最大６日間増殖させた。６日目に、ＬＮＰ環状ＲＮＡ及びＡｐｏＥ３（１μｇ／ｍＬ）をＴ細胞と共培養してトランスフェクションを媒介した。２４時間後、Ｆｌｕｃ＋Ｋ５６２細胞を、抗ＣＤ１９抗体をコードする２００ｎｇの環状ＲＮＡでエレクトロポレーションした後に７日目に共培養した。共培養から４８時間後、アッセイをＦｌｕｃ発現を通じてＫ５６２細胞のＣＡＲ発現及び細胞傷害性殺傷について評価した。

【１１１５】

図６９Ａ及び図６９Ｂに示されているように、Ｔ細胞へのインビトロでのＣＡＲのＬＮＰ媒介送達からの抗ＣＤ１９　ＣＡＲのＴ細胞発現、及び操作Ｋ５６２細胞において特異的な抗原依存的な方法で腫瘍細胞を溶解するその能力が存在する。

【１１１６】

実施例７１Ｂ：抗ＢＣＭＡ抗体をコードするＬＮＰ環状ＲＮＡは、Ｋ５６２細胞のヒトＴ細胞死を媒介する。

環状ＲＮＡ構築物は、抗ＢＣＭＡ抗体をコードする配列が含まれた。次に、環状ＲＮＡ構築物を脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）内に封入した。

【１１１７】

ヒトＴ細胞を抗ＣＤ３／抗ＣＤ２８で刺激し、例えば、最大６日間増殖させた。６日目に、ＬＮＰ環状ＲＮＡ及びＡｐｏＥ３（１μｇ／ｍＬ）をＴ細胞と共培養してトランスフェクションを媒介した。２４時間後、Ｆｌｕｃ＋Ｋ５６２細胞を、抗ＢＣＭＡ抗体をコードする２００ｎｇの環状ＲＮＡでエレクトロポレーションした後に７日目に共培養した。共培養から４８時間後、アッセイをＦｌｕｃ発現を通じてＫ５６２細胞のＣＡＲ発現及び細胞傷害性殺傷について評価した。

【１１１８】

図６９Ｂに示されているように、Ｔ細胞へのインビトロでのＣＡＲのＬＮＰ媒介送達からの抗ＢＣＭＡ　ＣＡＲのＴ細胞発現、及び操作Ｋ５６２細胞において特異的な抗原依存的な方法で腫瘍細胞を溶解するその能力が存在する。

【１１１９】

実施例７２

抗ＣＤ１９　ＣＡＲ　Ｔ細胞は、インビトロで抗腫瘍活性を示す。

ヒトＴ細胞を抗ＣＤ３／抗ＣＤ２８で活性化し、２００ｎｇの抗ＣＤ１９　ＣＡＲ発現環状ＲＮＡで１回エレクトロポレーションした。エレクトロポレーションしたＴ細胞を、Ｆｌｕｃ＋Ｎａｌｍ６標的細胞及び非標的Ｆｌｕｃ＋Ｋ５６２細胞と共培養して、ＣＡＲ媒介死滅を評価した。共培養の２４時間後、Ｔ細胞を溶解し、標的及び非標的細胞による残存Ｆｌｕｃ発現を調査し、合計８日間にわたる発現及び発現の安定性を評価した。

【１１２０】

図７０Ａ及び７０Ｂに示されるように、Ｔ細胞は、抗原依存的に特異的に環状ＲＮＡ　ＣＡＲ構築物を発現する。結果は、ＣＡＲをコードする直鎖状ｍＲＮＡと比較して、ＣＡＲをコードする環状ＲＮＡの細胞傷害性の改善、及び機能的な表面受容体の送達も示す。

【１１２１】

実施例７３

ＡｐｏＥ３を介した環状ＲＮＡの効果的なＬＮＰトランスフェクション

ヒトＴ細胞を抗ＣＤ３／抗ＣＤ２８で刺激し、例えば、最大６日間増殖させた。６日目に、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）、及びＡｐｏＥ３（１μｇ／ｍＬ）を含むまたは含まずに緑色蛍光タンパク質溶液を発現する環状ＲＮＡをＴ細胞と共培養した。２４時間後、Ｔ細胞を生／死Ｔ細胞について染色し、生Ｔ細胞をフローサイトメーターでＧＦＰ発現について分析した。

【１１２２】

図７１Ａ、７１Ｂ、７１Ｃ、７２Ｄ、及び７１Ｅに示されるように、効率的なＬＮＰトランスフェクションは、活性化されたＴ細胞上でＡｐｏＥ３によって媒介され、その後に有意なペイロード発現が続き得る。これらの結果は、複数のドナーにわたって示された。

【１１２３】

実施例７４

実施例７４Ａ：脂質ナノ粒子製剤化手順

Ｚｅｔａｓｉｚｅｒ Ｎａｎｏ ＺＳ（Ｍａｌｖｅｒｎ Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ Ｌｔｄ，Ｍａｌｖｅｒｎ，Ｗｏｒｃｅｓｔｅｒｓｈｉｒｅ，ＵＫ）を使用して、輸送ビヒクル組成物の粒径、多分散性指数（ＰＤＩ）及びゼータ電位を、粒径の決定においては１×ＰＢＳ、及びゼータ電位の決定においては１５ｍＭのＰＢＳで決定することができる。

【１１２４】

紫外可視分光法を使用して、輸送ビヒクル組成物中の治療剤及び／または予防剤（例えば、ＲＮＡ）の濃度を決定することができる。１×ＰＢＳに希釈した１００μＬの製剤を４：１（ｖ／ｖ）のメタノール及びクロロホルムの混合物９００μＬに加える。混合後、溶液の吸光度スペクトルを、例えば、ＤＵ ８００分光光度計（Ｂｅｃｋｍａｎ Ｃｏｕｌｔｅｒ，Ｂｅｃｋｍａｎ Ｃｏｕｌｔｅｒ，Ｉｎｃ．，Ｂｒｅａ，ＣＡ）で、２３０ｎｍ～３３０ｎｍで記録する。輸送ビヒクル組成物中の治療剤及び／または予防剤の濃度は、その組成物中に使用されている治療剤及び／または予防剤の吸光係数ならびに、波長、例えば、２６０ｎｍでの吸光度及び、波長、例えば、３３０ｎｍでのベースライン値間の差に基づいて計算することができる。

【１１２５】

ＲＮＡを含む輸送ビヒクル組成物の場合、ＱＵＡＮＴ－ＩＴ（商標）ＲＩＢＯＧＲＥＥＮ（登録商標）ＲＮＡアッセイ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）を使用して、輸送ビヒクル組成物によるＲＮＡの封入を評価することができる。試料を、ＴＥ緩衝液（１０ｍＭトリス－ＨＣｌ、１ｍＭ ＥＤＴＡ、ｐＨ７．５）中およそ約５μｇ／ｍＬまたは１μｇ／ｍＬの濃度まで希釈する。５０μＬの希釈試料を、ポリスチレン９６ウェルプレートに移し、５０μＬのＴＥ緩衝液または５０μＬの２～４％Ｔｒｉｔｏｎ（登録商標） Ｘ－１００溶液のいずれかをウェルに加える。プレートを、３７℃の温度にて１５分間インキュベートした。ＲＩＢＯＧＲＥＥＮ（登録商標）試薬を、１：１００または１：２００でＴＥ緩衝液に希釈し、１００μＬのこの溶液を各ウェルに加える。蛍光強度は、蛍光プレートリーダー（Ｗａｌｌａｃ Ｖｉｃｔｏｒ １４２０ Ｍｕｌｔｉｌａｂｌｅｌ Ｃｏｕｎｔｅｒ；Ｐｅｒｋｉｎ Ｅｌｍｅｒ，Ｗａｌｔｈａｍ，ＭＡ）を使用して、励起波長、例えば、約４８０ｎｍ及び発光波長、例えば、約５２０ｎｍにて測定することができる。試薬ブランクの蛍光値を試料の各値から引き、遊離ＲＮＡのパーセンテージを、インタクトな試料（Ｔｒｉｔｏｎ（登録商標） Ｘ－１００を添加しない）の蛍光強度を破壊試料（Ｔｒｉｔｏｎ（登録商標） Ｘ－１００の添加によって生じる）の蛍光値で除することで決定した。

【１１２６】

実施例７４Ｂ：６２：４：３３：１のイオン化可能脂質：ＤＯＰＥ：コレステロール：ＤＳＰＥ－ＰＥＧ（２０００）の製剤比についてのＲＮＡ封入、総フラックス、及びインビトロでの発現割合。

脂質ナノ粒子を、６２：４：３３：１ｍｏｌ％のイオン化可能脂質：ＤＯＰＥ：コレス

テロール：ＤＳＰＥ－ＰＥＧ（２０００）の製剤比で脂質１０ａ－２７、１０ａ－２６、１０ａ－４６、または１０ａ－４５を使用して製剤化し、ＲＮＡ分子を４．５の脂質－窒素－対－リン酸比（Ｎ：Ｐ）で封入した。ＲＮＡの発現は、全ての製剤に存在した。図７２Ａ及び７２Ｂにそれぞれ示されるように、脾臓内でより大きな総フラックス及び発現割合が存在した。

【表３４】

| 製剤 | イオン化可能脂質 | ヘルパー脂質 | PEG-脂質 | イオン化可能脂質:ヘルパー脂質:コレステロール:PEG-脂質 (mol%) | Z 平均 (nm) | PDI | RNA 封入化効率(%) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 10a-27 (4.5D) | 脂質 10a-27 | DOPE | DSPE-PEG(2000) | 62:4:33:1 | 71 | 0.02 | 94 |
| 10a-26 (4.5D) | 脂質 10a-26 | DOPE | DSPE-PEG(2000) | 62:4:33:1 | 71 | 0.04 | 92 |
| 10a-46 (4.5D) | 脂質 10a-26 | DOPE | DSPE-PEG(2000) | 62:4:33:1 | 110 | 0.1 | 93 |
| 10a-45 (4.5D) | 脂質 10a-25 | DOPE | DSPE-PEG(2000) | 62:4:33:1 | 157 | 0.13 | 83 |

【１１２７】

実施例７４Ｃ：５０：１０：３８．５：１．５のイオン化可能脂質：ＤＯＰＥ：コレステロール：ＤＳＰＥ－ＰＥＧ（２０００）の製剤比についてのＲＮＡ封入、総フラックス、及びインビトロでの発現割合。

脂質ナノ粒子を、５０：１０：３８．５：１．５ｍｏｌ％のイオン化可能脂質：ＤＯＰＥ：コレステロール：ＤＳＰＥ－ＰＥＧ（２０００）の製剤比で脂質１０ａ－４６または１０ａ－４５を使用して製剤化し、ＲＮＡ分子を５．７の脂質－窒素－対－リン酸比（Ｎ：Ｐ）で封入した。ＲＮＡの発現は、全ての製剤に存在した。図７２Ｃ及び７２Ｄにそれぞれ示されるように、脾臓内でより大きな総フラックス及び発現割合が存在した。

【表３５】

| 製剤 | イオン化可能脂質 | ヘルパー脂質 | PEG-脂質 | イオン化可能脂質:DOPE:コレステロール:PEG-脂質 (mol%) | Z 平均 (nm) | PDI | RNA 封入化効率(%) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 10a-45 (5.7A) | 脂質 10a-45 | DOPE | DMG-PEG(2000) | 50:10:38.5:1.5 | 74 | 0.04 | 95 |
| 10a-46 (5.7A) | 脂質 10a-46 | DOPE | DMG-PEG(2000) | 50:10:38.5:1.5 | 84 | 0.04 | 96 |

【１１２８】

実施例７４Ｄ：５０：１０：３８．５：１．５のイオン化可能脂質：ＤＯＰＥ：コレステロール：ＤＭＧ－ＰＥＧ（２０００）の製剤比について、または３５：１６：４６．２．５のイオン化可能脂質：ＤＳＰＣ：コレステロール：$C_{14}$－ＰＥＧ（２０００）の製

剤比についてのＲＮＡ封入、総フラックス、及びインビトロでの発現割合。
脂質ナノ粒子を、５０：１０：３８．５：１．５ｍｏｌ％のイオン化可能脂質：ＤＯＰＥ：コレステロール：ＤＭＧ－ＰＥＧ（２０００）の製剤比で、もしくは３５：１６：４６．２．５ｍｏｌ％のイオン化可能脂質：ＤＳＰＣ：コレステロール：Ｃ１４－ＰＥＧ（２０００）の製剤比で脂質１０ａ－４５または１０ａ－４６を使用して製剤化し、ＲＮＡ分子を５．７または４．５の脂質－窒素－対－リン酸比（Ｎ：Ｐ）で封入した。ＲＮＡの発現は、全ての製剤に存在した。図７２Ｅ及び７２Ｆにそれぞれ示されるように、脾臓内でより大きな総フラックス及び発現割合が存在した。
【表３６】

| 製剤 | イオン化可能脂質 | ヘルパー脂質 | PEG-脂質 | イオン化可能脂質: ヘルパー脂質: コレステロール: PEG-脂質 (mol%) | Z 平均 (nm) | PDI | RNA 封入化効率(%) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 10a-45 DSPC (5.7E) | 脂質 10a-45 | DSPC | $C_{14}$-PEG(2000) | 35:16:46.2.5 | 56 | 0.22 | 94 |
| 10a-46 DSPC (5.7E) | 脂質 10a-46 | DSPC | $C_{14}$-PEG(2000) | 35:16:46.2.5 | 68 | 0.02 | 95 |
| 10a-46 (4.5A) | 脂質 10a-46 | DOPE | DMG-PEG(2000) | 50:10:38.5:1.5 | 91 | 0.13 | 93 |
| 10a-46 (5.7A) | 脂質 10a-46 | DOPE | DMG-PEG(2000) | 50:10:38.5:1.5 | 76 | 0.06 | 93 |

【１１２９】
実施例７４Ｅ：６２：４：３３：１のイオン化可能脂質：ＤＯＰＥ：コレステロール：ＤＳＰＥ－ＰＥＧ（２０００）の製剤比について、または５０：１０：３８．５：１．５のイオン化可能脂質：ＤＳＰＣ：コレステロール：ＤＭＧ－ＰＥＧ（２０００）の製剤比についてのＲＮＡ封入、総フラックス、及びインビトロでの発現割合。
脂質ナノ粒子を、６２：４：３３：１ｍｏｌ％のイオン化可能脂質：ＤＯＰＥ：コレステロール：ＤＳＰＥ－ＰＥＧ（２０００）の製剤比で（ＲＮＡ分子を４．５のＮ：Ｐ比で封入する）、もしくは５０：１０：３８．５：１．５ｍｏｌ％のイオン化可能脂質：ＤＯＰＥ：コレステロール：ＤＭＧ－ＰＥＧ（２０００）の製剤比で（ＲＮＡ分子を５．７のＮ：Ｐ比で封入する）脂質１０ａ－２６または１０ａ－２７を使用して製剤化した。ＲＮＡの発現は、全ての製剤に存在した。図７２Ｇ及び７２Ｈにそれぞれ示されるように、脾臓内でより大きな総フラックス及び発現割合が存在した。

【表３７】

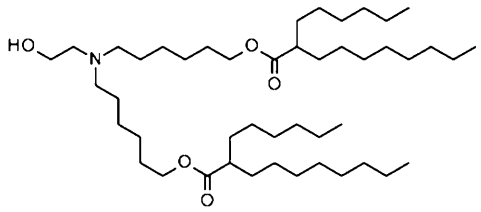
| 製剤 | イオン化可能脂質 | ヘルパー脂質 | PEG-脂質 | イオン化可能脂質:ヘルパー脂質:コレステロール:PEG-脂質 (mol%) | Z平均 (nm) | PDI | 封入効率(EE) (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 10a-27(4.5D) | 脂質10a-27 | DOPE | DSPE-PEG(2000) | 62:4:33:1 | 82 | 0.06 | 94 |
| 10a-26 (4.5D) | 脂質10a-26 | DOPE | DSPE-PEG(2000) | 62:4:33:1 | 68 | 0.08 | 91 |
| 10a-27 DSPC (5.7A) | 脂質10a-27 | DSPC | DMG-PEG(2000) | 50:10:38.5:1.5 | 79 | 0.06 | 96 |
| 10a-26 DSPC (5.7A) | 脂質10a-26 | DSPC | DMG-PEG(2000) | 50:10:38.5:1.5 | 79 | 0.05 | 93 |

【１１３０】

実施例７４Ｆ：５０：１０：３８．５：１．５のイオン化可能脂質：ＤＯＰＥ：コレステロール：ＤＭＧ－ＰＥＧ（２０００）の製剤比についてのＲＮＡ封入、総フラックス、及びインビトロでの発現割合。

脂質ナノ粒子を、５０：１０：３８．５：１．５ｍｏｌ％のイオン化可能脂質：ＤＳＰＣ：コレステロール：ＤＭＧ－ＰＥＧ（２０００）の製剤比で脂質１０ａ－２６、１０ａ－２７、または１０ａ－１３０、及び／または脂質３－ＩＩＩ－１

【化１６３】



（ によって表される）

を使用して製剤化し、ＲＮＡ分子を５．７のＮ：Ｐ比で封入した。ＲＮＡの発現は、全ての製剤に存在した。図７２Ｉ及び７２Ｊにそれぞれ示されるように、肝臓内でより大きな総フラックス及び発現割合が存在した。

【１１３１】

ＴＮＳ及び粒子のｐＫａも計算した。５μＬの６０μｇ／ｍＬの２－（ｐ－トルイジノ）ナフタレン－６－スルホン酸（ＴＮＳ）及び５μＬの３０μｇのＲＮＡ／ｍＬ脂質ナノ粒子を、ｐＨ２～１２の範囲のＨＥＰＥＳ緩衝液を含むウェルに添加した。次いで、混合物を室温で５分間振盪し、プレートリーダーを使用して蛍光（励起３２２ｎｍ、発光４３１ｎｍ）を読み取った。蛍光シグナルの屈曲点を計算して、粒子のｐＫａを決定した。

【表３８】

| 製剤 | イオン化可能脂質 | ヘルパー脂質 | PEG-脂質 | イオン化可能脂質:ヘルパー脂質:コレステロール:PEG-脂質(mol%) | Z平均 | PDI | EE(%) | 濃度(μg/mL) | pKa |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 10a-27/III-1(5.7A) | 脂質 10a-27/脂質 3-III-1 3:1 の比 | DOPE | DMG-PEG(2000) | 50:10:38.5:1.5 | 74 | 0 | 96 | 55.8 | 7.4 |
| 10a-27III-1(5.7A) | 脂質 10a-27/脂質 3-III-1 1:3 の比 | DOPE | DMG-PEG(2000) | 50:10:38.5:1.5 | 85 | 0.1 | 93 | 51.9 | 6.3 |
| 10a-26/III-1(5.7A) | 脂質 10a-26/脂質 3-III-1 3:1 の比 | DOPE | DMG-PEG(2000) | 50:10:38.5:1.5 | 87 | 0.1 | 94 | 51.7 | 6.8 |
| 10a-26/III-1(5.7A) | 脂質 10a-26/脂質 3-III-1 1:3 の比 | DOPE | DMG-PEG(2000) | 50:10:38.5:1.5 | 97 | 0.1 | 90 | 53.1 | 6.2 |
| 10a-130(5.7A) | 脂質 10a-130 | DOPE | DMG-PEG(2000) | 50:10:38.5:1.5 | 60 | 0.1 | 89 | 53.8 | 6.7 |

【１１３２】

実施例７４Ｇ：６２：４：３３：１のイオン化可能脂質：ＤＯＰＥ：コレステロール：ＤＳＰＥ－ＰＥＧ（２０００）の製剤比について、または５０：１０：３８．５：１．５のイオン化可能脂質：ＤＳＰＣ：コレステロール：ＤＭＧ－ＰＥＧ（２０００）の製剤比についてのＲＮＡ封入、総フラックス、及びインビトロでの発現割合。

脂質ナノ粒子を、６２：４：３３：１ｍｏｌ％のイオン化可能脂質：ＤＯＰＥ：コレステロール：ＤＳＰＥ－ＰＥＧ（２０００）の製剤比で（ＲＮＡ分子を４．５のＮ：Ｐ比で封入する）、もしくは５０：１０：３８．５：１．５ｍｏｌ％のイオン化可能脂質：ＤＯＰＥ：コレステロール：ＤＭＧ－ＰＥＧ（２０００）の製剤比で（ＲＮＡ分子を５．７のＮ：Ｐ比で封入する）脂質１０ａ－１３９を使用して製剤化した。ＲＮＡの発現は、全ての製剤に存在した。図７２Ｋ及び７２Ｌにそれぞれ示されるように、肝臓内でより大きな総フラックス及び発現割合が存在した。

【表３９】

| 製剤 | イオン化可能脂質 | ヘルパー脂質 | PEG-脂質 | イオン化可能脂質:ヘルパー脂質:コレステロール:PEG-脂質(mol%) | Z平均(nm) | PDI | EE(%) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 10a-139(4.5D) | 脂質 10a-139 | DOPE | DSPE-PEG(2000) | 62:4:33:1 | 93 | 0.01 | 79 |
| 10a-139(5.7A) | 脂質 10a-139 | DSPC | DMG-PEG(2000) | 50:10:38.5:1.5 | 122 | 0.02 | 95 |

【１１３３】

実施例７５

この実施例は、インビトロでのＳＡＲＳ－ＣｏＶ２スパイクタンパク質発現を示す。ＳＡＲＳ－ＣｏＶ２安定化スパイクタンパク質をコードする環状ＲＮＡを、ＭｅｓｓｅｎｇｅｒＭａｘトランスフェクション試薬を使用して２９３細胞にトランスフェクトした。トランスフェクションから２４時間後、２９３細胞を、ＣＲ３０２２抗スパイク一次抗体及びＡＰＣ標識二次抗体で染色した。

【１１３４】

図７３Ａは、インビトロ転写反応から生じる約４．５ｋｂのＳＡＲＳ－Ｃｏｖ２安定化スパイクタンパク質コードＲＮＡの環状化効率を示す。図７３Ｂ及び図７３Ｃは、Ｍｏｃｋトランスフェクト細胞と比較した、ＭｅｓｓｅｎｇｅｒＭａｘトランスフェクション試薬による環状ＲＮＡトランスフェクション後の２９３細胞上のＳＡＲＳ－ＣｏＶ２安定化スパイクタンパク質発現を示す。

【１１３５】

図７７Ａ及び図７７Ｂは、ＭｅｓｓｅｎｇｅｒＭａｘトランスフェクション試薬を使用して、可変ＩＲＥＳ配列、コドン最適化コード領域、安定化ＳＡＲＳ－ＣｏＶ２スパイクタンパク質を含む環状ＲＮＡのパネルをトランスフェクションした後の、２９３細胞上の細胞及びｇＭＦＩの割合によるＳＡＲＳ－ＣｏＶ２安定化スパイクタンパク質発現を示す。図７７Ｃは、ＭＦＩと割合との間の関係を示す。

【１１３６】

実施例７６

この実施例は、脂質ナノ粒子製剤中に封入された０．２ｍｇ／ｋｇのｃｉｒｃＲＮＡ調製物のＩＶ注射後のインビボサイトカイン応答を示す。ＲＮＡ前駆体イニシエータとしてＧＴＰ及びスプライシングヌクレオチドを用いて合成されたｃｉｒｃＲＮＡスプライシング反応物は、スプライシング反応における三リン酸化５’末端の存在により、精製したｃｉｒｃＲＮＡ及び直鎖状ｍ１ψ－ｍＲＮＡよりも大きなサイトカイン応答を誘発した。ＩＬ－１β、ＩＬ－６、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２ｐ７０、ＲＡＮＴＥＳ、ＴＮＦαのレベルを、ＬＮＰ製剤化ｃｉｒｃＲＮＡ調製物の静脈内注射の６時間後に採取した血液から測定した。ＰＢＳを注射したマウスを対照として使用した。

【１１３７】

図７４に見られるように、ＲＮＡ前駆体イニシエータとしてＧＴＰ及びスプライシングヌクレオチドを用いて合成されたｃｉｒｃＲＮＡスプライシング反応物は、スプライシング反応における三リン酸化５’末端の存在により、精製したｃｉｒｃＲＮＡ及び直鎖状ｍ１ψ－ｍＲＮＡよりも大きなサイトカイン応答を誘発する。

【１１３８】

実施例７７

この実施例は、環状ＲＮＡを含む様々な用量の脂質ナノ粒子の筋肉内送達を示す。マウスに、脂質ナノ粒子に製剤化された０．１μｇ、１μｇ、または１０μｇのいずれかのｃｉｒｃＲＮＡを投与した。全身ＩＶＩＳ画像化を、ルシフェリンの注射後６時間で実施した（図７５Ａ及び図７５Ｂ）。エクスビボＩＶＩＳ画像化を２４時間で実施した。肝臓、大腿四頭筋、及び腓腹のフラックス値を図７５Ｃに示す。図７６Ｂ及び図７６Ｃは、環状ＲＮＡの発現がマウスの筋肉組織に存在することを示す。

【１１３９】

実施例７８

この実施例は、ＬＮＰ製剤における複数の環状ＲＮＡの発現を示す。ｈＥＰＯまたはｆＬｕｃのいずれかをコードする環状ＲＮＡ構築物を、ＬＮＰの単一及び混合セットで投与した。血清中のｈＥＰＯ濃度（図７６Ａ）及びＩＶＩＳ画像化による総フラックス（図７６Ｂ）を決定した。結果は、環状ＲＮＡ　ｈＥＰＯまたはｆＬｕｃが、個々に製剤化または共製剤化された発現タンパク質を効率的に構築することを示している。

【１１４０】

実施例７９

実施例７９Ａ：肝細胞のプレーティング及び培養

初代ヒト肝細胞（ＰＨＨ）、初代マウス肝細胞（ＰＭＨ）、初代カニクイザル肝細胞（ＰＣＨ）を解凍し、肝細胞解凍培地（Ｘｅｎｏｔｅｃｈ、カタログ番号Ｋ８６００／Ｋ８６５０）に再懸濁し、続いて遠心分離した。上清を廃棄し、ペレット化した細胞を肝細胞プレーティング培地（Ｘｅｎｏｔｅｃｈ、カタログ番号Ｋ８２００）に再懸濁した。細胞を血球計算盤により計数し、１００μＬのプレーティング培地中、ＰＨＨについては２５，０００細胞／ウェル、ＰＭＨについては２５，０００細胞／ウェル、及びＰＣＨについては５０，０００細胞／ウェルの密度で、Ｂｉｏ－コートコラーゲン－Ｉでコーティングされた９６ウェルプレートにプレーティングした。プレーティングした細胞を、３７℃及び５％$CO_2$雰囲気の組織培養インキュベーター内で６時間静置及び接着させた。インキュベーション後、細胞を単層形成について確認し、その後、プレーティング培地を吸引し、１００ｕｌの培地（Ｘｅｎｏｔｅｃｈ、カタログ番号Ｋ８３００）と交換した。培地は、実験期間中２４時間毎に交換した。

【１１４１】

実施例７９Ｂ：初代ヒト、マウス、及びカニクイザル肝細胞におけるホタルルシフェラーゼをコードするＬＮＰ製剤化環状ＲＮＡのインビトロスクリーニング

ＴＩＥ及びホタルルシフェラーゼをコードするコード要素を含む環状ＲＮＡ構築物を産生し、ＬＮＰにトランスフェクションした。環状化ＲＮＡ（ｏＲＮＡ）を用いて製剤化した様々な濃度のＬＮＰを、３％ウシ胎児血清（ＦＢＳ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ、カタログ番号Ａ３１６０４０１）を補充した肝細胞培地で希釈した。１００μＬのＬＮＰ／ＦＢＳ／培地混合物を細胞に添加する前に、培地を細胞から吸引した。

【１１４２】

ルシフェラーゼ活性は、初代ヒト（図９０Ａ）、マウス（図９０Ｂ）、及びカニクイザル（図９０Ｃ）肝細胞において検出された。トランスフェクションの２４時間後、プレートをインキュベーターから取り出し、１５分間室温に平衡化させた。１００μＬの体積のホタルルシフェラーゼワンステップグローアッセイ作業溶液（Ｐｉｅｒｃｅ、カタログ番号１６１９６）を各ウェルに添加した。プレートをマイクロプレートシェーカー（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ、カタログ番号Ｓ７２０５０）上に置き、３００ｒｐｍで３分間混合した。混合後、プレートを室温で１０分間インキュベートした。発光をＶａｒｉｏｓｋａｎまたはＢｉｏ－Ｔｅｋ　Ｃｙｔａｔｉｏｎ５機器を使用して読み取った。

【１１４３】

図９０Ａ、図９０Ｂ、及び図９０Ｃに見られるように、環状ＲＮＡを含むＴＩＥは、インビトロでＬＮＰをトランスフェクトすると、用量依存的に複数種の初代肝細胞においてホタルルシフェラーゼタンパク質発現を駆動することができる。

【１１４４】

実施例７９Ｃ：複数の初代ヒト肝細胞ドナーにおけるホタルルシフェラーゼをコードするＬＮＰ製剤化環状ＲＮＡのインビトロスクリーニング

ＴＩＥ及びホタルルシフェラーゼをコードするコード要素を含む環状ＲＮＡ構築物を産生し、ＬＮＰにトランスフェクションした。環状化ＲＮＡ（ｏＲＮＡ）を用いて製剤化した様々な濃度のＬＮＰを、３％ウシ胎児血清（ＦＢＳ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ、カタログ番号Ａ３１６０４０１）を補充した肝細胞培地で希釈した。１００ｕｌのＬＮＰ／ＦＢＳ／培地混合物を細胞に添加する前に、培地を細胞から吸引した。

【１１４５】

ルシフェラーゼ活性は、初代ヒト（図９１Ａ）、マウス（図９１Ｂ）、及びカニクイザル（図９１Ｃ）肝細胞において検出された。トランスフェクションの２４時間後、プレートをインキュベーターから取り出し、１５分間室温に平衡化させた。１００μＬの体積のホタルルシフェラーゼワンステップグローアッセイ作業溶液（Ｐｉｅｒｃｅ、カタログ番号１６１９６）を各ウェルに添加した。プレートをマイクロプレートシェーカー（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ、カタログ番号Ｓ７２０５０）上に置き、３００ｒｐｍで３分間混合した。混合後、プレートを室温で１０分間インキュベートした。発光をＶａｒｉｏｓｋａｎまたはＢｉｏ－Ｔｅｋ　Ｃｙｔａｔｉｏｎ５機器を使用して読み取った。

【１１４６】
図９１Ａ、図９１Ｂ、及び図９１Ｃに見られるように、環状ＲＮＡを含むＴＩＥは、インビトロでＬＮＰをトランスフェクトすると、用量依存的に複数のヒトドナーからの初代肝細胞においてホタルルシフェラーゼタンパク質発現を駆動することができる。
【１１４７】
実施例８０
複数のヒト細胞モデルにおけるＧＦＰをコードする環状ＲＮＡで製剤化したＬＮＰのインビトロ発現。
ＴＩＥ及びＧＦＰタンパク質をコードするコード要素を含む環状ＲＮＡ構築物を作製した。ＬＮＰは、環状ＲＮＡ構築物を用いて製剤化した。次いで、環状ＲＮＡ構築物を含む様々な濃度のＬＮＰを、３％ウシ胎児（ＦＢＳ）を補充した肝細胞培地（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ、カタログ番号Ａ３１６０４０１）で希釈した。１００ｕｌのＬＮＰ／ＦＢＳ／培地混合物を細胞に添加する前に、培地を細胞から吸引した。
【１１４８】
ＨｅＬａ（ヒト子宮頸腺癌；ＡＴＣＣ、カタログ番号ＣＣＬ－２）、ＨＥＫ２９３（ヒト胚性腎臓；ＡＴＣＣ、カタログ番号ＣＲＬ－１５７３）、及びＨＵＨ７（ヒト肝臓肝細胞癌；ＪＣＲＢ、カタログ番号ＪＣＲＢ０４０３）に、ＬＮＰ製剤化ｏＲＮＡを前述したようにトランスフェクトした。トランスフェクションの２４時間後、培地を除去し、細胞をトリプシン処理した。トリプシン処理した細胞を、１０％ＦＢＳを補充したＰＢＳで中和し、回収して、チューブに移した。チューブを遠心分離して細胞をペレット化し、上清を吸引した。ペレットは溶解するまで－８０℃で保存した。細胞を溶解するために氷上で解凍し、１ｍＭ　ＤＴＴ、及び２５０Ｕ／ｍＬベンゾナーゼ（ＥＭＤ　Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ、カタログ番号７１２０６－３）を新たに加えた１００μＬ／ウェルのＲＩＰＡ緩衝液（Ｂｏｓｔｏｎ　Ｂｉｏ　Ｐｒｏｄｕｃｔｓ、カタログＢＰ－１１５）、ならびに完全なプロテアーゼ阻害剤カクテル（Ｓｉｇｍａ、カタログ番号１１６９７４９８００１）からなるプロテアーゼ阻害剤混合物を用いて溶解した。細胞を氷上に３０分間保持し、その時点でＮａＣｌ（最終濃度１Ｍ）を添加した。細胞溶解物を完全に混合し、氷上で３０分間保持した。全細胞抽出物（ＷＣＥ）を遠心分離して、破片をペレット化した。Ｂｒａｄｆｏｒｄアッセイ（Ｂｉｏ－Ｒａｄ、カタログ番号５００－０００１）を使用して、溶解物のタンパク質含有量を評価した。Ｂｒａｄｆｏｒｄアッセイ手順は、製造元のプロトコルに従って完了した。抽出物は使用するまで－２０℃で保存した。ウエスタンブロットを実施して、ＧＦＰタンパク質レベルを評価した。全細胞抽出物溶解物をＬａｅｍｍｌｉ緩衝液と混合し、９５℃で１０分間変性させた。ウエスタンブロットを、製造元のプロトコルに従って、４～１２％Ｂｉｓ－Ｔｒｉｓゲル（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ、カタログ番号ＮＰ０３３５ＢＯＸ）でＮｕＰａｇｅシステムを使用して実行し、続いて、０．４５μｍニトロセルロース膜（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ、カタログ番号ＬＣ２００１）に湿式転写した。転写後、膜を水で十分にすすぎ、Ｐｏｎｃｅａｕ　Ｓ溶液（Ｂｏｓｔｏｎ　Ｂｉｏ　Ｐｒｏｄｕｃｔｓ、カタログ番号ＳＴ－１８０）で染色して、完全かつ均一な転写を確認した。ブロットを、ＴＢＳ中の５％ドライミルクを使用して、室温でラボのロッカー上で３０分間ブロックした。ブロットを１ＸＴＢＳＴ（Ｂｏｓｔｏｎ　ＢｉｏＰｒｏｄｕｃｔｓ、カタログ番号ＩＢＢ－１８０）ですすぎ、マウスｄｙｌｉｇｈｔ　６８０タグ付き抗ＧＦＰモノクローナル抗体（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ、カタログ番号ＭＡ５１５２５６Ｄ６８０）を使用して、１ＸＴＢＳＴ中で、１：１，０００でプローブした。抗β－アクチンまたはＧＡＰＤＨを、１×ＴＢＳＴ中で、１：４，０００でローディング対照（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ、カタログ番号ＡＭ４３０２／ＡＭ４３００）として使用し、ＧＦＰ一次抗体と同時にインキュベートした。ブロットをバッグに密封し、ラボのロッカー上で、４℃で一晩保管した。インキュベーション後、ブロットを１×ＴＢＳＴで各々５分間３回すすぎ、室温で３０分間、１×ＴＢＳＴで、各々１：２５，０００でマウス二次抗体（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ、カタログ番号ＰＩ３５５１９）でプローブした。インキュベーション後、ブロットを１×ＴＢＳＴで各々５分間３回すすいだ。ブロットをＬｉ

ｃｏｒ　Ｏｄｙｓｓｅｙシステムを使用して可視化及び分析した。
【１１４９】
図９２に示すように、ＴＩＥ含有環状ＲＮＡは、ＬＮＰをインビトロでトランスフェクトした場合、多様なヒト細胞株（例えば、ＨｅＬａ、ＨＥＫ２９３、及びＨＵＨ７細胞）において用量依存的にＧＦＰタンパク質を発現することができる。
【１１５０】
実施例８１
初代ヒト肝細胞におけるＧＦＰをコードする環状ＲＮＡで製剤化したＬＮＰのインビトロ発現。
ＴＩＥ及びＧＦＰタンパク質をコードするコード要素を含む環状ＲＮＡ構築物を作製した。環状化ＲＮＡ（ｏＲＮＡ）を含む様々な濃度のＬＮＰを、３％ウシ胎児血清（ＦＢＳ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ、カタログ番号Ａ３１６０４０１）を補充した肝細胞培地で希釈した。１００μＬのＬＮＰ／ＦＢＳ／培地混合物を細胞に添加する前に、培地を細胞から吸引した。
【１１５１】
初代ヒト肝細胞（ＰＨＨ）を解凍し、肝細胞解凍培地（Ｘｅｎｏｔｅｃｈ、カタログ番号Ｋ８６００／Ｋ８６５０）に再懸濁し、続いて遠心分離した。上清を廃棄し、ペレット化した細胞を肝細胞プレーティング培地（Ｘｅｎｏｔｅｃｈ、カタログ番号Ｋ８２００）に再懸濁した。細胞を血球計算盤により計数し、１００ｕｌのプレーティング培地中、ＰＨＨについては２５，０００細胞／ウェル、ＰＭＨについては２５，０００細胞／ウェル、及びＰＣＨについては５０，０００細胞／ウェルの密度で、Ｂｉｏ－コートコラーゲン－Ｉでコーティングされた９６ウェルプレートにプレーティングした。プレーティングした細胞を、３７℃及び５％$CO_2$雰囲気の組織培養インキュベーター内で６時間静置及び接着させた。インキュベーション後、細胞を単層形成について確認し、その後、プレーティング培地を吸引し、１００ｕｌの培地（Ｘｅｎｏｔｅｃｈ、カタログ番号Ｋ８３００）と交換した。培地は、実験期間中２４時間毎に交換した。
【１１５２】
初代ヒト肝細胞を、ＬＮＰ製剤化ｏＲＮＡで前述したようにトランスフェクトした。トランスフェクションの２４時間後、培地を除去し、細胞をトリプシン処理した。トリプシン処理した細胞を、１０％ＦＢＳを補充したＰＢＳで中和し、回収して、チューブに移した。チューブを遠心分離して細胞をペレット化し、上清を吸引した。ペレットは溶解するまで－８０℃で保存した。細胞を溶解するために氷上で解凍し、１ｍＭ　ＤＴＴ、及び２５０Ｕ／ｍｌベンゾナーゼ（ＥＭＤ　Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ、カタログ番号７１２０６－３）を新たに加えた１００μＬ／ウェルのＲＩＰＡ緩衝液（Ｂｏｓｔｏｎ　Ｂｉｏ　Ｐｒｏｄｕｃｔｓ、カタログＢＰ－１１５）、ならびに完全なプロテアーゼ阻害剤カクテル（Ｓｉｇｍａ、カタログ番号１１６９７４９８００１）からなるプロテアーゼ阻害剤混合物を用いて溶解した。細胞を氷上に３０分間保持し、その時点でＮａＣｌ（最終濃度１Ｍ）を添加した。細胞溶解物を完全に混合し、氷上で３０分間保持した。全細胞抽出物（ＷＣＥ）を遠心分離して、破片をペレット化した。Ｂｒａｄｆｏｒｄアッセイ（Ｂｉｏ－Ｒａｄ、カタログ番号５００－０００１）を使用して、溶解物のタンパク質含有量を評価した。Ｂｒａｄｆｏｒｄアッセイ手順は、製造元のプロトコルに従って完了した。抽出物は使用するまで－２０℃で保存した。ウエスタンブロットを実施して、ＧＦＰタンパク質レベルを評価した。全細胞抽出物溶解物をＬａｅｍｍｌｉ緩衝液と混合し、９５℃で１０分間変性させた。ウエスタンブロットを、製造元のプロトコルに従って、４～１２％Ｂｉｓ－Ｔｒｉｓゲル（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ、カタログ番号ＮＰ０３３５ＢＯＸ）でＮｕＰａｇｅシステムを使用して実行し、続いて、０．４５μｍニトロセルロース膜（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ、カタログ番号ＬＣ２００１）に湿式転写した。転写後、膜を水で十分にすすぎ、Ｐｏｎｃｅａｕ　Ｓ溶液（Ｂｏｓｔｏｎ　Ｂｉｏ　Ｐｒｏｄｕｃｔｓ、カタログ番号ＳＴ－１８０）で染色して、完全かつ均一な転写を確認した。ブロットを、ＴＢＳ中の５％ドライミルクを使用して、室温でラボのロッカー上で３０分間ブロックした。ブロ

ットを１ＸＴＢＳＴ（Ｂｏｓｔｏｎ　ＢｉｏＰｒｏｄｕｃｔｓ、カタログ番号ＩＢＢ－１８０）ですすぎ、マウスｄｙｌｉｇｈｔ　６８０タグ付き抗ＧＦＰモノクローナル抗体（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ、カタログ番号ＭＡ５１５２５６Ｄ６８０）を使用して、１ＸＴＢＳＴ中で、１：１，０００でプローブした。抗β－アクチンまたはＧＡＰＤＨを、１×ＴＢＳＴ中で、１：４，０００でローディング対照（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ、カタログ番号ＡＭ４３０２／ＡＭ４３００）として使用し、ＧＦＰ一次抗体と同時にインキュベートした。ブロットをバッグに密封し、ラボのロッカー上で、４℃で一晩保管した。インキュベーション後、ブロットを１×ＴＢＳＴで各々５分間３回すすぎ、室温で３０分間、１×ＴＢＳＴで、各々１：２５，０００でマウス二次抗体（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ、カタログ番号ＰＩ３５５１９）でプローブした。インキュベーション後、ブロットを１×ＴＢＳＴで各々５分間３回すすいだ。ブロットをＬｉｃｏｒ　Ｏｄｙｓｓｅｙシステムを使用して可視化及び分析した。

【１１５３】

図９３のウエスタンブロットに示されるように、ＴＩＥを含む環状ＲＮＡは、ＬＮＰをインビボでトランスフェクトした場合、初代ヒト肝細胞においてＧＦＰタンパク質を正常にコードすることができる。

【１１５４】

実施例８２

リポフェクタミンを使用したマウス筋芽細胞及び初代ヒト骨格筋筋芽細胞におけるホタルルシフェラーゼをコードする環状ＲＮＡにおけるホタルルシフェラーゼのインビトロ発現。

環状ＲＮＡ構築物は、ＴＩＥ及びホタルルシフェラーゼタンパク質をコードするコード要素を含む。

【１１５５】

初代ヒト骨格筋（ＨＳｋＭ）細胞（Ｌｏｎｚａ、カタログ番号２０ＴＬ３５６５１４）を３７℃の水浴中で解凍し、ＳｋＧＭ－２　ＢｕｌｌｅｔＫｉｔ増殖培地（Ｌｏｎｚａ、カタログ番号ＣＣ－３２４５）に推奨播種密度（ｃｍ$^{2}$当たり３，０００～５，０００）でプレーティングし、一晩増殖させた。ＲｅａｇｅｎｔＰａｃｋ継代培養試薬（Ｌｏｎｚａ、カタログ番号ＣＣ－５０３４）を使用して細胞を剥離し、組織培養グレード９６ウェルプレートに推奨播種密度でプレーティングし、３７°Ｃ、５％$CO_2$雰囲気の組織培養インキュベーター内で一晩増殖させるか、または２日ごとに増殖培地を交換して７０～８０％コンフルエントになるまで増殖させた。

【１１５６】

１つの９６ウェルプレート反応について、０．３μＬのリポフェクタミン－３０００トランスフェクション試薬（Ｌｉｐｏ３Ｋ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ、カタログ番号Ｌ３０００１５）を、５μ　ＬのＯｐｔｉ－ＭＥＭ還元血清培地（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ、カタログ番号５１９８５０９１）と混合した。別のチューブでは、反応ごとに、ホタルルシフェラーゼ（ｆ．ｌｕｃ）ｏＲＮＡ（１０～２００ｎｇ）を、５μＬのＯｐｔｉ－ＭＥＭ及び０．２μＬのＰ３０００ＴＭエンハンサー試薬（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ、カタログ番号Ｌ３０００１５）と組み合わせた。等量のＬｉｐｏ３Ｋ／Ｏｐｔｉ－ＭＥＭ混合物をｏＲＮＡ／Ｏｐｔｉ－ＭＥＭ混合物と組み合わせ、室温で１５分間インキュベートした。Ｌｉｐｏ３Ｋ／ｏＲＮＡ混合物をトランスフェクトする各ウェルに添加し、３７℃、５％$CO_2$雰囲気の組織培養インキュベーターに２４時間置いた。

【１１５７】

２４時間後、トランスフェクションプレートをインキュベーターから取り出し、１５分間室温に平衡化させた。１００μＬの体積のホタルルシフェラーゼワンステップグローアッセイ作業溶液（Ｐｉｅｒｃｅ、カタログ番号１６１９６）を各ウェルに添加した。プレートをマイクロプレートシェーカー（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ、カタログ番号Ｓ７２０５０）上に置き、３００ｒｐｍで３分間混合した。混合後、プレートを室温で１０分間インキュベートした。発光をＶａｒｉｏｓｋａｎまたはＢｉｏ－Ｔｅｋ　Ｃｙｔａｔｉｏ

ｎ５機器を使用して読み取った。
【１１５８】
図９４Ａ及び図９４Ｂに示されるように、ＴＩＥを含む環状ＲＮＡは、リポフェクタミンをインビトロでトランスフェクトすると、用量依存的に異なる種の筋芽細胞においてホタルルシフェラーゼタンパク質発現を駆動することができる。
【１１５９】
実施例８３
分化した初代ヒト骨格筋筋肉におけるホタルルシフェラーゼをコードする環状ＲＮＡにおけるホタルルシフェラーゼのインビトロ発現
環状ＲＮＡ構築物は、ＴＩＥ及びホタルルシフェラーゼタンパク質をコードするコード要素を含む。
【１１６０】
初代ヒト骨格筋（ＨＳｋＭ）細胞（Ｌｏｎｚａ、カタログ番号２０ＴＬ３５６５１４）を３７℃の水浴中で解凍し、ＳｋＧＭ－２ ＢｕｌｌｅｔＫｉｔ増殖培地（Ｌｏｎｚａ、カタログ番号ＣＣ－３２４５）に推奨播種密度（ｃｍ$^2$当たり３，０００～５，０００）でプレーティングし、一晩増殖させた。ＲｅａｇｅｎｔＰａｃｋ継代培養試薬（Ｌｏｎｚａ、カタログ番号ＣＣ－５０３４）を使用して細胞を剥離し、組織培養グレード９６ウェルプレートに推奨播種密度でプレーティングし、３７°Ｃ、５％$CO_2$雰囲気の組織培養インキュベーター内で一晩増殖させるか、または２日ごとに増殖培地を交換して７０～８０％コンフルエントになるまで増殖させた。細胞が７０～８０％の培養密度に達したら、増殖培地を除去し、細胞を１ＸＰＢＳ（Ｇｉｂｃｏ、カタログ番号１００１００２３）で２回洗浄し、２％のウマ血清（Ｇｉｂｃｏ、カタログ番号２６０５００８８）及び１％Ｐｅｎ－Ｓｔｒｅｐ（Ｇｉｂｃｏ、カタログ番号１５１４０－１２２）を補充したＦ－１０（１Ｘ）（Ｇｉｂｃｏ、カタログ番号１１５５０－０４３）からなる分化培地に変更した。ほぼ全ての筋芽細胞が融合して筋管を形成するまで、培地を５～６日間毎日交換した。
【１１６１】
１つの９６ウェルプレート反応について、０．３μＬのリポフェクタミン－３０００トランスフェクション試薬（Ｌｉｐｏ３Ｋ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ、カタログ番号Ｌ３０００１５）を、５μＬのＯｐｔｉ－ＭＥＭ還元血清培地（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ、カタログ番号５１９８５０９１）と混合した。別のチューブでは、反応ごとに、ホタルルシフェラーゼ（ｆ．ｌｕｃ）ｏＲＮＡ（１０～２００ｎｇ）を、５μＬのＯｐｔｉ－ＭＥＭ及び０．２μＬのＰ３０００ＴＭエンハンサー試薬（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ、カタログ番号Ｌ３０００１５）と組み合わせた。等量のＬｉｐｏ３Ｋ／Ｏｐｔｉ－ＭＥＭ混合物をｏＲＮＡ／Ｏｐｔｉ－ＭＥＭ混合物と組み合わせ、室温で１５分間インキュベートした。Ｌｉｐｏ３Ｋ／ｏＲＮＡ混合物をトランスフェクトする各ウェルに添加し、３７℃、５％$CO_2$雰囲気の組織培養インキュベーターに２４時間置いた。
【１１６２】
２４時間後、トランスフェクションプレートをインキュベーターから取り出し、１５分間室温に平衡化させた。１００μＬの体積のＦｉｒｔｈｙ Ｌｕｃワンステップグローアッセイ作業溶液（Ｐｉｅｒｃｅ、カタログ番号１６１９６）を各ウェルに添加した。プレートをマイクロプレートシェーカー（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ、カタログ番号Ｓ７２０５０）上に置き、３００ｒｐｍで３分間混合した。混合後、プレートを室温で１０分間インキュベートした。発光をＶａｒｉｏｓｋａｎまたはＢｉｏ－Ｔｅｋ Ｃｙｔａｔｉｏｎ５機器を使用して読み取った。
【１１６３】
図９５Ａ及び図９５Ｂに示されるように、ＴＩＥを含む環状ＲＮＡは、リポフェクタミンをインビトロでトランスフェクトすると、用量依存的に複数のヒトドナーにおいて分化状態（例えば、筋芽細胞及び分化した筋管）を通じて初代筋細胞におけるホタルルシフェラーゼタンパク質の発現を駆動することができる。
【１１６４】

実施例８３

ＴＩＥを含む環状ＲＮＡの無細胞インビトロ翻訳

様々なＲＮＡ鋳型からのタンパク質産物を特徴付けるために、無細胞ウサギ網状赤血球インビトロ翻訳アッセイ（Ｐｒｏｍｅｇａ、カタログ番号Ｌ４５４０）を完了した。直鎖状ｍＲＮＡ及び環状ｏＲＮＡ鋳型の両方をアッセイにおいて使用し、反応成分を製造元のプロトコルに従って組み立てた。アッセイの前に、ＲＮＡ鋳型を６５℃で３分間変性させ、直ちに氷上で冷却した。全ての反応成分を氷上で組み立てた。Ｆｌｅｘｉ Ｒａｂｂｉｔ Ｒｅｔｉｃｕｌｏｃｙｔｅキット構成要素、完全アミノ酸混合物（Ｐｒｏｍｅｇａ、カタログ番号Ｌ５０６１）、ＲＮＡｓｉｎ ＴＩＥｕｃｌｅａｓｅ阻害剤（Ｐｒｏｍｅｇａ、カタログ番号Ｎ２１１１）、及びＴｒａｎｓｃｅｎｄ ｔＲＮＡ（Ｐｒｏｍｅｇａ、カタログ番号 Ｌ５０６１）を変性ＲＮＡ鋳型に添加した。反応物をボルテックスして混合し、３０℃で６０分間インキュベートし、次いで氷上に置いた。

【１１６５】

反応混合物を１×試料緩衝液（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ、カタログ番号ＮＰ０００７）に添加し、７０℃で１５分間加熱した。変性タンパク質試料を４～１２％Ｂｉｓ－Ｔｒｉｓゲル（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ、カタログ番号ＮＰＯ３３５ＢＯＸ）に負荷した。ゲル電気泳動を完了させ、ゲルを０．４５μｍのニトロセルロース膜（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ、カタログ番号ＬＣ２００１）上に湿式転写した。転写後、０．５％Ｔｗｅｅｎ（登録商標）－２０（Ｂｏｓｔｏｎ Ｂｉｏｐｒｏｄｕｃｔｓ Ｉｎｃ、カタログ番号ＩＢＢ－１８０）を含む新たに作製したＴＢＳ中で膜を揺動させながら１時間ブロックした。膜を、１：２，５００希釈のストレプトアビジン－ＡＰ（Ｐｒｏｍｅｇａ、カタログ番号Ｖ５５９１）とともに揺動させながら４５分間インキュベートした。膜を１回のすすぎ当たり１分間で、ＴＢＳＴで２回、脱イオン水で２回、４サイクル洗浄した。膜をＷｅｓｔｅｒｎ Ｂｌｕｅ基質（Ｐｒｏｍｅｇａ、カタログ番号Ｓ３８４１）とともに４５分間インキュベートし、膜を水ですすぎ、ＬＩＣＯＲ Ｏｄｙｓｓｅｙ ＣＬｘ画像化システムでスキャンした。

【１１６６】

図９６Ａ及び図９６Ｂに示されるように、ＴＩＥを含む環状ＲＮＡは、いかなる細胞型にも依存せず、無細胞溶解物中でタンパク質発現を駆動することができる。図９６Ａは、直鎖状または環状ＲＮＡ入力からのホタルルシフェラーゼの発現を示す。図９６Ｂは、野生型天然配列（ＷＴ）と比較して、異なるコドン最適化（ｃｏ）アプローチを用いたヒト及びマウスＡＴＰ７Ｂタンパク質の発現を示す。ＡＲＰ７Ｂタンパク質を発現するコドン最適化環状ＲＮＡ、及びホタルルシフェラーゼを発現する環状ＲＮＡは、タンパク質全長を発現することを示した。

【１１６７】

実施例８４

ＴＩＥ選択方法論

ＧｅｎＢａｎｋにおける配列からの活性評価のために推定ＴＩＥを特定した。簡潔には、長さが１ｋｂを超えるＲｉｂｏｖｉｒｉａ及び未分類ウイルス配列を同定した。５’及び遺伝子間ＵＴＲを、２５０ｎｔの最小長カットオフを有する推定ＣＤＳ開始部位及び終了部位に基づいて抽出した。ネガティブセンスＣＤＳアノテーションのために逆配列も収集した。ＴＩＥ配列を含むと予想されない属については、属ごとにいくつかの非コード領域をランダムに選択した。重複、＞１０ｎの反復含有配列、ＸｂａＩ部位及びＢａｍＨＩ部位の両方を有する配列、ならびに低品質配列（非ａｃｇｔ）を選別し、次いで、配列を、クラスタリングのために８０％の配列類似性カットオフを使用してＣＤＨｉｔを通してクラスタリングし、各クラスターからの代表的な配列をさらなる研究のために選択した。未分類配列またはＴＩＥを含むと予想される配列について、全ての５’及び遺伝子間ＵＴＲを選択し、重複、＞１０ｎの反復含有配列、ＸｂａＩ部位及びＢａｍＨＩ部位の両方を有する配列、ならびに低品質配列（非ａｃｇｔ）を選別し、次いで、配列を、クラスタリングのために９５％（低リスク、既知のＩＲＥＳ）の配列類似性カットオフを使用してＣ

ＤＨｉｔを通してクラスタリングし、各クラスターからの代表的な配列をさらなる研究のために選択した。両方の戦略について、３００ｎｔ未満の配列、または配列の複雑さのために合成することができない配列を排除した。

【１１６８】

実施例８５

実施例８５Ａ：初代ヒトＴ細胞におけるＴＩＥ活性

推定ＴＩＥを含む核酸配列を、ガウシアルシフェラーゼレポーター配列の開始コドンの前に環状ＲＮＡ（ｏＲＮＡ）構築物に挿入した。ＴＩＥを含むｏＲＮＡを合成し、精製した。精製ｏＲＮＡを脂質ナノ粒子へと製剤化した。ＬＮＰ－ｏＲＮＡをインビトロでＴ細胞にトランスフェクトした。トランスフェクションから２４及び４８時間後に上清を採取して交換し、ｏＲＮＡからのガウシアルシフェラーゼ発現をセレンテラジン含有検出試薬及びルミノメーターを使用して決定した。２４時間でのより高い発光は、より高いＴＩＥ機能を示す。２４時間と比較して４８時間でのより高い発光は、ＴＩＥ機能によるより高いｏＲＮＡ安定性を示す。

【１１６９】

実施例８５Ａ：初代ヒト肝細胞におけるＴＩＥ活性

推定ＴＩＥを含む核酸配列を、ガウシアルシフェラーゼレポーター配列の開始コドンの前に環状ＲＮＡ（ｏＲＮＡ）構築物に挿入した。ＴＩＥを含むｏＲＮＡを合成し、精製した。精製ｏＲＮＡを脂質ナノ粒子へと製剤化した。ＬＮＰ－ｏＲＮＡをインビトロで肝細胞にトランスフェクトした。トランスフェクションから２４及び４８時間後に上清を採取して交換し、ｏＲＮＡからのガウシアルシフェラーゼ発現をセレンテラジン含有検出試薬及びルミノメーターを使用して決定した。２４時間でのより高い発光は、より高いＴＩＥ機能を示す。２４時間と比較して４８時間でのより高い発光は、ＴＩＥ機能によるより高いｏＲＮＡ安定性を示す。

【１１７０】

実施例８５Ｃ：初代ヒト筋管におけるＴＩＥ活性

推定ＴＩＥを含む核酸配列を、ガウシアルシフェラーゼレポーター配列の開始コドンの前に環状ＲＮＡ（ｏＲＮＡ）構築物に挿入した。ＴＩＥを含むｏＲＮＡを合成し、精製した。精製ｏＲＮＡを脂質ナノ粒子へと製剤化した。ＬＮＰ－ｏＲＮＡをインビトロでヒト筋管にトランスフェクトした。トランスフェクションから２４及び４８時間後に上清を採取して交換し、ｏＲＮＡからのガウシアルシフェラーゼ発現をセレンテラジン含有検出試薬及びルミノメーターを使用して決定した。２４時間でのより高い発光は、より高いＴＩＥ機能を示す。２４時間と比較して４８時間でのより高い発光は、ＴＩＥ機能によるより高いｏＲＮＡ安定性を示す。

【１１７１】

実施例８６

ＴＩＥ組織指向性

選択したＴＩＥ含有ｏＲＮＡをＬＮＰに製剤化した。ＬＮＰ－ｏＲＮＡをＴ細胞、肝細胞、及び筋管にトランスフェクトした。トランスフェクションから２４及び４８時間後に上清を採取して交換し、ｏＲＮＡからのガウシアルシフェラーゼ発現をセレンテラジン含有検出試薬及びルミノメーターを使用して決定した。２４時間でのより高い発光は、より高いＴＩＥ機能を示す。２４時間と比較して４８時間でのより高い発光は、ＴＩＥ機能によるより高いｏＲＮＡ安定性を示し得る。ＴＩＥ活性を細胞型間で比較し、ＴＩＥ組織指向性に起因する差異に注目した。差異は、組織特異的発現を示し、翻訳開始、分解、または安定性の向上を促進するＴＩＥ関与タンパク質の結果であり得る。

【１１７２】

実施例８６

実施例８６Ａ：ＴＩＥ欠失スキャニング

ＴＩＥの５’末端または３’末端のいずれかに漸進的な欠失を伴う選択ＴＩＥ配列を、ガウシアルシフェラーゼレポーター配列の開始コドンの前に環状ＲＮＡ（ｏＲＮＡ）構築物

に挿入した。ＴＩＥバリアントを含むｏＲＮＡを合成し、精製した。精製ｏＲＮＡを脂質ナノ粒子へと製剤化した。ＬＮＰ－ｏＲＮＡをヒト初代Ｔ細胞にトランスフェクトした。トランスフェクションから２４及び４８時間後に上清を採取して交換し、ｏＲＮＡからのガウシアルシフェラーゼ発現をセレンテラジン含有検出試薬及びルミノメーターを使用して決定した。２４時間でのより高い発光は、より高いＴＩＥ機能を示す。２４時間と比較して４８時間でのより高い発光は、ＴＩＥ機能によるより高いｏＲＮＡ安定性を示し得る。漸進的な欠失に起因する発現または安定性障害は、ＴＩＥのコア機能単位を同定する。

【１１７３】

実施例８６Ｂ：ＴＩＥバリアントの生成及び同定

選択ＴＩＥ含有ｏＲＮＡ合成プラスミドを、エラープローンＰＣＲに供して、ＰＣＲ生成物にランダムな変異を導入した。ＰＣＲ生成物をｏＲＮＡ合成のための鋳型として使用した。精製されたｏＲＮＡをＬＮＰに製剤化し、初代ヒトＴ細胞にトランスフェクトした。ＨＰＬＣにより、トランスフェクションから６、２４、４８、及び７２時間後にＴ細胞からポリソーム画分を採取した。各ポリソーム画分に関連するＲＮＡをポリソーム画分から抽出し、ＮＧＳによって配列決定した。各時点での各ポリソーム画分におけるＴＩＥ変異濃縮を分析して、１）ＴＩＥからの翻訳活性を維持または改善する、及び／または２）ｏＲＮＡの安定性を改善する変異を同定した。

【１１７４】

実施例８６Ｃ：ＴＩＥの単一及び複数バリアントの検証

実施例６からの推定上の有益なＴＩＥ変異を単独または組み合わせて含む核酸配列を、ガウシアルシフェラーゼレポーター配列の開始コドンの前に環状ＲＮＡ（ｏＲＮＡ）構築物に挿入した。ＴＩＥバリアントを含むｏＲＮＡを合成し、精製した。精製ｏＲＮＡを脂質ナノ粒子へと製剤化した。ＬＮＰ－ｏＲＮＡをヒト初代Ｔ細胞にトランスフェクトした。トランスフェクションから２４及び４８時間後に上清を採取して交換し、ｏＲＮＡからのガウシアルシフェラーゼ発現をセレンテラジン含有検出試薬及びルミノメーターを使用して決定した。２４時間でのより高い発光は、より高いＴＩＥ機能を示す。２４時間と比較して４８時間でのより高い発光は、ＴＩＥ機能によるより高いｏＲＮＡ安定性を示す。

【１１７５】

実施例８７

実施例８７Ａ：真核生物のＴＩＥの選択

真核生物のＴＩＥの選択。推定真核生物のＴＩＥを、いくつかのデータベースを使用して同定した。選択されたＴＩＥは、配列４０～１５７８ヌクレオチドの長さを含み、同定された修飾（ｍ６Ａ）部位を含む場合と含まない場合がある。

【１１７６】

実施例８７Ｂ：修飾ヌクレオチド（ｍ６Ａ）を含むＴＩＥ

推定ＴＩＥを含む核酸配列を、ガウシアルシフェラーゼレポーター配列のコード領域に先行して環状ＲＮＡ（ｏＲＮＡ）構築物に挿入した。ｏＲＮＡを、修飾ヌクレオチドのタイトレーションを用いて合成した。精製ｏＲＮＡを脂質ナノ粒子へと製剤化した。ＬＮＰ－ｏＲＮＡをＴ細胞、肝細胞、及び筋管にトランスフェクトした。トランスフェクションから２４及び４８時間後に上清を採取して交換し、ｏＲＮＡからのガウシアルシフェラーゼ発現をセレンテラジン含有検出試薬及びルミノメーターを使用して決定した。ＴＩＥを含む修飾ヌクレオチドの２４時間でのより高い発光は、増強された機能のための修飾の必要性を示す。２４時間と比較して４８時間でより高い発光は、ＴＩＥを含む修飾ヌクレオチドがｏＲＮＡの安定性を向上させることを示す。

【１１７７】

実施例８８

酸化及び／または低酸素ストレスを受ける細胞におけるＴＩＥの発現

推定ＴＩＥを含む核酸配列を、ガウシアルシフェラーゼレポーター配列のコード領域に先行して環状ＲＮＡ（ｏＲＮＡ）構築物に挿入した。精製ｏＲＮＡを脂質ナノ粒子へと製剤化した。肝細胞を過酸化水素で処理して酸化ストレスを誘発するか、または$CoCl_2$

で処理して低酸素ストレスを誘導した。ＬＮＰ－ｏＲＮＡを、インビトロで（低酸素ストレス下、酸化ストレス下、または未処理下で）肝細胞にトランスフェクトした。トランスフェクションから２４及び４８時間後に上清を採取して交換し、ｏＲＮＡからのガウシアルシフェラーゼ発現をセレンテラジン含有検出試薬及びルミノメーターを使用して決定した。２４時間でのより高い発光は、より高いＴＩＥ機能を示す。２４時間と比較して４８時間でのより高い発光は、ＴＩＥ機能によるより高いｏＲＮＡ安定性を示し得る。

【１１７８】

実施例８９

ＴＩＥとしてのアプタマー

翻訳開始因子に対するアプタマーを含む核酸配列（すなわち、ｅＩＦ４Ｅ、ｅＩＦ４Ｇ、ｅＩＦ４ａ）を、ガウシアルシフェラーゼレポーター配列のコード領域に先行して環状ＲＮＡ（ｏＲＮＡ）構築物に挿入した。精製ｏＲＮＡを脂質ナノ粒子へと製剤化した。ＬＮＰ－ｏＲＮＡを肝細胞にトランスフェクトした。トランスフェクションから２４及び４８時間後に上清を採取して交換し、ｏＲＮＡからのガウシアルシフェラーゼ発現をセレンテラジン含有検出試薬及びルミノメーターを使用して決定した。２４時間でのより高い発光は、より高いＴＩＥ機能を示す。２４時間と比較して４８時間でのより高い発光は、ＴＩＥ機能によるより高いｏＲＮＡ安定性を示し得る。

【１１７９】

実施例９０

タンデムＴＩＥ

ウイルス、真核生物、及び／またはアプタマーＴＩＥの選択された組み合わせを、ガウシアルシフェラーゼレポーター配列のコード領域に先行して環状ＲＮＡ（ｏＲＮＡ）構築物に挿入した。ｏＲＮＡを、修飾ヌクレオチドのタイトレーションを用いて合成した。精製ｏＲＮＡを脂質ナノ粒子へと製剤化した。ＬＮＰ－ｏＲＮＡをＴ細胞、肝細胞、及び筋管にトランスフェクトした。トランスフェクションから２４及び４８時間後に上清を採取して交換し、ｏＲＮＡからのガウシアルシフェラーゼ発現をセレンテラジン含有検出試薬及びルミノメーターを使用して決定した。２４時間での複数のＴＩＥを含む構築物のより高い発光は、ＴＩＥの相乗効果を示す。２４時間と比較して４８時間でより高い発光は、１つの構築物において複数のＴＩＥを有することが、ｏＲＮＡの安定性を向上させることを示し得る。

【１１８０】

実施例９１

実施例９１Ａ：キャップ非依存性翻訳を増強するコードアプタマー

ｅＩＦ４Ｅ、ｅＩＦ４ａ、及び他の翻訳イニシエータと結合する特定のアプタマーは、タンパク質に非機能的な立体構造を採用させることによって翻訳を阻害することが知られている。翻訳開始因子に対するアプタマーを含む核酸配列（すなわち、ｅＩＦ４Ｅ、ｅＩＦ４ａ）を、機能的ＴＩＥ及びガウシアルシフェラーゼレポーター配列のコード領域に先行して環状ＲＮＡ（ｏＲＮＡ）構築物に挿入した。精製ｏＲＮＡを脂質ナノ粒子へと製剤化した。ＬＮＰ－ｏＲＮＡを肝細胞にトランスフェクトした。トランスフェクションから２４及び４８時間後に上清を採取して交換し、ｏＲＮＡからのガウシアルシフェラーゼ発現をセレンテラジン含有検出試薬及びルミノメーターを使用して決定した。２４時間でのより高い発光は、キャップ非依存性翻訳を優先することを示す。２４時間と比較して４８時間でのより高い発光は、キャップ依存性翻訳の阻害によるより高いｏＲＮＡ安定性を示す。

【１１８１】

実施例９１Ｂ：キャップ非依存性翻訳を増強するコードアプタマー

ｏＲＮＡ及びアプタマーの共トランスフェクション。ｅＩＦ４Ｅ、ｅＩＦ４ａ、及び他の翻訳イニシエータと結合する特定のアプタマーは、タンパク質に非機能的な立体構造を採用させることによって翻訳を阻害することが知られている。翻訳開始因子に対するアプタマーを含む核酸配列（すなわち、ｅＩＦ４Ｅ、ｅＩＦ４ａ）を、ＴＩＥ及びガウシアル

シフェラーゼレポーターのコード領域を含む環状ＲＮＡ（ｏＲＮＡ）で共トランスフェクションした。精製アプタマー及びｏＲＮＡを一緒に脂質ナノ粒子に製剤化した。ＬＮＰ－ｏＲＮＡを肝細胞にトランスフェクトした。トランスフェクションから２４及び４８時間後に上清を採取して交換し、ｏＲＮＡからのガウシアルシフェラーゼ発現をセレンテラジン含有検出試薬及びルミノメーターを使用して決定した。２４時間でのより高い発光は、キャップ非依存性翻訳を優先することを示す。２４時間と比較して４８時間でのより高い発光は、キャップ依存性翻訳の阻害によるより高いｏＲＮＡ安定性を示し得る。

【１１８２】

実施例９２

環状ＲＮＡの免疫原性を評価した。免疫刺激のマーカーであるＲＩＧ－１及びＩＦＮＢ１　ＲＮＡの発現の誘導を、様々なＲＮＡ調製物による細胞のトランスフェクション後に、ＲＴ－ｃＰＣＲを使用して測定した。市販されている３ｐｈｐＲＮＡを除く全てのＲＮＡ調製物は、Ａｎａｂａｅｎａ置換イントロン、ＧＬｕｃリーディングフレーム、強い相同性アーム、５’及び３’スペーサー、ならびにＣＶＢ　３　ＩＲＥＳを含むＲＮＡのインビトロ転写（ＩＶＴ）及び環状化を使用して産生された。ＨｅＬａ細胞（図１０１Ａ）及びＡ５９４細胞（図１０１Ｂ）の両方において、ＲＩＧ－１及びＩＦＮＢ１の最高レベルは、過剰なＧＭＰの非存在下で調製されたＩＶＴ反応生成物及び陽性対照の３ｐｈｐＲＮＡによって誘導された。

【１１８３】

実施例９３

ＩＲＥＳ選択及びスクリーニング

約３，０００個の潜在的な配列内リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ）配列候補を、当該技術分野で利用可能な部分的及び完全なウイルス配列（例えば、Ｇｅｎｂａｎｋ）のウイルス非翻訳領域から計算的に同定した。各ＤＮＡ鋳型を、配列番号１～２９８３及び３２８２～３２８７から選択されるＩＲＥＳ配列またはその断片を含むようにクローニングした。例示的な構築物には、５’増強イントロン要素、５’増強エクソン要素、強固なＩＲＥＳ、ガウシアルシフェラーゼをコードするコード要素、３’増強エクソン要素、及び３’増強イントロン要素が含まれる。操作された環状ＲＮＡ（ｏＲＮＡ）は、インビトロ転写（ＩＶＴ）によってＤＮＡ鋳型から生成し、ｏＲＮＡは、その後、ＩＶＴ反応の非環状ＲＮＡ成分から精製した。

【１１８４】

精製したｏＲＮＡを脂質でナノ沈殿させて、ＬＮＰ－ｏＲＮＡ構築物を形成した。最初に、ＬＮＰを「ＮｅｘｔＧｅｎ」混合チャンバーを備えたＰｒｅｃｉｓｉｏｎ　Ｎａｎｏ　ｓｙｓｔｅｍｓ　Ｉｇｎｉｔｅ装置を使用して空の脂質ナノ粒子を作製することによって製剤化した。表１０ｂからの脂質３９、ＤＳＰＣ、コレステロール、及びＤＭＧ－ＰＥＧ２０００（Ａｖａｎｔｉ　Ｐｏｌａｒ　Ｌｉｐｉｄｓ，Ｉｎｃ．，Ａｌａｂａｓｔｅｒ，ＡＬ）を４５：９：４４：２のモル比で含有したエタノール相を、ｐＨ４．５の５０ｍＭ酢酸ナトリウム緩衝液と混合した。３：１の水対エタノールの混合比を使用した。次いで空のＬＮＰを１Ｌの１ｘＰＢＳで透析し、１８時間にわたって２回交換した。次いで、透析した空のＬＮＰを、ｐＨ４．５の５０ｍＭ酢酸ナトリウム緩衝液中で４０μｇ／ｍＬの最終環状ＲＮＡ濃度と混合した。３：１の水性対空の脂質ナノ粒子の混合比を使用した。ＬＮＰの最終イオン化可能脂質対ＲＮＡリン酸比は、６．０であった。

【１１８５】

初代ヒト骨格筋管、初代ヒト肝細胞、及び活性化された初代ヒトＴ細胞を、製剤化したＬＮＰ－ｏＲＮＡで、３連で処理した。上清におけるタンパク質発現をトランスフェクションから４８時間後の発光測定によって評価した。

【１１８６】

総発光シグナルを複製プレート間で正規化し、フラッシュアッセイ読み出しタイミングによる複製間のプレート全体の差を制御した。バックグラウンドに対して＜１．５ｘのシグナルを有する陽性対照を有するプレートを分析から除外した。バックグラウンドを空の

ウェルに基づいて減算した。各試験ウェルの複製をプレート対照の平均に対して正規化した。

【１１８７】

表２７は、スクリーニングのためのタンパク質発現及び安定性測定値を提供する。測定された数値は対照（ヤギコブウイルスＩＲＥＳ、配列番号３２８２）に対して正規化され、倍率変化として表される。

【表２７－１】

表２７．ＩＲＥＳの発現及び機能安定性スクリーニング

| 配列番号 | [Mod] 倍率変化 Myo | [Mod] T 倍率変化 | [Mod] PHH 倍率変化 | 配列番号 | [Mod] 倍率変化 Myo | [Mod] T 倍率変化 | [Mod] PHH 倍率変化 | 配列番号 | [Mod] 倍率変化 Myo | [Mod] T 倍率変化 | [Mod] PHH 倍率変化 | 配列番号 | [Mod] 倍率変化 Myo | [Mod] T 倍率変化 | [Mod] PHH 倍率変化 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 97 | 0.260167 | 0.353177 | 1.163467 | 672 | 0.089022 | 0.461053 | 0.683679 | 1245 | 0.209877 | 1.009418 | | 2010 | 0.008014 | 0.048727 | 0.376383 |
| 98 | 0.290648 | 0.677026 | 0.78802 | 673 | 0.052496 | 0.22393 | 0.290818 | 1246 | 0.689115 | 0.935799 | | 2011 | 0.007678 | 0.050682 | 0.388038 |
| 99 | 0.163908 | 0.27666 | 1.020326 | 674 | 0.242917 | 0.426446 | 0.671781 | 1247 | 1.206727 | 3.45224 | | 2012 | 0.007658 | 0.048585 | 0.40471 |
| 100 | 0.495163 | 0.48261 | 1.22777 | 675 | 0.020806 | 0.100778 | 0.254393 | 1248 | 0.997846 | 3.186952 | | 2013 | 0.00776 | 0.046273 | 0.269896 |
| 101 | 0.533025 | 0.852995 | 1.370347 | 676 | 0.120498 | 0.594332 | 0.557211 | 1249 | 1.03331 | 4.151541 | | 2014 | 0.007967 | 0.048251 | 0.353403 |
| 102 | 0.044695 | 0.030995 | 0.514093 | 677 | 0.083653 | 0.221249 | 0.399649 | 1250 | 0.526962 | 1.830667 | | 2015 | 0.008137 | 0.046658 | 0.338498 |
| 103 | 0.045577 | 0.039508 | 0.647085 | 678 | 0.006713 | 0.026074 | 0.284843 | 1251 | 0.038789 | 0.160427 | | 2016 | 0.007733 | 0.04596 | 0.356733 |
| 104 | 0.076071 | 0.168841 | 0.774536 | 679 | 0.012988 | 0.238136 | 0.251857 | 1252 | 0.529876 | 1.476753 | | 2017 | 0.007571 | 0.045682 | 0.396185 |
| 105 | 0.249558 | 0.329006 | 0.642043 | 680 | 0.939588 | 1.168014 | 0.89748 | 1253 | 0.148526 | 0.512689 | | 2018 | 0.007836 | 0.047143 | 0.396857 |
| 106 | 0.352419 | 0.648041 | 1.09325 | 682 | 0.116101 | 0.51627 | 0.411418 | 1254 | 0.171619 | 0.496272 | | 2019 | 0.008556 | 0.049704 | 0.356688 |
| 107 | 0.287896 | 0.937122 | 1.119079 | 683 | 0.091835 | 0.41856 | 0.330861 | 1255 | 1.440028 | 4.650389 | | 2020 | 0.007647 | 0.047487 | 0.406455 |
| 109 | 0.249157 | 0.626121 | 0.853308 | 684 | 0.269272 | 0.956985 | 0.388996 | 1256 | 1.246323 | 3.526473 | | 2021 | 0.007659 | 0.046888 | 0.36344 |
| 110 | 0.242425 | 0.513277 | 0.717483 | 685 | 0.068553 | 0.420129 | 0.219238 | 1257 | 1.630471 | 3.27436 | | 2022 | 0.007575 | 0.046464 | 0.411014 |
| 111 | 0.222321 | 0.465065 | 0.786969 | 686 | 0.118729 | 0.627236 | 0.408928 | 1258 | 1.175351 | 3.563138 | | 2023 | 0.008 | 0.046656 | 0.392491 |
| 112 | 0.371086 | 0.636962 | 0.807476 | 687 | 0.109438 | 0.486295 | 0.332833 | 1259 | 0.846546 | 1.714691 | | 2024 | 0.007671 | 0.046704 | 0.343154 |
| 113 | 0.317071 | 0.43731 | 0.827882 | 688 | 0.136059 | 0.604523 | 0.382106 | 1260 | 1.043862 | 0.869917 | | 2026 | 0.008452 | 0.049376 | 0.408859 |
| 114 | 0.05835 | 0.068124 | 0.789812 | 689 | 0.029476 | 0.230011 | 0.246326 | 1261 | 0.290872 | 0.44244 | | 2027 | 0.007698 | 0.046912 | 0.328525 |
| 115 | 0.050735 | 0.046932 | 0.425032 | 690 | 0.713106 | 1.287446 | 0.527058 | 1263 | 0.493679 | 0.657699 | 1.716926 | 2028 | 0.007683 | 0.046616 | 0.339399 |
| 116 | 0.039211 | 0.030739 | 0.529925 | 691 | 0.237497 | 0.831741 | 0.595391 | 1264 | 0.298742 | 0.443995 | 1.012966 | 2029 | 0.007666 | 0.046757 | 0.297973 |
| 117 | 0.042734 | 0.046123 | 0.425775 | 692 | 0.223793 | 1.114774 | 0.464139 | 1265 | 0.378744 | 0.471388 | 1.244712 | 2030 | 0.007675 | 0.046508 | 0.435685 |
| 118 | 0.154586 | 0.456184 | 0.666903 | 693 | 0.271839 | 2.152616 | 0.674694 | 1266 | 0.211218 | 0.327944 | 0.97188 | 2031 | 0.008134 | 0.04519 | 0.411958 |
| 119 | 0.198021 | 0.987593 | 0.62119 | 694 | 0.05139 | 0.613276 | 0.240255 | 1267 | 0.17315 | 0.41676 | 1.57404 | 2032 | 0.007675 | 0.045703 | 0.307964 |
| 120 | 0.275525 | 0.701885 | 0.489288 | 695 | 0.327666 | 1.036856 | 0.542561 | 1268 | 0.213092 | 0.396399 | 1.097609 | 2033 | 0.007603 | 0.046911 | 0.368773 |
| 121 | 0.627572 | 1.028933 | 0.997696 | 696 | 0.098363 | 0.604772 | 0.25928 | 1269 | 0.227781 | 0.372048 | 1.433456 | 2034 | 0.007487 | 0.046125 | 0.42095 |
| 122 | 0.388602 | 0.8876 | 0.832163 | 697 | 0.375897 | 0.957958 | 0.549728 | 1270 | 0.004499 | 0.018835 | 1.068802 | 2035 | 0.007824 | 0.048172 | 0.297846 |

【表２７－２】

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 123 | 0.039714 | 0.030111 | 0.638047 | 698 | 0.026512 | 0.225899 | 0.241871 | 1271 | 0.180553 | 0.407587 | 1.83541 | 2036 | 0.007336 | 0.048153 | 0.42074 |
| 125 | 0.382696 | 0.641754 | 0.649185 | 699 | 0.497694 | 1.50769 | 0.574673 | 1272 | 0.394666 | 0.599394 | 1.66783 | 2037 | 0.008092 | 0.047712 | 0.309579 |
| 126 | 0.057929 | 0.06647 | 0.645602 | 700 | 0.288469 | 0.915024 | 0.510727 | 1273 | 0.281898 | 0.489728 | 1.50982 | 2038 | 0.007771 | 0.046713 | 0.372379 |
| 127 | 0.293568 | 0.685807 | 0.674465 | 701 | 0.437509 | 1.020715 | 0.734873 | 1274 | 0.243913 | 0.319871 | 0.788908 | 2039 | 0.008147 | 0.047807 | 0.46323 |
| 128 | 0.489317 | 0.583675 | 1.021214 | 702 | 0.046205 | 0.476705 | 0.190078 | 1275 | 0.262209 | 0.4805 | 3.95034 | 2041 | 0.007752 | 0.046575 | 0.519016 |
| 129 | 0.053695 | 0.089454 | 0.668895 | 703 | 0.122863 | 0.83862 | 0.282447 | 1276 | 0.378342 | 0.610004 | 1.467933 | 2042 | 0.007808 | 0.047418 | 0.427933 |
| 130 | 0.040577 | 0.060757 | 0.572842 | 704 | 0.147205 | 0.901082 | 0.301388 | 1277 | 0.273883 | 0.469937 | 1.070136 | 2043 | 0.007841 | 0.048971 | 0.487233 |
| 131 | 0.039511 | 0.033359 | 0.53476 | 705 | 0.223074 | 0.853951 | 0.40577 | 1278 | 0.315846 | 0.734033 | 0.89974 | 2044 | 0.007751 | 0.04791 | 0.502666 |
| 132 | 0.039977 | 0.031182 | 0.564324 | 706 | 0.008438 | 0.033092 | 0.191812 | 1279 | 0.189246 | 0.354251 | 6.159851 | 2045 | 0.007997 | 0.04765 | 0.425789 |
| 133 | 0.039326 | 0.030041 | 0.541046 | 707 | 0.394494 | 0.997947 | 0.843619 | 1280 | 0.388472 | 0.494888 | 1.410746 | 2046 | 0.007681 | 0.047159 | 0.387429 |
| 134 | 0.046625 | 0.052943 | 0.46727 | 708 | 0.186993 | 1.051411 | 0.468843 | 1281 | 0.00514 | 0.020652 | 0.591781 | 2047 | 0.008297 | 0.04738 | 0.434821 |
| 136 | 0.047864 | 0.042316 | 0.428555 | 709 | 0.108893 | 0.601642 | 0.210326 | 1282 | 0.289013 | 0.482967 | 2.197797 | 2048 | 0.00876 | 0.04945 | 0.444633 |
| 138 | 0.372287 | 0.637832 | 0.615651 | 710 | 0.091753 | 0.734575 | 0.237951 | 1283 | 0.053841 | 0.067338 | 0.927451 | 2049 | 0.007392 | 0.046997 | 0.359452 |
| 139 | 0.059696 | 0.097316 | 0.520599 | 711 | 0.345755 | 1.159082 | 0.385849 | 1284 | 0.570301 | 0.633162 | 2.538618 | 2050 | 0.008459 | 0.051214 | 0.257893 |
| 140 | 0.16008 | 0.399455 | 0.715372 | 712 | 0.115713 | 0.513471 | 0.287018 | 1285 | 0.255977 | 0.464247 | 1.400939 | 2051 | 0.007739 | 0.048823 | 0.379033 |
| 141 | 0.040253 | 0.031062 | 0.546956 | 713 | 0.122493 | 0.686785 | 0.347889 | 1286 | 0.003738 | 0.01781 | 0.498459 | 2052 | 0.007651 | 0.047708 | 0.301475 |
| 142 | 0.038521 | 0.027425 | 0.46798 | 714 | 0.191872 | 0.830288 | 0.567754 | 1287 | 0.422493 | 0.771168 | 1.722777 | 2055 | 0.008096 | 0.046365 | 0.286331 |
| 143 | 0.03901 | 0.032654 | 0.420921 | 715 | 0.016321 | 0.055715 | 0.200218 | 1288 | 0.373076 | 0.512993 | 1.52444 | 2056 | 0.007633 | 0.045501 | 0.321644 |
| 145 | 0.03927 | 0.026297 | 0.635934 | 716 | 0.020481 | 0.530732 | 0.198959 | 1289 | 0.003707 | 0.017964 | 0.668949 | 2057 | 0.007723 | 0.04781 | 0.286926 |
| 146 | 0.043229 | 0.034645 | 0.587329 | 717 | 0.039274 | 0.234164 | 0.199885 | 1290 | 0.02527 | 0.048054 | 0.658627 | 2058 | 0.007596 | 0.047326 | 0.35697 |
| 147 | 0.042637 | 0.036624 | 0.559359 | 718 | 0.344223 | 1.062216 | 0.47539 | 1291 | 0.010359 | 0.025134 | 0.65155 | 2059 | 0.007819 | 0.048191 | 0.328469 |
| 148 | 0.039126 | 0.029094 | 0.736827 | 719 | 0.034917 | 0.299112 | 0.221854 | 1292 | 0.018398 | 0.043801 | 0.757339 | 2060 | 0.007522 | 0.049484 | 0.346836 |
| 149 | 0.039186 | 0.028926 | 0.711791 | 720 | 0.149534 | 0.777313 | 0.356745 | 1293 | 0.01987 | 0.051117 | 0.725236 | 2062 | 0.007728 | 0.04874 | 0.437359 |
| 150 | 0.03864 | 0.027048 | 0.514678 | 721 | 0.35108 | 1.01378 | 0.464163 | 1294 | 0.010602 | 0.029974 | 0.799556 | 2064 | 0.007614 | 0.047857 | 0.346887 |
| 151 | 0.037309 | 0.026948 | 0.493258 | 722 | 0.234439 | 0.884539 | 0.353844 | 1295 | 0.008196 | 0.027605 | 0.669465 | 2065 | 0.007718 | 0.04734 | 0.320753 |
| 152 | 0.038449 | 0.026258 | 0.615534 | 723 | 0.0088 | 0.035731 | 0.175315 | 1296 | 0.062396 | 0.233757 | 1.952551 | 2066 | 0.007861 | 0.048273 | 0.33439 |
| 153 | 0.038341 | 0.025876 | 0.695107 | 724 | 0.302881 | 1.254204 | 0.495122 | 1298 | 0.003269 | 0.017718 | 0.60053 | 2067 | 0.007787 | 0.048374 | 0.360579 |
| 154 | 0.0402 | 0.0304 | 0.722679 | 725 | 0.05075 | 0.39608 | 0.275113 | 1302 | 0.003654 | 0.017971 | 0.669614 | 2068 | 0.007899 | 0.047923 | 0.438593 |
| 155 | 0.038723 | 0.027351 | 0.586864 | 726 | 0.081523 | 0.495768 | 0.301285 | 1453 | 0.029035 | 0.074756 | 1.361452 | 2069 | 0.007997 | 0.047566 | 0.294398 |
| 156 | 0.038511 | 0.027142 | 0.627475 | 727 | 0.043541 | 0.247525 | 0.249821 | 1456 | 0.070888 | 0.141499 | 1.733833 | 2070 | 0.007618 | 0.047015 | 0.368413 |

【表２７－３】

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 157 | 0.039049 | 0.027127 | 0.731503 | 728 | 0.33696 | 1.546341 | 0.460674 | 1457 | 0.005302 | 0.02091 | 0.86533 | 2071 | 0.008211 | 0.047051 | 0.398477 |
| 158 | 0.038048 | 0.027701 | 0.672155 | 729 | 0.359043 | 1.008995 | 0.546047 | 1458 | 0.022487 | 0.056128 | 0.69949 | 2072 | 0.007816 | 0.045952 | 0.291645 |
| 159 | 0.038668 | 0.025816 | 0.61191 | 730 | 0.097955 | 0.496152 | 0.329261 | 1459 | 0.041481 | 0.10652 | 1.298416 | 2073 | 0.00744 | 0.047558 | 0.416445 |
| 160 | 0.039335 | 0.026247 | 0.5674 | 731 | 0.072919 | 0.443675 | 0.274429 | 1460 | 0.178585 | 0.283471 | 1.592463 | 2074 | 0.007748 | 0.047678 | 0.31422 |
| 161 | 0.038824 | 0.025876 | 0.492452 | 732 | 0.015001 | 0.060524 | 0.182808 | 1461 | 0.003819 | 0.018816 | 0.634444 | 2075 | 0.007821 | 0.049202 | 0.410995 |
| 162 | 0.038216 | 0.023393 | 0.575165 | 733 | 0.453244 | 1.410075 | 0.629982 | 1462 | 0.089803 | 0.219634 | 2.496717 | 2076 | 0.007579 | 0.048504 | 0.35862 |
| 163 | 0.038264 | 0.027191 | 0.52053 | 734 | 0.342572 | 1.700432 | 0.413281 | 1463 | 0.367361 | 0.489496 | 3.718475 | 2077 | 0.007606 | 0.048341 | 0.336701 |
| 164 | 0.038197 | 0.026151 | 0.524974 | 735 | 0.012613 | 0.050176 | 0.182816 | 1465 | 0.05509 | 0.079253 | 0.882252 | 2078 | 0.007833 | 0.047621 | 0.430521 |
| 165 | 0.037817 | 0.026532 | 0.561699 | 736 | 0.016461 | 0.063952 | 0.182823 | 1466 | 0.125624 | 0.195771 | 1.647541 | 2079 | 0.008881 | 0.04708 | 0.367176 |
| 166 | 0.038844 | 0.026828 | 0.575901 | 738 | 0.482005 | 1.605961 | 0.567678 | 1467 | 0.104653 | 0.186069 | 1.135532 | 2080 | 0.007632 | 0.046431 | 0.401737 |
| 167 | 0.038524 | 0.025708 | 0.69976 | 739 | 0.58218 | 1.397435 | 0.754253 | 1468 | 0.036721 | 0.09977 | 0.954748 | 2081 | 0.007585 | 0.047886 | 0.328978 |
| 168 | 0.038788 | 0.025543 | 0.731934 | 740 | 0.029093 | 0.051791 | 0.207152 | 1469 | 0.12058 | 0.220731 | 1.105286 | 2082 | 0.00782 | 0.048005 | 0.42346 |
| 169 | 0.039231 | 0.027338 | 0.432891 | 741 | 0.349249 | 1.283688 | 0.511103 | 1470 | 0.107829 | 0.199233 | 0.937104 | 2084 | 0.007872 | 0.048572 | 0.374299 |
| 170 | 0.037986 | 0.022969 | 0.541642 | 742 | 0.04606 | 0.482528 | 0.221214 | 1471 | 0.112351 | 0.216795 | 1.247919 | 2085 | 0.007508 | 0.048884 | 0.363426 |
| 171 | 0.038154 | 0.027212 | 0.582587 | 743 | 0.141882 | 0.376925 | 2.230581 | 1472 | 0.229734 | 0.29791 | 1.053188 | 2086 | 0.007641 | 0.04778 | 0.455748 |
| 172 | 0.037112 | 0.026558 | 0.639476 | 744 | 0.254656 | 0.939146 | 0.493241 | 1473 | 0.005236 | 0.020279 | 0.786991 | 2087 | 0.007576 | 0.046705 | 0.394438 |
| 173 | 0.037335 | 0.026078 | 0.504809 | 745 | 0.015338 | 0.058975 | 0.213153 | 1474 | 0.094218 | 0.183605 | 2.872396 | 2089 | 0.007588 | 0.050455 | 0.512216 |
| 174 | 0.037049 | 0.025905 | 0.577144 | 746 | 0.340833 | 0.962798 | 0.521323 | 1475 | 0.103852 | 0.178429 | 2.934125 | 2091 | 0.007914 | 0.049272 | 0.348157 |
| 175 | 0.037822 | 0.025498 | 0.530502 | 747 | 0.701684 | 1.619727 | 0.658665 | 1476 | 0.032997 | 0.071639 | 1.468191 | 2092 | 0.008757 | 0.085812 | 0.387008 |
| 177 | 0.038266 | 0.026051 | 0.561219 | 748 | 0.442992 | 1.472323 | 0.774321 | 1477 | 0.004763 | 0.019988 | 0.744601 | 2093 | 0.007033 | 0.04869 | 0.543809 |
| 178 | 0.039045 | 0.027092 | 0.500802 | 749 | 0.196686 | 0.71019 | 0.441595 | 1479 | 0.004862 | 0.02006 | 0.646639 | 2094 | 0.007412 | 0.048193 | 0.462981 |
| 179 | 0.037153 | 0.026609 | 0.50571 | 750 | 0.00964 | 0.038536 | 0.188239 | 1480 | 0.062493 | 0.120887 | 1.421179 | 2095 | 0.007785 | 0.048394 | 0.378497 |
| 180 | 0.038755 | 0.028951 | 0.487148 | 751 | 0.360595 | 1.364262 | 0.554156 | 1482 | 0.063512 | 0.117236 | 1.02612 | 2096 | 0.00808 | 0.04793 | 0.422319 |
| 181 | 0.037539 | 0.025831 | 0.659122 | 752 | 0.32576 | 1.182967 | 0.622747 | 1483 | 0.003687 | 0.018638 | 0.806893 | 2097 | 0.007585 | 0.052485 | 0.339995 |
| 182 | 0.03747 | 0.025334 | 0.496612 | 753 | 0.066818 | 0.928007 | 0.240297 | 1485 | 0.002923 | 0.016326 | 0.810278 | 2098 | 0.007722 | 0.077927 | 0.360082 |
| 183 | 0.038763 | 0.025478 | 0.768879 | 754 | 0.017628 | 0.16402 | 0.222692 | 1486 | 0.003046 | 0.016492 | 0.639067 | 2101 | 0.003196 | 0.02074 | 0.711343 |
| 184 | 0.043604 | 0.030907 | 0.689648 | 755 | 0.237297 | 1.072629 | 0.451982 | 1487 | 0.002997 | 0.016251 | 0.874065 | 2102 | 0.003171 | 0.019613 | 0.932187 |
| 185 | 0.039562 | 0.027297 | 0.687583 | 756 | 0.178168 | 1.009049 | 0.452329 | 1488 | 0.002931 | 0.015913 | 0.718561 | 2103 | 0.003015 | 0.019345 | 0.66012 |
| 186 | 0.039007 | 0.026413 | 0.665244 | 757 | 0.012459 | 0.041059 | 0.194411 | 1489 | 0.00278 | 0.016262 | 0.945829 | 2105 | 0.003183 | 0.019557 | 0.922989 |
| 187 | 0.038049 | 0.026641 | 0.587503 | 758 | 0.007271 | 0.030828 | 0.157203 | 1490 | 0.003396 | 0.017309 | 0.839493 | 2106 | 0.00304 | 0.019249 | 0.610898 |

【表２７－４】

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 188 | 0.037709 | 0.026875 | 0.671188 | 759 | 0.031242 | 0.159577 | 0.186227 | 1491 | 0.002835 | 0.016415 | 0.616515 | 2107 | 0.003086 | 0.020481 | 0.726218 |
| 189 | 0.037762 | 0.027089 | 0.52406 | 761 | 0.043353 | 0.146524 | 0.225515 | 1492 | 0.00337 | 0.017996 | 0.87573 | 2108 | 0.003083 | 0.01979 | 0.699435 |
| 190 | 0.03731 | 0.026211 | 0.418576 | 762 | 0.007574 | 0.030242 | 0.208583 | 1493 | 0.002838 | 0.016276 | 0.706791 | 2109 | 0.003083 | 0.019528 | 0.595743 |
| 191 | 0.038235 | 0.02599 | 0.484504 | 763 | 0.008587 | 0.032455 | 0.1986 | 1494 | 0.002936 | 0.016453 | 0.886075 | 2110 | 0.003043 | 0.01985 | 0.811218 |
| 192 | 0.039939 | 0.027233 | 0.483419 | 764 | 0.008102 | 0.033408 | 0.169696 | 1496 | 0.003021 | 0.016335 | 0.634456 | 2111 | 0.003105 | 0.019319 | 0.486517 |
| 194 | 0.020192 | 0.00648 | 0.519074 | 765 | 0.008951 | 0.03922 | 0.17488 | 1497 | 0.002921 | 0.016072 | 0.841508 | 2112 | 0.003041 | 0.018937 | 0.51889 |
| 195 | 0.019531 | 0.006334 | 0.376436 | 766 | 0.018024 | 0.295069 | 0.205724 | 1498 | 0.002932 | 0.016361 | 0.582778 | 2113 | 0.00304 | 0.019069 | 0.468082 |
| 196 | 0.019542 | 0.00641 | 0.498646 | 767 | 0.124411 | 0.768264 | 0.418591 | 1499 | 0.002819 | 0.017478 | 0.948983 | 2114 | 0.003108 | 0.018998 | 0.482694 |
| 197 | 0.019244 | 0.006324 | 0.402627 | 768 | 0.008208 | 0.036795 | 0.183375 | 1500 | 0.003006 | 0.017306 | 0.604048 | 2115 | 0.00313 | 0.019507 | 0.554585 |
| 198 | 0.018573 | 0.006291 | 0.419065 | 769 | 0.036346 | 0.37833 | 0.238709 | 1501 | 0.002807 | 0.016489 | 0.785628 | 2116 | 0.003166 | 0.020002 | 0.7362 |
| 199 | 0.019198 | 0.006785 | 0.34161 | 770 | 0.279379 | 1.535747 | 0.723481 | 1502 | 0.002769 | 0.015804 | 0.755524 | 2118 | 0.003188 | 0.01935 | 0.596176 |
| 200 | 0.019364 | 0.00696 | 0.385662 | 771 | 0.643475 | 0.520238 | 0.45387 | 1503 | 0.002882 | 0.016466 | 0.819839 | 2119 | 0.003134 | 0.019993 | 0.637627 |
| 201 | 0.020124 | 0.006802 | 0.336954 | 772 | 0.014665 | 0.047355 | 0.166823 | 1504 | 0.003412 | 0.016569 | 0.709579 | 2120 | 0.003081 | 0.019437 | 0.678214 |
| 202 | 0.019957 | 0.006958 | 0.433697 | 773 | 0.468419 | 2.022633 | 0.735404 | 1505 | 0.003997 | 0.017625 | 0.888899 | 2121 | 0.003146 | 0.019336 | 0.60839 |
| 203 | 0.019453 | 0.006298 | 0.462718 | 774 | 0.362808 | 1.622526 | 0.436049 | 1506 | 0.00289 | 0.017248 | 0.894677 | 2122 | 0.003065 | 0.019235 | 0.499429 |
| 204 | 0.019494 | 0.006471 | 0.441202 | 775 | 0.008859 | 0.038937 | 0.134732 | 1507 | 0.002795 | 0.01699 | 0.79213 | 2124 | 0.003203 | 0.019847 | 0.557828 |
| 205 | 0.019442 | 0.006373 | 0.629439 | 776 | 0.311065 | 0.985297 | 0.574464 | 1508 | 0.002911 | 0.016103 | 0.775025 | 2125 | 0.003239 | 0.02001 | 0.552858 |
| 206 | 0.018867 | 0.006885 | 0.374898 | 777 | 0.039862 | 0.065683 | 0.181863 | 1509 | 0.002935 | 0.016148 | 0.746427 | 2126 | 0.003195 | 0.019259 | 0.656 |
| 207 | 0.01914 | 0.006134 | 0.460931 | 779 | 0.123206 | 0.450318 | 0.697269 | 1510 | 0.002847 | 0.016713 | 0.598686 | 2127 | 0.003154 | 0.019186 | 0.483088 |
| 208 | 0.018981 | 0.006092 | 0.433478 | 780 | 0.006814 | 0.029606 | 0.249389 | 1511 | 0.002895 | 0.016502 | 0.768356 | 2129 | 0.003119 | 0.019051 | 0.620213 |
| 209 | 0.019624 | 0.006283 | 0.410556 | 781 | 0.009967 | 0.031473 | 0.286858 | 1512 | 0.003954 | 0.017185 | 0.677016 | 2130 | 0.003123 | 0.019615 | 0.424395 |
| 210 | 0.019591 | 0.007049 | 0.588881 | 782 | 0.777497 | 1.325239 | 0.830948 | 1514 | 0.002815 | 0.027933 | 0.931244 | 2134 | 0.003217 | 0.019331 | 0.536501 |
| 211 | 0.019397 | 0.006595 | 0.542165 | 783 | 0.587889 | 1.292049 | 1.019843 | 1515 | 0.002933 | 0.027695 | 0.651567 | 2135 | 0.003065 | 0.019226 | 0.52152 |
| 212 | 0.019568 | 0.00626 | 0.532913 | 784 | 0.387894 | 0.821784 | 0.97539 | 1516 | 0.002785 | 0.026655 | 0.652685 | 2137 | 0.003178 | 0.018652 | 0.698231 |
| 213 | 0.018989 | 0.006333 | 0.547859 | 786 | 0.120025 | 0.185762 | 0.380872 | 1517 | 0.002783 | 0.027738 | 0.565322 | 2138 | 0.003168 | 0.019197 | 0.587975 |
| 214 | 0.01915 | 0.006268 | 0.425401 | 787 | 0.235698 | 0.942409 | 1.240669 | 1518 | 0.002828 | 0.026694 | 0.631511 | 2140 | 0.003216 | 0.019528 | 0.625389 |
| 216 | 0.019187 | 0.006268 | 0.524257 | 788 | 0.336218 | 1.269178 | 0.957619 | 1519 | 0.002834 | 0.027337 | 0.66479 | 2141 | 0.00316 | 0.019709 | 0.682383 |
| 217 | 0.019397 | 0.006238 | 0.390937 | 789 | 0.01732 | 0.096762 | 0.304029 | 1520 | 0.003453 | 0.028188 | 0.710203 | 2142 | 0.003241 | 0.019746 | 0.516585 |
| 218 | 0.019339 | 0.006206 | 0.494667 | 791 | 0.617079 | 1.629033 | 1.466181 | 1521 | 0.002992 | 0.026775 | 0.61482 | 2143 | 0.00322 | 0.019625 | 0.613552 |
| 219 | 0.018624 | 0.00708 | 0.490922 | 792 | 0.185997 | 0.704769 | 0.536405 | 1522 | 0.003072 | 0.028592 | 0.83538 | 2144 | 0.003175 | 0.018746 | 0.700146 |

【表２７－５】

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 220 | 0.019181 | 0.006335 | 0.474431 | 793 | 0.877167 | 1.831368 | 1.454354 | 1523 | 0.003473 | 0.028775 | 0.571612 | 2145 | 0.003151 | 0.019352 | 0.390091 |
| 221 | 0.019256 | 0.006244 | 0.457017 | 794 | 0.009408 | 0.076964 | 0.311169 | 1524 | 0.002805 | 0.027075 | 0.704035 | 2146 | 0.003246 | 0.019676 | 0.504855 |
| 222 | 0.019112 | 0.006315 | 0.449704 | 795 | 0.099921 | 0.429592 | 0.632075 | 1525 | 0.003615 | 0.030549 | 0.735642 | 2147 | 0.00315 | 0.018806 | 0.691577 |
| 223 | 0.01928 | 0.006732 | 0.413984 | 796 | 0.094809 | 0.536362 | 0.432216 | 1526 | 0.002812 | 0.027292 | 0.770641 | 2148 | 0.00327 | 0.020065 | 0.647184 |
| 224 | 0.019162 | 0.006106 | 0.445024 | 797 | 0.244954 | 0.482612 | 0.621421 | 1527 | 0.00283 | 0.026705 | 0.696095 | 2149 | 0.003318 | 0.019742 | 0.593045 |
| 225 | 0.019165 | 0.006185 | 0.408971 | 798 | 0.017916 | 0.084297 | 0.371982 | 1528 | 0.002794 | 0.026616 | 0.600694 | 2150 | 0.003295 | 0.019112 | 0.545147 |
| 226 | 0.018975 | 0.006285 | 0.510492 | 799 | 0.012818 | 0.047289 | 0.29833 | 1529 | 0.002883 | 0.026458 | 0.557503 | 2151 | 0.003222 | 0.019324 | 0.623487 |
| 227 | 0.019522 | 0.007133 | 0.437234 | 800 | 0.011675 | 0.13481 | 0.297163 | 1530 | 0.002978 | 0.028069 | 0.812791 | 2153 | 0.003163 | 0.019031 | 0.622529 |
| 228 | 0.019859 | 0.006494 | 0.570592 | 801 | 0.099266 | 0.273608 | 0.403125 | 1532 | 0.002984 | 0.027308 | 0.532545 | 2154 | 0.003097 | 0.019212 | 0.412396 |
| 229 | 0.019454 | 0.006315 | 0.473748 | 802 | 0.367887 | 1.18793 | 0.85394 | 1533 | 0.00285 | 0.02682 | 0.563657 | 2155 | 0.003183 | 0.018864 | 0.628595 |
| 230 | 0.018871 | 0.006278 | 0.51804 | 803 | 0.006742 | 0.027036 | 0.289538 | 1534 | 0.002846 | 0.02764 | 0.746323 | 2157 | 0.003208 | 0.019445 | 0.512846 |
| 231 | 0.019655 | 0.006844 | 0.511603 | 804 | 0.059456 | 0.162059 | 0.353715 | 1536 | 0.002799 | 0.027063 | 0.751124 | 2158 | 0.00328 | 0.020175 | 0.608198 |
| 232 | 0.019285 | 0.006225 | 0.565024 | 805 | 0.01413 | 0.033509 | 0.294557 | 1537 | 0.002812 | 0.02665 | 0.629611 | 2159 | 0.00605 | 0.027206 | 0.523008 |
| 233 | 0.019316 | 0.006211 | 0.442953 | 806 | 0.518086 | 1.610542 | 0.760268 | 1538 | 0.002753 | 0.026783 | 0.503323 | 2160 | 0.003294 | 0.019204 | 0.60676 |
| 235 | 0.019002 | 0.007102 | 0.395003 | 807 | 0.022595 | 0.066194 | 0.294225 | 1539 | 0.002909 | 0.027333 | 0.504615 | 2161 | 0.003175 | 0.019186 | 0.58493 |
| 236 | 0.018841 | 0.006315 | 0.509341 | 808 | 0.459064 | 1.277287 | 1.042237 | 1540 | 0.002819 | 0.027702 | 0.694792 | 2162 | 0.003073 | 0.018774 | 0.676172 |
| 237 | 0.019316 | 0.006327 | 0.318761 | 810 | 0.012544 | 0.05468 | 0.274167 | 1541 | 0.002759 | 0.02709 | 0.560466 | 2163 | 0.003213 | 0.026017 | 0.717037 |
| 238 | 0.019395 | 0.007836 | 0.596039 | 811 | 0.151174 | 0.538166 | 0.417778 | 1542 | 0.002733 | 0.027285 | 0.651773 | 2164 | 0.003146 | 0.019228 | 0.629069 |
| 239 | 0.019249 | 0.006356 | 0.413194 | 812 | 0.006597 | 0.025521 | 0.283047 | 1543 | 0.002765 | 0.026253 | 0.573015 | 2165 | 0.003177 | 0.019712 | 0.651398 |
| 241 | 0.019155 | 0.006661 | 0.275657 | 813 | 0.00961 | 0.027888 | 0.286255 | 1544 | 0.002706 | 0.027092 | 0.654941 | 2166 | 0.015226 | 0.067595 | 0.77104 |
| 242 | 0.019203 | 0.006108 | 0.443553 | 814 | 0.048257 | 0.855988 | 0.357851 | 1545 | 0.002874 | 0.026632 | 0.714128 | 2168 | 0.003259 | 0.019199 | 0.709717 |
| 243 | 0.019402 | 0.006124 | 0.451916 | 815 | 0.008921 | 0.03568 | 0.252635 | 1546 | 0.00294 | 0.027778 | 0.636466 | 2169 | 0.003096 | 0.019088 | 0.552215 |
| 244 | 0.018854 | 0.007129 | 0.467265 | 816 | 0.39553 | 1.021138 | 0.918671 | 1548 | 0.00279 | 0.028079 | 0.706656 | 2170 | 0.003193 | 0.019073 | 0.843088 |
| 245 | 0.019175 | 0.006401 | 0.543468 | 817 | 0.123764 | 0.912411 | 0.462477 | 1549 | 0.002731 | 0.027168 | 0.522207 | 2171 | 0.003203 | 0.018715 | 0.663203 |
| 246 | 0.019056 | 0.007055 | 0.4824 | 818 | 0.007052 | 0.060048 | 0.259581 | 1550 | 0.002677 | 0.027476 | 0.696415 | 2173 | 0.003078 | 0.018872 | 0.596725 |
| 247 | 0.018824 | 0.006353 | 0.484173 | 820 | 0.595672 | 0.572794 | 2.367059 | 1551 | 0.002816 | 0.027408 | 0.60935 | 2174 | 0.003215 | 0.019295 | 0.586757 |
| 248 | 0.019655 | 0.006175 | 0.368398 | 821 | 0.027009 | 0.077125 | 0.292614 | 1552 | 0.002864 | 0.027019 | 0.564324 | 2175 | 0.003355 | 0.020379 | 0.591717 |
| 249 | 0.01946 | 0.006185 | 0.396805 | 822 | 0.006996 | 0.035426 | 0.27968 | 1553 | 0.00289 | 0.027219 | 0.656982 | 2176 | 0.00331 | 0.020075 | 0.621581 |
| 250 | 0.019 | 0.006117 | 0.480145 | 823 | 0.61953 | 2.009281 | 0.808006 | 1554 | 0.002904 | 0.027245 | 0.709589 | 2178 | 0.003288 | 0.019762 | 0.563754 |
| 252 | 0.01904 | 0.007513 | 0.39182 | 824 | 0.078118 | 0.029309 | 0.329722 | 1555 | 0.002857 | 0.027357 | 0.770251 | 2179 | 0.023311 | 0.108889 | 0.634632 |

【表２７－６】

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 253 | 0.018899 | 0.006977 | 0.575079 | 825 | 0.038471 | 0.505871 | 0.321534 | 1556 | 0.002779 | 0.027449 | 0.600841 | 2180 | 0.003154 | 0.018821 | 0.582331 |
| 254 | 0.019338 | 0.006347 | 0.526008 | 826 | 0.214307 | 1.236203 | 0.710454 | 1557 | 0.002804 | 0.027851 | 0.819866 | 2181 | 0.003174 | 0.019114 | 0.467664 |
| 255 | 0.019193 | 0.006255 | 0.287479 | 827 | 0.187119 | 1.091001 | 0.678169 | 1558 | 0.002822 | 0.027061 | 0.698614 | 2182 | 0.003295 | 0.019446 | 0.780908 |
| 256 | 0.019022 | 0.006292 | 0.433444 | 828 | 0.008155 | 0.032836 | 0.286114 | 1559 | 0.002789 | 0.026908 | 0.526565 | 2183 | 0.003253 | 0.01977 | 0.567795 |
| 257 | 0.01915 | 0.006647 | 0.428502 | 829 | 0.043091 | 0.374192 | 0.385331 | 1560 | 0.002867 | 0.02696 | 0.567773 | 2184 | 0.003242 | 0.020002 | 0.791142 |
| 258 | 0.019567 | 0.006018 | 0.468423 | 830 | 0.227057 | 0.993627 | 0.956788 | 1561 | 0.002954 | 0.026183 | 0.535325 | 2185 | 0.003168 | 0.019575 | 0.775637 |
| 259 | 0.019534 | 0.006067 | 0.58953 | 831 | 0.111249 | 0.782791 | 0.514752 | 1562 | 0.002832 | 0.028297 | 0.591001 | 2186 | 0.003096 | 0.018948 | 0.568767 |
| 260 | 0.019436 | 0.007053 | 0.357243 | 832 | 0.007741 | 0.034744 | 0.240929 | 1563 | 0.002851 | 0.026715 | 0.518507 | 2187 | 0.003259 | 0.019195 | 0.523207 |
| 261 | 0.019714 | 0.006449 | 0.480901 | 833 | 0.148308 | 1.302523 | 0.621108 | 1564 | 0.002773 | 0.027867 | 0.574878 | 2188 | 0.003153 | 0.019022 | 0.565014 |
| 262 | 0.018951 | 0.006418 | 0.40858 | 834 | 0.050544 | 0.635099 | 0.432155 | 1565 | 0.002829 | 0.027062 | 0.707218 | 2189 | 0.003154 | 0.019989 | 0.535538 |
| 263 | 0.019192 | 0.006212 | 0.560046 | 835 | 0.107654 | 0.475431 | 0.419748 | 1566 | 0.002787 | 0.027944 | 0.60274 | 2190 | 0.003524 | 0.019646 | 0.64781 |
| 264 | 0.019612 | 0.006356 | 0.552301 | 836 | 0.332776 | 1.197718 | 0.712195 | 1567 | 0.002789 | 0.026836 | 0.681669 | 2191 | 0.004391 | 0.020707 | 0.675903 |
| 265 | 0.019321 | 0.006195 | 0.401567 | 837 | 0.007024 | 0.02723 | 0.249139 | 1568 | 0.002819 | 0.026247 | 0.679288 | 2192 | 0.00296 | 0.020679 | 0.695385 |
| 266 | 0.019369 | 0.006648 | 0.604516 | 839 | 0.541139 | 1.487877 | 1.280705 | 1569 | 0.00288 | 0.026881 | 0.755689 | 2193 | 0.00312 | 0.019868 | 0.56865 |
| 267 | 0.019151 | 0.006684 | 0.464703 | 840 | 0.434719 | 1.514761 | 1.27396 | 1570 | 0.002853 | 0.026701 | 0.743775 | 2194 | 0.003186 | 0.020148 | 0.67523 |
| 268 | 0.018286 | 0.007032 | 0.4753 | 841 | 0.268407 | 1.048218 | 0.711256 | 1571 | 0.002811 | 0.027011 | 0.525869 | 2195 | 0.003131 | 0.019043 | 0.529032 |
| 269 | 0.01937 | 0.006374 | 0.5176 | 842 | 0.258458 | 1.028083 | 0.818548 | 1572 | 0.00285 | 0.027158 | 0.513429 | 2196 | 0.003166 | 0.020125 | 0.702299 |
| 270 | 0.019261 | 0.006259 | 0.499406 | 843 | 0.211266 | 0.691019 | 1.864166 | 1573 | 0.002801 | 0.027285 | 0.801479 | 2197 | 0.003391 | 0.019802 | 0.716997 |
| 271 | 0.019395 | 0.00619 | 0.412264 | 846 | 0.14662 | 0.821729 | 1.1122 | 1574 | 0.00283 | 0.026694 | 0.625502 | 2198 | 0.007135 | 0.025543 | 0.647545 |
| 272 | 0.018911 | 0.006199 | 0.421016 | 847 | 0.386867 | 1.568454 | 0.669131 | 1575 | 0.002879 | 0.026776 | 0.59054 | 2200 | 0.006172 | 0.047972 | 0.218144 |
| 274 | 0.019303 | 0.006349 | 0.455375 | 848 | 0.080316 | 0.56734 | 0.850772 | 1576 | 0.002797 | 0.026677 | 0.838621 | 2201 | 0.006242 | 0.04465 | 0.132477 |
| 276 | 0.019357 | 0.006325 | 0.376791 | 849 | 0.25383 | 1.721732 | 0.602704 | 1577 | 0.003048 | 0.027552 | 0.622979 | 2202 | 0.00613 | 0.045688 | 0.181752 |
| 278 | 0.019529 | 0.006257 | 0.583499 | 850 | 0.526909 | 1.78363 | 0.891613 | 1578 | 0.002889 | 0.027386 | 0.598139 | 2203 | 0.006068 | 0.046964 | 0.152828 |
| 279 | 0.019217 | 0.006392 | 0.4111 | 851 | 0.116222 | 0.76078 | 0.77039 | 1579 | 0.002955 | 0.027358 | 0.491017 | 2204 | 0.005921 | 0.046084 | 0.14141 |
| 281 | 0.019185 | 0.006136 | 0.587463 | 852 | 0.206702 | 0.560921 | 1.415325 | 1580 | 0.002857 | 0.026945 | 0.435188 | 2205 | 0.006157 | 0.046238 | 0.191263 |
| 282 | 0.019681 | 0.006236 | 0.688522 | 853 | 0.238304 | 1.081284 | 0.677935 | 1581 | 0.002782 | 0.02785 | 0.477584 | 2206 | 0.006136 | 0.046016 | 0.190921 |
| 283 | 0.020003 | 0.006456 | 0.361814 | 854 | 0.053709 | 0.430447 | 0.580549 | 1582 | 0.00277 | 0.026769 | 0.585209 | 2207 | 0.005964 | 0.047186 | 0.153246 |
| 284 | 0.021001 | 0.008113 | 0.463016 | 855 | 0.218825 | 0.941552 | 0.664315 | 1583 | 0.002882 | 0.027091 | 0.705566 | 2208 | 0.006177 | 0.047117 | 0.155879 |
| 285 | 0.019166 | 0.006828 | 0.350735 | 856 | 0.101452 | 0.224533 | 0.577448 | 1584 | 0.002823 | 0.026051 | 0.588066 | 2210 | 0.006352 | 0.043635 | 0.146858 |
| 286 | 0.019521 | 0.006951 | 0.480012 | 857 | 0.417144 | 0.902022 | 1.306233 | 1585 | 0.003011 | 0.02627 | 0.645734 | 2211 | 0.006108 | 0.044772 | 0.155641 |

【表２７－７】

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 287 | 0.019513 | 0.006754 | 0.469042 | 858 | 0.03876 | 0.729869 | 0.32705 | 1586 | 0.002783 | 0.027931 | 0.509146 | 2212 | 0.006024 | 0.045543 | 0.142517 |
| 288 | 0.018469 | 0.006294 | 0.484396 | 859 | 0.007745 | 0.034045 | 0.25266 | 1587 | 0.002834 | 0.027194 | 0.594226 | 2213 | 0.005939 | 0.046344 | 0.143164 |
| 289 | 0.019434 | 0.006129 | 0.551443 | 860 | 0.008348 | 0.045165 | 0.274574 | 1588 | 0.002788 | 0.027098 | 0.522658 | 2214 | 0.006222 | 0.04614 | 0.192484 |
| 290 | 0.019277 | 0.006906 | 0.508385 | 861 | 0.594983 | 1.639781 | 1.271579 | 1589 | 0.002909 | 0.027134 | 0.76665 | 2215 | 0.006083 | 0.047678 | 0.16743 |
| 291 | 0.021833 | 0.009489 | 0.384556 | 862 | 0.900769 | 1.57937 | 1.004981 | 1590 | 0.002772 | 0.026947 | 0.590476 | 2216 | 0.006163 | 0.053998 | 0.13437 |
| 293 | 0.01252 | 0.006427 | 0.356902 | 863 | 0.537996 | 1.331377 | 1.261956 | 1592 | 0.002841 | 0.026809 | 0.671333 | 2217 | 0.006135 | 0.045467 | 0.137485 |
| 294 | 0.011884 | 0.006276 | 0.322886 | 864 | 0.388698 | 0.891772 | 1.285634 | 1593 | 0.002895 | 0.026378 | 0.470406 | 2218 | 0.006112 | 0.046402 | 0.156384 |
| 295 | 0.012392 | 0.00627 | 0.447166 | 865 | 0.264661 | 1.079879 | 0.864063 | 1594 | 0.00308 | 0.026761 | 0.571625 | 2219 | 0.006181 | 0.046612 | 0.162334 |
| 297 | 0.012283 | 0.00621 | 0.567064 | 866 | 0.06028 | 0.22964 | 0.478783 | 1595 | 0.00292 | 0.026874 | 0.592748 | 2220 | 0.006096 | 0.050543 | 0.162733 |
| 298 | 0.012177 | 0.006287 | 0.464133 | 867 | 0.239258 | 0.716616 | 0.710261 | 1596 | 0.002734 | 0.02666 | 0.615701 | 2221 | 0.006186 | 0.047334 | 0.152158 |
| 299 | 0.012284 | 0.006151 | 0.348391 | 868 | 0.008279 | 0.030116 | 0.264729 | 1597 | 0.00288 | 0.026918 | 0.694078 | 2222 | 0.006075 | 0.047502 | 0.194765 |
| 300 | 0.012339 | 0.006071 | 0.502548 | 870 | 0.345182 | 0.941026 | 1.084312 | 1598 | 0.002796 | 0.028141 | 0.728341 | 2223 | 0.006029 | 0.046467 | 0.137691 |
| 301 | 0.012495 | 0.007116 | 0.35649 | 871 | 0.381332 | 0.702232 | 1.235897 | 1599 | 0.003183 | 0.027135 | 0.584021 | 2224 | 0.006314 | 0.055065 | 0.20807 |
| 302 | 0.01222 | 0.006362 | 0.411845 | 872 | 0.007184 | 0.0288 | 0.280018 | 1600 | 0.003303 | 0.02835 | 0.463076 | 2226 | 0.006294 | 0.045913 | 0.209723 |
| 303 | 0.012195 | 0.006278 | 0.26423 | 873 | 0.011191 | 0.037242 | 0.285839 | 1601 | 0.003179 | 0.02638 | 0.376498 | 2227 | 0.006684 | 0.046979 | 0.190792 |
| 304 | 0.012215 | 0.006262 | 0.552091 | 874 | 0.149494 | 0.617071 | 1.476994 | 1602 | 0.004066 | 0.027302 | 0.787392 | 2228 | 0.006095 | 0.04607 | 0.165137 |
| 305 | 0.01249 | 0.006788 | 0.42767 | 875 | 0.172408 | 0.907391 | 0.867952 | 1603 | 0.003293 | 0.027454 | 0.565816 | 2229 | 0.006403 | 0.052747 | 0.16783 |
| 306 | 0.012402 | 0.006165 | 0.371097 | 876 | 0.462175 | 1.088865 | 1.306636 | 1604 | 0.002846 | 0.02701 | 0.748421 | 2231 | 0.006318 | 0.047325 | 0.120074 |
| 307 | 0.012281 | 0.006139 | 0.520864 | 878 | 0.010338 | 0.034189 | 0.216719 | 1605 | 0.005887 | 0.032685 | 0.622649 | 2232 | 0.006136 | 0.047645 | 0.154048 |
| 308 | 0.012497 | 0.00617 | 0.397038 | 879 | 0.004925 | 0.019286 | 0.108567 | 1606 | 0.002889 | 0.02704 | 0.56754 | 2233 | 0.008079 | 0.057783 | 0.168608 |
| 309 | 0.012793 | 0.006274 | 0.245538 | 881 | 0.005183 | 0.020939 | 0.088123 | 1607 | 0.002831 | 0.026806 | 0.743947 | 2234 | 0.006343 | 0.048289 | 0.130913 |
| 310 | 0.012404 | 0.006334 | 0.348876 | 882 | 0.005094 | 0.020658 | 0.090945 | 1608 | 0.002965 | 0.027359 | 0.760013 | 2238 | 0.006235 | 0.046307 | 0.168547 |
| 311 | 0.012122 | 0.006441 | 0.294773 | 883 | 0.005435 | 0.022801 | 0.085715 | 1609 | 0.00396 | 0.027561 | 0.674454 | 2239 | 0.006246 | 0.046488 | 0.140553 |
| 312 | 0.012249 | 0.006229 | 0.325353 | 884 | 0.150855 | 0.669518 | 0.216276 | 1611 | 0.008586 | 0.075287 | 0.257982 | 2241 | 0.006379 | 0.054148 | 0.24124 |
| 313 | 0.012563 | 0.006174 | 0.365834 | 885 | 0.352227 | 0.729722 | 0.522431 | 1612 | 0.009539 | 0.076797 | 0.197109 | 2242 | 0.006455 | 0.047961 | 0.131922 |
| 314 | 0.012287 | 0.006596 | 0.462958 | 886 | 0.00519 | 0.04764 | 0.094334 | 1613 | 0.008018 | 0.072467 | 0.231769 | 2243 | 0.006337 | 0.046456 | 0.186051 |
| 315 | 0.012275 | 0.006142 | 0.298952 | 887 | 0.006618 | 0.067628 | 0.098385 | 1614 | 0.012023 | 0.075871 | 0.172221 | 2244 | 0.006203 | 0.045602 | 0.125512 |
| 316 | 0.012716 | 0.007565 | 0.34122 | 888 | 0.689507 | 1.833727 | 0.663895 | 1615 | 0.008328 | 0.071072 | 0.220705 | 2245 | 0.006499 | 0.057369 | 0.154019 |
| 317 | 0.012291 | 0.006397 | 0.309566 | 889 | 0.192102 | 1.196074 | 0.344485 | 1616 | 0.012023 | 0.075453 | 0.25357 | 2246 | 0.006248 | 0.056398 | 0.149261 |
| 318 | 0.012115 | 0.006393 | 0.329808 | 890 | 0.348046 | 1.61085 | 0.692815 | 1617 | 0.012384 | 0.075749 | 0.189438 | 2247 | 0.006307 | 0.046397 | 0.228139 |

【表２７－８】

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 319 | 0.01227 | 0.008317 | 0.304387 | 891 | 0.080898 | 0.580847 | 0.200646 | 1618 | 0.009907 | 0.074134 | 0.228244 | 2248 | 0.006168 | 0.047874 | 0.112137 |
| 320 | 0.012221 | 0.006647 | 0.328903 | 892 | 0.044425 | 0.718329 | 0.121203 | 1621 | 0.007789 | 0.070227 | 0.245667 | 2249 | 0.006196 | 0.046805 | 0.155686 |
| 321 | 0.012186 | 0.007163 | 0.399922 | 893 | 0.382721 | 0.843293 | 0.376432 | 1622 | 0.008908 | 0.072407 | 0.245921 | 2250 | 0.00895 | 0.054401 | 0.183022 |
| 322 | 0.015035 | 0.031123 | 0.376798 | 894 | 0.068781 | 0.640743 | 0.21479 | 1623 | 0.011175 | 0.077951 | 0.188074 | 2251 | 0.00639 | 0.045554 | 0.169424 |
| 323 | 0.012308 | 0.006096 | 0.237291 | 896 | 0.014415 | 0.055218 | 0.107079 | 1624 | 0.008036 | 0.069872 | 0.246323 | 2252 | 0.006125 | 0.046755 | 0.150411 |
| 324 | 0.01192 | 0.006316 | 0.405807 | 897 | 0.00687 | 0.027706 | 0.094585 | 1625 | 0.011073 | 0.074178 | 0.233123 | 2253 | 0.00622 | 0.053633 | 0.191924 |
| 325 | 0.012466 | 0.00625 | 0.493302 | 898 | 0.286212 | 1.357183 | 0.357932 | 1626 | 0.012397 | 0.076047 | 0.205037 | 2254 | 0.006108 | 0.046631 | 0.13209 |
| 328 | 0.012498 | 0.00643 | 0.514255 | 899 | 0.297653 | 1.1528 | 0.302755 | 1627 | 0.01196 | 0.082003 | 0.236073 | 2255 | 0.00633 | 0.04723 | 0.135853 |
| 329 | 0.012432 | 0.006216 | 0.374611 | 900 | 0.327981 | 0.932419 | 0.386499 | 1628 | 0.008087 | 0.073661 | 0.162851 | 2256 | 0.006144 | 0.061456 | 0.112837 |
| 330 | 0.012053 | 0.006128 | 0.420442 | 901 | 0.010727 | 0.05943 | 0.088041 | 1629 | 0.009228 | 0.071361 | 0.1983 | 2257 | 0.006404 | 0.047664 | 0.179404 |
| 331 | 0.012416 | 0.006082 | 0.375976 | 902 | 0.350484 | 1.180504 | 0.40489 | 1630 | 0.00787 | 0.068021 | 0.252184 | 2258 | 0.00629 | 0.04559 | 0.115119 |
| 332 | 0.01236 | 0.006301 | 0.525602 | 903 | 0.374566 | 1.622565 | 0.396166 | 1632 | 0.008463 | 0.070379 | 0.220109 | 2259 | 0.006517 | 0.047495 | 0.139756 |
| 333 | 0.012418 | 0.006263 | 0.410027 | 904 | 0.166397 | 1.049689 | 0.320325 | 1633 | 0.008069 | 0.070751 | 0.186138 | 2260 | 0.006178 | 0.046241 | 0.166521 |
| 334 | 0.011605 | 0.006186 | 0.411457 | 905 | 0.136541 | 0.817688 | 0.362347 | 1634 | 0.010343 | 0.072986 | 0.210934 | 2261 | 0.006256 | 0.047309 | 0.21795 |
| 335 | 0.011728 | 0.006232 | 0.357123 | 906 | 0.291429 | 1.325833 | 0.396889 | 1635 | 0.009638 | 0.077485 | 0.263883 | 2262 | 0.006307 | 0.046961 | 0.155011 |
| 336 | 0.012106 | 0.006323 | 0.380811 | 907 | 0.347797 | 1.267447 | 0.541789 | 1636 | 0.008719 | 0.074615 | 0.259029 | 2263 | 0.006309 | 0.046877 | 0.215311 |
| 337 | 0.012118 | 0.006278 | 0.325981 | 908 | 0.034779 | 0.467747 | 0.163031 | 1637 | 0.008512 | 0.073437 | 0.167086 | 2264 | 0.00632 | 0.047891 | 0.153035 |
| 338 | 0.012218 | 0.006206 | 0.377091 | 909 | 0.164487 | 0.350343 | 0.141732 | 1638 | 0.007929 | 0.072165 | 0.163977 | 2265 | 0.006283 | 0.058641 | 0.211202 |
| 339 | 0.012209 | 0.006258 | 0.32511 | 910 | 0.265078 | 0.886219 | 0.407203 | 1639 | 0.007868 | 0.07025 | 0.216269 | 2266 | 0.006381 | 0.047328 | 0.134896 |
| 340 | 0.012372 | 0.006041 | 0.380202 | 911 | 0.220201 | 0.717038 | 0.423402 | 1640 | 0.010217 | 0.075129 | 0.212716 | 2267 | 0.006567 | 0.045783 | 0.135634 |
| 341 | 0.012382 | 0.00629 | 0.480572 | 912 | 0.186388 | 0.85741 | 0.362314 | 1641 | 0.009846 | 0.072375 | 0.229234 | 2269 | 0.006447 | 0.046908 | 0.133405 |
| 342 | 0.011896 | 0.006308 | 0.348783 | 913 | 0.518467 | 1.762848 | 0.547938 | 1642 | 0.008044 | 0.072899 | 0.146821 | 2270 | 0.006417 | 0.04824 | 0.139725 |
| 343 | 0.01204 | 0.006332 | 0.37449 | 914 | 0.40602 | 1.766605 | 0.454544 | 1643 | 0.007903 | 0.073916 | 0.202451 | 2271 | 0.00618 | 0.046553 | 0.166047 |
| 344 | 0.011928 | 0.006417 | 0.471347 | 915 | 0.163459 | 1.042566 | 0.26138 | 1644 | 0.007997 | 0.072045 | 0.2269 | 2272 | 0.006225 | 0.047393 | 0.160067 |
| 345 | 0.01169 | 0.006267 | 0.36332 | 916 | 0.296433 | 1.092387 | 0.371475 | 1645 | 0.008005 | 0.071968 | 0.225724 | 2273 | 0.006276 | 0.047685 | 0.170297 |
| 346 | 0.012345 | 0.006259 | 0.366717 | 917 | 0.635553 | 1.261914 | 0.549559 | 1646 | 0.007868 | 0.072947 | 0.218694 | 2274 | 0.00624 | 0.04688 | 0.198238 |
| 347 | 0.012182 | 0.006163 | 0.363674 | 918 | 0.291057 | 1.006901 | 0.474071 | 1647 | 0.007874 | 0.07009 | 0.204347 | 2275 | 0.006534 | 0.046315 | 0.157348 |
| 348 | 0.012163 | 0.00616 | 0.444482 | 919 | 0.413799 | 1.246473 | 0.564896 | 1648 | 0.008126 | 0.072838 | 0.231684 | 2276 | 0.007069 | 0.047997 | 0.152782 |
| 349 | 0.012659 | 0.006222 | 0.317343 | 920 | 0.179531 | 1.451147 | 0.495419 | 1649 | 0.007985 | 0.07098 | 0.217341 | 2277 | 0.009026 | 0.05061 | 0.196609 |
| 350 | 0.01182 | 0.006202 | 0.590775 | 921 | 0.178932 | 1.285129 | 0.41161 | 1650 | 0.00805 | 0.073491 | 0.157452 | 2278 | 0.014832 | 0.067865 | 0.14616 |

【表２７－９】

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 351 | 0.011972 | 0.006135 | 0.408389 | 923 | 0.317288 | 1.146979 | 0.387911 | 1651 | 0.008583 | 0.074894 | 0.221222 | 2279 | 0.006428 | 0.046196 | 0.131052 |
| 352 | 0.011885 | 0.006384 | 0.34904 | 924 | 0.273164 | 0.914613 | 0.414757 | 1652 | 0.00782 | 0.073647 | 0.23366 | 2280 | 0.006224 | 0.046989 | 0.145311 |
| 353 | 0.011969 | 0.006398 | 0.336116 | 925 | 0.19808 | 0.725391 | 0.296935 | 1653 | 0.007727 | 0.072533 | 0.274822 | 2281 | 0.006154 | 0.047328 | 0.14968 |
| 354 | 0.012428 | 0.006564 | 0.404646 | 926 | 0.009777 | 0.035042 | 0.100935 | 1654 | 0.007898 | 0.072049 | 0.19207 | 2282 | 0.006248 | 0.046031 | 0.150055 |
| 355 | 0.012092 | 0.006308 | 0.299465 | 927 | 0.436574 | 1.262457 | 0.683576 | 1655 | 0.007809 | 0.072421 | 0.239521 | 2283 | 0.006174 | 0.047343 | 0.163964 |
| 356 | 0.012409 | 0.006126 | 0.356694 | 928 | 0.183262 | 0.813709 | 0.402288 | 1656 | 0.00814 | 0.070844 | 0.233632 | 2284 | 0.008235 | 0.4302 | 0.20482 |
| 357 | 0.012519 | 0.006278 | 0.390957 | 929 | 0.094365 | 0.787482 | 0.213812 | 1657 | 0.008044 | 0.069952 | 0.173161 | 2285 | 1.795726 | 2.705619 | 0.273225 |
| 358 | 0.011963 | 0.006349 | 0.303741 | 930 | 0.009025 | 0.063975 | 0.099171 | 1658 | 0.008147 | 0.070865 | 0.114916 | 2286 | 0.008775 | 0.050342 | 0.1587 |
| 359 | 0.012077 | 0.006261 | 0.334388 | 931 | 0.032034 | 0.095047 | 0.131713 | 1659 | 0.008054 | 0.070011 | 0.234503 | 2287 | 0.00631 | 0.047599 | 0.134257 |
| 360 | 0.012007 | 0.006365 | 0.350437 | 932 | 0.429418 | 1.050149 | 0.621605 | 1660 | 0.008051 | 0.073257 | 0.209313 | 2288 | 0.006544 | 0.046959 | 0.161388 |
| 361 | 0.012282 | 0.007154 | 0.317387 | 933 | 0.0172 | 0.052524 | 0.099638 | 1661 | 0.008006 | 0.073666 | 0.220585 | 2289 | 0.008183 | 0.050593 | 0.141202 |
| 362 | 0.012469 | 0.007445 | 0.472965 | 934 | 0.632772 | 1.169765 | 0.781487 | 1662 | 0.007882 | 0.072722 | 0.194041 | 2290 | 0.006064 | 0.048815 | 0.175503 |
| 363 | 0.012436 | 0.006211 | 0.393245 | 935 | 0.253132 | 1.3481 | 0.278776 | 1663 | 0.0079 | 0.07183 | 0.209789 | 2291 | 0.00618 | 0.046271 | 0.152712 |
| 364 | 0.012106 | 0.006298 | 0.499986 | 936 | 0.170298 | 1.000176 | 0.277753 | 1664 | 0.008074 | 0.069676 | 0.185531 | 2292 | 0.007016 | 0.048265 | 0.181027 |
| 365 | 0.012805 | 0.009062 | 0.426256 | 937 | 0.15824 | 0.84717 | 0.442072 | 1665 | 0.00878 | 0.071074 | 0.21086 | 2293 | 0.008176 | 0.049316 | 0.164933 |
| 366 | 0.01212 | 0.006302 | 0.373071 | 938 | 0.20538 | 0.88334 | 0.432407 | 1666 | 0.007895 | 0.071838 | 0.244376 | 2294 | 0.006486 | 0.048746 | 0.152462 |
| 367 | 0.01206 | 0.006217 | 0.396929 | 939 | 0.224863 | 0.999881 | 0.380371 | 1668 | 0.008053 | 0.072861 | 0.253493 | 2295 | 0.006359 | 0.047944 | 0.131901 |
| 368 | 0.011994 | 0.006227 | 0.438247 | 940 | 0.006178 | 0.021918 | 0.089462 | 1669 | 0.007873 | 0.073223 | 0.198109 | 2296 | 0.00722 | 0.04902 | 0.134938 |
| 369 | 0.011901 | 0.006318 | 0.340287 | 941 | 0.011284 | 0.066173 | 0.115573 | 1670 | 0.007816 | 0.068945 | 0.206857 | 2299 | 0.001841 | 0.021836 | 0.688111 |
| 370 | 0.012341 | 0.007446 | 0.356303 | 942 | 0.173491 | 0.708929 | 0.733394 | 1671 | 0.007989 | 0.071814 | 0.303432 | 2300 | 0.086641 | 0.166328 | 0.690494 |
| 371 | 0.012601 | 0.006237 | 0.447917 | 943 | 0.189128 | 1.089849 | 0.316464 | 1672 | 0.008207 | 0.073024 | 0.222844 | 2301 | 0.001849 | 0.020911 | 0.564046 |
| 372 | 0.012511 | 0.007461 | 0.304352 | 944 | 0.090245 | 0.422225 | 0.480858 | 1673 | 0.008259 | 0.0722 | 0.255081 | 2302 | 0.001837 | 0.020036 | 0.674931 |
| 373 | 0.012419 | 0.006273 | 0.445464 | 946 | 0.230236 | 0.894889 | 0.396333 | 1674 | 0.008145 | 0.071765 | 0.197578 | 2303 | 0.001843 | 0.020641 | 0.808588 |
| 374 | 0.012212 | 0.006298 | 0.325297 | 947 | 0.257151 | 0.909063 | 0.325964 | 1675 | 0.008243 | 0.07316 | 0.202955 | 2304 | 0.001836 | 0.020295 | 0.58194 |
| 375 | 0.012262 | 0.006342 | 0.253124 | 948 | 0.170075 | 0.588195 | 0.260671 | 1676 | 0.008121 | 0.07247 | 0.197388 | 2305 | 0.001822 | 0.020215 | 0.654307 |
| 376 | 0.01206 | 0.00625 | 0.506673 | 949 | 0.187726 | 0.806307 | 0.331384 | 1677 | 0.008023 | 0.071901 | 0.24222 | 2306 | 0.002438 | 0.022581 | 0.736907 |
| 377 | 0.012314 | 0.006239 | 0.391603 | 950 | 0.22905 | 0.942413 | 0.603096 | 1678 | 0.008907 | 0.074766 | 0.187839 | 2307 | 0.00178 | 0.021066 | 0.620358 |
| 378 | 0.011869 | 0.006468 | 0.357757 | 951 | 0.397644 | 0.841753 | 0.3522 | 1679 | 0.007883 | 0.072372 | 0.198258 | 2308 | 0.001832 | 0.020095 | 0.668554 |
| 380 | 0.013014 | 0.007118 | 0.33064 | 952 | 0.049028 | 0.367599 | 0.253907 | 1680 | 0.008303 | 0.07202 | 0.20641 | 2309 | 0.00178 | 0.019898 | 0.763666 |
| 381 | 0.014152 | 0.007984 | 0.444288 | 953 | 0.147509 | 0.791804 | 0.804695 | 1681 | 0.008051 | 0.068996 | 0.172375 | 2310 | 0.003472 | 0.020626 | 0.667713 |

【表２７－１０】

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 382 | 0.012422 | 0.006289 | 0.366077 | 954 | 0.16991 | 0.798194 | 0.475492 | 1682 | 0.008184 | 0.073282 | 0.285672 | 2311 | 0.001796 | 0.019725 | 0.588065 |
| 383 | 0.012649 | 0.0065 | 0.360518 | 955 | 0.264691 | 0.591625 | 0.406549 | 1684 | 0.008361 | 0.072729 | 0.170928 | 2312 | 0.001799 | 0.020161 | 0.680887 |
| 384 | 0.012302 | 0.006376 | 0.350175 | 957 | 0.148218 | 0.602345 | 0.46558 | 1685 | 0.008716 | 0.074393 | 0.222029 | 2313 | 0.001785 | 0.020109 | 0.751756 |
| 385 | 0.012345 | 0.006215 | 0.391858 | 958 | 0.204506 | 0.863187 | 0.592641 | 1686 | 0.008059 | 0.071129 | 0.196348 | 2314 | 0.001785 | 0.020767 | 0.734117 |
| 386 | 0.012388 | 0.006074 | 0.51586 | 959 | 0.255224 | 1.064249 | 0.774381 | 1687 | 0.007953 | 0.070337 | 0.21236 | 2315 | 0.001731 | 0.021027 | 0.575685 |
| 387 | 0.012519 | 0.007024 | 0.397167 | 961 | 0.156063 | 1.110527 | 0.516403 | 1688 | 0.008643 | 0.070881 | 0.227238 | 2316 | 0.001777 | 0.020545 | 0.621465 |
| 388 | 0.013891 | 0.00748 | 0.425872 | 962 | 0.212997 | 1.217959 | 0.365859 | 1689 | 0.007905 | 0.069917 | 0.19241 | 2317 | 0.001726 | 0.020462 | 0.635235 |
| 391 | 0.00426 | 0.025652 | 1.07762 | 963 | 0.0211 | 0.144681 | 0.150198 | 1690 | 0.008127 | 0.072187 | 0.219756 | 2319 | 0.001783 | 0.019558 | 0.623992 |
| 392 | 0.004221 | 0.024819 | 0.967405 | 964 | 0.489565 | 1.57383 | 0.615012 | 1691 | 0.007958 | 0.073297 | 0.230226 | 2320 | 0.001783 | 0.019848 | 0.456169 |
| 393 | 0.004402 | 0.026185 | 1.490273 | 965 | 0.251985 | 0.770085 | 0.522089 | 1692 | 0.00806 | 0.069949 | 0.25326 | 2321 | 0.001819 | 0.019947 | 0.557319 |
| 395 | 0.004363 | 0.024306 | 1.116184 | 966 | 0.55303 | 0.923252 | 0.527881 | 1693 | 0.008331 | 0.073454 | 0.232442 | 2322 | 0.001816 | 0.020314 | 0.849308 |
| 396 | 0.004078 | 0.025204 | 1.218613 | 967 | 0.374958 | 1.224169 | 0.526617 | 1694 | 0.00995 | 0.07389 | 0.245006 | 2323 | 0.001812 | 0.021185 | 0.5437 |
| 397 | 0.004141 | 0.025195 | 1.186671 | 968 | 0.07674 | 0.128785 | 0.431369 | 1695 | 0.00813 | 0.070796 | 0.208166 | 2324 | 0.002117 | 0.021167 | 0.623834 |
| 399 | 0.004058 | 0.025739 | 1.164329 | 969 | 0.186199 | 0.698537 | 0.472067 | 1696 | 0.00828 | 0.070973 | 0.196401 | 2325 | 0.001774 | 0.020086 | 0.705615 |
| 400 | 0.004405 | 0.026216 | 0.849372 | 970 | 0.161868 | 0.595542 | 0.889933 | 1697 | 0.008427 | 0.070372 | 0.211389 | 2326 | 0.001762 | 0.020397 | 0.609166 |
| 401 | 0.004166 | 0.025629 | 1.02162 | 971 | 0.057774 | 0.497863 | 0.206401 | 1698 | 0.010244 | 0.071351 | 0.23418 | 2327 | 0.001838 | 0.019555 | 0.516895 |
| 402 | 0.004116 | 0.025377 | 1.037716 | 972 | 0.089708 | 0.555687 | 0.328706 | 1699 | 0.008127 | 0.071392 | 0.186818 | 2328 | 0.001819 | 0.019407 | 0.566088 |
| 403 | 0.004734 | 0.028736 | 1.197277 | 974 | 0.4611 | 1.588992 | 0.988689 | 1700 | 0.011627 | 0.078038 | 0.216352 | 2329 | 0.001846 | 0.020255 | 0.675583 |
| 404 | 0.004247 | 0.025532 | 0.859999 | 975 | 0.501721 | 1.70434 | 0.729741 | 1701 | 0.008158 | 0.071674 | 0.235836 | 2330 | 0.001822 | 0.020372 | 0.658319 |
| 405 | 0.004301 | 0.025699 | 0.866291 | 976 | 0.468553 | 1.572864 | 0.520521 | 1702 | 0.008405 | 0.072728 | 0.214028 | 2331 | 0.00183 | 0.020907 | 0.712729 |
| 406 | 0.004319 | 0.025744 | 1.453868 | 977 | 0.465145 | 1.349452 | 0.80622 | 1703 | 0.00931 | 0.072866 | 0.24933 | 2332 | 0.001716 | 0.020645 | 0.633101 |
| 407 | 0.00439 | 0.026383 | 0.93497 | 978 | 0.060567 | 1.227042 | 0.179786 | 1704 | 0.00834 | 0.06923 | 0.178878 | 2333 | 0.001761 | 0.020053 | 0.496843 |
| 408 | 0.00535 | 0.032252 | 0.865951 | 980 | 0.649997 | 2.424418 | 0.991253 | 1705 | 0.00998 | 0.07348 | 0.262106 | 2334 | 0.001795 | 0.020116 | 0.470328 |
| 409 | 0.004149 | 0.025932 | 0.961605 | 981 | 0.675473 | 1.395536 | 0.799773 | 1707 | 0.004095 | 0.007786 | 0.905391 | 2335 | 0.001973 | 0.019994 | 0.69908 |
| 410 | 0.004251 | 0.025634 | 1.117515 | 982 | 0.493201 | 1.634458 | 0.836638 | 1708 | 0.00319 | 0.007636 | 0.918093 | 2336 | 0.002355 | 0.021316 | 0.639826 |
| 411 | 0.004339 | 0.025073 | 1.08764 | 983 | 0.6355 | 4.406334 | 0.657997 | 1710 | 0.003179 | 0.007381 | 0.810737 | 2337 | 0.002071 | 0.019995 | 0.717695 |
| 412 | 0.004524 | 0.025372 | 0.873893 | 984 | 0.622337 | 2.861176 | 0.393731 | 1711 | 0.003206 | 0.007316 | 0.948158 | 2338 | 0.003361 | 0.022952 | 0.608106 |
| 413 | 0.004216 | 0.025102 | 1.007087 | 985 | 0.247394 | 1.921413 | 0.406224 | 1712 | 0.003223 | 0.007633 | 0.992454 | 2339 | 0.002512 | 0.022295 | 0.934816 |
| 414 | 0.004159 | 0.025802 | 0.964101 | 986 | 0.098809 | 1.089629 | 0.184354 | 1713 | 0.003147 | 0.007825 | 1.018484 | 2340 | 0.001872 | 0.02124 | 0.653365 |
| 415 | 0.004389 | 0.025762 | 0.882981 | 987 | 0.47511 | 2.42364 | 0.361921 | 1714 | 0.003156 | 0.007799 | 1.011062 | 2341 | 0.001758 | 0.020188 | 0.628362 |

【表２７－１１】

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 416 | 0.004232 | 0.024642 | 1.018017 | 988 | 0.364262 | 1.773289 | 0.713466 | 1715 | 0.003144 | 0.007846 | 1.03755 | 2342 | 0.00179 | 0.020031 | 0.430364 |
| 417 | 0.004211 | 0.025603 | 0.850283 | 989 | 0.751797 | 1.903482 | 0.467399 | 1716 | 0.003126 | 0.007534 | 0.995065 | 2343 | 0.00225 | 0.021727 | 0.620708 |
| 418 | 0.004341 | 0.025106 | 0.846304 | 992 | 0.251144 | 1.61049 | 0.379502 | 1717 | 0.003303 | 0.008123 | 0.95218 | 2344 | 0.487092 | 1.242389 | 0.705218 |
| 419 | 0.004202 | 0.024844 | 1.080883 | 993 | 0.209284 | 1.691842 | 0.44776 | 1718 | 0.003174 | 0.007598 | 0.739364 | 2346 | 0.62511 | 0.991799 | 0.755326 |
| 420 | 0.004135 | 0.024946 | 0.97078 | 994 | 0.34175 | 2.039731 | 0.798924 | 1720 | 0.003107 | 0.007531 | 0.963791 | 2347 | 0.007601 | 0.031311 | 0.516649 |
| 422 | 0.004459 | 0.025873 | 1.058666 | 995 | 0.560565 | 3.12071 | 0.388763 | 1721 | 0.003184 | 0.007393 | 0.642433 | 2348 | 0.003801 | 0.024391 | 0.44802 |
| 423 | 0.004274 | 0.025787 | 1.226844 | 996 | 0.407642 | 3.358356 | 0.353555 | 1722 | 0.003234 | 0.007679 | 1.087014 | 2349 | 0.001763 | 0.020418 | 0.710152 |
| 424 | 0.004383 | 0.024211 | 0.850711 | 997 | 0.930576 | 2.730102 | 0.497813 | 1723 | 0.003183 | 0.007625 | 0.746413 | 2352 | 0.001967 | 0.020354 | 0.674644 |
| 425 | 0.004319 | 0.025464 | 0.973357 | 998 | 0.325541 | 2.234049 | 0.512623 | 1725 | 0.003166 | 0.00732 | 0.983384 | 2353 | 0.002343 | 0.020885 | 0.451139 |
| 426 | 0.004226 | 0.025422 | 0.838836 | 999 | 0.37115 | 2.362841 | 0.625508 | 1726 | 0.003192 | 0.007532 | 0.92262 | 2354 | 0.005892 | 0.03064 | 0.7194 |
| 427 | 0.004226 | 0.025762 | 0.973639 | 1000 | 0.200748 | 2.565779 | 0.285251 | 1727 | 0.003216 | 0.007484 | 0.718343 | 2355 | 0.002628 | 0.021243 | 0.487594 |
| 428 | 0.004161 | 0.025186 | 0.86052 | 1001 | 0.101767 | 1.532869 | 0.325446 | 1728 | 0.003213 | 0.00725 | 0.952505 | 2356 | 0.002016 | 0.021037 | 0.615679 |
| 429 | 0.004196 | 0.02512 | 1.028343 | 1002 | 0.334714 | 3.270477 | 0.575591 | 1729 | 0.003225 | 0.007421 | 0.911589 | 2357 | 0.002143 | 0.021701 | 0.386956 |
| 430 | 0.004215 | 0.0256 | 1.062937 | 1003 | 0.294501 | 2.785205 | 0.192242 | 1730 | 0.003281 | 0.007498 | 0.995307 | 2358 | 0.00212 | 0.021198 | 0.829166 |
| 431 | 0.00421 | 0.025733 | 1.00445 | 1004 | 0.42759 | 3.329744 | 0.366353 | 1731 | 0.003053 | 0.007481 | 0.950875 | 2359 | 0.001791 | 0.020172 | 0.544619 |
| 433 | 0.004741 | 0.027408 | 0.950117 | 1005 | 0.658112 | 2.554948 | 0.265405 | 1732 | 0.00316 | 0.007479 | 0.757397 | 2360 | 0.001856 | 0.020163 | 0.486583 |
| 434 | 0.004318 | 0.025754 | 1.092758 | 1006 | 0.657566 | 1.865741 | 1.037788 | 1733 | 0.003214 | 0.007451 | 0.940672 | 2361 | 0.001901 | 0.019958 | 0.530139 |
| 435 | 0.004428 | 0.025757 | 1.018609 | 1007 | 0.428267 | 2.664938 | 0.294918 | 1734 | 0.003219 | 0.007427 | 0.893661 | 2362 | 0.001879 | 0.020308 | 0.653006 |
| 436 | 0.004163 | 0.02512 | 0.727576 | 1008 | 0.123986 | 1.595956 | 0.302035 | 1735 | 0.003254 | 0.007528 | 0.836399 | 2363 | 0.001922 | 0.020067 | 0.590144 |
| 437 | 0.004243 | 0.025229 | 0.780294 | 1009 | 0.274442 | 2.817702 | 0.287299 | 1737 | 0.003227 | 0.007374 | 0.911326 | 2364 | 0.001837 | 0.02092 | 0.592571 |
| 438 | 0.00418 | 0.026218 | 1.039505 | 1010 | 0.238204 | 3.007669 | 0.358667 | 1738 | 0.003214 | 0.007477 | 1.002511 | 2365 | 0.001792 | 0.020929 | 0.551517 |
| 439 | 0.004887 | 0.026537 | 1.117939 | 1011 | 0.329633 | 2.440677 | 0.33232 | 1739 | 0.00327 | 0.008719 | 0.956423 | 2366 | 0.001791 | 0.020276 | 0.562391 |
| 440 | 0.005189 | 0.028072 | 0.889784 | 1012 | 0.374152 | 3.023523 | 0.243111 | 1740 | 0.003147 | 0.007789 | 1.00538 | 2367 | 0.001762 | 0.020237 | 0.490932 |
| 441 | 0.004272 | 0.025361 | 0.836717 | 1013 | 0.040086 | 0.407359 | 0.097212 | 1741 | 0.003279 | 0.007904 | 0.975752 | 2368 | 0.001774 | 0.019958 | 0.581639 |
| 442 | 0.004524 | 0.02738 | 0.921425 | 1014 | 0.650383 | 2.577328 | 0.702306 | 1742 | 0.003162 | 0.007423 | 1.22881 | 2369 | 0.002441 | 0.023886 | 0.442913 |
| 443 | 0.004218 | 0.025148 | 1.162762 | 1015 | 0.556326 | 3.822954 | 0.220832 | 1743 | 0.003139 | 0.007692 | 0.743436 | 2370 | 0.001851 | 0.019744 | 0.597586 |
| 444 | 0.004237 | 0.024847 | 0.728786 | 1016 | 0.286549 | 2.359215 | 0.398523 | 1744 | 0.003205 | 0.007379 | 0.772479 | 2371 | 0.001833 | 0.019874 | 0.780994 |
| 445 | 0.004293 | 0.025134 | 1.175772 | 1017 | 0.391716 | 5.493401 | 0.257803 | 1745 | 0.003182 | 0.007429 | 1.079506 | 2372 | 0.001836 | 0.020828 | 0.624654 |
| 446 | 0.005773 | 0.02595 | 0.999823 | 1018 | 0.232929 | 2.135935 | 0.649378 | 1747 | 0.003253 | 0.0075 | 0.816336 | 2373 | 0.002203 | 0.0221 | 0.648313 |
| 447 | 0.004274 | 0.025853 | 1.006288 | 1019 | 0.28219 | 2.371224 | 0.266729 | 1748 | 0.003362 | 0.008459 | 0.998276 | 2374 | 0.001781 | 0.02029 | 0.477161 |

【表２７－１２】

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 448 | 0.004344 | 0.02546 | 0.863958 | 1020 | 0.51863 | 2.875937 | 0.340747 | 1749 | 0.003015 | 0.007458 | 0.936332 | 2375 | 0.001758 | 0.019773 | 0.487119 |
| 449 | 0.004346 | 0.025705 | 0.920647 | 1021 | 0.330813 | 1.726956 | 0.254804 | 1750 | 0.003212 | 0.008153 | 0.859119 | 2376 | 0.001766 | 0.019771 | 0.526721 |
| 450 | 0.004326 | 0.025476 | 0.816123 | 1022 | 0.017793 | 0.063328 | 0.09479 | 1752 | 0.003259 | 0.007776 | 0.978627 | 2377 | 0.001848 | 0.019724 | 0.617253 |
| 451 | 0.004237 | 0.025069 | 0.846299 | 1023 | 0.632422 | 5.001505 | 0.355245 | 1753 | 0.00325 | 0.007387 | 0.786866 | 2379 | 0.001845 | 0.020022 | 0.490031 |
| 452 | 0.005257 | 0.025596 | 0.800487 | 1024 | 0.18462 | 1.771516 | 0.207356 | 1754 | 0.003162 | 0.006997 | 1.003224 | 2380 | 0.001881 | 0.020903 | 0.584369 |
| 453 | 0.007428 | 0.026513 | 1.037012 | 1025 | 0.252709 | 2.019318 | 0.193805 | 1755 | 0.003259 | 0.007394 | 0.925965 | 2381 | 0.329765 | 0.386006 | 0.504277 |
| 454 | 0.004303 | 0.024553 | 0.94302 | 1026 | 0.266125 | 3.425025 | 0.244887 | 1756 | 0.00318 | 0.007571 | 1.096225 | 2382 | 0.002171 | 0.020794 | 0.601362 |
| 455 | 0.010434 | 0.037939 | 0.690676 | 1027 | 0.333355 | 2.88353 | 0.287246 | 1758 | 0.003337 | 0.007882 | 0.985142 | 2383 | 0.001822 | 0.020056 | 0.529306 |
| 456 | 0.007299 | 0.027948 | 1.099247 | 1028 | 0.279444 | 1.656027 | 0.326932 | 1759 | 0.003418 | 0.008082 | 0.953122 | 2384 | 0.001781 | 0.019899 | 0.518998 |
| 457 | 0.004251 | 0.025526 | 0.872239 | 1029 | 0.757301 | 2.168554 | 0.177607 | 1760 | 0.003232 | 0.007565 | 0.769634 | 2385 | 0.002162 | 0.020271 | 0.525008 |
| 458 | 0.004302 | 0.025162 | 1.050254 | 1030 | 0.787768 | 3.103594 | 0.962656 | 1761 | 0.003209 | 0.007716 | 0.826567 | 2386 | 0.001834 | 0.019886 | 0.548855 |
| 459 | 0.004217 | 0.025242 | 0.856808 | 1031 | 0.485323 | 3.727265 | 0.678268 | 1762 | 0.003197 | 0.007352 | 0.743692 | 2387 | 0.002131 | 0.020496 | 0.494099 |
| 460 | 0.004174 | 0.02491 | 0.771856 | 1032 | 0.152334 | 1.921508 | 0.428204 | 1763 | 0.003236 | 0.007511 | 1.040475 | 2388 | 0.002937 | 0.022063 | 0.622276 |
| 461 | 0.004283 | 0.023773 | 0.825394 | 1033 | 0.10525 | 1.592774 | 0.153351 | 1764 | 0.003251 | 0.007572 | 1.383275 | 2390 | 0.001843 | 0.021049 | 0.592485 |
| 462 | 0.004232 | 0.026042 | 1.06574 | 1034 | 0.017448 | 0.092714 | 0.088247 | 1765 | 0.003257 | 0.013774 | 0.819945 | 2392 | 0.001773 | 0.020597 | 0.495091 |
| 463 | 0.00424 | 0.02602 | 0.834992 | 1035 | 0.32027 | 2.717977 | 0.197946 | 1766 | 0.003138 | 0.007452 | 0.976752 | 2394 | 0.001773 | 0.020237 | 0.601764 |
| 464 | 0.004112 | 0.026109 | 1.215674 | 1036 | 0.315469 | 1.59956 | 0.232083 | 1767 | 0.003206 | 0.007674 | 0.936511 | 2395 | 0.001806 | 0.020086 | 0.558798 |
| 465 | 0.004229 | 0.025226 | 0.796978 | 1037 | 0.583145 | 2.318094 | 0.166805 | 1768 | 0.003234 | 0.008193 | 0.717088 | 2396 | 0.001807 | 0.02021 | 0.456341 |
| 466 | 0.004197 | 0.024889 | 1.287377 | 1039 | 0.347433 | 2.874902 | 0.471893 | 1769 | 0.003178 | 0.007449 | 0.913192 | 2397 | 0.002983 | 0.022137 | 0.664263 |
| 467 | 0.005177 | 0.025637 | 0.884542 | 1040 | 0.142964 | 1.920848 | 0.351992 | 1771 | 0.003187 | 0.007352 | 0.941054 | 2399 | 0.002032 | 0.028561 | 0.419347 |
| 469 | 0.00431 | 0.025306 | 1.013611 | 1042 | 0.202209 | 2.100867 | 0.315035 | 1772 | 0.005576 | 0.019795 | 0.767377 | 2400 | 0.001953 | 0.02732 | 0.539873 |
| 470 | 0.004249 | 0.025992 | 0.811355 | 1044 | 0.349521 | 2.320673 | 0.253838 | 1773 | 0.003294 | 0.012787 | 0.583382 | 2401 | 0.001912 | 0.027274 | 0.638418 |
| 471 | 0.004548 | 0.027775 | 0.99103 | 1045 | 0.210983 | 0.761205 | 0.187876 | 1774 | 0.003183 | 0.007692 | 0.809862 | 2402 | 0.001914 | 0.026898 | 0.523509 |
| 473 | 0.005266 | 0.027614 | 0.841048 | 1046 | 0.090748 | 0.371038 | 0.186849 | 1775 | 0.003131 | 0.007429 | 1.000089 | 2403 | 0.001954 | 0.027389 | 0.678695 |
| 474 | 0.005181 | 0.025263 | 1.045863 | 1048 | 0.066928 | 0.667905 | 0.236017 | 1776 | 0.003174 | 0.007465 | 0.908376 | 2404 | 0.001977 | 0.027124 | 0.765805 |
| 475 | 0.004214 | 0.024591 | 1.055417 | 1049 | 0.019242 | 0.114164 | 0.097972 | 1777 | 0.003238 | 0.00771 | 1.13952 | 2405 | 0.00211 | 0.030541 | 0.701647 |
| 476 | 0.004585 | 0.024957 | 0.96854 | 1051 | 0.317465 | 2.158948 | 0.221567 | 1778 | 0.003232 | 0.007417 | 0.854898 | 2406 | 0.00247 | 0.029078 | 0.813564 |
| 477 | 0.005587 | 0.026272 | 1.177024 | 1053 | 0.034762 | 0.16757 | 0.098127 | 1779 | 0.003218 | 0.007322 | 0.736095 | 2407 | 0.002076 | 0.027414 | 0.698683 |
| 478 | 0.005441 | 0.028445 | 0.988752 | 1054 | 1.115094 | 3.572908 | 0.107919 | 1780 | 0.003511 | 0.008457 | 0.949085 | 2408 | 0.001925 | 0.028973 | 0.656613 |
| 479 | 0.004717 | 0.027028 | 0.856542 | 1055 | 0.426255 | 2.279363 | 0.875474 | 1781 | 0.003302 | 0.009751 | 0.834468 | 2409 | 0.002188 | 0.027465 | 0.541032 |

【表２７－１３】

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 480 | 0.004527 | 0.026333 | 0.732261 | 1056 | 0.35721 | 2.140493 | 0.659378 | 1782 | 0.003093 | 0.007604 | 0.813662 | 2410 | 0.001926 | 0.025909 | 0.545951 |
| 481 | 0.004189 | 0.026134 | 1.042274 | 1058 | 0.55246 | 3.14052 | 0.533825 | 1783 | 0.003061 | 0.007604 | 0.894994 | 2411 | 0.00194 | 0.026781 | 0.754864 |
| 482 | 0.004308 | 0.025592 | 1.144538 | 1059 | 0.282424 | 1.535033 | 0.458698 | 1784 | 0.003161 | 0.007326 | 0.70474 | 2412 | 0.00382 | 0.039591 | 0.762652 |
| 483 | 0.004232 | 0.025486 | 0.988084 | 1060 | 0.508811 | 3.071866 | 0.445119 | 1785 | 0.003225 | 0.007357 | 0.699541 | 2413 | 0.002162 | 0.027084 | 0.685745 |
| 484 | 0.005422 | 0.026264 | 0.930135 | 1061 | 0.525733 | 2.601345 | 0.545443 | 1786 | 0.003164 | 0.007261 | 0.794668 | 2414 | 0.002494 | 0.029168 | 0.594618 |
| 486 | 0.010488 | 0.036814 | 0.400608 | 1062 | 0.723702 | 1.828112 | 0.521941 | 1787 | 0.00315 | 0.007418 | 0.964931 | 2415 | 0.002268 | 0.029022 | 0.768169 |
| 487 | 0.009352 | 0.035227 | 0.398473 | 1063 | 0.699279 | 2.002368 | 1.090698 | 1788 | 0.003283 | 0.007843 | 0.946281 | 2416 | 0.001922 | 0.026555 | 0.470209 |
| 488 | 0.011628 | 0.039565 | 0.371609 | 1064 | 0.488057 | 1.746524 | 0.694956 | 1789 | 0.003291 | 0.007593 | 0.936091 | 2417 | 0.002127 | 0.027122 | 0.636734 |
| 489 | 0.010104 | 0.036386 | 0.522603 | 1065 | 0.525503 | 2.352257 | 0.927797 | 1790 | 0.003761 | 0.00877 | 0.886762 | 2418 | 0.001951 | 0.026994 | 0.650385 |
| 490 | 0.010243 | 0.035054 | 0.428049 | 1066 | 0.718979 | 3.256654 | 0.939838 | 1791 | 0.003112 | 0.007642 | 0.918008 | 2419 | 0.001945 | 0.027143 | 0.883213 |
| 491 | 0.009427 | 0.034974 | 0.456625 | 1067 | 0.491483 | 1.809573 | 0.745394 | 1792 | 0.003268 | 0.007666 | 0.703354 | 2420 | 0.002209 | 0.02794 | 0.572425 |
| 492 | 0.009978 | 0.034961 | 0.578826 | 1068 | 1.179541 | 3.74017 | 0.467877 | 1793 | 0.003133 | 0.007455 | 0.842638 | 2421 | 0.003578 | 0.031521 | 0.65348 |
| 493 | 0.017268 | 0.035854 | 0.439093 | 1069 | 0.680638 | 2.4638 | 0.562974 | 1794 | 0.003159 | 0.007349 | 0.728775 | 2422 | 0.4597 | 1.118984 | 0.742345 |
| 494 | 0.011939 | 0.036741 | 0.564414 | 1071 | 0.209584 | 0.500858 | 0.031699 | 1795 | 0.003246 | 0.007273 | 0.745148 | 2423 | 0.002036 | 0.027481 | 0.594989 |
| 495 | 0.009874 | 0.035139 | 0.393693 | 1072 | 0.427886 | 1.498126 | 0.045503 | 1796 | 0.003613 | 0.007904 | 0.628593 | 2424 | 0.001912 | 0.026795 | 0.566853 |
| 496 | 0.009436 | 0.033925 | 0.438625 | 1074 | 0.225285 | 0.934492 | 0.092819 | 1797 | 0.00427 | 0.008685 | 0.659605 | 2425 | 0.002128 | 0.027336 | 0.616199 |
| 499 | 0.017365 | 0.040412 | 0.408489 | 1075 | 0.137715 | 0.599395 | 0.037514 | 1798 | 0.003091 | 0.007893 | 0.885414 | 2426 | 0.004274 | 0.035029 | 0.701308 |
| 500 | 0.010443 | 0.035109 | 0.376297 | 1076 | 0.218044 | 1.024494 | 0.018691 | 1799 | 0.003119 | 0.007443 | 1.016389 | 2427 | 0.002039 | 0.026637 | 0.688343 |
| 501 | 0.098725 | 0.035501 | 0.705679 | 1077 | 0.357504 | 1.710835 | 0.077848 | 1801 | 0.005041 | 0.009766 | 0.788892 | 2428 | 0.002025 | 0.026834 | 0.482521 |
| 502 | 0.009362 | 0.036715 | 0.497175 | 1078 | 0.446448 | 1.518153 | 0.329426 | 1802 | 0.003799 | 0.009741 | 0.970487 | 2430 | 0.002201 | 0.027234 | 0.454862 |
| 503 | 0.010364 | 0.039033 | 0.408634 | 1079 | 0.068825 | 0.57375 | 0.014851 | 1803 | 0.003191 | 0.007455 | 0.811591 | 2431 | 0.002645 | 0.028863 | 0.606143 |
| 504 | 0.01097 | 0.034864 | 0.429402 | 1080 | 0.003884 | 0.019354 | 0.011699 | 1804 | 0.003256 | 0.007526 | 0.980185 | 2432 | 0.002137 | 0.027883 | 0.73667 |
| 505 | 0.011296 | 0.045354 | 0.444601 | 1081 | 0.132094 | 0.892676 | 0.083692 | 1806 | 0.007832 | 0.015298 | 0.668837 | 2433 | 0.001911 | 0.026777 | 0.764379 |
| 506 | 0.009332 | 0.034205 | 0.450232 | 1082 | 0.11434 | 0.923226 | 0.056705 | 1808 | 0.002099 | 0.00239 | 0.713927 | 2434 | 0.002656 | 0.031144 | 0.654025 |
| 507 | 0.009893 | 0.052264 | 0.571042 | 1083 | 0.048631 | 0.398633 | 0.030346 | 1809 | 0.003792 | 0.004621 | 0.798598 | 2435 | 0.357958 | 1.054187 | 0.789014 |
| 508 | 0.009472 | 0.034109 | 0.533749 | 1084 | 0.09557 | 0.924719 | 0.027728 | 1810 | 0.002017 | 0.002054 | 0.778629 | 2436 | 0.002408 | 0.027834 | 0.652141 |
| 510 | 0.010046 | 0.035326 | 0.405723 | 1085 | 0.319794 | 0.776496 | 0.0123 | 1811 | 0.001935 | 0.002012 | 0.827105 | 2437 | 0.002128 | 0.029482 | 0.589591 |
| 511 | 0.009439 | 0.03423 | 0.345853 | 1086 | 0.841477 | 2.348773 | 0.384012 | 1812 | 0.001955 | 0.002041 | 0.652207 | 2438 | 0.002046 | 0.027328 | 0.6305 |
| 512 | 0.009106 | 0.034492 | 0.364057 | 1087 | 0.52158 | 1.199952 | 0.055537 | 1813 | 0.002017 | 0.002107 | 1.07398 | 2439 | 0.002126 | 0.027527 | 0.702897 |
| 513 | 0.013017 | 0.036592 | 0.399432 | 1088 | 0.078823 | 0.411586 | 0.028465 | 1814 | 0.001992 | 0.00212 | 0.938161 | 2441 | 0.001931 | 0.027353 | 0.554509 |

【表２７－１４】

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 514 | 0.029114 | 0.157091 | 0.665907 | 1089 | 0.00343 | 0.019524 | 0.010609 | 1815 | 0.002057 | 0.002093 | 0.672235 | 2442 | 0.00194 | 0.026835 | 0.748374 |
| 515 | 0.009588 | 0.035852 | 0.430589 | 1090 | 0.003436 | 0.019498 | 0.011946 | 1816 | 0.002067 | 0.002143 | 0.813551 | 2443 | 0.00206 | 0.027504 | 0.580563 |
| 516 | 0.01053 | 0.034159 | 0.347145 | 1091 | 0.102675 | 0.821406 | 0.058983 | 1817 | 0.001993 | 0.00201 | 0.666663 | 2444 | 0.002454 | 0.030028 | 0.562538 |
| 517 | 0.011616 | 0.049112 | 0.479119 | 1092 | 0.106604 | 0.815445 | 0.072592 | 1818 | 0.001943 | 0.002032 | 1.177111 | 2445 | 0.002479 | 0.027979 | 0.691218 |
| 518 | 0.010441 | 0.034833 | 0.526338 | 1093 | 0.058575 | 0.476647 | 0.055827 | 1819 | 0.002001 | 0.002046 | 0.840791 | 2446 | 0.002005 | 0.026464 | 0.592756 |
| 519 | 0.012705 | 0.03856 | 0.465362 | 1094 | 0.582942 | 1.352039 | 0.521226 | 1820 | 0.00202 | 0.002025 | 0.821089 | 2447 | 0.00209 | 0.02736 | 0.67768 |
| 520 | 0.036111 | 0.066426 | 0.601134 | 1095 | 0.274994 | 0.998033 | 0.05091 | 1821 | 0.010528 | 0.014897 | 1.05278 | 2448 | 0.00215 | 0.027489 | 0.746934 |
| 521 | 0.009721 | 0.035602 | 0.5263 | 1096 | 0.135482 | 0.659134 | 0.082443 | 1822 | 0.001978 | 0.002002 | 0.847594 | 2449 | 0.001919 | 0.027314 | 0.63539 |
| 522 | 0.009626 | 0.034174 | 0.411501 | 1097 | 0.092301 | 0.934711 | 0.104868 | 1823 | 0.002033 | 0.002129 | 0.923411 | 2450 | 0.001947 | 0.026788 | 0.971937 |
| 523 | 0.010243 | 0.034049 | 0.461773 | 1098 | 0.128824 | 1.226146 | 0.0726 | 1824 | 0.001995 | 0.002089 | 0.931098 | 2451 | 0.002047 | 0.027081 | 0.714018 |
| 524 | 0.009466 | 0.03404 | 0.450292 | 1099 | 0.053711 | 0.584595 | 0.057494 | 1825 | 0.001951 | 0.002044 | 0.72614 | 2452 | 0.00199 | 0.026765 | 0.687724 |
| 525 | 0.009484 | 0.035115 | 0.428652 | 1100 | 0.06731 | 0.735897 | 0.070774 | 1826 | 0.001901 | 0.002026 | 0.969977 | 2453 | 0.002001 | 0.026884 | 0.675106 |
| 526 | 0.034651 | 0.049443 | 0.470629 | 1101 | 0.112476 | 0.815231 | 0.062219 | 1827 | 0.002017 | 0.002057 | 1.124311 | 2454 | 0.002043 | 0.026814 | 0.578459 |
| 527 | 0.010225 | 0.035086 | 0.474979 | 1102 | 0.415663 | 1.212428 | 0.079545 | 1828 | 0.002003 | 0.002006 | 0.621247 | 2455 | 0.002485 | 0.027898 | 0.62214 |
| 528 | 0.01019 | 0.0345 | 0.559636 | 1103 | 0.412005 | 1.754218 | 0.07277 | 1829 | 0.002024 | 0.002243 | 0.826881 | 2456 | 0.003114 | 0.03194 | 0.536157 |
| 529 | 0.0097 | 0.044281 | 0.512486 | 1104 | 0.094334 | 0.470474 | 0.097149 | 1830 | 0.001924 | 0.001957 | 0.830188 | 2457 | 0.002044 | 0.028064 | 0.672813 |
| 531 | 0.011152 | 0.035546 | 0.358218 | 1105 | 0.028017 | 0.537236 | 0.024877 | 1831 | 0.002058 | 0.002061 | 1.08971 | 2458 | 0.015881 | 0.100316 | 0.627601 |
| 532 | 0.017782 | 0.037115 | 0.476891 | 1106 | 0.053871 | 0.742137 | 0.06444 | 1832 | 0.002021 | 0.002227 | 0.99019 | 2460 | 0.00195 | 0.026811 | 0.61264 |
| 533 | 0.010199 | 0.033963 | 0.420376 | 1107 | 0.095169 | 1.103475 | 0.065829 | 1833 | 0.001961 | 0.002 | 1.043679 | 2461 | 0.001936 | 0.027321 | 0.614411 |
| 534 | 0.009483 | 0.035329 | 0.29936 | 1108 | 0.093046 | 0.820538 | 0.035385 | 1834 | 0.001997 | 0.002049 | 1.079505 | 2462 | 0.001952 | 0.026879 | 0.570422 |
| 535 | 0.90231 | 0.680855 | 0.881043 | 1109 | 0.057641 | 0.482332 | 0.044518 | 1835 | 0.002924 | 0.036425 | 0.9315 | 2463 | 0.001996 | 0.026846 | 0.724248 |
| 537 | 0.010176 | 0.034227 | 0.547417 | 1110 | 0.455043 | 1.55682 | 0.197962 | 1836 | 0.002051 | 0.002049 | 0.764385 | 2464 | 0.003014 | 0.029551 | 0.681079 |
| 539 | 0.009638 | 0.034846 | 0.4356 | 1111 | 0.383534 | 1.350223 | 0.034935 | 1837 | 0.001987 | 0.002013 | 0.939205 | 2465 | 0.851106 | 1.519622 | 0.556387 |
| 540 | 0.00967 | 0.035308 | 0.379571 | 1112 | 0.069077 | 0.719701 | 0.057509 | 1838 | 0.001986 | 0.002074 | 0.945167 | 2466 | 0.001875 | 0.027585 | 0.573732 |
| 541 | 0.020438 | 0.064563 | 0.553054 | 1113 | 0.039422 | 0.485263 | 0.043295 | 1839 | 0.00206 | 0.002081 | 0.757964 | 2467 | 0.001914 | 0.026865 | 0.584638 |
| 542 | 0.0096 | 0.035474 | 0.46663 | 1114 | 0.067072 | 0.91085 | 0.025613 | 1840 | 0.001961 | 0.002069 | 0.963668 | 2468 | 0.001951 | 0.026667 | 0.76513 |
| 543 | 0.010103 | 0.036928 | 0.391608 | 1115 | 0.039005 | 0.503229 | 0.02457 | 1841 | 0.001918 | 0.001952 | 0.824621 | 2469 | 0.001935 | 0.026646 | 0.483364 |
| 544 | 0.031817 | 0.071379 | 0.405136 | 1116 | 0.033876 | 0.323061 | 0.033704 | 1842 | 0.001947 | 0.00206 | 0.828898 | 2470 | 0.001927 | 0.027128 | 0.708523 |
| 545 | 0.011419 | 0.044632 | 0.471581 | 1117 | 0.064028 | 0.56885 | 0.033787 | 1844 | 0.002009 | 0.002099 | 0.812678 | 2471 | 0.002115 | 0.027369 | 0.645251 |
| 546 | 0.009434 | 0.034118 | 0.633882 | 1118 | 0.250182 | 0.508475 | 0.021224 | 1845 | 0.001913 | 0.002007 | 0.924997 | 2472 | 0.002277 | 0.02739 | 0.83229 |

【表２７－１５】

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 547 | 0.009671 | 0.034574 | 0.37907 | 1119 | 0.37371 | 0.826558 | 0.089181 | 1846 | 0.002008 | 0.002012 | 1.067461 | 2473 | 0.003074 | 0.029112 | 0.868278 |
| 548 | 0.009753 | 0.03389 | 0.425888 | 1120 | 0.090101 | 0.592721 | 0.06047 | 1847 | 0.002012 | 0.002021 | 0.910096 | 2474 | 0.001898 | 0.031517 | 0.628315 |
| 549 | 0.009679 | 0.034543 | 0.416178 | 1121 | 0.059672 | 1.02895 | 0.070457 | 1848 | 0.002014 | 0.002092 | 1.070281 | 2475 | 0.001888 | 0.025737 | 0.488711 |
| 550 | 0.010414 | 0.035565 | 0.382037 | 1122 | 0.02492 | 0.538694 | 0.02872 | 1849 | 0.00198 | 0.002053 | 1.115724 | 2476 | 0.001895 | 0.026321 | 0.539154 |
| 551 | 0.009573 | 0.034555 | 0.569187 | 1125 | 0.122305 | 0.680083 | 0.045805 | 1850 | 0.00196 | 0.002017 | 0.780307 | 2477 | 0.001942 | 0.02957 | 0.540224 |
| 553 | 0.010895 | 0.037061 | 0.452852 | 1126 | 0.463398 | 1.267668 | 0.085815 | 1851 | 0.001999 | 0.002057 | 0.88249 | 2478 | 0.001972 | 0.026698 | 0.560129 |
| 554 | 0.0252 | 0.106556 | 0.399393 | 1127 | 0.238281 | 1.080024 | 0.095938 | 1852 | 0.001974 | 0.002022 | 0.630003 | 2479 | 0.002055 | 0.026361 | 0.588692 |
| 556 | 0.009499 | 0.034102 | 0.463958 | 1128 | 0.073365 | 0.521087 | 0.063778 | 1853 | 0.00197 | 0.001976 | 0.893397 | 2480 | 0.002449 | 0.029257 | 0.564031 |
| 557 | 0.016537 | 0.050391 | 0.406694 | 1129 | 0.031089 | 0.393886 | 0.022686 | 1854 | 0.002051 | 0.002022 | 0.767922 | 2481 | 0.002188 | 0.027339 | 0.617131 |
| 558 | 0.029851 | 0.098052 | 0.422865 | 1130 | 0.093374 | 0.767258 | 0.115614 | 1855 | 0.002001 | 0.002064 | 1.128736 | 2482 | 0.001929 | 0.027532 | 0.647844 |
| 559 | 0.240194 | 0.948046 | 0.755382 | 1131 | 0.079149 | 0.574318 | 0.048331 | 1856 | 0.002104 | 0.002101 | 1.08652 | 2483 | 0.001901 | 0.026611 | 0.505461 |
| 560 | 0.023732 | 0.142099 | 0.410883 | 1132 | 0.074191 | 0.643954 | 0.023463 | 1857 | 0.001954 | 0.002061 | 0.814235 | 2484 | 0.001911 | 0.026331 | 0.632902 |
| 561 | 0.009951 | 0.034656 | 0.525667 | 1133 | 0.062971 | 0.480284 | 0.031931 | 1858 | 0.001944 | 0.002018 | 0.855267 | 2485 | 0.001935 | 0.026733 | 0.781338 |
| 562 | 0.023838 | 0.071971 | 0.547672 | 1134 | 0.216714 | 2.20506 | 0.132402 | 1859 | 0.001923 | 0.002007 | 1.245303 | 2486 | 0.00232 | 0.028127 | 0.762296 |
| 563 | 0.029476 | 0.233222 | 0.518497 | 1135 | 0.256515 | 0.844706 | 0.057365 | 1860 | 0.001933 | 0.002022 | 0.820898 | 2487 | 0.002045 | 0.029716 | 0.555858 |
| 564 | 0.009775 | 0.033845 | 0.432675 | 1136 | 0.10945 | 0.887249 | 0.110266 | 1861 | 0.001984 | 0.001993 | 0.92614 | 2488 | 0.002322 | 0.027239 | 0.655834 |
| 565 | 0.014326 | 0.034722 | 0.462568 | 1137 | 0.029429 | 0.352312 | 0.033672 | 1862 | 0.002019 | 0.002032 | 1.0456 | 2489 | 0.003042 | 0.02839 | 0.619313 |
| 567 | 0.062129 | 0.223441 | 0.412738 | 1138 | 0.100706 | 0.864622 | 0.084684 | 1863 | 0.002124 | 0.002046 | 0.904399 | 2490 | 0.001901 | 0.027794 | 0.675581 |
| 568 | 0.010126 | 0.035292 | 0.406865 | 1139 | 0.068952 | 0.846332 | 0.073941 | 1864 | 0.002036 | 0.002068 | 0.957025 | 2491 | 0.001867 | 0.026896 | 0.63697 |
| 569 | 0.010231 | 0.035076 | 0.671012 | 1140 | 0.088214 | 0.797631 | 0.063666 | 1865 | 0.001969 | 0.002058 | 0.878785 | 2492 | 0.001957 | 0.027113 | 0.720652 |
| 570 | 0.010125 | 0.035003 | 0.480816 | 1141 | 0.060094 | 0.359254 | 0.051047 | 1866 | 0.001941 | 0.002003 | 0.88721 | 2493 | 0.00211 | 0.02692 | 0.928346 |
| 571 | 0.010039 | 0.034758 | 0.495482 | 1142 | 0.449206 | 1.015907 | 0.520133 | 1867 | 0.001968 | 0.002036 | 0.765442 | 2494 | 0.001976 | 0.02681 | 0.505157 |
| 572 | 0.010531 | 0.045745 | 0.522281 | 1143 | 0.015059 | 0.08374 | 0.013579 | 1868 | 0.002326 | 0.002549 | 0.633458 | 2496 | 0.005512 | 0.03457 | 0.661025 |
| 573 | 0.025354 | 0.034962 | 0.419466 | 1144 | 0.021431 | 0.415068 | 0.029096 | 1869 | 0.002028 | 0.002049 | 0.630945 | 2498 | 0.001855 | 0.021094 | 1.26703 |
| 574 | 0.243552 | 0.556199 | 0.762058 | 1145 | 0.065197 | 0.376581 | 0.059013 | 1870 | 0.002011 | 0.002052 | 1.044067 | 2499 | 0.001794 | 0.019382 | 1.205979 |
| 575 | 0.015572 | 0.035785 | 0.437496 | 1146 | 0.091757 | 0.625511 | 0.054384 | 1871 | 0.002039 | 0.002032 | 0.858321 | 2500 | 0.001798 | 0.019209 | 1.194211 |
| 576 | 0.013035 | 0.038805 | 0.531242 | 1147 | 0.069289 | 0.534903 | 0.093464 | 1872 | 0.002073 | 0.002103 | 0.894575 | 2501 | 0.001855 | 0.019647 | 1.175705 |
| 577 | 0.032586 | 0.079404 | 0.417157 | 1148 | 0.09357 | 0.984551 | 0.073067 | 1874 | 0.00194 | 0.002077 | 0.741909 | 2502 | 0.001805 | 0.01951 | 1.05585 |
| 578 | 0.02313 | 0.063316 | 0.474352 | 1149 | 0.087768 | 0.722494 | 0.041795 | 1876 | 0.002012 | 0.002203 | 0.77563 | 2503 | 0.001854 | 0.01969 | 0.740211 |
| 579 | 0.065246 | 0.302516 | 0.543815 | 1150 | 0.371622 | 1.089698 | 0.054021 | 1877 | 0.002166 | 0.00293 | 0.909265 | 2504 | 0.001802 | 0.019108 | 1.169167 |

【表２７－１６】

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 581 | 0.354729 | 0.62217 | 1.144543 | 1151 | 0.2795 | 0.947429 | 0.047765 | 1878 | 0.002203 | 0.003175 | 0.764486 | 2505 | 0.001803 | 0.020364 | 1.044078 |
| 582 | 0.033618 | 0.058613 | 0.615124 | 1152 | 0.107195 | 0.384755 | 0.042152 | 1879 | 0.002076 | 0.002159 | 0.870865 | 2507 | 0.001816 | 0.019238 | 0.826173 |
| 583 | 0.308377 | 0.394948 | 0.932255 | 1153 | 0.170766 | 0.881601 | 0.079923 | 1880 | 0.002123 | 0.00211 | 0.974287 | 2508 | 0.0018 | 0.019457 | 0.747832 |
| 585 | 0.006337 | 0.020183 | 0.315108 | 1154 | 0.165804 | 1.199739 | 0.082085 | 1882 | 0.001971 | 0.00206 | 1.194054 | 2509 | 0.001814 | 0.018725 | 0.764182 |
| 586 | 0.163191 | 0.081969 | 0.381663 | 1155 | 0.133725 | 0.619659 | 0.096667 | 1883 | 0.001965 | 0.00198 | 0.850391 | 2510 | 0.001788 | 0.018705 | 0.961773 |
| 587 | 0.005108 | 0.023774 | 0.224587 | 1156 | 0.083408 | 0.615919 | 0.018728 | 1884 | 0.001983 | 0.00208 | 0.739432 | 2511 | 0.001811 | 0.019187 | 1.002978 |
| 588 | 0.021841 | 0.05963 | 0.370248 | 1157 | 0.005065 | 0.022682 | 0.011868 | 1885 | 0.004432 | 0.006831 | 0.921387 | 2512 | 0.00184 | 0.019337 | 0.951505 |
| 589 | 0.046721 | 0.333438 | 0.27475 | 1158 | 0.279768 | 0.567474 | 0.470594 | 1886 | 0.001964 | 0.002047 | 0.905673 | 2513 | 0.001795 | 0.0198 | 0.784969 |
| 590 | 0.090307 | 0.279891 | 0.29317 | 1159 | 0.366023 | 1.092993 | 0.087006 | 1887 | 0.002128 | 0.002131 | 0.970315 | 2514 | 0.001806 | 0.019423 | 1.155331 |
| 591 | 0.028787 | 0.07838 | 0.325743 | 1160 | 0.27576 | 0.987157 | 0.055226 | 1888 | 0.00216 | 0.002141 | 0.900712 | 2515 | 0.001819 | 0.019277 | 0.899568 |
| 592 | 0.005702 | 0.020121 | 0.306412 | 1161 | 0.00888 | 0.211542 | 0.013514 | 1889 | 0.001985 | 0.00209 | 0.904929 | 2516 | 0.001783 | 0.018727 | 0.906725 |
| 593 | 0.0099 | 0.046476 | 0.246072 | 1162 | 0.321948 | 1.123212 | 0.077234 | 1890 | 0.002027 | 0.002135 | 0.942252 | 2517 | 0.001767 | 0.018491 | 1.156806 |
| 594 | 0.015627 | 0.043937 | 0.215799 | 1163 | 0.238473 | 0.676024 | 0.108033 | 1891 | 0.001943 | 0.002032 | 1.031348 | 2518 | 0.001826 | 0.018843 | 0.984126 |
| 595 | 0.004629 | 0.019544 | 0.251833 | 1164 | 0.174887 | 0.553471 | 0.031922 | 1892 | 0.001968 | 0.002051 | 0.673121 | 2519 | 0.001827 | 0.018971 | 1.106655 |
| 596 | 0.046096 | 0.243097 | 0.24242 | 1165 | 0.362907 | 1.060364 | 0.105512 | 1894 | 0.002064 | 0.002078 | 1.215602 | 2520 | 0.001856 | 0.019129 | 0.981249 |
| 597 | 0.724998 | 0.981484 | 0.844379 | 1167 | 0.440301 | 3.41734 | | 1895 | 0.002657 | 0.002895 | 0.952559 | 2521 | 0.001863 | 0.019361 | 0.815735 |
| 598 | 0.026838 | 0.114469 | 0.289663 | 1168 | 2.269595 | 6.148748 | | 1897 | 0.004208 | 0.004197 | 0.877243 | 2522 | 0.001753 | 0.019788 | 0.683346 |
| 599 | 0.005828 | 0.019718 | 0.257416 | 1169 | 1.81238 | 4.676323 | | 1898 | 0.001943 | 0.002098 | 0.720743 | 2523 | 0.00179 | 0.018958 | 0.763397 |
| 600 | 0.005909 | 0.019865 | 0.251511 | 1170 | 0.205013 | 0.821177 | | 1899 | 0.001911 | 0.002064 | 0.771716 | 2524 | 0.001774 | 0.019189 | 0.99147 |
| 601 | 0.00614 | 0.020424 | 0.288905 | 1171 | 1.757897 | 3.916135 | | 1900 | 0.001992 | 0.002012 | 1.042259 | 2525 | 0.001796 | 0.019005 | 1.173316 |
| 602 | 0.005997 | 0.020776 | 0.216972 | 1172 | 1.485171 | 1.939494 | | 1902 | 0.002111 | 0.002087 | 0.877153 | 2526 | 0.00239 | 0.022053 | 0.703461 |
| 603 | 0.004669 | 0.019593 | 0.244223 | 1173 | 0.294994 | 0.522214 | | 1903 | 0.002066 | 0.002106 | 1.055068 | 2527 | 0.001839 | 0.018912 | 0.926152 |
| 604 | 0.008771 | 0.03346 | 0.323606 | 1174 | 0.375652 | 1.011377 | | 1904 | 0.003184 | 0.003144 | 1.09739 | 2528 | 0.002235 | 0.020166 | 0.849943 |
| 605 | 0.006624 | 0.020724 | 0.274329 | 1175 | 0.751857 | 4.08474 | | 1909 | 0.002055 | 0.003948 | 0.847157 | 2529 | 0.001833 | 0.019542 | 1.169762 |
| 606 | 0.005853 | 0.020382 | 0.242918 | 1176 | 0.543517 | 3.338898 | | 1912 | 0.00224 | 0.004186 | 0.742941 | 2531 | 0.001757 | 0.019516 | 0.804991 |
| 607 | 0.007747 | 0.021643 | 0.255363 | 1177 | 1.544519 | 7.245177 | | 1914 | 0.002728 | 0.006378 | 1.015755 | 2532 | 0.001791 | 0.019332 | 0.97138 |
| 608 | 0.005712 | 0.019678 | 0.221593 | 1178 | 0.736878 | 2.629057 | | 1915 | 0.002104 | 0.003971 | 1.11464 | 2533 | 0.00183 | 0.018744 | 0.932083 |
| 609 | 0.256073 | 0.504568 | 0.599603 | 1179 | 0.686547 | 2.072089 | | 1916 | 0.002013 | 0.00378 | 0.838864 | 2534 | 0.001829 | 0.018966 | 0.603137 |
| 610 | 0.005913 | 0.020199 | 0.199839 | 1180 | 0.237255 | 0.98724 | | 1917 | 0.002152 | 0.003877 | 0.908892 | 2535 | 0.001825 | 0.019067 | 0.775401 |
| 611 | 0.00447 | 0.019293 | 0.258074 | 1182 | 0.654624 | 1.237891 | | 1919 | 0.002163 | 0.003718 | 0.800267 | 2536 | 0.001839 | 0.019239 | 1.005791 |

【表２７－１７】

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 612 | 0.005724 | 0.019734 | 0.360177 | 1183 | 0.909645 | 4.061809 | | 1921 | 0.002207 | 0.003959 | 0.605339 | 2537 | 0.001837 | 0.019027 | 0.742716 |
| 613 | 0.005694 | 0.019843 | 0.280102 | 1184 | 0.544952 | 2.024292 | | 1922 | 0.002089 | 0.004028 | 0.664389 | 2538 | 0.00184 | 0.019119 | 1.025351 |
| 614 | 0.005742 | 0.019885 | 0.286104 | 1185 | 0.147863 | 1.25923 | | 1923 | 0.002035 | 0.003926 | 0.807267 | 2539 | 0.001786 | 0.019252 | 1.038877 |
| 615 | 0.005705 | 0.019587 | 0.226829 | 1186 | 0.434429 | 1.954991 | | 1924 | 0.002045 | 0.003803 | 0.75616 | 2540 | 0.001818 | 0.019031 | 1.121716 |
| 616 | 0.006013 | 0.020573 | 0.266788 | 1187 | 0.505786 | 3.505564 | | 1925 | 0.002024 | 0.003787 | 0.78207 | 2541 | 0.001778 | 0.018762 | 0.803414 |
| 617 | 0.035272 | 0.094008 | 0.237734 | 1188 | 0.406861 | 2.548182 | | 1926 | 0.002081 | 0.004003 | 0.919381 | 2542 | 0.00183 | 0.01897 | 0.935541 |
| 618 | 0.026309 | 0.025971 | 0.242108 | 1189 | 0.4624 | 2.051662 | | 1927 | 0.002087 | 0.0039 | 0.87094 | 2543 | 0.001856 | 0.018641 | 0.779233 |
| 619 | 0.004687 | 0.020401 | 0.240359 | 1190 | 0.071895 | 0.226536 | | 1928 | 0.002169 | 0.003842 | 0.85592 | 2544 | 0.001832 | 0.018997 | 0.936523 |
| 620 | 0.00571 | 0.019825 | 0.218814 | 1191 | 0.02375 | 0.087245 | | 1929 | 0.002196 | 0.003892 | 1.04674 | 2545 | 0.001818 | 0.019351 | 0.785605 |
| 621 | 0.006001 | 0.020668 | 0.280146 | 1192 | 1.717893 | 7.465639 | | 1930 | 0.002059 | 0.004072 | 0.758699 | 2546 | 0.001855 | 0.019618 | 1.078452 |
| 622 | 0.082002 | 0.273485 | 0.335066 | 1193 | 0.542623 | 4.373519 | | 1931 | 0.002018 | 0.003893 | 0.935624 | 2547 | 0.001753 | 0.019425 | 0.952274 |
| 623 | 0.006029 | 0.020465 | 0.261982 | 1194 | 0.354838 | 3.577394 | | 1932 | 0.00212 | 0.003782 | 0.741426 | 2548 | 0.001801 | 0.019016 | 0.883621 |
| 624 | 0.140559 | 0.424388 | 0.42443 | 1195 | 0.259933 | 3.12244 | | 1935 | 0.002149 | 0.003827 | 0.781431 | 2549 | 0.001932 | 0.019884 | 0.963362 |
| 625 | 0.005826 | 0.019866 | 0.264531 | 1196 | 0.215423 | 2.052223 | | 1936 | 0.002114 | 0.003987 | 0.983047 | 2550 | 0.001852 | 0.019493 | 0.756811 |
| 626 | 0.051468 | 0.032244 | 0.306101 | 1197 | 0.526893 | 2.109184 | | 1939 | 0.002105 | 0.003927 | 1.012539 | 2551 | 0.001811 | 0.018994 | 0.735339 |
| 627 | 0.075104 | 0.276951 | 0.298932 | 1198 | 0.822275 | 1.940819 | | 1940 | 0.002102 | 0.003894 | 0.972949 | 2552 | 0.001829 | 0.018641 | 0.751335 |
| 628 | 0.005997 | 0.022048 | 0.26821 | 1199 | 2.037406 | 9.409115 | | 1943 | 0.002208 | 0.003969 | 0.819485 | 2553 | 0.001842 | 0.019264 | 0.734602 |
| 629 | 0.034034 | 0.401114 | 0.435605 | 1200 | 1.095359 | 5.130504 | | 1944 | 0.002129 | 0.003932 | 0.90291 | 2555 | 0.001803 | 0.019524 | 0.791215 |
| 630 | 0.011946 | 0.027566 | 0.254444 | 1201 | 0.157644 | 0.731059 | | 1949 | 0.002939 | 0.028633 | 0.702177 | 2556 | 0.001808 | 0.019326 | 1.234156 |
| 631 | 0.005914 | 0.020147 | 0.288981 | 1202 | 0.230264 | 1.923086 | | 1951 | 0.00213 | 0.003953 | 0.756432 | 2557 | 0.001817 | 0.019034 | 0.844118 |
| 632 | 0.037385 | 0.026122 | 0.362523 | 1204 | 0.044579 | 0.913551 | | 1954 | 0.002084 | 0.003994 | 0.716999 | 2559 | 0.0018 | 0.019361 | 0.832718 |
| 633 | 0.005826 | 0.019832 | 0.356419 | 1206 | 0.511955 | 1.209704 | | 1955 | 0.002082 | 0.003928 | 0.924112 | 2560 | 0.001849 | 0.018958 | 1.108257 |
| 634 | 0.010026 | 0.030547 | 0.206994 | 1207 | 0.046192 | 0.162052 | | 1956 | 0.002151 | 0.004369 | 0.83182 | 2561 | 0.001875 | 0.019191 | 0.924327 |
| 635 | 0.01508 | 0.04919 | 0.264614 | 1208 | 0.026908 | 0.124359 | | 1959 | 0.002066 | 0.003906 | 0.943132 | 2562 | 0.00183 | 0.019757 | 0.913942 |
| 636 | 0.296551 | 1.260655 | 0.610765 | 1209 | 0.281822 | 3.216097 | | 1960 | 0.002082 | 0.003897 | 0.845987 | 2563 | 0.001766 | 0.019449 | 1.039711 |
| 637 | 0.032124 | 0.375722 | 0.306647 | 1210 | 0.220147 | 2.427366 | | 1962 | 0.002068 | 0.004065 | 0.677381 | 2564 | 0.001761 | 0.019642 | 0.975257 |
| 638 | 0.005896 | 0.021846 | 0.271964 | 1211 | 0.111229 | 1.298379 | | 1964 | 0.002309 | 0.005092 | 0.691221 | 2565 | 0.001822 | 0.018907 | 0.875283 |
| 639 | 0.018881 | 0.148987 | 0.215144 | 1213 | 0.141412 | 0.865279 | | 1965 | 0.002145 | 0.004599 | 1.02379 | 2566 | 0.001827 | 0.018953 | 0.804406 |
| 640 | 0.018015 | 0.131161 | 0.288994 | 1214 | 0.15488 | 0.459765 | | 1966 | 0.002096 | 0.003928 | 0.821807 | 2567 | 0.00182 | 0.01881 | 0.84509 |
| 641 | 0.032334 | 0.02755 | 0.409355 | 1215 | 0.997818 | 3.321803 | | 1967 | 0.002135 | 0.004049 | 0.784332 | 2568 | 0.001815 | 0.018919 | 0.949194 |

【表２７－１８】

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 642 | 0.067149 | 0.273403 | 0.35373 | 1216 | 1.025901 | 4.406269 | | 1969 | 0.00258 | 0.004963 | 0.869906 | 2569 | 0.00187 | 0.018963 | 0.839079 |
| 643 | 0.094609 | 0.53261 | 0.4944 | 1217 | 0.260845 | 2.930463 | | 1970 | 0.002402 | 0.005499 | 0.802557 | 2570 | 0.001859 | 0.019606 | 0.843373 |
| 644 | 0.006418 | 0.02472 | 0.231759 | 1218 | 0.345315 | 3.143776 | | 1971 | 0.003555 | 0.00803 | 0.915366 | 2571 | 0.001771 | 0.019425 | 0.664874 |
| 645 | 0.131335 | 0.734794 | 0.553125 | 1219 | 0.305255 | 1.957145 | | 1972 | 0.002123 | 0.004341 | 1.002436 | 2572 | 0.001861 | 0.019316 | 0.807564 |
| 646 | 0.029427 | 0.344127 | 0.390884 | 1220 | 0.172212 | 1.168102 | | 1973 | 0.002093 | 0.004195 | 0.739287 | 2573 | 0.001825 | 0.018896 | 1.142032 |
| 647 | 0.023863 | 0.136043 | 0.300959 | 1221 | 0.248967 | 0.814305 | | 1974 | 0.002264 | 0.004213 | 1.090771 | 2574 | 0.001799 | 0.018916 | 0.733867 |
| 650 | 0.010281 | 0.03014 | 0.242733 | 1222 | 0.03732 | 0.119114 | | 1975 | 0.00213 | 0.004172 | 0.890328 | 2575 | 0.001848 | 0.018948 | 0.764302 |
| 651 | 0.007994 | 0.028947 | 0.25194 | 1223 | 1.247387 | 3.024953 | | 1976 | 0.002854 | 0.00629 | 1.03609 | 2576 | 0.001862 | 0.0189 | 0.934422 |
| 652 | 0.15318 | 0.627023 | 0.43527 | 1224 | 0.024175 | 0.081463 | | 1977 | 0.0022 | 0.003857 | 0.750837 | 2578 | 0.001938 | 0.019715 | 0.942217 |
| 653 | 0.118823 | 0.69422 | 0.40527 | 1225 | 0.057454 | 0.455597 | | 1978 | 0.002184 | 0.006424 | 0.789674 | 2579 | 0.001762 | 0.019242 | 0.986229 |
| 654 | 0.105353 | 0.646828 | 0.388119 | 1226 | 0.361586 | 4.237747 | | 1979 | 0.00218 | 0.004072 | 1.041609 | 2580 | 0.001771 | 0.01972 | 0.75995 |
| 656 | 0.006783 | 0.02363 | 0.269316 | 1227 | 0.15804 | 1.518132 | | 1980 | 0.002089 | 0.003918 | 0.742203 | 2581 | 0.001846 | 0.019138 | 0.813534 |
| 657 | 0.307363 | 1.189775 | 0.605584 | 1228 | 0.015375 | 0.056146 | | 1981 | 0.002022 | 0.00393 | 0.802623 | 2582 | 0.001812 | 0.018893 | 1.03767 |
| 658 | 0.142732 | 0.450462 | 0.421859 | 1229 | 0.444241 | 1.249649 | | 1983 | 0.00211 | 0.00387 | 0.823111 | 2583 | 0.001829 | 0.019116 | 0.974132 |
| 659 | 0.22685 | 0.512994 | 0.582274 | 1230 | 0.649691 | 1.15827 | | 1985 | 0.00238 | 0.005063 | 0.920921 | 2584 | 0.001881 | 0.019667 | 0.850391 |
| 660 | 0.088314 | 0.402555 | 0.524885 | 1232 | 0.378509 | 0.925671 | | 1987 | 0.002096 | 0.003989 | 0.820149 | 2585 | 0.002575 | 0.020133 | 1.050868 |
| 661 | 0.180276 | 0.439707 | 0.530249 | 1233 | 0.325411 | 2.625939 | | 1988 | 0.002196 | 0.004207 | 0.733845 | 2586 | 0.002919 | 0.020784 | 0.982573 |
| 662 | 0.010698 | 0.060157 | 0.272901 | 1234 | 0.206621 | 2.051787 | | 1993 | 0.002629 | 0.004548 | 0.923992 | 2587 | 0.001816 | 0.019662 | 0.675518 |
| 663 | 0.161736 | 0.431703 | 0.609228 | 1235 | 0.019165 | 0.09314 | | 1994 | 0.003546 | 0.013836 | 0.780026 | 2588 | 0.001816 | 0.019437 | 0.754413 |
| 664 | 0.104153 | 0.348438 | 0.502663 | 1236 | 0.118642 | 1.658952 | | 1996 | 0.00246 | 0.004831 | 0.793669 | 2589 | 0.001844 | 0.01968 | 0.725135 |
| 665 | 0.509021 | 0.807128 | 0.717144 | 1237 | 0.017709 | 0.057603 | | 1998 | 0.005897 | 0.010175 | 0.864774 | 2590 | 0.00185 | 0.020018 | 0.754455 |
| 666 | 0.474224 | 0.60482 | 0.829418 | 1238 | 0.015895 | 0.043364 | | 1999 | 0.002493 | 0.004889 | 0.91103 | 2591 | 0.001831 | 0.019558 | 0.900126 |
| 667 | 0.04441 | 0.198916 | 0.289447 | 1239 | 0.025104 | 0.079453 | | 2001 | 0.003035 | 0.009213 | 0.760895 | 2593 | 0.001894 | 0.019772 | 0.853028 |
| 668 | 0.072205 | 0.466606 | 0.40305 | 1240 | 0.361175 | 2.493372 | | 2004 | 0.009008 | 0.051959 | 0.315777 | 2594 | 0.003467 | 0.021701 | 0.877 |
| 669 | 0.026334 | 0.185174 | 0.304685 | 1242 | 0.325351 | 1.821619 | | 2006 | 0.007683 | 0.047495 | 0.479879 | | | | |
| 670 | 0.108713 | 0.572116 | 0.361198 | 1243 | 0.411323 | 2.267424 | | 2007 | 0.00815 | 0.046714 | 0.350549 | | | | |
| 671 | 0.054216 | 0.293384 | 0.286724 | 1244 | 0.262681 | 1.368943 | | 2009 | 0.007773 | 0.047424 | 0.356192 | | | | |

【１１８８】

実施例９４

キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）をコードする環状ＲＮＡのインビトロ投与後のＣＤ１９－４１ＢＢζ、ＣＤ１９－ＣＤ２８ζ、ＨＥＲ２－４１ＢＢζ、またはＨＥＲ２－ＣＤ２８ζの該ＣＡＲの発現

３つの固有なＴ細胞ドナー由来のヒトＴ細胞を３日間抗ＣＤ３またはＣＤ２８で活性化し、２４時間休止するように設定した。ＣＤ１９－４１ＢＢζ、ＣＤ１９－ＣＤ２８ζ、ＨＥＲ２－４１ＢＢζ、またはＨＥＲ２－ＣＤ２８ζキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）をコードする操作された環状ＲＮＡ（ｏＲＮＡ）をヒトＴ細胞にエレクトロポレーションした。

各ＣＡＲのトランスフェクション後２４時間のＣＡＲ発現を、蛍光活性化細胞選別（ＦＡＣＳ）を使用して測定した。

【１１８９】

図１０２Ａ及び１０２Ｂに見られるように、環状ＲＮＡ構築物は、異なるＣＡＲ構築物の各々についてＣＡＲを発現することができた。

【１１９０】

実施例９５

ＣＤ１９－４１ＢＢζ及びＣＤ１９－ＣＤ２８ζキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）のインビトロトランスフェクション後の腫瘍細胞の溶解及びサイトカイン産生

ヒトＴ細胞を抗ＣＤ３またはＣＤ２８で３日間活性化し、２４時間休止させた。次いで、細胞に、エレクトロポレーションを介して、ｍＯＸ４０Ｌ（陽性対照）、ＣＤ１９－４１ＢＢζ、ＣＤ１９－ＣＤ２８ζ、ＨＥＲ２－４１ＢＢζ、またはＨＥＲ２－ＣＤ２８ζキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）をコードする環状ＲＮＡをトランスフェクトした。エレクトロポレーションの２４時間後、該Ｔ細胞を、１：１のエフェクター対標的（Ｅ：Ｔ）比でＮａｌｍ６腫瘍細胞と共培養した。Ｎａｌｍ６殺傷を、ヒトＴ細胞とＮａｌｍ６腫瘍細胞の共培養から２４時間後に測定した。共培養上清を収集し、ＩＦＮ－ｇ及びＩＬ－２発現について、Ｍｅｓｏ　Ｓｃａｌｅ　Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ（ＭＳＤ）（Ａｇｉｌｅｎｔ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｓａｎｔａ　Ｃｌａｒａ，ＣＡ）を使用して分析した。

【１１９１】

図１０３Ａに見られるように、環状ＲＮＡをコードするＣＤ１９－４１ＢＢζ及びＣＤ１９－ＣＤ２８ζは、陽性対照であるｍＯＸ４０Ｌ環状ＲＮＡに対する腫瘍細胞殺傷を上回り、ＨＥＲ２－４１ＢＢζ及びＨＥＲ２－ＣＤ２８ζさえも上回った。ＣＤ１９－ＢＢζ及びＣＤ１９－２８ζをコードするｃｉｒｃＲＮＡもまた、ＨＥＲ２－４１ＢＢζ、ＨＥＲ２－ＣＤ２８ζ、またはｍＯＸ４０ＬをコードするｃｉｒｃＲＮＡと比較して、ＩＦＮ－ｇ及びＩＬ－２サイトカインを上回った（図１０３Ｂ及び図１０３Ｃ）。抗原特異的殺傷が、ｃｉｒｃＲＮＡのトランスフェクションに後に、１：３のエフェクター対標的（Ｅ：Ｔ）比で観察された。

【１１９２】

実施例９６

ｍＯＸ４０ＬをコードするＬＮＰ－ｃｉｒｃＲＮＡの静脈内投与後のヒト化マウスの血液及び脾臓ヒトＴ細胞におけるｍＯＸ４０Ｌ発現

ＮＯＧマウス（１Ｅ７マウスハイブリドーマ）に、ヒト末梢血単核細胞（ｈＰＢＭＣ）を移植した。３週間後、マウスを、２ｍｇ／ｋｇのｍＯｘ４０Ｌをコードする環状ＲＮＡを封入したＬＮＰの単一静脈内用量で処置した。ＬＮＰは、イオン化可能脂質１０ｂ－１５（表１０ｂ、脂質１５）、１０ａ－２７（表１０ａ、脂質２７）、または１０ａ－２６（表１０ａ、脂質２６）で製剤化した。静脈内投与の２４時間後、脾細胞及び末梢血細胞を単離し、ｍＯＸ４０ＬのＴ細胞発現について分析した。

【１１９３】

図１０４Ａ及び１０４Ｂに見られるように、ｍＯＸ４０Ｌは、ＬＮＰ構築物の各々について、ヒト化マウスの脾臓及び末梢血のヒトＴ細胞において検出された。発現は、脾臓における３つの構築物全てでより高かった。

【１１９４】

実施例９７

抗ＣＤ１９　ＣＡＲをコードするＬＮＰ－ｃｉｒｃＲＮＡ構築物の静脈内投与後のヒト化マウスの脾臓におけるＢ細胞無形成

ＮＯＧマウス（１Ｅ７マウスハイブリドーマ）に、合計５０～６０％のヒト生着でヒト末梢血単核細胞（ｈＰＢＭＣ）を移植した。移植の３週間後、マウスを、２ｍｇ／ｋｇの抗ＣＤ１９　ＣＡＲまたはＩＸＰＢＳ（陰性対照）をコードする環状ＲＮＡを封入したＬＮＰの単一用量で処置した。投与から６日後、脾細胞を単離し、ＣＤ１９発現を介してＢ細胞の存在について分析した。

【１１９５】
図１０５に見られるように、ＬＮＰ－ｃｉｒｃＲＮＡ構築物を受けたマウスの脾細胞（図１０５の左側）を陰性対照を受けたマウスの脾細胞（図１０５の右側）と比較すると、ヒト化マウスにはＢ細胞無形成が存在した。
【１１９６】
実施例９８
異なるＣＡＲをコードする環状ＲＮＡ構築物のインビトロ投与後のＮａｌｍ６殺傷
Ｔ細胞を抗ＣＤ３または抗ＣＤ２８で３日間活性化し、２４時間休止させた。次いで、細胞を、ｍＯＸ４０Ｌ （陽性対照）、ｍＯＸ４０Ｌ（陽性対照）、ＣＤ１９－４１ＢＢζ、ＣＤ１９－ＣＤ２８ζ、ＨＥＲ２－４１ＢＢζ、またはＨＥＲ２－ＣＤ２８ζキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）をコードするＬＮＰ－ｃｉｒｃＲＮＡで処理した。ＬＮＰを、イオン化可能脂質１０ｂ－１５（表１０ｂ、脂質１５）を使用して製剤化した。ＣＡＲの発現を、蛍光活性化細胞選別（ＦＡＣＳ）によって測定し、平均蛍光活性（ＭＦＩ）を測定した。次いで、Ｔ細胞をＮａｌｍ６腫瘍細胞と共培養した。翌日、Ｎａｌｍ６殺傷を測定した。
【１１９７】
Ｔ細胞をＮａｌｍ６細胞と共培養した４８時間後、エフェクター対標的（Ｅ：Ｔ）比は１：５であった。図１０６Ａに見られるように、ＬＮＰ－ｃｉｒｃＲＮＡ構築物の投与後のＮａｌｍ６腫瘍細胞の殺傷率は、ＨＥＲ２－４１ＢＢζ、ＨＥＲ２－ＣＤ２８ζ、またはｍＯＸ４０Ｌ（陽性対照）をコードする構築物と比較して、ＣＤ１９－ＣＤ２８ζまたはＣＤ１９－４１ＢＢζをコードする構築物について有意に高かった。図１０６Ｂは、ＣＤ１９－２８ζＣＡＲをコードするｃｉｒｃＲＮＡが、ＣＤ１９－ＢＢζＣＡＲをコードするｃｉｒｃＲＮＡよりもＮａｌｍ６細胞をより多く殺傷することを示す。
【１１９８】
実施例９９
１Ｅ６（Ｎａｌｍ６－Ｌｕｃ）細胞をＮＳＧマウスに移植した。３日後、ＣＤ３／ＣＤ２８処理したｈＰＢＭＣをエクスビボで移植した。生着の２４時間後、マウスに、２ｍｇ／ｋｇの環状ＲＮＡ構築物（ＣＤ１９－４１ＢＢζ　ＣＡＲ、ＣＤ１９－ＣＤ２８ζ　ＣＡＲ、ＨＥＲ２－４１ＢＢζ　ＣＡＲ、ＨＥＲ２－ＣＤ２８ζ　ＣＡＲ、またはｍＯＸ４０Ｌ（陽性対照）のいずれかをコードする環状ＲＮＡ）を封入したＬＮＰまたはＰＢＳ（陰性対照１）またはＰＢＭＣ（陰性対照２））をインビボ投与を介して投与した。全てのＬＮＰを、イオン化可能脂質１０ｂ－１５（表１０ｂ、脂質１５）を使用して製剤化した。マウスには一日おきに合計５用量を投与した。経時的なＮａｌｍ６腫瘍量を、ＩＶＩＳイメージングを使用して定量化した。
【１１９９】
図１０７に見られるように、ＣＤ１９－ＣＤ２８ζ　ＣＡＲで製剤化したＬＮＰは、他のＣＡＲまたは対照（陽性または陰性）よりも腫瘍退縮においてより効果的である。
【１２００】
実施例１００
約３，０００個の潜在的な配列内リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ）配列候補を、当該技術分野で利用可能な部分的及び完全なウイルス配列（例えば、Ｇｅｎｂａｎｋ）のウイルス非翻訳領域から計算的に同定した。各ＤＮＡ鋳型を、配列番号１～２９８３及び３２８２～３２８７から選択されるＩＲＥＳ配列またはその断片を含むようにクローニングした。例示的な構築物には、５’増強イントロン要素、５’増強エクソン要素、推定ＩＲＥＳ、ガウシアルシフェラーゼをコードするコード要素、３’増強エクソン要素、及び３’増強イントロン要素が含まれる。操作された環状ＲＮＡ（ｏＲＮＡ）は、インビトロ転写（ＩＶＴ）によってＤＮＡ鋳型から生成し、ｏＲＮＡは、その後、ＩＶＴ反応の非環状ＲＮＡ成分から精製した。
【１２０１】
精製したｏＲＮＡを脂質でナノ沈殿させて、ＬＮＰ－ｏＲＮＡ構築物を形成した。最初

に、ＬＮＰを「ＮｅｘｔＧｅｎ」混合チャンバーを備えたＰｒｅｃｉｓｉｏｎ Ｎａｎｏｓｙｓｔｅｍｓ Ｉｇｎｉｔｅ装置を使用して空の脂質ナノ粒子を作製することによって製剤化した。表１０ｂからの脂質３９、ＤＳＰＣ、コレステロール、及びＤＭＧ－ＰＥＧ２０００（Ａｖａｎｔｉ Ｐｏｌａｒ Ｌｉｐｉｄｓ，Ｉｎｃ．，Ａｌａｂａｓｔｅｒ，ＡＬ）を４５：９：４４：２のモル比で含有したエタノール相を、ｐＨ４．５の５０ｍＭ酢酸ナトリウム緩衝液と混合した。３：１の水対エタノールの混合比を使用した。次いで空のＬＮＰを１Ｌの１ｘＰＢＳで透析し、１８時間にわたって２回交換した。次いで、透析した空のＬＮＰを、ｐＨ４．５の５０ｍＭ酢酸ナトリウム緩衝液中で４０μｇ／ｍＬの最終環状ＲＮＡ濃度と混合した。３：１の水性対空の脂質ナノ粒子の混合比を使用した。ＬＮＰの最終イオン化可能脂質対ＲＮＡリン酸比は、６．０であった。

【１２０２】

初代ヒト骨格筋管（ＭＹＯ）、初代ヒト肝細胞（ＰＨＨ）、及び活性化された初代ヒトＴ細胞（ＴＣＬ）を、製剤化したＬＮＰ－ｏＲＮＡで３連で処理した。上清におけるタンパク質発現をトランスフェクションから４８時間後の発光測定によって評価した。

【１２０３】

総発光シグナルを複製プレート間で正規化し、フラッシュアッセイ読み出しタイミングによる複製間のプレート全体の差を制御した。バックグラウンドに対して＜２ｘのシグナルを有する陽性対照を有するプレートを分析から除外した。バックグラウンドを空のウェルに基づいて減算した。各試験ウェルの複製をそのそれぞれのプレート対照に対して正規化し、次いで複製を平均した。

【１２０４】

表２８は、スクリーニングのためのタンパク質発現及び安定性測定値を提供する。測定された数値は対照（ヤギコブウイルスＩＲＥＳ、配列番号３２８２）に対して正規化され、倍率変化として表される。

【１２０５】

タンパク質発現データ（表２８）をさらに分析して、例えば、特定の細胞型において所望の発現レベルを有するタンパク質発現に好適なＩＲＥＳを同定することができる。例えば、ＩＲＥＳ配列は、ＮＣＢＩの分類データベースに従って、属または種に割り当てた。いくつかの配列は、階層の様々なレベルで未分類のままであった。以下の分析を実施した：

●分類学的グループ化による平均発現を評価して、有意な発現が予想され得る（対照の＞１０％）分類学的グループ化を決定した。以下の表は、同定されたウイルス属及び選択基準を満たす属内のＩＲＥの数を要約する。

【表４１】

| MYO | | PPH | | TCL | |
|---|---|---|---|---|---|
| 属 | IRES の数 | 属 | IRES の数 | 属 | IRES の数 |
| ボピウイルス | 3 | エンテロウイルス | 690 | パセリウイルス | 3 |
| オシウイルス | 4 | ボピウイルス | 3 | ボピウイルス | 3 |
| ハニウイルス | 6 | ミスシウイルス | 4 | ハニウイルス | 6 |
| パセリウイルス | 3 | ガリウイルス | 2 | ミスシウイルス | 4 |
| ミスシウイルス | 4 | オシウイルス | 4 | エンテロウイルス | 690 |
| コブウイルス | 130 | カルジオウイルス | 35 | コブウイルス | 130 |
| エンテロウイルス | 690 | コブウイルス | 130 | ラボウイルス | 2 |
| カルジオウイルス | 35 | ラボウイルス | 2 | トットリウイルス | 1 |
| サリウイルス | 14 | サリウイルス | 14 | サリウイルス | 14 |
| ラボウイルス | 2 | 未分類 カリシウイルス科 | 3 | カルジオウイルス | 35 |
| 未分類 カリシウイルス科 | 3 | パレコウイルス | 76 | パレコウイルス | 76 |
| パレコウイルス | 76 | ハニウイルス | 6 | 未分類ベクター | 9 |
| ガリウイルス | 2 | トットリウイルス | 1 | メグリウイルス | 17 |
| シシニウイルス | 10 | 未分類 | 23 | アレキシウイルス | 1 |
| | | パセリウイルス | 3 | 未分類 | 23 |
| | | コサウイルス | 10 | オシウイルス | 4 |
| | | シシニウイルス | 10 | シャンバウイルス | 4 |
| | | 未分類ベクター | 9 | | |

●分類学的グループ化の９０番目のパーセンタイル内の平均発現を評価して、平均で最も活性の高いＩＲＥＳ要素を含む分類学的グループ化を決定した。以下の表は、同定されたウイルス属及び選択基準を満たす属内のＩＲＥの数を要約する。

【表４２】

| MYO | | PPH | | TCL | |
|---|---|---|---|---|---|
| 属 | IRES の数 | 属 | IRES の数 | 属 | IRES の数 |
| ハニウイルス | 6 | エンテロウイルス | 690 | パセリウイルス | 3 |
| パセリウイルス | 3 | ミスシウイルス | 4 | ハニウイルス | 6 |
| コブウイルス | 130 | コブウイルス | 130 | ミスシウイルス | 4 |
| ボピウイルス | 3 | ボピウイルス | 3 | エンテロウイルス | 690 |
| エンテロウイルス | 690 | ガリウイルス | 2 | コブウイルス | 130 |

●種レベルの分類学的分析を、３０を超える種がスクリーニングに表示され、平均発現が陽性対照の＞１０％である属について実施した。エンテロウイルス、コブウイルス、パレコウイルス、カルジオウイルス。９０番目のパーセンタイル内の平均発現を評価した。以下の表は、同定されたウイルス種及び選択基準を満たす種内のＩＲＥの数を要約する。

【表４３】

| エンテロウイルス種 | IRESの数 | コブウイルス種 | IRESの数 | パレコウイルス種 | IRESの数 | カルジオウイルス種 | IRESの数 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| MYO | | | | | | | |
| エンテロウイルスI | 1 | アイチウイルスB | 8 | パレコウイルスA | 48 | カルジオウイルスF | 1 |
| エンテロウイルスF | 5 | 未分類コブウイルス | 32 | 未分類パレコウイルス | 19 | 未分類カルジオウイルス | 4 |
| エンテロウイルスE | 1 | | | | | カルジオウイルスB | 18 |
| エンテロウイルスJ | 5 | | | | | カルジオウイルスE | 1 |
| エンテロウイルスC | 137 | | | | | | |
| エンテロウイルスA | 117 | | | | | | |
| エンテロウイルスB | 154 | | | | | | |
| PPH | | | | | | | |
| エンテロウイルスB | 154 | アイチウイルスB | 8 | パレコウイルスA | 48 | カルジオウイルスF | 1 |
| エンテロウイルスA | 117 | 未分類コブウイルス | 32 | 未分類パレコウイルス | 19 | カルジオウイルスE | 1 |
| エンテロウイルスD | 11 | アイチウイルスA | 32 | | | 未分類カルジオウイルス | 4 |
| エンテロウイルスJ | 5 | | | | | カルジオウイルスB | 18 |
| エンテロウイルスC | 137 | | | | | | |
| ライノウイルスB | 21 | | | | | | |
| エンテロウイルスH | 1 | | | | | | |
| エンテロウイルスI | 1 | | | | | | |
| 未分類エンテロウイルス | 149 | | | | | | |
| エンテロウイルスE | 1 | | | | | | |
| エンテロウイルスF | 5 | | | | | | |
| TCL | | | | | | | |
| エンテロウイルスI | 1 | 未分類コブウイルス | 32 | パレコウイルスA | 48 | 未分類カルジオウイルス | 4 |
| エンテロウイルスD | 11 | アイチウイルスB | 8 | | | カルジオウイルスB | 18 |
| エンテロウイルスC | 137 | | | | | | |
| エンテロウイルスA | 117 | | | | | | |
| エンテロウイルスJ | 5 | | | | | | |
| 未分類エンテロウイルス | 149 | | | | | | |
| エンテロウイルスH | 1 | | | | | | |

●全ての試験した配列にわたる各細胞型における上位配列を評価した。上位約３０個の配列を、各個々の細胞型における陽性対照と比較した発現によって選択し、同様に機能する密接に関連した配列は、わずかに低い性能を有する多様な配列で置き換えた。

○上位のＩＲＥＳには、配列番号７５、７７、１３７、５３２、５６６、５８２、６４８、６８０、６９３、７５２、７８５、７８７、７９１、７９３、８２０、８２３、８３９、８４０、８４３、８５２、８５７、８６１、８６２、８６３、８６４、８７１、８７４、８７６、９２２、９５９、９８３、９８４、１０１５、１０１７、１０２３、１０２６、１０３１、１０４１、１０４７、１０５９、１０６８、１１３４、１１６８、１１６９、１１７１、１１７７、１１７８、１１７９、１１８０、１１８９、１１９２、１１９３、１１９８、１２１６、１２１８、１２３０、１２６３、１２７６、１２８０、１２８２、１２８４、１２８７、１３４６、１３５４、１３６４、１３６７、１３７０、１４３２、１４３８、１４４０、２２８５、２４６５、２６０１、２６１５、２６１６、２６１７、２６１８、２６２７、２６６７、２６８１、２７４２、２７４６、２７５８、２７７７、２７７８、３２８２、３２８３、３２８６、及び３２８７が含まれる。

○ＭＹＯにおけるタンパク質発現の上位のＩＲＥＳ配列には、配列番号１３７、５８０、７８５、７９１、８２０、９２２、１０４１、１０４７、１０６８、１１６８、１１６９、１１７１、１１７７、１１７８、１１７９、１１８０、１１８９、１１９２、１２６３、１２７６、１２８０、１２８２、１２８４、１２８７、１３５４、１３５６、１４３２、１４３６、１４３９、１４４０、２２８５、２６６７、２７４６、２７７７、２７７８、３２８３、及び３２８４が含まれる。

○ＰＰＨにおけるタンパク質発現の上位のＩＲＥＳ配列には、配列番号１３７、５８０、６４８、６９３、７５２、７８５、７９１、７９３、８２０、８２３、８３９、８４０、８６１、８６２、８６３、８７６、９２２、９５９、９８３、９８４、１０１５、１０１７、１０２３、１０２６、１０３１、１０４１、１０４７、１０５９、１０６８、１１３４、１１６８、１１６９、１１７１、１１７７、１１７８、１１７９、１１８０、１１８９、１１９２、１１９３、１１９８、１２１６、１２６３、１２７６、１２８０、１２８２、１２８４、１２８７、１３４６、１３５４、１３５６、１４３２、１４３６、１４３８、１４３９、１４４０、２２８５、２７７７、２７７８、３２８３、及び３２８４が含まれる。

○ＴＣＬにおけるタンパク質発現の上位のＩＲＥＳ配列には、配列番号７７、７８７、７９３、８２０、８３９、８４０、８４３、８５２、８５７、８６１、８６２、８６３、８６４、８７１、８７４、８７６、９５９、１１９３、１２１６、１２８４、１２８７、１３４６、１３５６、１３６４、１４３２、１４３８、１４４０、２６６７、２６８１、２７４２、２７４６、２７５８、３２８３、及び３２８４が含まれる。

【１２０６】

全体として、ｏＲＮＡにおいて高度に活性な数百の新たなＩＲＥＳ要素が同定され、その多くは遍在するＥＭＣＶ型ＩＲＥＳ及び／またはＣＶＢ３型ＩＲＥＳよりもはるかに強力である（図１１１Ａ～１１１Ｃ）。非常に類似したウイルス由来のＩＲＥＳ間でも有意差があることが観察された。少数のＩＲＥＳが全ての細胞型において強力である。図１１０Ａ及び図１１０Ｂに示されるように、筋管及び肝細胞のＩＲＥＳ活性は相関することが多いが、Ｔ細胞のＩＲＥＳ活性は筋管及び肝細胞の活性と相関しないことが多い。

【表２８－１】

表２８．ＩＲＥＳの発現及び機能安定性スクリーニング

| 配列番号 | MYO 平均 [倍率変化] | MYO 標準偏差 [倍率変化] | PHH 平均 [倍率変化] | PHH 標準偏差 [倍率変化] | TCL 平均 [倍率変化] | TCL 標準偏差 [倍率変化] | 配列番号 | MYO 平均 [倍率変化] | MYO 標準偏差 [倍率変化] | PHH 平均 [倍率変化] | PHH 標準偏差 [倍率変化] | TCL 平均 [倍率変化] | TCL 標準偏差 [倍率変化] |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 3282 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1506 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0214472 | 0.0113230 |
| 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1507 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0151743 | 0.0218812 |
| 3 | 0.0007257 | 0.0006312 | 0.0016067 | 0.0003508 | 0 | 0 | 1508 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0082973 | 0.0123163 |
| 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0117764 | 0.0121685 | 1509 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0081531 | 0.0123913 |
| 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0347900 | 0.0324761 | 1510 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0238213 | 0.0412598 | 1511 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0073978 | 0.0093885 |
| 7 | 0 | 0 | 0.0002392 | 0.0002873 | 0.0243770 | 0.0218275 | 1512 | 0.0006905 | 0.0001037 | 0.0003128 | 0.0003378 | 0.0105988 | 0.0183577 |
| 8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0055608 | 0.0096316 | 1513 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 9 | 0.0050209 | 0.0050966 | 0.0098061 | 0.0022326 | 0.0163004 | 0.0159090 | 1514 | 0 | 0 | 0.0007412 | 0.0006638 | 0.0276949 | 0.0149782 |
| 10 | 0 | 0 | 0.0003045 | 0.0004177 | 0.0683266 | 0.0380156 | 1515 | 0.0000200 | 0.0000215 | 0.0004574 | 0.0002314 | 0.0026166 | 0.0045322 |
| 11 | 0.0007727 | 0.0008018 | 0.0074580 | 0.0004470 | 0.0002548 | 0.0004414 | 1516 | 0 | 0 | 0.0001842 | 0.0003190 | 0.0013687 | 0.0022164 |
| 13 | 0 | 0 | 0.0015653 | 0.0002912 | 0.0258959 | 0.0234567 | 1517 | 0 | 0 | 0.0006197 | 0.0005449 | 0.0076199 | 0.0131981 |
| 15 | 0.0194108 | 0.0070272 | 0.0589347 | 0.0084655 | 0.0510777 | 0.0439756 | 1518 | 0 | 0 | 0.0002437 | 0.0004222 | 0.0019248 | 0.0033339 |
| 17 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0141218 | 0.0136848 | 1519 | 0 | 0 | 0.0001733 | 0.0001535 | 0.0027708 | 0.0047992 |
| 18 | 0 | 0 | 0.0015323 | 0.0003545 | 0.0314972 | 0.0203211 | 1520 | 0.0004964 | 0.0000165 | 0.0016507 | 0.0007970 | 0.0100196 | 0.0089848 |
| 19 | 0 | 0 | 0.0007075 | 0.0003451 | 0 | 0 | 1521 | 0.0000418 | 0.0000414 | 0.0000751 | 0.0000668 | 0.0072923 | 0.0126307 |
| 20 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0096814 | 0.0097625 | 1522 | 0.0001229 | 0.0000702 | 0.0013256 | 0.0008175 | 0.0208572 | 0.0219754 |
| 21 | 0.0212586 | 0.0030008 | 0.1362660 | 0.0099125 | 0.0747982 | 0.0245418 | 1523 | 0.0005071 | 0.0000569 | 0.0023354 | 0.0011011 | 0.0064428 | 0.0111592 |
| 22 | 0.0091365 | 0.0034231 | 0.0925952 | 0.0067153 | 0.0309040 | 0.0284601 | 1524 | 0 | 0 | 0.0004331 | 0.0005532 | 0.0050150 | 0.0058351 |
| 23 | 0 | 0 | 0.0008387 | 0.0004640 | 0.0024170 | 0.0041863 | 1525 | 0.0007472 | 0.0000638 | 0.0034506 | 0.0006977 | 0.0107460 | 0.0058710 |
| 24 | 0 | 0 | 0.0000246 | 0.0000427 | 0.0031111 | 0.0053885 | 1526 | 0.0000052 | 0.0000090 | 0.0002429 | 0.0002183 | 0.0167959 | 0.0198498 |
| 25 | 0.0737983 | 0.0053055 | 0.1558598 | 0.0162108 | 0.4519536 | 0.1337645 | 1527 | 0 | 0 | 0.0000853 | 0.0001477 | 0.0107912 | 0.0138687 |
| 26 | 0.0027586 | 0.0007225 | 0.0125235 | 0.0005036 | 0 | 0 | 1528 | 0 | 0 | 0.0001664 | 0.0002251 | 0.0029835 | 0.0051675 |
| 27 | 0.0186635 | 0.0040436 | 0.0989179 | 0.0085851 | 0.0244226 | 0.0253392 | 1529 | 0.0000397 | 0.0000687 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 28 | 0.0176418 | 0.0025557 | 0.1220648 | 0.0135955 | 0.1126415 | 0.0207651 | 1530 | 0.0000744 | 0.0001067 | 0.0009300 | 0.0008577 | 0.0142545 | 0.0149820 |
| 29 | 0 | 0 | 0.0082741 | 0.0009236 | 0.0109582 | 0.0120151 | 1532 | 0.0000333 | 0.0000289 | 0.0004763 | 0.0002133 | 0 | 0 |
| 30 | 0.1967132 | 0.0482465 | 0.3984421 | 0.0443954 | 0.3729583 | 0.0512158 | 1533 | 0 | 0 | 0.0002489 | 0.0002519 | 0.0061249 | 0.0106087 |
| 31 | 0.5881394 | 0.1231212 | 0.6943366 | 0.0609169 | 0.4862626 | 0.0380244 | 1534 | 0 | 0 | 0.0004789 | 0.0004669 | 0.0102236 | 0.0140407 |
| 32 | 0.2163073 | 0.0786069 | 0.3275750 | 0.0149576 | 0.0297402 | 0.0211648 | 1535 | 0.0004070 | 0.0002482 | 0.0000169 | 0.0000293 | 0.0031651 | 0.0030277 |
| 33 | 0.3574334 | 0.1134934 | 0.4409356 | 0.0619212 | 0.2087538 | 0.1393970 | 1536 | 0 | 0 | 0.0000278 | 0.0000482 | 0.0105381 | 0.0092746 |

【表２８－２】

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 34 | 0.2168290 | 0.0372754 | 0.4643626 | 0.0428027 | 0.2638304 | 0.0199095 | 1537 | 0 | 0 | 0.0001787 | 0.0003096 | 0.0019766 | 0.0032946 | | | | | | |
| 35 | 0 | 0 | 0.0053785 | 0.0003841 | 0.0041330 | 0.0071586 | 1538 | 0 | 0 | 0.0000469 | 0.0000813 | 0 | 0 | | | | | | |
| 36 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0009344 | 0.0016184 | 1539 | 0.0000080 | 0.0000138 | 0.0005273 | 0.0000987 | 0 | 0 | | | | | | |
| 37 | 0.0385876 | 0.0102730 | 0.2564175 | 0.0318420 | 0.0237011 | 0.0410515 | 1540 | 0 | 0 | 0.0004805 | 0.0004641 | 0.0061239 | 0.0051189 | | | | | | |
| 38 | 0.0783841 | 0.0081066 | 0.2208610 | 0.0161877 | 0.0218646 | 0.0195008 | 1541 | 0 | 0 | 0.0004565 | 0.0004266 | 0.0019858 | 0.0034394 | | | | | | |
| 39 | 0.0002919 | 0.0005055 | 0.0039006 | 0.0003663 | 0.0032560 | 0.0056396 | 1542 | 0 | 0 | 0.0001653 | 0.0001464 | 0.0044504 | 0.0039191 | | | | | | |
| 40 | 0.1990175 | 0.0602854 | 0.2390836 | 0.0064826 | 0.0510807 | 0.0668843 | 1543 | 0.0000060 | 0.0000105 | 0.0001109 | 0.0001921 | 0.0011654 | 0.0020185 | | | | | | |
| 41 | 0.0004126 | 0.0003911 | 0.0103342 | 0.0014990 | 0.0275243 | 0.0212627 | 1544 | 0 | 0 | 0.0001949 | 0.0003376 | 0.0056140 | 0.0097237 | | | | | | |
| 42 | 0.0719844 | 0.0178546 | 0.3424716 | 0.0127386 | 0.0932231 | 0.0251858 | 1545 | 0 | 0 | 0.0001339 | 0.0001699 | 0.0127388 | 0.0217735 | | | | | | |
| 43 | 0.1099597 | 0.0229409 | 0.4559891 | 0.0857666 | 0.2865923 | 0.0149024 | 1546 | 0.0000324 | 0.0000483 | 0.0011222 | 0.0004400 | 0.0054897 | 0.0065997 | | | | | | |
| 44 | 0 | 0 | 0.0160162 | 0.0023394 | 0.0142148 | 0.0146243 | 1548 | 0 | 0 | 0.0008301 | 0.0006891 | 0.0130482 | 0.0116042 | | | | | | |
| 46 | 0.2248916 | 0.0386050 | 0.5030167 | 0.0391307 | 0.2471603 | 0.0200305 | 1549 | 0 | 0 | 0.0003654 | 0.0003780 | 0.0109065 | 0.0188906 | | | | | | |
| 47 | 0.0024602 | 0.0015882 | 0.0894217 | 0.0068490 | 0.0225889 | 0.0391252 | 1550 | 0 | 0 | 0.0004262 | 0.0003949 | 0.0064043 | 0.0073966 | | | | | | |
| 48 | 0.1302672 | 0.0415369 | 0.4246611 | 0.0722898 | 0.0028031 | 0.0048551 | 1551 | 0 | 0 | 0.0002645 | 0.0004582 | 0 | 0 | | | | | | |
| 49 | 0.1952196 | 0.0634240 | 0.6215006 | 0.0699875 | 0.0725234 | 0.0384119 | 1552 | 0 | 0 | 0.0002943 | 0.0005097 | 0 | 0 | | | | | | |
| 50 | 0.2776097 | 0.1012361 | 0.8012082 | 0.0392090 | 0.2099342 | 0.0885092 | 1553 | 0 | 0 | 0.0001401 | 0.0001466 | 0.0040492 | 0.0066442 | | | | | | |
| 51 | 0.0916662 | 0.0254500 | 0.6244846 | 0.0767046 | 0.0896825 | 0.0175443 | 1554 | 0.0000294 | 0.0000347 | 0.0008094 | 0.0012840 | 0.0074537 | 0.0108322 | | | | | | |
| 52 | 0.0401935 | 0.0061400 | 0.1618844 | 0.0066904 | 0.0792739 | 0.0186896 | 1555 | 0 | 0 | 0.0007101 | 0.0004906 | 0.0133649 | 0.0124682 | | | | | | |
| 53 | 0.0798819 | 0.0091055 | 0.5740121 | 0.0677347 | 0.0872744 | 0.0545906 | 1556 | 0 | 0 | 0.0004873 | 0.0004740 | 0 | 0 | | | | | | |
| 54 | 0.0324016 | 0.0096527 | 0.4088882 | 0.0452690 | 0.0424563 | 0.0590408 | 1557 | 0 | 0 | 0.0005740 | 0.0005099 | 0.0173760 | 0.0199652 | | | | | | |
| 55 | 0.0872815 | 0.0289797 | 0.6137779 | 0.0345733 | 0.0161925 | 0.0114987 | 1558 | 0 | 0 | 0.0004837 | 0.0004195 | 0.0080935 | 0.0080551 | | | | | | |
| 56 | 0.2027666 | 0.0715003 | 0.5259393 | 0.0334114 | 0.0430137 | 0.0745018 | 1559 | 0 | 0 | 0.0002943 | 0.0005097 | 0 | 0 | | | | | | |
| 57 | 0.0551177 | 0.0150097 | 0.0529392 | 0.0080507 | 0.0023628 | 0.0033778 | 1560 | 0 | 0 | 0.0002489 | 0.0003232 | 0 | 0 | | | | | | |
| 60 | 0.0004209 | 0.0005173 | 0.0059558 | 0.0012320 | 0.0160415 | 0.0205989 | 1561 | 0.0000245 | 0.0000214 | 0.0002600 | 0.0004503 | 0.0047187 | 0.0081730 | | | | | | |
| 61 | 0.0003711 | 0.0003214 | 0.0120956 | 0.0013357 | 0.0573225 | 0.0391070 | 1562 | 0 | 0 | 0.0011000 | 0.0014289 | 0.0126741 | 0.0219522 | | | | | | |
| 62 | 0.1869718 | 0.0273751 | 0.8055271 | 0.0438858 | 0.0756394 | 0.0150066 | 1563 | 0 | 0 | 0.0003629 | 0.0006286 | 0.0049302 | 0.0085393 | | | | | | |
| 63 | 0.1211071 | 0.0398989 | 0.5329137 | 0.1684756 | 0.1943937 | 0.0137275 | 1564 | 0 | 0 | 0.0006810 | 0.0006196 | 0.0009712 | 0.0016821 | | | | | | |
| 66 | 0.0014413 | 0.0021840 | 0.0120186 | 0.0004905 | 0.0142627 | 0.0247038 | 1565 | 0 | 0 | 0.0005362 | 0.0009288 | 0.0076843 | 0.0071498 | | | | | | |
| 67 | 0.6782079 | 0.2787539 | 0.4995717 | 0.0781897 | 0.0431586 | 0.0270043 | 1566 | 0 | 0 | 0.0006864 | 0.0004407 | 0 | 0 | | | | | | |
| 68 | 0.0570387 | 0.0148521 | 0.2466370 | 0.0267851 | 0.0662418 | 0.0340702 | 1567 | 0 | 0 | 0.0002303 | 0.0003989 | 0.0077153 | 0.0124248 | | | | | | |
| 69 | 0.0090531 | 0.0005709 | 0.5600881 | 0.0631328 | 0.0000849 | 0.0001471 | 1568 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0067468 | 0.0108688 | | | | | | |
| 70 | 0.6929018 | 0.0427263 | 0.7111662 | 0.0426930 | 0.1314525 | 0.0531588 | 1569 | 0 | 0 | 0.0001877 | 0.0003250 | 0.0102320 | 0.0022420 | | | | | | |
| 71 | 0 | 0 | 0.0028198 | 0.0002416 | 0.0018636 | 0.0032279 | 1570 | 0 | 0 | 0.0001950 | 0.0003377 | 0.0215169 | 0.0259005 | | | | | | |
| 72 | 0.1911527 | 0.0667602 | 0.3083742 | 0.0173782 | 0.0922957 | 0.0330755 | 1571 | 0 | 0 | 0.0006122 | 0.0005478 | 0.0015842 | 0.0027439 | | | | | | |
| 74 | 0.4385857 | 0.1433729 | 0.6156285 | 0.0770318 | 0.0278455 | 0.0278326 | 1572 | 0 | 0 | 0.0003479 | 0.0002998 | 0 | 0 | | | | | | |

【表２８－３】

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 76 | 0.6382066 | 0.1223888 | 0.6946743 | 0.0462455 | 0.1553771 | 0.0625390 | 1573 | 0.0000030 | 0.0000052 | 0.0006190 | 0.0005306 | 0.0132096 | 0.0114422 | | | | | | |
| 77 | 0.7032592 | 0.4446845 | 0.7768201 | 0.2615780 | 1.3834075 | 0.0480207 | 1574 | 0 | 0 | 0.0001749 | 0.0003029 | 0.0047961 | 0.0083071 | | | | | | |
| 79 | 0.2960022 | 0.0569176 | 0.5767077 | 0.0234579 | 0.1828386 | 0.0237461 | 1575 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | | |
| 80 | 0.4478252 | 0.1402655 | 0.5727297 | 0.0096986 | 0 | 0 | 1576 | 0.0000030 | 0.0000052 | 0.0002541 | 0.0002438 | 0.0203078 | 0.0212871 | | | | | | |
| 81 | 0.0178928 | 0.0036404 | 0.0221887 | 0.0023027 | 0.1186251 | 0.0459029 | 1577 | 0.0000919 | 0.0000853 | 0.0007964 | 0.0001953 | 0.0041446 | 0.0071787 | | | | | | |
| 82 | 0.4297767 | 0.2245829 | 0.5078949 | 0.1393677 | 0.9130118 | 0.0629758 | 1578 | 0.0000765 | 0.0000680 | 0.0008097 | 0.0007678 | 0.0081730 | 0.0141560 | | | | | | |
| 83 | 0.0149078 | 0.0040463 | 0.1738232 | 0.0327499 | 0.0089636 | 0.0079776 | 1579 | 0.0000445 | 0.0000387 | 0.0007256 | 0.0006741 | 0.0062280 | 0.0107872 | | | | | | |
| 84 | 0.1945619 | 0.0806958 | 0.4080238 | 0.0171027 | 0.0889561 | 0.0769459 | 1580 | 0 | 0 | 0.0003041 | 0.0004831 | 0.0004596 | 0.0007961 | | | | | | |
| 85 | 0.4527750 | 0.1963657 | 0.3842792 | 0.0094416 | 0.0035469 | 0.0061434 | 1581 | 0 | 0 | 0.0005678 | 0.0005932 | 0 | 0 | | | | | | |
| 86 | 0.0017080 | 0.0012651 | 0.0079952 | 0.0011154 | 0 | 0 | 1582 | 0 | 0 | 0.0000810 | 0.0001404 | 0.0004984 | 0.0008633 | | | | | | |
| 88 | 0.3707798 | 0.1031602 | 0.5799964 | 0.0841860 | 0.0134757 | 0.0170499 | 1583 | 0.0000073 | 0.0000127 | 0.0001485 | 0.0002572 | 0.0053623 | 0.0071408 | | | | | | |
| 89 | 0.0006089 | 0.0010225 | 0.0019466 | 0.0005328 | 0.0183244 | 0.0292280 | 1584 | 0 | 0 | 0.0000810 | 0.0001404 | 0.0020399 | 0.0035332 | | | | | | |
| 90 | 0.4897043 | 0.1389473 | 0.6459191 | 0.0390811 | 0.0061620 | 0.0106729 | 1585 | 0.0000849 | 0.0000782 | 0 | 0 | 0.0008564 | 0.0014834 | | | | | | |
| 92 | 0.2764537 | 0.1240604 | 0.5475590 | 0.0234751 | 0.0183546 | 0.0139946 | 1586 | 0 | 0 | 0.0006962 | 0.0003161 | 0.0047472 | 0.0082223 | | | | | | |
| 93 | 0.4499083 | 0.2129886 | 0.4760142 | 0.0076992 | 0 | 0 | 1587 | 0 | 0 | 0.0004315 | 0.0003855 | 0.0011286 | 0.0019549 | | | | | | |
| 94 | 0.1740216 | 0.0519610 | 0.4323126 | 0.0982759 | 0.0023896 | 0.0041390 | 1588 | 0 | 0 | 0.0002826 | 0.0000940 | 0 | 0 | | | | | | |
| 95 | 0.4375171 | 0.1728297 | 0.5837429 | 0.0251473 | 0.0289199 | 0.0110706 | 1589 | 0.0000151 | 0.0000261 | 0.0004532 | 0.0003980 | 0.0153938 | 0.0146403 | | | | | | |
| 96 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1590 | 0 | 0 | 0.0002283 | 0.0003677 | 0.0085810 | 0.0148628 | | | | | | |
| 97 | 0.2170292 | 0.0344728 | 0.3452326 | 0.0317161 | 0.3951922 | ND | 1591 | 0.0005291 | 0.0000867 | 0.0010207 | 0.0009550 | 0.0006937 | 0.0012014 | | | | | | |
| 98 | 0.2685941 | 0.0765690 | 0.6952049 | 0.0772868 | 0 | ND | 1592 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0053427 | 0.0055973 | | | | | | |
| 99 | 0.1342300 | 0.0383110 | 0.2687326 | 0.0334611 | 0.3030330 | ND | 1593 | 0 | 0 | 0.0001137 | 0.0001970 | 0 | 0 | | | | | | |
| 100 | 0.5828736 | 0.0294970 | 0.8229197 | 0.0846635 | 0.4461679 | 0.0818919 | 1594 | 0.0001257 | 0.0001193 | 0.0000627 | 0.0000753 | 0.0008751 | 0.0015156 | | | | | | |
| 101 | 0.5188459 | 0.1148813 | 0.8968855 | 0.1350424 | 1.1794009 | ND | 1595 | 0.0000309 | 0.0000536 | 0.0001407 | 0.0002438 | 0.0027933 | 0.0048381 | | | | | | |
| 102 | 0.0046130 | 0.0031718 | 0.0069334 | 0.0023042 | 0.0651029 | ND | 1596 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | | |
| 103 | 0.0051833 | 0.0014146 | 0.0161795 | 0.0021885 | 0 | ND | 1597 | 0 | 0 | 0.0001471 | 0.0001162 | 0.0056398 | 0.0093831 | | | | | | |
| 104 | 0.0339436 | 0.0044657 | 0.1522868 | 0.0190001 | 0 | ND | 1598 | 0 | 0 | 0.0009122 | 0.0003350 | 0.0159323 | 0.0193802 | | | | | | |
| 105 | 0.2251646 | 0.0732739 | 0.3323910 | 0.0721383 | 0.3910922 | ND | 1599 | 0.0002334 | 0.0000374 | 0.0003108 | 0.0003461 | 0.0020343 | 0.0035234 | | | | | | |
| 106 | 0.3069493 | 0.0957163 | 0.6961634 | 0.2030217 | 0 | ND | 1600 | 0.0004490 | 0.0000883 | 0.0011799 | 0.0001840 | 0.0002981 | 0.0005164 | | | | | | |
| 107 | 0.2814393 | 0.1399702 | 0.9673365 | 0.0490462 | 0.3905573 | ND | 1601 | 0.0002284 | 0.0000617 | 0.0000554 | 0.0000960 | 0.0061032 | 0.0105711 | | | | | | |
| 108 | 0.6981985 | 0.2590590 | 0.9752755 | 0.0608064 | 0.2536976 | 0.0430809 | 1602 | 0.0011178 | 0.0000431 | 0.0004065 | 0.0005336 | 0.0152107 | 0.0133324 | | | | | | |
| 109 | 0.2429038 | 0.1400384 | 0.6494309 | 0.0946196 | 0.3739178 | ND | 1603 | 0.0003257 | 0.0001322 | 0.0009224 | 0.0009789 | 0.0029302 | 0.0050753 | | | | | | |
| 110 | 0.2064715 | 0.0673403 | 0.4988407 | 0.0924237 | 0.0253530 | ND | 1604 | 0 | 0 | 0.0000139 | 0.0000241 | 0.0142232 | 0.0142299 | | | | | | |
| 111 | 0.1987318 | 0.0798635 | 0.4829672 | 0.1066300 | 0 | ND | 1605 | 0.0030934 | 0.0003819 | 0.0056302 | 0.0019678 | 0.0079829 | 0.0138268 | | | | | | |
| 112 | 0.3379470 | 0.0825198 | 0.6270075 | 0.0951682 | 0 | ND | 1606 | 0 | 0 | 0.0000603 | 0.0001045 | 0.0009815 | 0.0017001 | | | | | | |
| 113 | 0.2801268 | 0.0925221 | 0.4251382 | 0.0091592 | 0.1162967 | ND | 1607 | 0 | 0 | 0.0002729 | 0.0004728 | 0.0177913 | 0.0257054 | | | | | | |

【表２８－４】

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 114 | 0.0203083 | 0.0089203 | 0.0457710 | 0.0061140 | 0 | ND | 1608 | 0.0000172 | 0.0000299 | 0.0002584 | 0.0003174 | 0.0175660 | 0.0165238 | | | | | | |
| 115 | 0.0131362 | 0.0046594 | 0.0201751 | 0.0006238 | 0 | ND | 1609 | 0.0010173 | 0.0000620 | 0.0010659 | 0.0010435 | 0.0032036 | 0.0038620 | | | | | | |
| 116 | 0.0000021 | 0.0000037 | 0.0029992 | 0.0002743 | 0 | ND | 1610 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0069605 | 0.0120559 | | | | | | |
| 117 | 0.0031185 | 0.0013549 | 0.0191040 | 0.0007534 | 0 | ND | 1611 | 0.0003588 | 0.0000853 | 0.0026388 | 0.0027004 | 0.0564205 | 0.0520091 | | | | | | |
| 118 | 0.1241871 | 0.0480745 | 0.4590174 | 0.0233074 | 0 | ND | 1612 | 0.0012827 | 0.0001979 | 0.0036456 | 0.0037675 | 0.0004511 | 0.0007814 | | | | | | |
| 119 | 0.1749396 | 0.0778002 | 1.0310895 | 0.1670904 | 0 | ND | 1613 | 0 | 0 | 0.0001635 | 0.0002833 | 0.0505646 | 0.0875805 | | | | | | |
| 120 | 0.2575445 | 0.1059152 | 0.7236329 | 0.0529854 | 0 | ND | 1614 | 0.0036948 | 0.0006211 | 0.0049334 | 0.0010346 | 0.0111173 | 0.0192557 | | | | | | |
| 121 | 0.6494572 | 0.2831596 | 1.0346703 | 0.1667450 | 0.1392316 | ND | 1615 | 0.0000859 | 0.0001487 | 0 | 0 | 0.0221051 | 0.0234419 | | | | | | |
| 122 | 0.3417563 | 0.1512691 | 0.8871036 | 0.0103979 | 0 | ND | 1616 | 0.0037435 | 0.0005235 | 0.0027122 | 0.0007835 | 0.0543729 | 0.0507003 | | | | | | |
| 123 | 0.0001161 | 0.0001579 | 0.0023300 | 0.0009030 | 0 | ND | 1617 | 0.0040865 | 0.0005649 | 0.0041983 | 0.0007918 | 0 | 0 | | | | | | |
| 124 | 0.9006923 | 0.3197386 | 1.5905103 | 0.0905090 | 0.1451584 | 0.0165966 | 1618 | 0.0016710 | 0.0002546 | 0.0028054 | 0.0014955 | 0.0170919 | 0.0148803 | | | | | | |
| 125 | 0.3924469 | 0.2068017 | 0.6282859 | 0.0330176 | 0.1353970 | ND | 1621 | 0 | 0 | 0.0001627 | 0.0002818 | 0.0434570 | 0.0392746 | | | | | | |
| 126 | 0.0187588 | 0.0054806 | 0.0434370 | 0.0036734 | 0.1566415 | ND | 1622 | 0.0006654 | 0.0000395 | 0.0006737 | 0.0006445 | 0.0671413 | 0.0848171 | | | | | | |
| 127 | 0.2963362 | 0.1464111 | 0.6974915 | 0.0352878 | 0 | ND | 1623 | 0.0028626 | 0.0005510 | 0.0072559 | 0.0023049 | 0 | 0 | | | | | | |
| 128 | 0.4537441 | 0.1188701 | 0.5690407 | 0.0299702 | 0.3175412 | ND | 1624 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0613542 | 0.0638549 | | | | | | |
| 129 | 0.0154092 | 0.0070195 | 0.0631405 | 0.0072633 | 0 | ND | 1625 | 0.0027722 | 0.0004154 | 0.0013995 | 0.0011101 | 0.0225306 | 0.0141810 | | | | | | |
| 130 | 0.0015048 | 0.0021189 | 0.0337146 | 0.0069058 | 0 | ND | 1626 | 0.0045476 | 0.0008276 | 0.0032398 | 0.0015958 | 0.0172414 | 0.0270984 | | | | | | |
| 131 | 0.0001991 | 0.0003448 | 0.0056489 | 0.0006963 | 0 | ND | 1627 | 0.0040491 | 0.0006149 | 0.0095197 | 0.0025161 | 0.0398837 | 0.0346928 | | | | | | |
| 132 | 0.0005971 | 0.0008253 | 0.0034234 | 0.0010446 | 0 | ND | 1628 | 0 | 0 | 0.0008855 | 0.0007885 | 0.0194668 | 0.0337175 | | | | | | |
| 133 | 0 | 0 | 0.0022669 | 0.0004595 | 0.2491430 | ND | 1629 | 0.0009121 | 0.0005022 | 0.0008843 | 0.0009616 | 0 | 0 | | | | | | |
| 134 | 0.0070991 | 0.0022130 | 0.0273380 | 0.0099178 | 0 | ND | 1630 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0451013 | 0.0310727 | | | | | | |
| 135 | 0.0094051 | 0.0055160 | 0.0221044 | 0.0011844 | 0.0032483 | 0.0056262 | 1631 | 0.0000350 | 0.0000607 | 0.0010128 | 0.0009295 | 0.0005251 | 0.0009094 | | | | | | |
| 136 | 0.0068106 | 0.0018391 | 0.0147612 | 0.0021237 | 0 | ND | 1632 | 0.0002405 | 0.0001650 | 0 | 0 | 0.0192644 | 0.0182091 | | | | | | |
| 137 | 1.2986966 | 0.4830765 | 1.0333533 | 0.0925197 | 0.2430558 | 0.0095921 | 1633 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0126335 | 0.0218819 | | | | | | |
| 138 | 0.3778265 | 0.1899576 | 0.6246971 | 0.1091093 | 0 | ND | 1634 | 0.0020441 | 0.0003740 | 0.0005269 | 0.0008139 | 0.0151077 | 0.0261673 | | | | | | |
| 139 | 0.0222471 | 0.0088329 | 0.0768459 | 0.0178366 | 0 | ND | 1635 | 0.0013437 | 0.0003184 | 0.0047410 | 0.0027827 | 0.0590905 | 0.0308344 | | | | | | |
| 140 | 0.1258643 | 0.0194531 | 0.3957942 | 0.0279953 | 0 | ND | 1636 | 0.0004840 | 0.0002911 | 0.0016268 | 0.0015116 | 0.0619350 | 0.0598219 | | | | | | |
| 141 | 0.0003538 | 0.0006127 | 0.0034971 | 0.0005907 | 0 | ND | 1637 | 0.0002732 | 0.0002328 | 0.0005634 | 0.0004481 | 0.0167014 | 0.0289276 | | | | | | |
| 142 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | ND | 1638 | 0 | 0 | 0.0000258 | 0.0000448 | 0 | 0 | | | | | | |
| 143 | 0 | 0 | 0.0049397 | 0.0005123 | 0 | ND | 1639 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0414879 | 0.0718591 | | | | | | |
| 145 | 0.0002624 | 0.0004544 | 0 | 0 | 0 | ND | 1640 | 0.0019115 | 0.0007195 | 0.0024157 | 0.0006908 | 0.0122781 | 0.0212529 | | | | | | |
| 146 | 0.0041248 | 0.0027535 | 0.0067767 | 0.0027159 | 0 | ND | 1641 | 0.0015849 | 0.0004598 | 0.0023121 | 0.0022390 | 0.0336987 | 0.0349883 | | | | | | |
| 147 | 0.0044277 | 0.0042768 | 0.0089219 | 0.0024342 | 0 | ND | 1642 | 0.0000613 | 0.0001061 | 0.0000775 | 0.0001343 | 0 | 0 | | | | | | |
| 148 | 0.0000541 | 0.0000936 | 0.0011627 | 0.0007072 | 0 | ND | 1643 | 0 | 0 | 0.0011622 | 0.0013597 | 0.0028816 | 0.0027030 | | | | | | |
| 149 | 0.0002663 | 0.0004613 | 0.0010294 | 0.0008036 | 0 | ND | 1644 | 0 | 0 | 0.0008076 | 0.0008135 | 0.0350211 | 0.0425576 | | | | | | |

【表２８－５】

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 150 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | ND | 1645 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0138206 | 0.0145315 |
| 151 | 0 | 0 | 0.0000822 | 0.0001424 | 0 | ND | 1646 | 0 | 0 | 0.0005036 | 0.0007428 | 0.0208713 | 0.0225055 |
| 152 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | ND | 1647 | 0 | 0 | 0.0000257 | 0.0000445 | 0.0143153 | 0.0247947 |
| 153 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | ND | 1648 | 0.0000094 | 0.0000163 | 0.0002842 | 0.0004923 | 0.0263279 | 0.0228713 |
| 154 | 0.0012122 | 0.0018781 | 0.0024662 | 0.0013982 | 0.1262727 | ND | 1649 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0109320 | 0.0107906 |
| 155 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | ND | 1650 | 0 | 0 | 0.0016003 | 0.0020244 | 0 | 0 |
| 156 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | ND | 1651 | 0.0003239 | 0.0001108 | 0.0020799 | 0.0014340 | 0.0407642 | 0.0561672 |
| 157 | 0.0000392 | 0.0000679 | 0 | 0 | 0.1972687 | ND | 1652 | 0 | 0 | 0.0007924 | 0.0001139 | 0.0375056 | 0.0556149 |
| 158 | 0 | 0 | 0.0000417 | 0.0000722 | 0.4104664 | ND | 1653 | 0 | 0 | 0.0002874 | 0.0002958 | 0.0735939 | 0.0526186 |
| 159 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | ND | 1654 | 0 | 0 | 0.0005814 | 0.0010070 | 0.0119523 | 0.0207020 |
| 160 | 0.0000629 | 0.0001090 | 0 | 0 | 0 | ND | 1655 | 0 | 0 | 0.0003295 | 0.0004736 | 0.0492772 | 0.0562500 |
| 161 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | ND | 1656 | 0.0000137 | 0.0000238 | 0.0003778 | 0.0006078 | 0.0406504 | 0.0352461 |
| 162 | 0 | 0 | 0.0002741 | 0.0004747 | 0 | ND | 1657 | 0.0000083 | 0.0000145 | 0 | 0 | 0.0116280 | 0.0201404 |
| 163 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | ND | 1658 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0059445 | 0.0102962 |
| 164 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | ND | 1659 | 0 | 0 | 0.0000685 | 0.0001187 | 0.0367034 | 0.0369291 |
| 165 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | ND | 1660 | 0 | 0 | 0.0005815 | 0.0010072 | 0.0047955 | 0.0068049 |
| 166 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | ND | 1661 | 0 | 0 | 0.0007791 | 0.0011760 | 0.0388151 | 0.0600015 |
| 167 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | ND | 1662 | 0 | 0 | 0.0003489 | 0.0006042 | 0.0168155 | 0.0248809 |
| 168 | 0.0000684 | 0.0001185 | 0 | 0 | 0.0087777 | ND | 1663 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0247370 | 0.0233538 |
| 169 | 0.0000619 | 0.0001072 | 0.0000179 | 0.0000309 | 0 | ND | 1664 | 0 | 0 | 0.0000343 | 0.0000593 | 0.0042459 | 0.0073541 |
| 170 | 0 | 0 | 0.0002535 | 0.0004391 | 0 | ND | 1665 | 0.0005162 | 0.0001559 | 0.0005230 | 0.0004747 | 0.0167812 | 0.0253681 |
| 171 | 0 | 0 | 0.0000069 | 0.0000119 | 0 | ND | 1666 | 0.0000391 | 0.0000677 | 0 | 0 | 0.0436754 | 0.0446937 |
| 172 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | ND | 1668 | 0 | 0 | 0.0001199 | 0.0002076 | 0.0604003 | 0.0403215 |
| 173 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | ND | 1669 | 0 | 0 | 0.0004167 | 0.0004073 | 0.0267734 | 0.0463729 |
| 174 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | ND | 1670 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0127607 | 0.0221022 |
| 175 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | ND | 1671 | 0 | 0 | 0.0000771 | 0.0001335 | 0.0978058 | 0.0777299 |
| 176 | 0.0027756 | 0.0045054 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1672 | 0.0000310 | 0.0000537 | 0.0005685 | 0.0009847 | 0.0252635 | 0.0220030 |
| 177 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | ND | 1673 | 0.0000491 | 0.0000429 | 0.0000257 | 0.0000445 | 0.0518293 | 0.0177900 |
| 178 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.1678586 | ND | 1674 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0067869 | 0.0117553 |
| 179 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | ND | 1675 | 0.0000190 | 0.0000329 | 0.0003497 | 0.0003035 | 0.0450701 | 0.0639803 |
| 180 | 0.0003667 | 0.0006352 | 0.0011302 | 0.0008598 | 0 | ND | 1676 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0226017 | 0.0391472 |
| 181 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.1736276 | ND | 1677 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0380110 | 0.0192158 |
| 182 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | ND | 1678 | 0.0006376 | 0.0003776 | 0.0020524 | 0.0003638 | 0.0406537 | 0.0704142 |
| 183 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0786524 | ND | 1679 | 0 | 0 | 0.0001378 | 0.0002168 | 0.0273142 | 0.0473095 |
| 184 | 0.0038077 | 0.0008918 | 0.0035129 | 0.0016791 | 0 | ND | 1680 | 0.0000806 | 0.0000867 | 0 | 0 | 0.0033508 | 0.0058037 |

【表２８－６】

| | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 185 | 0.0001813 | 0.0003140 | 0 | 0 | 0 | ND | 1681 | 0.0000036 | 0.0000062 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 186 | 0.0001267 | 0.0002195 | 0 | 0 | 0 | ND | 1682 | 0.0000021 | 0.0000037 | 0.0004264 | 0.0001044 | 0.0848976 | 0.0516951 |
| 187 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | ND | 1684 | 0.0001634 | 0.0001573 | 0.0004539 | 0.0007861 | 0.0325964 | 0.0564587 |
| 188 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | ND | 1685 | 0.0004586 | 0.0002100 | 0.0015522 | 0.0004772 | 0.0712171 | 0.1021588 |
| 189 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | ND | 1686 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0311091 | 0.0538826 |
| 190 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | ND | 1687 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0037537 | 0.0050434 |
| 191 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | ND | 1688 | 0.0003773 | 0.0001399 | 0 | 0 | 0.0305146 | 0.0449695 |
| 192 | 0.0002562 | 0.0004438 | 0 | 0 | 0 | ND | 1689 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0241801 | 0.0418812 |
| 193 | 0.0026405 | 0.0042372 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1690 | 0.0000740 | 0.0001281 | 0.0004005 | 0.0006937 | 0.0520529 | 0.0678950 |
| 194 | 0.0004935 | 0.0008353 | 0.0003503 | 0.0002392 | 0.1663075 | 0.1281269 | 1691 | 0 | 0 | 0.0007474 | 0.0011953 | 0.0270826 | 0.0273611 |
| 195 | 0.0000793 | 0.0001374 | 0.0002305 | 0.0002639 | 0.0573155 | 0.0521670 | 1692 | 0 | 0 | 0.0002181 | 0.0003777 | 0.0604226 | 0.0428062 |
| 196 | 0.0001466 | 0.0002540 | 0.0002864 | 0.0002399 | 0.1553605 | 0.1359665 | 1693 | 0.0001200 | 0.0001039 | 0.0011464 | 0.0009943 | 0.0309146 | 0.0208542 |
| 197 | 0 | 0 | 0.0002247 | 0.0002589 | 0.0351676 | 0.0609121 | 1694 | 0.0016614 | 0.0004415 | 0.0018681 | 0.0026545 | 0.0540495 | 0.0630073 |
| 198 | 0 | 0 | 0.0001920 | 0.0003325 | 0.0974514 | 0.1687908 | 1695 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0075350 | 0.0065379 |
| 199 | 0 | 0 | 0.0001454 | 0.0001701 | 0.0121421 | 0.0113885 | 1696 | 0.0001209 | 0.0001092 | 0 | 0 | 0.0198601 | 0.0343987 |
| 200 | 0 | 0 | 0.0002660 | 0.0001737 | 0.0556123 | 0.0963233 | 1697 | 0.0001969 | 0.0000570 | 0 | 0 | 0.0325121 | 0.0563127 |
| 201 | 0.0001719 | 0.0002978 | 0.0001715 | 0.0002499 | 0.0541251 | 0.0937474 | 1698 | 0.0020375 | 0.0001380 | 0.0009472 | 0.0013617 | 0.0263970 | 0.0233097 |
| 202 | 0.0002820 | 0.0004885 | 0.0002541 | 0.0000908 | 0.0696660 | 0.1206650 | 1699 | 0.0000116 | 0.0000201 | 0.0011636 | 0.0010976 | 0.0132900 | 0.0230189 |
| 203 | 0 | 0 | 0.0001760 | 0.0002921 | 0.0928222 | 0.1509802 | 1700 | 0.0037455 | 0.0006815 | 0.0055439 | 0.0005267 | 0.0440983 | 0.0660264 |
| 204 | 0 | 0 | 0.0003727 | 0.0002687 | 0.0658697 | 0.1092254 | 1701 | 0.0000454 | 0.0000787 | 0 | 0 | 0.0561907 | 0.0909423 |
| 205 | 0 | 0 | 0.0002445 | 0.0003594 | 0.5541883 | 0.3020828 | 1702 | 0.0001531 | 0.0002204 | 0.0003359 | 0.0005818 | 0.0107985 | 0.0114638 |
| 206 | 0 | 0 | 0.0001952 | 0.0002121 | 0.0279955 | 0.0484897 | 1703 | 0.0010795 | 0.0001478 | 0.0001202 | 0.0001071 | 0.0555085 | 0.0662571 |
| 207 | 0 | 0 | 0.0002311 | 0.0002060 | 0.0889643 | 0.1251821 | 1704 | 0.0000959 | 0.0001010 | 0 | 0 | 0.0185704 | 0.0321649 |
| 208 | 0 | 0 | 0.0000934 | 0.0001617 | 0.1024051 | 0.1773708 | 1705 | 0.0017416 | 0.0001628 | 0.0006921 | 0.0005899 | 0.0684873 | 0.0711576 |
| 209 | 0 | 0 | 0.0002796 | 0.0002433 | 0.0624011 | 0.1080819 | 1706 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0079206 | 0.0137189 |
| 210 | 0.0001183 | 0.0002048 | 0.0003223 | 0.0002550 | 0.2411962 | 0.2419626 | 1707 | 0.0016830 | 0.0029151 | 0.0001967 | 0.0003291 | 0.0122062 | 0.0113083 |
| 211 | 0.0000904 | 0.0001566 | 0.0004762 | 0.0002281 | 0.9259241 | ND | 1708 | 0 | 0 | 0.0000912 | 0.0001299 | 0.0152926 | 0.0217236 |
| 212 | 0.0001219 | 0.0002111 | 0.0001937 | 0.0003356 | 0.2178775 | 0.2596663 | 1710 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0147887 | 0.0154947 |
| 213 | 0 | 0 | 0.0003266 | 0.0003126 | 0.2505550 | 0.2169901 | 1711 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0178860 | 0.0158903 |
| 214 | 0 | 0 | 0.0002160 | 0.0002317 | 0.0476767 | 0.0703246 | 1712 | 0.0000088 | 0.0000152 | 0.0000492 | 0.0000428 | 0.0129941 | 0.0121886 |
| 216 | 0 | 0 | 0.0001824 | 0.0003159 | 0.2306831 | 0.1516152 | 1713 | 0.0000022 | 0.0000038 | 0.0001185 | 0.0001027 | 0.0160293 | 0.0111027 |
| 217 | 0 | 0 | 0.0001684 | 0.0002917 | 0.0254489 | 0.0440788 | 1714 | 0 | 0 | 0.0001689 | 0.0001462 | 0.0095627 | 0.0040442 |
| 218 | 0 | 0 | 0.0001405 | 0.0002434 | 0.1385204 | 0.1113068 | 1715 | 0 | 0 | 0.0002438 | 0.0003330 | 0.0370091 | 0.0611141 |
| 219 | 0.0001603 | 0.0002776 | 0.0003878 | 0.0001724 | 0.1112562 | 0.1727830 | 1716 | 0 | 0 | 0.0000655 | 0.0001135 | 0.0178636 | 0.0158345 |
| 220 | 0 | 0 | 0.0002112 | 0.0002665 | 0.1090107 | 0.1607722 | 1717 | 0 | 0 | 0.0003726 | 0.0003254 | 0.0186544 | 0.0170116 |

【表２８－７】

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 221 | 0 | 0 | 0.0001841 | 0.0003189 | 0.0945364 | 0.1045403 | 1718 | 0 | 0 | 0.0000356 | 0.0000616 | 0.0075529 | 0.0130819 |
| 222 | 0 | 0 | 0.0002096 | 0.0003249 | 0.1037849 | 0.1044641 | 1719 | 0.0003748 | 0.0004300 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 223 | 0 | 0 | 0.0001836 | 0.0002731 | 0.1575390 | 0.2728656 | 1720 | 0 | 0 | 0.0000359 | 0.0000460 | 0.0267932 | 0.0464072 |
| 224 | 0 | 0 | 0.0001039 | 0.0001799 | 0.0937493 | 0.0847543 | 1721 | 0 | 0 | 0.0000777 | 0.0001345 | 0 | 0 |
| 225 | 0 | 0 | 0.0001257 | 0.0002177 | 0.0528530 | 0.0459885 | 1722 | 0 | 0 | 0.0001026 | 0.0001107 | 0.0283874 | 0.0255912 |
| 226 | 0 | 0 | 0.0002171 | 0.0003068 | 0.1520711 | 0.1941579 | 1723 | 0 | 0 | 0.0001290 | 0.0001895 | 0.0035056 | 0.0060719 |
| 227 | 0.0001168 | 0.0002023 | 0.0004347 | 0.0001091 | 0.0885370 | 0.1028400 | 1725 | 0 | 0 | 0.0000056 | 0.0000097 | 0.0140501 | 0.0154694 |
| 228 | 0.0001174 | 0.0002033 | 0.0004113 | 0.0001798 | 0.2434061 | 0.1912923 | 1726 | 0 | 0 | 0.0000236 | 0.0000409 | 0.0124075 | 0.0205463 |
| 229 | 0 | 0 | 0.0002248 | 0.0002806 | 0.1213316 | 0.0639225 | 1727 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 230 | 0 | 0 | 0.0002042 | 0.0003537 | 0.1616325 | 0.1664502 | 1728 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0154741 | 0.0240479 |
| 231 | 0.0000524 | 0.0000908 | 0.0001910 | 0.0002274 | 0.2030905 | 0.2794821 | 1729 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0068112 | 0.0117974 |
| 232 | 0 | 0 | 0.0001614 | 0.0002796 | 0.2628485 | 0.1188171 | 1730 | 0.0000225 | 0.0000389 | 0.0000257 | 0.0000229 | 0.0127153 | 0.0165742 |
| 233 | 0 | 0 | 0.0001335 | 0.0002313 | 0.1439482 | 0.2145109 | 1731 | 0 | 0 | 0.0001055 | 0.0001828 | 0.0134973 | 0.0119059 |
| 234 | 0.0035238 | 0.0056624 | 0 | 0 | 0.0057047 | 0.0051800 | 1732 | 0 | 0 | 0.0000322 | 0.0000558 | 0.0013163 | 0.0022799 |
| 235 | 0 | 0 | 0.0004097 | 0.0001409 | 0.0790734 | 0.0687344 | 1733 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0075383 | 0.0130567 |
| 236 | 0 | 0 | 0.0001901 | 0.0002941 | 0.1651978 | 0.1544132 | 1734 | 0 | 0 | 0.0000068 | 0.0000117 | 0.0084227 | 0.0095082 |
| 237 | 0 | 0 | 0.0002173 | 0.0001838 | 0 | 0 | 1735 | 0 | 0 | 0.0000484 | 0.0000838 | 0 | 0 |
| 238 | 0 | 0 | 0.0018711 | 0.0004076 | 0.3043567 | 0.0864281 | 1737 | 0 | 0 | 0.0000267 | 0.0000462 | 0.0188671 | 0.0176621 |
| 239 | 0 | 0 | 0.0002117 | 0.0003406 | 0.1072086 | 0.1834130 | 1738 | 0 | 0 | 0.0000259 | 0.0000448 | 0.0091395 | 0.0033803 |
| 241 | 0 | 0 | 0.0001527 | 0.0002645 | 0 | 0 | 1739 | 0 | 0 | 0.0000322 | 0.0000558 | 0.0065600 | 0.0070334 |
| 242 | 0 | 0 | 0.0001414 | 0.0002449 | 0.0778986 | 0.1078134 | 1740 | 0 | 0 | 0.0002473 | 0.0003063 | 0.0171570 | 0.0152061 |
| 243 | 0 | 0 | 0.0001566 | 0.0001438 | 0.1482527 | 0.1369307 | 1741 | 0.0000033 | 0.0000056 | 0.0002644 | 0.0002555 | 0.0192584 | 0.0290658 |
| 244 | 0.0001625 | 0.0002814 | 0.0004468 | 0.0001530 | 0.1266311 | 0.1287875 | 1742 | 0 | 0 | 0.0000180 | 0.0000312 | 0.0439135 | 0.0433778 |
| 245 | 0 | 0 | 0.0002515 | 0.0003740 | 0.1989956 | 0.2226582 | 1743 | 0 | 0 | 0.0000887 | 0.0001107 | 0 | 0 |
| 246 | 0 | 0 | 0.0003804 | 0.0002498 | 0.1770053 | 0.2935734 | 1744 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0119747 | 0.0207409 |
| 247 | 0 | 0 | 0.0002222 | 0.0003789 | 0.1800851 | 0.2582025 | 1745 | 0 | 0 | 0.0000034 | 0.0000058 | 0.0273053 | 0.0412685 |
| 248 | 0.0000098 | 0.0000170 | 0.0001553 | 0.0002691 | 0.0353126 | 0.0493908 | 1747 | 0 | 0 | 0.0000360 | 0.0000595 | 0.0063976 | 0.0057177 |
| 249 | 0.0000176 | 0.0000306 | 0.0001763 | 0.0003053 | 0 | 0 | 1748 | 0.0000375 | 0.0000650 | 0.0001178 | 0.0001317 | 0.0118692 | 0.0157493 |
| 250 | 0 | 0 | 0.0001161 | 0.0002010 | 0.1029454 | 0.1739991 | 1749 | 0 | 0 | 0.0000744 | 0.0001289 | 0.0074124 | 0.0128387 |
| 251 | 0.0033165 | 0.0049488 | 0.0001106 | 0.0001916 | 0 | 0 | 1750 | 0 | 0 | 0.0003657 | 0.0003167 | 0.0039927 | 0.0036256 |
| 252 | 0 | 0 | 0.0007996 | 0.0003882 | 0.0745070 | 0.1290500 | 1752 | 0 | 0 | 0.0001609 | 0.0001416 | 0.0126236 | 0.0151477 |
| 253 | 0 | 0 | 0.0003296 | 0.0003299 | 0.2686670 | 0.0804923 | 1753 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0021029 | 0.0022601 |
| 254 | 0 | 0 | 0.0002042 | 0.0003537 | 0.1899439 | 0.2124320 | 1754 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0131520 | 0.0227799 |
| 255 | 0 | 0 | 0.0002184 | 0.0003575 | 0.0034144 | 0.0059138 | 1755 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0097072 | 0.0168134 |
| 256 | 0 | 0 | 0.0002042 | 0.0003537 | 0.0838484 | 0.1452297 | 1756 | 0 | 0 | 0.0000661 | 0.0000615 | 0.0267302 | 0.0338692 |

【表２８－８】

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 257 | 0 | 0 | 0.0001039 | 0.0001799 | 0.0839686 | 0.1298450 | 1758 | 0.0000084 | 0.0000145 | 0.0002344 | 0.0002301 | 0.0103705 | 0.0179622 |
| 258 | 0 | 0 | 0.0001248 | 0.0002162 | 0.1888471 | 0.2735434 | 1759 | 0.0000527 | 0.0000576 | 0.0003688 | 0.0003233 | 0.0151013 | 0.0261562 |
| 259 | 0 | 0 | 0.0000681 | 0.0001179 | 0.2776387 | 0.2419839 | 1760 | 0 | 0 | 0.0001283 | 0.0002223 | 0.0188332 | 0.0326200 |
| 260 | 0.0000400 | 0.0000693 | 0.0003602 | 0.0001341 | 0 | 0 | 1761 | 0 | 0 | 0.0001661 | 0.0002026 | 0.0043237 | 0.0074889 |
| 261 | 0.0000517 | 0.0000895 | 0.0003867 | 0.0002324 | 0.1734046 | 0.2803180 | 1762 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0094781 | 0.0164166 |
| 262 | 0 | 0 | 0.0002803 | 0.0003715 | 0.0397171 | 0.0510967 | 1763 | 0 | 0 | 0.0000349 | 0.0000604 | 0.0208861 | 0.0120056 |
| 263 | 0 | 0 | 0.0002330 | 0.0004036 | 0.2285464 | 0.2633905 | 1764 | 0 | 0 | 0.0000675 | 0.0001028 | 0.0512953 | 0.0239016 |
| 264 | 0 | 0 | 0.0002210 | 0.0003777 | 0.2403762 | 0.3506751 | 1765 | 0.0000013 | 0.0000023 | 0.0137994 | 0.0239013 | 0.0001624 | 0.0002812 |
| 265 | 0 | 0 | 0.0001152 | 0.0001254 | 0.0524731 | 0.0908861 | 1766 | 0 | 0 | 0.0000544 | 0.0000943 | 0.0154655 | 0.0213978 |
| 266 | 0 | 0 | 0.0001169 | 0.0002025 | 0.2624837 | 0.2743648 | 1767 | 0 | 0 | 0.0001610 | 0.0001395 | 0.0074150 | 0.0128431 |
| 267 | 0 | 0 | 0.0001248 | 0.0002162 | 0.1632179 | 0.1438061 | 1768 | 0 | 0 | 0.0003769 | 0.0003267 | 0.0023826 | 0.0041267 |
| 268 | 0 | 0 | 0.0003386 | 0.0001235 | 0.1252031 | 0.1716708 | 1769 | 0 | 0 | 0.0000045 | 0.0000078 | 0.0070643 | 0.0095901 |
| 269 | 0 | 0 | 0.0002360 | 0.0002793 | 0.1913163 | 0.2022738 | 1770 | 0.0006057 | 0.0004484 | 0.0012029 | 0.0011053 | 0 | 0 |
| 270 | 0 | 0 | 0.0001744 | 0.0002500 | 0.1320488 | 0.1956990 | 1771 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0122468 | 0.0157363 |
| 271 | 0 | 0 | 0.0001466 | 0.0002539 | 0.0456216 | 0.0510024 | 1772 | 0.0024043 | 0.0003829 | 0.0105410 | 0.0009809 | 0.0003997 | 0.0006923 |
| 272 | 0 | 0 | 0.0001151 | 0.0001731 | 0.0751907 | 0.0676338 | 1773 | 0 | 0 | 0.0104014 | 0.0175647 | 0.0002776 | 0.0004808 |
| 273 | 0.0027525 | 0.0040149 | 0.0008314 | 0.0005339 | 0.0023992 | 0.0041555 | 1774 | 0 | 0 | 0.0001766 | 0.0001562 | 0.0025285 | 0.0043795 |
| 274 | 0 | 0 | 0.0002696 | 0.0002822 | 0.1639162 | 0.1523657 | 1775 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0188449 | 0.0326403 |
| 276 | 0 | 0 | 0.0001913 | 0.0002546 | 0.0596345 | 0.1032900 | 1776 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0092422 | 0.0160080 |
| 277 | 0.0023108 | 0.0032926 | 0.0002527 | 0.0004377 | 0.0009210 | 0.0015952 | 1777 | 0 | 0 | 0.0001069 | 0.0001312 | 0.0274981 | 0.0287748 |
| 278 | 0.0000975 | 0.0001689 | 0.0001417 | 0.0002424 | 0.2604306 | 0.2815006 | 1778 | 0 | 0 | 0.0000144 | 0.0000250 | 0.0063446 | 0.0109892 |
| 279 | 0 | 0 | 0.0002933 | 0.0002237 | 0.1404197 | 0.2432141 | 1779 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0079898 | 0.0138387 |
| 280 | 0.0015479 | 0.0026810 | 0 | 0 | 0.0008869 | 0.0015362 | 1780 | 0.0001648 | 0.0000506 | 0.0002581 | 0.0002276 | 0.0078000 | 0.0135101 |
| 281 | 0 | 0 | 0.0000986 | 0.0001708 | 0.2248532 | 0.1002155 | 1781 | 0.0000167 | 0.0000290 | 0.0021716 | 0.0036565 | 0.0105981 | 0.0183565 |
| 282 | 0 | 0 | 0.0001361 | 0.0002358 | 0.4552935 | 0.3968338 | 1782 | 0 | 0 | 0.0000911 | 0.0001578 | 0.0067511 | 0.0116933 |
| 283 | 0.0001646 | 0.0002851 | 0.0003215 | 0.0003518 | 0.0095278 | 0.0165027 | 1783 | 0 | 0 | 0.0000981 | 0.0001057 | 0.0137379 | 0.0218991 |
| 284 | 0.0009583 | 0.0004915 | 0.0015010 | 0.0002832 | 0.1139894 | 0.1085088 | 1784 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 285 | 0 | 0 | 0.0001266 | 0.0001461 | 0 | 0 | 1785 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 286 | 0.0000213 | 0.0000369 | 0.0002556 | 0.0001460 | 0.1816939 | 0.2169121 | 1786 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0012937 | 0.0022408 |
| 287 | 0.0000346 | 0.0000599 | 0.0001307 | 0.0001939 | 0.1178958 | 0.1185231 | 1787 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0319719 | 0.0553769 |
| 288 | 0 | 0 | 0.0001886 | 0.0001656 | 0.1268540 | 0.1148801 | 1788 | 0 | 0 | 0.0000360 | 0.0000624 | 0.0165138 | 0.0186481 |
| 289 | 0 | 0 | 0.0001300 | 0.0002252 | 0.2441179 | 0.2488018 | 1789 | 0.0000317 | 0.0000549 | 0.0000044 | 0.0000077 | 0.0063460 | 0.0109917 |
| 290 | 0 | 0 | 0.0002042 | 0.0001531 | 0.1036243 | 0.0482206 | 1790 | 0.0004186 | 0.0001008 | 0.0007771 | 0.0007305 | 0.0156994 | 0.0197029 |
| 291 | 0.0018605 | 0.0004508 | 0.0029326 | 0.0002167 | 0.0292909 | 0.0414620 | 1791 | 0 | 0 | 0.0000791 | 0.0000897 | 0.0081615 | 0.0141362 |
| 292 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0081855 | 0.0081005 | 1792 | 0.0000009 | 0.0000015 | 0.0000844 | 0.0001462 | 0.0089677 | 0.0155324 |

【表２８－９】

| | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 293 | 0.0000146 | 0.0000252 | 0.0000437 | 0.0000448 | 0.0097715 | 0.0138190 | 1793 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0094808 | 0.0164212 |
| 294 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0142945 | 0.0202155 | 1794 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0081237 | 0.0140706 |
| 295 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0095600 | 0.0135198 | 1795 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0210156 | 0.0364001 |
| 297 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.1297971 | 0.1835609 | 1796 | 0.0002540 | 0.0001240 | 0.0002508 | 0.0002291 | 0.0005432 | 0.0009408 | |
| 298 | 0 | 0 | 0.0000568 | 0.0000984 | 0.0274672 | 0.0388445 | 1797 | 0.0009434 | 0.0001380 | 0.0007316 | 0.0006356 | 0.0067990 | 0.0117761 | |
| 299 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0043545 | 0.0061582 | 1798 | 0 | 0 | 0.0001602 | 0.0002377 | 0.0054017 | 0.0093560 | |
| 300 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0202304 | 0.0286101 | 1799 | 0 | 0 | 0.0000244 | 0.0000423 | 0.0207254 | 0.0217099 | |
| 301 | 0 | 0 | 0.0006115 | 0.0000568 | 0 | 0 | 1801 | 0.0017777 | 0.0001484 | 0.0028304 | 0.0024512 | 0.0051982 | 0.0090036 | |
| 302 | 0 | 0 | 0.0000138 | 0.0000239 | 0.0110935 | 0.0156885 | 1802 | 0.0005602 | 0.0001312 | 0.0011721 | 0.0010526 | 0.0105815 | 0.0183278 | |
| 303 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1803 | 0 | 0 | 0.0000135 | 0.0000234 | 0.0212268 | 0.0367658 | |
| 304 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0944802 | 0.1336152 | 1804 | 0 | 0 | 0.0000301 | 0.0000300 | 0.0142541 | 0.0165957 | |
| 305 | 0.0001560 | 0.0002702 | 0.0003102 | 0.0000874 | 0 | 0 | 1806 | 0.0045964 | 0.0002945 | 0.0051493 | 0.0031891 | 0 | 0 | |
| 306 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1807 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0136169 | 0.0235851 | |
| 307 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.1780230 | 0.2517625 | 1808 | 0.0000718 | 0.0000639 | 0.0003240 | 0.0000446 | 0 | 0 | |
| 308 | 0.0001318 | 0.0002283 | 0 | 0 | 0.0957482 | 0.1354084 | 1809 | 0.0017569 | 0.0000684 | 0.0026801 | 0.0004138 | 0 | 0 | |
| 309 | 0.0000467 | 0.0000383 | 0.0000026 | 0.0000046 | 0 | 0 | 1810 | 0 | 0 | 0.0000018 | 0.0000032 | 0 | 0 | |
| 310 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1811 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| 311 | 0 | 0 | 0.0000276 | 0.0000479 | 0 | 0 | 1812 | 0.0000211 | 0.0000365 | 0.0000032 | 0.0000055 | 0 | 0 | |
| 312 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0315036 | 0.0445528 | 1813 | 0 | 0 | 0.0000498 | 0.0000448 | 0.0076994 | 0.0112195 | |
| 313 | 0.0000104 | 0.0000181 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1814 | 0 | 0 | 0.0000916 | 0.0001215 | 0.0019233 | 0.0033313 | |
| 314 | 0 | 0 | 0.0001007 | 0.0000865 | 0.0484529 | 0.0685228 | 1815 | 0 | 0 | 0.0000346 | 0.0000185 | 0 | 0 | |
| 315 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0010711 | 0.0015148 | 1816 | 0.0000003 | 0.0000006 | 0.0000958 | 0.0000533 | 0 | 0 | |
| 316 | 0.0000577 | 0.0000500 | 0.0010144 | 0.0002734 | 0 | 0 | 1817 | 0 | 0 | 0.0000114 | 0.0000197 | 0 | 0 | |
| 317 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0274907 | 0.0388778 | 1818 | 0 | 0 | 0.0000123 | 0.0000213 | 0.0175020 | 0.0155229 | |
| 318 | 0 | 0 | 0.0000399 | 0.0000691 | 0 | 0 | 1819 | 0 | 0 | 0.0000156 | 0.0000269 | 0 | 0 | |
| 319 | 0 | 0 | 0.0017707 | 0.0003739 | 0.0229566 | 0.0324656 | 1820 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| 320 | 0 | 0 | 0.0001892 | 0.0001633 | 0 | 0 | 1821 | 0.0083650 | 0.0004110 | 0.0132174 | 0.0014703 | 0.0302489 | 0.0523927 | |
| 321 | 0 | 0 | 0.0007360 | 0.0002644 | 0.0699828 | 0.0989707 | 1822 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0011690 | 0.0020248 | |
| 322 | 0.0023674 | 0.0002528 | 0.0252286 | 0.0005503 | 0 | 0 | 1823 | 0 | 0 | 0.0000643 | 0.0000291 | 0 | 0 | |
| 323 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1824 | 0 | 0 | 0.0000274 | 0.0000348 | 0.0121330 | 0.0210149 | |
| 324 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0558163 | 0.0789362 | 1825 | 0 | 0 | 0.0000133 | 0.0000230 | 0.0024672 | 0.0042733 | |
| 325 | 0.0000204 | 0.0000353 | 0.0000107 | 0.0000186 | 0.0677692 | 0.0958401 | 1826 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0084396 | 0.0146177 | |
| 326 | 0.0022911 | 0.0028562 | 0.0011234 | 0.0005254 | 0.0020915 | 0.0036225 | 1827 | 0.0000010 | 0.0000018 | 0.0000575 | 0.0000501 | 0.0128808 | 0.0223102 | |
| 327 | 0.0042601 | 0.0042526 | 0.0034321 | 0.0012976 | 0 | 0 | 1828 | 0 | 0 | 0.0000110 | 0.0000190 | 0 | 0 | |
| 328 | 0.0000015 | 0.0000026 | 0 | 0 | 0.0998208 | 0.0138982 | 1829 | 0 | 0 | 0.0001693 | 0.0000718 | 0.0134032 | 0.0232151 | |

【表２８－１０】

| | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 329 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0183890 | 0.0260060 | 1830 | 0 | 0 | 0.0000046 | 0.0000079 | 0.0107508 | 0.0186209 |
| 330 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0539333 | 0.0762732 | 1831 | 0.0000020 | 0.0000035 | 0.0000027 | 0.0000027 | 0.0086795 | 0.0039288 |
| 331 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1832 | 0 | 0 | 0.0001619 | 0.0000518 | 0.0047950 | 0.0051503 |
| 332 | 0.0000508 | 0.0000879 | 0 | 0 | 0.1510237 | 0.0002060 | 1833 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0083094 | 0.0080082 |
| 333 | 0.0000565 | 0.0000978 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1834 | 0 | 0 | 0.0000068 | 0.0000118 | 0.0147250 | 0.0128702 |
| 334 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0809992 | 0.1145501 | 1835 | 0.0009736 | 0.0004992 | 0.0360275 | 0.0068131 | 0.0102126 | 0.0176888 |
| 335 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1836 | 0.0000092 | 0.0000159 | 0.0000005 | 0.0000008 | 0.0015277 | 0.0026461 |
| 336 | 0 | 0 | 0.0000066 | 0.0000114 | 0 | 0 | 1837 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0005918 | 0.0010251 |
| 337 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1838 | 0 | 0 | 0.0000192 | 0.0000224 | 0.0148857 | 0.0257828 |
| 338 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1839 | 0.0000020 | 0.0000035 | 0.0000215 | 0.0000373 | 0 | 0 |
| 339 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1840 | 0 | 0 | 0.0000105 | 0.0000182 | 0.0091860 | 0.0159107 |
| 340 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1841 | 0 | 0 | 0.0000005 | 0.0000008 | 0.0080680 | 0.0139742 |
| 341 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.1293092 | 0.1828709 | 1842 | 0 | 0 | 0.0000146 | 0.0000133 | 0 | 0 |
| 342 | 0 | 0 | 0.0000092 | 0.0000160 | 0 | 0 | 1844 | 0 | 0 | 0.0000338 | 0.0000387 | 0.0042791 | 0.0074117 |
| 343 | 0 | 0 | 0.0000230 | 0.0000399 | 0.0119520 | 0.0169027 | 1845 | 0 | 0 | 0.0000178 | 0.0000309 | 0.0001023 | 0.0001772 |
| 344 | 0 | 0 | 0.0000077 | 0.0000133 | 0.0458083 | 0.0647828 | 1846 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0075919 | 0.0131496 |
| 345 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1847 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 346 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1848 | 0.0000105 | 0.0000182 | 0.0000384 | 0.0000666 | 0.0040739 | 0.0070563 |
| 347 | 0.0000111 | 0.0000192 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1849 | 0 | 0 | 0.0000128 | 0.0000222 | 0.0114668 | 0.0058062 |
| 348 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.1319993 | 0.1866752 | 1850 | 0 | 0 | 0.0000096 | 0.0000166 | 0 | 0 |
| 349 | 0.0000087 | 0.0000150 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1851 | 0 | 0 | 0.0000123 | 0.0000117 | 0 | 0 |
| 350 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.2108575 | 0.2981976 | 1852 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 351 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0259249 | 0.0366634 | 1853 | 0.0000139 | 0.0000241 | 0 | 0 | 0.0005582 | 0.0009669 |
| 352 | 0 | 0 | 0.0001074 | 0.0001861 | 0 | 0 | 1854 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 353 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1855 | 0.0000306 | 0.0000529 | 0.0000178 | 0.0000308 | 0.0148567 | 0.0135019 |
| 354 | 0.0000101 | 0.0000174 | 0.0000962 | 0.0001036 | 0.0911843 | 0.1289541 | 1856 | 0.0000346 | 0.0000600 | 0.0000421 | 0.0000592 | 0.0113143 | 0.0132170 |
| 355 | 0 | 0 | 0.0000200 | 0.0000346 | 0 | 0 | 1857 | 0 | 0 | 0.0000114 | 0.0000133 | 0 | 0 |
| 356 | 0.0000097 | 0.0000167 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1858 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0042652 | 0.0073875 |
| 357 | 0.0000258 | 0.0000447 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1859 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0299173 | 0.0168661 |
| 358 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1860 | 0.0000282 | 0.0000488 | 0.0000023 | 0.0000040 | 0.0024516 | 0.0042463 |
| 359 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1861 | 0.0000360 | 0.0000623 | 0 | 0 | 0.0172309 | 0.0298448 |
| 360 | 0 | 0 | 0.0000077 | 0.0000133 | 0 | 0 | 1862 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0017440 | 0.0030208 |
| 361 | 0.0000087 | 0.0000150 | 0.0006598 | 0.0001819 | 0 | 0 | 1863 | 0.0000469 | 0.0000812 | 0.0000059 | 0.0000103 | 0.0020384 | 0.0035307 |
| 362 | 0.0000879 | 0.0001523 | 0.0009182 | 0.0002469 | 0.1284541 | 0.0827066 | 1864 | 0.0000360 | 0.0000623 | 0.0000114 | 0.0000101 | 0.0162806 | 0.0281988 |
| 363 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0027693 | 0.0039164 | 1865 | 0 | 0 | 0.0000424 | 0.0000479 | 0.0010023 | 0.0017361 |

【表２８－１１】

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 364 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0536420 | 0.0758612 | 1866 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0051799 | 0.0089719 |
| 365 | 0.0000954 | 0.0000844 | 0.0026423 | 0.0003263 | 0 | 0 | 1867 | 0 | 0 | 0.0000077 | 0.0000134 | 0 | 0 | |
| 366 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0369029 | 0.0521885 | 1868 | 0.0002339 | 0.0000725 | 0.0005274 | 0.0001154 | 0 | 0 | |
| 367 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.1848965 | 0.2614832 | 1869 | 0 | 0 | 0.0000452 | 0.0000453 | 0 | 0 | |
| 368 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1870 | 0 | 0 | 0.0000036 | 0.0000063 | 0.0092814 | 0.0153974 | |
| 369 | 0 | 0 | 0.0000153 | 0.0000266 | 0 | 0 | 1871 | 0 | 0 | 0.0000494 | 0.0000856 | 0.0085164 | 0.0147508 | |
| 370 | 0 | 0 | 0.0008919 | 0.0004515 | 0.1026751 | 0.1452046 | 1872 | 0 | 0 | 0.0000407 | 0.0000398 | 0.0072465 | 0.0125513 | |
| 371 | 0.0000499 | 0.0000864 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1874 | 0 | 0 | 0.0000269 | 0.0000371 | 0.0049480 | 0.0085702 | |
| 372 | 0.0000400 | 0.0000692 | 0.0009810 | 0.0001949 | 0 | 0 | 1875 | 0.0002580 | 0.0003055 | 0.0000994 | 0.0001721 | 0.0020868 | 0.0019339 | |
| 373 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0242182 | 0.0148237 | 1876 | 0 | 0 | 0.0001737 | 0.0000539 | 0.0050869 | 0.0088108 | |
| 374 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1877 | 0.0001113 | 0.0001221 | 0.0008772 | 0.0001347 | 0 | 0 | |
| 375 | 0 | 0 | 0.0000169 | 0.0000292 | 0 | 0 | 1878 | 0.0001154 | 0.0000506 | 0.0011702 | 0.0001141 | 0 | 0 | |
| 376 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.1248432 | 0.1765550 | 1879 | 0.0000155 | 0.0000269 | 0.0000940 | 0.0000430 | 0.0057669 | 0.0099885 | |
| 377 | 0.0000201 | 0.0000348 | 0 | 0 | 0.0200501 | 0.0283551 | 1880 | 0.0000304 | 0.0000229 | 0.0000593 | 0.0000521 | 0.0071421 | 0.0123704 | |
| 378 | 0 | 0 | 0.0000553 | 0.0000957 | 0 | 0 | 1881 | 0.0000050 | 0.0000087 | 0.0000107 | 0.0000186 | 0.0001094 | 0.0001895 | |
| 379 | 0.0005807 | 0.0007015 | 0.0000092 | 0.0000160 | 0.1613972 | 0.2282501 | 1882 | 0 | 0 | 0.0000050 | 0.0000087 | 0.0248666 | 0.0234986 | |
| 381 | 0.0013667 | 0.0001470 | 0.0014716 | 0.0000999 | 0.0114746 | 0.0162275 | 1883 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0111844 | 0.0193719 | |
| 382 | 0.0002088 | 0.0003617 | 0 | 0 | 0.0002319 | 0.0003280 | 1884 | 0 | 0 | 0.0000251 | 0.0000422 | 0 | 0 | |
| 383 | 0.0001155 | 0.0002001 | 0.0000629 | 0.0001090 | 0 | 0 | 1885 | 0.0022979 | 0.0003269 | 0.0049182 | 0.0005270 | 0 | 0 | |
| 384 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1886 | 0 | 0 | 0.0000037 | 0.0000063 | 0.0016826 | 0.0029143 | |
| 385 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1887 | 0.0000295 | 0.0000306 | 0.0000694 | 0.0000128 | 0.0080531 | 0.0139484 | |
| 386 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.3210464 | 0.3088334 | 1888 | 0.0000587 | 0.0000323 | 0.0001130 | 0.0000537 | 0 | 0 | |
| 387 | 0 | 0 | 0.0006004 | 0.0002863 | 0 | 0 | 1889 | 0 | 0 | 0.0000315 | 0.0000103 | 0.0137533 | 0.0238213 | |
| 388 | 0.0011051 | 0.0001338 | 0.0010431 | 0.0002487 | 0.0591409 | 0.0836378 | 1890 | 0 | 0 | 0.0000676 | 0.0000507 | 0.0102193 | 0.0177003 | |
| 389 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0040722 | 0.0070533 | 1891 | 0 | 0 | 0.0000009 | 0.0000016 | 0.0000227 | 0.0000394 | |
| 390 | 0.0022027 | 0.0035927 | 0 | 0 | 0.0039956 | 0.0069206 | 1892 | 0 | 0 | 0.0000009 | 0.0000016 | 0 | 0 | |
| 391 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0089299 | 0.0154670 | 1893 | 0.0000322 | 0.0000558 | 0.0000258 | 0.0000447 | 0.0009566 | 0.0016569 | |
| 392 | 0 | 0 | 0.0001089 | 0.0001886 | 0.0003318 | 0.0005747 | 1894 | 0.0000073 | 0.0000126 | 0.0000265 | 0.0000300 | 0.0212104 | 0.0276191 | |
| 393 | 0.0008596 | 0.0003355 | 0.0080292 | 0.0019091 | 0.0614979 | 0.0975487 | 1895 | 0.0005634 | 0.0000145 | 0.0008358 | 0.0000757 | 0.0184332 | 0.0319273 | |
| 394 | 0.0029859 | 0.0041202 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1897 | 0.0021314 | 0.0001263 | 0.0021966 | 0.0001813 | 0.0016675 | 0.0028883 | |
| 395 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0140083 | 0.0242630 | 1898 | 0 | 0 | 0.0000406 | 0.0000188 | 0 | 0 | |
| 396 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0167457 | 0.0153954 | 1899 | 0 | 0 | 0.0000205 | 0.0000237 | 0.0016205 | 0.0028068 | |
| 397 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0284898 | 0.0474175 | 1900 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0075360 | 0.0123301 | |
| 398 | 0.0028360 | 0.0045240 | 0.0006378 | 0.0003034 | 0 | 0 | 1902 | 0.0000152 | 0.0000143 | 0.0000355 | 0.0000346 | 0.0050183 | 0.0086919 | |
| 399 | 0 | 0 | 0.0000568 | 0.0000718 | 0.0082304 | 0.0071426 | 1903 | 0.0000003 | 0.0000006 | 0.0000452 | 0.0000328 | 0.0067434 | 0.0116799 | |

【表２８－１２】

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 400 | 0.0000450 | 0.0000779 | 0.0002070 | 0.0002536 | 0 | 0 | 1904 | 0.0010793 | 0.0000564 | 0.0011245 | 0.0000969 | 0.0252836 | 0.0339733 | | | | | | | |
| 401 | 0 | 0 | 0.0000258 | 0.0000447 | 0.0070531 | 0.0122164 | 1905 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | | | |
| 402 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0371334 | 0.0643169 | 1906 | 0.0001117 | 0.0001107 | 0.0017138 | 0.0002746 | 0.0019296 | 0.0033421 | | | | | | | |
| 403 | 0.0002571 | 0.0002081 | 0.0027514 | 0.0012125 | 0.0174262 | 0.0164329 | 1907 | 0.0002741 | 0.0001943 | 0 | 0 | 0.0034466 | 0.0031875 | | | | | | | |
| 404 | 0 | 0 | 0.0002177 | 0.0003771 | 0.0025530 | 0.0044219 | 1909 | 0 | 0 | 0.0000010 | 0.0000016 | 0.0005361 | 0.0009285 | | | | | | | |
| 405 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0169812 | 0.0294123 | 1910 | 0.0001503 | 0.0001316 | 0.0003375 | 0.0004181 | 0 | 0 | | | | | | | |
| 406 | 0.0000285 | 0.0000494 | 0.0000458 | 0.0000794 | 0.0532935 | 0.0414884 | 1911 | 0.0004073 | 0.0003775 | 0.0001500 | 0.0002599 | 0 | 0 | | | | | | | |
| 407 | 0.0000291 | 0.0000504 | 0.0003463 | 0.0003503 | 0.0026261 | 0.0045485 | 1912 | 0 | 0 | 0.0001209 | 0.0001064 | 0 | 0 | | | | | | | |
| 408 | 0.0006237 | 0.0003539 | 0.0063730 | 0.0009548 | 0 | 0 | 1913 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0039704 | 0.0068769 | | | | | | | |
| 409 | 0 | 0 | 0.0000372 | 0.0000645 | 0.0052833 | 0.0091510 | 1914 | 0.0003964 | 0.0000292 | 0.0021142 | 0.0002783 | 0.0151591 | 0.0220914 | | | | | | | |
| 410 | 0 | 0 | 0.0001633 | 0.0002828 | 0.0191228 | 0.0285728 | 1915 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0277240 | 0.0067179 | | | | | | | |
| 411 | 0.0000128 | 0.0000222 | 0 | 0 | 0.0117165 | 0.0202936 | 1916 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0047909 | 0.0056743 | | | | | | | |
| 412 | 0.0001142 | 0.0001109 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1917 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0123623 | 0.0214122 | | | | | | | |
| 413 | 0 | 0 | 0.0001518 | 0.0002630 | 0.0090798 | 0.0157267 | 1918 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0003748 | 0.0006493 | | | | | | | |
| 414 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0067766 | 0.0117374 | 1919 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0126659 | 0.0219380 | | | | | | | |
| 415 | 0.0000047 | 0.0000081 | 0 | 0 | 0.0001946 | 0.0003370 | 1920 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0003537 | 0.0006127 | | | | | | | |
| 416 | 0 | 0 | 0.0000641 | 0.0000645 | 0 | 0 | 1921 | 0 | 0 | 0.0000153 | 0.0000264 | 0 | 0 | | | | | | | |
| 417 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0062524 | 0.0108295 | 1922 | 0 | 0 | 0.0000513 | 0.0000889 | 0 | 0 | | | | | | | |
| 418 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1923 | 0 | 0 | 0.0000114 | 0.0000198 | 0.0113313 | 0.0196265 | | | | | | | |
| 419 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0245045 | 0.0424431 | 1924 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0009456 | 0.0016379 | | | | | | | |
| 420 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0011285 | 0.0019547 | 1925 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | | | |
| 422 | 0.0000402 | 0.0000475 | 0 | 0 | 0.0030752 | 0.0048773 | 1926 | 0 | 0 | 0.0000067 | 0.0000116 | 0.0078075 | 0.0112603 | | | | | | | |
| 423 | 0 | 0 | 0.0000948 | 0.0001641 | 0.0239613 | 0.0214125 | 1927 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0073881 | 0.0120105 | | | | | | | |
| 424 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1928 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0084953 | 0.0147143 | | | | | | | |
| 425 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0053725 | 0.0093055 | 1929 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0218048 | 0.0147009 | | | | | | | |
| 426 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0068393 | 0.0118460 | 1930 | 0 | 0 | 0.0000657 | 0.0000590 | 0 | 0 | | | | | | | |
| 427 | 0 | 0 | 0.0001232 | 0.0002134 | 0.0001871 | 0.0003241 | 1931 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0054930 | 0.0084786 | | | | | | | |
| 428 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1932 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | | | |
| 429 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1933 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | | | |
| 430 | 0 | 0 | 0.0001098 | 0.0001902 | 0.0030937 | 0.0053585 | 1934 | 0.0001190 | 0.0001150 | 0.0002452 | 0.0003100 | 0.0088779 | 0.0125807 | | | | | | | |
| 431 | 0 | 0 | 0.0001175 | 0.0002034 | 0.0118859 | 0.0142173 | 1935 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0141015 | 0.0244245 | | | | | | | |
| 432 | 0.0019526 | 0.0033820 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1936 | 0 | 0 | 0.0000448 | 0.0000776 | 0.0118234 | 0.0102434 | | | | | | | |
| 433 | 0.0002604 | 0.0001779 | 0.0013245 | 0.0004278 | 0.0002759 | 0.0004779 | 1937 | 0.0000064 | 0.0000110 | 0 | 0 | 0.0024313 | 0.0024025 | | | | | | | |
| 434 | 0 | 0 | 0.0001375 | 0.0002382 | 0.0096024 | 0.0166318 | 1938 | 0.0000754 | 0.0001306 | 0 | 0 | 0.0005738 | 0.0009938 | | | | | | | |
| 435 | 0.0000488 | 0.0000501 | 0.0002664 | 0.0004615 | 0.0028452 | 0.0030135 | 1939 | 0 | 0 | 0.0000038 | 0.0000066 | 0.0127554 | 0.0178290 | | | | | | | |

【表２８－１３】

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 436 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1940 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0175073 | 0.0291343 |
| 437 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1941 | 0.0002190 | 0.0001364 | 0.0000317 | 0.0000548 | 0.0010889 | 0.0018860 | |
| 438 | 0 | 0 | 0.0002326 | 0.0003591 | 0 | 0 | 0 | 1942 | 0.0000827 | 0.0001432 | 0.0000643 | 0.0001114 | 0.0051542 | 0.0008972 | |
| 439 | 0.0004142 | 0.0001317 | 0.0004875 | 0.0002289 | 0.0041754 | 0.0064649 | 0 | 1943 | 0 | 0 | 0.0000315 | 0.0000545 | 0.0107602 | 0.0186372 | |
| 440 | 0.0004794 | 0.0003959 | 0.0021674 | 0.0012392 | 0 | 0 | 0 | 1944 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0184315 | 0.0268293 | |
| 441 | 0.0000111 | 0.0000192 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1945 | 0 | 0 | 0.0001789 | 0.0000622 | 0.0020212 | 0.0035008 | |
| 442 | 0.0000919 | 0.0001592 | 0.0014010 | 0.0011475 | 0 | 0 | 0 | 1946 | 0.0004391 | 0.0005527 | 0 | 0 | 0.0016392 | 0.0015230 | |
| 443 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0093467 | 0.0073972 | 0 | 1947 | 0.0004006 | 0.0001555 | 0.0002307 | 0.0002362 | 0.0005364 | 0.0009291 | |
| 444 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1948 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| 445 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0177145 | 0.0230742 | 0 | 1949 | 0.0004954 | 0.0001098 | 0.0239673 | 0.0022134 | 0 | 0 | |
| 446 | 0.0013179 | 0.0002259 | 0.0000430 | 0.0000744 | 0.0035495 | 0.0061479 | 0 | 1950 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0005017 | 0.0008690 | |
| 447 | 0 | 0 | 0.0000296 | 0.0000512 | 0 | 0 | 0 | 1951 | 0 | 0 | 0.0000247 | 0.0000428 | 0 | 0 | |
| 448 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1952 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| 449 | 0 | 0 | 0.0000143 | 0.0000248 | 0 | 0 | 0 | 1954 | 0 | 0 | 0.0000134 | 0.0000231 | 0.0016683 | 0.0028896 | |
| 450 | 0 | 0 | 0.0000602 | 0.0001042 | 0 | 0 | 0 | 1955 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0228263 | 0.0395363 | |
| 451 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0075457 | 0.0130695 | 0 | 1956 | 0 | 0 | 0.0002428 | 0.0002139 | 0.0014964 | 0.0025918 | |
| 452 | 0.0007210 | 0.0006495 | 0.0005844 | 0.0010122 | 0 | 0 | 0 | 1957 | 0.0010197 | 0.0009460 | 0.0007188 | 0.0001341 | 0 | 0 | |
| 453 | 0.0028202 | 0.0006981 | 0.0006720 | 0.0005823 | 0.0178773 | 0.0309643 | 0 | 1958 | 0.0002568 | 0.0004447 | 0 | 0 | 0.0012506 | 0.0021660 | |
| 454 | 0 | 0 | 0.0001436 | 0.0002487 | 0 | 0 | 0 | 1959 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0170408 | 0.0260386 | |
| 455 | 0.0060793 | 0.0013687 | 0.0127466 | 0.0050718 | 0.0023831 | 0.0041276 | 0 | 1960 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0069377 | 0.0120165 | |
| 456 | 0.0025241 | 0.0013519 | 0.0020921 | 0.0016110 | 0.0176881 | 0.0306367 | 0 | 1961 | 0.0004598 | 0.0003520 | 0.0000307 | 0.0000532 | 0.0021004 | 0.0036379 | |
| 457 | 0 | 0 | 0.0000328 | 0.0000568 | 0 | 0 | 0 | 1962 | 0 | 0 | 0.0000238 | 0.0000412 | 0.0003160 | 0.0005473 | |
| 458 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0068230 | 0.0118179 | 0 | 1963 | 0.0000765 | 0.0000912 | 0.0000731 | 0.0001266 | 0.0008304 | 0.0007859 | |
| 459 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1964 | 0.0000900 | 0.0001119 | 0.0007399 | 0.0006510 | 0 | 0 | |
| 460 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1965 | 0 | 0 | 0.0003923 | 0.0003447 | 0.0185523 | 0.0116015 | |
| 461 | 0 | 0 | 0.0000143 | 0.0000248 | 0 | 0 | 0 | 1966 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0083072 | 0.0143885 | |
| 462 | 0 | 0 | 0.0001816 | 0.0003145 | 0.0064170 | 0.0111145 | 0 | 1967 | 0 | 0 | 0.0000124 | 0.0000129 | 0 | 0 | |
| 463 | 0 | 0 | 0.0001677 | 0.0002904 | 0.0011828 | 0.0020486 | 0 | 1969 | 0.0002384 | 0.0001230 | 0.0006388 | 0.0005545 | 0.0082832 | 0.0143469 | |
| 464 | 0 | 0 | 0.0002078 | 0.0001866 | 0.0142368 | 0.0066098 | 0 | 1970 | 0.0000663 | 0.0000611 | 0.0020880 | 0.0030883 | 0 | 0 | |
| 465 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0052292 | 0.0090573 | 0 | 1971 | 0.0011896 | 0.0001929 | 0.0035645 | 0.0008630 | 0.0057613 | 0.0099789 | |
| 466 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0280453 | 0.0246908 | 0 | 1972 | 0 | 0 | 0.0002084 | 0.0001990 | 0.0262043 | 0.0314184 | |
| 467 | 0.0008463 | 0.0004359 | 0.0000831 | 0.0001439 | 0 | 0 | 0 | 1973 | 0 | 0 | 0.0001438 | 0.0001275 | 0.0079431 | 0.0137579 | |
| 468 | 0.0024443 | 0.0027341 | 0.0008780 | 0.0009669 | 0 | 0 | 0 | 1974 | 0 | 0 | 0.0001428 | 0.0001237 | 0.0220420 | 0.0169078 | |
| 469 | 0.0000448 | 0.0000777 | 0 | 0 | 0.0086170 | 0.0149252 | 0 | 1975 | 0 | 0 | 0.0001105 | 0.0001268 | 0.0044758 | 0.0067951 | |
| 470 | 0.0000115 | 0.0000199 | 0.0000799 | 0.0000979 | 0.0157570 | 0.0272918 | 0 | 1976 | 0.0004931 | 0.0001581 | 0.0019200 | 0.0006573 | 0.0259703 | 0.0339102 | |

【表２８－１４】

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 471 | 0.0000982 | 0.0000341 | 0.0017704 | 0.0003230 | 0.0041258 | 0.0071462 | 1977 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 473 | 0.0008051 | 0.0000803 | 0.0016706 | 0.0004760 | 0 | 0 | 1978 | 0.0000112 | 0.0000193 | 0.0041953 | 0.0072665 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 474 | 0.0006335 | 0.0004250 | 0.0003782 | 0.0006550 | 0.0101572 | 0.0175928 | 1979 | 0 | 0 | 0.0000352 | 0.0000609 | 0.0408739 | 0.0501130 | | | | | |
| 475 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0044220 | 0.0076592 | 1980 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0011917 | 0.0020641 | | | | | |
| 476 | 0.0001338 | 0.0001223 | 0 | 0 | 0.0007470 | 0.0012938 | 1981 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0096925 | 0.0167878 | | | | | |
| 477 | 0.0011092 | 0.0001524 | 0.0003750 | 0.0005845 | 0.0203991 | 0.0279806 | 1982 | 0.0442426 | 0.0100134 | 0.0831665 | 0.0159561 | 0.1307232 | 0.0080173 | | | | | |
| 478 | 0.0009810 | 0.0001108 | 0.0023819 | 0.0009795 | 0.0010946 | 0.0009823 | 1983 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0078427 | 0.0135840 | | | | | |
| 479 | 0.0003131 | 0.0001678 | 0.0009852 | 0.0001189 | 0.0024695 | 0.0042773 | 1984 | 0 | 0 | 0.0001859 | 0.0002286 | 0 | 0 | | | | | |
| 480 | 0.0001096 | 0.0000953 | 0.0005497 | 0.0004981 | 0 | 0 | 1985 | 0.0000530 | 0.0000047 | 0.0007428 | 0.0004534 | 0.0168361 | 0.0291610 | | | | | |
| 481 | 0 | 0 | 0.0001426 | 0.0001672 | 0.0361284 | 0.0625763 | 1986 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0027372 | 0.0026339 | | | | | |
| 482 | 0 | 0 | 0.0000875 | 0.0001515 | 0.0355187 | 0.0581144 | 1987 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0038043 | 0.0065892 | | | | | |
| 483 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0027122 | 0.0046976 | 1988 | 0 | 0 | 0.0001151 | 0.0001216 | 0.0013096 | 0.0022682 | | | | | |
| 484 | 0.0009362 | 0.0001973 | 0.0004820 | 0.0006298 | 0.0011667 | 0.0020208 | 1990 | 0.0002144 | 0.0001677 | 0.0005097 | 0.0004414 | 0 | 0 | | | | | |
| 485 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0107619 | 0.0186402 | 1991 | 0.0001612 | 0.0001477 | 0.0000608 | 0.0001052 | 0.0004618 | 0.0007999 | | | | | |
| 486 | 0.0001584 | 0.0001714 | 0.0047770 | 0.0071923 | 0 | 0 | 1992 | 0.0001179 | 0.0002041 | 0.0001520 | 0.0002632 | 0 | 0 | | | | | |
| 487 | 0 | 0 | 0.0011701 | 0.0017163 | 0.0577037 | 0.0816053 | 1993 | 0.0003737 | 0.0000364 | 0.0003810 | 0.0003404 | 0.0153320 | 0.0265558 | | | | | |
| 488 | 0.0008551 | 0.0005615 | 0.0071277 | 0.0064041 | 0.0194711 | 0.0275363 | 1994 | 0.0012234 | 0.0001061 | 0.0162634 | 0.0256335 | 0 | 0 | | | | | |
| 489 | 0 | 0 | 0.0017111 | 0.0010507 | 0.0553528 | 0.0656917 | 1995 | 0.0001248 | 0.0002162 | 0.0001318 | 0.0001511 | 0.0012595 | 0.0021815 | | | | | |
| 490 | 0 | 0 | 0.0015341 | 0.0026571 | 0.0813540 | 0.1150519 | 1996 | 0.0002096 | 0.0000581 | 0.0006092 | 0.0001619 | 0 | 0 | | | | | |
| 491 | 0 | 0 | 0.0022019 | 0.0038138 | 0 | 0 | 1998 | 0.0036606 | 0.0001738 | 0.0059853 | 0.0001614 | 0.0200462 | 0.0347210 | | | | | |
| 492 | 0 | 0 | 0.0024726 | 0.0042827 | 0.3544001 | 0.4708680 | 1999 | 0.0001640 | 0.0000210 | 0.0005837 | 0.0005055 | 0.0087106 | 0.0150873 | | | | | |
| 493 | 0 | 0 | 0.0026138 | 0.0044421 | 0.0337543 | 0.0477358 | 2000 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0021484 | 0.0037211 | | | | | |
| 494 | 0.0011744 | 0.0002771 | 0.0042498 | 0.0065519 | 0.2220542 | 0.0768709 | 2001 | 0.0008152 | 0.0001555 | 0.0068939 | 0.0072719 | 0 | 0 | | | | | |
| 495 | 0 | 0 | 0.0015161 | 0.0026259 | 0 | 0 | 2002 | 0.0012724 | 0.0009324 | 0.0045422 | 0.0010058 | 0.0122816 | 0.0068439 | | | | | |
| 496 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2003 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0060517 | 0.0104819 | | | | | |
| 497 | 0.0030250 | 0.0036693 | 0.0013428 | 0.0007280 | 0 | 0 | 2004 | 0.0009046 | 0.0001134 | 0.0042284 | 0.0040644 | 0.0085020 | 0.0120236 | | | | | |
| 499 | 0.0059714 | 0.0006314 | 0.0062704 | 0.0022048 | 0.0439156 | 0.0621061 | 2005 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0043831 | 0.0039849 | | | | | |
| 500 | 0.0000076 | 0.0000107 | 0.0015341 | 0.0026571 | 0.0256014 | 0.0362058 | 2006 | 0 | 0 | 0.0001371 | 0.0002375 | 0.1922461 | 0.1362097 | | | | | |
| 501 | 0 | 0 | 0.0021070 | 0.0032931 | 0.2397874 | 0.3391106 | 2007 | 0 | 0 | 0.0002588 | 0.0004483 | 0 | 0 | | | | | |
| 502 | 0 | 0 | 0.0041832 | 0.0065127 | 0.0349729 | 0.0077338 | 2008 | 0.0004336 | 0.0003923 | 0.0004835 | 0.0001491 | 0.0016545 | 0.0019491 | | | | | |
| 503 | 0.0001550 | 0.0001976 | 0.0047002 | 0.0017924 | 0 | 0 | 2009 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | |
| 504 | 0.0004959 | 0.0001751 | 0.0013717 | 0.0023758 | 0 | 0 | 2010 | 0 | 0 | 0.0006833 | 0.0011835 | 0 | 0 | | | | | |
| 505 | 0.0008008 | 0.0011325 | 0.0108682 | 0.0010517 | 0.1105144 | 0.1562910 | 2011 | 0 | 0 | 0.0016787 | 0.0016054 | 0.0911541 | 0.1289114 | | | | | |
| 506 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0121560 | 0.0171912 | 2012 | 0 | 0 | 0.0014183 | 0.0024566 | 0.0066758 | 0.0094410 | | | | | |
| 507 | 0.0000126 | 0.0000179 | 0.0204962 | 0.0073157 | 0.1145952 | 0.1620621 | 2013 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.1048419 | 0.1482688 | | | | | |

【表２８－１５】

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 508 | 0 | 0 | 0.0011912 | 0.0020632 | 0.0820306 | 0.0931532 | 2014 | 0.0000534 | 0.0000924 | 0.0000207 | 0.0000359 | 0.0099386 | 0.0140553 |
| 509 | 0.0028841 | 0.0045362 | 0.0088002 | 0.0008325 | 0.0029381 | 0.0044990 | 2015 | 0.0000980 | 0.0001697 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 510 | 0 | 0 | 0.0011912 | 0.0020632 | 0 | 0 | 2016 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0898737 | 0.1271007 |
| 511 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2017 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0604597 | 0.0855029 |
| 512 | 0 | 0 | 0.0013356 | 0.0023133 | 0 | 0 | 2018 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.1284475 | 0.1816522 |
| 513 | 0.0021493 | 0.0021047 | 0.0012044 | 0.0010650 | 0 | 0 | 2019 | 0.0003515 | 0.0004189 | 0.0020167 | 0.0020671 | 0.2491949 | 0.3524148 |
| 514 | 0.0134345 | 0.0075081 | 0.1441073 | 0.0283935 | 0.2012040 | 0.2845454 | 2020 | 0 | 0 | 0.0013976 | 0.0024207 | 0.0671879 | 0.0450215 |
| 515 | 0 | 0 | 0.0013491 | 0.0015357 | 0 | 0 | 2021 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.1189628 | 0.1682388 |
| 516 | 0.0001448 | 0.0002048 | 0.0000722 | 0.0001250 | 0 | 0 | 2022 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0712751 | 0.0680535 |
| 517 | 0.0009345 | 0.0001736 | 0.0171363 | 0.0066906 | 0.0455101 | 0.0643610 | 2023 | 0.0000096 | 0.0000167 | 0 | 0 | 0.0342628 | 0.0484550 |
| 518 | 0 | 0 | 0.0010468 | 0.0018131 | 0.3281560 | 0.4094182 | 2024 | 0 | 0 | 0.0000104 | 0.0000179 | 0.0267469 | 0.0378259 |
| 519 | 0.0019670 | 0.0004477 | 0.0048552 | 0.0033015 | 0 | 0 | 2026 | 0.0003522 | 0.0001109 | 0.0007312 | 0.0012665 | 0.1002219 | 0.0862131 |
| 520 | 0.0183402 | 0.0042332 | 0.0247996 | 0.0151599 | 0.2240576 | 0.3168653 | 2027 | 0 | 0 | 0.0002485 | 0.0004303 | 0 | 0 |
| 521 | 0 | 0 | 0.0009224 | 0.0010451 | 0.4049867 | 0.3588577 | 2028 | 0 | 0 | 0.0011181 | 0.0019366 | 0 | 0 |
| 522 | 0 | 0 | 0.0002707 | 0.0004689 | 0 | 0 | 2029 | 0 | 0 | 0.0002588 | 0.0004483 | 0.0979835 | 0.1385695 |
| 523 | 0 | 0 | 0.0000180 | 0.0000313 | 0 | 0 | 2030 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.1092567 | 0.1545123 |
| 524 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0195272 | 0.0276157 | 2031 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0966145 | 0.1366336 |
| 525 | 0 | 0 | 0.0018951 | 0.0032824 | 0.1522168 | 0.2152670 | 2032 | 0 | 0 | 0.0000932 | 0.0001614 | 0.1423584 | 0.2013252 |
| 526 | 0.0173253 | 0.0078852 | 0.0161182 | 0.0032487 | 0.3149922 | 0.4419840 | 2033 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0306717 | 0.0433764 |
| 527 | 0 | 0 | 0.0014980 | 0.0025946 | 0.2749817 | 0.3888829 | 2034 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0761281 | 0.0617506 |
| 528 | 0 | 0 | 0.0006497 | 0.0011254 | 0.2090782 | 0.0727220 | 2035 | 0 | 0 | 0.0004337 | 0.0004071 | 0 | 0 |
| 529 | 0 | 0 | 0.0099382 | 0.0017643 | 0.1321446 | 0.1868806 | 2036 | 0 | 0 | 0.0015736 | 0.0027255 | 0.0258107 | 0.0365019 |
| 530 | 0.0154973 | 0.0079196 | 0.0154592 | 0.0025101 | 0 | 0 | 2037 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0526642 | 0.0744784 |
| 531 | 0.0007502 | 0.0010610 | 0.0010222 | 0.0009372 | 0 | 0 | 2038 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0381529 | 0.0247143 |
| 532 | 0.0042802 | 0.0033971 | 0.0017336 | 0.0017340 | 0.1176025 | 0.1663151 | 2039 | 0.0000564 | 0.0000977 | 0 | 0 | 0.0834173 | 0.1179699 |
| 533 | 0.0001768 | 0.0002501 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2040 | 0.0004153 | 0.0003074 | 0.0002022 | 0.0002194 | 0.0013795 | 0.0012516 |
| 534 | 0 | 0 | 0.0011699 | 0.0019416 | 0 | 0 | 2041 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.2634754 | 0.0539818 |
| 535 | 0.6621585 | 0.2068253 | 0.6752830 | 0.0567695 | 0.5970549 | 0.0249870 | 2042 | 0 | 0 | 0.0001139 | 0.0001972 | 0.0635657 | 0.0898955 |
| 536 | 0.7356028 | 0.3277019 | 1.1265240 | 0.0845791 | 0.0761190 | 0.0021644 | 2043 | 0 | 0 | 0.0006833 | 0.0011835 | 0.1122891 | 0.1320289 |
| 537 | 0 | 0 | 0.0000215 | 0.0000372 | 0.1588903 | 0.2247049 | 2044 | 0 | 0 | 0.0014287 | 0.0024745 | 0.1665846 | 0.0710030 |
| 538 | 0.0035886 | 0.0050468 | 0.0019018 | 0.0008668 | 0 | 0 | 2045 | 0 | 0 | 0.0003185 | 0.0005049 | 0 | 0 |
| 539 | 0 | 0 | 0.0003790 | 0.0006565 | 0 | 0 | 2046 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0518732 | 0.0564630 |
| 540 | 0 | 0 | 0.0005089 | 0.0008815 | 0 | 0 | 2047 | 0.0000990 | 0.0001114 | 0 | 0 | 0.0310319 | 0.0042641 |
| 541 | 0.0100268 | 0.0035773 | 0.0301097 | 0.0021593 | 0.1849819 | 0.0154651 | 2048 | 0.0006590 | 0.0001217 | 0.0019114 | 0.0017871 | 0.1545240 | 0.0526515 |
| 542 | 0 | 0 | 0.0003335 | 0.0003030 | 0 | 0 | 2049 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0235208 | 0.0332635 |

【表２８－１６】

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 543 | 0 | 0 | 0.0025526 | 0.0017751 | 0 | 0 | 2050 | 0.0003551 | 0.0000901 | 0.0017881 | 0.0019166 | 0 | 0 | | |
| 544 | 0.0185741 | 0.0051595 | 0.0413098 | 0.0095212 | 0 | 0 | 2051 | 0 | 0 | 0.0002742 | 0.0004749 | 0 | 0 | | |
| 545 | 0.0009737 | 0.0000624 | 0.0112934 | 0.0037279 | 0.0307543 | 0.0434932 | 2052 | 0 | 0 | 0.0006522 | 0.0011297 | 0 | 0 | | |
| 546 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.4325578 | 0.2946660 | 2053 | 0.0001442 | 0.0002497 | 0.0000536 | 0.0000928 | 0.0025167 | 0.0043591 | | |
| 547 | 0 | 0 | 0.0001505 | 0.0002607 | 0.1526386 | 0.2158636 | 2054 | 0.0004280 | 0.0004284 | 0.0004071 | 0.0002616 | 0.0008606 | 0.0014907 | | |
| 548 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0895339 | 0.1266201 | 2055 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0025240 | 0.0035694 | | |
| 549 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2056 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0855433 | 0.1209765 | | |
| 550 | 0 | 0 | 0.0007056 | 0.0006569 | 0.0496101 | 0.0701593 | 2057 | 0 | 0 | 0.0002278 | 0.0003945 | 0 | 0 | | |
| 551 | 0 | 0 | 0.0000361 | 0.0000625 | 0.1232288 | 0.1701687 | 2058 | 0.0000413 | 0.0000716 | 0 | 0 | 0 | 0 | | |
| 553 | 0.0000930 | 0.0001316 | 0.0029785 | 0.0024899 | 0.0061697 | 0.0087253 | 2059 | 0 | 0 | 0.0001968 | 0.0002414 | 0 | 0 | | |
| 554 | 0.0118316 | 0.0009724 | 0.0707090 | 0.0090478 | 0 | 0 | 2060 | 0 | 0 | 0.0011906 | 0.0020621 | 0 | 0 | | |
| 555 | 0.0024143 | 0.0037752 | 0.0007919 | 0.0006264 | 0 | 0 | 2061 | 0 | 0 | 0.0000093 | 0.0000160 | 0 | 0 | | |
| 556 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0778577 | 0.1101074 | 2062 | 0 | 0 | 0.0005383 | 0.0009324 | 0.0858825 | 0.0199812 | | |
| 557 | 0.0047496 | 0.0010828 | 0.0164986 | 0.0025296 | 0.0229640 | 0.0324760 | 2063 | 0 | 0 | 0.0001866 | 0.0003232 | 0.0011683 | 0.0016953 | | |
| 558 | 0.0087937 | 0.0049353 | 0.0673630 | 0.0126938 | 0.0204685 | 0.0289468 | 2064 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.1221224 | 0.1727071 | | |
| 559 | 0.2326154 | 0.1193410 | 0.9689222 | 0.0786511 | 1.1885137 | ND | 2065 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0866102 | 0.1224854 | | |
| 560 | 0.0107380 | 0.0014844 | 0.1212741 | 0.0102078 | 0 | 0 | 2066 | 0 | 0 | 0.0002381 | 0.0004124 | 0 | 0 | | |
| 561 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0872141 | 0.1233393 | 2067 | 0 | 0 | 0.0002692 | 0.0004662 | 0.0943316 | 0.1334051 | | |
| 562 | 0.0088337 | 0.0004751 | 0.0437183 | 0.0139538 | 0.0913277 | 0.1291569 | 2068 | 0 | 0 | 0.0007764 | 0.0013448 | 0.0568502 | 0.0166281 | | |
| 563 | 0.0145291 | 0.0008656 | 0.2372340 | 0.0807174 | 0.0324977 | 0.0459587 | 2069 | 0 | 0 | 0.0003416 | 0.0005917 | 0.0448845 | 0.0634763 | | |
| 564 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0271862 | 0.0384471 | 2070 | 0 | 0 | 0.0000207 | 0.0000359 | 0.0403760 | 0.0571003 | | |
| 565 | 0.0022078 | 0.0031223 | 0.0002707 | 0.0004689 | 0.0499019 | 0.0303406 | 2071 | 0.0000436 | 0.0000756 | 0 | 0 | 0.1525765 | 0.2157757 | | |
| 566 | 0.0040990 | 0.0039217 | 0.0085094 | 0.0004472 | 0.0039786 | 0.0050082 | 2072 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | |
| 567 | 0.0397148 | 0.0043366 | 0.2303590 | 0.0636931 | 0.1173639 | 0.1659776 | 2073 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0185166 | 0.0261864 | | |
| 568 | 0.0000286 | 0.0000405 | 0.0001762 | 0.0002253 | 0 | 0 | 2074 | 0 | 0 | 0.0001035 | 0.0001793 | 0 | 0 | | |
| 569 | 0 | 0 | 0.0000361 | 0.0000625 | 0.3679245 | 0.5203239 | 2075 | 0 | 0 | 0.0004689 | 0.0006748 | 0.0363986 | 0.0514754 | | |
| 570 | 0 | 0 | 0.0006317 | 0.0010941 | 0.1107303 | 0.0394040 | 2076 | 0 | 0 | 0.0007868 | 0.0013628 | 0 | 0 | | |
| 571 | 0 | 0 | 0.0000717 | 0.0001242 | 0.0382681 | 0.0541192 | 2077 | 0 | 0 | 0.0002899 | 0.0005021 | 0 | 0 | | |
| 572 | 0.0002808 | 0.0000827 | 0.0128160 | 0.0046128 | 0.0997423 | 0.1410569 | 2078 | 0 | 0 | 0.0002174 | 0.0003766 | 0.0750311 | 0.1061100 | | |
| 573 | 0.0056618 | 0.0080070 | 0.0001577 | 0.0002731 | 0.0609264 | 0.0861630 | 2079 | 0.0007799 | 0.0001193 | 0 | 0 | 0.0266513 | 0.0376906 | | |
| 574 | 0.1602101 | 0.0424718 | 0.6254741 | 0.0731480 | 0.3282258 | 0.0846053 | 2080 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0246273 | 0.0348282 | | |
| 575 | 0.0030194 | 0.0033011 | 0.0010655 | 0.0009872 | 0 | 0 | 2081 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0401367 | 0.0567619 | | |
| 576 | 0.0024359 | 0.0001109 | 0.0038509 | 0.0003668 | 0.1681999 | 0.0083336 | 2082 | 0 | 0 | 0.0002285 | 0.0003958 | 0.0927083 | 0.0735886 | | |
| 577 | 0.0161146 | 0.0027839 | 0.0463201 | 0.0013412 | 0.1666811 | 0.2357227 | 2084 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | |
| 578 | 0.0091999 | 0.0011480 | 0.0283967 | 0.0073489 | 0.0701238 | 0.0991700 | 2085 | 0 | 0 | 0.0003830 | 0.0006635 | 0 | 0 | | |

【表２８－１７】

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 579 | 0.0411625 | 0.0111830 | 0.2836451 | 0.0166118 | 0.0366176 | 0.0517851 | 2086 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0640736 | 0.0906138 |
| 580 | 1.3003354 | 0.2074056 | 1.8650980 | 0.2575640 | 0.6667881 | 0.0711716 | 2087 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0542890 | 0.0767763 |
| 581 | 0.3758708 | 0.0404870 | 0.7000608 | 0.1249055 | 0.7808206 | 0.2085546 | 2088 | 0.0004344 | 0.0003764 | 0.0015427 | 0.0001013 | 0 | 0 | 0 |
| 582 | 0.0135340 | 0.0067790 | 0.0232339 | 0.0034976 | 0.1319441 | 0.1865972 | 2089 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.2164268 | 0.0692852 |
| 583 | 0.4141506 | 0.0368368 | 0.6638750 | 0.1081149 | 0.5786855 | 0.0685822 | 2090 | 0 | 0 | 0.0001152 | 0.0001996 | 0 | 0 | 0 |
| 584 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0061761 | 0.0106973 | 2091 | 0 | 0 | 0.0015630 | 0.0027071 | 0.0492355 | 0.0696295 |
| 585 | 0.0000636 | 0.0001102 | 0 | 0 | 0.0837522 | 0.0728986 | 2092 | 0.0006821 | 0.0002090 | 0.1025803 | ND | 0 | 0 | 0 |
| 586 | 0.1592580 | 0.0244719 | 0.0601360 | 0.0061350 | 0.1474880 | 0.0359687 | 2093 | 0 | 0 | 0.0023086 | 0.0039987 | 0.3082770 | 0.2158565 |
| 587 | 0.0000293 | 0.0000507 | 0.0020322 | 0.0003955 | 0.0381730 | 0.0661176 | 2094 | 0 | 0 | 0.0003002 | 0.0005200 | 0.1124594 | 0.1590415 |
| 588 | 0.0160828 | 0.0007692 | 0.0415401 | 0.0074104 | 0.1489352 | 0.0209061 | 2095 | 0 | 0 | 0.0010075 | 0.0009659 | 0.0405898 | 0.0574026 |
| 589 | 0.0381167 | 0.0036384 | 0.3214640 | 0.0089083 | 0.0277869 | 0.0440434 | 2096 | 0.0000297 | 0.0000515 | 0 | 0 | 0.1443389 | 0.0522986 |
| 590 | 0.0845032 | 0.0069491 | 0.2677176 | 0.0084728 | 0.1110154 | 0.1922843 | 2097 | 0 | 0 | 0.0002381 | 0.0004124 | 0 | 0 |
| 591 | 0.0214413 | 0.0021399 | 0.0609662 | 0.0079985 | 0.1389971 | 0.1667447 | 2098 | 0 | 0 | 0.1621645 | ND | 0.0452286 | 0.0639629 |
| 592 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0829422 | 0.1060403 | 2099 | 0.0001984 | 0.0001907 | 0.0004419 | 0.0003924 | 0.0032546 | 0.0031593 |
| 593 | 0.0031289 | 0.0006476 | 0.0267903 | 0.0029745 | 0.0364772 | 0.0631803 | 2100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0200395 | 0.0347094 |
| 594 | 0.0088021 | 0.0005509 | 0.0242818 | 0.0017612 | 0.0580496 | 0.1005449 | 2101 | 0 | 0 | 0.0006874 | 0.0009872 | 0.0118845 | 0.0109374 |
| 595 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0022701 | 0.0039320 | 2102 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0272397 | 0.0206183 |
| 596 | 0.0384593 | 0.0045682 | 0.2344708 | 0.0269804 | 0.0459080 | 0.0795150 | 2103 | 0 | 0 | 0.0000120 | 0.0000209 | 0.0170472 | 0.0295266 |
| 597 | 0.7432446 | 0.1902757 | 0.9783760 | 0.0114977 | 0.7349576 | 0.2313648 | 2104 | 0.0000428 | 0.0000742 | 0.0002645 | 0.0002438 | 0.0040049 | 0.0038985 |
| 598 | 0.0201631 | 0.0051852 | 0.1027519 | 0.0331148 | 0.0328313 | 0.0328998 | 2105 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0290708 | 0.0266937 |
| 599 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0007946 | 0.0013763 | 2106 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0060548 | 0.0104872 |
| 600 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0688403 | 0.1192350 | 2107 | 0 | 0 | 0.0005612 | 0.0004957 | 0.0186059 | 0.0199866 |
| 601 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0940446 | 0.1628900 | 2108 | 0 | 0 | 0.0001142 | 0.0000999 | 0.0078967 | 0.0086912 |
| 602 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2109 | 0 | 0 | 0.0002300 | 0.0003984 | 0.0024284 | 0.0042062 |
| 603 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0019920 | 0.0034502 | 2110 | 0 | 0 | 0.0001285 | 0.0002225 | 0.0187104 | 0.0162810 |
| 604 | 0.0022913 | 0.0004444 | 0.0124885 | 0.0027042 | 0.0919310 | 0.0885054 | 2111 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 605 | 0.0001186 | 0.0000992 | 0 | 0 | 0.0270108 | 0.0261662 | 2112 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 606 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0592145 | 0.1025625 | 2113 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0026195 | 0.0045370 |
| 607 | 0.0013009 | 0.0005977 | 0.0000152 | 0.0000263 | 0.0022895 | 0.0039655 | 2114 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0059354 | 0.0102804 |
| 608 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0624941 | 0.1082430 | 2115 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 609 | 0.2356069 | 0.0155190 | 0.4919241 | 0.0303794 | 0.5041053 | 0.0615217 | 2116 | 0 | 0 | 0.0003412 | 0.0000270 | 0.0092473 | 0.0125703 |
| 610 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2117 | 0.0000893 | 0.0001029 | 0.0001193 | 0.0002067 | 0.0028183 | 0.0048814 |
| 611 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2118 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0093237 | 0.0161492 |
| 612 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.1156300 | 0.1011944 | 2119 | 0 | 0 | 0.0009965 | 0.0017260 | 0.0099822 | 0.0172896 |
| 613 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0383296 | 0.0438455 | 2120 | 0 | 0 | 0.0000201 | 0.0000348 | 0.0027994 | 0.0045833 |

【表２８－１８】

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 614 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0545764 | 0.0497348 | 2121 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0101789 | 0.0176304 |
| 615 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0243988 | 0.0422599 | 2122 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0013220 | 0.0022898 |
| 616 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.1579185 | 0.2735229 | 2123 | 0.0000429 | 0.0000646 | 0 | 0 | 0 | 0.0016066 | 0.0027828 |
| 617 | 0.0300048 | 0.0035560 | 0.0743844 | 0.0070447 | 0.0742433 | 0.1285932 | 2124 | 0 | 0 | 0.0003553 | 0.0005378 | 0 | 0 |
| 618 | 0.0213302 | 0.0082498 | 0.0056795 | 0.0010178 | 0.0277037 | 0.0479843 | 2125 | 0 | 0 | 0.0002088 | 0.0003616 | 0.0080846 | 0.0140030 |
| 619 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0125299 | 0.0217024 | 2126 | 0 | 0 | 0.0000192 | 0.0000332 | 0.0105848 | 0.0183335 |
| 620 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0116829 | 0.0202353 | 2127 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0009814 | 0.0016998 |
| 621 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0306138 | 0.0453435 | 2128 | 0.0000839 | 0.0001454 | 0 | 0 | 0.0025185 | 0.0023294 |
| 622 | 0.0834761 | 0.0392916 | 0.2628144 | 0.0228614 | 0.1682080 | 0.2621826 | 2129 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0011981 | 0.0020752 |
| 623 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0193816 | 0.0176850 | 2130 | 0 | 0 | 0.0004230 | 0.0006546 | 0 | 0 |
| 624 | 0.1253418 | 0.0121630 | 0.3970176 | 0.0815496 | 0.2323187 | 0.0798540 | 2131 | 0 | 0 | 0.0000127 | 0.0000219 | 0.0036058 | 0.0043573 |
| 625 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0050759 | 0.0076675 | 2132 | 0.0000759 | 0.0001314 | 0 | 0 | 0.0003537 | 0.0006127 |
| 626 | 0.0479579 | 0.0170337 | 0.0108262 | 0.0003398 | 0.0684951 | 0.0646467 | 2133 | 0.0002135 | 0.0003698 | 0.0005998 | 0.0002739 | 0.0008253 | 0.0009459 |
| 627 | 0.0911609 | 0.0215735 | 0.2614610 | 0.0158727 | 0.1389814 | 0.1611575 | 2134 | 0 | 0 | 0.0000040 | 0.0000070 | 0.0067670 | 0.0117208 |
| 628 | 0.0000640 | 0.0001109 | 0.0003442 | 0.0001424 | 0.1232906 | 0.2135457 | 2135 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 629 | 0.0318363 | 0.0193388 | 0.3843110 | 0.0361490 | 0.2486736 | 0.0847963 | 2136 | 0.0001763 | 0.0001828 | 0.0005019 | 0.0002886 | 0.0027355 | 0.0047381 |
| 630 | 0.0072468 | 0.0071456 | 0.0060059 | 0.0004022 | 0.0241750 | 0.0418723 | 2137 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0048975 | 0.0042916 |
| 631 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0385420 | 0.0334185 | 2138 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0027821 | 0.0048188 |
| 632 | 0.0302294 | 0.0039273 | 0.0062286 | 0.0016876 | 0.1335242 | 0.1156467 | 2140 | 0 | 0 | 0.0001308 | 0.0002265 | 0.0040178 | 0.0047581 |
| 633 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.2273360 | 0.2811847 | 2141 | 0 | 0 | 0.0002570 | 0.0004452 | 0.0069219 | 0.0020122 |
| 634 | 0.0035011 | 0.0006077 | 0.0092609 | 0.0013154 | 0.0140921 | 0.0244082 | 2142 | 0 | 0 | 0.0000201 | 0.0000348 | 0.0011472 | 0.0019870 |
| 635 | 0.0083789 | 0.0073264 | 0.0276192 | 0.0024357 | 0.0093290 | 0.0118055 | 2143 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0061751 | 0.0106956 |
| 636 | 0.3308273 | 0.1861993 | 1.2387705 | 0.1755532 | 0.5459785 | 0.2164344 | 2144 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0061649 | 0.0092240 |
| 637 | 0.0290785 | 0.0157753 | 0.3520201 | 0.0669087 | 0.0951546 | 0.1248032 | 2145 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 638 | 0 | 0 | 0.0001447 | 0.0000655 | 0.0276871 | 0.0409042 | 2146 | 0 | 0 | 0.0001553 | 0.0001397 | 0.0010592 | 0.0018346 |
| 639 | 0.0132983 | 0.0044059 | 0.1333098 | 0.0080701 | 0.0128664 | 0.0222852 | 2147 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0142104 | 0.0246131 |
| 640 | 0.0123506 | 0.0010871 | 0.1112332 | 0.0027455 | 0.0321647 | 0.0195755 | 2148 | 0 | 0 | 0.0002288 | 0.0003963 | 0.0048553 | 0.0084097 |
| 641 | 0.0233920 | 0.0084414 | 0.0060716 | 0.0004087 | 0.2893865 | 0.2843866 | 2149 | 0.0000043 | 0.0000075 | 0.0000482 | 0.0000834 | 0.0026521 | 0.0023377 |
| 642 | 0.0614917 | 0.0015276 | 0.2636393 | 0.0265713 | 0.1115925 | 0.0313271 | 2150 | 0.0000131 | 0.0000227 | 0 | 0 | 0.0053796 | 0.0093177 |
| 643 | 0.1167920 | 0.0331307 | 0.5413619 | 0.0698157 | 0.2614197 | 0.1624274 | 2151 | 0 | 0 | 0.0000077 | 0.0000133 | 0.0022097 | 0.0022289 |
| 644 | 0.0004333 | 0.0006427 | 0.0030430 | 0.0002196 | 0.0406213 | 0.0703582 | 2153 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0078163 | 0.0128586 |
| 645 | 0.1512085 | 0.1121081 | 0.7220659 | 0.0789405 | 0.3529426 | 0.1218391 | 2154 | 0 | 0 | 0.0000090 | 0.0000156 | 0 | 0 |
| 646 | 0.0261425 | 0.0145379 | 0.3164378 | 0.0769564 | 0.1752195 | 0.1311875 | 2155 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0081617 | 0.0141365 |
| 647 | 0.0179885 | 0.0043089 | 0.1202282 | 0.0096419 | 0.0877726 | 0.1183733 | 2157 | 0 | 0 | 0.0000038 | 0.0000066 | 0.0013888 | 0.0024054 |
| 648 | 0.8364384 | 0.0736869 | 2.0988091 | 0.2613982 | 0.4212376 | 0.0398057 | 2158 | 0.0000109 | 0.0000190 | 0.0005616 | 0.0001997 | 0.0063426 | 0.0102548 |

【表２８－１９】

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 649 | 0.1982021 | 0.0753191 | 0.5374597 | 0.0366612 | 0.1539274 | 0.0049375 | 2159 | 0.0024673 | 0.0011222 | 0.0072974 | 0.0020057 | 0.0017740 | 0.0030727 | | | | | | |
| 650 | 0.0037990 | 0.0008731 | 0.0100971 | 0.0008916 | 0.0302768 | 0.0524409 | 2160 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0028303 | 0.0049022 | | | | | | |
| 651 | 0.0022190 | 0.0020933 | 0.0074158 | 0.0001783 | 0.0480244 | 0.0831807 | 2161 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0003369 | 0.0005834 | | | | | | |
| 652 | 0.1500641 | 0.0330903 | 0.5974245 | 0.1264769 | 0.2413558 | 0.0850356 | 2162 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0037509 | 0.0035748 | | | | | | |
| 653 | 0.1254132 | 0.0618922 | 0.6824948 | 0.0571202 | 0.2129784 | 0.1238575 | 2163 | 0.0000159 | 0.0000275 | 0.0064831 | 0.0000671 | 0.0086937 | 0.0075492 | | | | | | |
| 654 | 0.1054210 | 0.0372556 | 0.6502155 | 0.0308408 | 0.2014638 | 0.1347303 | 2164 | 0 | 0 | 0.0001037 | 0.0001796 | 0.0030490 | 0.0028294 | | | | | | |
| 656 | 0.0002770 | 0.0001150 | 0.0018846 | 0.0003930 | 0.0284026 | 0.0491948 | 2165 | 0 | 0 | 0.0000920 | 0.0001593 | 0.0062175 | 0.0099219 | | | | | | |
| 657 | 0.3042831 | 0.0058213 | 1.2171704 | 0.0998021 | 0.4380874 | 0.1403344 | 2166 | 0.0115915 | 0.0015349 | 0.0479652 | 0.0103204 | 0.0149510 | 0.0164174 | | | | | | |
| 658 | 0.1393847 | 0.0102848 | 0.4472882 | 0.0256927 | 0.1996647 | 0.0493551 | 2167 | 0.0004244 | 0.0003765 | 0.0003010 | 0.0002649 | 0.0003710 | 0.0006425 | | | | | | |
| 659 | 0.2206369 | 0.0147343 | 0.4941708 | 0.0721036 | 0.5388732 | 0.3283799 | 2168 | 0.0000022 | 0.0000038 | 0 | 0 | 0.0111107 | 0.0077775 | | | | | | |
| 660 | 0.1081203 | 0.0181684 | 0.4051920 | 0.0676577 | 0.3541962 | 0.1374233 | 2169 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0079468 | 0.0137643 | | | | | | |
| 661 | 0.1741534 | 0.0274978 | 0.4223568 | 0.0205547 | 0.3463964 | 0.2854087 | 2170 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0195354 | 0.0187784 | | | | | | |
| 662 | 0.0046460 | 0.0011337 | 0.0410290 | 0.0024061 | 0.0347073 | 0.0411821 | 2171 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0072405 | 0.0119869 | | | | | | |
| 663 | 0.1489672 | 0.0320348 | 0.4274451 | 0.0349014 | 0.4609515 | 0.0437903 | 2172 | 0.0007139 | 0.0004380 | 0.0002769 | 0.0002652 | 0.0009806 | 0.0016984 | | | | | | |
| 664 | 0.0961319 | 0.0156278 | 0.3402746 | 0.0167305 | 0.2866836 | 0.1214791 | 2173 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0013012 | 0.0022538 | | | | | | |
| 665 | 0.4843036 | 0.0579456 | 0.8366756 | 0.1169991 | 0.6310413 | 0.2244086 | 2174 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0007422 | 0.0012855 | | | | | | |
| 666 | 0.4375607 | 0.0484287 | 0.5944213 | 0.0339241 | 0.8172975 | 0.1586150 | 2175 | 0.0000222 | 0.0000272 | 0.0003918 | 0.0005337 | 0.0118724 | 0.0190089 | | | | | | |
| 667 | 0.0395275 | 0.0047122 | 0.1917166 | 0.0391059 | 0.0472552 | 0.0727157 | 2176 | 0 | 0 | 0.0001526 | 0.0002642 | 0.0051133 | 0.0088565 | | | | | | |
| 668 | 0.0867209 | 0.0022841 | 0.4503778 | 0.0454082 | 0.1703639 | 0.1343864 | 2178 | 0.0000492 | 0.0000647 | 0.0002785 | 0.0003439 | 0.0125777 | 0.0217851 | | | | | | |
| 669 | 0.0206424 | 0.0010229 | 0.1709944 | 0.0087666 | 0.1028417 | 0.1016411 | 2179 | 0.0194765 | 0.0025404 | 0.0906490 | 0.0207822 | 0.0085047 | 0.0081664 | | | | | | |
| 670 | 0.0972733 | 0.0035545 | 0.5561272 | 0.0330177 | 0.1521158 | 0.0516329 | 2180 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0031645 | 0.0054811 | | | | | | |
| 671 | 0.0451419 | 0.0028420 | 0.2733999 | 0.0363351 | 0.0352812 | 0.0142832 | 2181 | 0 | 0 | 0.0000090 | 0.0000156 | 0 | 0 | | | | | | |
| 672 | 0.0844126 | 0.0059330 | 0.4517005 | 0.0152299 | 0.6612089 | 0.2460925 | 2182 | 0 | 0 | 0.0000947 | 0.0001640 | 0.0124198 | 0.0071542 | | | | | | |
| 673 | 0.0446246 | 0.0034984 | 0.2135571 | 0.0173957 | 0.0621160 | 0.1061497 | 2183 | 0 | 0 | 0.0001389 | 0.0001908 | 0.0013081 | 0.0022658 | | | | | | |
| 674 | 0.2397069 | 0.0118600 | 0.3868312 | 0.1416002 | 0.6442280 | 0.2444108 | 2184 | 0 | 0 | 0.0002831 | 0.0002205 | 0.0200212 | 0.0193989 | | | | | | |
| 675 | 0.0151392 | 0.0011353 | 0.0792808 | 0.0083289 | 0.0056780 | 0.0098346 | 2185 | 0 | 0 | 0.0000120 | 0.0000209 | 0.0134063 | 0.0128967 | | | | | | |
| 676 | 0.1486876 | 0.0324978 | 0.5790247 | 0.0527920 | 0.4216003 | 0.2267397 | 2186 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0039149 | 0.0067809 | | | | | | |
| 677 | 0.0716011 | 0.0124607 | 0.2121102 | 0.0247843 | 0.1790751 | 0.0152490 | 2187 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0026102 | 0.0045209 | | | | | | |
| 678 | 0.0001818 | 0.0002241 | 0.0044975 | 0.0001447 | 0.0419456 | 0.0457590 | 2188 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0058269 | 0.0100925 | | | | | | |
| 679 | 0.0059955 | 0.0007569 | 0.2128796 | 0.0522719 | 0.0164285 | 0.0284550 | 2189 | 0 | 0 | 0.0002449 | 0.0004242 | 0 | 0 | | | | | | |
| 680 | 1.0901519 | 0.0587442 | 1.0962492 | 0.0717250 | 0.7111044 | 0.2752649 | 2190 | 0.0001918 | 0.0000483 | 0.0001849 | 0.0002329 | 0.0034126 | 0.0059109 | | | | | | |
| 681 | 0 | 0 | 0.0006994 | 0.0012113 | 0.0183730 | 0.0174017 | 2191 | 0.0010404 | 0.0000503 | 0.0011608 | 0.0004135 | 0.0061414 | 0.0057187 | | | | | | |
| 682 | 0.1119864 | 0.0338127 | 0.4821107 | 0.1719061 | 0.2789759 | 0.1647577 | 2192 | 0 | 0 | 0.0006728 | 0.0005703 | 0.0079317 | 0.0076491 | | | | | | |
| 683 | 0.0868051 | 0.0313509 | 0.3640109 | 0.0298972 | 0.2092970 | 0.1153486 | 2193 | 0 | 0 | 0.0000790 | 0.0000783 | 0.0001464 | 0.0002536 | | | | | | |
| 684 | 0.2686023 | 0.0684330 | 0.9800626 | 0.3349554 | 0.2702055 | 0.1520438 | 2194 | 0 | 0 | 0.0003113 | 0.0003046 | 0.0052936 | 0.0046832 | | | | | | |

【表２８－２０】

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 685 | 0.0629586 | 0.0144293 | 0.3917626 | 0.1128741 | 0.0611415 | 0.0446839 | 2195 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0012200 | 0.0021131 |
| 686 | 0.1220330 | 0.0371486 | 0.6113336 | 0.1357637 | 0.2913168 | 0.2432904 | 2196 | 0 | 0 | 0.0002077 | 0.0003019 | 0.0100204 | 0.0088851 | |
| 687 | 0.1060137 | 0.0129652 | 0.4334764 | 0.0469308 | 0.2034702 | 0.1525438 | 2197 | 0.0000430 | 0.0000556 | 0.0001632 | 0.0001732 | 0.0060281 | 0.0060578 | |
| 688 | 0.1392359 | 0.0350612 | 0.5423728 | 0.1771555 | 0.2616572 | 0.1639092 | 2198 | 0.0037041 | 0.0004542 | 0.0056999 | 0.0009170 | 0.0111501 | 0.0182080 | |
| 689 | 0.0222335 | 0.0047470 | 0.1944258 | 0.0425351 | 0.0888623 | 0.0483262 | 2199 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0327417 | 0.0305114 | |
| 690 | 0.7931133 | 0.2930577 | 1.2459515 | 0.2345576 | 0.6401840 | 0.1987117 | 2200 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0667119 | 0.0810807 | |
| 691 | 0.2475513 | 0.0561736 | 0.8054016 | 0.1744951 | 0.5013921 | 0.2282519 | 2201 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0045152 | 0.0078206 | |
| 692 | 0.2383455 | 0.0726239 | 1.1036980 | 0.2731438 | 0.3522065 | 0.1732830 | 2202 | 0 | 0 | 0.0001235 | 0.0002139 | 0.0170505 | 0.0295323 | |
| 693 | 0.2721665 | 0.0577994 | 2.1264090 | 0.5442050 | 0.6041771 | 0.3020684 | 2203 | 0 | 0 | 0.0005204 | 0.0009014 | 0.0013835 | 0.0023964 | |
| 694 | 0.0480062 | 0.0078544 | 0.5797554 | 0.2160935 | 0.0845687 | 0.0536574 | 2204 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| 695 | 0.3469131 | 0.0556283 | 1.0514313 | 0.3264593 | 0.6843641 | 0.3298497 | 2205 | 0 | 0 | 0.0007057 | 0.0012223 | 0.0373535 | 0.0332175 | |
| 696 | 0.0984323 | 0.0141036 | 0.5374821 | 0.0394291 | 0.0747431 | 0.0901088 | 2206 | 0 | 0 | 0.0003176 | 0.0005500 | 0.0521761 | 0.0452140 | |
| 697 | 0.3864897 | 0.0696349 | 0.9393823 | 0.1722059 | 0.6778312 | 0.1618193 | 2207 | 0 | 0 | 0.0004851 | 0.0008403 | 0.0243986 | 0.0422596 | |
| 698 | 0.0193405 | 0.0063414 | 0.1942349 | 0.0611259 | 0.0892323 | 0.0575994 | 2208 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0319372 | 0.0553169 | |
| 699 | 0.5356713 | 0.1473690 | 1.4675700 | 0.4282454 | 0.4827006 | 0.2091308 | 2210 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0035388 | 0.0034490 | |
| 700 | 0.3122287 | 0.1026598 | 0.9034739 | 0.1972549 | 0.4116976 | 0.2491096 | 2211 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0077374 | 0.0127433 | |
| 701 | 0.4548248 | 0.0675463 | 1.0033845 | 0.2061377 | 0.8805021 | 0.1580498 | 2212 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0137244 | 0.0237714 | |
| 702 | 0.0413658 | 0.0027628 | 0.4366542 | 0.1405365 | 0.0480032 | 0.0535676 | 2213 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0102647 | 0.0177790 | |
| 703 | 0.1149407 | 0.0106235 | 0.8057825 | 0.2019983 | 0.1405841 | 0.0818401 | 2214 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0593284 | 0.0732090 | |
| 704 | 0.1498939 | 0.0249229 | 0.8903458 | 0.1528732 | 0.1258626 | 0.1040091 | 2215 | 0 | 0 | 0.0002382 | 0.0004125 | 0.0016737 | 0.0028989 | |
| 705 | 0.2280163 | 0.0349173 | 0.8376578 | 0.1491411 | 0.2899377 | 0.1547673 | 2216 | 0 | 0 | 0.0042046 | 0.0049972 | 0 | 0 | |
| 706 | 0.0013390 | 0.0006324 | 0.0049167 | 0.0016474 | 0.0290738 | 0.0376417 | 2217 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0106779 | 0.0184947 | |
| 707 | 0.4163436 | 0.0935874 | 1.0139513 | 0.3230595 | 0.7626945 | 0.3096327 | 2218 | 0 | 0 | 0.0006086 | 0.0010542 | 0.0162006 | 0.0280603 | |
| 708 | 0.1961212 | 0.0431953 | 1.0161493 | 0.3315227 | 0.3747202 | 0.1922637 | 2219 | 0 | 0 | 0.0001500 | 0.0002597 | 0.0115679 | 0.0124232 | |
| 709 | 0.1009269 | 0.0060413 | 0.5634515 | 0.1502164 | 0.0621927 | 0.0367464 | 2220 | 0 | 0 | 0.0037634 | 0.0065184 | 0 | 0 | |
| 710 | 0.0956237 | 0.0390889 | 0.6841375 | 0.2290324 | 0.1023302 | 0.0801116 | 2221 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0303853 | 0.0526289 | |
| 711 | 0.3578531 | 0.0536221 | 1.1082864 | 0.2379130 | 0.2644487 | 0.2146901 | 2222 | 0 | 0 | 0.0007851 | 0.0013598 | 0.0448904 | 0.0292536 | |
| 712 | 0.1108911 | 0.0256759 | 0.4998773 | 0.0848033 | 0.1516285 | 0.0862815 | 2223 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0082750 | 0.0143327 | |
| 713 | 0.1198411 | 0.0233395 | 0.6649111 | 0.1134277 | 0.2408170 | 0.1605661 | 2224 | 0 | 0 | 0.0083079 | 0.0127315 | 0.0591977 | 0.0163055 | |
| 714 | 0.2014690 | 0.0563517 | 0.7942609 | 0.2557375 | 0.4629323 | 0.2266353 | 2226 | 0.0000032 | 0.0000056 | 0 | 0 | 0.0596172 | 0.0528397 | |
| 715 | 0.0086990 | 0.0022139 | 0.0264723 | 0.0068804 | 0.0382718 | 0.0338926 | 2227 | 0.0001515 | 0.0001871 | 0.0002999 | 0.0005195 | 0.0391595 | 0.0366191 | |
| 716 | 0.0138899 | 0.0014323 | 0.5003837 | 0.1668733 | 0.0491607 | 0.0203149 | 2228 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0209039 | 0.0276948 | |
| 717 | 0.0337254 | 0.0043447 | 0.2096656 | 0.0522941 | 0.0459750 | 0.0477513 | 2229 | 0 | 0 | 0.0050674 | 0.0087770 | 0.0133461 | 0.0204704 | |
| 718 | 0.3456002 | 0.0948500 | 1.0297494 | 0.2855522 | 0.3617828 | 0.1738824 | 2231 | 0 | 0 | 0.0003793 | 0.0006570 | 0 | 0 | |
| 719 | 0.0280048 | 0.0057205 | 0.2843953 | 0.0786139 | 0.0651033 | 0.0474553 | 2232 | 0 | 0 | 0.0000991 | 0.0001716 | 0 | 0 | |

【表２８－２１】

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 720 | 0.1541197 | 0.0237351 | 0.7664988 | 0.1254280 | 0.1829716 | 0.0916703 | 2233 | 0.0014487 | 0.0000689 | 0.0105644 | 0.0110054 | 0.0116086 | 0.0183142 |
| 721 | 0.3658019 | 0.0557647 | 0.9642200 | 0.2739219 | 0.3577866 | 0.2019418 | 2234 | 0.0000214 | 0.0000370 | 0.0004391 | 0.0005913 | 0.0030737 | 0.0053238 |
| 722 | 0.2362119 | 0.0596088 | 0.8975635 | 0.2361855 | 0.2299753 | 0.1118675 | 2236 | 0.0002699 | 0.0003007 | 0.0018603 | 0.0016308 | 0.0004638 | 0.0008033 |
| 723 | 0.0015887 | 0.0002229 | 0.0077992 | 0.0028998 | 0.0321983 | 0.0311211 | 2237 | 0 | 0 | 0.0001009 | 0.0001430 | 0.0028326 | 0.0049061 |
| 724 | 0.3010883 | 0.0134666 | 1.2970200 | 0.4475172 | 0.3972778 | 0.1159046 | 2238 | 0 | 0 | 0.0005557 | 0.0009625 | 0.0197883 | 0.0274397 |
| 725 | 0.0462770 | 0.0068714 | 0.3899908 | 0.1376810 | 0.1312767 | 0.0868442 | 2239 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0022884 | 0.0039636 |
| 726 | 0.0790916 | 0.0132180 | 0.4405365 | 0.0946351 | 0.1511455 | 0.0692922 | 2240 | 0.0000920 | 0.0001264 | 0.0004675 | 0.0008097 | 0.0278697 | 0.0261368 |
| 727 | 0.0369060 | 0.0071946 | 0.2364510 | 0.0931115 | 0.0886757 | 0.0404180 | 2241 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0008516 | 0.0014751 |
| 728 | 0.3564860 | 0.0532429 | 1.5647283 | 0.3442435 | 0.3471954 | 0.1584193 | 2242 | 0 | 0 | 0.0000970 | 0.0001681 | 0.0001286 | 0.0002227 |
| 729 | 0.3658040 | 0.0609981 | 1.0195790 | 0.2686638 | 0.4780796 | 0.2496219 | 2243 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0432445 | 0.0456817 |
| 730 | 0.0958256 | 0.0177670 | 0.4741013 | 0.0687694 | 0.1952694 | 0.1019891 | 2244 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 731 | 0.0697025 | 0.0059738 | 0.4283847 | 0.1219803 | 0.1374708 | 0.0662875 | 2245 | 0.0000768 | 0.0000665 | 0.0129115 | 0.0212504 | 0 | 0 |
| 732 | 0.0081515 | 0.0006427 | 0.0311620 | 0.0082739 | 0.0174979 | 0.0169640 | 2246 | 0 | 0 | 0.0115469 | 0.0199998 | 0.0034055 | 0.0058986 |
| 733 | 0.4624917 | 0.0473925 | 1.4144889 | 0.3743635 | 0.5800617 | 0.2975561 | 2247 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0772833 | 0.0676742 |
| 734 | 0.3489421 | 0.0790977 | 1.6674031 | 0.4820783 | 0.2906061 | 0.1377851 | 2248 | 0 | 0 | 0.0005822 | 0.0010084 | 0 | 0 |
| 735 | 0.0056606 | 0.0013757 | 0.0220137 | 0.0047842 | 0.0187125 | 0.0239292 | 2249 | 0.0000089 | 0.0000154 | 0 | 0 | 0.0083046 | 0.0143840 |
| 736 | 0.0099623 | 0.0026249 | 0.0344463 | 0.0074713 | 0.0114069 | 0.0101781 | 2250 | 0.0023325 | 0.0004812 | 0.0047917 | 0.0041532 | 0.0378654 | 0.0456834 |
| 737 | 0.0024436 | 0.0035630 | 0.0048658 | 0.0002429 | 0.0000850 | 0.0001472 | 2251 | 0.0000464 | 0.0000803 | 0 | 0 | 0.0467970 | 0.0810548 |
| 738 | 0.5126487 | 0.1212549 | 1.6191663 | 0.1732762 | 0.6965441 | 0.2058485 | 2252 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0105195 | 0.0182203 |
| 739 | 0.5906328 | 0.1336401 | 1.3528364 | 0.2591570 | 0.7386854 | 0.3698840 | 2253 | 0 | 0 | 0.0032229 | 0.0055822 | 0.0326849 | 0.0386575 |
| 740 | 0.0230807 | 0.0038993 | 0.0217202 | 0.0061335 | 0.0442842 | 0.0369662 | 2254 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 741 | 0.3396374 | 0.0418120 | 1.3246633 | 0.3998377 | 0.4144375 | 0.1738005 | 2255 | 0 | 0 | 0.0000794 | 0.0001375 | 0.0115088 | 0.0199339 |
| 742 | 0.0421225 | 0.0075935 | 0.4532118 | 0.1177707 | 0.0642745 | 0.0477136 | 2256 | 0 | 0 | 0.0541603 | ND | 0.0054251 | 0.0093966 |
| 743 | 0.4778789 | 0.0630132 | 0.9196188 | 0.2628757 | 0.5449919 | 0.1232365 | 2257 | 0 | 0 | 0.0000617 | 0.0001069 | 0.0295153 | 0.0265674 |
| 744 | 0.2664740 | 0.0361598 | 0.8968104 | 0.1538481 | 0.3873526 | 0.1718089 | 2258 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 745 | 0.0087991 | 0.0017846 | 0.0305534 | 0.0007925 | 0.0401244 | 0.0183698 | 2259 | 0 | 0 | 0.0002831 | 0.0002666 | 0.0096293 | 0.0166784 |
| 746 | 0.3563631 | 0.0380841 | 0.9006697 | 0.2216913 | 0.4688996 | 0.2832184 | 2260 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0362850 | 0.0541543 |
| 747 | 0.7224644 | 0.1281956 | 1.5967749 | 0.3808133 | 0.5983972 | 0.2547259 | 2261 | 0 | 0 | 0.0001067 | 0.0001848 | 0.0707987 | 0.0317646 |
| 748 | 0.4628174 | 0.0639871 | 1.4877148 | 0.4151679 | 0.7749983 | 0.4105918 | 2262 | 0 | 0 | 0.0003705 | 0.0006417 | 0.0213562 | 0.0369900 |
| 749 | 0.2016296 | 0.0178909 | 0.7680248 | 0.4061214 | 0.3319342 | 0.1719244 | 2263 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0506259 | 0.0751998 |
| 750 | 0.0025650 | 0.0005598 | 0.0093414 | 0.0022463 | 0.0254844 | 0.0307480 | 2264 | 0 | 0 | 0.0005557 | 0.0009625 | 0.0060578 | 0.0104925 |
| 751 | 0.3833717 | 0.0628420 | 1.3554707 | 0.1976652 | 0.4633426 | 0.2367725 | 2265 | 0.0000556 | 0.0000964 | 0.0143576 | 0.0248681 | 0.0627392 | 0.0879766 |
| 752 | 0.3432048 | 0.0433617 | 1.1515246 | 0.2686385 | 0.5531098 | 0.2507335 | 2266 | 0 | 0 | 0.0004410 | 0.0007639 | 0.0583999 | 0.1011516 |
| 753 | 0.0617437 | 0.0116139 | 0.9373098 | 0.1603001 | 0.1068908 | 0.0730321 | 2267 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 754 | 0.0106909 | 0.0007846 | 0.1339423 | 0.0340525 | 0.0490958 | 0.0135928 | 2269 | 0 | 0 | 0.0005204 | 0.0009014 | 0.0140097 | 0.0242656 |

【表２８－２２】

| | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 755 | 0.2490235 | 0.0622153 | 1.0286894 | 0.1919862 | 0.3437454 | 0.1893448 | 2270 | 0 | 0 | 0.0005645 | 0.0009778 | 0 | 0 |
| 756 | 0.1717305 | 0.0004516 | 1.0127763 | 0.2729028 | 0.3465940 | 0.1107786 | 2271 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0310014 | 0.0536960 |
| 757 | 0.0054900 | 0.0007439 | 0.0116315 | 0.0038131 | 0.0328869 | 0.0284953 | 2272 | 0 | 0 | 0.0000610 | 0.0001056 | 0.0262610 | 0.0454853 |
| 758 | 0.0002204 | 0.0003818 | 0.0015720 | 0.0004312 | 0.0165435 | 0.0286542 | 2273 | 0 | 0 | 0.0000794 | 0.0001375 | 0.0269416 | 0.0466643 |
| 759 | 0.0251391 | 0.0028856 | 0.1255371 | 0.0126569 | 0.0372960 | 0.0542426 | 2274 | 0 | 0 | 0.0002558 | 0.0004431 | 0.0520665 | 0.0547939 |
| 760 | 0.6792006 | 0.2996080 | 0.6492615 | 0.0287358 | 0.1000361 | 0.0040645 | 2275 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0046661 | 0.0080819 |
| 761 | 0.0368116 | 0.0041520 | 0.1128563 | 0.0163097 | 0.0859247 | 0.0618694 | 2276 | 0.0004025 | 0.0000458 | 0.0001411 | 0.0002445 | 0.0150993 | 0.0261528 |
| 762 | 0.0003047 | 0.0003530 | 0.0015116 | 0.0005253 | 0.0347454 | 0.0117534 | 2277 | 0.0023787 | 0.0001464 | 0.0026182 | 0.0022875 | 0.0599825 | 0.0588070 |
| 763 | 0.0014499 | 0.0005461 | 0.0044637 | 0.0020502 | 0.0347449 | 0.0300997 | 2278 | 0.0080662 | 0.0012344 | 0.0233840 | 0.0100507 | 0.0045786 | 0.0039946 |
| 764 | 0.0008618 | 0.0001195 | 0.0050802 | 0.0012711 | 0.0173741 | 0.0284035 | 2279 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0070734 | 0.0122515 |
| 765 | 0.0018299 | 0.0004046 | 0.0106240 | 0.0017637 | 0.0084315 | 0.0129675 | 2280 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0023473 | 0.0040656 |
| 766 | 0.0115525 | 0.0016566 | 0.2526626 | 0.0513034 | 0.0445147 | 0.0385098 | 2281 | 0 | 0 | 0.0000991 | 0.0001716 | 0.0171030 | 0.0296232 |
| 767 | 0.1216636 | 0.0147762 | 0.7300450 | 0.1468574 | 0.3052640 | 0.1545072 | 2282 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0084860 | 0.0146982 |
| 768 | 0.0009894 | 0.0002376 | 0.0075444 | 0.0002232 | 0.0131936 | 0.0114407 | 2283 | 0 | 0 | 0.0000176 | 0.0000306 | 0.0051826 | 0.0025694 |
| 769 | 0.0309757 | 0.0023603 | 0.3646575 | 0.0529937 | 0.0682454 | 0.0263133 | 2284 | 0.0017445 | 0.0001292 | 0.0012274 | 0.0013661 | 0.0481651 | 0.0523332 |
| 770 | 0.2908393 | 0.0355357 | 0.5088522 | 0.1155363 | 0.3528536 | 0.0441255 | 2285 | 1.8127979 | 0.0879777 | 2.8124011 | 1.1744627 | 0.1815338 | 0.1698569 |
| 771 | 0.6652379 | 0.1205940 | 1.4879278 | 0.2996936 | 0.9737556 | 0.4081553 | 2286 | 0.0023087 | 0.0001907 | 0.0023593 | 0.0031837 | 0.0042364 | 0.0073377 |
| 772 | 0.0076543 | 0.0012777 | 0.0180755 | 0.0043473 | 0.0257300 | 0.0304441 | 2287 | 0.0000452 | 0.0000782 | 0.0001588 | 0.0002750 | 0 | 0 |
| 773 | 0.5011577 | 0.0910847 | 1.9656274 | 0.6675773 | 0.6206645 | 0.2564350 | 2288 | 0.0000255 | 0.0000263 | 0 | 0 | 0.0242122 | 0.0419367 |
| 774 | 0.3855430 | 0.0608567 | 1.6777277 | 0.5084799 | 0.2989244 | 0.1241777 | 2289 | 0.0017108 | 0.0002418 | 0.0026339 | 0.0011858 | 0.0366055 | 0.0634026 |
| 775 | 0.0015681 | 0.0005398 | 0.0104731 | 0.0028526 | 0.0057233 | 0.0099130 | 2290 | 0 | 0 | 0.0010627 | 0.0010518 | 0.0296431 | 0.0258497 |
| 776 | 0.3229560 | 0.0275012 | 0.9955637 | 0.0837407 | 0.6810275 | 0.1826995 | 2291 | 0 | 0 | 0.0002210 | 0.0003828 | 0.0508869 | 0.0881387 |
| 777 | 0.0336307 | 0.0073409 | 0.0327952 | 0.0060883 | 0.0457330 | 0.0410626 | 2292 | 0.0003600 | 0.0000461 | 0.0000610 | 0.0001056 | 0.0321322 | 0.0395285 |
| 778 | 0 | 0 | 0.0013937 | 0.0023164 | 0.0009345 | 0.0016185 | 2293 | 0.0016885 | 0.0000920 | 0.0023755 | 0.0023301 | 0.0115515 | 0.0103145 |
| 779 | 0.1243461 | 0.0419125 | 0.4510455 | 0.2003006 | 0.6509206 | 0.1913214 | 2294 | 0.0000406 | 0.0000494 | 0.0010762 | 0.0014504 | 0.0110351 | 0.0101208 |
| 780 | 0.0000430 | 0.0000744 | 0.0045356 | 0.0027496 | 0 | 0 | 2295 | 0 | 0 | 0.0009615 | 0.0016653 | 0.0102259 | 0.0177118 |
| 781 | 0.0028688 | 0.0004613 | 0.0067288 | 0.0040415 | 0.0319141 | 0.0188219 | 2296 | 0.0007282 | 0.0001068 | 0.0011327 | 0.0016006 | 0.0405555 | 0.0702442 |
| 782 | 0.7468512 | 0.0883888 | 1.4305099 | 0.7007234 | 1.1097899 | 0.4425158 | 2298 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0106077 | 0.0183731 |
| 783 | 0.6141437 | 0.1717315 | 1.3594319 | 0.6194480 | 1.1763946 | 0.3299439 | 2299 | 0 | 0 | 0.0009746 | 0.0007006 | 0.0315963 | 0.0519836 |
| 784 | 0.3690822 | 0.0708474 | 0.8485793 | 0.3801638 | 1.1051783 | 0.3112519 | 2300 | 0.0847727 | 0.0075940 | 0.1484284 | 0.0020310 | 0.0095545 | 0.0053480 |
| 785 | 1.2441359 | 0.5166303 | 1.8317439 | 0.0584043 | 0.0870500 | 0.0177789 | 2301 | 0 | 0 | 0.0003289 | 0.0005697 | 0.0037793 | 0.0036847 |
| 786 | 0.1066808 | 0.0272660 | 0.1631694 | 0.0365012 | 0.1748128 | 0.0181701 | 2302 | 0 | 0 | 0.0000429 | 0.0000743 | 0.0079526 | 0.0094909 |
| 787 | 0.2220721 | 0.0093622 | 0.9318827 | 0.2545935 | 1.4874460 | 0.4209787 | 2303 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0417736 | 0.0478693 |
| 788 | 0.3356167 | 0.0493813 | 1.2764768 | 0.5059650 | 1.0064085 | 0.1709161 | 2304 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0180552 | 0.0312725 |
| 789 | 0.0106526 | 0.0016368 | 0.0786709 | 0.0398256 | 0.0658624 | 0.0559150 | 2305 | 0 | 0 | 0.0001841 | 0.0003188 | 0.0139593 | 0.0130074 |

【表２８－２３】

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 790 | 0.0036843 | 0.0045125 | 0.0060851 | 0.0014246 | 0 | 0 | 2306 | 0.0002813 | 0.0001537 | 0.0013227 | 0.0007991 | 0.0271910 | 0.0235516 |
| 791 | 1.2096602 | 0.1849961 | 1.6156370 | 0.1805862 | 0.6496945 | 0.0152531 | 2307 | 0 | 0 | 0.0001935 | 0.0002717 | 0.0090578 | 0.0113238 |
| 792 | 0.1761966 | 0.0188661 | 0.6884410 | 0.3354732 | 0.4410120 | 0.1841573 | 2308 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0111129 | 0.0145113 |
| 793 | 0.8948030 | 0.1649499 | 1.8343207 | 0.6708429 | 1.8467718 | 0.4794745 | 2309 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0171349 | 0.0042142 |
| 794 | 0.0023317 | 0.0003388 | 0.0561765 | 0.0278199 | 0.0760967 | 0.0514085 | 2310 | 0.0013644 | 0.0003521 | 0 | 0 | 0.0073605 | 0.0127488 |
| 795 | 0.0901874 | 0.0088615 | 0.4112345 | 0.1146114 | 0.5241135 | 0.0398496 | 2311 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0005445 | 0.0005596 |
| 796 | 0.0864917 | 0.0068195 | 0.5390815 | 0.2307694 | 0.2588730 | 0.1007498 | 2312 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0174440 | 0.0201104 |
| 797 | 0.2400677 | 0.0265441 | 0.4526116 | 0.1652983 | 0.5534929 | 0.1159519 | 2313 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0219674 | 0.0217124 |
| 798 | 0.0108918 | 0.0013984 | 0.0592385 | 0.0262722 | 0.1628976 | 0.0726163 | 2314 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0259544 | 0.0361162 |
| 799 | 0.0057797 | 0.0012942 | 0.0203581 | 0.0073666 | 0.0614595 | 0.0900022 | 2315 | 0 | 0 | 0.0000107 | 0.0000186 | 0.0035230 | 0.0044304 |
| 800 | 0.0048193 | 0.0007023 | 0.1177966 | 0.0556011 | 0.0481708 | 0.0123361 | 2316 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0080537 | 0.0115824 |
| 801 | 0.0910098 | 0.0104249 | 0.2511696 | 0.1054970 | 0.2176410 | 0.1079909 | 2317 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0102008 | 0.0098209 |
| 802 | 0.3733436 | 0.0783738 | 1.1933716 | 0.4741272 | 0.9145904 | 0.2532303 | 2319 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0040370 | 0.0028084 |
| 803 | 0.0000150 | 0.0000259 | 0.0001360 | 0.0002355 | 0.0427385 | 0.0438892 | 2320 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 804 | 0.0514066 | 0.0018827 | 0.1466807 | 0.0683188 | 0.1338908 | 0.0237104 | 2321 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0106598 | 0.0184633 |
| 805 | 0.0074535 | 0.0014995 | 0.0085464 | 0.0046152 | 0.0484296 | 0.0522748 | 2322 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0297283 | 0.0269999 |
| 806 | 0.5128886 | 0.0180725 | 1.5281681 | 0.5367373 | 0.7563714 | 0.2289824 | 2323 | 0 | 0 | 0.0001802 | 0.0003120 | 0.0235482 | 0.0407868 |
| 807 | 0.0163740 | 0.0039293 | 0.0418284 | 0.0174684 | 0.0462168 | 0.0088282 | 2324 | 0.0000454 | 0.0000786 | 0.0002971 | 0.0004591 | 0.0069457 | 0.0060162 |
| 808 | 0.4643184 | 0.0696582 | 1.3076795 | 0.5307546 | 1.1862337 | 0.1944240 | 2325 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0252427 | 0.0231164 |
| 810 | 0.0057540 | 0.0002689 | 0.0266162 | 0.0127661 | 0.0254950 | 0.0367606 | 2326 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0074135 | 0.0111016 |
| 811 | 0.1462955 | 0.0187936 | 0.5000987 | 0.1978054 | 0.2354513 | 0.0568923 | 2327 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0009710 | 0.0016819 |
| 812 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0271394 | 0.0235807 | 2328 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0018516 | 0.0016079 |
| 813 | 0.0030996 | 0.0016384 | 0.0029468 | 0.0022170 | 0.0375059 | 0.0489379 | 2329 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0088919 | 0.0125761 |
| 814 | 0.0404907 | 0.0039199 | 0.8414862 | 0.3836713 | 0.1422321 | 0.0447855 | 2330 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0145286 | 0.0165470 |
| 815 | 0.0020609 | 0.0005994 | 0.0110446 | 0.0056575 | 0.0023115 | 0.0040036 | 2331 | 0 | 0 | 0.0003182 | 0.0005511 | 0.0216802 | 0.0187757 |
| 816 | 0.4186203 | 0.1399217 | 1.0638654 | 0.4701762 | 0.9989026 | 0.2456221 | 2332 | 0 | 0 | 0.0000679 | 0.0001177 | 0.0271825 | 0.0470815 |
| 817 | 0.1234082 | 0.0328284 | 0.8742523 | 0.3178681 | 0.3212447 | 0.1265584 | 2333 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0143589 | 0.0248704 |
| 818 | 0.0002183 | 0.0002979 | 0.0320476 | 0.0104378 | 0.0099074 | 0.0154985 | 2334 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0015809 | 0.0027382 |
| 819 | 0.4482214 | 0.1802843 | 1.3255871 | 0.1500400 | 0.2240464 | 0.0237996 | 2335 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0195271 | 0.0224236 |
| 820 | 1.1766075 | 0.0599776 | 1.4377744 | 0.1541220 | 4.2590882 | 1.1975232 | 2336 | 0.0002364 | 0.0002784 | 0.0003417 | 0.0003033 | 0.0270165 | 0.0382663 |
| 821 | 0.0190923 | 0.0045851 | 0.0519580 | 0.0257468 | 0.0388592 | 0.0302686 | 2337 | 0.0000080 | 0.0000139 | 0 | 0 | 0.0185840 | 0.0224577 |
| 822 | 0.0002209 | 0.0003093 | 0.0108164 | 0.0054359 | 0.0235889 | 0.0121649 | 2338 | 0.0012443 | 0.0002553 | 0.0016566 | 0.0010474 | 0.0125410 | 0.0131594 |
| 823 | 0.6303426 | 0.0990415 | 2.0981536 | 0.9207057 | 0.9074077 | 0.4606725 | 2339 | 0.0003557 | 0.0001513 | 0.0011294 | 0.0003862 | 0.0479725 | 0.0238676 |
| 824 | 0.0766174 | 0.0252503 | 0.0028887 | 0.0018879 | 0.1321434 | 0.1041817 | 2340 | 0 | 0 | 0.0004199 | 0.0005095 | 0.0090874 | 0.0130295 |
| 825 | 0.0326170 | 0.0059370 | 0.4896559 | 0.1415877 | 0.0921156 | 0.0574376 | 2341 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0106711 | 0.0094067 |

【表２８－２４】

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 826 | 0.2132570 | 0.0340306 | 1.2647511 | 0.5324821 | 0.6759137 | 0.2634486 | 2342 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 827 | 0.1815407 | 0.0200487 | 1.0538685 | 0.4168982 | 0.6652945 | 0.2553687 | 2343 | 0.0001447 | 0.0002036 | 0.0005361 | 0.0004444 | 0.0073590 | 0.0091605 | | |
| 828 | 0.0011388 | 0.0003272 | 0.0054974 | 0.0017042 | 0.0291928 | 0.0290069 | 2344 | 0.5091978 | 0.2485159 | 1.2800271 | 0.0474194 | 0.0181810 | 0.0144579 | | |
| 829 | 0.0366749 | 0.0048739 | 0.3529989 | 0.1579602 | 0.1872286 | 0.0678367 | 2345 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0021893 | 0.0019104 | | |
| 830 | 0.2168890 | 0.0189036 | 0.9913468 | 0.3866638 | 1.0606919 | 0.2122776 | 2346 | 0.6383388 | 0.1508114 | 0.9772492 | 0.1852853 | 0.0257944 | 0.0225915 | | |
| 831 | 0.1096451 | 0.0278374 | 0.7662902 | 0.3746027 | 0.3887289 | 0.0967025 | 2347 | 0.0053815 | 0.0009261 | 0.0104333 | 0.0003402 | 0.0022083 | 0.0038248 | | |
| 832 | 0.0009791 | 0.0009128 | 0.0100638 | 0.0050787 | 0 | 0 | 2348 | 0.0016485 | 0.0001876 | 0.0031408 | 0.0010653 | 0 | 0 | | |
| 833 | 0.1517613 | 0.0480407 | 1.3844949 | 0.6619613 | 0.5627038 | 0.1335200 | 2349 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0162311 | 0.0047470 | |
| 834 | 0.0445537 | 0.0056964 | 0.6267001 | 0.2523216 | 0.2596575 | 0.0657143 | 2351 | 0.0006036 | 0.0003641 | 0.0000662 | 0.0001147 | 0.0007926 | 0.0013729 | | |
| 835 | 0.1028041 | 0.0074166 | 0.4574859 | 0.1351078 | 0.2831502 | 0.1670968 | 2352 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0092008 | 0.0096851 | | |
| 836 | 0.3281256 | 0.0340064 | 1.1960177 | 0.1975451 | 0.7180878 | 0.2725227 | 2353 | 0.0002201 | 0.0002517 | 0 | 0 | 0 | 0 | | |
| 837 | 0.0001568 | 0.0001580 | 0.0026819 | 0.0023226 | 0.0084414 | 0.0146209 | 2354 | 0.0039566 | 0.0023360 | 0.0102351 | 0.0017062 | 0.0113331 | 0.0123829 | | |
| 838 | 0.0171068 | 0.0079444 | 0.0122888 | 0.0012806 | 0 | 0 | 2355 | 0.0005076 | 0.0002484 | 0.0005484 | 0.0007019 | 0.0044227 | 0.0076603 | | |
| 839 | 0.5388195 | 0.0611288 | 1.4823523 | 0.7283869 | 1.4326699 | 0.1784227 | 2356 | 0 | 0 | 0.0000770 | 0.0000985 | 0.0120054 | 0.0207939 | | |
| 840 | 0.4139326 | 0.0292893 | 1.4889660 | 0.5965066 | 1.5087552 | 0.5718780 | 2357 | 0.0000561 | 0.0000972 | 0.0007696 | 0.0005118 | 0 | 0 | | |
| 841 | 0.2785886 | 0.0812528 | 1.1062311 | 0.5251016 | 0.6824268 | 0.1280151 | 2358 | 0.0000150 | 0.0000260 | 0.0002712 | 0.0002356 | 0.0191794 | 0.0163041 | | |
| 842 | 0.2615451 | 0.0535742 | 1.0736436 | 0.4938042 | 0.8530606 | 0.2221382 | 2359 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0009852 | 0.0017064 | | |
| 843 | 0.1923153 | 0.0299787 | 0.6690661 | 0.2641047 | 2.4965771 | 0.7483032 | 2360 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0038994 | 0.0067540 | | |
| 844 | 0.4865939 | 0.1488644 | 1.4608203 | 0.0465369 | 0.3831173 | 0.0713714 | 2361 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0020503 | 0.0035512 | | |
| 845 | 0.1454574 | 0.0066106 | 0.5957453 | 0.0027632 | 0.1624975 | 0.0087683 | 2362 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0115990 | 0.0099906 | | |
| 846 | 0.1369823 | 0.0121922 | 1.1401785 | 0.2636452 | 1.2587981 | 0.5495608 | 2363 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0203488 | 0.0342996 | | |
| 847 | 0.3835961 | 0.0062622 | 2.0188154 | 0.3318678 | 0.6842160 | 0.3414744 | 2364 | 0 | 0 | 0.0000393 | 0.0000681 | 0.0081235 | 0.0083337 | | |
| 848 | 0.0754755 | 0.0117404 | 0.5744557 | 0.2562899 | 0.8392391 | 0.1093640 | 2365 | 0 | 0 | 0.0002610 | 0.0004521 | 0.0013944 | 0.0024152 | | |
| 849 | 0.2583264 | 0.0566976 | 1.8602784 | 0.9217313 | 0.5203092 | 0.1660751 | 2366 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0085170 | 0.0147518 | | |
| 850 | 0.5562698 | 0.1683688 | 1.7526928 | 0.6640152 | 0.9804276 | 0.3347994 | 2367 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | |
| 851 | 0.1145687 | 0.0261641 | 0.7334243 | 0.2753407 | 0.7771992 | 0.1684661 | 2368 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0080336 | 0.0139146 | | |
| 852 | 0.1954675 | 0.0106259 | 0.5081842 | 0.1809175 | 1.7760225 | 0.5179178 | 2369 | 0.0003107 | 0.0001700 | 0.0026580 | 0.0008874 | 0.0167948 | 0.0290894 | | |
| 853 | 0.2386231 | 0.0269957 | 1.0768910 | 0.1860235 | 0.6773812 | 0.2859134 | 2370 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0127210 | 0.0220334 | | |
| 854 | 0.0478617 | 0.0031631 | 0.4460447 | 0.2243769 | 0.5240844 | 0.2256005 | 2371 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0302694 | 0.0311873 | | |
| 855 | 0.2128024 | 0.0168563 | 0.9932703 | 0.4755309 | 0.6348777 | 0.1698348 | 2372 | 0 | 0 | 0.0000548 | 0.0000950 | 0.0118533 | 0.0202033 | | |
| 856 | 0.0909237 | 0.0128629 | 0.2013447 | 0.0925931 | 0.4931850 | 0.1521315 | 2373 | 0.0000951 | 0.0001647 | 0.0011155 | 0.0002143 | 0.0111133 | 0.0117153 | | |
| 857 | 0.4260379 | 0.0882727 | 0.9166772 | 0.3883544 | 1.5934035 | 0.4201176 | 2374 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | |
| 858 | 0.0296376 | 0.0060975 | 0.7407408 | 0.3109973 | 0.1006344 | 0.0493297 | 2375 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | |
| 859 | 0.0007436 | 0.0004736 | 0.0073459 | 0.0032222 | 0.0035883 | 0.0062151 | 2376 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0029699 | 0.0051440 | | |
| 860 | 0.0015482 | 0.0000274 | 0.0185965 | 0.0075140 | 0.0129381 | 0.0184519 | 2377 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0319489 | 0.0509850 | | |

【表２８－２５】

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 861 | 0.593918 | 0.0320351 | 1.6520001 | 0.1341928 | 1.5382917 | 0.2762123 | 2379 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0061992 | 0.0107374 |
| 862 | 0.8626269 | 0.1503672 | 1.5953983 | 0.6417049 | 1.6649476 | 0.4457799 | 2380 | 0 | 0 | 0.0000393 | 0.0000681 | 0.0034298 | 0.0059406 | |
| 863 | 0.5214500 | 0.0466549 | 1.3671389 | 0.5882597 | 1.5105618 | 0.4952573 | 2381 | 0.3286092 | 0.0177007 | 0.3752226 | 0.0280312 | 0.0003458 | 0.0005989 | |
| 864 | 0.3870868 | 0.0219952 | 0.8923021 | 0.3560355 | 1.5467879 | 0.4798770 | 2382 | 0.0000595 | 0.0001031 | 0.0000107 | 0.0000186 | 0.0100648 | 0.0136983 | |
| 865 | 0.2535143 | 0.0141704 | 1.0680685 | 0.5372128 | 0.9219688 | 0.2493120 | 2383 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0000032 | 0.0000055 | |
| 866 | 0.0517522 | 0.0038918 | 0.2064443 | 0.0918785 | 0.3268171 | 0.0772961 | 2384 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0052014 | 0.0090090 | |
| 867 | 0.2375035 | 0.0303309 | 0.7223557 | 0.3081785 | 0.6375810 | 0.0562019 | 2385 | 0.0000574 | 0.0000994 | 0 | 0 | 0.0220818 | 0.0382469 | |
| 868 | 0.0012539 | 0.0002122 | 0.0035092 | 0.0018678 | 0.0106886 | 0.0185132 | 2386 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0148311 | 0.0256883 | |
| 869 | 1.0019056 | 0.1426194 | 1.8376386 | 0.1323780 | 0.8473526 | 0.1274444 | 2387 | 0.0000595 | 0.0001031 | 0 | 0 | 0.0002673 | 0.0004630 | |
| 870 | 0.3297324 | 0.0361669 | 0.9119081 | 0.3515428 | 1.1969889 | 0.4533518 | 2388 | 0.0007850 | 0.0001904 | 0.0008801 | 0.0004476 | 0.0104309 | 0.0090436 | |
| 871 | 0.3621068 | 0.0378441 | 0.7068048 | 0.2991754 | 1.4409424 | 0.3503940 | 2390 | 0 | 0 | 0.0000501 | 0.0000867 | 0.0102370 | 0.0175917 | |
| 872 | 0.0002420 | 0.0001625 | 0.0037638 | 0.0022829 | 0.0235938 | 0.0104199 | 2392 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| 873 | 0.0045288 | 0.0005922 | 0.0127769 | 0.0065310 | 0.0369895 | 0.0383683 | 2394 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0042129 | 0.0041454 | |
| 874 | 0.1400322 | 0.0167777 | 0.5571608 | 0.1841735 | 1.8520352 | 0.3607469 | 2395 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0077521 | 0.0068924 | |
| 875 | 0.1678987 | 0.0163764 | 0.8957383 | 0.3186484 | 0.9367534 | 0.3091561 | 2396 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| 876 | 0.4692483 | 0.0585856 | 1.1178576 | 0.4780424 | 1.5735405 | 0.4963713 | 2397 | 0.0008292 | 0.0001293 | 0.0010311 | 0.0001553 | 0.0075677 | 0.0067101 | |
| 877 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0127151 | 0.0205143 | 2398 | 0 | 0 | 0.0035956 | 0.0062277 | 0.0085629 | 0.0148314 | |
| 878 | 0.0042651 | 0.0008248 | 0.0144572 | 0.0099741 | 0.1791199 | 0.0720935 | 2399 | 0.0000572 | 0.0000991 | 0.0018057 | 0.0022448 | 0.0057621 | 0.0099803 | |
| 879 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0100200 | 0.0127834 | 2400 | 0.0000233 | 0.0000404 | 0.0004150 | 0.0004990 | 0.0048968 | 0.0084815 | |
| 880 | 0.0043227 | 0.0027305 | 0.0042971 | 0.0002024 | 0 | 0 | 2401 | 0.0000030 | 0.0000052 | 0.0003588 | 0.0006215 | 0.0148389 | 0.0134274 | |
| 881 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2402 | 0.0000038 | 0.0000065 | 0 | 0 | 0.0068783 | 0.0115706 | |
| 882 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0038666 | 0.0054682 | 2403 | 0.0000192 | 0.0000333 | 0.0000617 | 0.0000982 | 0.0171240 | 0.0266267 | |
| 883 | 0 | 0 | 0.0006653 | 0.0007318 | 0.0081053 | 0.0114626 | 2404 | 0.0000290 | 0.0000502 | 0 | 0 | 0.0115276 | 0.0126975 | |
| 884 | 0.1471682 | 0.0265647 | 0.8447619 | 0.5041407 | 0.1743315 | 0.0855773 | 2405 | 0.0000808 | 0.0001062 | 0.0005378 | 0.0004179 | 0.0230528 | 0.0300230 | |
| 885 | 0.3405239 | 0.0299151 | 0.7719486 | 0.1378584 | 0.8731001 | 0.5486238 | 2406 | 0.0004150 | 0.0002084 | 0.0019011 | 0.0010834 | 0.0286834 | 0.0200736 | |
| 886 | 0 | 0 | 0.0297735 | 0.0188636 | 0.0172826 | 0.0244413 | 2407 | 0.0000633 | 0.0000795 | 0.0002401 | 0.0003982 | 0.0156599 | 0.0271237 | |
| 887 | 0.0005097 | 0.0001121 | 0.0525930 | 0.0028278 | 0.0245058 | 0.0101067 | 2408 | 0.0000008 | 0.0000013 | 0.0000308 | 0.0000533 | 0.0154035 | 0.0187811 | |
| 888 | 0.6701495 | 0.0515567 | 1.9449049 | 0.2521632 | 0.9352117 | 0.5374151 | 2409 | 0.0001470 | 0.0001444 | 0.0001521 | 0.0002124 | 0.0043633 | 0.0075575 | |
| 889 | 0.1810806 | 0.0314987 | 1.5172920 | 0.8654131 | 0.3970724 | 0.1851990 | 2410 | 0.0000418 | 0.0000724 | 0 | 0 | 0.0062371 | 0.0108029 | |
| 890 | 0.3447856 | 0.0505007 | 1.8853924 | 0.8906931 | 0.7494377 | 0.3206252 | 2411 | 0.0000079 | 0.0000137 | 0.0000702 | 0.0001216 | 0.0231969 | 0.0181655 | |
| 891 | 0.0724515 | 0.0126193 | 0.6700226 | 0.1397345 | 0.1446928 | 0.0570936 | 2412 | 0.0018637 | 0.0008886 | 0.0077165 | 0.0072801 | 0.0198271 | 0.0250936 | |
| 892 | 0.0379877 | 0.0036213 | 0.8171244 | 0.0765814 | 0.0325425 | 0.0328970 | 2413 | 0.0001176 | 0.0001359 | 0.0000570 | 0.0000988 | 0.0190535 | 0.0169496 | |
| 893 | 0.3692303 | 0.0514058 | 0.9796081 | 0.4186800 | 0.4391435 | 0.2079283 | 2414 | 0.0004522 | 0.0002097 | 0.0017917 | 0.0009329 | 0.0089378 | 0.0154807 | |
| 894 | 0.0603598 | 0.0117061 | 0.7392029 | 0.3535570 | 0.1763967 | 0.0082283 | 2415 | 0.0002131 | 0.0001698 | 0.0017803 | 0.0008653 | 0.0286410 | 0.0376777 | |
| 896 | 0.0083643 | 0.0012224 | 0.0391071 | 0.0218916 | 0.0193974 | 0.0072531 | 2416 | 0.0000151 | 0.0000261 | 0 | 0 | 0.0082792 | 0.0090876 | |

【表２８－２６】

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 897 | 0.0006869 | 0.0003309 | 0.0063547 | 0.0029412 | 0.0067844 | 0.0095946 | 2417 | 0.0000851 | 0.0001000 | 0.0000219 | 0.0000380 | 0.0078826 | 0.0120449 |
| 898 | 0.2772595 | 0.0219299 | 1.5919484 | 0.8611955 | 0.4166101 | 0.2671627 | 2418 | 0.0000343 | 0.0000593 | 0 | 0 | 0.0189176 | 0.0324836 |
| 899 | 0.2913919 | 0.0373450 | 1.3019666 | 0.5970651 | 0.4185023 | 0.2447737 | 2419 | 0.0000211 | 0.0000365 | 0.0001623 | 0.0002811 | 0.0330007 | 0.0356849 |
| 900 | 0.3165235 | 0.0365368 | 0.9789776 | 0.1366711 | 0.4185444 | 0.1359086 | 2420 | 0.0001786 | 0.0001258 | 0.0005457 | 0.0000992 | 0.0068405 | 0.0118481 |
| 901 | 0.0046324 | 0.0006306 | 0.0431558 | 0.0058195 | 0 | 0 | 2421 | 0.0015820 | 0.0004557 | 0.0042165 | 0.0010059 | 0.0293700 | 0.0508703 |
| 902 | 0.3415284 | 0.0345199 | 1.4948809 | 0.8405054 | 0.4503790 | 0.0824256 | 2422 | 0.4629697 | 0.0532369 | 1.2102562 | 0.5085150 | 0.0178661 | 0.0219615 |
| 903 | 0.3581634 | 0.0661577 | 1.9131594 | 0.8306942 | 0.4517932 | 0.1822115 | 2423 | 0.0000474 | 0.0000822 | 0.0001736 | 0.0001749 | 0.0096052 | 0.0085921 |
| 904 | 0.1597305 | 0.0065779 | 1.2358426 | 0.6820194 | 0.2956965 | 0.1569389 | 2424 | 0.0000154 | 0.0000267 | 0 | 0 | 0.0110877 | 0.0192045 |
| 905 | 0.1273941 | 0.0116015 | 0.9930522 | 0.4942538 | 0.3821762 | 0.1059796 | 2425 | 0.0000972 | 0.0000864 | 0.0001715 | 0.0002518 | 0.0099207 | 0.0130670 |
| 906 | 0.2842960 | 0.0135621 | 1.6776734 | 0.9384457 | 0.3983205 | 0.0665316 | 2426 | 0.0024164 | 0.0020012 | 0.0077438 | 0.0011343 | 0.0073407 | 0.0059171 |
| 907 | 0.3310415 | 0.0649510 | 1.4555994 | 0.4935093 | 0.6619310 | 0.1675899 | 2427 | 0.0000527 | 0.0000913 | 0 | 0 | 0.0181782 | 0.0298907 |
| 908 | 0.0274063 | 0.0047282 | 0.5301644 | 0.2053931 | 0.0913604 | 0.0415588 | 2428 | 0.0000610 | 0.0001056 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 909 | 0.1535525 | 0.0134974 | 0.3888339 | 0.1828495 | 0.0714316 | 0.0087958 | 2430 | 0.0001578 | 0.0001588 | 0.0000513 | 0.0000889 | 0.0016807 | 0.0029111 |
| 910 | 0.2630031 | 0.0483506 | 0.9817207 | 0.2667945 | 0.4508670 | 0.1025349 | 2431 | 0.0006029 | 0.0002171 | 0.0016966 | 0.0010656 | 0.0079158 | 0.0121720 |
| 911 | 0.2099171 | 0.0153248 | 0.8311129 | 0.2458102 | 0.4376597 | 0.0856623 | 2432 | 0.0000907 | 0.0000998 | 0.0009379 | 0.0013748 | 0.0264585 | 0.0439809 |
| 912 | 0.1707705 | 0.0226077 | 1.0383092 | 0.5006838 | 0.4164817 | 0.0000013 | 2433 | 0.0000053 | 0.0000091 | 0 | 0 | 0.0249975 | 0.0330890 |
| 913 | 0.4818175 | 0.0763338 | 2.0425324 | 0.7069156 | 0.5174682 | 0.0203474 | 2434 | 0.0006593 | 0.0004652 | 0.0011697 | 0.0007883 | 0.0106568 | 0.0167051 |
| 914 | 0.3925773 | 0.0368836 | 2.1973784 | 1.1167067 | 0.4285404 | 0.0027365 | 2435 | 0.4716492 | 0.2748773 | 0.9743552 | 0.1308426 | 0.0159458 | 0.0059171 |
| 915 | 0.1580614 | 0.0219703 | 1.2239193 | 0.4368052 | 0.2181235 | 0.0572156 | 2436 | 0.0003907 | 0.0002509 | 0.0004956 | 0.0008585 | 0.0044278 | 0.0062842 |
| 916 | 0.2819465 | 0.0181551 | 1.2790595 | 0.4065963 | 0.3671746 | 0.1168482 | 2437 | 0.0001059 | 0.0001010 | 0.0000513 | 0.0000889 | 0.0017583 | 0.0030454 |
| 917 | 0.6300580 | 0.0761798 | 1.4802635 | 0.5112224 | 0.6386307 | 0.1719433 | 2438 | 0.0000392 | 0.0000678 | 0.0002532 | 0.0002251 | 0.0187189 | 0.0311728 |
| 918 | 0.2784590 | 0.0315574 | 1.1952363 | 0.4718813 | 0.4702428 | 0.0413233 | 2439 | 0.0001011 | 0.0001517 | 0.0002585 | 0.0002856 | 0.0197622 | 0.0189525 |
| 919 | 0.4074454 | 0.0518436 | 1.4496065 | 0.2281196 | 0.6517923 | 0.2094878 | 2441 | 0 | 0 | 0.0001435 | 0.0002486 | 0.0176274 | 0.0305315 |
| 920 | 0.1690367 | 0.0144909 | 1.6888264 | 0.7808953 | 0.4628982 | 0.0006877 | 2442 | 0.0000181 | 0.0000313 | 0 | 0 | 0.0195369 | 0.0203316 |
| 921 | 0.1818878 | 0.0454716 | 1.5778334 | 0.7750634 | 0.4272560 | 0.1057797 | 2443 | 0.0000588 | 0.0000612 | 0.0002585 | 0.0002856 | 0.0124670 | 0.0123245 |
| 922 | 3.4140434 | 1.3723771 | 1.8529707 | 0.1527104 | 0.2157329 | 0.0223705 | 2444 | 0.0004441 | 0.0003325 | 0.0005748 | 0.0005030 | 0.0070469 | 0.0122056 |
| 923 | 0.3010908 | 0.0348821 | 1.4421522 | 0.7909056 | 0.3973307 | 0.1886032 | 2445 | 0.0004625 | 0.0002609 | 0.0006074 | 0.0005756 | 0.0153236 | 0.0132830 |
| 924 | 0.2748877 | 0.0585666 | 1.2109233 | 0.8169687 | 0.3842675 | 0.2276269 | 2446 | 0.0000309 | 0.0000535 | 0 | 0 | 0.0094318 | 0.0163364 |
| 925 | 0.1864681 | 0.0101874 | 0.7570132 | 0.1091631 | 0.2901999 | 0.0538680 | 2447 | 0.0000828 | 0.0001435 | 0.0002332 | 0.0004039 | 0.0049785 | 0.0086231 |
| 926 | 0.0037685 | 0.0008215 | 0.0150461 | 0.0064566 | 0.0233662 | 0.0135724 | 2448 | 0.0001095 | 0.0001550 | 0.0001214 | 0.0001600 | 0.0153819 | 0.0118478 |
| 927 | 0.4318845 | 0.0615468 | 1.4340856 | 0.4518837 | 0.9367170 | 0.3614953 | 2449 | 0 | 0 | 0.0001166 | 0.0002020 | 0.0164362 | 0.0284683 |
| 928 | 0.1824124 | 0.0401845 | 1.2008483 | 0.4579460 | 0.4094542 | 0.0489591 | 2450 | 0.0000109 | 0.0000189 | 0.0000044 | 0.0000076 | 0.0403978 | 0.0301711 |
| 929 | 0.0824791 | 0.0123042 | 0.8983709 | 0.4006846 | 0.1593716 | 0.0610960 | 2451 | 0.0000380 | 0.0000659 | 0.0002281 | 0.0003951 | 0.0188403 | 0.0190268 |
| 930 | 0.0027554 | 0.0002163 | 0.0492230 | 0.0256099 | 0.0105156 | 0.0033703 | 2452 | 0.0000309 | 0.0000535 | 0 | 0 | 0.0170814 | 0.0184129 |
| 931 | 0.0258376 | 0.0026976 | 0.0859250 | 0.0181125 | 0.0419612 | 0.0240098 | 2453 | 0.0000264 | 0.0000456 | 0 | 0 | 0.0155130 | 0.0181149 |

【表２８－２７】

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 932 | 0.4261512 | 0.0597224 | 1.2344997 | 0.2533501 | 0.8443599 | 0.4198049 | 2454 | 0.0000309 | 0.0000535 | 0 | 0 | 0.0081001 | 0.0089751 |
| 933 | 0.0110432 | 0.0012226 | 0.0283163 | 0.0015801 | 0.0091021 | 0.0017826 | 2455 | 0.0004458 | 0.0001741 | 0.0004292 | 0.0005577 | 0.0137039 | 0.0129794 |
| 934 | 0.6356982 | 0.1052789 | 1.2943090 | 0.3262727 | 0.9370015 | 0.3367836 | 2456 | 0.0010893 | 0.0002542 | 0.0019674 | 0.0004871 | 0.0063063 | 0.0097580 |
| 935 | 0.2498322 | 0.0386567 | 1.4300480 | 0.2125065 | 0.2385670 | 0.1018381 | 2457 | 0.0000546 | 0.0000946 | 0.0009667 | 0.0010910 | 0.0175801 | 0.0218962 |
| 936 | 0.1589528 | 0.0204370 | 1.1575313 | 0.6229310 | 0.2395571 | 0.0500690 | 2458 | 0.0140069 | 0.0014663 | 0.0702549 | 0.0088082 | 0.0030657 | 0.0053099 |
| 937 | 0.1441376 | 0.0142619 | 0.9786933 | 0.4331392 | 0.4321309 | 0.0716816 | 2460 | 0.0000226 | 0.0000391 | 0.0002018 | 0.0003495 | 0.0228606 | 0.0395957 |
| 938 | 0.2031241 | 0.0360895 | 1.0244028 | 0.4257385 | 0.4847764 | 0.1396722 | 2461 | 0.0000196 | 0.0000339 | 0.0004079 | 0.0007065 | 0.0121956 | 0.0150149 |
| 939 | 0.2112971 | 0.0255222 | 1.1829352 | 0.3675039 | 0.4285740 | 0.1526786 | 2462 | 0.0000331 | 0.0000574 | 0 | 0 | 0.0181868 | 0.0315005 |
| 940 | 0.0000765 | 0.0000688 | 0.0002997 | 0.0005191 | 0 | 0 | 2463 | 0.0000463 | 0.0000802 | 0.0000395 | 0.0000684 | 0.0180510 | 0.0227591 |
| 941 | 0.0050931 | 0.0005404 | 0.0500171 | 0.0193957 | 0.0169418 | 0.0131972 | 2464 | 0.0010061 | 0.0003695 | 0.0020544 | 0.0005009 | 0.0139817 | 0.0187103 |
| 942 | 0.1707588 | 0.0347992 | 0.7577469 | 0.1661540 | 0.9911682 | 0.3958148 | 2465 | 0.8671411 | 0.1827097 | 1.4054673 | 0.4605879 | 0.0046702 | 0.0080891 |
| 943 | 0.1762501 | 0.0206980 | 1.1534182 | 0.1675703 | 0.2594093 | 0.0331581 | 2466 | 0.0000128 | 0.0000222 | 0.0004448 | 0.0004015 | 0.0094850 | 0.0164285 |
| 944 | 0.0797240 | 0.0115462 | 0.4673871 | 0.0286095 | 0.5673771 | 0.1827626 | 2467 | 0.0000015 | 0.0000026 | 0 | 0 | 0.0080401 | 0.0125165 |
| 945 | 0.5814933 | 0.2277992 | 1.4071678 | 0.0587717 | 0.1158668 | 0.0319320 | 2468 | 0.0000124 | 0.0000215 | 0 | 0 | 0.0248461 | 0.0227765 |
| 946 | 0.2207690 | 0.0228089 | 1.1220992 | 0.6406516 | 0.3933063 | 0.0971148 | 2469 | 0.0000267 | 0.0000463 | 0 | 0 | 0.0088776 | 0.0153764 |
| 947 | 0.2532843 | 0.0359496 | 1.1421549 | 0.6383162 | 0.3378375 | 0.1000830 | 2470 | 0.0000090 | 0.0000157 | 0.0002325 | 0.0004027 | 0.0166755 | 0.0239491 |
| 948 | 0.1589921 | 0.0295189 | 0.6746642 | 0.3623457 | 0.2354148 | 0.0496478 | 2471 | 0.0001008 | 0.0000876 | 0.0002057 | 0.0003129 | 0.0294545 | 0.0270056 |
| 949 | 0.1821871 | 0.0042268 | 0.8203615 | 0.0512430 | 0.3032757 | 0.1342002 | 2472 | 0.0002369 | 0.0001597 | 0.0001930 | 0.0003343 | 0.0344328 | 0.0236281 |
| 950 | 0.2247875 | 0.0328869 | 1.0892295 | 0.5388531 | 0.7602569 | 0.2431375 | 2473 | 0.0010394 | 0.0002925 | 0.0015950 | 0.0011146 | 0.0297150 | 0.0158162 |
| 951 | 0.3842484 | 0.0502364 | 0.9465582 | 0.2979981 | 0.3750030 | 0.0951033 | 2474 | 0.0000023 | 0.0000039 | 0.0012767 | 0.0011881 | 0.0027011 | 0.0023437 |
| 952 | 0.0426259 | 0.0052491 | 0.3810325 | 0.0950710 | 0.2005218 | 0.0317585 | 2475 | 0.0000090 | 0.0000157 | 0 | 0 | 0.0130615 | 0.0226231 |
| 953 | 0.1372913 | 0.0134926 | 0.9704767 | 0.4087998 | 0.9839774 | 0.3303922 | 2476 | 0 | 0 | 0.0000746 | 0.0001292 | 0.0164469 | 0.0284869 |
| 954 | 0.1628276 | 0.0082633 | 0.9397548 | 0.3598247 | 0.5743305 | 0.0731047 | 2477 | 0.0000215 | 0.0000372 | 0.0002258 | 0.0003910 | 0.0091878 | 0.0159138 |
| 955 | 0.2563646 | 0.0260857 | 0.7605425 | 0.4871772 | 0.4585377 | 0.1027742 | 2478 | 0.0000395 | 0.0000685 | 0.0000307 | 0.0000532 | 0.0049887 | 0.0086407 |
| 956 | 0.2391771 | 0.0297105 | 0.9831789 | 0.0349722 | 0.0722747 | 0.0026507 | 2479 | 0.0000712 | 0.0001233 | 0 | 0 | 0.0011877 | 0.0020571 |
| 957 | 0.1397804 | 0.0116432 | 0.6869359 | 0.3153661 | 0.5133568 | 0.2382439 | 2480 | 0.0004132 | 0.0002028 | 0.0000650 | 0.0001126 | 0.0088872 | 0.0096885 |
| 958 | 0.1947139 | 0.0169748 | 0.9808479 | 0.4604095 | 0.7694269 | 0.2929716 | 2481 | 0.0001443 | 0.0001764 | 0.0002855 | 0.0003294 | 0.0097355 | 0.0107007 |
| 959 | 0.7510216 | 0.0472336 | 1.8921317 | 0.4948369 | 3.3708277 | 0.7470173 | 2482 | 0.0000060 | 0.0000104 | 0.0004219 | 0.0005245 | 0.0155246 | 0.0151434 |
| 960 | 0.7075363 | 0.2570171 | 1.2355977 | 0.0791769 | 0.4463361 | 0.0599540 | 2483 | 0.0000060 | 0.0000104 | 0.0001345 | 0.0002330 | 0.0126157 | 0.0218510 |
| 961 | 0.1433127 | 0.0156736 | 1.2961013 | 0.6559879 | 0.6034332 | 0.1666298 | 2484 | 0.0000181 | 0.0000313 | 0.0000044 | 0.0000076 | 0.0050183 | 0.0086919 |
| 962 | 0.1982254 | 0.0237106 | 1.5728354 | 0.9510842 | 0.3597792 | 0.1431926 | 2485 | 0.0000203 | 0.0000352 | 0 | 0 | 0.0200409 | 0.0151332 |
| 963 | 0.0141388 | 0.0020483 | 0.1580591 | 0.0941857 | 0.0683269 | 0.0374093 | 2486 | 0.0002769 | 0.0002262 | 0.0008917 | 0.0006494 | 0.0138142 | 0.0038071 |
| 964 | 0.4837021 | 0.0541549 | 1.8192377 | 0.6267415 | 0.8082392 | 0.0450020 | 2487 | 0.0000727 | 0.0001259 | 0.0001060 | 0.0001837 | 0.0036610 | 0.0063410 |
| 965 | 0.2387303 | 0.0121959 | 0.8356915 | 0.1956378 | 0.5967066 | 0.1931533 | 2488 | 0.0002756 | 0.0001763 | 0.0001929 | 0.0003340 | 0.0136485 | 0.0157927 |
| 966 | 0.5428558 | 0.0390375 | 1.0942961 | 0.4029519 | 0.5553491 | 0.1000158 | 2489 | 0.0009930 | 0.0001160 | 0.0008863 | 0.0003444 | 0.0081293 | 0.0074553 |

【表２８－２８】

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 967 | 0.3790396 | 0.0812215 | 1.4938162 | 0.7163500 | 0.5532541 | 0.2473251 | 2490 | 0 | 0 | 0.0005370 | 0.0004653 | 0.0175117 | 0.0222877 |
| 968 | 0.0706122 | 0.0088025 | 0.3400911 | ND | 0.5158618 | 0.0821811 | 2491 | 0 | 0 | 0.0002198 | 0.0003806 | 0.0187575 | 0.0324890 |
| 969 | 0.1768472 | 0.0210385 | 1.2345580 | 0.7968995 | 0.5353495 | 0.1503010 | 2492 | 0.0000147 | 0.0000254 | 0.0000090 | 0.0000155 | 0.0199752 | 0.0286311 |
| 970 | 0.1561197 | 0.0018095 | 0.7236427 | 0.3813770 | 1.1850391 | 0.3323564 | 2493 | 0.0000757 | 0.0000923 | 0.0001228 | 0.0002127 | 0.0373233 | 0.0394017 |
| 971 | 0.0495618 | 0.0099058 | 0.7923464 | 0.4444232 | 0.1766061 | 0.0256643 | 2494 | 0.0000282 | 0.0000489 | 0.0002153 | 0.0003729 | 0.0092665 | 0.0160500 |
| 972 | 0.0801790 | 0.0046517 | 0.7126026 | 0.4626978 | 0.3463313 | 0.1135727 | 2495 | 0.0001204 | 0.0002086 | 0.0000214 | 0.0000371 | 0.0021804 | 0.0037766 |
| 973 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0050507 | 0.0087481 | 2496 | 0.0034616 | 0.0003094 | 0.0042888 | 0.0015338 | 0.0110503 | 0.0108850 |
| 974 | 0.4648077 | 0.0617351 | 1.6023297 | 0.3822333 | 0.9636032 | 0.0952493 | 2497 | 0.0004800 | 0.0008314 | 0.0043656 | 0.0011573 | 0.0241278 | 0.0417905 |
| 975 | 0.5022281 | 0.0418114 | 1.6143303 | 0.4246182 | 0.7073563 | 0.1249687 | 2498 | 0.0000023 | 0.0000039 | 0.0016814 | 0.0015527 | 0.0454715 | 0.0232620 |
| 976 | 0.4745932 | 0.0666697 | 1.6014528 | 0.4425514 | 0.4964049 | 0.1480459 | 2499 | 0 | 0 | 0.0001516 | 0.0002450 | 0.0463109 | 0.0372785 |
| 977 | 0.4443138 | 0.0610076 | 1.2318357 | 0.3640334 | 0.8575415 | 0.4154052 | 2500 | 0 | 0 | 0.0001708 | 0.0001718 | 0.0347270 | 0.0427746 |
| 978 | 0.0482658 | 0.0044037 | 1.2285972 | 0.2759839 | 0.0986519 | 0.0264638 | 2501 | 0.0000027 | 0.0000047 | 0.0003106 | 0.0002823 | 0.0393132 | 0.0314475 |
| 979 | 0.3766846 | 0.0650270 | 1.0975079 | 0.0573909 | 0.2938823 | 0.0088981 | 2502 | 0 | 0 | 0.0005681 | 0.0004984 | 0.0401929 | 0.0479934 |
| 980 | 0.6512222 | 0.0399235 | 2.3660137 | 0.5200565 | 0.9380213 | 0.1274103 | 2503 | 0.0000022 | 0.0000038 | 0.0007638 | 0.0006476 | 0.0065783 | 0.0099198 |
| 981 | 0.6832500 | 0.0677885 | 1.2626195 | 0.1789951 | 0.8534637 | 0.3821545 | 2504 | 0 | 0 | 0.0001767 | 0.0003061 | 0.0481277 | 0.0498081 |
| 982 | 0.4686204 | 0.0797793 | 1.6613887 | 0.3272631 | 0.8240170 | 0.0851889 | 2505 | 0 | 0 | 0.0010517 | 0.0001619 | 0.0257277 | 0.0229711 |
| 983 | 0.6444064 | 0.0615861 | 4.7136366 | 1.8858685 | 0.6204121 | 0.0881507 | 2507 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0181483 | 0.0314338 |
| 984 | 0.6035169 | 0.0456524 | 2.8609727 | 0.7759316 | 0.3347954 | 0.0225893 | 2508 | 0 | 0 | 0.0006058 | 0.0005249 | 0.0028098 | 0.0048667 |
| 985 | 0.2298669 | 0.0250994 | 1.8351535 | 0.7207521 | 0.3028478 | 0.1390108 | 2509 | 0 | 0 | 0.0000430 | 0.0000745 | 0.0244693 | 0.0394982 |
| 986 | 0.0885746 | 0.0111582 | 1.1222052 | 0.2922987 | 0.1102654 | 0.0201112 | 2510 | 0 | 0 | 0.0000939 | 0.0001626 | 0.0151162 | 0.0103352 |
| 987 | 0.4448471 | 0.0961480 | 2.4052220 | 0.7897207 | 0.3001425 | 0.0149617 | 2511 | 0 | 0 | 0.0003077 | 0.0002683 | 0.0268137 | 0.0241370 |
| 988 | 0.3620793 | 0.0306518 | 1.7950797 | 0.3963892 | 0.6838352 | 0.0851278 | 2512 | 0 | 0 | 0.0003471 | 0.0003303 | 0.0099326 | 0.0100944 |
| 989 | 0.7336602 | 0.0656895 | 1.8895962 | 0.5801506 | 0.4433509 | 0.1542402 | 2513 | 0 | 0 | 0.0007528 | 0.0002937 | 0.0005421 | 0.0009389 |
| 990 | 0.2206460 | 0.0207349 | 1.1269792 | 0.1234185 | 0.3064968 | 0.0280448 | 2514 | 0 | 0 | 0.0004705 | 0.0004653 | 0.0346187 | 0.0159088 |
| 991 | 0.7321813 | 0.2261107 | 1.1197010 | 0.1415824 | 0.3816279 | 0.0455450 | 2515 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0125791 | 0.0173599 |
| 992 | 0.2468605 | 0.0318213 | 1.6098180 | 0.4560422 | 0.2976428 | 0.0702950 | 2516 | 0 | 0 | 0.0000367 | 0.0000635 | 0.0111075 | 0.0096380 |
| 993 | 0.1930123 | 0.0250841 | 1.6355141 | 0.4455041 | 0.4239337 | 0.1633884 | 2517 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0398867 | 0.0189180 |
| 994 | 0.3227000 | 0.0448070 | 1.9845746 | 0.5742763 | 0.7638368 | 0.1029197 | 2518 | 0 | 0 | 0.0001452 | 0.0002017 | 0.0180508 | 0.0255881 |
| 995 | 0.5439462 | 0.0350653 | 3.2587217 | 1.1629884 | 0.3397365 | 0.0826466 | 2519 | 0 | 0 | 0.0001958 | 0.0001937 | 0.0327121 | 0.0256413 |
| 996 | 0.4012845 | 0.0094747 | 3.4555925 | 1.0405762 | 0.2797507 | 0.0800871 | 2520 | 0.0000036 | 0.0000062 | 0.0000497 | 0.0000259 | 0.0148701 | 0.0078434 |
| 997 | 0.9199176 | 0.0245175 | 2.7504221 | 0.8898482 | 0.4264102 | 0.0885026 | 2521 | 0.0000054 | 0.0000094 | 0.0004766 | 0.0004235 | 0.0281383 | 0.0369604 |
| 998 | 0.3115842 | 0.0225580 | 2.0882653 | 0.2692482 | 0.4404398 | 0.0421094 | 2522 | 0 | 0 | 0.0004265 | 0.0003973 | 0.0050323 | 0.0087162 |
| 999 | 0.3461858 | 0.0750906 | 2.3725175 | 0.7501325 | 0.5564268 | 0.1780061 | 2523 | 0 | 0 | 0.0001252 | 0.0002168 | 0.0141808 | 0.0245619 |
| 1000 | 0.1916241 | 0.0130987 | 2.5632311 | 0.9965968 | 0.1741114 | 0.1562101 | 2524 | 0 | 0 | 0.0003002 | 0.0003473 | 0.0156035 | 0.0247350 |
| 1001 | 0.0913438 | 0.0114911 | 1.5925617 | 0.5180450 | 0.2490311 | 0.0131636 | 2525 | 0 | 0 | 0.0000446 | 0.0000471 | 0.0377274 | 0.0267513 |

【表２８－２９】

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1002 | 0.3320653 | 0.0282104 | 3.2287735 | 1.0691863 | 0.5219928 | 0.0856587 | 2526 | 0.0005188 | 0.0002145 | 0.0042874 | 0.0047851 | 0 | 0 |
| 1003 | 0.2937735 | 0.0465016 | 2.8841946 | 0.9888222 | 0.1100175 | 0.0358807 | 2527 | 0 | 0 | 0.0003169 | 0.0003427 | 0.0065381 | 0.0080477 |
| 1004 | 0.4284362 | 0.0485965 | 3.2928069 | 1.0842744 | 0.2933541 | 0.0909486 | 2528 | 0.0003581 | 0.0001168 | 0.0012516 | 0.0005524 | 0.0140771 | 0.0243823 |
| 1005 | 0.6654203 | 0.0529148 | 2.6638717 | 0.4743255 | 0.2145549 | 0.0914813 | 2529 | 0 | 0 | 0.0005605 | 0.0003408 | 0.0438649 | 0.0455055 |
| 1006 | 0.6183605 | 0.1545205 | 1.7937229 | 0.4412440 | 1.0379123 | 0.1212749 | 2531 | 0 | 0 | 0.0006495 | 0.0007104 | 0.0098125 | 0.0169958 |
| 1007 | 0.4016958 | 0.0833568 | 2.7946628 | 1.0382498 | 0.2372135 | 0.0427654 | 2532 | 0 | 0 | 0.0003705 | 0.0004166 | 0.0248696 | 0.0228739 |
| 1008 | 0.1124653 | 0.0022288 | 1.5666353 | 0.4977335 | 0.2293820 | 0.0266877 | 2533 | 0.0000102 | 0.0000177 | 0.0000821 | 0.0001423 | 0.0134888 | 0.0168423 |
| 1009 | 0.2553805 | 0.0346376 | 2.8272442 | 0.8509960 | 0.2016688 | 0.0636371 | 2534 | 0 | 0 | 0.0001430 | 0.0002222 | 0.0091564 | 0.0158594 |
| 1010 | 0.2321996 | 0.0193690 | 3.0148998 | 1.1917316 | 0.2884946 | 0.0549803 | 2535 | 0 | 0 | 0.0001412 | 0.0002246 | 0.0064919 | 0.0112443 |
| 1011 | 0.3105702 | 0.0401141 | 2.4126682 | 0.9863188 | 0.2749424 | 0.0583164 | 2536 | 0.0000102 | 0.0000177 | 0.0002234 | 0.0003870 | 0.0346411 | 0.0385875 |
| 1012 | 0.3576421 | 0.0273906 | 3.2592381 | 1.1636162 | 0.1675611 | 0.0259508 | 2537 | 0 | 0 | 0.0003247 | 0.0005623 | 0.0089016 | 0.0154180 |
| 1013 | 0.0282793 | 0.0053718 | 0.3860625 | 0.0667090 | 0.0093589 | 0.0083046 | 2538 | 0 | 0 | 0.0001598 | 0.0002682 | 0.0231920 | 0.0115526 |
| 1014 | 0.6154703 | 0.1335214 | 2.5793819 | 0.7025958 | 0.6823378 | 0.1148810 | 2539 | 0 | 0 | 0.0006327 | 0.0006718 | 0.0225253 | 0.0225918 |
| 1015 | 0.5805739 | 0.1421629 | 3.9821937 | 1.1180395 | 0.1200136 | 0.1099847 | 2540 | 0 | 0 | 0.0001525 | 0.0001728 | 0.0320515 | 0.0105721 |
| 1016 | 0.2655796 | 0.0480711 | 2.3666670 | 0.7354405 | 0.3094432 | 0.0770517 | 2541 | 0 | 0 | 0.0003364 | 0.0005826 | 0.0128677 | 0.0151238 |
| 1017 | 0.3975912 | 0.0780187 | 5.5430680 | 2.3981839 | 0.1777474 | 0.0317408 | 2542 | 0.0000049 | 0.0000085 | 0.0001425 | 0.0001566 | 0.0173082 | 0.0156016 |
| 1018 | 0.2133119 | 0.0344361 | 2.1373706 | 0.8353797 | 0.6015538 | 0.0852876 | 2543 | 0 | 0 | 0.0001173 | 0.0002032 | 0.0190309 | 0.0329625 |
| 1019 | 0.2816383 | 0.0431206 | 2.3643366 | 0.7133617 | 0.2010870 | 0.0151854 | 2544 | 0 | 0 | 0.0002866 | 0.0004537 | 0.0236824 | 0.0343698 |
| 1020 | 0.5005328 | 0.0392953 | 2.7635348 | 0.8702750 | 0.2587552 | 0.0398398 | 2545 | 0 | 0 | 0.0002933 | 0.0001212 | 0.0115179 | 0.0199497 |
| 1021 | 0.3227466 | 0.0045727 | 1.7403751 | 0.3968804 | 0.1741921 | 0.0387886 | 2546 | 0.0000014 | 0.0000023 | 0.0002681 | 0.0002010 | 0.0233264 | 0.0202530 |
| 1022 | 0.0044029 | 0.0007796 | 0.0203444 | 0.0048221 | 0.0125449 | 0.0058818 | 2547 | 0 | 0 | 0.0006390 | 0.0007514 | 0.0134342 | 0.0199401 |
| 1023 | 0.6146241 | 0.0586666 | 5.2370269 | 1.8410277 | 0.2792734 | 0.0447332 | 2548 | 0.0000182 | 0.0000315 | 0.0000500 | 0.0000866 | 0.0133481 | 0.0231195 |
| 1024 | 0.1829192 | 0.0464650 | 1.7342673 | 0.7808295 | 0.1334512 | 0.0244825 | 2549 | 0.0000568 | 0.0000482 | 0.0009403 | 0.0005551 | 0.0153229 | 0.0165661 |
| 1025 | 0.2513094 | 0.0438291 | 2.1660512 | 0.8058713 | 0.1561293 | 0.1527949 | 2550 | 0.0000111 | 0.0000192 | 0.0004650 | 0.0002759 | 0.0364059 | 0.0630569 |
| 1026 | 0.2663048 | 0.0462276 | 3.5640821 | 1.0804324 | 0.1694833 | 0.0162749 | 2551 | 0 | 0 | 0.0001220 | 0.0001059 | 0.0107678 | 0.0186504 |
| 1027 | 0.3381513 | 0.0660641 | 3.0599222 | 1.0994546 | 0.2056052 | 0.0789369 | 2552 | 0.0000084 | 0.0000146 | 0 | 0 | 0.0022227 | 0.0038499 |
| 1028 | 0.2591176 | 0.0413577 | 1.6370353 | 0.6875387 | 0.2565559 | 0.0270655 | 2553 | 0 | 0 | 0.0002681 | 0.0003064 | 0.0001355 | 0.0002347 |
| 1029 | 0.7604396 | 0.0360374 | 2.3016668 | 0.9417868 | 0.0945734 | 0.0211611 | 2555 | 0 | 0 | 0.0007981 | 0.0006928 | 0.0234921 | 0.0406895 |
| 1030 | 0.7663837 | 0.0871229 | 2.9962144 | 0.6942432 | 0.8881196 | 0.0898256 | 2556 | 0 | 0 | 0.0003915 | 0.0003873 | 0.0373854 | 0.0411042 |
| 1031 | 0.4968801 | 0.0908441 | 3.8776909 | 1.2322863 | 0.5966595 | 0.1211817 | 2557 | 0 | 0 | 0.0002811 | 0.0004782 | 0.0154708 | 0.0267962 |
| 1032 | 0.1405369 | 0.0014311 | 1.9161251 | 0.7256935 | 0.3953427 | 0.1289551 | 2559 | 0 | 0 | 0.0000856 | 0.0001483 | 0.0115534 | 0.0117564 |
| 1033 | 0.0914987 | 0.0040993 | 1.5537728 | 0.6238801 | 0.0762093 | 0.0134750 | 2560 | 0.0000191 | 0.0000331 | 0.0000430 | 0.0000745 | 0.0240630 | 0.0186623 |
| 1034 | 0.0035287 | 0.0001655 | 0.0505029 | 0.0126350 | 0.0153523 | 0.0146533 | 2561 | 0.0000258 | 0.0000446 | 0.0004733 | 0.0008198 | 0.0206600 | 0.0204580 |
| 1035 | 0.3244569 | 0.0594476 | 2.6895159 | 0.9260824 | 0.1177796 | 0.0175839 | 2562 | 0 | 0 | 0.0008339 | 0.0005460 | 0.0204554 | 0.0216603 |
| 1036 | 0.2983793 | 0.0259069 | 1.6274596 | 0.3110478 | 0.1470460 | 0.0716671 | 2563 | 0 | 0 | 0.0001560 | 0.0001956 | 0.0252178 | 0.0218529 |

【表２８－３０】

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1037 | 0.5884341 | 0.0515044 | 2.4573769 | 0.9836418 | 0.0905974 | 0.0208873 | 2564 | 0 | 0 | 0.0004135 | 0.0007162 | 0.0215119 | 0.0238817 |
| 1038 | 1.1373624 | 0.4467507 | 1.2873383 | 0.1354214 | 0.1716609 | 0.0316672 | 2565 | 0.0000120 | 0.0000208 | 0 | 0 | 0.0101229 | 0.0124966 |
| 1039 | 0.3515206 | 0.0650118 | 2.9813130 | 0.7982888 | 0.4451893 | 0.1415361 | 2566 | 0 | 0 | 0.0002711 | 0.0002822 | 0.0073824 | 0.0127867 |
| 1040 | 0.1287296 | 0.0079571 | 1.9994204 | 0.7389460 | 0.2935465 | 0.0483662 | 2567 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0049444 | 0.0045555 |
| 1041 | 1.2766183 | 0.4934301 | 1.4137173 | 0.1398801 | 0.0542331 | 0.0215154 | 2568 | 0 | 0 | 0.0000634 | 0.0001097 | 0.0354964 | 0.0610771 |
| 1042 | 0.1842608 | 0.0257511 | 2.0851383 | 0.8852422 | 0.2528157 | 0.0098179 | 2569 | 0.0000032 | 0.0000055 | 0.0000067 | 0.0000116 | 0.0087506 | 0.0125512 |
| 1044 | 0.3376695 | 0.0049125 | 2.3488475 | 0.5329835 | 0.1777707 | 0.0337140 | 2570 | 0 | 0 | 0.0006210 | 0.0004918 | 0.0065163 | 0.0112866 |
| 1045 | 0.1967731 | 0.0103747 | 0.7796736 | 0.3218209 | 0.1180794 | 0.0352058 | 2571 | 0 | 0 | 0.0004114 | 0.0002791 | 0.0068344 | 0.0118375 |
| 1046 | 0.0806043 | 0.0130122 | 0.3433658 | 0.1101220 | 0.1141458 | 0.0251075 | 2572 | 0.0000050 | 0.0000086 | 0.0003154 | 0.0002745 | 0.0045069 | 0.0040430 |
| 1047 | 1.5430334 | 0.5303947 | 2.0682140 | 0.1815461 | 0.4316179 | 0.0491058 | 2573 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0382140 | 0.0331336 |
| 1048 | 0.0548027 | 0.0049219 | 0.6561182 | 0.2234613 | 0.1710983 | 0.0520207 | 2574 | 0 | 0 | 0.0000834 | 0.0001444 | 0.0015880 | 0.0027504 |
| 1049 | 0.0058536 | 0.0010429 | 0.0733477 | 0.0122953 | 0.0099518 | 0.0099451 | 2575 | 0.0000103 | 0.0000089 | 0.0001574 | 0.0001790 | 0.0116185 | 0.0201238 |
| 1051 | 0.2962024 | 0.0463655 | 2.1849029 | 0.5003702 | 0.1487739 | 0.0225584 | 2576 | 0.0000120 | 0.0000208 | 0.0002699 | 0.0004675 | 0.0143724 | 0.0248938 |
| 1053 | 0.0210922 | 0.0012715 | 0.1259172 | 0.0364452 | 0.0147066 | 0.0071216 | 2577 | 0 | 0 | 0.0001397 | 0.0001255 | 0.0046645 | 0.0080791 |
| 1054 | 1.0677698 | 0.1883711 | 3.5132858 | 0.9939637 | 0.0248735 | 0.0073520 | 2578 | 0.0000620 | 0.0000368 | 0.0007228 | 0.0003438 | 0.0175303 | 0.0158141 |
| 1055 | 0.4103479 | 0.0359980 | 2.3072606 | 0.5490504 | 0.8694600 | 0.0588763 | 2579 | 0 | 0 | 0.0003260 | 0.0004185 | 0.0246746 | 0.0325384 |
| 1056 | 0.3529162 | 0.0272824 | 2.1814617 | 0.6125236 | 0.6403482 | 0.1261943 | 2580 | 0 | 0 | 0.0003483 | 0.0004251 | 0.0110237 | 0.0190937 |
| 1057 | 0.3563346 | 0.0697054 | 1.5304946 | 0.0426846 | 0.1743806 | 0.0497241 | 2581 | 0 | 0 | 0.0002195 | 0.0003296 | 0.0070632 | 0.0122338 |
| 1058 | 0.5287895 | 0.0800595 | 3.2394743 | 1.0096479 | 0.7051688 | 0.2628245 | 2582 | 0 | 0 | 0.0002973 | 0.0005149 | 0.0311739 | 0.0303028 |
| 1059 | 0.2663074 | 0.0231763 | 1.5745259 | 0.4681559 | 0.4041289 | 0.0296362 | 2583 | 0 | 0 | 0.0001254 | 0.0001092 | 0.0210916 | 0.0130529 |
| 1060 | 0.4884822 | 0.0492452 | 3.1217433 | 0.7007232 | 0.4095314 | 0.1216496 | 2584 | 0.0000231 | 0.0000344 | 0.0003411 | 0.0000921 | 0.0144259 | 0.0249865 |
| 1061 | 0.5097986 | 0.0428906 | 2.6414709 | 0.6348626 | 0.5016146 | 0.0082216 | 2585 | 0.0007028 | 0.0001851 | 0.0012642 | 0.0009117 | 0.0308472 | 0.0287888 |
| 1062 | 0.7218343 | 0.0094383 | 1.8548848 | 0.1899919 | 0.4784562 | 0.0154915 | 2586 | 0.0010451 | 0.0000264 | 0.0019772 | 0.0012066 | 0.0146253 | 0.0094708 |
| 1063 | 0.6792214 | 0.0784664 | 1.9981087 | 0.5561860 | 1.1114104 | 0.2227874 | 2587 | 0 | 0 | 0.0007038 | 0.0004407 | 0.0135103 | 0.0234005 |
| 1064 | 0.4716220 | 0.0315095 | 1.8091633 | 0.5392496 | 0.6277769 | 0.0484979 | 2588 | 0 | 0 | 0.0004708 | 0.0004182 | 0 | 0 |
| 1065 | 0.5190791 | 0.0152362 | 2.2389796 | 0.5643734 | 0.9103826 | 0.1166170 | 2589 | 0.0000014 | 0.0000023 | 0.0003971 | 0.0005200 | 0 | 0 |
| 1066 | 0.7328844 | 0.0917938 | 3.4038959 | 1.2178188 | 0.8252291 | 0.4163924 | 2590 | 0 | 0 | 0.0007002 | 0.0001258 | 0.0045971 | 0.0079623 |
| 1067 | 0.4861320 | 0.0103844 | 1.8172401 | 0.4185287 | 0.7537927 | 0.2270304 | 2591 | 0 | 0 | 0.0005629 | 0.0004881 | 0.0116796 | 0.0104426 |
| 1068 | 1.2136380 | 0.1474860 | 3.8029137 | 0.9379813 | 0.3972197 | 0.1270576 | 2593 | 0.0000234 | 0.0000297 | 0.0009035 | 0.0007948 | 0.0058142 | 0.0100706 |
| 1069 | 0.6712734 | 0.0106924 | 2.5117429 | 0.4657026 | 0.5124918 | 0.0575214 | 2594 | 0.0015942 | 0.0000782 | 0.0028400 | 0.0006569 | 0.0251294 | 0.0428861 |
| 1071 | 0.2332450 | 0.0664013 | 0.5065804 | 0.2156580 | 0.0239843 | 0.0119804 | 2595 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0175935 | 0.0170420 |
| 1072 | 0.4602381 | 0.0998443 | 2.1366071 | 0.9452021 | 0.0361318 | 0.0040122 | 2596 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0025337 | 0.0041921 |
| 1073 | 0.2367053 | 0.0361671 | 1.3984621 | 0.1532048 | 0.0769001 | 0.0230866 | 2597 | 0 | 0 | 0.0001098 | 0.0000987 | 0.0057131 | 0.0087353 |
| 1074 | 0.2505167 | 0.0394853 | 0.9329074 | 0.5327273 | 0.0860104 | 0.0239809 | 2598 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0050057 | 0.0086701 |
| 1075 | 0.1464969 | 0.0532259 | 0.5718603 | 0.2991711 | 0.0255836 | 0.0102989 | 2599 | 0 | 0 | 0.0003276 | 0.0000625 | 0.0077367 | 0.0071424 |

【表２８－３１】

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1076 | 0.2381584 | 0.0964421 | 1.3498742 | 0.1974487 | 0.0079303 | 0.0025485 | 2600 | 0.0001352 | 0.0001593 | 0.0009200 | 0.0001938 | 0.0069598 | 0.0081842 |
| 1077 | 0.3650991 | 0.0289447 | 2.3568464 | 0.5832021 | 0.0598765 | 0.0483398 | 2602 | 0.0420024 | 0.0047368 | 0.0141224 | 0.0031934 | 0.0181510 | 0.0305593 |
| 1078 | 0.4739526 | 0.0851436 | 2.3021807 | 0.1648605 | 0.3016751 | 0.1201662 | 2603 | 0 | 0 | 0.0011677 | 0.0010887 | 0.0338156 | 0.0140073 |
| 1079 | 0.0737339 | 0.0092085 | 0.7643982 | 0.1975171 | 0.0049602 | 0.0021768 | 2604 | 0.0008487 | 0.0014700 | 0.0056725 | 0.0027729 | 0 | 0 |
| 1080 | 0.0004228 | 0.0001287 | 0.0015784 | 0.0009063 | 0.0012439 | 0.0003908 | 2606 | 0 | 0 | 0.0041077 | 0.0011847 | 0 | 0 |
| 1081 | 0.1419910 | 0.0617773 | 1.1706235 | 0.3785978 | 0.0696784 | 0.0184900 | 2607 | 0.0185436 | 0.0051999 | 0.0179025 | 0.0036802 | 0.0193906 | 0.0335856 |
| 1082 | 0.1250348 | 0.0711454 | 1.1947762 | 0.2722390 | 0.0470069 | 0.0014830 | 2608 | 0.0321172 | 0.0090934 | 0.0315612 | 0.0032121 | 0 | 0 |
| 1083 | 0.0792234 | 0.0410988 | 0.3995426 | 0.1145864 | 0.0194228 | 0.0042705 | 2609 | 0.0493652 | 0.0067623 | 0.0349944 | 0.0075196 | 0.0030883 | 0.0045519 |
| 1084 | 0.1030447 | 0.0557946 | 0.9612913 | 0.4728517 | 0.0169074 | 0.0036704 | 2610 | 0.0731214 | 0.0039255 | 0.0292627 | 0.0017863 | 0.0161748 | 0.0195467 |
| 1085 | 0.3587657 | 0.0847274 | 1.0786486 | 0.2725183 | 0.0022883 | 0.0013032 | 2611 | 0.0108013 | 0.0015541 | 0.0048574 | 0.0022394 | 0.0009606 | 0.0016638 |
| 1086 | 0.8821218 | 0.1276812 | 2.4761072 | 1.0135596 | 0.3449221 | 0.1901316 | 2612 | 0 | 0 | 0.0048153 | 0.0032582 | 0.0138259 | 0.0131928 |
| 1087 | 0.5405897 | 0.0598493 | 1.2404524 | 0.5355882 | 0.0436812 | 0.0039380 | 2613 | 0 | 0 | 0.0045243 | 0.0016542 | 0.0152500 | 0.0264138 |
| 1088 | 0.0835644 | 0.0332168 | 0.4115370 | 0.0979466 | 0.0182978 | 0.0008369 | 2614 | 0.0176889 | 0.0094255 | 0.0181332 | 0.0013429 | 0.0033516 | 0.0058051 |
| 1089 | 0.0000234 | 0.0000205 | 0.0017046 | 0.0006431 | 0.0004050 | 0.0003562 | 2616 | 0.0012779 | 0.0007500 | 0.0009925 | 0.0001936 | 0.0003930 | 0.0004526 |
| 1090 | 0.0000814 | 0.0001409 | 0.0017213 | 0.0007442 | 0.0013691 | 0.0010658 | 2619 | 0.0290566 | 0.0033657 | 0.0358374 | 0.0056448 | 0 | 0 |
| 1091 | 0.2943027 | ND | 0.8384121 | 0.2200198 | 0.0471924 | 0.0108141 | 2620 | 0.0000366 | 0.0000634 | 0.0002312 | 0.0000574 | 0.0007182 | 0.0006376 |
| 1092 | 0.1791732 | 0.0948466 | 0.8331410 | 0.2602041 | 0.0647833 | 0.0167119 | 2621 | 0.0005124 | 0.0005171 | 0.0006859 | 0.0001170 | 0.0011170 | 0.0009871 |
| 1093 | 0.0612047 | 0.0226275 | 0.4827328 | 0.2135814 | 0.0439839 | 0.0109119 | 2623 | 0.1072357 | 0.0054470 | 0.0831531 | 0.0043949 | 0.0022460 | 0.0038901 |
| 1094 | 0.6269533 | 0.1309995 | 1.3712113 | 0.4412255 | 0.4878138 | 0.0685991 | 2624 | 0.0335296 | 0.0039730 | 0.0283266 | 0.0041255 | 0.0118197 | 0.0204723 |
| 1095 | 0.3130229 | 0.0816077 | 1.0299869 | 0.4262696 | 0.0382892 | 0.0070869 | 2625 | 0.0247570 | 0.0040521 | 0.0272062 | 0.0029899 | 0.0092279 | 0.0159831 |
| 1096 | 0.1882183 | 0.0564479 | 0.6704150 | 0.1840953 | 0.0693389 | 0.0201685 | 2626 | 0.0311016 | 0.0055987 | 0.0332621 | 0.0081734 | 0.0000447 | 0.0000775 |
| 1097 | 0.1669607 | 0.1117034 | 0.9535914 | 0.4158897 | 0.0913767 | 0.0248360 | 2627 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 1098 | 0.3852625 | ND | 1.2258158 | 0.5609164 | 0.0598789 | 0.0172955 | 2628 | 0.0142034 | 0.0070646 | 0.0235747 | 0.0016690 | 0 | 0 |
| 1099 | 0.0925880 | 0.0655053 | 0.8166312 | 0.3442155 | 0.0490324 | 0.0134340 | 2629 | 0 | 0 | 0.0097822 | 0.0028955 | 0.0277986 | 0.0293370 |
| 1100 | 0.1241641 | 0.0943909 | 0.7517385 | 0.3130413 | 0.0628980 | 0.0174685 | 2630 | 0 | 0 | 0.0012353 | 0.0011775 | 0.0071395 | 0.0123660 |
| 1101 | 0.1556274 | 0.0660177 | 0.8235760 | 0.3444120 | 0.0491846 | 0.0071429 | 2631 | 0 | 0 | 0.0005671 | 0.0009822 | 0 | 0 |
| 1102 | 0.4362714 | 0.0661334 | 1.2195064 | 0.3276037 | 0.0689386 | 0.0067410 | 2632 | 0.0487179 | 0.0083709 | 0.0670660 | 0.0017735 | 0.0126260 | 0.0218688 |
| 1103 | 0.4317385 | 0.0747841 | 2.3535079 | 0.7467771 | 0.0629950 | 0.0060512 | 2633 | 0 | 0 | 0.0014265 | 0.0024708 | 0.0019983 | 0.0034612 |
| 1104 | 0.1123405 | 0.0617127 | 0.4765773 | 0.1914310 | 0.0806613 | 0.0228221 | 2634 | 0 | 0 | 0.0026020 | 0.0024778 | 0.0229953 | 0.0381603 |
| 1105 | 0.0276277 | 0.0166117 | 0.5384218 | 0.2274651 | 0.0146718 | 0.0025445 | 2635 | 0.0060753 | 0.0048750 | 0.0103052 | 0.0027541 | 0.0083694 | 0.0144962 |
| 1106 | 0.1703682 | ND | 0.7360701 | 0.3546248 | 0.0491697 | 0.0086915 | 2636 | 0 | 0 | 0.0018318 | 0.0027891 | 0.0030973 | 0.0053646 |
| 1107 | 0.2672307 | ND | 1.5928959 | 0.7683523 | 0.0518831 | 0.0098244 | 2637 | 0.0097700 | 0.0018185 | 0.0170616 | 0.0005630 | 0.0134876 | 0.0116987 |
| 1108 | 0.1694413 | 0.1229691 | 0.8901071 | 0.5229014 | 0.0251090 | 0.0019355 | 2638 | 0.0420603 | 0.0065508 | 0.0331794 | 0.0062425 | 0.0003125 | 0.0005412 |
| 1109 | 0.0686587 | 0.0420839 | 0.4794951 | 0.2364589 | 0.0324950 | 0.0041901 | 2639 | 0.0126794 | 0.0048752 | 0.0189073 | 0.0027303 | 0.0130567 | 0.0209970 |
| 1110 | 0.5147644 | 0.1357169 | 1.6446541 | 0.6717652 | 0.1818070 | 0.0449734 | 2640 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0023282 | 0.0040326 |

【表２８－３２】

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1111 | 0.4124980 | 0.0917555 | 1.4548802 | 0.8076491 | 0.0266181 | 0.0098752 | 2641 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 1112 | 0.0760038 | 0.0239417 | 0.7360354 | 0.2881188 | 0.0464518 | 0.0066012 | 2642 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0142443 | 0.0246719 | |
| 1113 | 0.0968292 | ND | 0.6166679 | 0.1359130 | 0.0353914 | 0.0139153 | 2643 | 0.0105217 | 0.0027528 | 0.0069201 | 0.0061847 | 0 | 0 | | 0 | |
| 1114 | 0.1988192 | ND | 0.8673357 | 0.3799399 | 0.0152684 | 0.0023197 | 2644 | 0 | 0 | 0.0006058 | 0.0010492 | 0 | 0 | | 0 | |
| 1115 | 0.1380449 | ND | 0.5125193 | 0.2152441 | 0.0141545 | 0.0018299 | 2645 | 0.0935195 | 0.0094782 | 0.0278726 | 0.0012464 | 0.0042371 | 0.0073388 | | | |
| 1116 | 0.0897876 | ND | 0.3074418 | 0.1718864 | 0.0237183 | 0.0020612 | 2646 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0208262 | 0.0197490 | | | |
| 1117 | 0.1016422 | 0.0606531 | 0.5782336 | 0.2495434 | 0.0247573 | 0.0074265 | 2647 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0021597 | 0.0021238 | | | |
| 1118 | 0.2794530 | 0.0842109 | 0.5107495 | 0.1842288 | 0.0096210 | 0.0027158 | 2648 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0186099 | 0.0322333 | | | |
| 1119 | 0.4151610 | 0.0120146 | 0.8454944 | 0.3501959 | 0.0758745 | 0.0109556 | 2649 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | |
| 1120 | 0.0963502 | 0.0366860 | 0.6011621 | 0.2511884 | 0.0479681 | 0.0026718 | 2650 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0141030 | 0.0210769 | | | |
| 1121 | 0.1671212 | ND | 1.3481831 | 0.3762183 | 0.0601159 | 0.0032732 | 2651 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0133185 | 0.0230683 | | | |
| 1122 | 0.0742113 | ND | 0.5634087 | 0.2943273 | 0.0183224 | 0.0021906 | 2652 | 0.0072514 | 0.0003474 | 0.0063519 | 0.0034296 | 0.0124516 | 0.0190326 | | | |
| 1123 | 0.8085738 | 0.0665540 | 1.5855967 | 0.0346007 | 0.5297481 | 0.0179199 | 2653 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0148424 | 0.0193172 | | | |
| 1124 | 0.0514056 | 0.0056035 | 0.6116618 | 0.0368377 | 0.0135726 | 0.0019182 | 2654 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0016615 | 0.0028779 | | | |
| 1125 | 0.2216648 | 0.1591561 | 0.6881011 | 0.2364860 | 0.0330649 | 0.0050691 | 2655 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | |
| 1126 | 0.5120381 | 0.1802037 | 1.2238033 | 0.4602425 | 0.0766221 | 0.0025950 | 2656 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0062189 | 0.0058976 | | | |
| 1127 | 0.2649451 | 0.0177920 | 1.0470926 | 0.5391124 | 0.0830581 | 0.0075218 | 2657 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | |
| 1128 | 0.0787524 | 0.0404432 | 0.5229301 | 0.2293408 | 0.0533725 | 0.0032347 | 2658 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0069584 | 0.0120523 | | | |
| 1129 | 0.0361171 | 0.0260755 | 0.3954795 | 0.1589478 | 0.0122786 | 0.0010144 | 2659 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | |
| 1130 | 0.3636822 | ND | 1.0570642 | 0.3793714 | 0.1012619 | 0.0120290 | 2660 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0015637 | 0.0027083 | | | |
| 1131 | 0.2885988 | ND | 0.7729791 | 0.1805158 | 0.0381979 | 0.0010987 | 2661 | 0.0000683 | 0.0001089 | 0.0007126 | 0.0001880 | 0.0023660 | 0.0030689 | | | |
| 1132 | 0.2345301 | ND | 0.6144258 | 0.2258738 | 0.0123130 | 0.0023481 | 2663 | 0 | 0 | 0.0001543 | 0.0002673 | 0 | 0 | | | |
| 1133 | 0.0760969 | 0.0485811 | 0.4760562 | 0.2348433 | 0.0219318 | 0.0012299 | 2664 | 0 | 0 | 0.0001852 | 0.0003208 | 0.0866828 | 0.1225880 | | | |
| 1134 | 0.2265714 | 0.0439254 | 2.9102138 | 0.5001506 | 0.1225020 | 0.0044885 | 2665 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | |
| 1135 | 0.2866766 | 0.0272333 | 0.8597123 | 0.4590056 | 0.0493844 | 0.0155375 | 2666 | 0.0023249 | 0.0005354 | 0.0013063 | 0.0008540 | 0 | 0 | | | |
| 1136 | 0.1306596 | 0.0624340 | 0.9040054 | 0.3952496 | 0.1014245 | 0.0055358 | 2667 | 1.0853721 | 0.0873419 | 0.5575123 | 0.0965338 | 4.5306839 | 1.7981195 | | | |
| 1137 | 0.0420295 | 0.0261351 | 0.3458167 | 0.1036139 | 0.0227689 | 0.0045348 | 2668 | 0.0009808 | 0.0004153 | 0.0006670 | 0.0006051 | 0 | 0 | | | |
| 1138 | 0.3438254 | ND | 0.8581561 | 0.3887268 | 0.0736909 | 0.0082105 | 2669 | 0.0146272 | 0.0034870 | 0.0039984 | 0.0009032 | 0 | 0 | | | |
| 1139 | 0.1919333 | ND | 1.1487815 | 0.3688324 | 0.0622272 | 0.0081191 | 2670 | 0.0001469 | 0.0001294 | 0.0005957 | 0.0005165 | 0.0346825 | 0.0490485 | | | |
| 1140 | 0.2501499 | ND | 1.0460207 | 0.2361026 | 0.0519228 | 0.0108107 | 2671 | 0.0033004 | 0.0009246 | 0.0028019 | 0.0012134 | 0 | 0 | | | |
| 1141 | 0.0969184 | 0.0577687 | 0.4497478 | 0.0608421 | 0.0398615 | 0.0044861 | 2672 | 0.0009570 | 0.0003018 | 0.0064549 | 0.0019507 | 0 | 0 | | | |
| 1142 | 0.5036460 | 0.0913841 | 1.0136553 | 0.1846192 | 0.4939718 | 0.0788646 | 2673 | 0.0000227 | 0.0000392 | 0.0005063 | 0.0006374 | 0 | 0 | | | |
| 1143 | 0.0116181 | 0.0021955 | 0.0670341 | 0.0346867 | 0.0035190 | 0.0014459 | 2674 | 0.0003332 | 0.0002098 | 0.0016014 | 0.0007677 | 0 | 0 | | | |
| 1144 | 0.0201831 | 0.0072128 | 0.4122003 | 0.1294802 | 0.0183006 | 0.0020324 | 2675 | 0.0010196 | 0.0001627 | 0.0010972 | 0.0009035 | 0 | 0 | | | |
| 1145 | 0.0743522 | 0.0371551 | 0.3759509 | 0.1318436 | 0.0463247 | 0.0119715 | 2676 | 0.0026907 | 0.0003639 | 0.0128282 | 0.0025402 | 0 | 0 | | | |

【表２８－３３】

| | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1146 | 0.1084657 | 0.0580738 | 0.8046660 | 0.2488724 | 0.0459004 | 0.0118768 | 2677 | 0.0085128 | 0.0010584 | 0.0271956 | 0.0086543 | 0 | 0 | |
| 1147 | 0.1084380 | 0.0512947 | 0.7065368 | 0.2586812 | 0.0788045 | 0.0106139 | 2678 | 0 | 0 | 0.0034481 | 0.0053950 | 0 | 0 | |
| 1148 | 0.1566662 | 0.0959344 | 0.9746857 | 0.4524714 | 0.0628677 | 0.0103038 | 2679 | 0.0008978 | 0.0002117 | 0.0043477 | 0.0011635 | 0 | 0 | |
| 1149 | 0.1048621 | 0.0592150 | 0.7597760 | 0.3462064 | 0.0329161 | 0.0071128 | 2680 | 0.1820525 | 0.0342164 | 0.4002018 | 0.0954815 | 0 | 0 | |
| 1150 | 0.3797881 | 0.0711396 | 1.0936059 | 0.2574388 | 0.0450961 | 0.0070879 | 2681 | 0.1457200 | 0.0101467 | 0.4271401 | 0.0938622 | 1.7026573 | 0.1675441 | |
| 1151 | 0.2911843 | 0.0557368 | 0.8812281 | 0.4207093 | 0.0345095 | 0.0058360 | 2682 | 0.2167480 | 0.0195829 | 0.4638010 | 0.1063586 | 0 | 0 | |
| 1152 | 0.1163108 | 0.0380032 | 0.5037347 | 0.0884885 | 0.0321948 | 0.0016892 | 2683 | 0.1031531 | 0.0028236 | 0.2656679 | 0.0492430 | 0 | 0 | |
| 1153 | 0.1868271 | 0.0675799 | 0.8986402 | 0.3534719 | 0.0662195 | 0.0117779 | 2684 | 0.0002379 | 0.0002139 | 0.0010983 | 0.0006289 | 0 | 0 | |
| 1154 | 0.2300224 | 0.0840233 | 1.1751245 | 0.4564500 | 0.0696813 | 0.0161612 | 2685 | 0.0231807 | 0.0027729 | 0.0727609 | 0.0256892 | 0 | 0 | |
| 1155 | 0.1455570 | 0.0436652 | 0.8631569 | 0.3220320 | 0.0844142 | 0.0086707 | 2686 | 0.0154364 | 0.0004472 | 0.0574878 | 0.0154412 | 0.1048409 | 0.1482674 | |
| 1156 | 0.0888814 | 0.0429756 | 0.6219737 | 0.2701220 | 0.0081509 | 0.0014810 | 2687 | 0.0005898 | 0.0002690 | 0.0056099 | 0.0014996 | 0.2115615 | 0.2991932 | |
| 1157 | 0.0017240 | 0.0004874 | 0.0048734 | 0.0016639 | 0.0013491 | 0.0006549 | 2688 | 0.0000964 | 0.0001670 | 0.0012683 | 0.0005676 | 0 | 0 | |
| 1158 | 0.2903569 | 0.0390723 | 0.5608915 | 0.1175145 | 0.4288556 | 0.0515607 | 2689 | 0.0032968 | 0.0006772 | 0.2867299 | 0.0760406 | 0 | 0 | |
| 1159 | 0.3896795 | 0.0749076 | 1.0764970 | 0.4309517 | 0.0769358 | 0.0030032 | 2690 | 0.0001262 | 0.0001370 | 0.0018803 | 0.0009839 | 0 | 0 | |
| 1160 | 0.3100941 | 0.0594830 | 1.0667459 | 0.5860937 | 0.0433537 | 0.0067694 | 2691 | 0.0003782 | 0.0003320 | 0.0020025 | 0.0010145 | 0.1044719 | 0.1477456 | |
| 1161 | 0.0059822 | 0.0006954 | 0.2070586 | 0.1021889 | 0.0033699 | 0.0010588 | 2692 | 0.2304727 | 0.0587462 | 0.6892924 | 0.1415679 | 0 | 0 | |
| 1162 | 0.3610518 | 0.1095783 | 1.1508184 | 0.4886021 | 0.0666468 | 0.0098455 | 2693 | 0.1652848 | 0.0291517 | 0.3748073 | 0.0933022 | 0.4055023 | 0.2508843 | |
| 1163 | 0.2557901 | 0.0583031 | 0.8837384 | 0.3226970 | 0.1042838 | 0.0369438 | 2694 | 0 | 0 | 0.0110067 | 0.0172569 | 0 | 0 | |
| 1164 | 0.1981150 | 0.0615554 | 0.7318466 | 0.1175606 | 0.0204963 | 0.0071605 | 2695 | 0.0030981 | 0.0001805 | 0.0160311 | 0.0028899 | 0.0575045 | 0.0813236 | |
| 1165 | 0.3827675 | 0.0640872 | 1.1513971 | 0.5227878 | 0.0950783 | 0.0068556 | 2696 | 0 | 0 | 0.0002803 | 0.0004856 | 0 | 0 | |
| 1166 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0038006 | 0.0065828 | 2697 | 0.0053121 | 0.0017241 | 0.0085906 | 0.0033930 | 0 | 0 | |
| 1167 | 0.3119335 | 0.0522865 | 0.9903744 | 0.1081761 | 0.0841313 | 0.0301040 | 2698 | 0.0845069 | 0.0121048 | 0.4893000 | 0.1298927 | 0.1040271 | 0.1471165 | |
| 1168 | 2.4633188 | 0.7943201 | 1.5691436 | 0.1075746 | 0.2402286 | 0.0329893 | 2699 | 0.0753938 | 0.0352866 | 0.0619207 | 0.0185980 | 0.0910905 | 0.1288214 | |
| 1169 | 1.8655293 | 0.7752488 | 1.7578967 | 0.1675373 | 0.1620726 | 0.0178057 | 2700 | 0.2916307 | 0.0450738 | 0.7602933 | 0.1382344 | 0 | 0 | |
| 1170 | 0.1290219 | 0.0677454 | 0.4658475 | 0.0459918 | 0.0131989 | 0.0084443 | 2701 | 0.1479164 | 0.0364809 | 0.3642534 | 0.0765800 | 0.4487362 | 0.0194284 | |
| 1171 | 1.5494493 | 0.7111238 | 1.9958733 | 0.1703133 | 0.7437129 | 0.0330120 | 2702 | 0.1216543 | 0.0277500 | 0.4038528 | 0.1086548 | 0 | 0 | |
| 1172 | 1.0694404 | 0.2662648 | 1.8114277 | 0.1422699 | 0.3144082 | 0.0815102 | 2704 | 0.1532171 | 0.0249032 | 0.7247436 | 0.1693331 | 0.1010622 | 0.1429235 | |
| 1173 | 0.2984324 | 0.1099944 | 1.0655430 | 0.0384042 | 0.2228978 | 0.0357802 | 2705 | 0.0001112 | 0.0000985 | 0.0025023 | 0.0011042 | 0 | 0 | |
| 1174 | 0.6083240 | 0.0770829 | 1.5605954 | 0.0704052 | 0.2232449 | 0.0197295 | 2706 | 0 | 0 | 0.0023730 | 0.0009445 | 0 | 0 | |
| 1175 | 0.5734585 | 0.1382026 | 1.4411784 | 0.0825248 | 0.2360367 | 0.0111059 | 2707 | 0.0108661 | 0.0004854 | 0.0580481 | 0.0136686 | 0.0634794 | 0.0897735 | |
| 1176 | 0.8873619 | 0.3893661 | 0.9110620 | 0.0704087 | 0.0456395 | 0.0203224 | 2708 | 0 | 0 | 0.0007100 | 0.0008603 | 0 | 0 | |
| 1177 | 3.7555353 | 1.4876334 | 2.6851983 | 0.1527552 | 0.1384087 | 0.0143806 | 2709 | 0.0005783 | 0.0002344 | 0.0016060 | 0.0011207 | 0 | 0 | |
| 1178 | 1.3831086 | 0.5760013 | 1.7048669 | 0.1250479 | 0.5214335 | 0.0368118 | 2710 | 0.0003732 | 0.0000763 | 0.0015915 | 0.0009324 | 0 | 0 | |
| 1179 | 1.5628717 | 0.5847612 | 1.4636000 | 0.2094204 | 0.3454931 | 0.0182838 | 2712 | 0.0061249 | 0.0012332 | 0.2237743 | 0.0580537 | 0 | 0 | |
| 1180 | 1.5944137 | 0.4333146 | 2.0950961 | 0.0849234 | 0.3047105 | 0.0448261 | 2713 | 0 | 0 | 0.0009552 | 0.0015252 | 0 | 0 | |

【表２８－３４】

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1182 | 0.8967171 | 0.2213373 | 1.7434756 | 0.0977428 | 0.3428484 | 0.0030703 | 2714 | 0.0000860 | 0.0000683 | 0.0015153 | 0.0006611 | 0.0857034 | 0.1212029 | | | | | | |
| 1183 | 0.6679703 | 0.0285639 | 1.4968843 | 0.0834464 | 0.2768983 | 0.0609484 | 2715 | 0.2779286 | 0.0529047 | 0.8607484 | 0.2016844 | 0 | 0 | | | | | | |
| 1184 | 0.4734001 | 0.0447403 | 1.2348826 | 0.0606420 | 0.4290597 | 0.0252410 | 2716 | 0 | 0 | 0.0010774 | 0.0006451 | 0 | 0 | | | | | | |
| 1185 | 0.1810723 | 0.0529123 | 0.7076171 | 0.0589146 | 0.0731918 | 0.0087094 | 2717 | 0.0107988 | 0.0014540 | 0.0216533 | 0.0039822 | 0.0288289 | 0.0407702 | | | | | | |
| 1186 | 1.1183215 | 0.4039136 | 1.2756049 | 0.1308429 | 0.1961926 | 0.0100168 | 2718 | 0.2174130 | 0.0278343 | 0.5715289 | 0.1653022 | 0.0002376 | 0.0003361 | | | | | | |
| 1187 | 0.8372767 | 0.3394280 | 1.1050937 | 0.0854532 | 0.1334922 | 0.0162271 | 2719 | 0.3103731 | 0.1159341 | 0.3859389 | 0.0237674 | 0.2508352 | 0.3547346 | | | | | | |
| 1188 | 0.9652713 | 0.3930699 | 1.5009054 | 0.1184105 | 0.0329343 | 0.0158458 | 2720 | 0.0695201 | 0.0197505 | 0.0291771 | 0.0092169 | 0 | 0 | | | | | | |
| 1189 | 1.2040928 | 0.4695679 | 1.5507602 | 0.0839758 | 0.3793624 | 0.0268494 | 2721 | 0.0019660 | 0.0001773 | 0.0088981 | 0.0096245 | 0.0403250 | 0.0570282 | | | | | | |
| 1190 | 0.1391295 | 0.0687015 | 0.1876103 | 0.0126008 | 0.0281054 | 0.0129511 | 2722 | 0.0013237 | 0.0002134 | 0.0018162 | 0.0009592 | 0 | 0 | | | | | | |
| 1191 | 0.0053721 | 0.0002779 | 0.0066841 | 0.0007473 | 0.0032213 | 0.0027934 | 2723 | 0 | 0 | 0.0008673 | 0.0010361 | 0 | 0 | | | | | | |
| 1192 | 2.1057505 | 0.9587129 | 1.9515534 | 0.1198302 | 0.8610332 | 0.0350537 | 2724 | 0.0004095 | 0.0002719 | 0.0130262 | 0.0028553 | 0 | 0 | | | | | | |
| 1193 | 0.4766151 | 0.1521229 | 1.2475651 | 0.1748335 | 1.5674450 | 0.4205181 | 2725 | 0.0044568 | 0.0007171 | 0.0048865 | 0.0016501 | 0.0092097 | 0.0130245 | | | | | | |
| 1194 | 0.4051197 | 0.1137845 | 0.9283841 | 0.1080510 | 0.5871469 | 0.0689246 | 2726 | 0.0288144 | 0.0133353 | 0.0396190 | 0.0122832 | 0 | 0 | | | | | | |
| 1195 | 0.1459566 | 0.0181992 | 1.2533441 | 0.0779828 | 0.1446953 | 0.0127394 | 2727 | 0.0062273 | 0.0025165 | 0.0041190 | 0.0008770 | 0.1204097 | 0.1702851 | | | | | | |
| 1196 | 0.1681048 | 0.0617434 | 1.0424138 | 0.1109162 | 0.3054916 | 0.0357990 | 2728 | 0.0482656 | 0.0103639 | 0.0181917 | 0.0059168 | 0 | 0 | | | | | | |
| 1197 | 0.5398339 | 0.1183024 | 1.4066722 | 0.0758479 | 0.5945030 | 0.1173408 | 2729 | 0.0020396 | 0.0004522 | 0.0025405 | 0.0002951 | 0.0044579 | 0.0052941 | | | | | | |
| 1198 | 0.3436872 | 0.0723323 | 1.8066242 | 0.2189182 | 0.2965184 | 0.0602256 | 2730 | 0.6904974 | 0.1289602 | 1.2249305 | 0.3230847 | 0 | 0 | | | | | | |
| 1199 | 0.4789225 | 0.1842709 | 1.5989430 | 0.1247662 | 0.3623343 | 0.0601604 | 2732 | 0.0042354 | 0.0012400 | 0.0081807 | 0.0023336 | 0 | 0 | | | | | | |
| 1200 | 0.9620068 | 0.3109432 | 1.3706066 | 0.1540522 | 1.1971715 | 0.1961661 | 2733 | 0.0017122 | 0.0001635 | 0.0204978 | 0.0049352 | 0 | 0 | | | | | | |
| 1201 | 0.1935093 | 0.0669073 | 0.3627785 | 0.0654961 | 0.0691112 | 0.0205595 | 2734 | 0.0010196 | 0.0002390 | 0.0119931 | 0.0022214 | 0.0307699 | 0.0435152 | | | | | | |
| 1204 | 0.0219993 | 0.0060854 | 0.4364780 | 0.0743474 | 0.0588621 | 0.0077899 | 2735 | 0.0117959 | 0.0031918 | 0.0543222 | 0.0105582 | 0 | 0 | | | | | | |
| 1206 | 0.4335058 | 0.0734847 | 1.2261299 | 0.0582375 | 0.7759921 | 0.0472870 | 2736 | 0.4963339 | 0.1360251 | 0.6945223 | 0.1417478 | 0 | 0 | | | | | | |
| 1207 | 0.0359578 | 0.0098144 | 0.0607404 | 0.0112944 | 0.1399066 | 0.0344076 | 2737 | 0.0069681 | 0.0021963 | 0.0209525 | 0.0037016 | 0 | 0 | | | | | | |
| 1208 | 0.0143312 | 0.0014050 | 0.0234552 | 0.0045930 | 0.0215231 | 0.0028902 | 2738 | 0.0204676 | 0.0042377 | 0.1134923 | ND | 0.0207891 | 0.0294002 | | | | | | |
| 1209 | 0.2205029 | 0.0417990 | 0.9353868 | 0.1883490 | 0.1931904 | 0.0371547 | 2739 | 0.0178850 | 0.0026589 | 0.0577531 | 0.0137593 | 0 | 0 | | | | | | |
| 1210 | 0.2557936 | 0.0298984 | 1.0523969 | 0.0916011 | 0.2348168 | 0.0245218 | 2740 | 0.8277393 | 0.1280371 | 1.4619677 | 0.3404284 | 0.1334856 | 0.1887771 | | | | | | |
| 1211 | 0.1297780 | 0.0278113 | 0.7374849 | 0.0833006 | 0.1178956 | 0.0195613 | 2741 | 0.0040438 | 0.0006805 | 0.0070266 | 0.0023479 | 0 | 0 | | | | | | |
| 1213 | 0.2604329 | 0.0848281 | 1.1404601 | 0.0856993 | 0.2773412 | 0.0591266 | 2742 | 0.3071911 | 0.0639586 | 0.7612579 | 0.1431412 | 2.2270529 | 0.1682949 | | | | | | |
| 1214 | 0.2120619 | 0.0790978 | 0.8162453 | 0.0883758 | 0.3707603 | 0.0218310 | 2743 | 0.0214032 | 0.0048630 | 0.0629804 | 0.0158579 | 0 | 0 | | | | | | |
| 1215 | 0.3129934 | 0.1746589 | 0.8763818 | 0.0456025 | 0.2118813 | 0.0361485 | 2744 | 0.0447765 | 0.0092554 | 0.0850149 | 0.0160396 | 0 | 0 | | | | | | |
| 1216 | 0.9636281 | 0.2371210 | 1.7579578 | 0.1591878 | 1.2701033 | 0.3692034 | 2745 | 0.0672693 | 0.0030230 | 0.0764654 | 0.0142122 | 0 | 0 | | | | | | |
| 1217 | 0.2168235 | 0.0519862 | 1.0165968 | 0.1753568 | 0.3777556 | 0.1041948 | 2746 | 1.1283296 | 0.0759363 | 0.9538445 | 0.2536897 | 1.4912321 | 0.2593340 | | | | | | |
| 1218 | 0.6310646 | 0.1420519 | 1.2286012 | 0.0727298 | 0.5055149 | 0.1098828 | 2748 | 0.1153089 | 0.0300730 | 0.1654565 | 0.0241948 | 0 | 0 | | | | | | |
| 1219 | 0.4386586 | 0.0939697 | 1.4339660 | 0.1344276 | 0.5382437 | 0.1466329 | 2749 | 0.0638319 | 0.0190445 | 0.1776748 | 0.0334217 | 0 | 0 | | | | | | |
| 1220 | 0.1523643 | 0.0273930 | 0.8537226 | 0.0611595 | 0.2184304 | 0.0371711 | 2750 | 0.1488771 | 0.0288261 | 0.3271651 | 0.0788638 | 0.5609430 | 0.1552925 | | | | | | |

【表２８－３５】

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1221 | 0.2301061 | 0.0374130 | 0.9918388 | 0.0440000 | 0.2654722 | 0.0293899 | 2751 | 0.0249735 | 0.0048320 | 0.1001664 | 0.0251445 | 0.1324371 | 0.1872943 | | | | | | |
| 1222 | 0.0217970 | 0.0037566 | 0.0698794 | 0.0124486 | 0.0535022 | 0.0058150 | 2752 | 0.5218987 | 0.1198026 | 0.7484955 | 0.1617572 | 0.7868380 | ND | | | | | | |
| 1223 | 0.6594858 | 0.2463318 | 0.9973389 | 0.0085594 | 0.3029725 | 0.0651777 | 2753 | 0.0472995 | 0.0063887 | 0.0612808 | 0.0095361 | 0 | 0 | | | | | | |
| 1224 | 0.0035725 | 0.0008584 | 0.1805596 | ND | 0.0196975 | 0.0035956 | 2754 | 1.1350483 | 0.2421055 | 1.1075736 | 0.1548066 | 0 | 0 | | | | | | |
| 1225 | 0.0696259 | 0.0082309 | 0.2693783 | 0.0412772 | 0.1505698 | 0.0325436 | 2755 | 0.0909082 | 0.0119904 | 0.3048483 | 0.0792410 | 0.0590743 | 0.0835437 | | | | | | |
| 1226 | 0.2213469 | 0.0746809 | 1.3561499 | 0.1995129 | 0.4088452 | 0.0739722 | 2756 | 0.1668204 | 0.0141235 | 0.1633100 | 0.0425010 | 0 | 0 | | | | | | |
| 1227 | 0.3497365 | 0.0454738 | 0.7508123 | 0.1531697 | 0.1227546 | 0.0297098 | 2757 | 0.7953489 | 0.1317878 | 0.9700522 | 0.2643227 | 0.6462692 | 0.1868224 | | | | | | |
| 1228 | 0.0005461 | 0.0004642 | 0.0022109 | 0.0019177 | 0 | 0 | 2758 | 0.4184153 | 0.0522908 | 0.5399081 | 0.1221224 | 2.0122685 | 0.1291835 | | | | | | |
| 1229 | 0.3080300 | 0.0886003 | 1.1183683 | 0.1575908 | 0.0985957 | 0.0083771 | 2759 | 0.0034428 | 0.0003274 | 0.0414005 | 0.0100414 | 0 | 0 | | | | | | |
| 1230 | 0.7020614 | 0.1348461 | 0.9056254 | 0.1815543 | 0.5405192 | 0.0729734 | 2760 | 0.7113551 | 0.1696731 | 0.8330051 | 0.2563652 | 1.2257474 | 0.1469474 | | | | | | |
| 1232 | 0.1916642 | 0.0580763 | 0.2945368 | 0.0235500 | 0.1822774 | 0.0323763 | 2761 | 0.7982985 | 0.2300338 | 0.9109760 | 0.1187384 | 0.3047428 | 0.4309715 | | | | | | |
| 1233 | 0.4091627 | 0.0690788 | 1.0350563 | 0.0946519 | 0.6349194 | 0.0444706 | 2762 | 0.0652079 | 0.0426121 | 0.1326388 | 0.0069429 | 0.1365821 | 0.0840582 | | | | | | |
| 1234 | 0.3353644 | 0.0290614 | 0.8211801 | 0.0710247 | 0.2121475 | 0.0429193 | 2763 | 0.2256631 | 0.0774941 | 0.0895803 | 0.0162537 | 0.1356018 | 0.0400500 | | | | | | |
| 1235 | 0.0015049 | 0.0006258 | 0.0139757 | 0.0044904 | 0.0043806 | 0.0033347 | 2764 | 0.7338392 | 0.4064907 | 1.4109467 | 0.0460486 | 0.1283034 | 0.0523790 | | | | | | |
| 1237 | 0.0009914 | 0.0002303 | 0.0020339 | 0.0018878 | 0.0008859 | 0.0011819 | 2765 | 0.4247636 | 0.0826082 | 0.8691629 | 0.0427524 | 0.1745902 | 0.1169676 | | | | | | |
| 1238 | 0.0003608 | 0.0003238 | 0.0009208 | 0.0008065 | 0.0006070 | 0.0010514 | 2766 | 0.6837472 | 0.1095688 | 0.9772066 | 0.0331672 | 0.4243782 | 0.1145891 | | | | | | |
| 1239 | 0.0008711 | 0.0003841 | 0.0032398 | 0.0028840 | 0.0025782 | 0.0013626 | 2767 | 0.5729303 | 0.0877027 | 1.1864223 | 0.0678733 | 0.1634338 | 0.0427302 | | | | | | |
| 1240 | 0.0910227 | 0.0357426 | 0.6557665 | 0.0811881 | 0.0927445 | 0.0129069 | 2768 | 0.4773763 | 0.0681418 | 1.3387269 | 0.0280259 | 0.2855688 | 0.0881331 | | | | | | |
| 1242 | 0.4686251 | 0.1866674 | 0.6267645 | 0.0868502 | 0.4867462 | 0.1024667 | 2769 | 1.1050831 | 0.3299793 | 1.4019612 | 0.0810408 | 0.6143991 | 0.1693745 | | | | | | |
| 1243 | 0.6921983 | 0.2163936 | 0.7447914 | 0.0267081 | 0.2945229 | 0.0633444 | 2770 | 0.3413598 | 0.0426292 | 0.5275183 | 0.0340033 | 1.1045972 | 0.2792074 | | | | | | |
| 1244 | 0.3527984 | 0.0524722 | 0.9700004 | 0.0890134 | 0.3675971 | 0.0542591 | 2771 | 0.7884229 | 0.2584628 | 0.9992497 | 0.1083988 | 0.8718817 | 0.2596336 | | | | | | |
| 1245 | 0.4613715 | 0.1227159 | 0.8857726 | 0.0777460 | 0.5113529 | 0.1637468 | 2772 | 0.3961448 | 0.1853959 | 0.7838245 | 0.0547372 | 0.4131228 | 0.1037773 | | | | | | |
| 1246 | 0.5302945 | 0.1222693 | 0.8532535 | 0.0951164 | 0.9124836 | 0.1734707 | 2773 | 0.3974197 | 0.0535887 | 0.8574359 | 0.0169394 | 0.1383868 | 0.0471738 | | | | | | |
| 1247 | 0.2327653 | 0.0608599 | 0.9164731 | 0.0782950 | 0.0271434 | 0.0043729 | 2774 | 0.2376444 | 0.0616967 | 0.8346856 | 0.0319449 | 0.1188548 | 0.0418083 | | | | | | |
| 1248 | 0.2738736 | 0.0505742 | 0.9151920 | 0.1138642 | 0.3448462 | 0.0200927 | 2775 | 0.1989131 | 0.0537649 | 0.8970938 | 0.0141046 | 0.0785012 | 0.0703693 | | | | | | |
| 1249 | 0.2490793 | 0.0343829 | 0.9787047 | 0.1078943 | 0.2789739 | 0.0417402 | 2776 | 0.0036064 | 0.0006830 | 0.0067760 | 0.0004333 | 0.0175627 | 0.0152100 | | | | | | |
| 1250 | 0.2297202 | 0.0696410 | 0.9377150 | 0.1601530 | 0.4456330 | 0.1128964 | 2777 | 1.4853952 | 0.1486686 | 2.5862095 | 0.1065336 | 0.1010278 | 0.0335748 | | | | | | |
| 1251 | 0.0132861 | 0.0012446 | 0.0363165 | 0.0081488 | 0.0322195 | 0.0017010 | 2778 | 1.1925919 | 0.2577906 | 1.2753079 | 0.0372231 | 0.4231847 | 0.1126026 | | | | | | |
| 1252 | 0.3019562 | 0.0602156 | 0.9639003 | 0.1211916 | 0.6293079 | 0.1084439 | 2779 | 0.0022693 | 0.0007860 | 0.0025802 | 0.0014116 | 0.0479333 | 0.0638838 | | | | | | |
| 1253 | 0.4690491 | 0.0649640 | 1.1569324 | 0.2053466 | 0.5709083 | 0.1304882 | 2780 | 0.7223614 | 0.2657272 | 1.3615913 | 0.0879321 | 0.1118176 | 0.0398186 | | | | | | |
| 1254 | 0.0735535 | 0.0231272 | 0.7343050 | 0.0541821 | 0.1179300 | 0.0134498 | 2781 | 0.0563155 | 0.0160584 | 0.2312937 | 0.0157148 | 0.0705637 | 0.0202225 | | | | | | |
| 1255 | 0.3339112 | 0.0730129 | 0.9794097 | 0.0887568 | 0.0569950 | 0.0213859 | 2782 | 0.0011193 | 0.0004796 | 0.0018944 | 0.0016465 | 0.0261291 | 0.0278103 | | | | | | |
| 1256 | 0.1908013 | 0.0368656 | 0.8677577 | 0.0422517 | 0.2275978 | 0.0388976 | 2783 | 0.0009911 | 0.0003367 | 0.0022644 | 0.0005763 | 0.0521206 | 0.0037009 | | | | | | |
| 1257 | 0.6986532 | 0.1279601 | 1.4475014 | 0.0919387 | 0.2680397 | 0.0464991 | 2784 | 0.2727146 | 0.0942746 | 0.6404607 | 0.0437021 | 0.0913395 | 0.0753197 | | | | | | |
| 1258 | 0.4854470 | 0.0623502 | 0.9581816 | 0.0981546 | 0.3459021 | 0.0829003 | 2785 | 0.2902922 | 0.0815494 | 0.4422081 | 0.0089387 | 0.0689866 | 0.0366877 | | | | | | |

【表２８－３６】

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1259 | 0.1279360 | 0.0505638 | 0.8994353 | 0.0860567 | 0.1522274 | 0.0187886 | 2786 | 0.0102765 | 0.0021944 | 0.0317259 | 0.0018401 | 0.0576260 | 0.0256811 | | | | | | |
| 1260 | 0.2773840 | 0.0702062 | 1.2149380 | 0.2295286 | 0.1291206 | 0.0251867 | 2787 | 0.0005167 | 0.0002172 | 0.0006032 | 0.0001896 | 0.0239282 | 0.0320570 | | | | | | |
| 1261 | 0.2689262 | 0.0491586 | 1.0361276 | 0.2963970 | 0.2425903 | 0.0174934 | 2788 | 0.0084965 | 0.0024968 | 0.0309092 | 0.0019084 | 0.0175027 | 0.0204110 | | | | | | |
| 1263 | 1.6813621 | 0.2002248 | 1.5301710 | 0.1421954 | 0.8012835 | 0.1052066 | 2789 | 0.0020551 | 0.0007875 | 0.0145503 | 0.0010512 | 0.0266584 | 0.0131078 | | | | | | |
| 1264 | 1.1284344 | 0.1673180 | 1.3374074 | 0.2139047 | 0.4073746 | 0.1285638 | 2790 | 0.0008354 | 0.0003982 | 0.0081196 | 0.0005133 | 0.0242859 | 0.0084150 | | | | | | |
| 1265 | 1.0774006 | 0.0311617 | 1.3704068 | 0.1747245 | 0.8351148 | 0.0526897 | 2791 | 0.0153318 | 0.0062985 | 0.0519370 | 0.0028458 | 0.0206824 | 0.0226480 | | | | | | |
| 1266 | 0.6472289 | 0.1212618 | 1.0154930 | 0.0801530 | 0.2479528 | 0.0851674 | 2792 | 0.0018924 | 0.0005598 | 0.0093246 | 0.0005805 | 0.0083729 | 0.0091187 | | | | | | |
| 1267 | 0.8237634 | 0.0137230 | 1.1063144 | 0.1637277 | 0.2939595 | 0.0249543 | 2793 | 0.0622854 | 0.0049861 | 0.1598164 | 0.0069726 | 0.0134876 | 0.0118923 | | | | | | |
| 1268 | 1.1859069 | 0.4890879 | 1.2200596 | 0.1845114 | 0.4011215 | 0.0105365 | 2794 | 0.0003993 | 0.0000467 | 0.0007983 | 0.0002251 | 0.0622806 | 0.0739598 | | | | | | |
| 1269 | 0.9818997 | 0.0757329 | 1.0045327 | 0.0422672 | 0.3058009 | 0.1212207 | 2795 | 0.0001486 | 0.0001478 | 0.0002150 | 0.0001962 | 0.0396071 | 0.0211574 | | | | | | |
| 1270 | 0.0030725 | 0.0009809 | 0.0044144 | 0.0010515 | 0.0029900 | 0.0029935 | 2796 | 0.0091736 | 0.0034706 | 0.0341944 | 0.0012355 | 0.0163491 | 0.0134426 | | | | | | |
| 1271 | 0.7558651 | 0.0490171 | 1.1061463 | 0.1581899 | 0.2746318 | 0.0716880 | 2797 | 0.0247881 | 0.0067025 | 0.0895860 | 0.0098787 | 0.0381065 | 0.0415483 | | | | | | |
| 1272 | 1.0920861 | 0.2150265 | 1.2729755 | 0.0349856 | 0.6159431 | 0.0177389 | 2798 | 0.0361618 | 0.0085936 | 0.1055090 | 0.0045071 | 0.0381794 | 0.0281542 | | | | | | |
| 1273 | 0.9113064 | 0.1513511 | 1.5905292 | 0.4382561 | 0.5210036 | 0.0180676 | 2799 | 0.0004905 | 0.0002565 | 0.0011158 | 0.0001334 | 0.0212048 | 0.0367278 | | | | | | |
| 1274 | 0.2380005 | 0.0310105 | 0.2886341 | 0.0374245 | 0.0095443 | 0.0050202 | 2800 | 0.0273560 | 0.0088108 | 0.0982409 | 0.0038992 | 0.0307879 | 0.0278978 | | | | | | |
| 1275 | 1.1344299 | 0.2724862 | 1.6390852 | 0.3655726 | 0.5376252 | 0.0401170 | 2801 | 0.0083010 | 0.0036977 | 0.0183209 | 0.0003659 | 0.0252680 | 0.0215168 | | | | | | |
| 1276 | 1.7303963 | 0.5014084 | 1.4020154 | 0.3291621 | 0.4785626 | 0.0505968 | 2802 | 0.0162374 | 0.0030448 | 0.0293537 | 0.0024489 | 0.0298099 | 0.0276037 | | | | | | |
| 1277 | 0.7495934 | 0.2098795 | 1.1918446 | 0.2324057 | 0.3683256 | 0.1136936 | 2803 | 0.0440369 | 0.0154128 | 0.1030566 | 0.0077580 | 0.0420513 | 0.0380221 | | | | | | |
| 1278 | 0.3161862 | 0.0138529 | 0.7264440 | 0.0970267 | 0.0187110 | 0.0163873 | 2804 | 0.0244463 | 0.0127126 | 0.0520222 | 0.0033943 | 0.0324592 | 0.0175922 | | | | | | |
| 1279 | 1.1696888 | 0.1113640 | 1.2516243 | 0.0864314 | 0.5964155 | 0.0717308 | 2805 | 0.0303138 | 0.0117616 | 0.1223927 | 0.0082463 | 0.0073262 | 0.0050003 | | | | | | |
| 1280 | 1.3462004 | 0.0274986 | 1.2628030 | 0.2810302 | 0.3131896 | 0.1769070 | 2806 | 0.0076871 | 0.0011724 | 0.0459285 | 0.0025637 | 0.0210299 | 0.0249968 | | | | | | |
| 1281 | 0.0019210 | 0.0004594 | 0.0034258 | 0.0003599 | 0 | 0 | 2807 | 0.2729202 | 0.0517422 | 0.6334141 | 0.0458533 | 0.0341030 | 0.0147647 | | | | | | |
| 1282 | 1.5098277 | 0.0866514 | 1.0597856 | 0.0778626 | 0.4425695 | 0.1743101 | 2808 | 0.0027622 | 0.0007208 | 0.0208271 | 0.0019960 | 0.0320653 | 0.0232420 | | | | | | |
| 1283 | 0.0483272 | 0.0154577 | 0.0486979 | 0.0139332 | 0.0259629 | 0.0087324 | 2809 | 0.0129311 | 0.0052668 | 0.0660361 | 0.0039470 | 0.0147676 | 0.0228853 | | | | | | |
| 1284 | 2.1335979 | 0.1669664 | 1.4815744 | 0.0363295 | 2.2456508 | 0.4022539 | 2810 | 0.0069708 | 0.0011722 | 0.0234546 | 0.0016672 | 0.0470054 | 0.0377010 | | | | | | |
| 1285 | 1.1396597 | 0.2580735 | 1.0764110 | 0.1202094 | 0.3726864 | 0.1046480 | 2811 | 0.4891717 | 0.1829334 | 0.5162991 | 0.0338210 | 0.0945000 | 0.0957038 | | | | | | |
| 1286 | 0.0005165 | 0.0001016 | 0.0005559 | 0.0003850 | 0 | 0 | 2812 | 0.3009263 | 0.1217957 | 0.5256594 | 0.0516179 | 0.0771653 | 0.0644539 | | | | | | |
| 1287 | 1.6089809 | 0.1720835 | 1.4827555 | 0.1607609 | 1.5978148 | 0.1554314 | 2813 | 0.0954734 | 0.0165561 | 0.2373430 | 0.0055281 | 0.0342743 | 0.0475356 | | | | | | |
| 1288 | 1.0927866 | 0.0064862 | 1.0970189 | 0.1721322 | 0.7231318 | 0.0727100 | 2814 | 0.2249062 | 0.0057142 | 0.5272675 | 0.0361928 | 0.0723234 | 0.0174392 | | | | | | |
| 1289 | 0.0004838 | 0.0001151 | 0.0008563 | 0.0004087 | 0.0175143 | 0.0303356 | 2815 | 0.0563550 | 0.0243243 | 0.2122466 | 0.0236290 | 0.0246953 | 0.0218257 | | | | | | |
| 1290 | 0.0215225 | 0.0048381 | 0.0298926 | 0.0071225 | 0.0117155 | 0.0202918 | 2816 | 0.0001912 | 0.0002050 | 0.0001396 | 0.0001221 | 0.0138966 | 0.0157374 | | | | | | |
| 1291 | 0.0070971 | 0.0019151 | 0.0081147 | 0.0019868 | 0.0000952 | 0.0001649 | 2817 | 0.0001006 | 0.0000944 | 0.0001982 | 0.0003433 | 0.0206071 | 0.0183115 | | | | | | |
| 1292 | 0.0149443 | 0.0025736 | 0.0256855 | 0.0060285 | 0.0078180 | 0.0067746 | 2818 | 0.0000587 | 0.0001016 | 0.0001294 | 0.0001687 | 0.0290242 | 0.0251154 | | | | | | |
| 1293 | 0.0163560 | 0.0020938 | 0.0326657 | 0.0052793 | 0.0047805 | 0.0082521 | 2819 | 0.0006653 | 0.0003733 | 0.0006486 | 0.0006671 | 0.0259133 | 0.0137982 | | | | | | |
| 1294 | 0.0076571 | 0.0002756 | 0.0118605 | 0.0010365 | 0.0102691 | 0.0075453 | 2820 | 0.0011258 | 0.0004985 | 0.0015400 | 0.0002695 | 0.0295470 | 0.0050635 | | | | | | |

【表２８－３７】

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1295 | 0.0047064 | 0.0002610 | 0.0097779 | 0.0022998 | 0 | 0 | 2821 | 0.0002878 | 0.0002575 | 0.0006298 | 0.0002823 | 0.0380064 | 0.0335411 |
| 1296 | 0.2815976 | 0.0712960 | 0.5378056 | 0.0119175 | 0.1829700 | 0.0216104 | 2822 | 0.0002404 | 0.0002132 | 0.0002841 | 0.0004612 | 0.0510858 | 0.0444087 |
| 1297 | 0.0006716 | 0.0006499 | 0.0027176 | 0.0023604 | 0.0040475 | 0.0035818 | 2823 | 0.0001026 | 0.0001389 | 0.0002041 | 0.0003534 | 0.0281929 | 0.0256184 |
| 1299 | 0.0030081 | 0.0002307 | 0.0112426 | 0.0035445 | 0.0006228 | 0.0010787 | 2824 | 0.0000828 | 0.0001416 | 0 | 0 | 0.0389431 | 0.0632744 |
| 1301 | 0.0001650 | 0.0001069 | 0.0012804 | 0.0011257 | 0.0002933 | 0.0005079 | 2825 | 0.0000509 | 0.0000881 | 0 | 0 | 0.0166461 | 0.0162737 |
| 1303 | 0.8264989 | 0.0348683 | 0.9289628 | 0.1844047 | 1.1634049 | 0.3099239 | 2826 | 0.0001805 | 0.0001249 | 0.0002328 | 0.0002220 | 0.0116399 | 0.0167412 |
| 1304 | 0.6847869 | 0.0751556 | 0.7263518 | 0.2016533 | 0.4878505 | 0.1987877 | 2827 | 0.0000265 | 0.0000458 | 0 | 0 | 0.0167043 | 0.0020318 |
| 1305 | 0.4568009 | 0.0766729 | 0.5868726 | 0.1028414 | 0.2586080 | 0.2599843 | 2828 | 0.0000630 | 0.0000690 | 0 | 0 | 0.0395113 | 0.0397022 |
| 1306 | 0.6310500 | 0.0226348 | 0.5931585 | 0.1343155 | 0.2482448 | 0.1974931 | 2829 | 0 | 0 | 0.0001625 | 0.0002814 | 0.0180231 | 0.0210823 |
| 1307 | 0.4040803 | 0.0442675 | 0.4606855 | 0.1052730 | 0.4301077 | 0.0503830 | 2830 | 0.0000345 | 0.0000598 | 0 | 0 | 0.0349953 | 0.0288701 |
| 1308 | 0.4996627 | 0.0600419 | 0.4248040 | 0.0780572 | 0.2472899 | 0.1946193 | 2831 | 0.0000227 | 0.0000392 | 0 | 0 | 0.0186741 | 0.0161778 |
| 1309 | 0.5211774 | 0.1030705 | 0.4898545 | 0.1057105 | 0.3240493 | 0.0335340 | 2832 | 0.0000178 | 0.0000309 | 0 | 0 | 0.0231429 | 0.0218715 |
| 1310 | 0.5429047 | 0.0393296 | 0.4979120 | 0.1249797 | 0.2335368 | 0.0761849 | 2833 | 0.0000498 | 0.0000501 | 0 | 0 | 0.0080709 | 0.0139791 |
| 1311 | 0.5066738 | 0.0214243 | 0.4153233 | 0.0597882 | 0.6541400 | 0.3256544 | 2834 | 0 | 0 | 0.0002425 | 0.0002437 | 0.0251031 | 0.0401342 |
| 1312 | 0.4764878 | 0.0592875 | 0.5815473 | 0.0709748 | 0.4710723 | 0.0278366 | 2835 | 0.0000231 | 0.0000260 | 0 | 0 | 0.0458037 | 0.0503060 |
| 1313 | 0.7017158 | 0.0241836 | 0.8152373 | 0.1870629 | 0.5445278 | 0.1911815 | 2836 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0125791 | 0.0147558 |
| 1314 | 0.3932338 | 0.0488905 | 0.5168607 | 0.0724310 | 0.1152818 | 0.0573888 | 2837 | 0.0000167 | 0.0000289 | 0 | 0 | 0.0459958 | 0.0483104 |
| 1315 | 0.3612068 | 0.0251576 | 0.2131064 | 0.0297224 | 1.0146173 | 0.3336144 | 2838 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0438270 | 0.0499550 |
| 1316 | 0.4100450 | 0.0317937 | 0.4698933 | 0.1080257 | 0.3563561 | 0.1643632 | 2839 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0285740 | 0.0081960 |
| 1317 | 0.7188392 | 0.0916055 | 0.7000382 | 0.1172436 | 0.3648277 | 0.1855358 | 2840 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0334819 | 0.0319670 |
| 1318 | 0.0573389 | 0.0086607 | 0.2031193 | 0.0354502 | 0.0885365 | 0.0945570 | 2841 | 0.0000174 | 0.0000206 | 0 | 0 | 0.0218098 | 0.0190279 |
| 1320 | 0.4079631 | 0.0383210 | 0.5231893 | 0.0947225 | 0.4844457 | 0.2199551 | 2842 | 0.0000563 | 0.0000584 | 0 | 0 | 0.0454356 | 0.0457183 |
| 1321 | 0.0042267 | 0.0001551 | 0.0069387 | 0.0016026 | 0.0017954 | 0.0031097 | 2843 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0081572 | 0.0141287 |
| 1327 | 0 | 0 | 0.0002018 | 0.0003495 | 0.0119341 | 0.0150909 | 2844 | 0.0000198 | 0.0000342 | 0 | 0 | 0.0477362 | 0.0167686 |
| 1330 | 0.6050875 | 0.0793211 | 0.6646954 | 0.1651502 | 0.3522013 | 0.0797373 | 2845 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0573050 | 0.0310995 |
| 1333 | 0.6928471 | 0.0504455 | 0.5944484 | 0.1777732 | 0.1756106 | 0.0755686 | 2846 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0102282 | 0.0049094 |
| 1334 | 0.1181383 | 0.0119854 | 0.3310020 | 0.0114490 | 0.1580894 | 0.0704209 | 2847 | 0.0000067 | 0.0000116 | 0 | 0 | 0.0074923 | 0.0120475 |
| 1335 | 0.1932326 | 0.0184962 | 0.3723622 | 0.0240655 | 0.2022450 | 0.1335212 | 2848 | 0 | 0 | 0.0000213 | 0.0000370 | 0.0455491 | 0.0046805 |
| 1336 | 0.0045540 | 0.0003984 | 0.0016805 | 0.0015099 | 0.0384825 | 0.0338409 | 2849 | 0.0000019 | 0.0000032 | 0 | 0 | 0.0083024 | 0.0072116 |
| 1337 | 0.1746442 | 0.0282145 | 0.3700011 | 0.0525269 | 0.2697839 | 0.0632154 | 2850 | 0 | 0 | 0.0000265 | 0.0000458 | 0.0036939 | 0.0041278 |
| 1338 | 0.0746130 | 0.0010281 | 0.2118025 | 0.0219761 | 0.0372844 | 0.0645784 | 2851 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0349438 | 0.0203174 |
| 1341 | 0.5972927 | 0.0711713 | 0.7208856 | 0.1292490 | 0.6915037 | 0.1836990 | 2852 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0342592 | 0.0079451 |
| 1342 | 0.7460815 | 0.0959989 | 0.8945715 | 0.1062130 | 0.2895301 | 0.0719730 | 2853 | 0.0000402 | 0.0000696 | 0.0001189 | 0.0002060 | 0.0480202 | 0.0176360 |
| 1343 | 0.4256132 | 0.0201074 | 0.7126413 | 0.0700161 | 0.8056843 | ND | 2854 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0129994 | 0.0129078 |
| 1344 | 0.5057468 | 0.0579023 | 0.6910458 | 0.1199498 | 0.2908224 | 0.1402402 | 2855 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0252535 | 0.0221383 |

【表２８－３８】

| | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1345 | 0.0864121 | 0.0152045 | 0.2679277 | 0.0333688 | 0.0847612 | 0.0229798 | 2856 | 0.0000077 | 0.0000133 | 0 | 0 | 0.0190804 | 0.0159003 |
| 1346 | 0.8558083 | 0.0984042 | 1.2298640 | 0.2181585 | 1.4460087 | 0.3049144 | 2857 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 1347 | 0.2896990 | 0.0304426 | 0.7673532 | 0.1334959 | 0.4212443 | 0.1023431 | 2858 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0244538 | 0.0244036 |
| 1350 | 0.0022577 | 0.0002827 | 0.0060852 | 0.0025951 | 0.0043857 | 0.0075962 | 2859 | 0 | 0 | 0.0002888 | 0.0005002 | 0.0080749 | 0.0017306 |
| 1351 | 0.2476978 | 0.0080758 | 0.5235681 | 0.0745269 | 0.1913771 | 0.1964248 | 2860 | 0 | 0 | 0.0002681 | 0.0002633 | 0.0021884 | 0.0035478 |
| 1352 | 0.0993521 | 0.0111684 | 0.3239891 | 0.0374916 | 0.0540040 | 0.0509742 | 2861 | 0 | 0 | 0.0002669 | 0.0002748 | 0.0016847 | 0.0024030 |
| 1353 | 1.1914409 | 0.1837432 | 1.1771487 | 0.1476558 | 0.2722678 | 0.1255312 | 2862 | 0 | 0 | 0.0001602 | 0.0002775 | 0.0049344 | 0.0052493 |
| 1354 | 1.2633572 | 0.0829061 | 1.2314698 | 0.1182702 | 0.2824483 | 0.1448161 | 2863 | 0 | 0 | 0.0000474 | 0.0000822 | 0.0005569 | 0.0009646 |
| 1355 | 0.0231168 | 0.0004706 | 0.0794225 | 0.0063597 | 0.0367779 | 0.0400407 | 2864 | 0 | 0 | 0.0001212 | 0.0002100 | 0.0011866 | 0.0018390 |
| 1356 | 1.5424990 | 0.0688198 | 1.7660105 | 0.2269430 | 1.9861043 | 0.8293464 | 2865 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0010718 | 0.0013574 |
| 1357 | 0.6168456 | 0.0299278 | 0.7997678 | 0.1350488 | 0.1900108 | 0.0369200 | 2866 | 0.0000058 | 0.0000100 | 0.0006303 | 0.0006643 | 0.0019419 | 0.0031087 |
| 1358 | 0.0007803 | 0.0004728 | 0.0026484 | 0.0022387 | 0.0102781 | 0.0178022 | 2867 | 0 | 0 | 0.0003540 | 0.0003066 | 0.0033883 | 0.0017748 |
| 1359 | 0.0044414 | 0.0005595 | 0.0103715 | 0.0036088 | 0.0154930 | 0.0134659 | 2868 | 0 | 0 | 0.0001863 | 0.0001773 | 0.0016577 | 0.0028525 |
| 1360 | 0.3969584 | 0.0889986 | 0.6451576 | 0.0482130 | 0.1323221 | 0.0533468 | 2869 | 0.0020518 | 0.0009065 | 0.2081323 | 0.0054836 | 0.0037159 | 0.0020826 |
| 1361 | 0.0461805 | 0.0016185 | 0.0814758 | 0.0101497 | 0.0374431 | 0.0564026 | 2870 | 0 | 0 | 0.0003318 | 0.0005747 | 0.0021541 | 0.0031407 |
| 1362 | 0.0544560 | 0.0117960 | 0.0854991 | 0.0106106 | 0.0075080 | 0.0130042 | 2871 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0023578 | 0.0025982 |
| 1363 | 0.0569595 | 0.0040718 | 0.0725855 | 0.0090996 | 0.0377465 | 0.0313624 | 2872 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0012825 | 0.0022213 |
| 1364 | 0.7234808 | 0.1034622 | 0.9833722 | 0.1413703 | 1.6573755 | 0.3939349 | 2873 | 0 | 0 | 0.0002074 | 0.0002360 | 0.0014732 | 0.0013584 |
| 1367 | 0.0828664 | 0.0073093 | 0.1621287 | 0.0192502 | 0.0196954 | 0.0217797 | 2874 | 0 | 0 | 0.0002899 | 0.0005021 | 0.0009984 | 0.0017178 |
| 1368 | 0.0014108 | 0.0004584 | 0.0039616 | 0.0034724 | 0.0082138 | 0.0142268 | 2875 | 0 | 0 | 0.0002781 | 0.0004817 | 0.0055298 | 0.0046041 |
| 1370 | 0.5783562 | 0.0106526 | 0.7707529 | 0.0911993 | 0.2861393 | 0.2271587 | 2876 | 0 | 0 | 0.0003166 | 0.0005483 | 0.0008854 | 0.0012248 |
| 1371 | 0.6613490 | 0.0701623 | 0.6793242 | 0.0526661 | 0.1103684 | 0.0531069 | 2877 | 0 | 0 | 0.0025274 | 0.0007185 | 0.0022142 | 0.0038351 |
| 1372 | 0.0003712 | 0.0002397 | 0.0024521 | 0.0023680 | 0.0041898 | 0.0072570 | 2878 | 0 | 0 | 0.0002978 | 0.0000825 | 0.0018848 | 0.0032645 |
| 1373 | 0.1994114 | 0.0234843 | 0.3074554 | 0.0577236 | 0.0629073 | 0.0232780 | 2879 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0002481 | 0.0004297 |
| 1374 | 0.0092679 | 0.0014701 | 0.0055439 | 0.0029954 | 0.0023322 | 0.0040395 | 2880 | 0.0005315 | 0.0003093 | 0.0124327 | 0.0008392 | 0.0010522 | 0.0018225 |
| 1375 | 0.0108961 | 0.0025129 | 0.0143257 | 0.0059740 | 0.0999217 | 0.0912612 | 2881 | 0 | 0 | 0.0000474 | 0.0000822 | 0.0026997 | 0.0028421 |
| 1376 | 0.0023645 | 0.0004094 | 0.0065445 | 0.0017498 | 0.0481522 | 0.0311374 | 2882 | 0.0037903 | 0.0009412 | 0.0323119 | 0.0020039 | 0.0059147 | 0.0051983 |
| 1379 | 0.0065776 | 0.0012042 | 0.0106892 | 0.0002382 | 0.0192539 | 0.0204961 | 2883 | 0 | 0 | 0.0000537 | 0.0000833 | 0.0043697 | 0.0023327 |
| 1380 | 0.0059850 | 0.0008174 | 0.0107511 | 0.0045623 | 0.0307652 | 0.0290461 | 2884 | 0 | 0 | 0.0000570 | 0.0000896 | 0.0022006 | 0.0038116 |
| 1383 | 0.0021749 | 0.0010568 | 0.0025897 | 0.0022843 | 0.0122125 | 0.0211527 | 2885 | 0 | 0 | 0.0002330 | 0.0002191 | 0.0040164 | 0.0009911 |
| 1384 | 0.0201986 | 0.0036671 | 0.0045267 | 0.0044221 | 0.0495302 | 0.0534342 | 2886 | 0 | 0 | 0.0001602 | 0.0002775 | 0.0011637 | 0.0016119 |
| 1385 | 0.0034163 | 0.0012737 | 0.0030351 | 0.0036663 | 0.0297239 | 0.0432839 | 2887 | 0 | 0 | 0.0000267 | 0.0000462 | 0.0023179 | 0.0010353 |
| 1386 | 0.0062740 | 0.0007991 | 0.0019742 | 0.0023204 | 0.0180666 | 0.0216462 | 2888 | 0 | 0 | 0.0001182 | 0.0002048 | 0.0008501 | 0.0014725 |
| 1387 | 0.0001134 | 0.0001965 | 0.0045099 | 0.0030160 | 0.0807376 | 0.0141489 | 2889 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0010199 | 0.0010147 |
| 1388 | 0.0030133 | 0.0007562 | 0.0063548 | 0.0047191 | 0.0211779 | 0.0202776 | 2890 | 0 | 0 | 0.0003415 | 0.0002961 | 0.0035395 | 0.0057551 |

【表２８－３９】

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1390 | 0.0130558 | 0.0045170 | 0.0094776 | 0.0035698 | 0.0046785 | 0.0072464 | 2891 | 0 | 0 | 0.0002496 | 0.0004323 | 0.0039934 | 0.0034689 |
| 1392 | 0.0068165 | 0.0025737 | 0.0070911 | 0.0012062 | 0.0512180 | 0.0451026 | 2892 | 0.0000529 | 0.0000917 | 0.0030757 | 0.0019897 | 0.0020351 | 0.0020654 |
| 1397 | 0.0016937 | 0.0005556 | 0.0019289 | 0.0019074 | 0.0183168 | 0.0233753 | 2893 | 0.0011150 | 0.0001869 | 0.0019492 | 0.0001388 | 0.0033770 | 0.0047579 |
| 1398 | 0.0055518 | 0.0007522 | 0.0021866 | 0.0014906 | 0.0028878 | 0.0050019 | 2894 | 0.0027127 | 0.0011710 | 0.0167373 | 0.0017385 | 0.0007790 | 0.0013493 |
| 1399 | 0.0119630 | 0.0018470 | 0.0031473 | 0.0016425 | 0.0507477 | 0.0158791 | 2895 | 0 | 0 | 0.0001182 | 0.0002048 | 0.0040675 | 0.0020663 |
| 1400 | 0.0022620 | 0.0001417 | 0.0080035 | 0.0017042 | 0.0152494 | 0.0211637 | 2896 | 0 | 0 | 0.0001182 | 0.0002048 | 0.0036510 | 0.0053729 |
| 1401 | 0.0063997 | 0.0019762 | 0.0065663 | 0.0025193 | 0.0437719 | 0.0379167 | 2897 | 0 | 0 | 0.0002948 | 0.0005106 | 0.0011115 | 0.0019252 |
| 1402 | 0.0132838 | 0.0023278 | 0.0149266 | 0.0064195 | 0.0028729 | 0.0049760 | 2898 | 0 | 0 | 0.0000381 | 0.0000661 | 0.0007082 | 0.0006634 |
| 1403 | 0.0088257 | 0.0001919 | 0.0028231 | 0.0026780 | 0.0287620 | 0.0185891 | 2899 | 0 | 0 | 0.0001831 | 0.0003171 | 0.0006016 | 0.0010420 |
| 1405 | 0.0042158 | 0.0006493 | 0.0051506 | 0.0014644 | 0.0183286 | 0.0317461 | 2900 | 0 | 0 | 0.0003209 | 0.0005558 | 0.0039228 | 0.0007570 |
| 1406 | 0.8243231 | 0.0943831 | 0.8681499 | 0.1434499 | 0.8834522 | 0.1469432 | 2901 | 0 | 0 | 0.0000576 | 0.0000998 | 0.0054072 | 0.0071568 |
| 1407 | 0.0143251 | 0.0016704 | 0.0073434 | 0.0027828 | 0.0158826 | 0.0178846 | 2902 | 0 | 0 | 0.0000305 | 0.0000529 | 0.0001442 | 0.0002498 |
| 1409 | 0.0055424 | 0.0013159 | 0.0031955 | 0.0031380 | 0.0124528 | 0.0215689 | 2903 | 0 | 0 | 0.0001593 | 0.0002758 | 0.0011581 | 0.0020058 |
| 1410 | 0.0002303 | 0.0003312 | 0.0024258 | 0.0027272 | 0.0686847 | 0.0177516 | 2904 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0003311 | 0.0005735 |
| 1411 | 0.0062471 | 0.0012585 | 0.0122205 | 0.0023064 | 0.0278328 | 0.0294955 | 2905 | 0 | 0 | 0.0001564 | 0.0002709 | 0.0037226 | 0.0032390 |
| 1412 | 0.0066120 | 0.0002031 | 0.0094052 | 0.0019897 | 0.0687211 | 0.0604874 | 2906 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0005633 | 0.0008715 |
| 1413 | 0.0052056 | 0.0004820 | 0.0097013 | 0.0044177 | 0.0203035 | 0.0179129 | 2908 | 0 | 0 | 0.0001842 | 0.0002249 | 0.0024658 | 0.0021603 |
| 1414 | 0.0000936 | 0.0001622 | 0.0005115 | 0.0008859 | 0.0477650 | 0.0585549 | 2909 | 0 | 0 | 0.0001259 | 0.0002180 | 0.0040101 | 0.0038924 |
| 1415 | 0.0041746 | 0.0004173 | 0.0054165 | 0.0051233 | 0.0308880 | 0.0315368 | 2910 | 0.0034462 | 0.0011661 | 0.0797412 | 0.0062000 | 0.0010729 | 0.0009440 |
| 1416 | 0.0010539 | 0.0003276 | 0.0023147 | 0.0033939 | 0.0436969 | 0.0756853 | 2911 | 0 | 0 | 0.0004225 | 0.0007143 | 0.0017709 | 0.0029193 |
| 1417 | 0.0077768 | 0.0008684 | 0.0018469 | 0.0014845 | 0.0281775 | 0.0307048 | 2912 | 0 | 0 | 0.0003242 | 0.0005615 | 0.0038792 | 0.0056539 |
| 1418 | 0.0049297 | 0.0004853 | 0.0094587 | 0.0021356 | 0.0171044 | 0.0180243 | 2913 | 0 | 0 | 0.0001513 | 0.0001678 | 0.0022592 | 0.0018677 |
| 1420 | 0.0256923 | 0.0078409 | 0.0123588 | 0.0015035 | 0.0228676 | 0.0088404 | 2914 | 0 | 0 | 0.0002174 | 0.0003766 | 0.0012510 | 0.0021667 |
| 1421 | 0.0129485 | 0.0012551 | 0.0084313 | 0.0016184 | 0.0137454 | 0.0223733 | 2915 | 0 | 0 | 0.0001067 | 0.0001470 | 0.0054819 | 0.0066289 |
| 1422 | 0.0078802 | 0.0018910 | 0.0060468 | 0.0021233 | 0.0813556 | 0.0681405 | 2916 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0041247 | 0.0036105 |
| 1423 | 0.0070940 | 0.0007981 | 0.0053212 | 0.0014374 | 0.0705585 | 0.0728304 | 2917 | 0 | 0 | 0.0002746 | 0.0004757 | 0.0000855 | 0.0001482 |
| 1424 | 0.0008130 | 0.0004527 | 0.0016318 | 0.0028264 | 0.0670937 | 0.0406387 | 2918 | 0 | 0 | 0.0000068 | 0.0000117 | 0.0017541 | 0.0030381 |
| 1425 | 0.0110881 | 0.0015407 | 0.0048686 | 0.0025159 | 0.0500578 | 0.0523645 | 2919 | 0 | 0 | 0.0002970 | 0.0002581 | 0.0040739 | 0.0035841 |
| 1426 | 0.0068704 | 0.0017598 | 0.0146260 | 0.0013185 | 0.1600268 | 0.0733184 | 2920 | 0 | 0 | 0.0001177 | 0.0002038 | 0.0014027 | 0.0024295 |
| 1429 | 0.0081553 | 0.0002773 | 0.0096982 | 0.0051245 | 0.1565784 | 0.0591747 | 2921 | 0 | 0 | 0.0000153 | 0.0000264 | 0.0005847 | 0.0005410 |
| 1430 | 0.0176537 | 0.0036880 | 0.0113208 | 0.0086165 | 0.1293613 | 0.1228146 | 2922 | 0 | 0 | 0.0011449 | 0.0010408 | 0.0014810 | 0.0021917 |
| 1431 | 0.0009808 | 0.0002353 | 0.0018923 | 0.0007905 | 0.0455805 | 0.0786438 | 2923 | 0 | 0 | 0.0000339 | 0.0000587 | 0.0009080 | 0.0008282 |
| 1432 | 1.6769521 | 0.1358782 | 1.1975277 | 0.1253814 | 2.7859320 | 0.9500725 | 2924 | 0 | 0 | 0.0001273 | 0.0001704 | 0.0059730 | 0.0021195 |
| 1434 | 0.0092783 | 0.0006747 | 0.0039659 | 0.0006545 | 0.0676869 | 0.0736203 | 2925 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0038295 | 0.0022180 |
| 1435 | 0.0082659 | 0.0014217 | 0.0013992 | 0.0004648 | 0.0525379 | 0.0047490 | 2927 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0046161 | 0.0041805 |

【表２８－４０】

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1436 | 1.2706683 | 0.0386444 | 1.4614020 | 0.1126878 | 0.4778224 | 0.2027137 | 2928 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0073779 | 0.0026917 |
| 1437 | 1.0759630 | 0.1887580 | 1.2882017 | 0.0692693 | 0.6910859 | 0.1672701 | 2929 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0034361 | 0.0047670 |
| 1438 | 0.8194347 | 0.1330127 | 1.0527987 | 0.2154229 | 1.6659825 | 0.3815178 | 2930 | 0 | 0 | 0.0000474 | 0.0000822 | 0.0013358 | 0.0023136 |
| 1439 | 1.7342303 | 0.3179971 | 1.6107447 | 0.4184550 | 0.8260412 | 0.2035492 | 2931 | 0.0000534 | 0.0000925 | 0 | 0 | 0.0026675 | 0.0042280 |
| 1440 | 1.8026610 | 0.0431962 | 1.6989601 | 0.3216126 | 1.7501626 | 0.7554963 | 2932 | 0 | 0 | 0.0000267 | 0.0000462 | 0.0028965 | 0.0035536 |
| 1441 | 1.1464581 | 0.0708931 | 1.0058035 | 0.0682755 | 0.8334941 | 0.3697624 | 2933 | 0 | 0 | 0.0001890 | 0.0003273 | 0.0026844 | 0.0029192 |
| 1442 | 0.0362756 | 0.0077594 | 0.0340583 | 0.0056199 | 0.0750984 | 0.0658393 | 2934 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0039800 | 0.0044691 |
| 1443 | 0.0123365 | 0.0020441 | 0.0100571 | 0.0043855 | 0.0858145 | 0.0394117 | 2935 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0034927 | 0.0026749 |
| 1445 | 0.0164562 | 0.0033337 | 0.0105157 | 0.0020924 | 0.0136607 | 0.0060145 | 2936 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0062780 | 0.0054382 |
| 1446 | 0.0096392 | 0.0009152 | 0.0065398 | 0.0018722 | 0.0770297 | 0.0268303 | 2937 | 0 | 0 | 0.0001526 | 0.0002643 | 0.0007357 | 0.0004362 |
| 1447 | 0.0244236 | 0.0021775 | 0.0291058 | 0.0051112 | 0.0802453 | 0.0521987 | 2938 | 0 | 0 | 0.0000992 | 0.0001718 | 0.0001571 | 0.0002721 |
| 1448 | 0.0217292 | 0.0035931 | 0.0201936 | 0.0066141 | 0.0637462 | 0.0648064 | 2939 | 0 | 0 | 0.0000576 | 0.0000998 | 0.0028504 | 0.0007973 |
| 1449 | 0.3703416 | 0.0561277 | 0.4315851 | 0.0711029 | 0.3525834 | 0.1473920 | 2940 | 0.0000181 | 0.0000314 | 0.0000636 | 0.0000692 | 0.0035870 | 0.0045199 |
| 1450 | 0.0067031 | 0.0002325 | 0.0197868 | 0.0010769 | 0.0079066 | 0.0118427 | 2941 | 0 | 0 | 0.0003521 | 0.0003943 | 0.0053909 | 0.0027417 |
| 1451 | 0.0155757 | 0.0030173 | 0.0223585 | 0.0020872 | 0.1926125 | 0.0752902 | 2942 | 0 | 0 | 0.0003013 | 0.0005219 | 0.0033073 | 0.0028649 |
| 1452 | 0.8230353 | 0.0853763 | 0.8026486 | 0.0863983 | 0.1507741 | 0.0394820 | 2943 | 0 | 0 | 0.0002389 | 0.0004137 | 0.0033973 | 0.0029948 |
| 1453 | 0.1318978 | 0.0224653 | 0.2025793 | 0.0162863 | 0.1062978 | 0.0079086 | 2944 | 0.0021967 | 0.0005349 | 0.0071147 | 0.0008935 | 0.0039586 | 0.0006191 |
| 1454 | 0.0000171 | 0.0000296 | 0.0003218 | 0.0003808 | 0 | 0 | 2945 | 0 | 0 | 0.0005185 | 0.0003487 | 0.0028645 | 0.0018528 |
| 1455 | 0.0401872 | 0.0119029 | 0.3701966 | 0.0465404 | 0.1888732 | 0.0226406 | 2946 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0008874 | 0.0015370 |
| 1456 | 0.2449640 | 0.0433679 | 0.3304413 | 0.0233954 | 0.3596319 | 0.1684708 | 2947 | 0 | 0 | 0.0002103 | 0.0003643 | 0.0013668 | 0.0017579 |
| 1459 | 0.2391696 | 0.0179026 | 0.2162631 | 0.0238057 | 0.1345462 | 0.0156782 | 2948 | 0.0008787 | 0.0001085 | 0.0011029 | 0.0003238 | 0.0056271 | 0.0075298 |
| 1460 | 0.5431378 | 0.0747152 | 0.6709769 | 0.0180195 | 0.4960652 | 0.0387229 | 2949 | 0 | 0 | 0.0002449 | 0.0003644 | 0.0088685 | 0.0027423 |
| 1462 | 0.5486038 | 0.0395963 | 0.5959308 | 0.0865567 | 0.3753196 | 0.0222590 | 2950 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0041176 | 0.0042734 |
| 1463 | 1.1745388 | 0.1384558 | 1.1169411 | 0.0293916 | 0.3646308 | 0.1622491 | 2951 | 0 | 0 | 0.0000648 | 0.0001123 | 0.0051045 | 0.0011025 |
| 1465 | 0.0505800 | 0.0095949 | 0.0618641 | 0.0143722 | 0.0203385 | 0.0069790 | 2952 | 0 | 0 | 0.0002780 | 0.0003366 | 0.0044292 | 0.0040755 |
| 1466 | 0.5597672 | 0.1120257 | 0.3788373 | 0.0657574 | 0.3404441 | 0.1540589 | 2953 | 0 | 0 | 0.0000458 | 0.0000793 | 0.0040634 | 0.0026033 |
| 1467 | 0.5179472 | 0.0305329 | 0.4425254 | 0.0094478 | 0.3304933 | 0.0285065 | 2954 | 0 | 0 | 0.0003967 | 0.0006871 | 0.0032936 | 0.0038747 |
| 1468 | 0.2442021 | 0.0606409 | 0.2205584 | 0.0286144 | 0.2542248 | 0.0201375 | 2955 | 0.0005453 | 0.0000850 | 0.0008395 | 0.0003224 | 0.0019053 | 0.0014105 |
| 1469 | 0.6598824 | 0.0711910 | 0.5973092 | 0.0814783 | 0.5347927 | 0.0877895 | 2956 | 0.0003284 | 0.0003326 | 0.0002793 | 0.0004837 | 0.0211403 | 0.0366160 |
| 1470 | 0.5154500 | 0.0401134 | 0.4196503 | 0.0758474 | 0.2334831 | 0.0605385 | 2957 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0535077 | 0.0515463 |
| 1471 | 0.4421111 | 0.0297634 | 0.3776197 | 0.0669732 | 0.1355433 | 0.1187545 | 2958 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0534843 | 0.0464883 |
| 1474 | 0.4187362 | 0.0370402 | 0.3662703 | 0.0514368 | 0.2939030 | 0.0189036 | 2959 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0405418 | 0.0081317 |
| 1475 | 0.4351635 | 0.0271134 | 0.4775194 | 0.1070030 | 0.5611848 | 0.0826185 | 2960 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0268907 | 0.0465761 |
| 1476 | 0.1234005 | 0.0116981 | 0.2945880 | 0.0267399 | 0.2212851 | 0.0153789 | 2961 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0132501 | 0.0229498 |
| 1480 | 0.1188290 | 0.0326226 | 0.1996171 | 0.0496048 | 0.3612866 | 0.0237007 | 2962 | 0.0029148 | 0.0011618 | 0.0081817 | 0.0013680 | 0.0190160 | 0.0329367 |

【表２８－４１】

| | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1481 | 0.0002826 | 0.0003823 | 0.0006922 | 0.0007397 | 0.0002372 | 0.0004109 | 2963 | 0.0000368 | 0.0000638 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 1482 | 0.1552174 | 0.0266779 | 0.2351971 | 0.0214493 | 0.2468712 | 0.0239869 | 2964 | 0.0000233 | 0.0000237 | 0.0000750 | 0.0000671 | 0.0345806 | 0.0335201 | |
| 1483 | 0.0004804 | 0.0001445 | 0.0007594 | 0.0001764 | 0.0108597 | 0.0120584 | 2965 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0147787 | 0.0255975 | |
| 1485 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0092575 | 0.0088783 | 2966 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0109951 | 0.0172768 | |
| 1486 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0028543 | 0.0049437 | 2967 | 0.0001165 | 0.0002017 | 0.0009887 | 0.0002295 | 0.0744903 | 0.0845345 | |
| 1487 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0156314 | 0.0138608 | 2968 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0259785 | 0.0449960 | |
| 1488 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0116046 | 0.0200998 | 2969 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0295550 | 0.0073847 | |
| 1489 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0240920 | 0.0219922 | 2970 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0038118 | 0.0066022 | |
| 1490 | 0.0001971 | 0.0001366 | 0.0004311 | 0.0005511 | 0.0128171 | 0.0120923 | 2971 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0034879 | 0.0060413 | |
| 1491 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2972 | 0 | 0 | 0.0000318 | 0.0000551 | 0 | 0 | |
| 1492 | 0.0001602 | 0.0001126 | 0.0002620 | 0.0003662 | 0.0208177 | 0.0183588 | 2973 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0539533 | 0.0421255 | |
| 1493 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0075576 | 0.0130902 | 2974 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0047027 | 0.0081453 | |
| 1494 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0201115 | 0.0175185 | 2975 | 0.5060688 | 0.1143204 | 0.7881679 | 0.0500019 | 0.3087274 | 0.0547200 | |
| 1495 | 0.0009526 | 0.0004679 | 0.0019682 | 0.0017312 | 0.0018253 | 0.0019164 | 2976 | 0 | 0 | 0.0004428 | 0.0003835 | 0.0299059 | 0.0259000 | |
| 1496 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0062954 | 0.0109039 | 2977 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0059492 | 0.0103043 | |
| 1497 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0125662 | 0.0109712 | 2978 | 0 | 0 | 0.0000772 | 0.0001337 | 0.0163306 | 0.0282854 | |
| 1498 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2979 | 0.0008297 | 0.0006033 | 0.0003828 | 0.0002474 | 0.0167764 | 0.0235896 | |
| 1499 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0232621 | 0.0179497 | 2980 | 0 | 0 | 0.0005189 | 0.0003060 | 0.0306022 | 0.0398638 | |
| 1500 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0063550 | 0.0110071 | 2981 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0605622 | 0.0638594 | |
| 1501 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0104711 | 0.0102432 | 2982 | 0 | 0 | 0.0000294 | 0.0000509 | 0.1130838 | 0.0589247 | |
| 1502 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0057084 | 0.0098872 | 2983 | 0 | 0 | 0.0006916 | 0.0003873 | 0.0505178 | 0.0531373 | |
| 1503 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0137267 | 0.0120369 | | 1.6864822 | 0.2023517 | 1.8296691 | 0.2622726 | 1.3533184 | 0.3489609 | |
| 1504 | 0.0001844 | 0.0000326 | 0 | 0 | 0.0022244 | 0.0030548 | | 1.2152631 | 0.0715746 | 1.9253447 | 0.2295974 | 1.4055953 | 0.5005810 | |
| 1505 | 0.0007358 | 0.0001360 | 0.0005113 | 0.0004625 | 0.0178155 | 0.0111417 | | 0.4541910 | 0.0455837 | 0.7196244 | 0.2152985 | 0.3611981 | 0.1391544 | |

ND: 検出されず

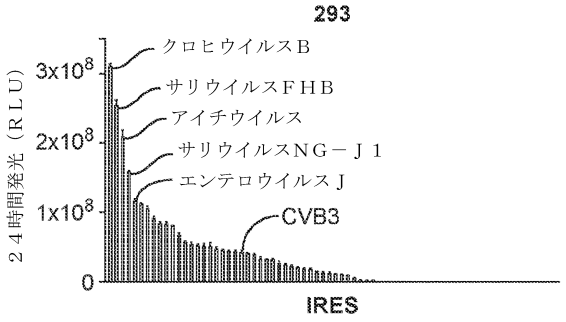
【１２０７】

**参照による組み込み**

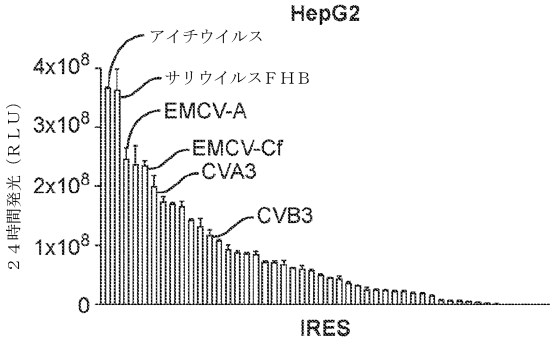
この本明細書に言及される全ての刊行物、特許及び特許出願は、各個別の刊行物、特許、または特許出願が、明確かつ個別に参照により本明細書に組み込まれることが示されているのと同程度に、参照により本明細書に組み込まれる。

【図面】

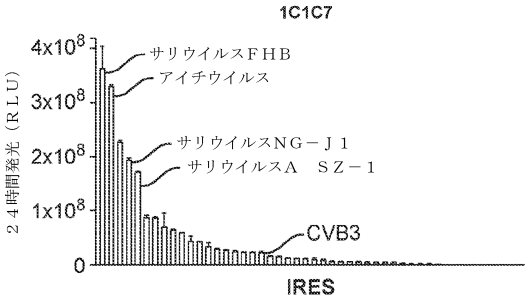
【図１Ａ】



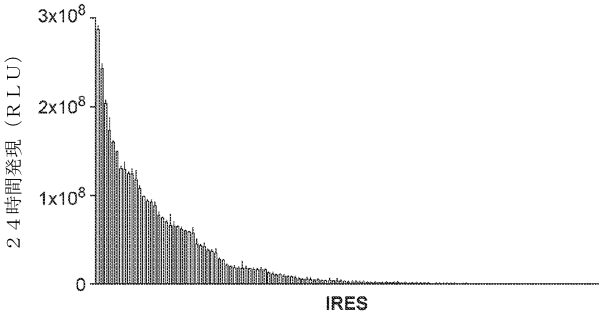

【図１Ｂ】



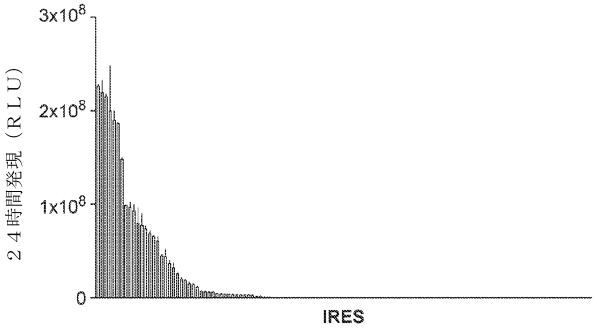

【図１Ｃ】



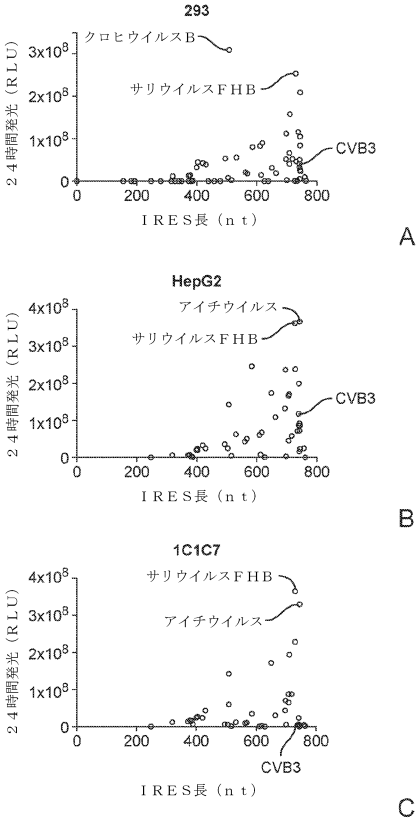

【図１Ｄ】



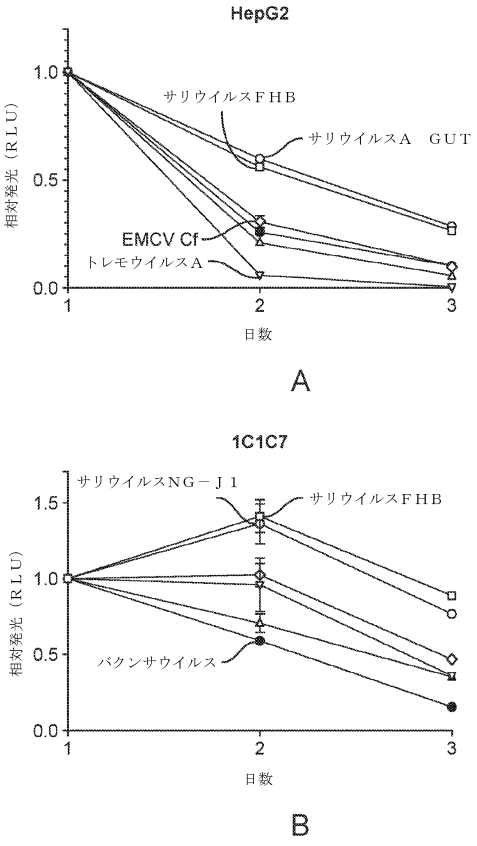
【図１Ｅ】


3x10^8
2x10^8
1x10^8
0
２４時間発現（ＲＬＵ）
IRES

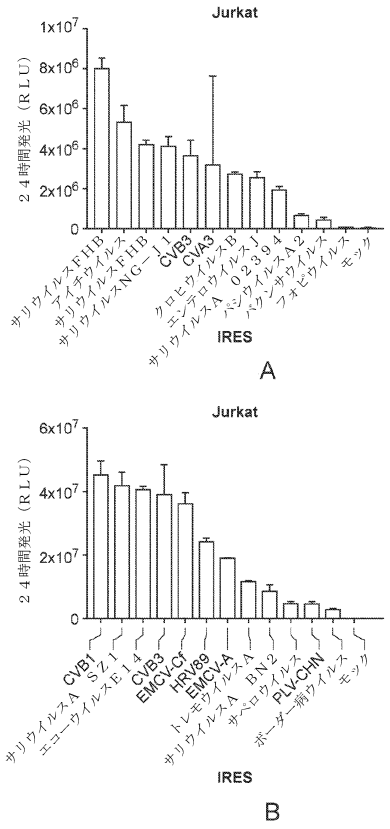
【図２】


293
クロヒウイルスB
サリウイルスFHB
CVB3
２４時間発光（ＲＬＵ）
IRES長（ｎｔ）
A
HepG2
アイチウイルス
サリウイルスFHB
CVB3
B
1C1C7
サリウイルスFHB
アイチウイルス
CVB3
C

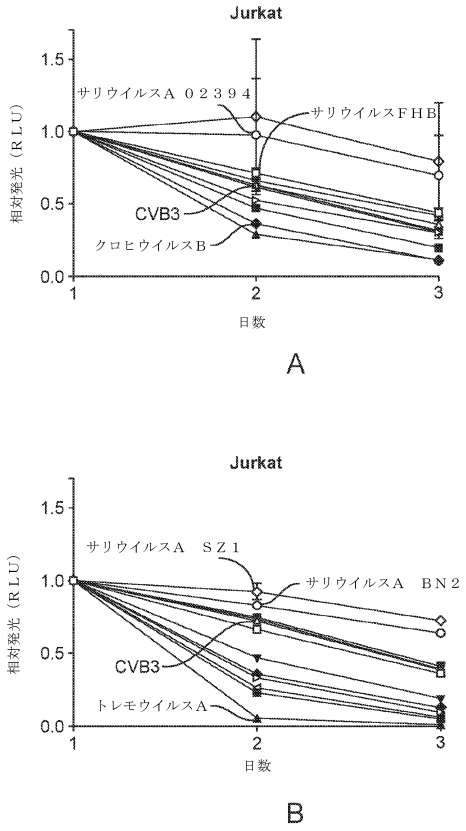
【図３】


HepG2
サリウイルスFHB
サリウイルスA GUT
EMCV Cf
トレモウイルスA
相対発光（ＲＬＵ）
日数
A
1C1C7
サリウイルスNG－Ｊ１
サリウイルスFHB
バクンサウイルス
相対発光（ＲＬＵ）
日数
B

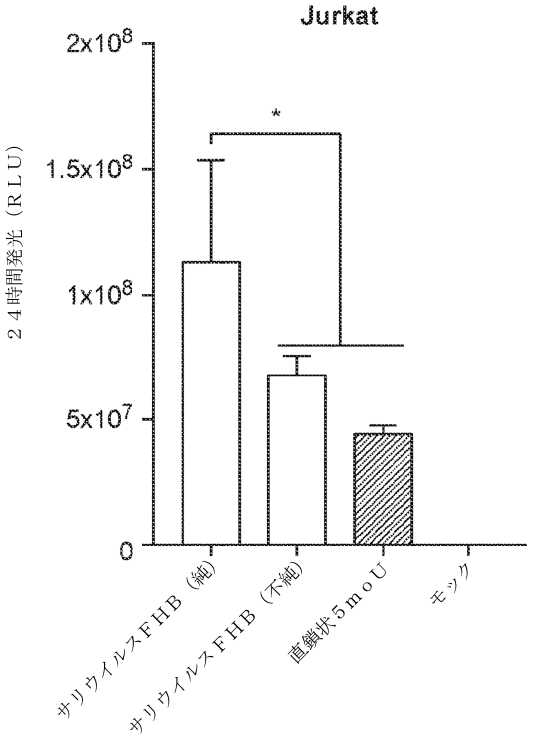
【図４】


Jurkat
２４時間発光（ＲＬＵ）
IRES
A
Jurkat
２４時間発光（ＲＬＵ）
IRES
B

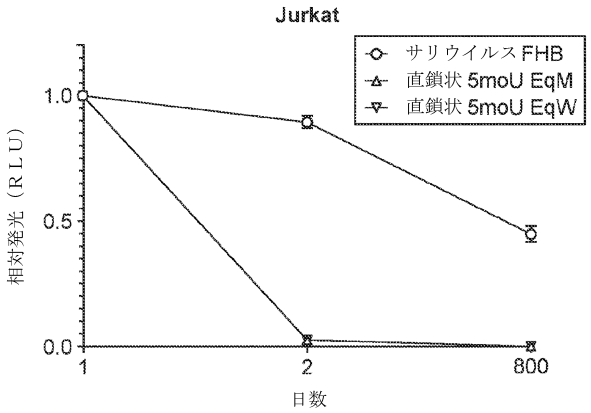
【図５】



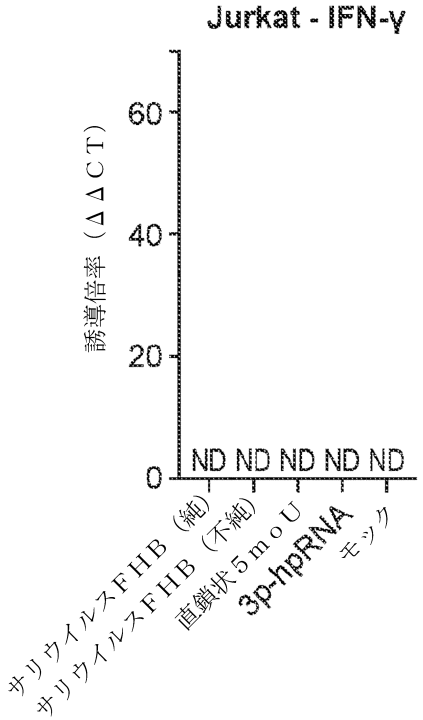

【図６Ａ】



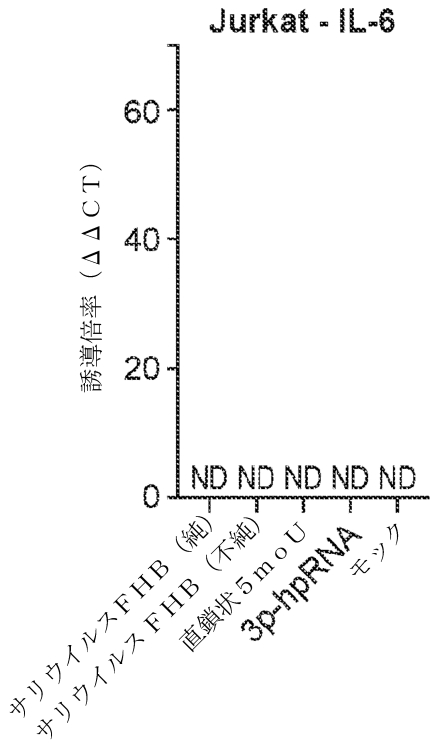

【図６Ｂ】



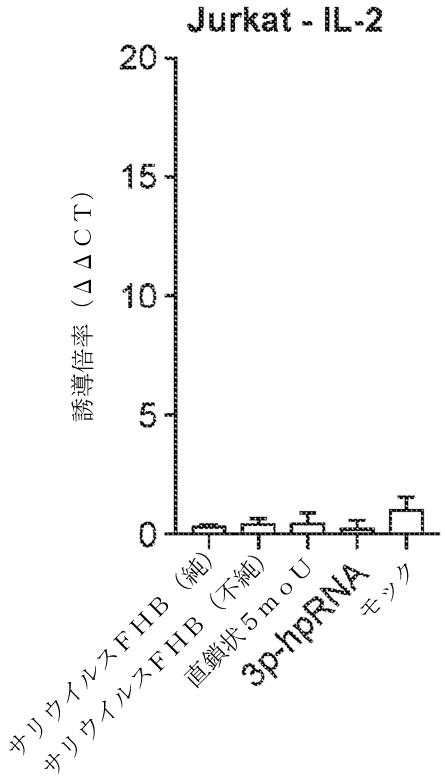

【図７Ａ】



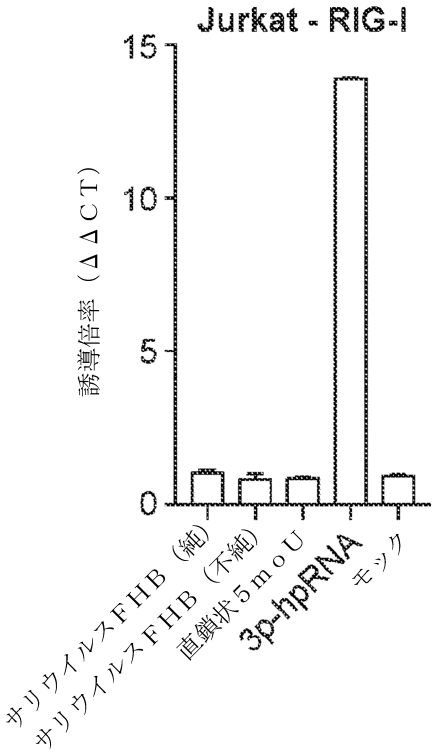
【図７Ｂ】



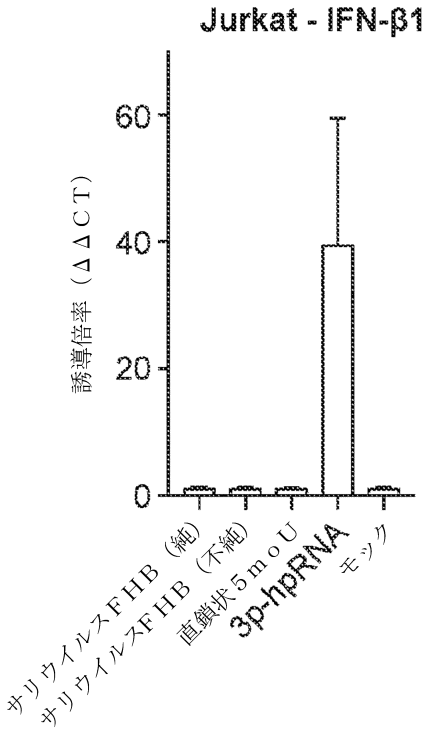

【図７Ｃ】



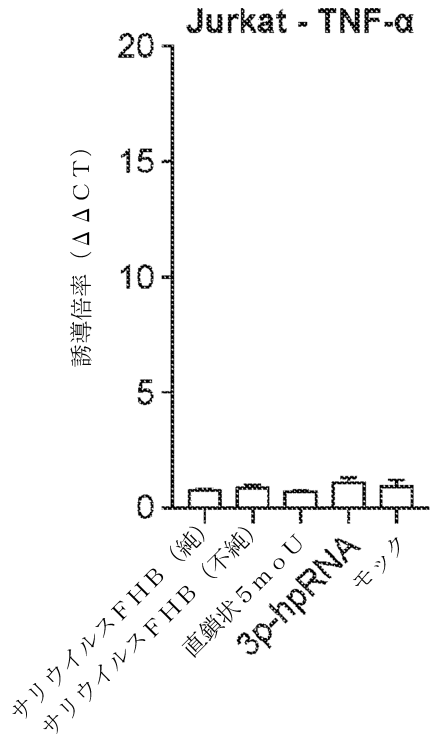

【図７Ｄ】



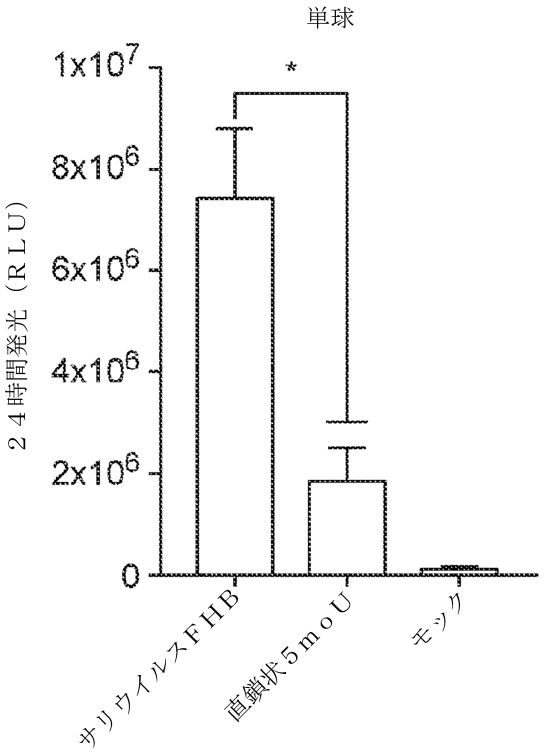

【図７Ｅ】



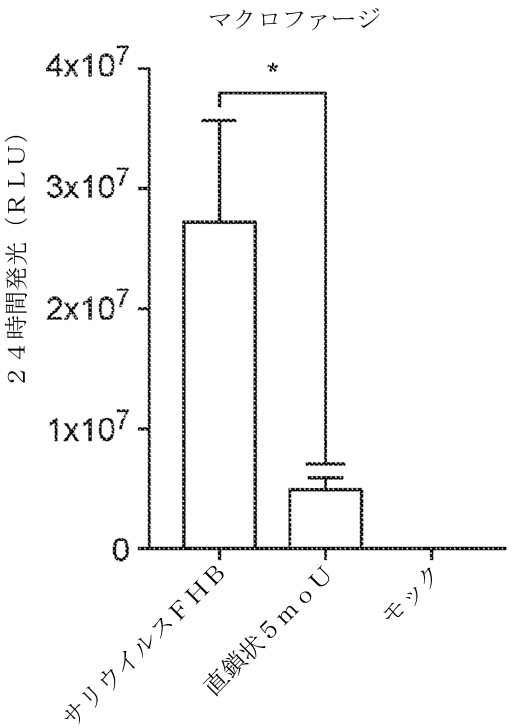
【図７Ｆ】



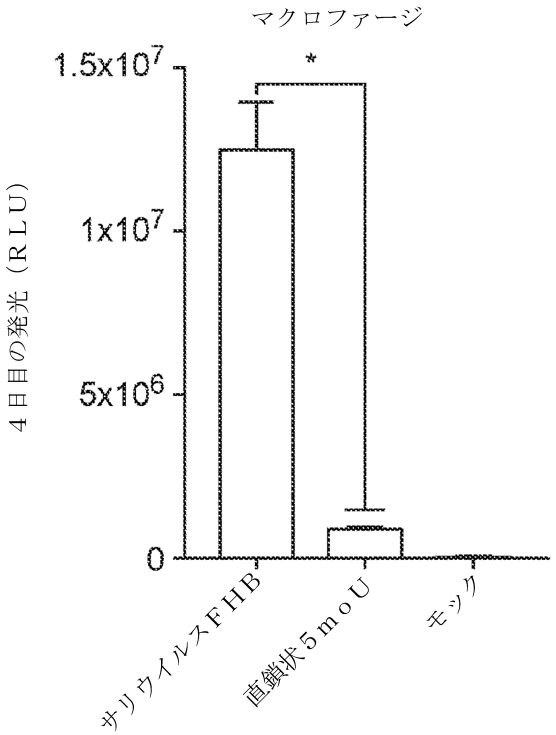

【図８Ａ】



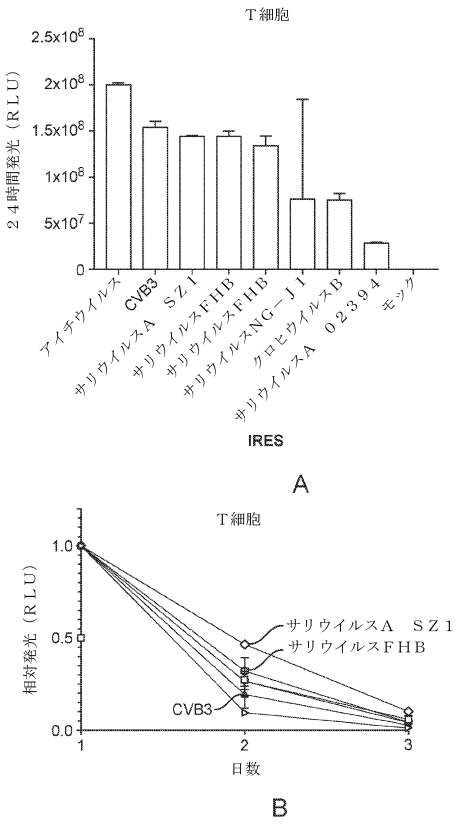

【図８Ｂ】



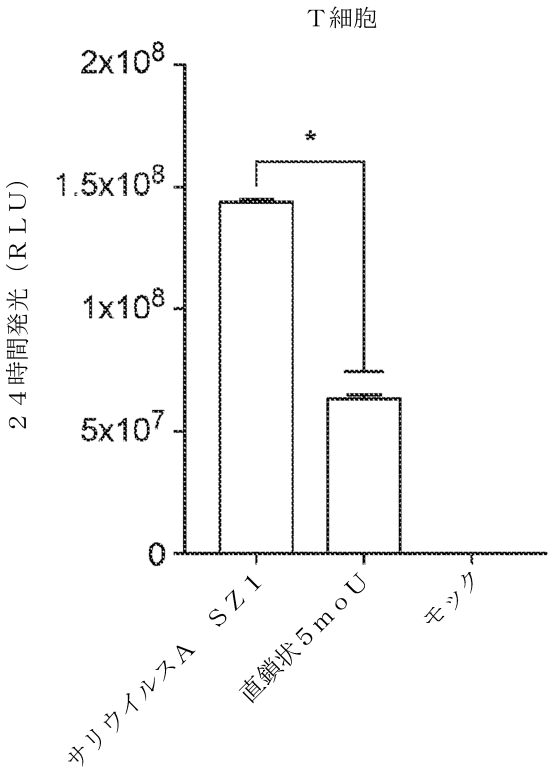

【図８Ｃ】



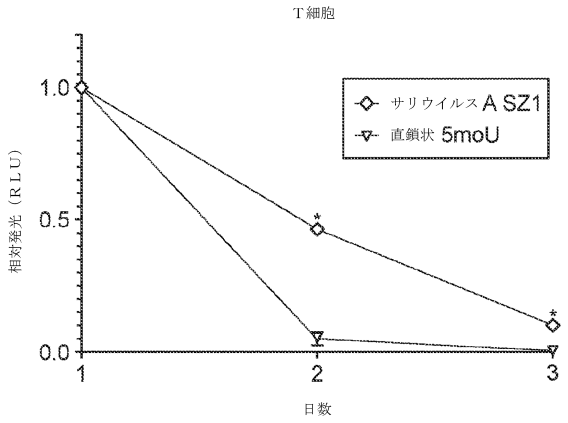
【図９】



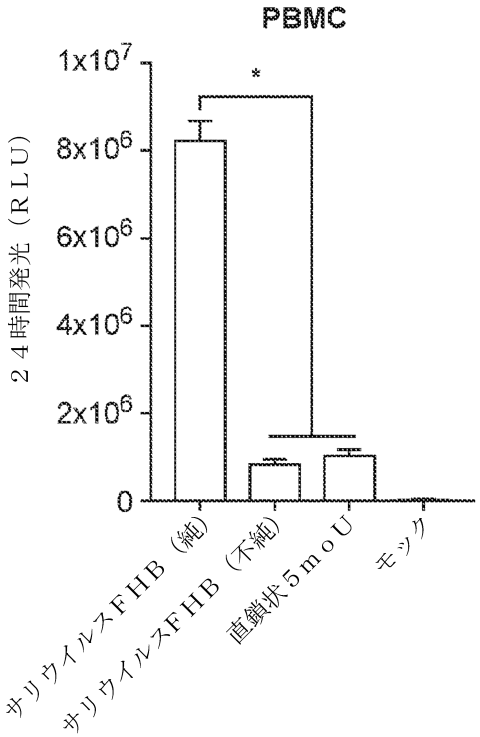

【図１０Ａ】



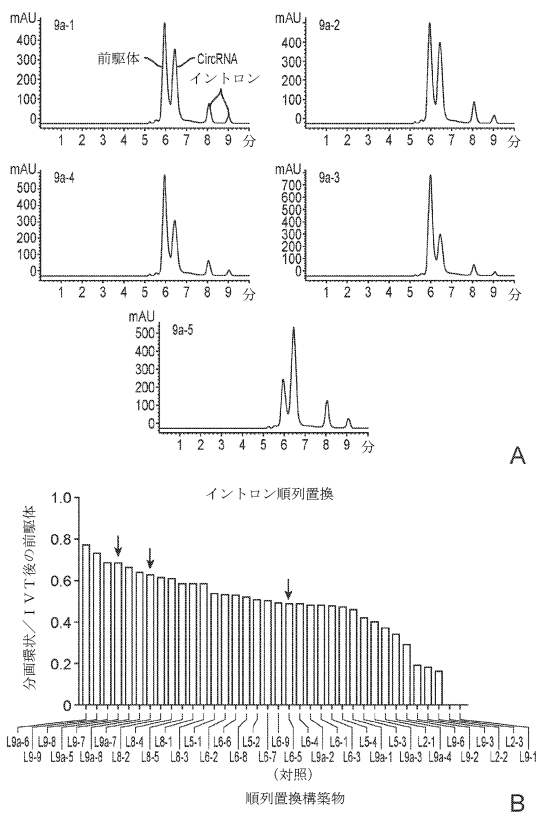

【図１０Ｂ】



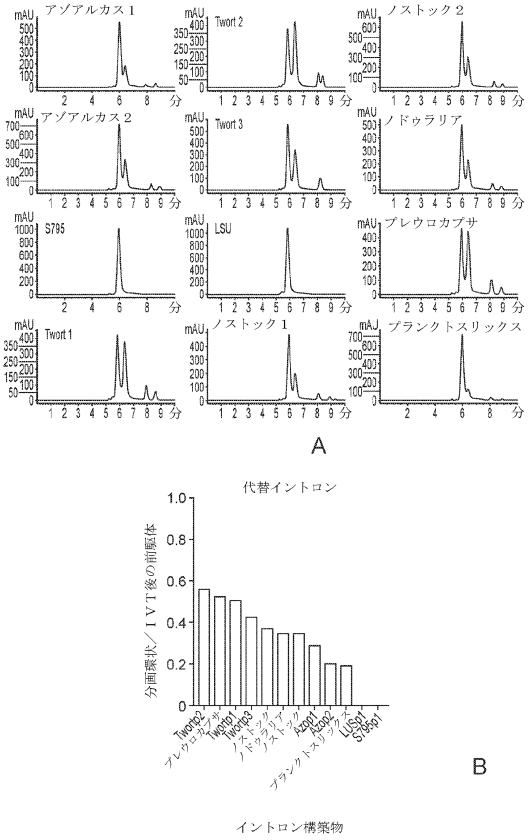

【図１０Ｃ】



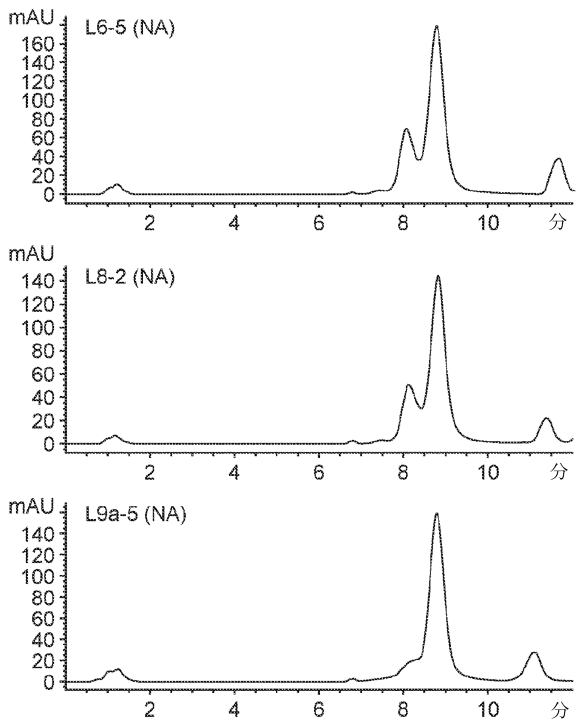
【図１１】



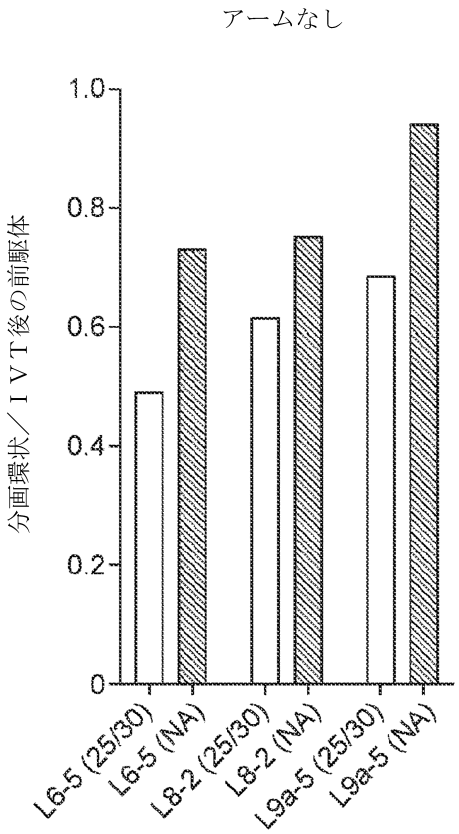

【図１２】



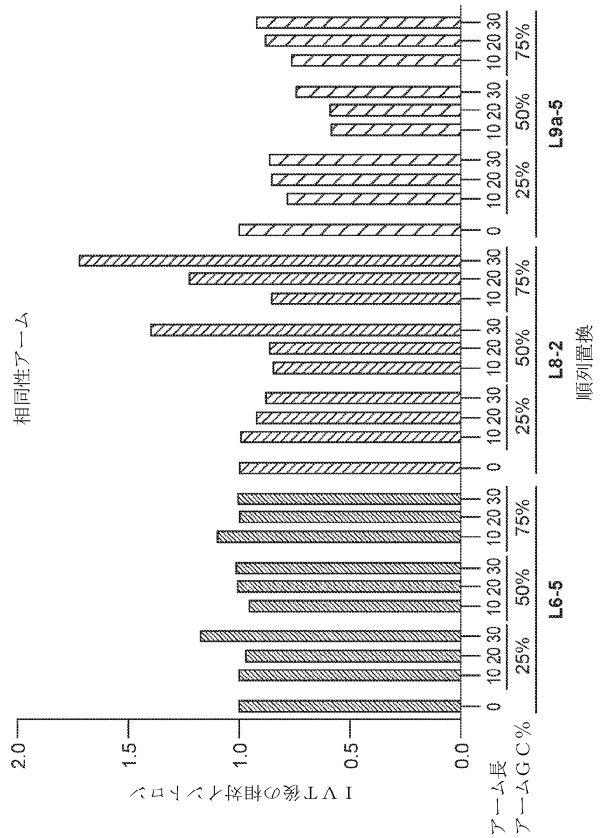

【図１３Ａ】



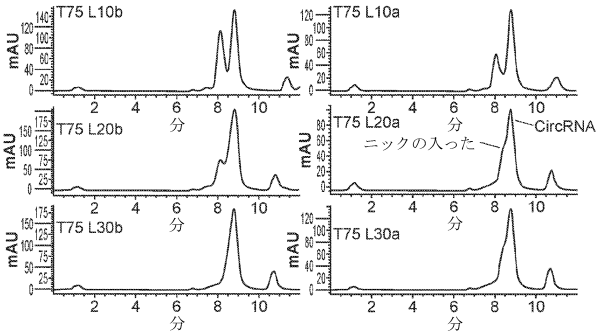

【図１３Ｂ】



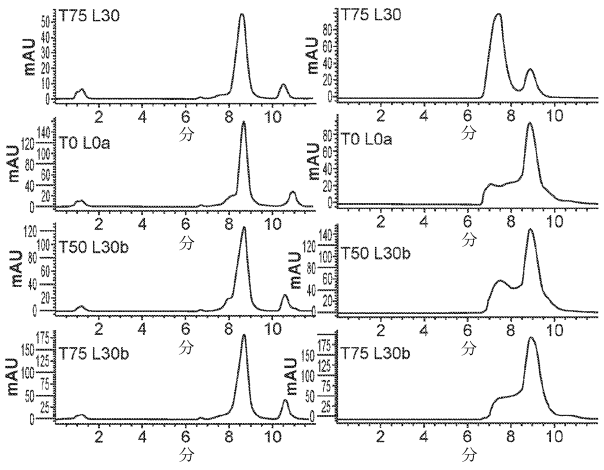
【図１４】



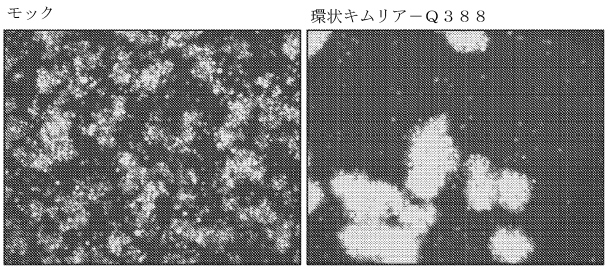

【図１５Ａ】



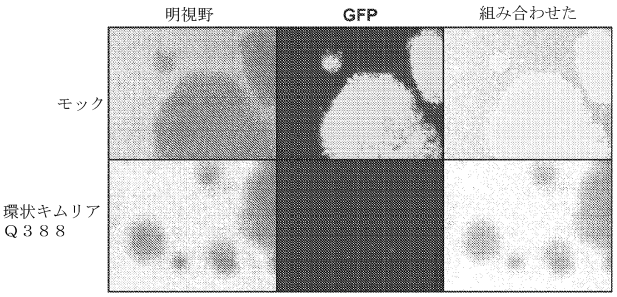

【図１５Ｂ】



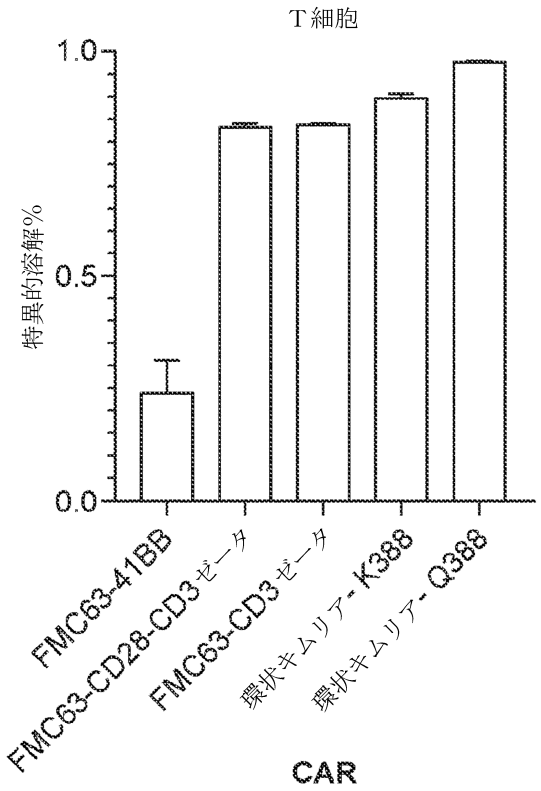

【図１６】



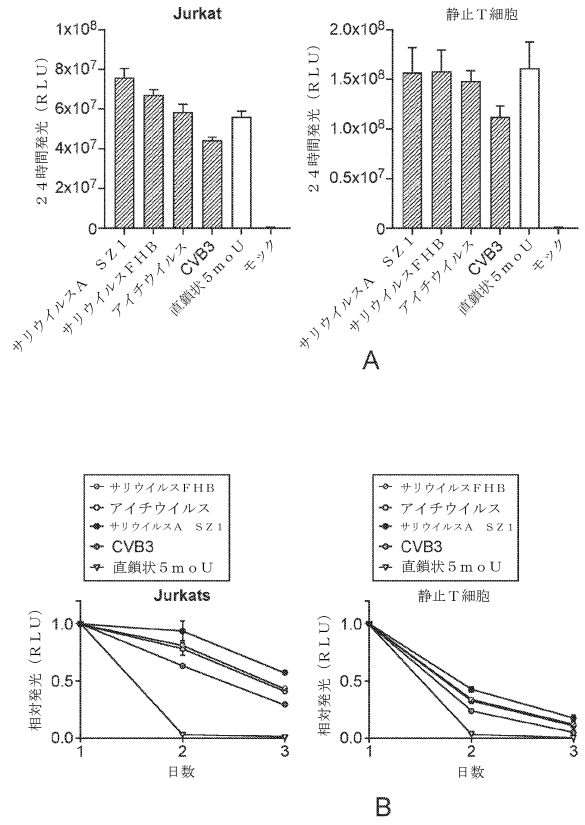
【図１７】



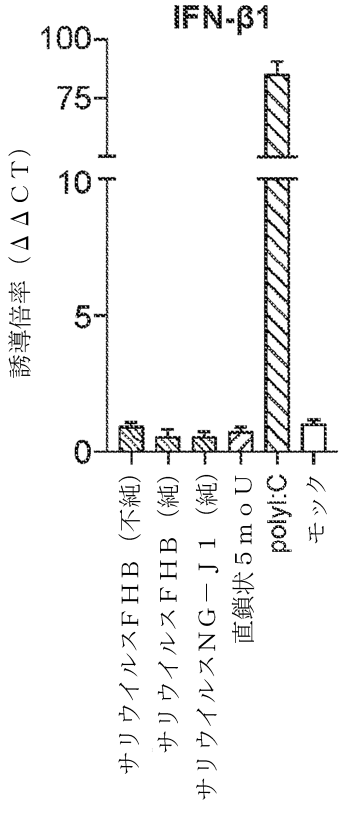

【図１８】



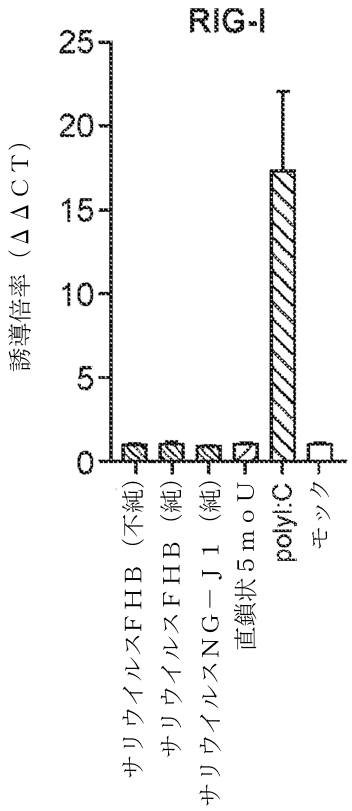

【図１９】



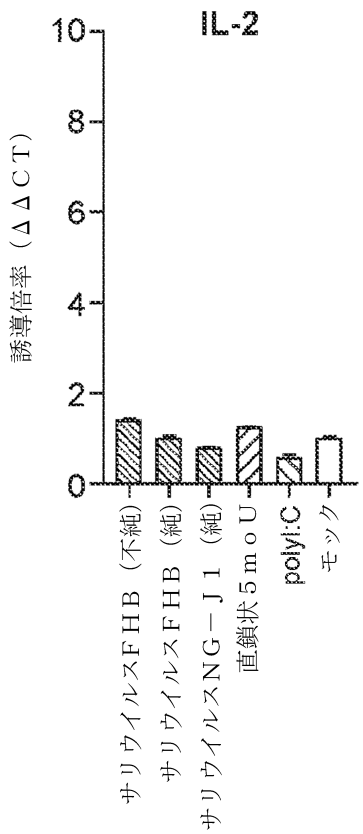

【図２０Ａ】



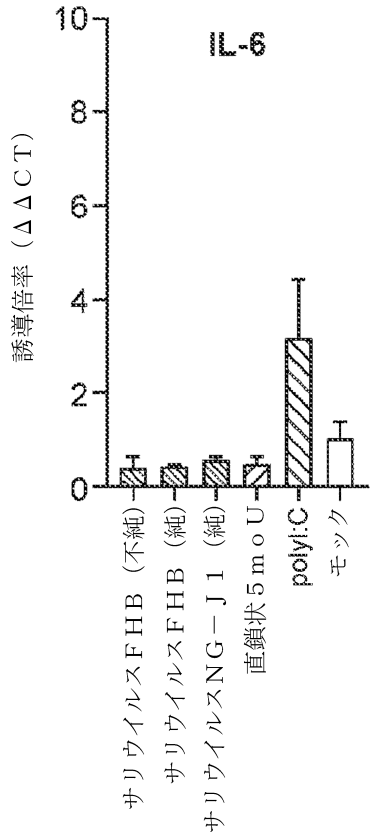
【図２０Ｂ】



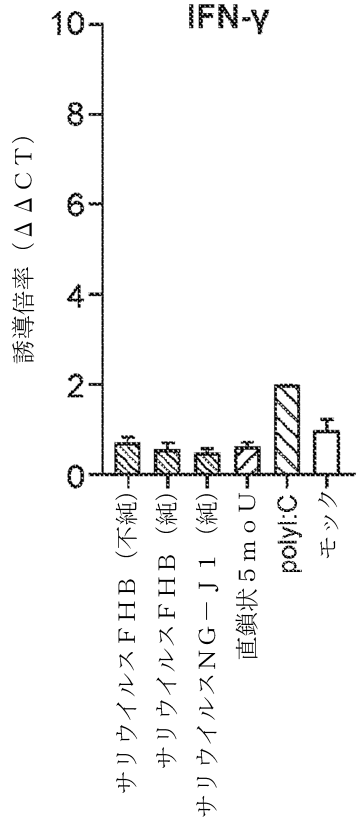

【図２０Ｃ】



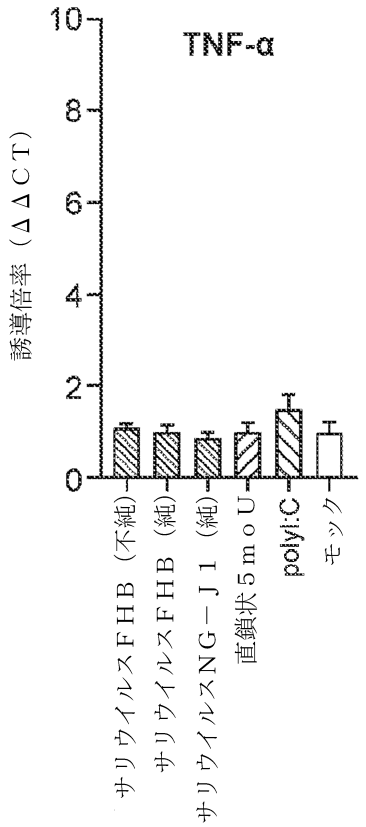

【図２０Ｄ】



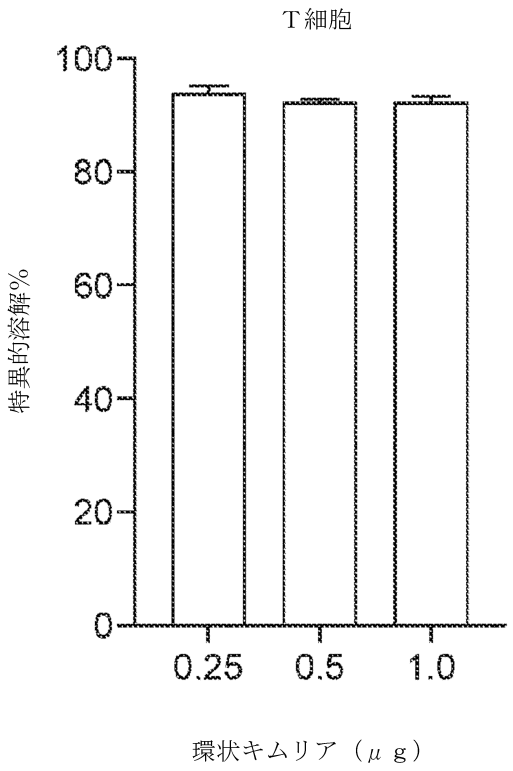

【図２０Ｅ】



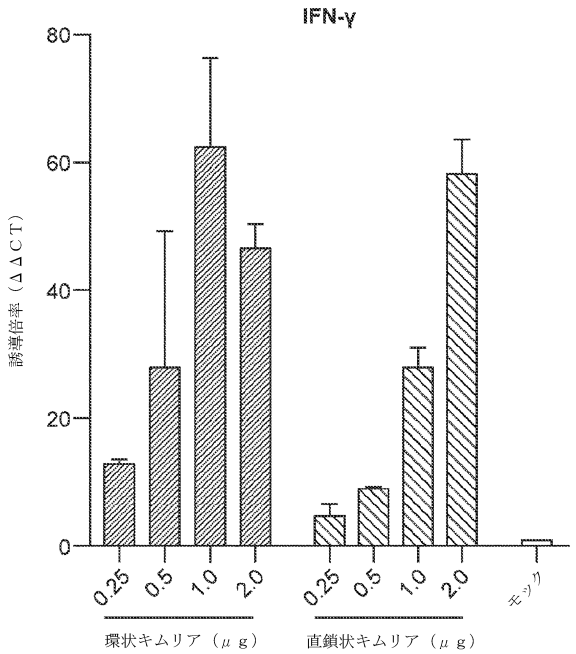
【図２０Ｆ】



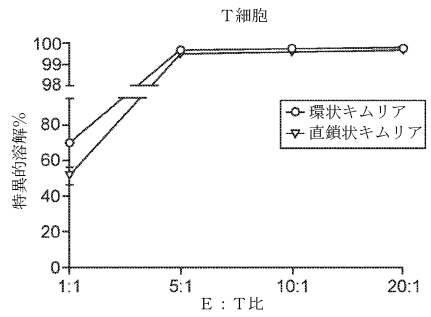

【図２１Ａ】



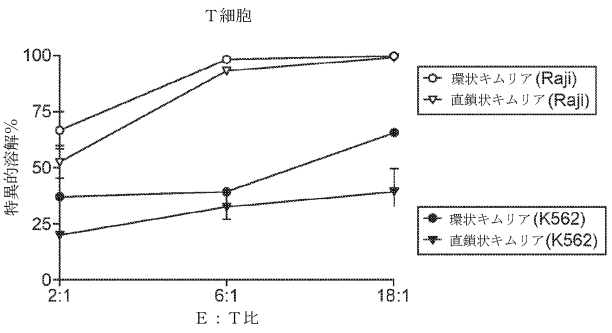

【図２１Ｂ】




【図２２】

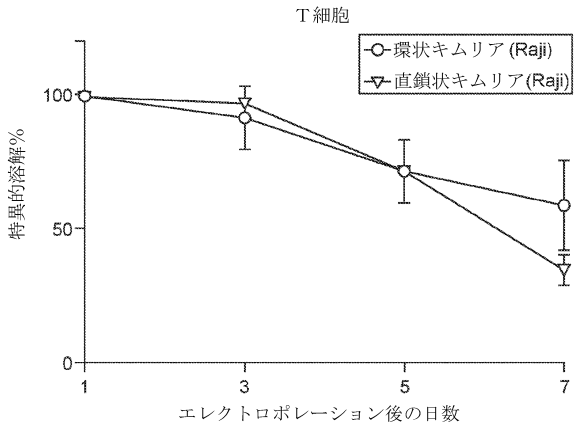



A

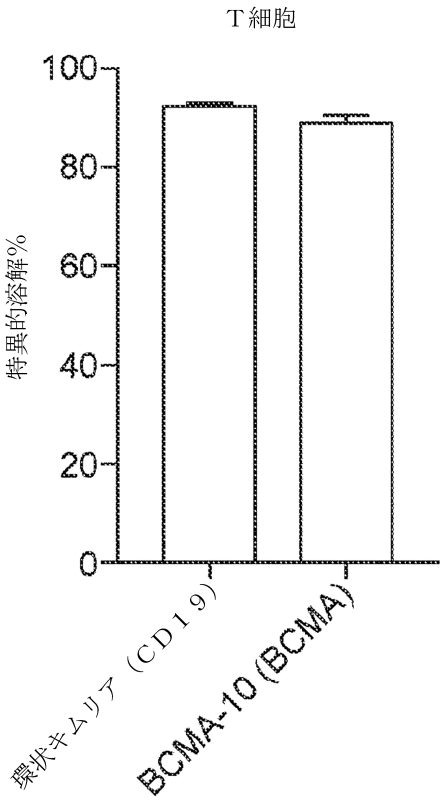



B

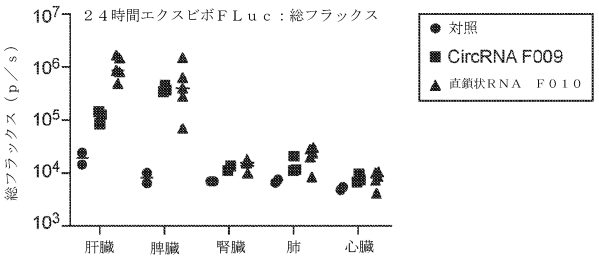
【図２３】



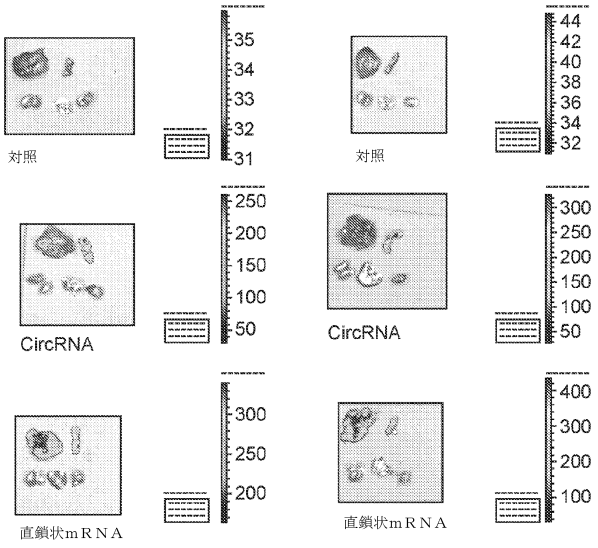

【図２４】



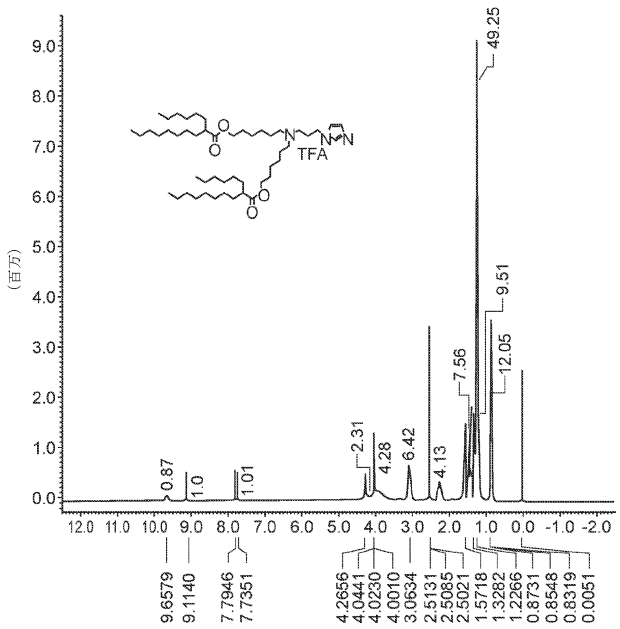

【図２５】



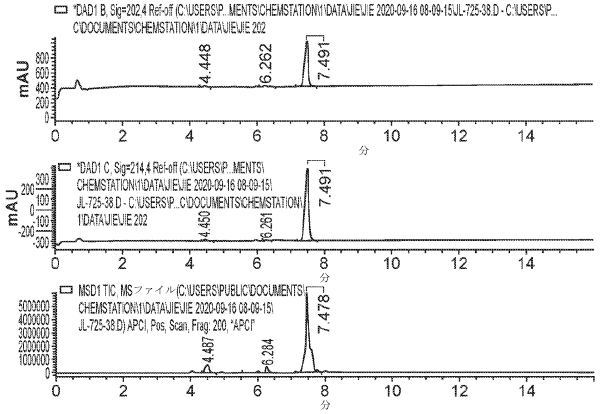

【図２６】



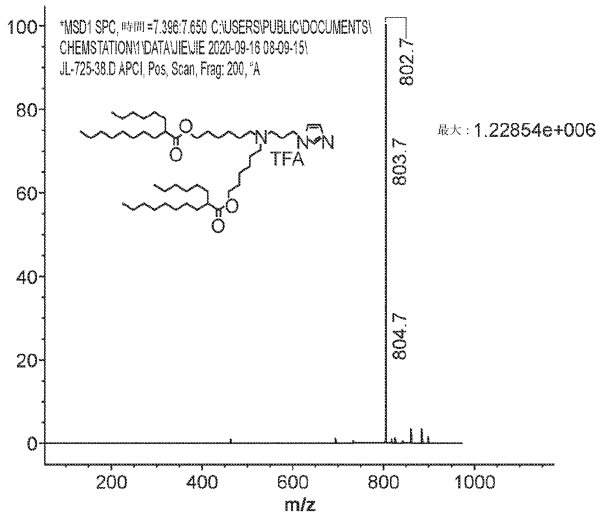
【図２７Ａ】



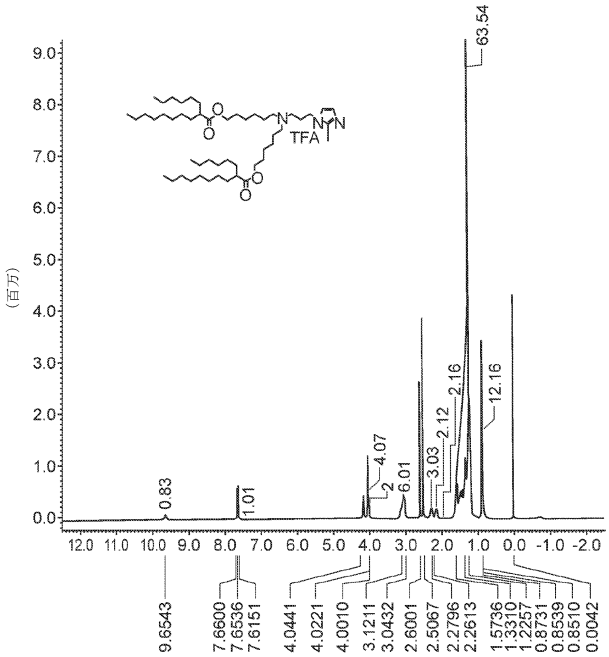

【図２７Ｂ】



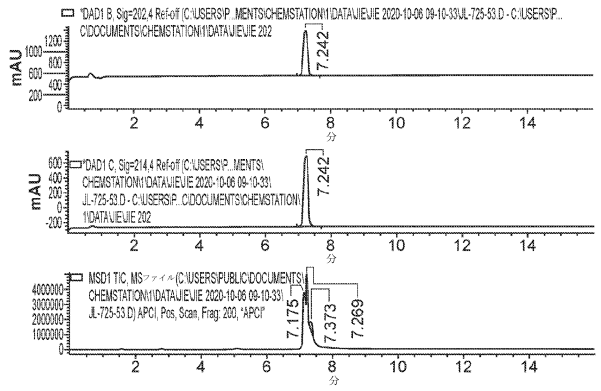

【図２７Ｃ】



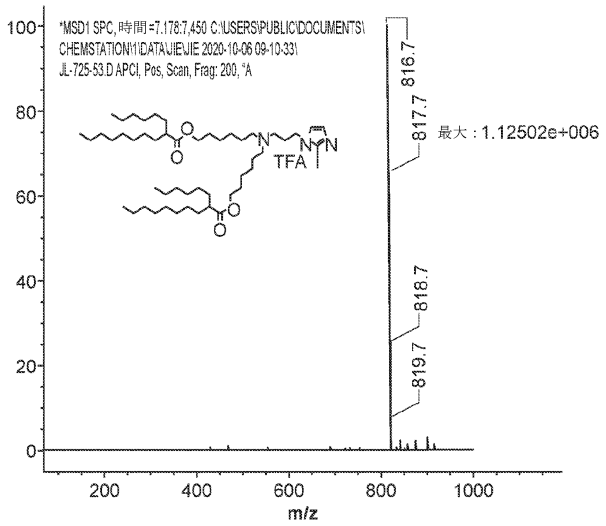

【図２７Ｄ】



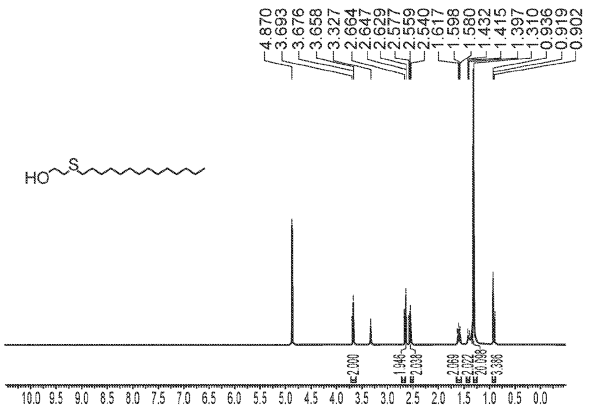
【図２７Ｅ】



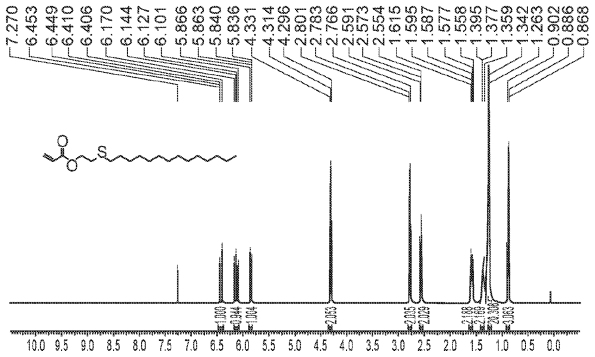

【図２７Ｆ】



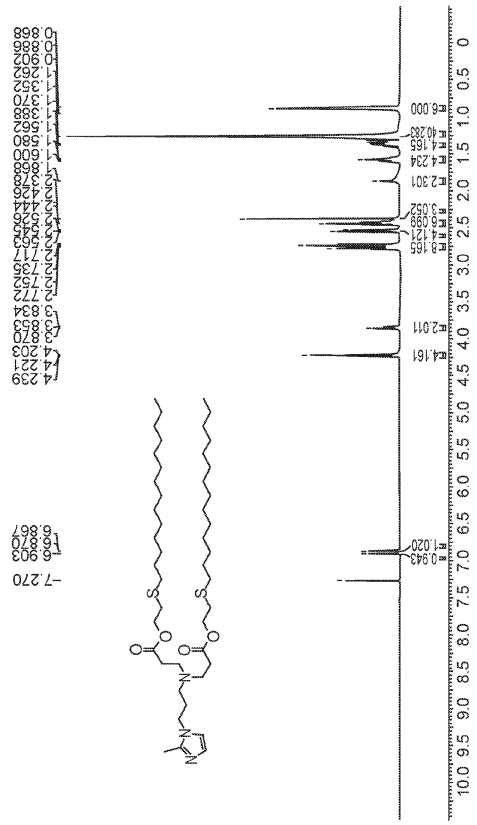

【図２８Ａ】



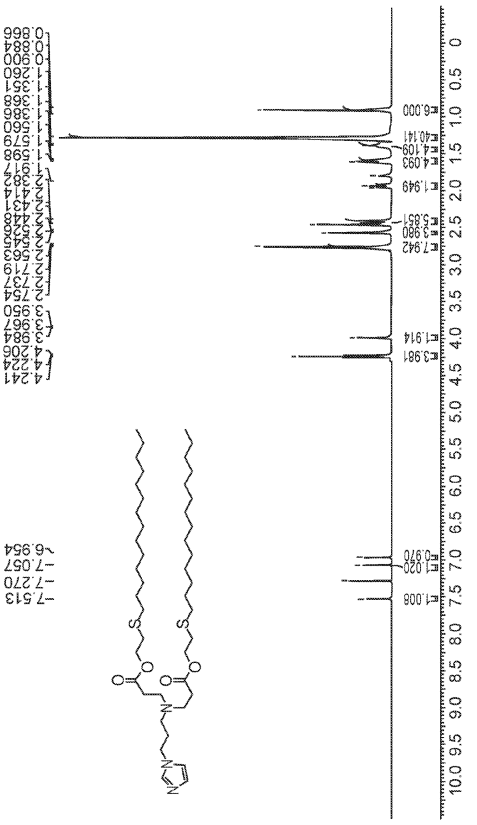

【図２８Ｂ】



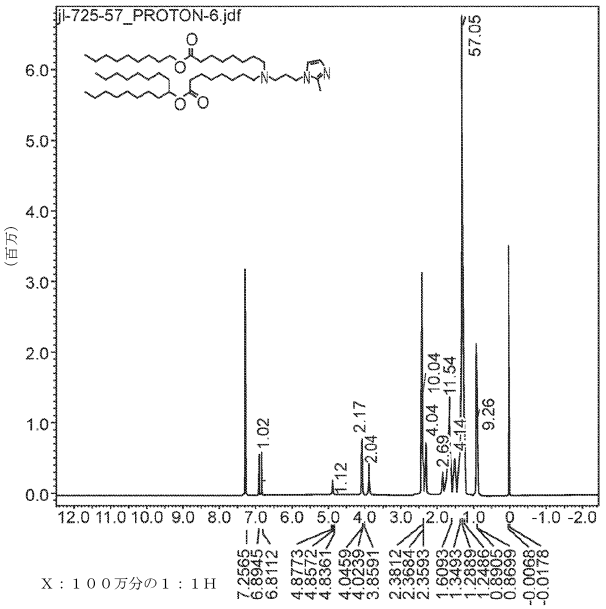
【図２８Ｃ】



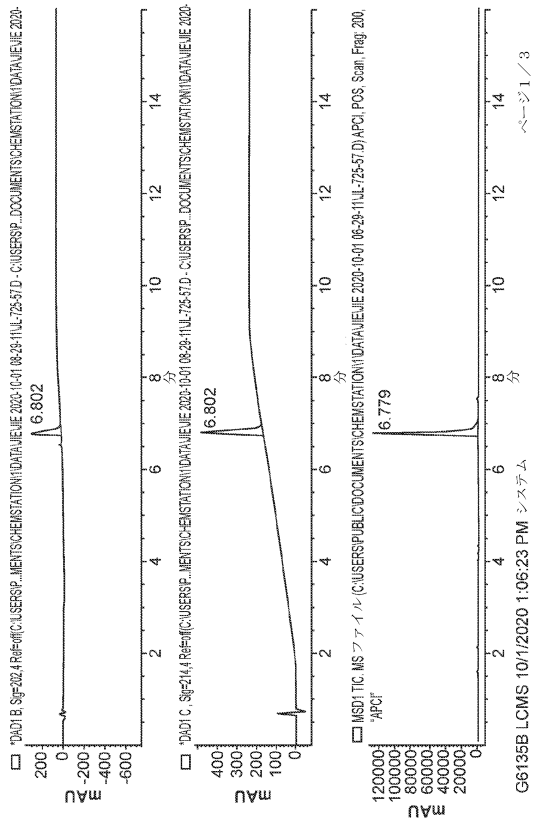
【図２９】



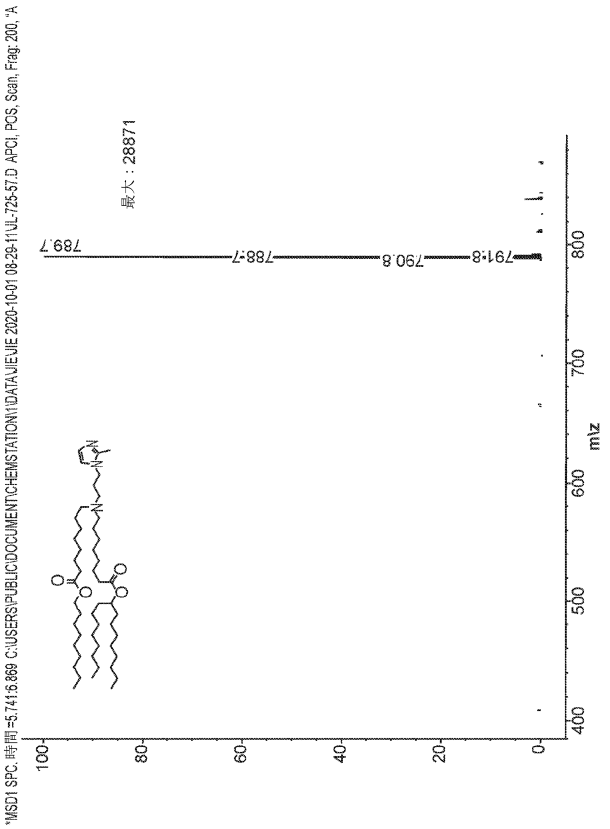
【図３０Ａ】



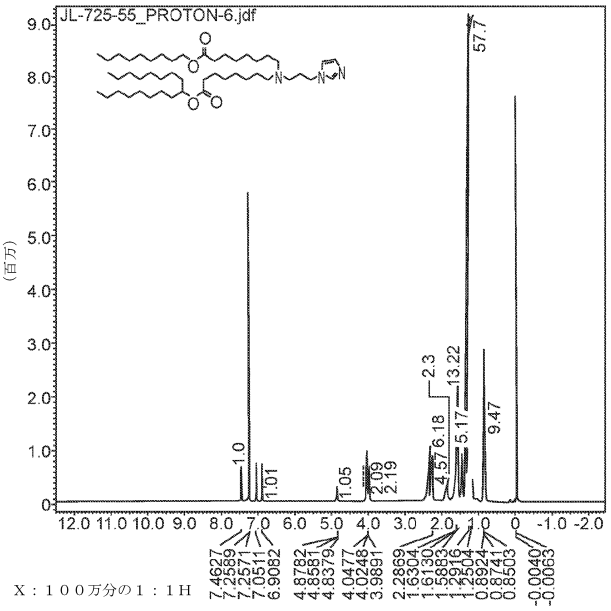

【図３０Ｂ】



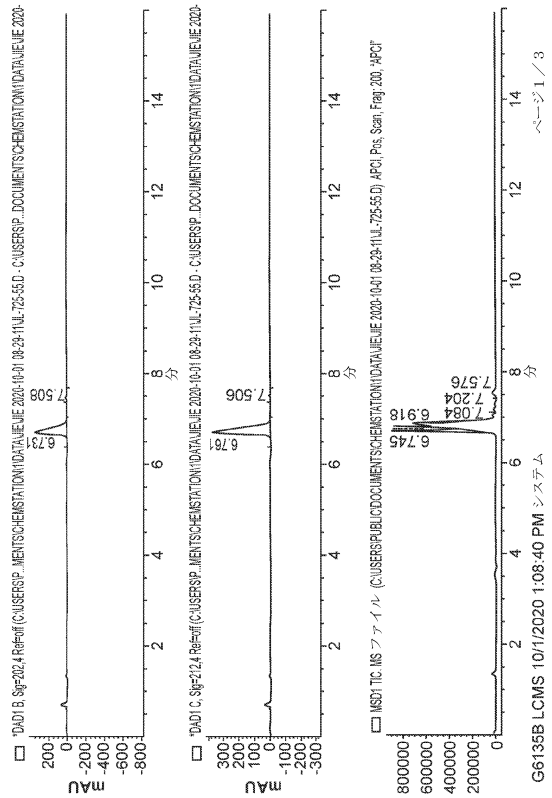
【図３０Ｃ】



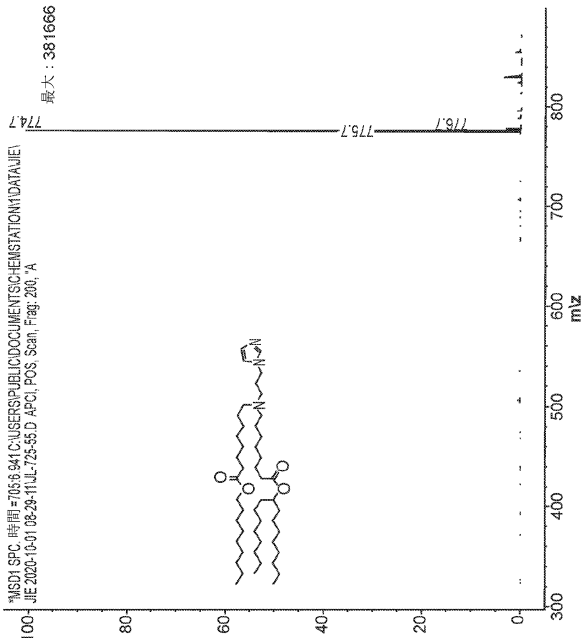

【図３１Ａ】



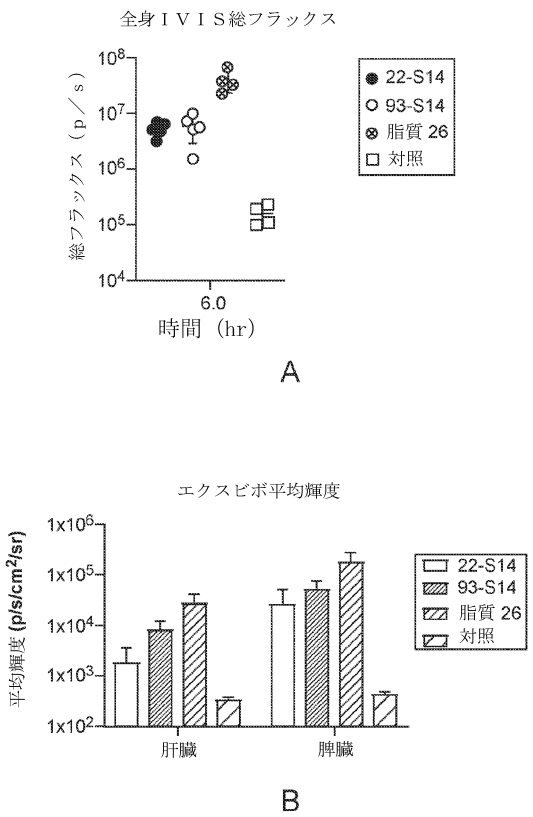

【図３１Ｂ】



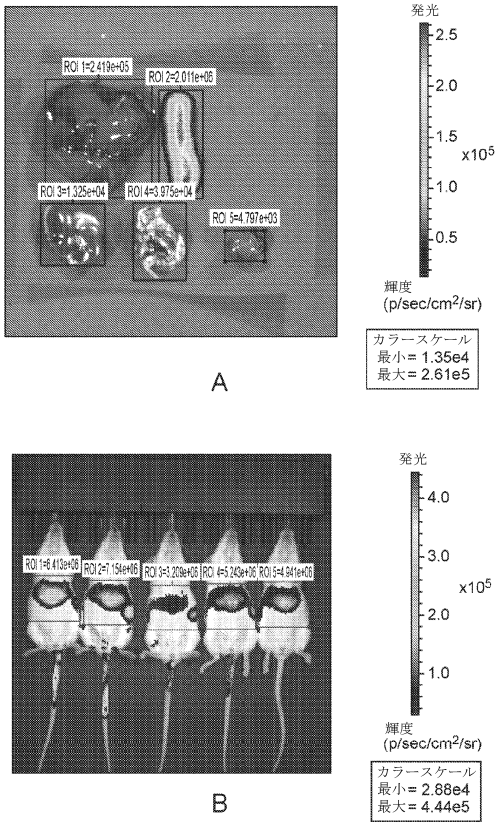

【図３１Ｃ】



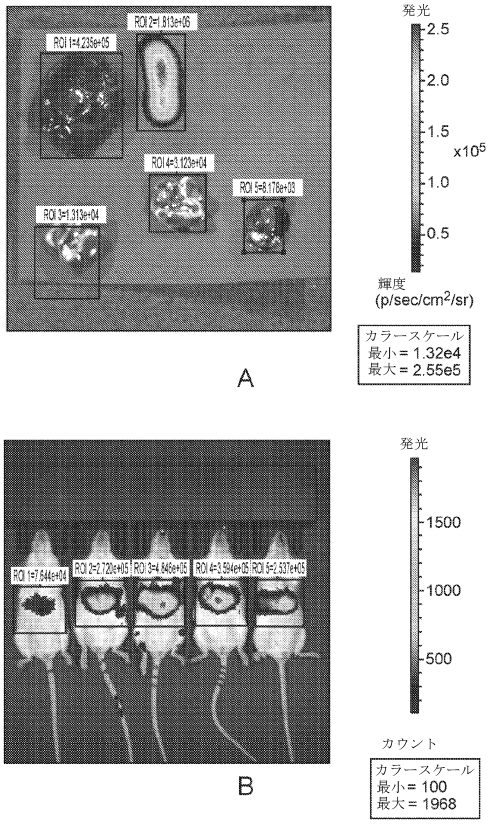
【図３２】



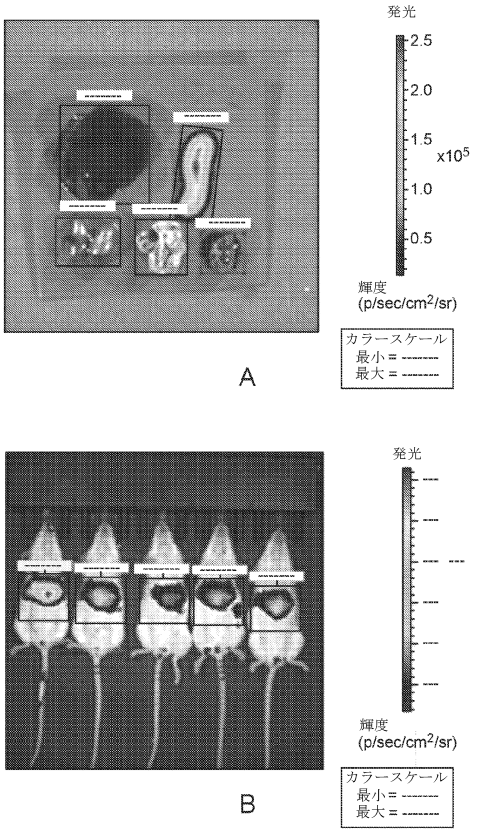

【図３３】



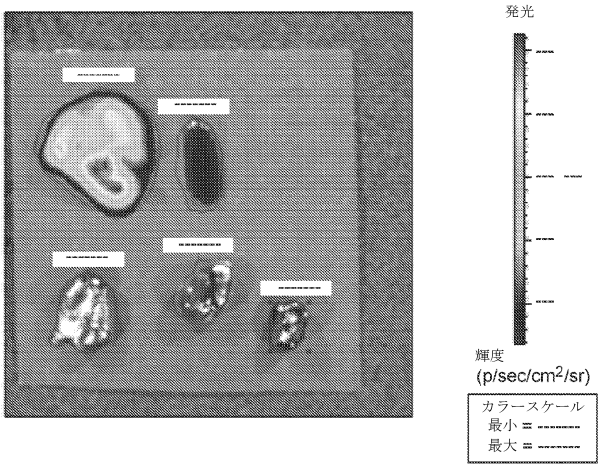

【図３４】



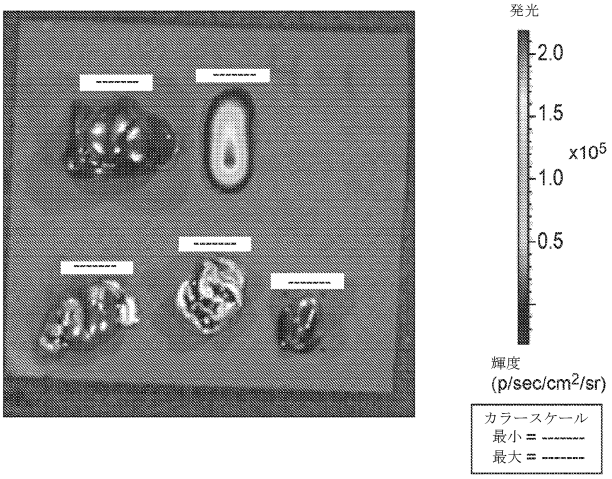

【図３５】



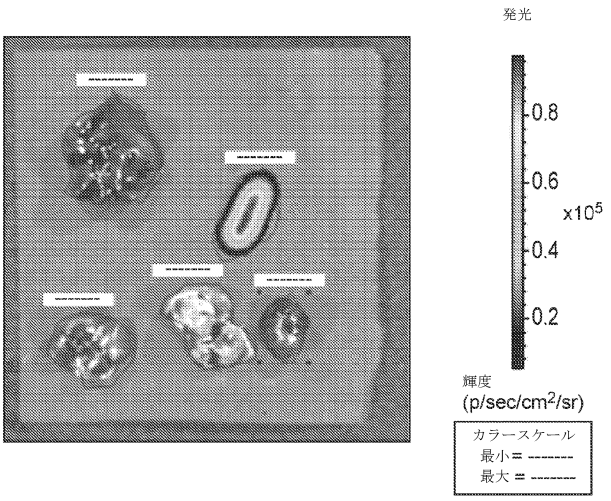
【図３６Ａ】



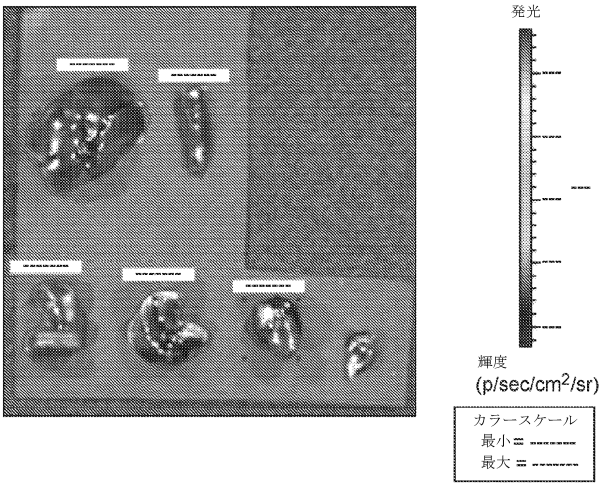

【図３６Ｂ】



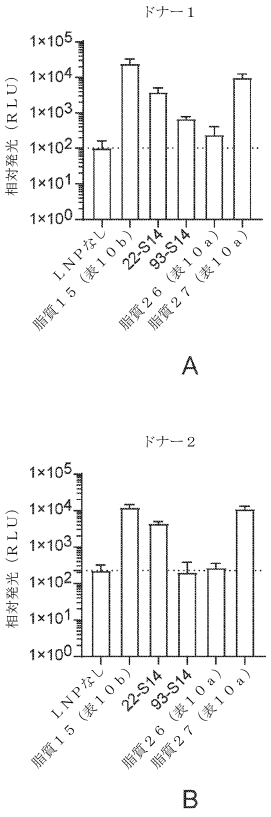

【図３６Ｃ】



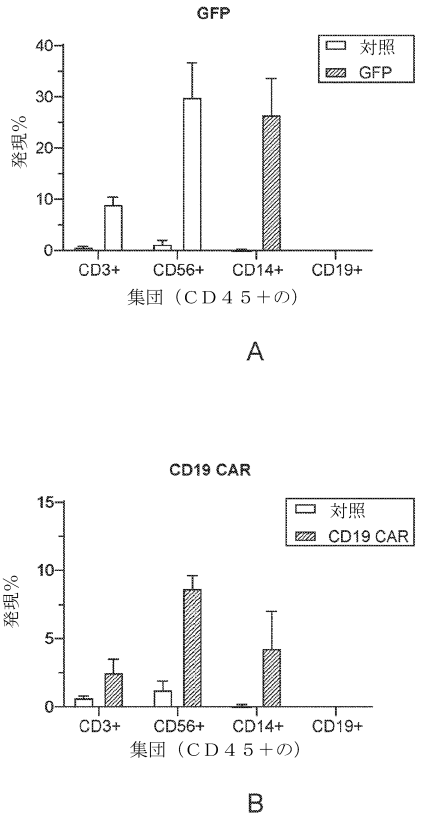

【図３６Ｄ】



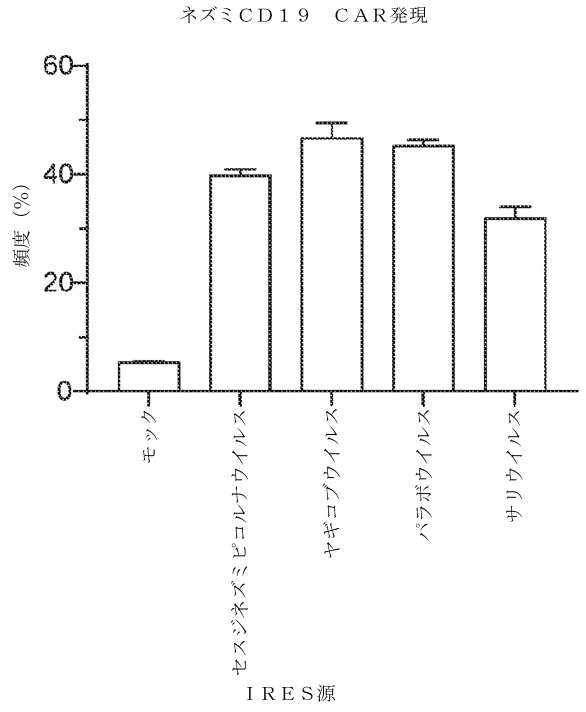
【図３７】



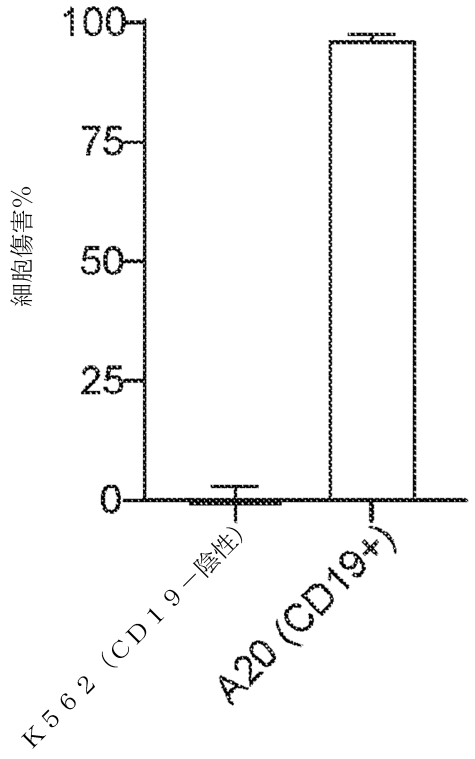

【図３８】



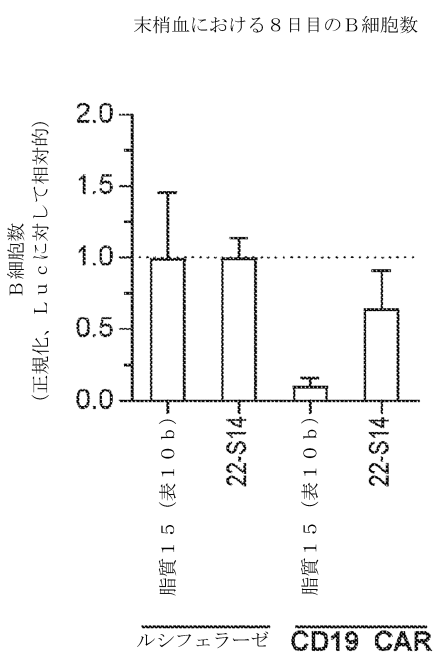

【図３９】



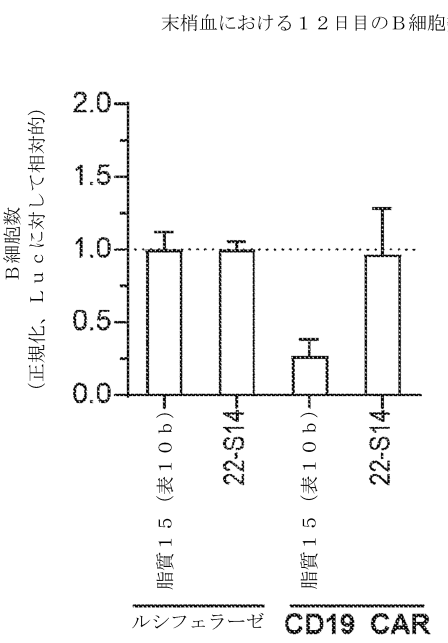

【図４０】



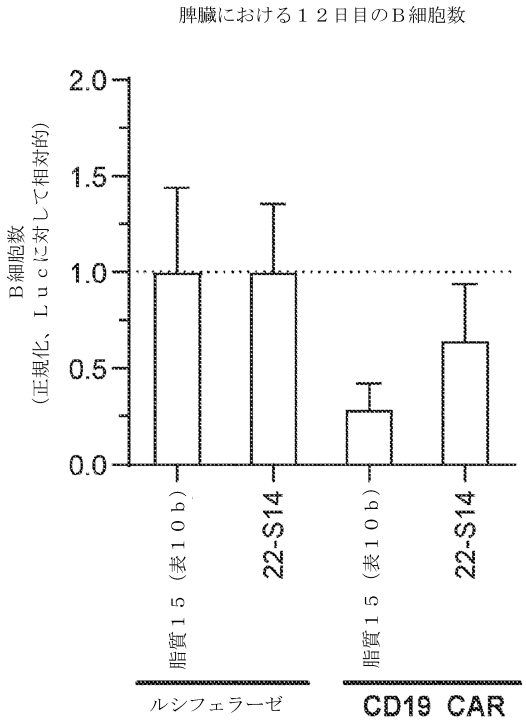
【図４１Ａ】



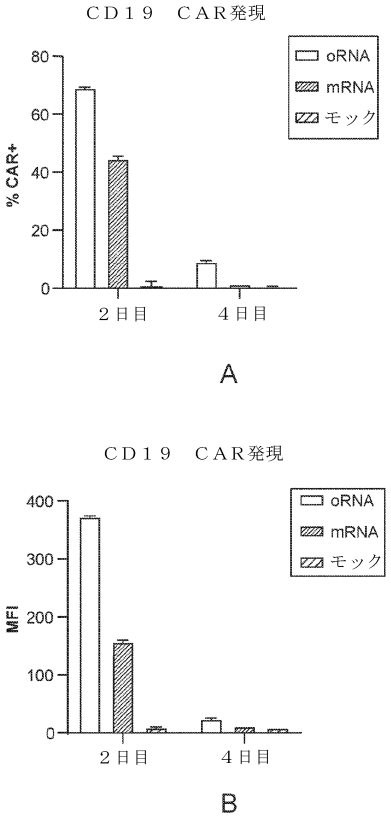

【図４１Ｂ】



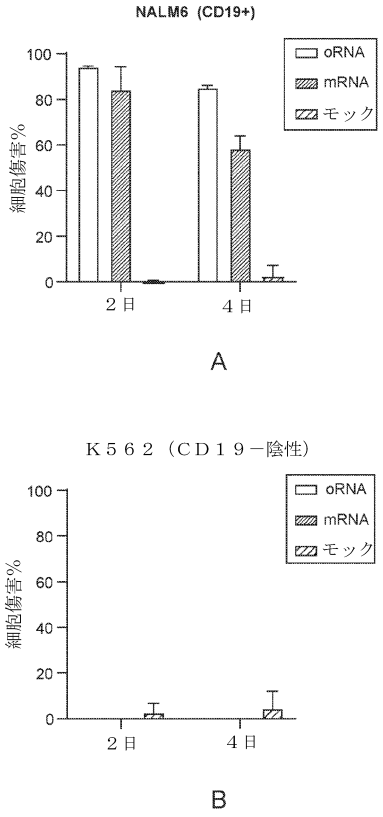

【図４１Ｃ】



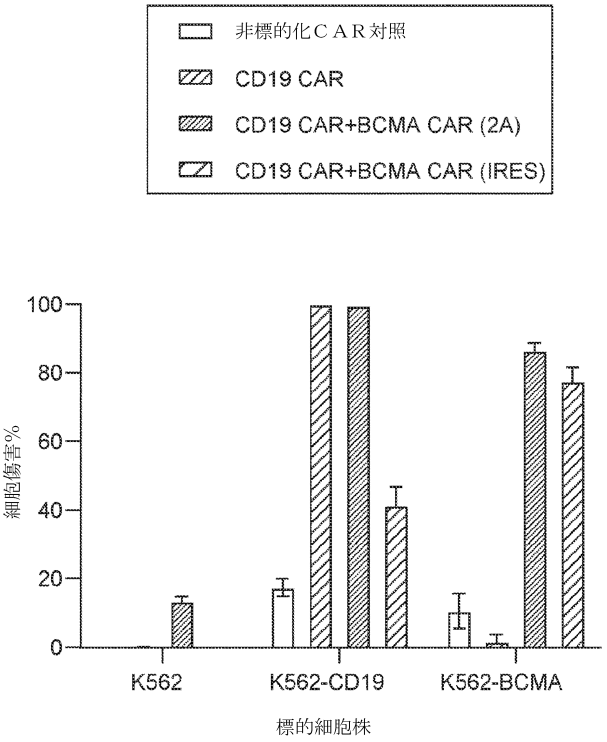

【図４２】



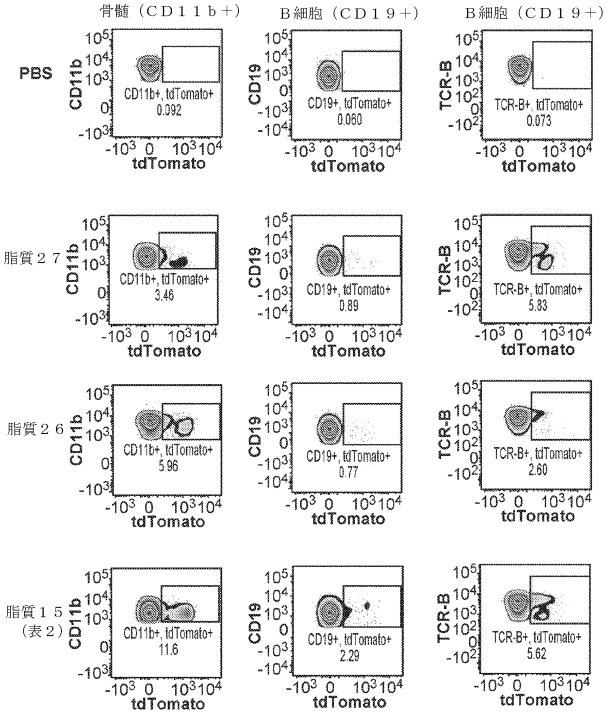
【図４３】



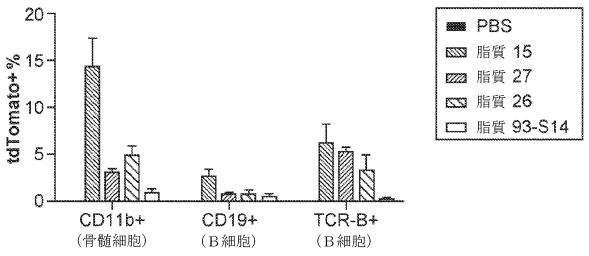

【図４４】



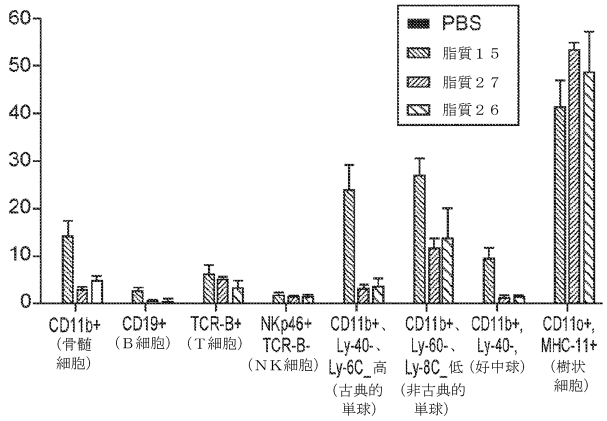

【図４５Ａ】



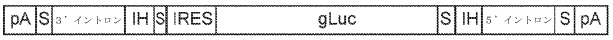

【図４５Ｂ】



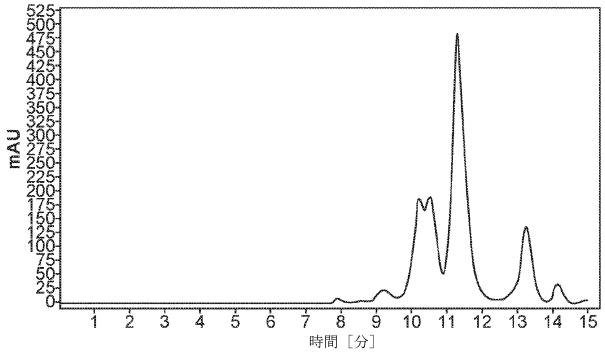
【図４５Ｃ】



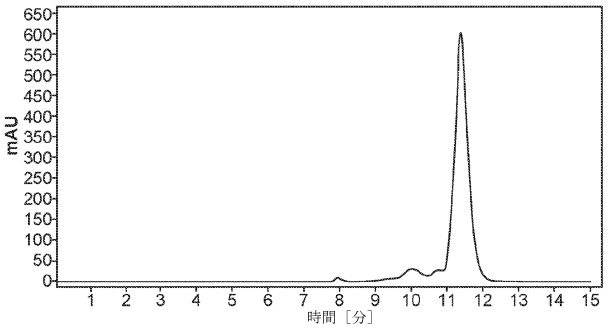

【図４６Ａ】



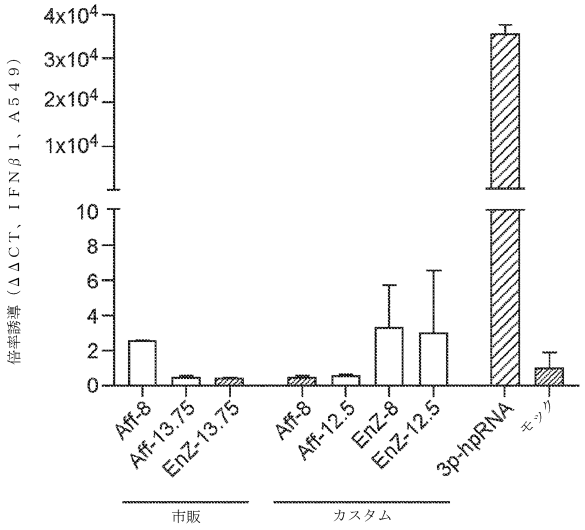

【図４６Ｂ】



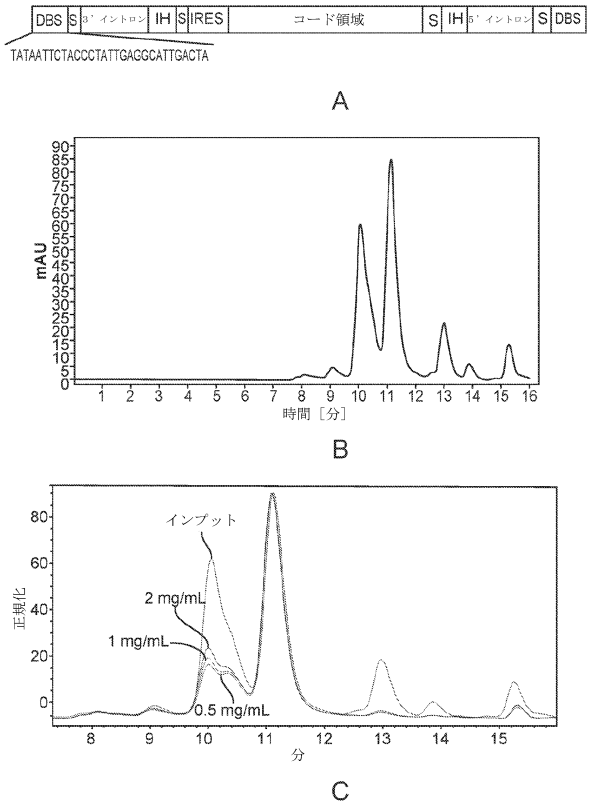

【図４６Ｃ】



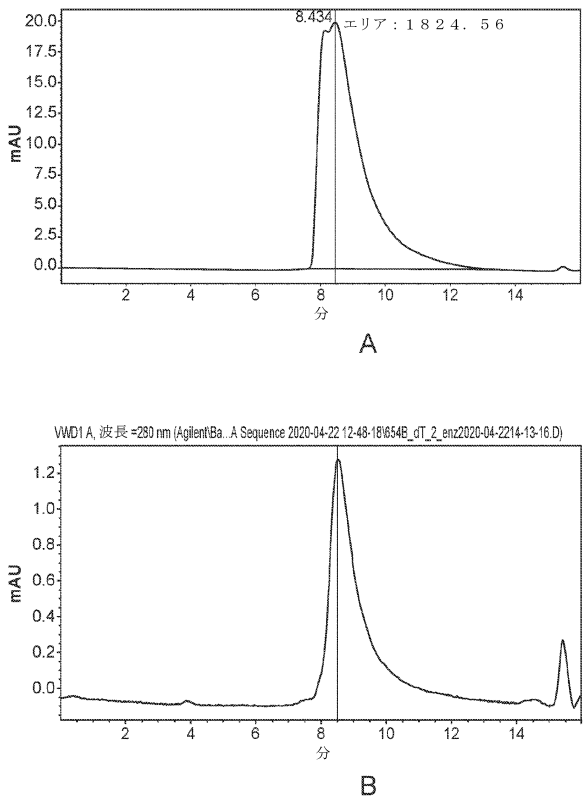
【図４６Ｄ】



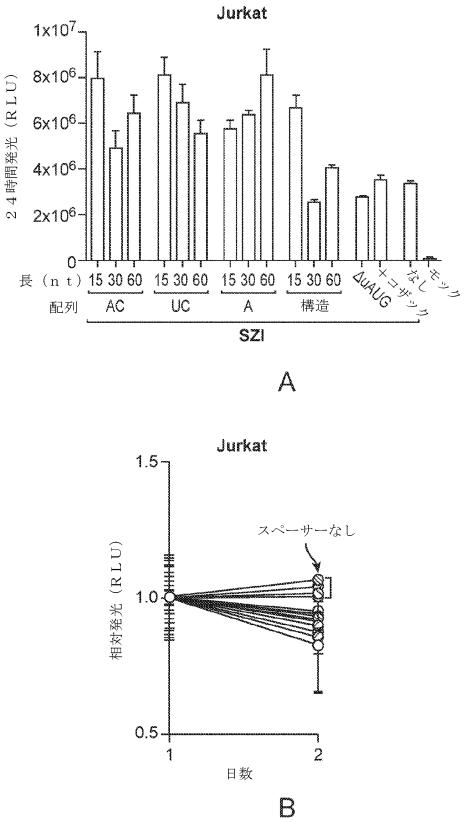

【図４７】



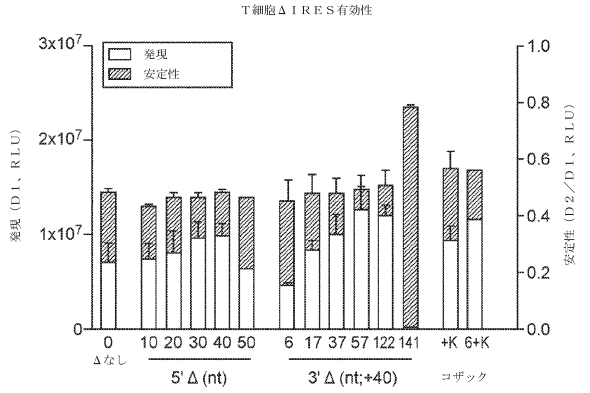

【図４８】



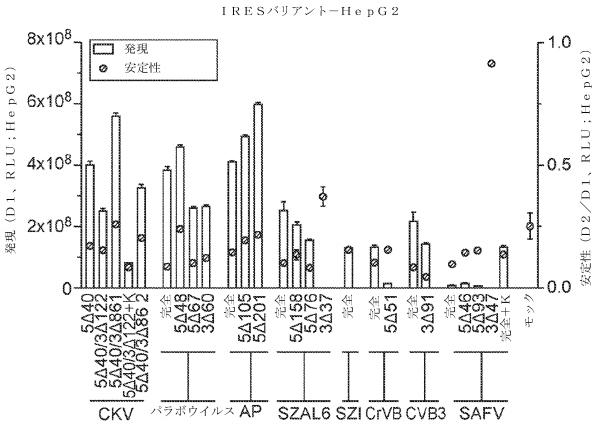

【図４９】



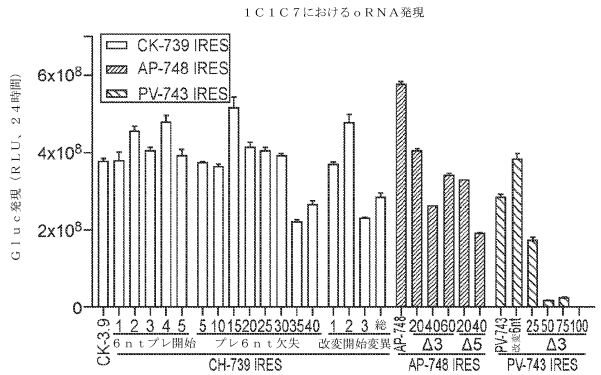
【図５０】



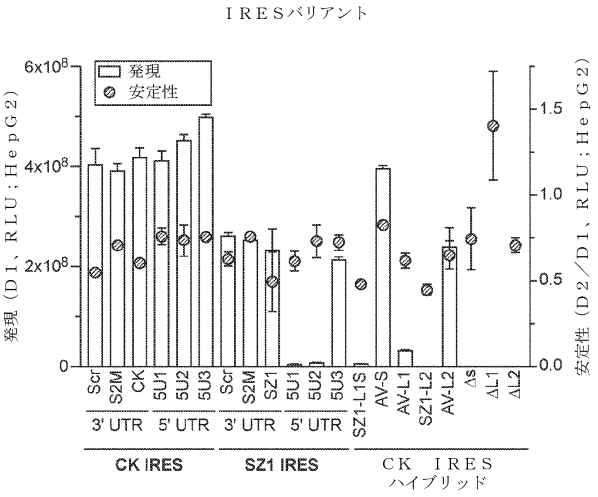

【図５１】



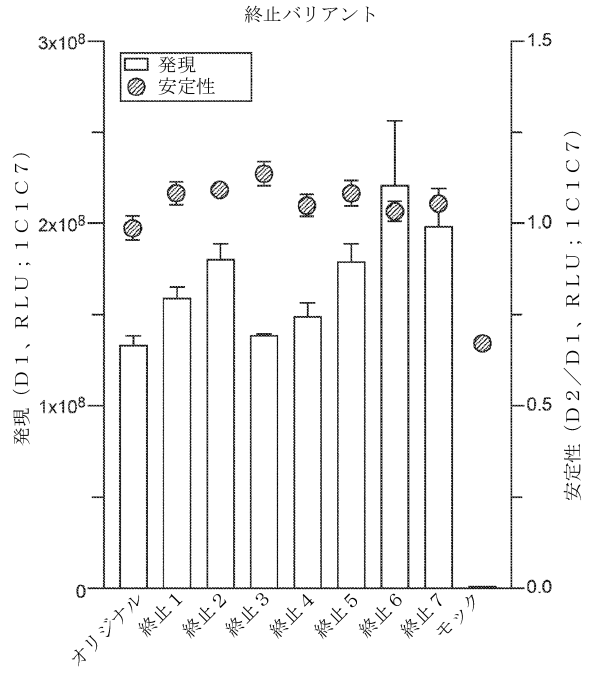

【図５２】



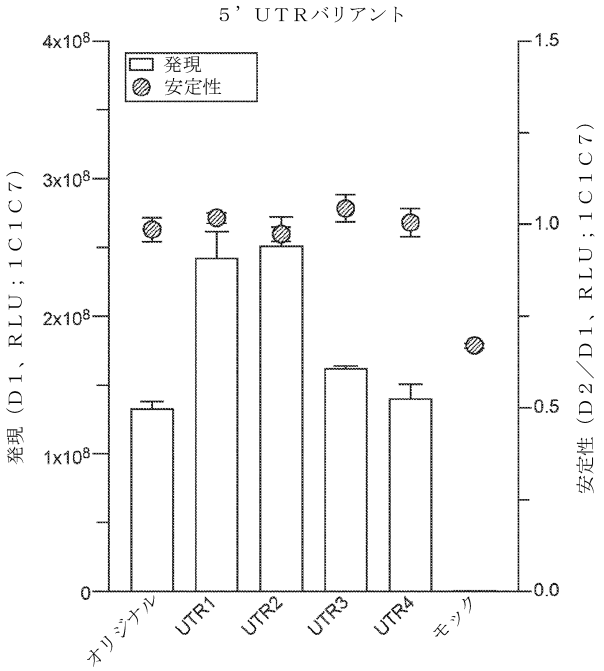

【図５３】



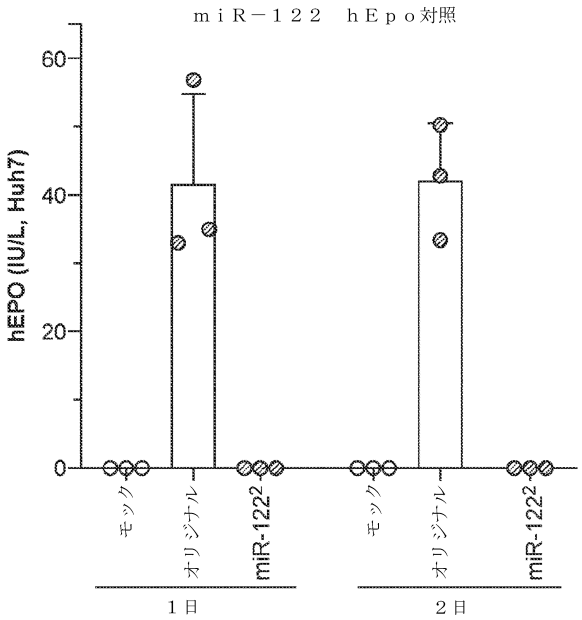
【図５４】



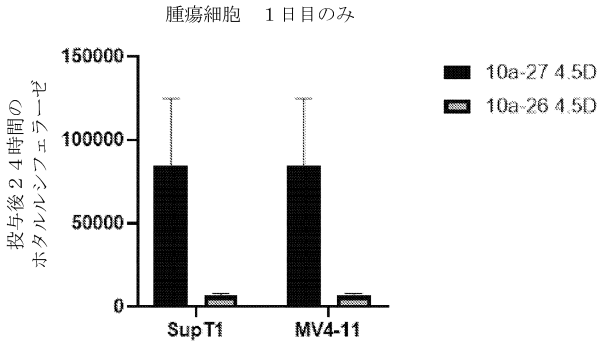

【図５５】



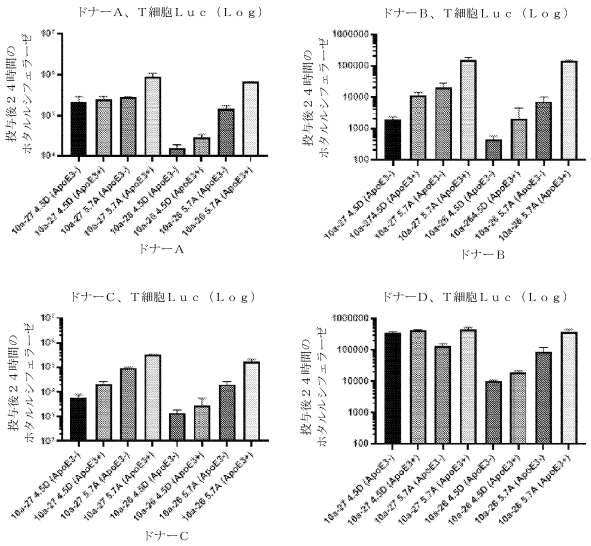

【図５６】



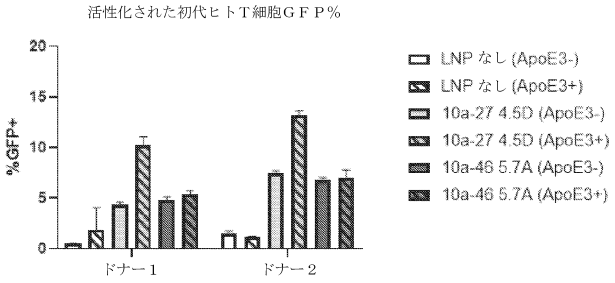

【図５７】



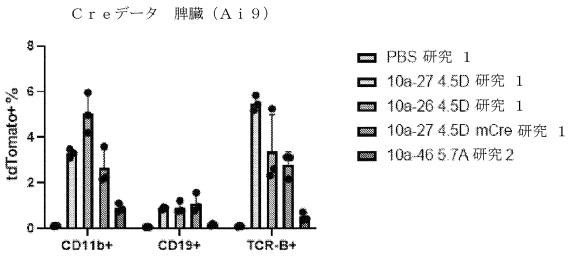
【図５８】



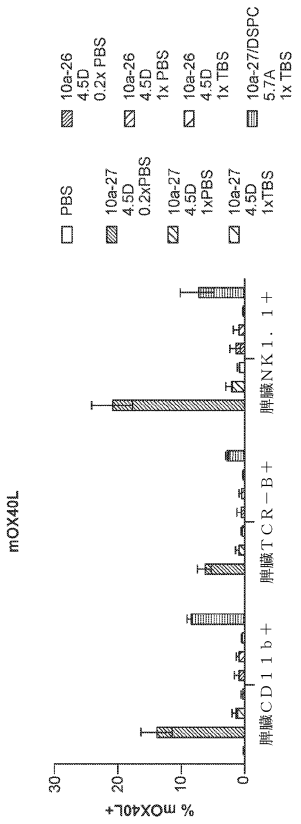

【図５９】



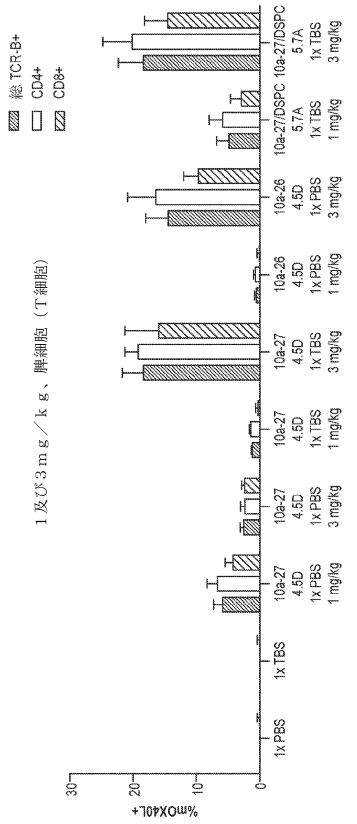

【図６０】



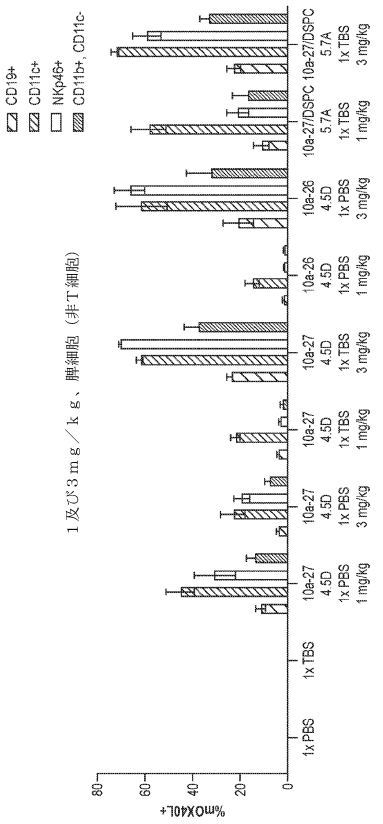

【図６１】



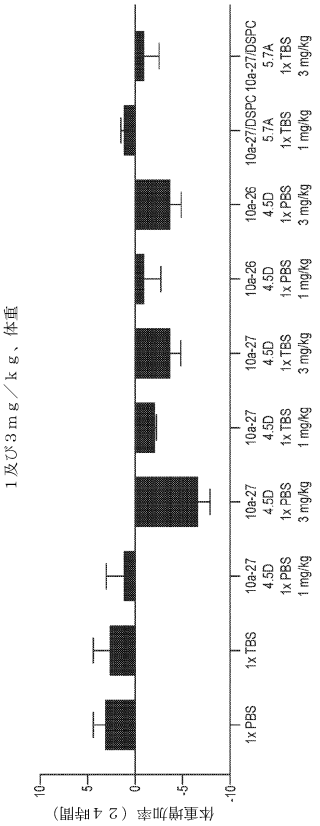
【図６２Ａ】



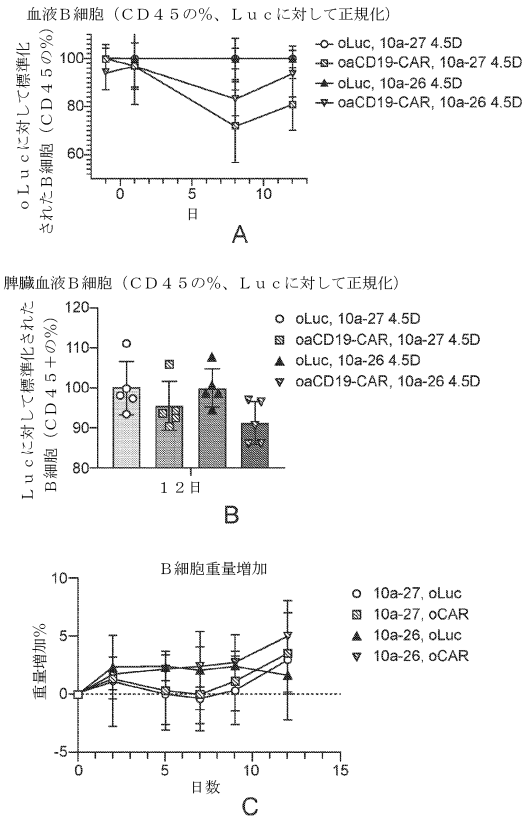

【図６２Ｂ】



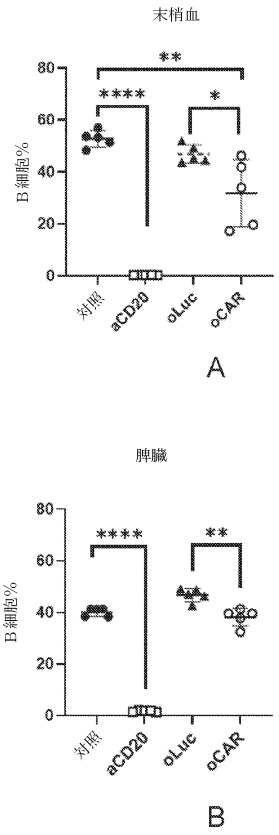

【図６２Ｃ】



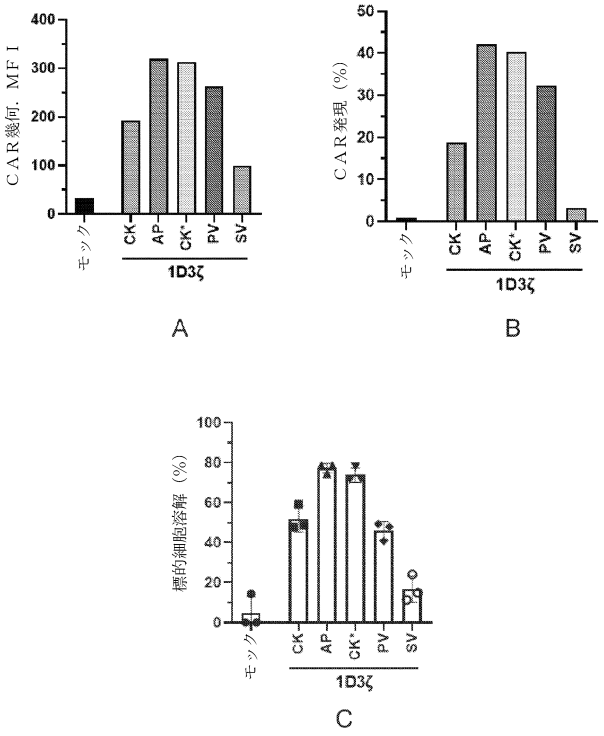

【図６３】



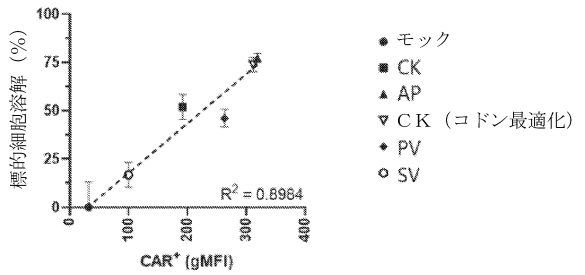
【図６４】



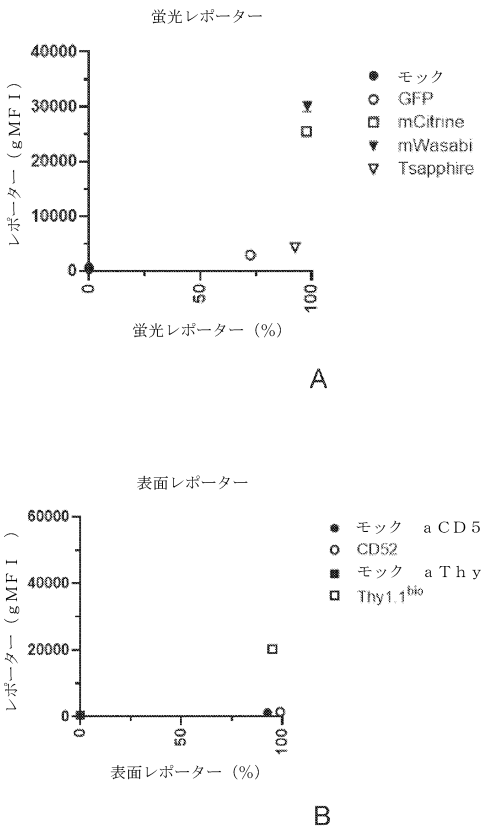

【図６５】



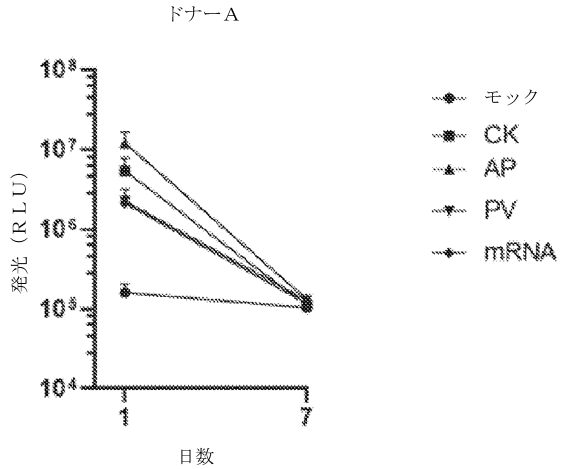

【図６６】



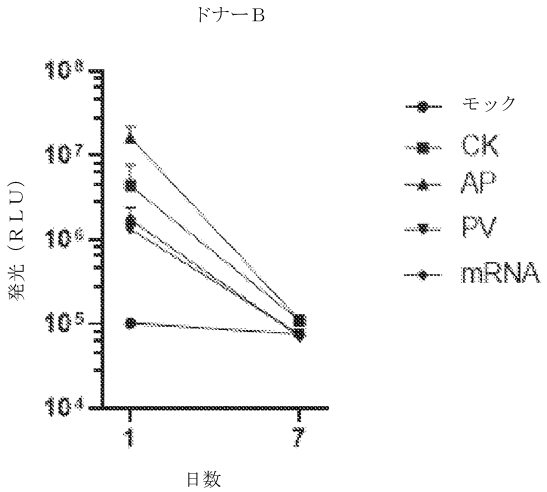

【図６７】



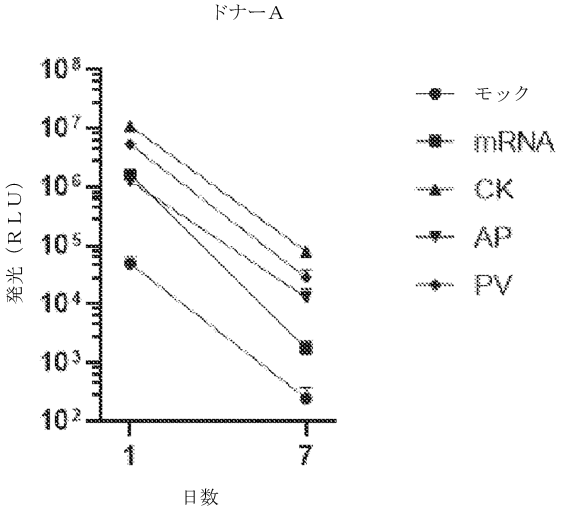
【図６８Ａ】



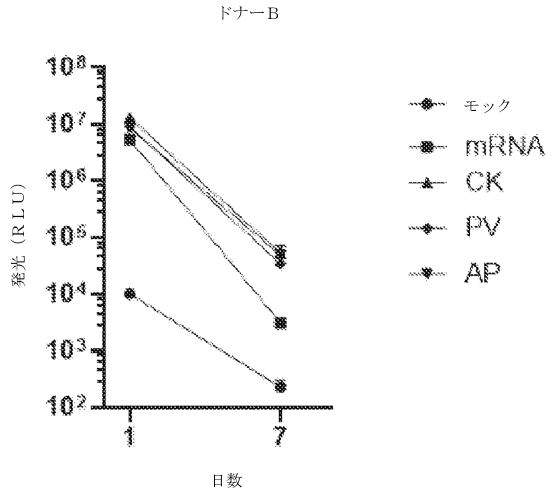

【図６８Ｂ】



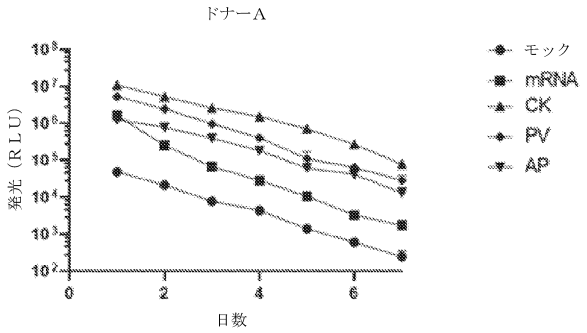

【図６８Ｃ】



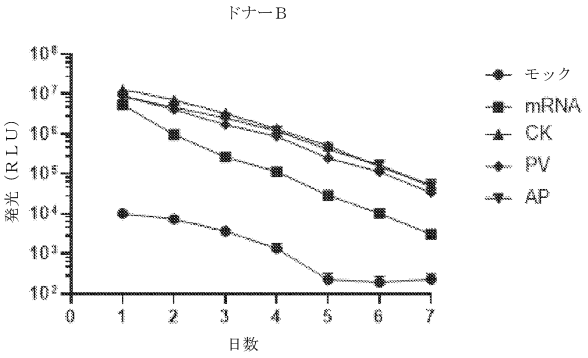

【図６８Ｄ】



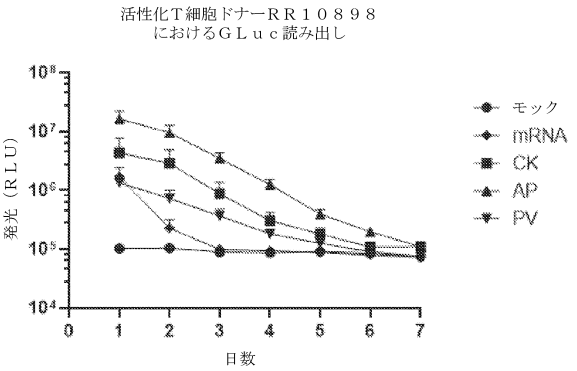
【図６８Ｅ】



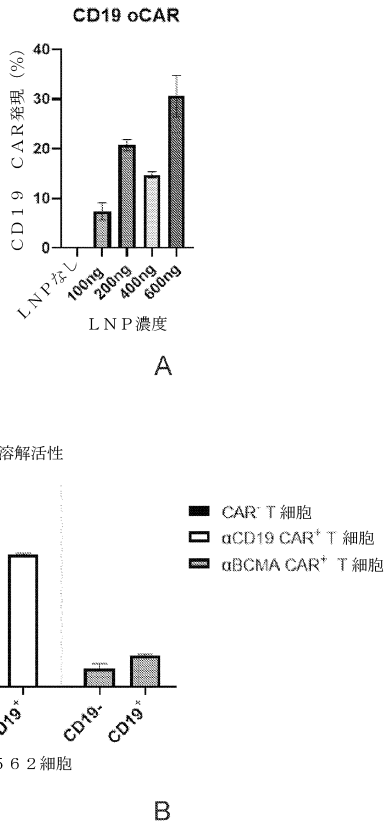

【図６８Ｆ】



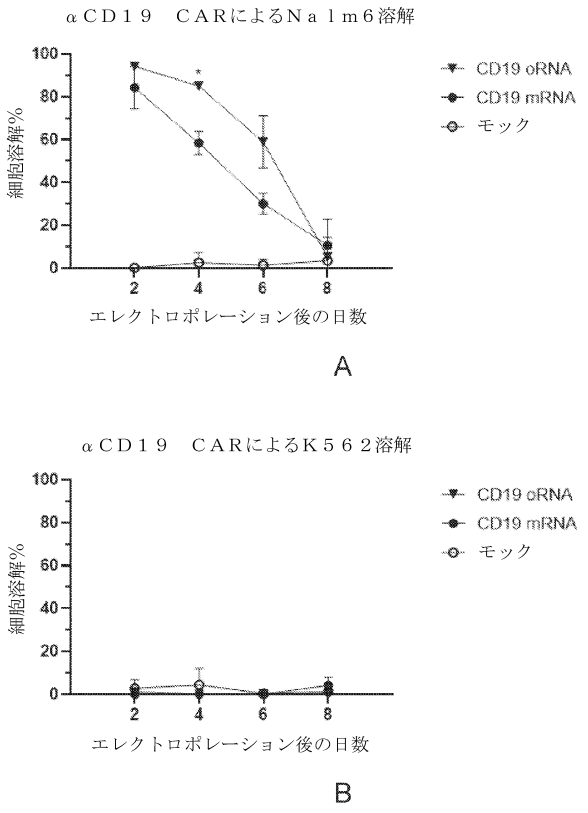

【図６８Ｇ】



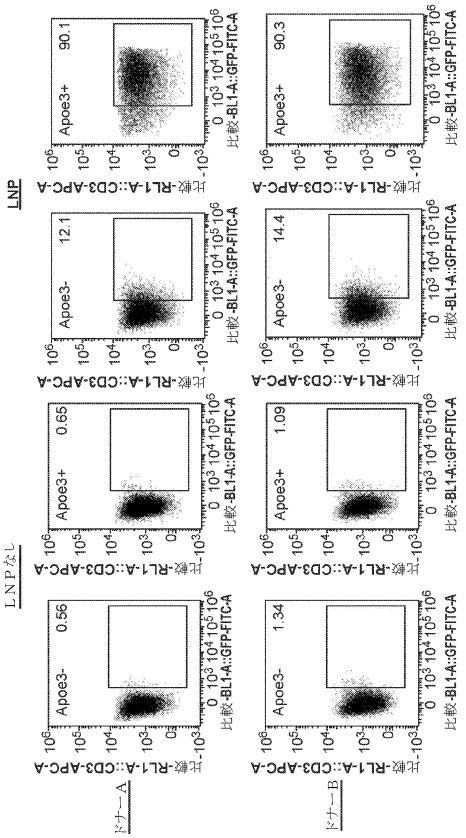

【図６９】



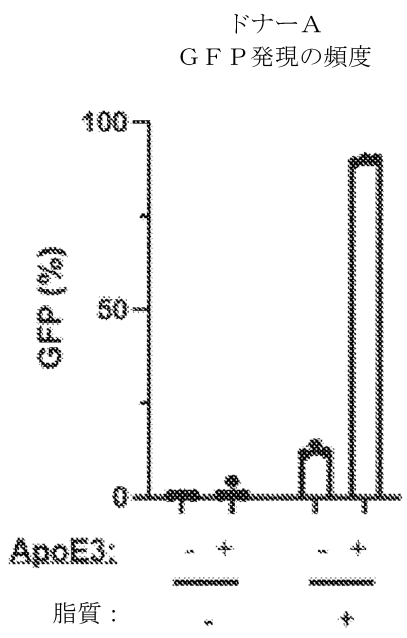
【図７０】



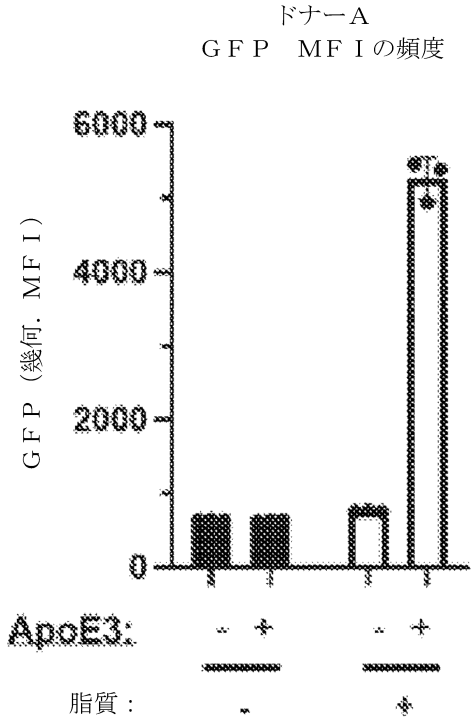

【図７１Ａ】



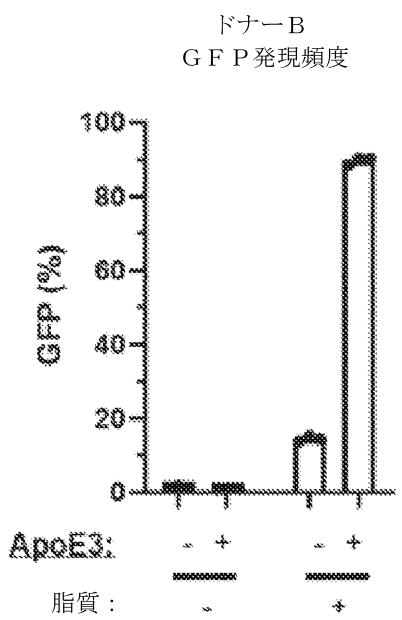

【図７１Ｂ】



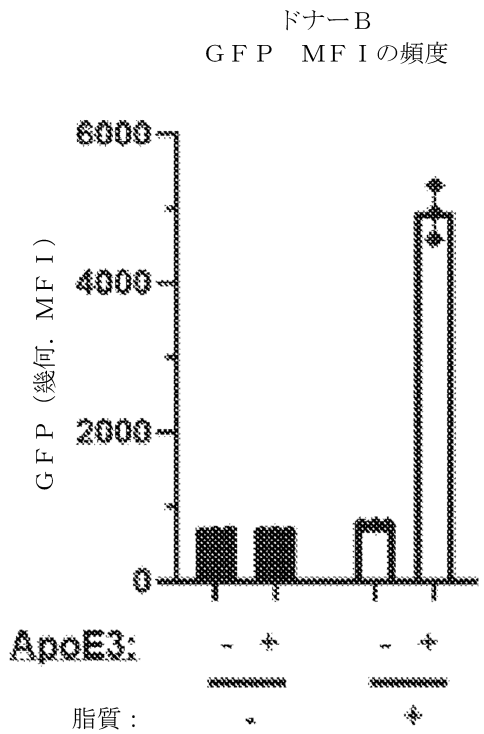

【図７１Ｃ】



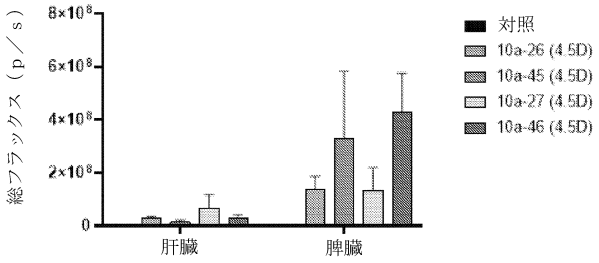
【図７１Ｄ】



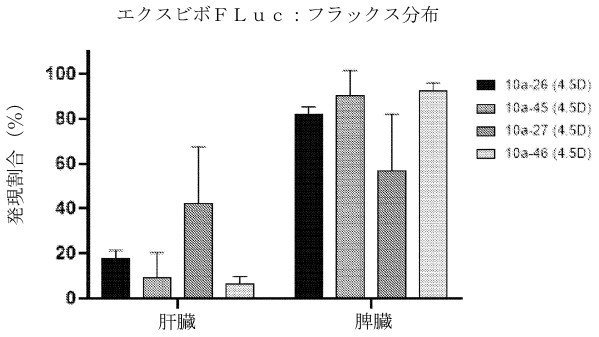

【図７１Ｅ】



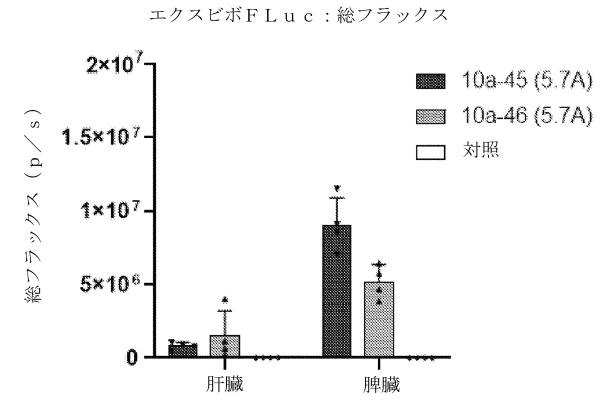

【図７２Ａ】



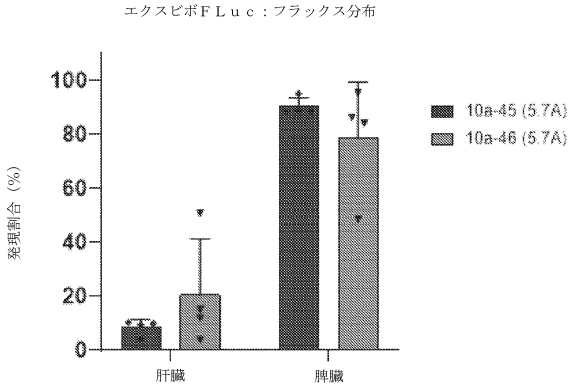

【図７２Ｂ】



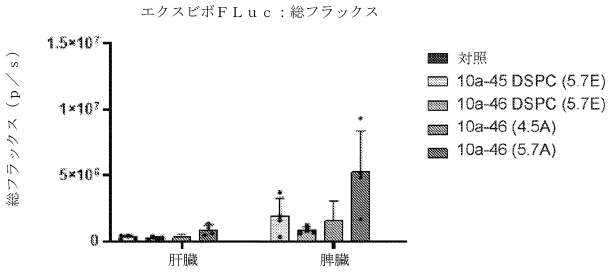
【図７２Ｃ】



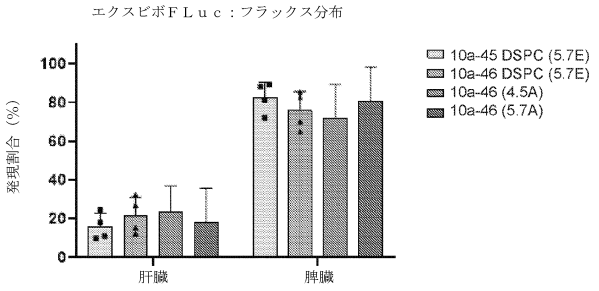

【図７２Ｄ】



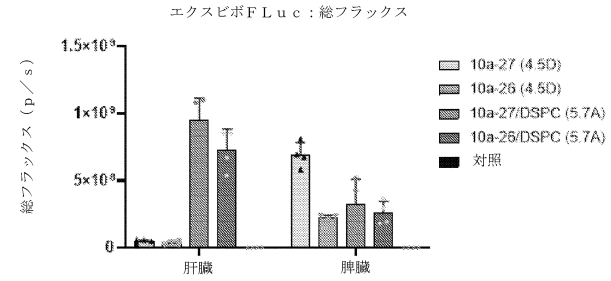

【図７２Ｅ】



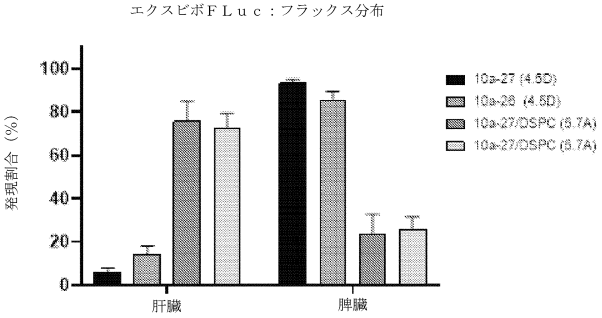

【図７２Ｆ】



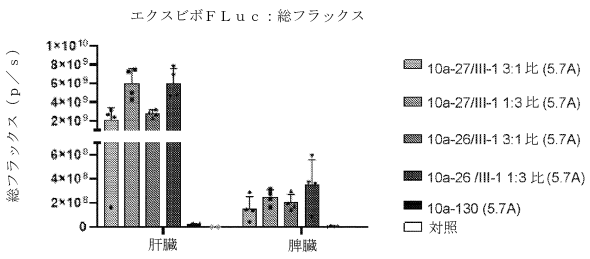

【図７２Ｇ】



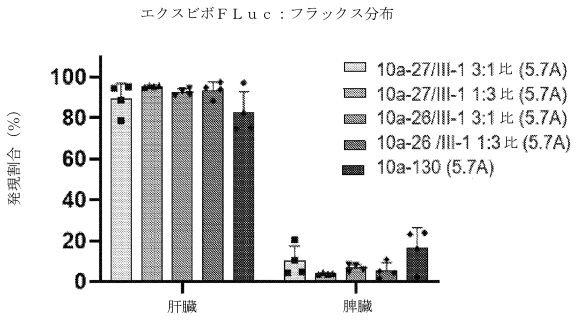

【図７２Ｈ】



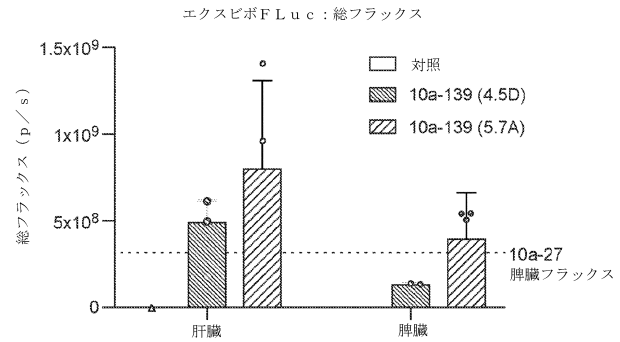
【図７２Ｉ】



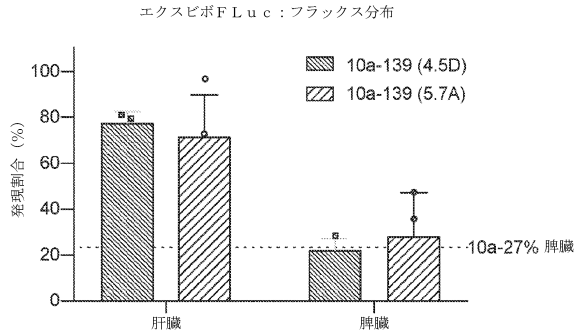

【図７２Ｊ】



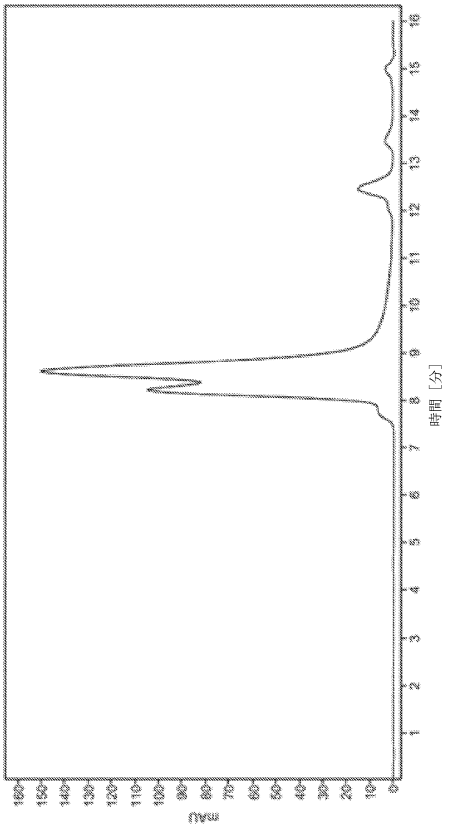

【図７２Ｋ】



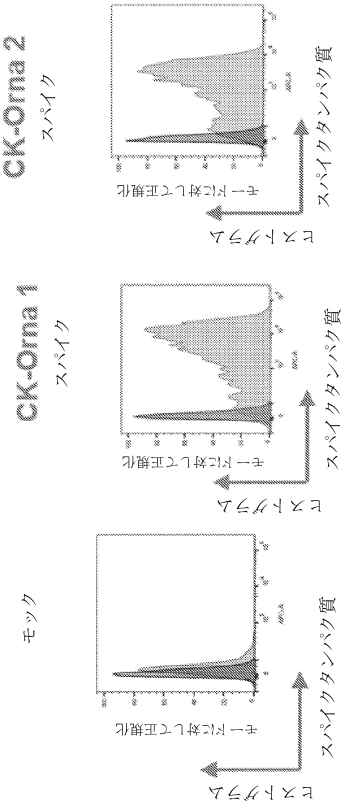

【図７２Ｌ】



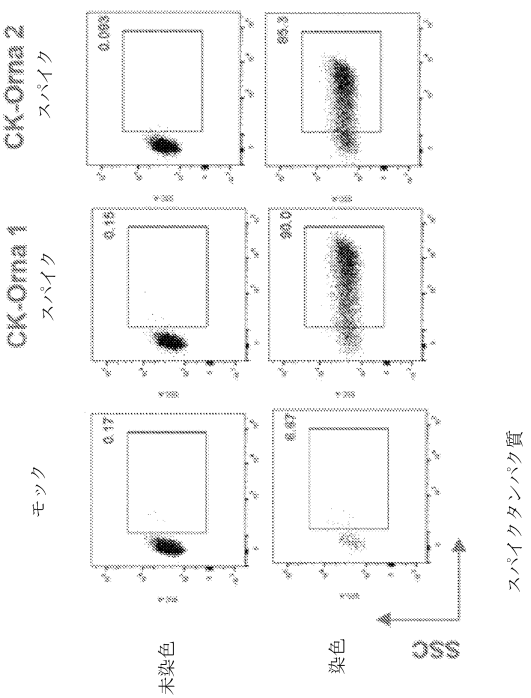
【図７３Ａ】



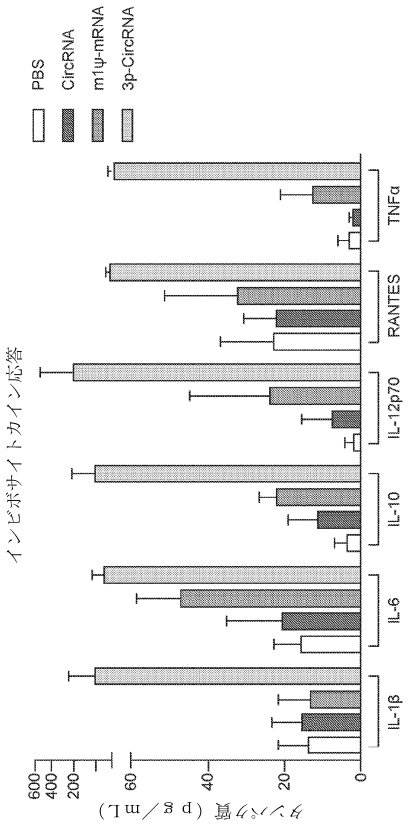

【図７３Ｂ】



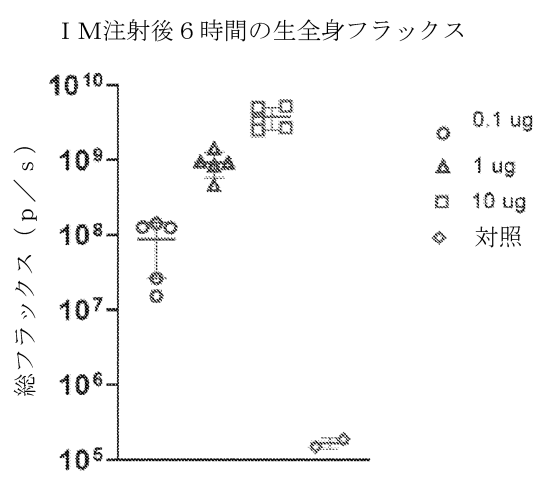

【図７３Ｃ】



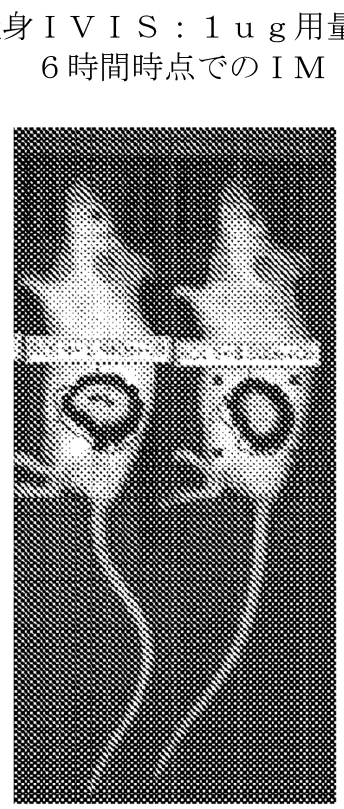

【図７４】



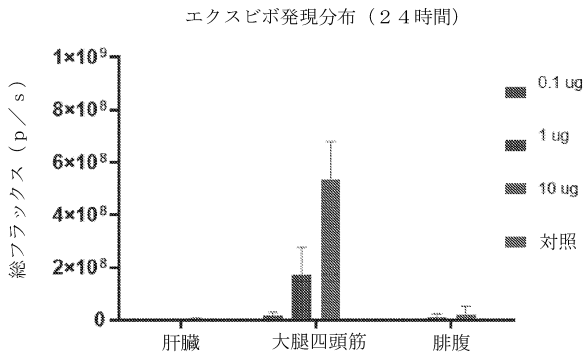
【図７５Ａ】



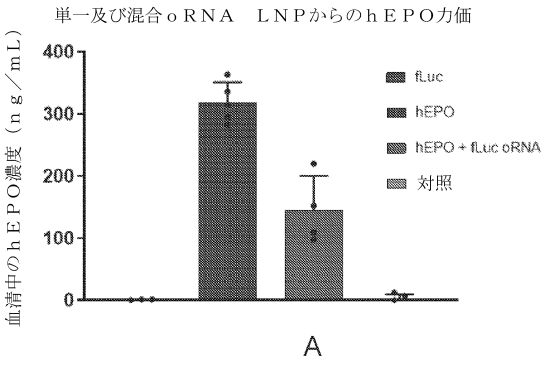

【図７５Ｂ】



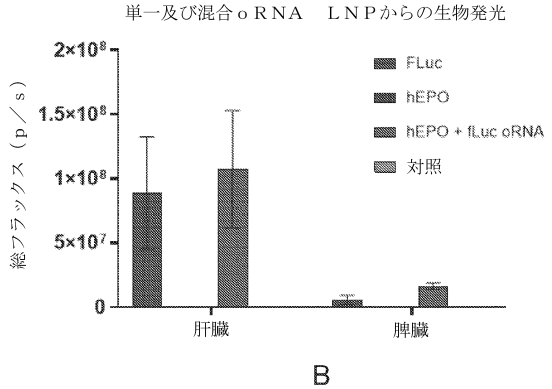

【図７５Ｃ】




【図７６】

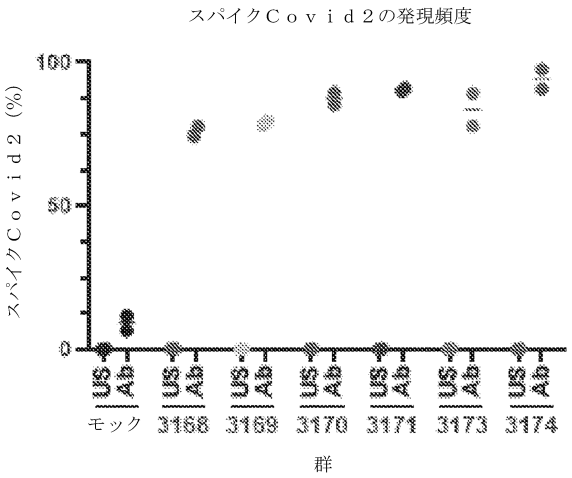



A

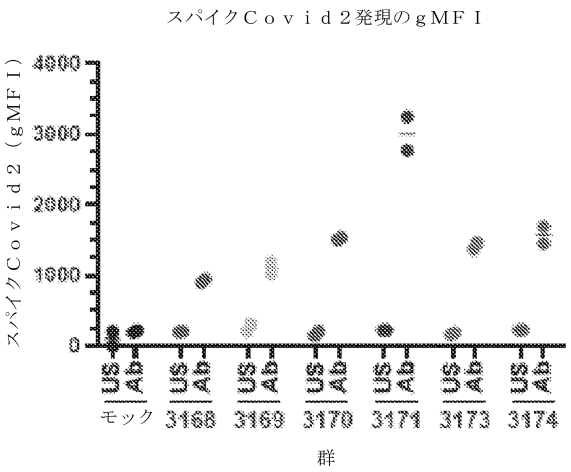



B

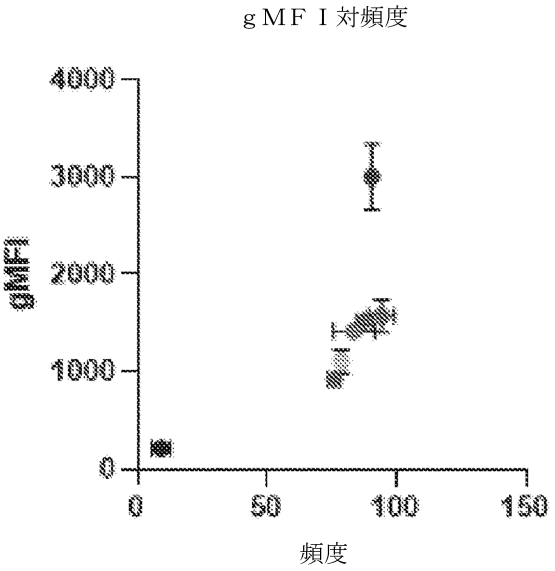
【図７７Ａ】



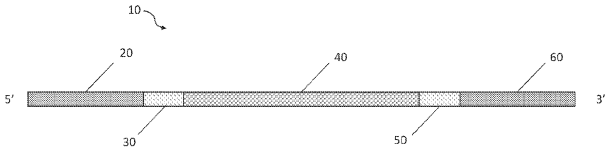

【図７７Ｂ】



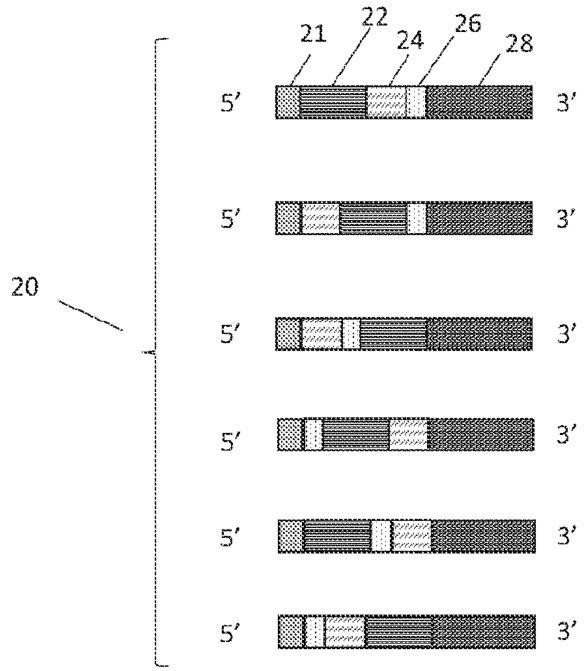

【図７７Ｃ】



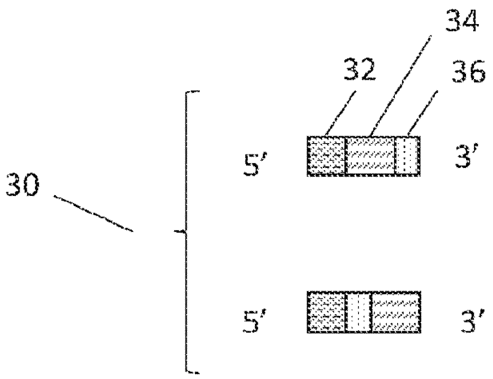

【図７８】



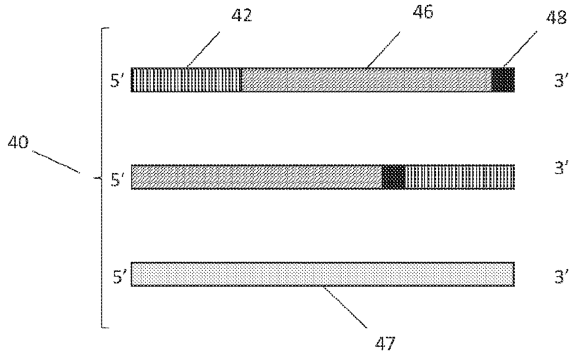
【図７９】



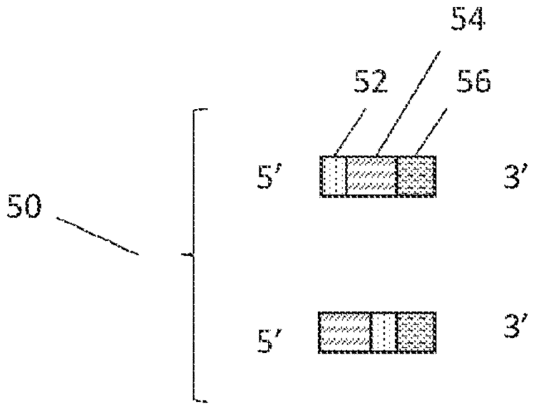

【図８０】



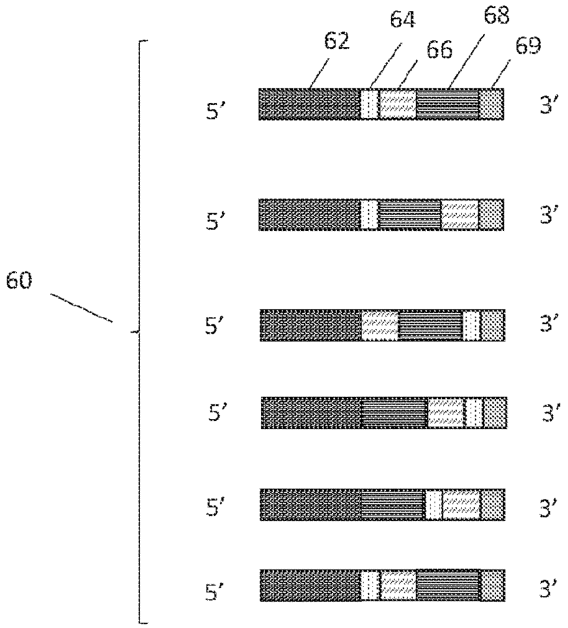

【図８１】



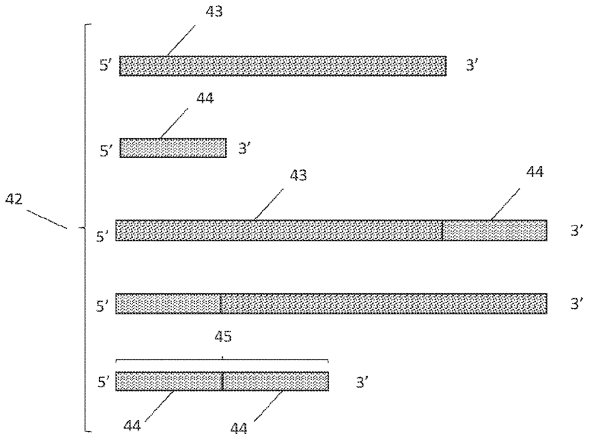

【図８２】



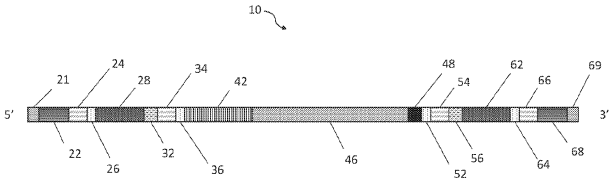
【図８３】



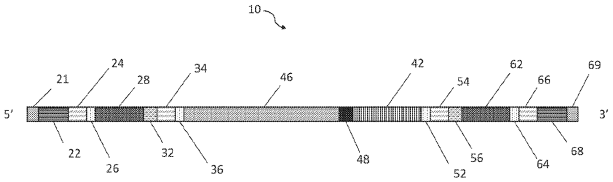

【図８４】



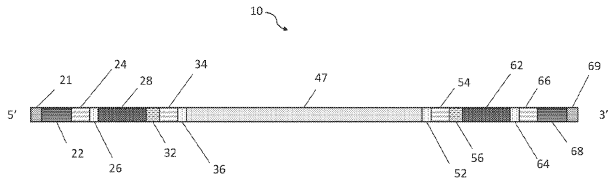

【図８５】



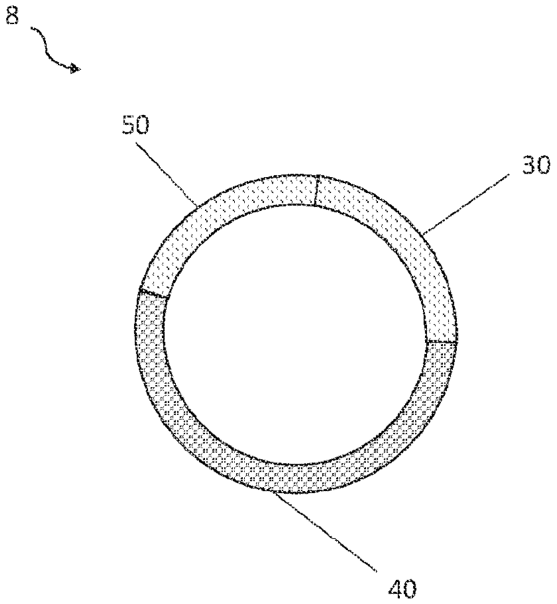

【図８６】



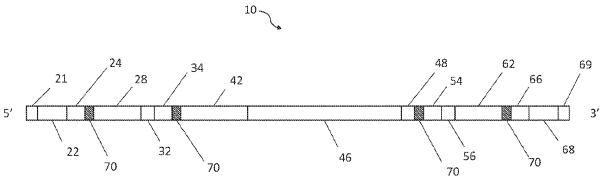
【図８７】



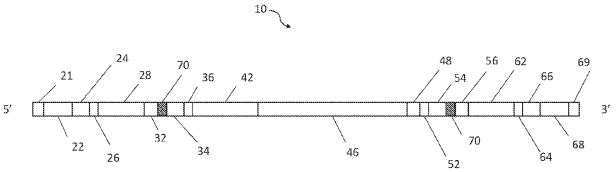

【図８８】




【図８９Ａ】

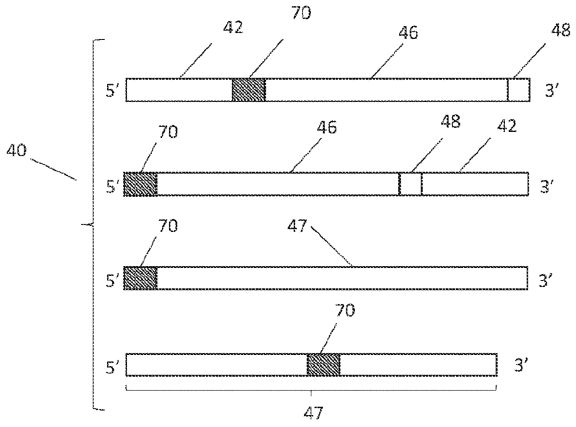



【図８９Ｂ】

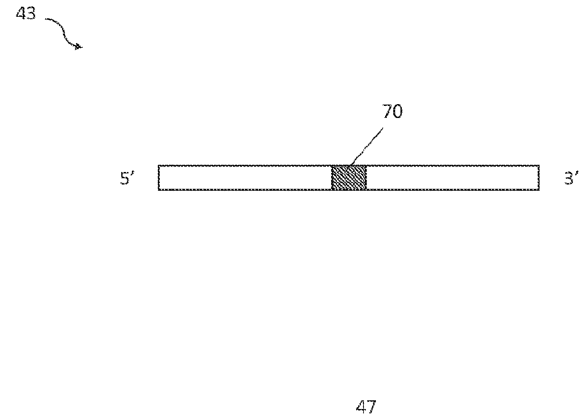


【図８９Ｃ】

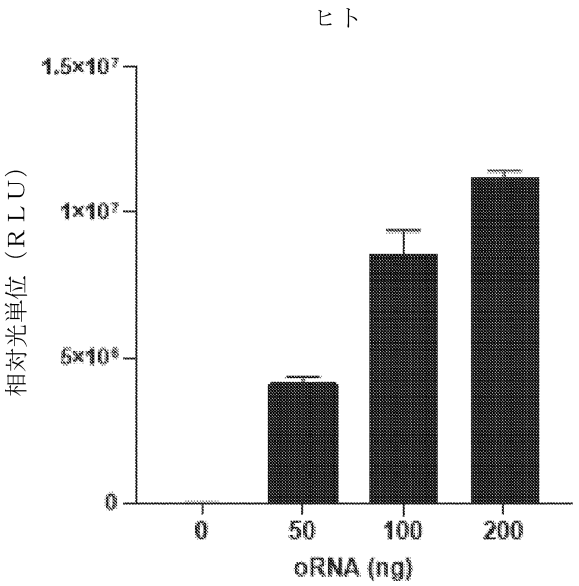
【図８９Ｄ】



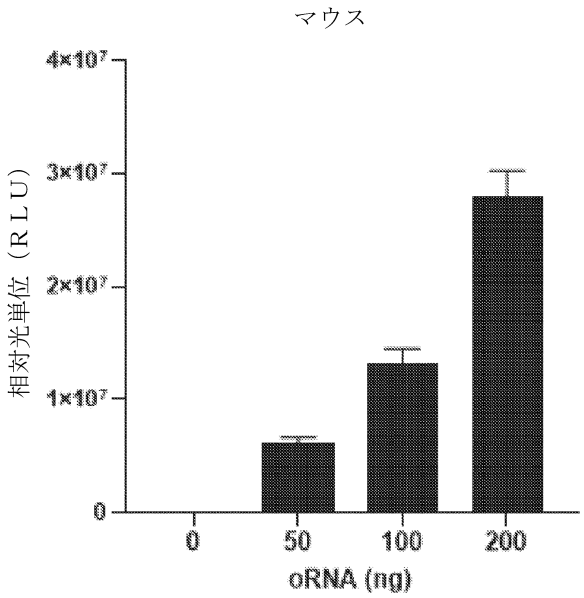

【図８９Ｅ】



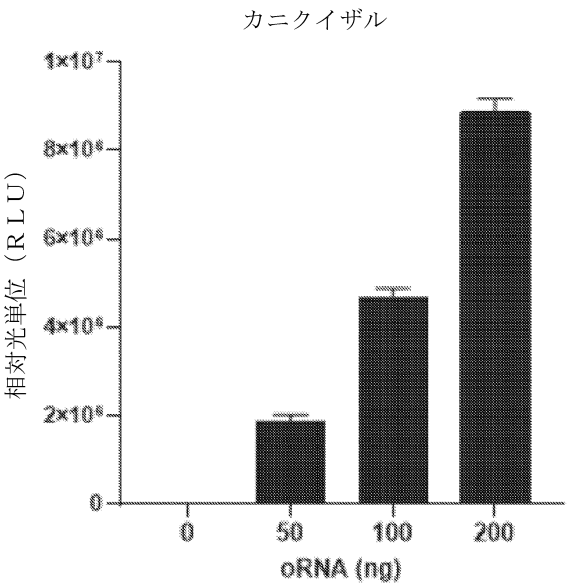

【図９０Ａ】



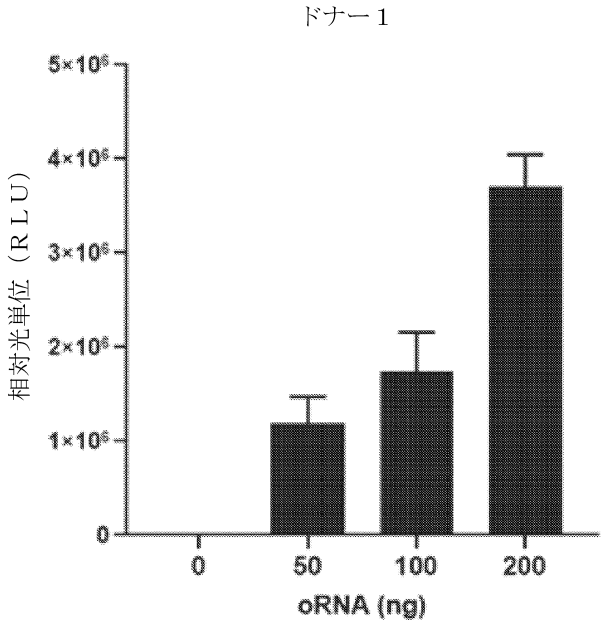
【図９０Ｂ】



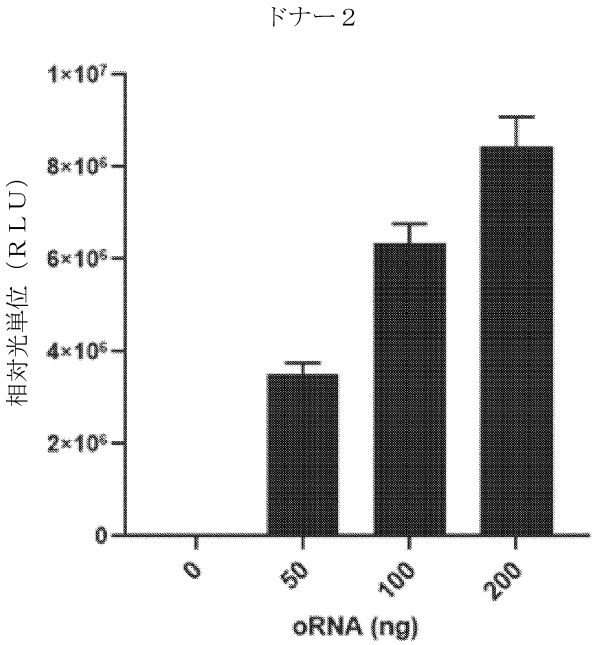

【図９０Ｃ】



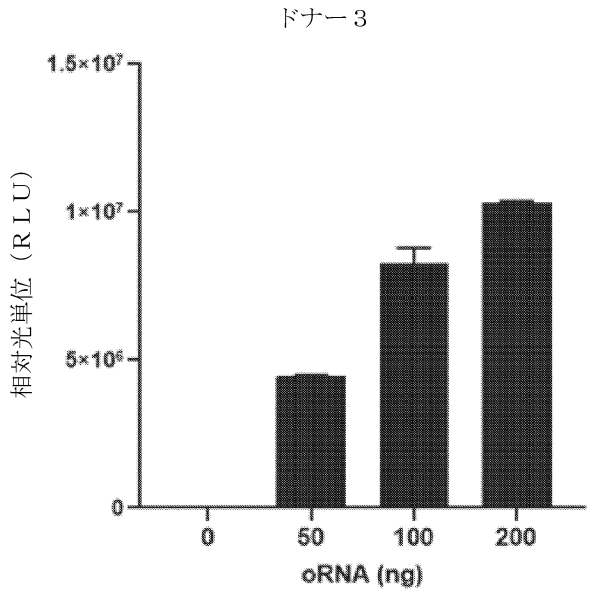

【図９１Ａ】



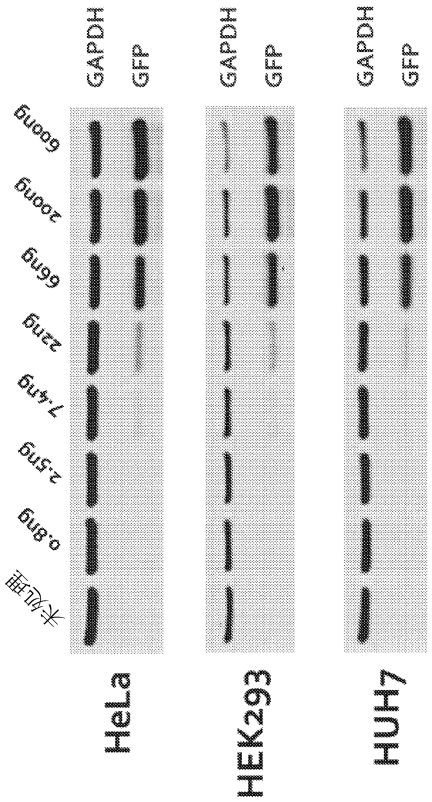

【図９１Ｂ】



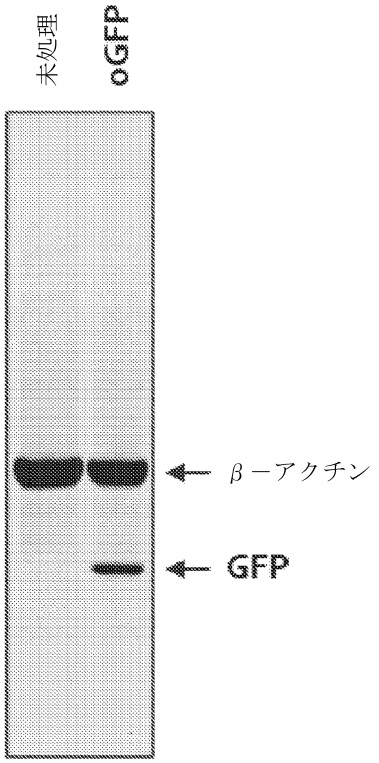
【図９１Ｃ】



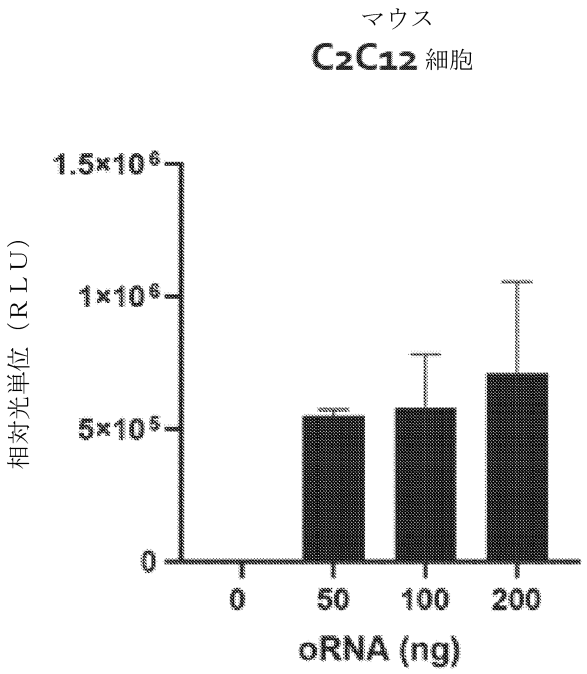

【図９２】



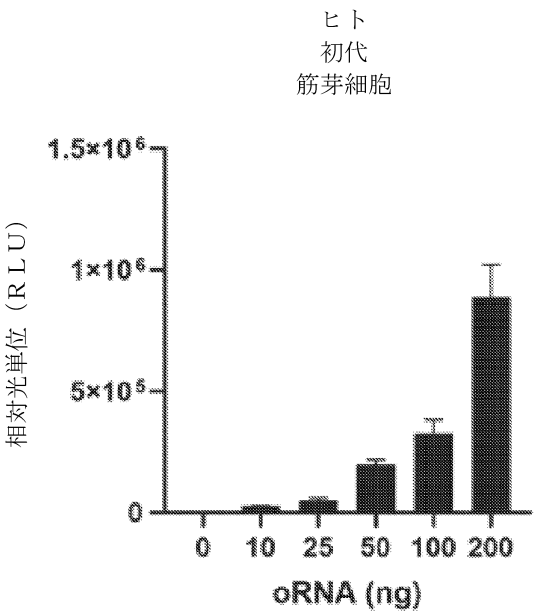

【図９３】



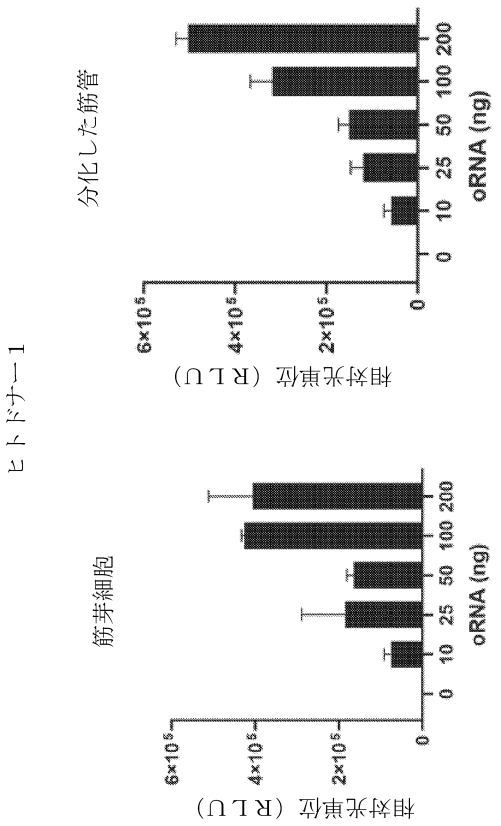

【図９４Ａ】



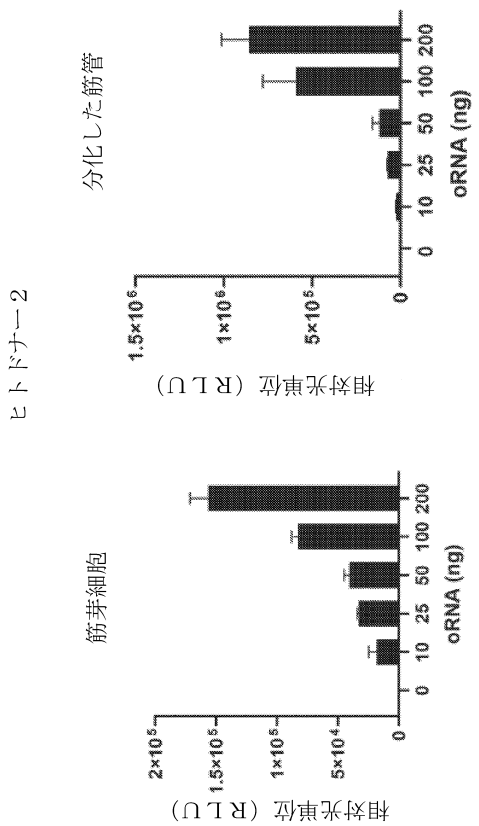
【図９４Ｂ】



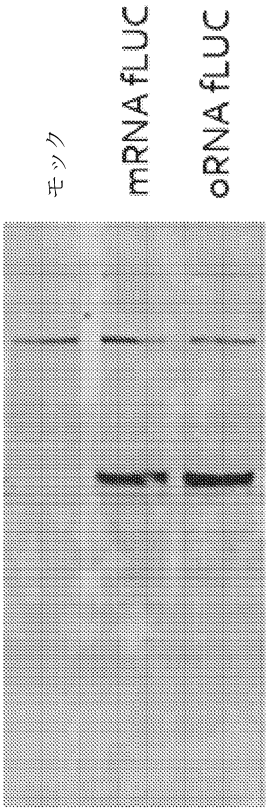

【図９５Ａ】



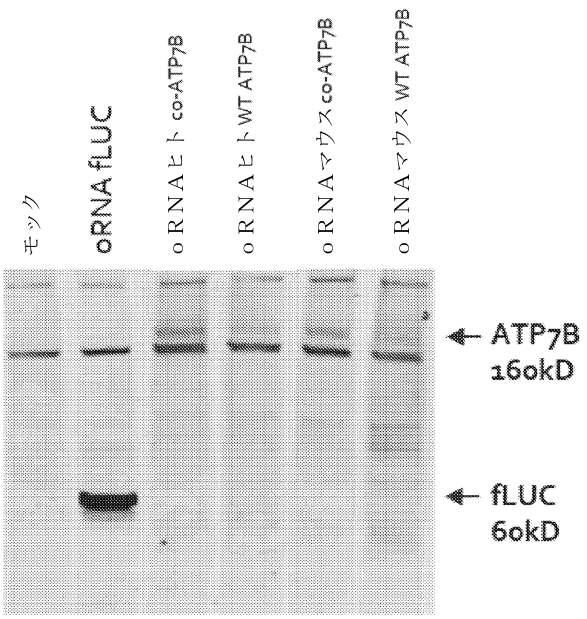

【図９５Ｂ】




【図９６Ａ】

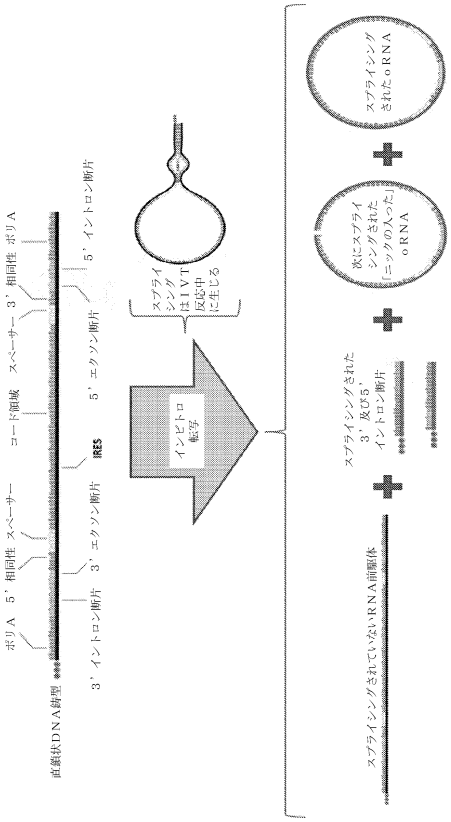


【図９６Ｂ】

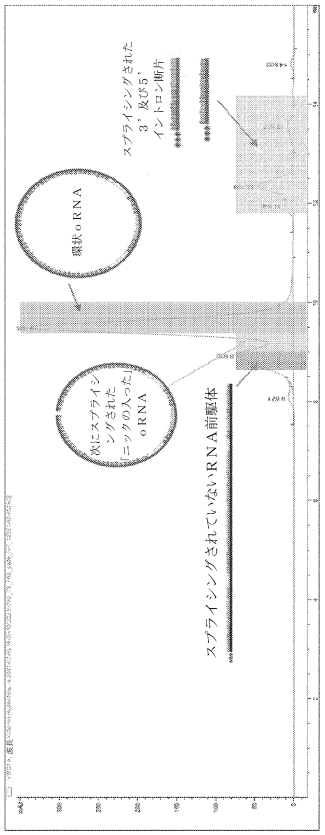



ｃｏ＝コドン最適化
ＷＴ＝野生型

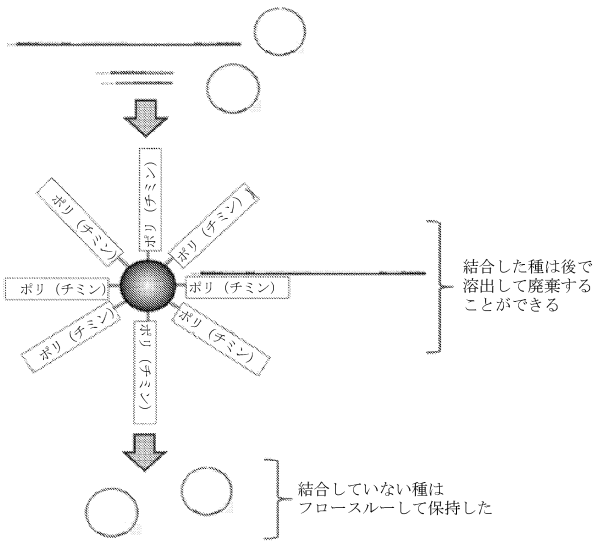
【図９７Ａ】



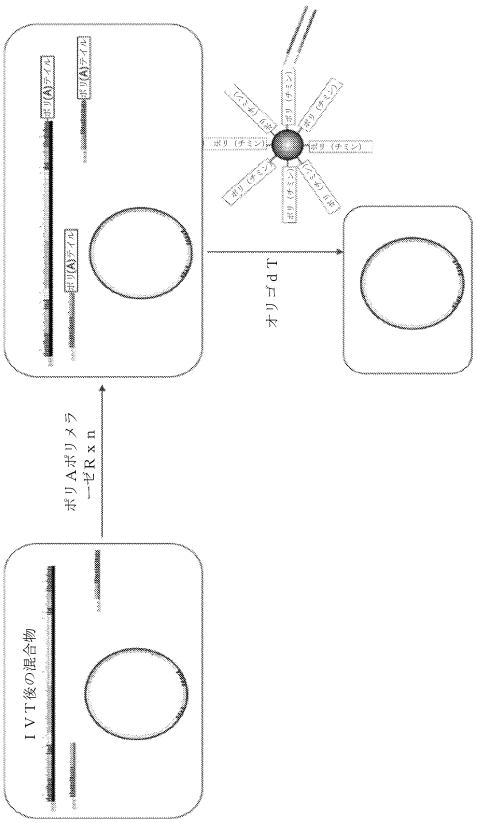

【図９７Ｂ】



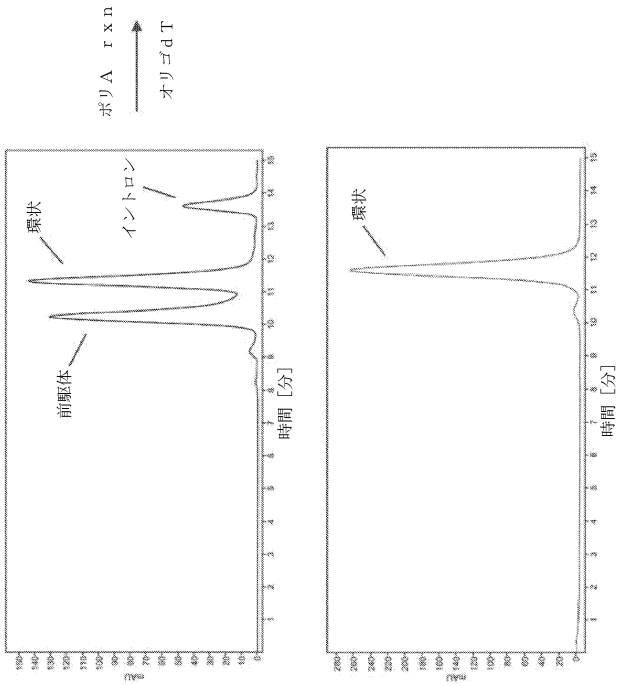

【図９８】



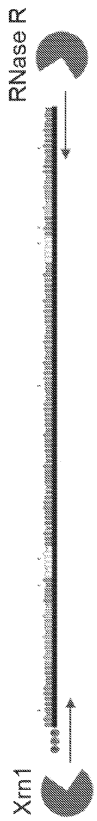
【図９９Ａ】



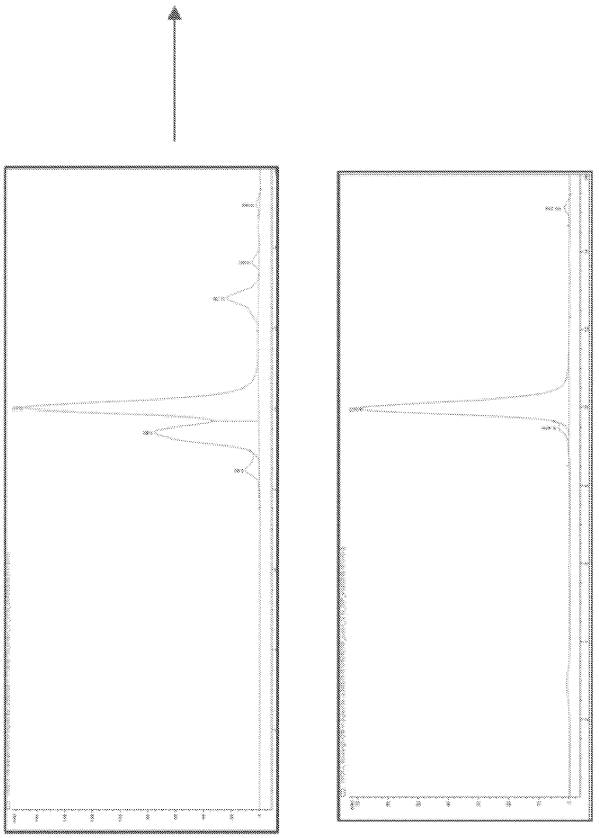

【図９９Ｂ】



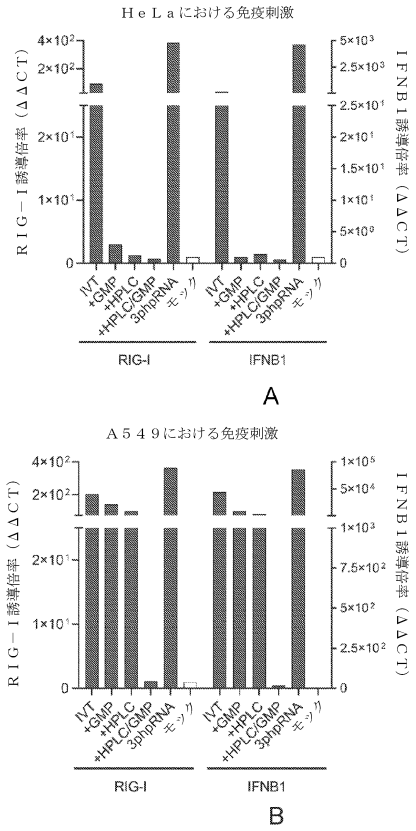

【図１００Ａ】



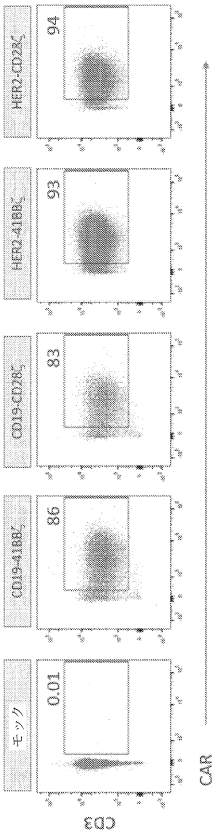

【図１００Ｂ】



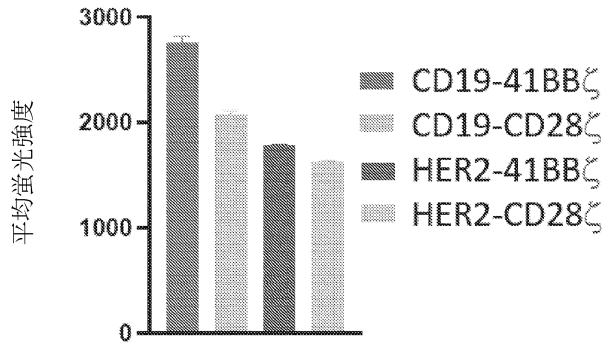
【図１０１】



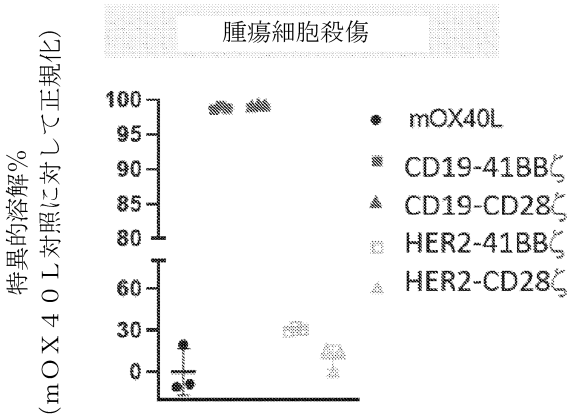

【図１０２Ａ】



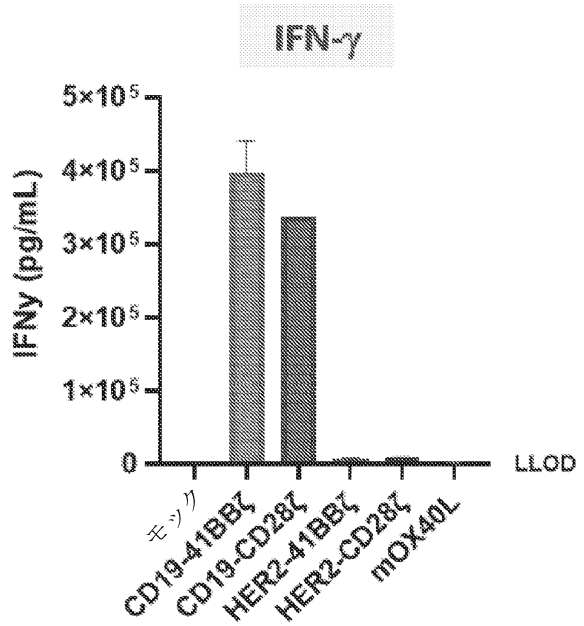

【図１０２Ｂ】



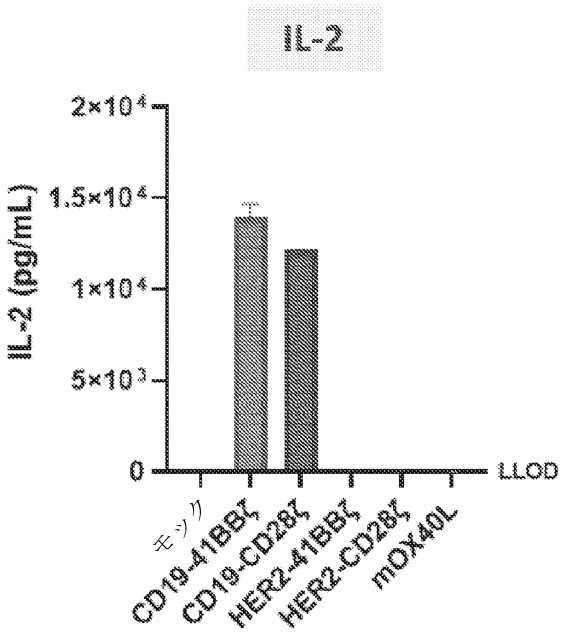

【図１０３Ａ】



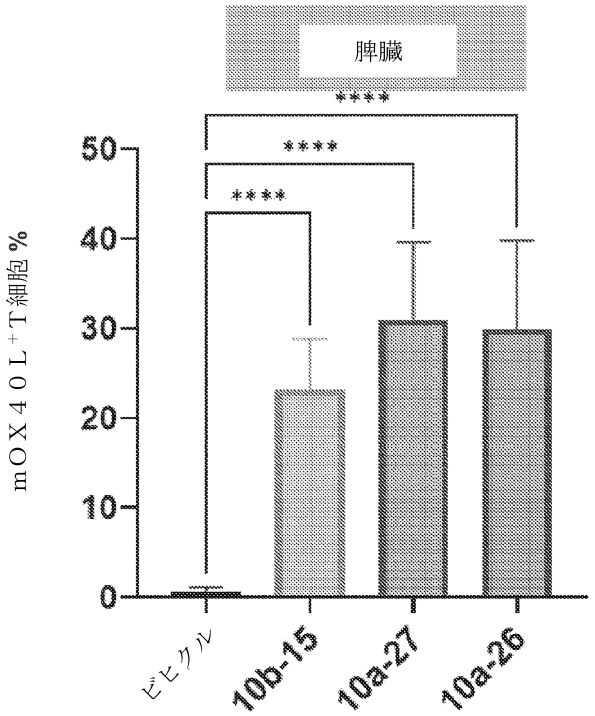
【図１０３Ｂ】



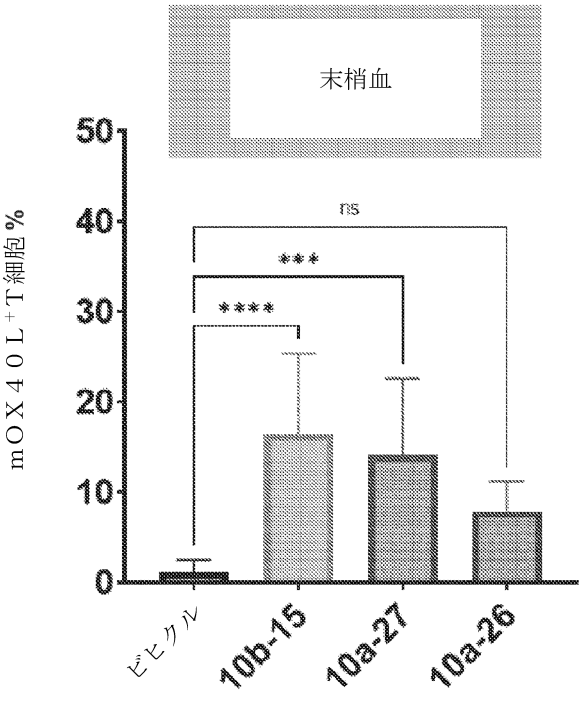

【図１０３Ｃ】



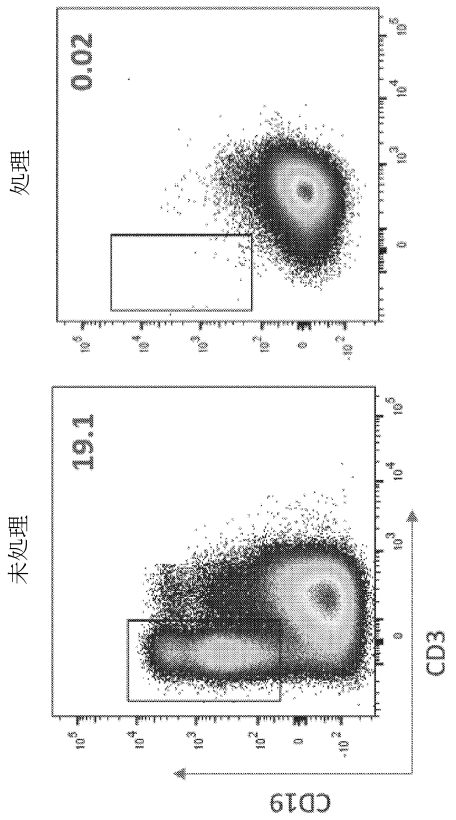

【図１０４Ａ】



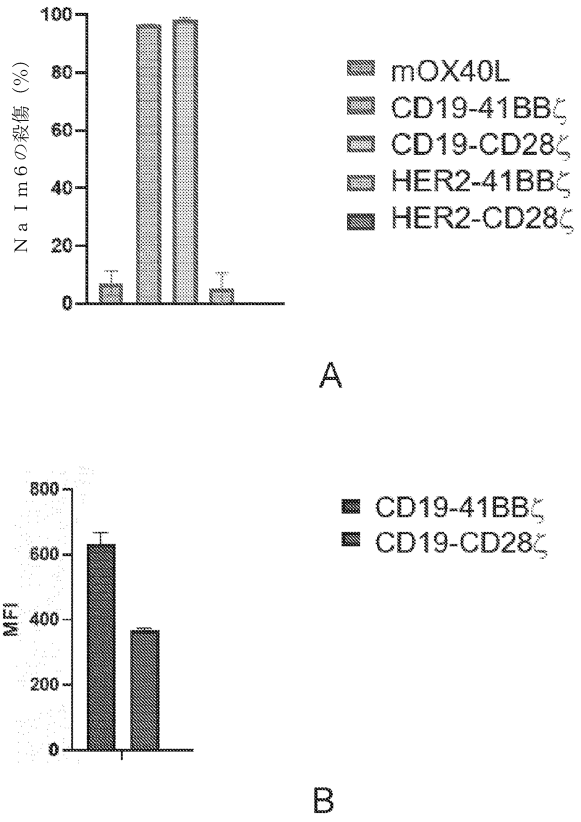

【図１０４Ｂ】



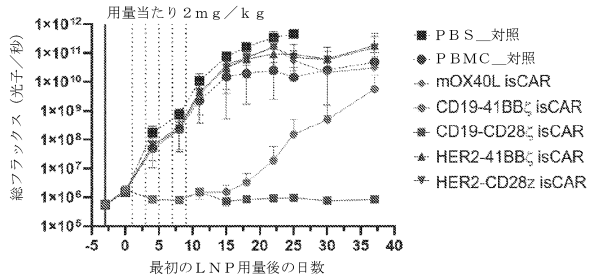
【図１０５】



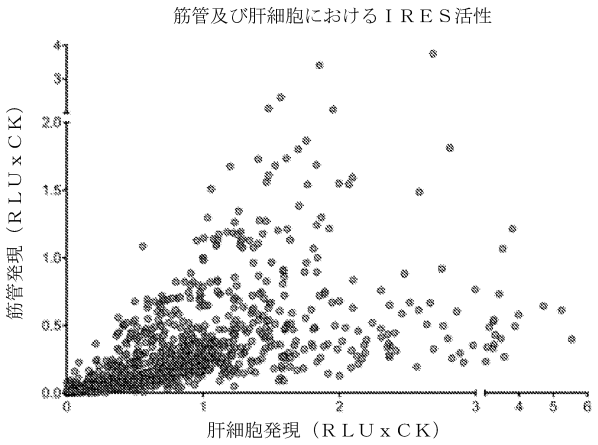

【図１０６】



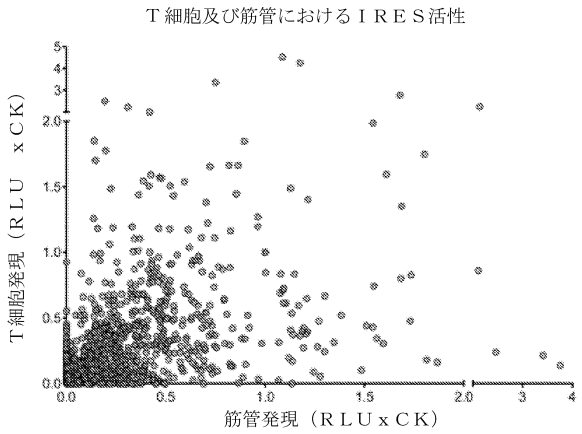

【図１０７】



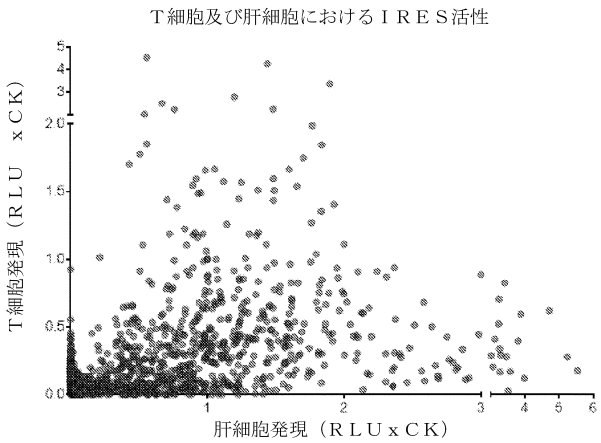

【図１０８Ａ】



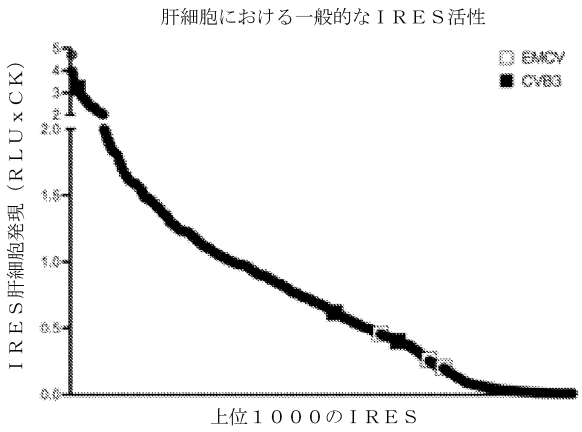
【図１０８Ｂ】



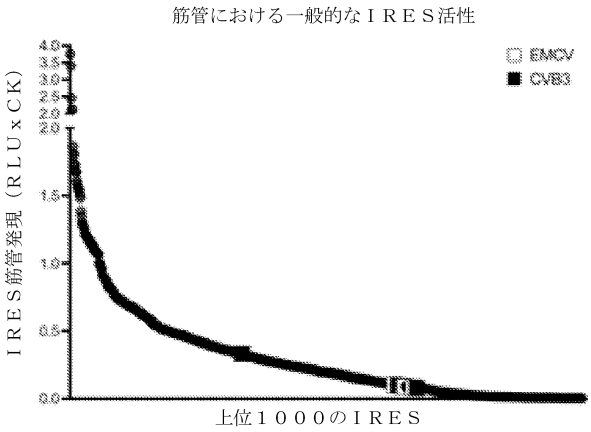

【図１０８Ｃ】



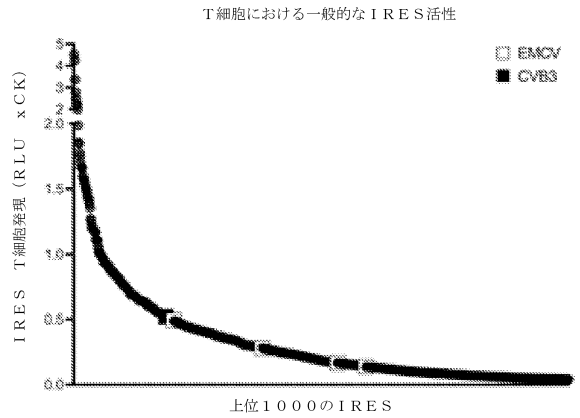

【図１０９Ａ】




【図１０９Ｂ】



【図１０９Ｃ】




【配列表】

２０２４５２１４４４０００００１.ａｐｐ

【国際調査報告】

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/033091

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N15/79 C12N15/85
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| X | R. ALEXANDER WESSELHOEFT ET AL: "Engineering circular RNA for potent and stable translation in eukaryotic cells", NATURE COMMUNICATIONS, vol. 9, no. 1, 6 July 2018 (2018-07-06), XP055622096, DOI: 10.1038/s41467-018-05096-6 | 1 |
| Y | the whole document | 2-143, 147-183 |
| | ----- -/-- | |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

| Date of the actual completion of the international search | Date of mailing of the international search report |
|---|---|
| 10 November 2022 | 16/01/2023 |
| Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016 | Authorized officer Young, Craig |

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

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/033091

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| X | WESSELHOEFT R ALEXANDER ET AL: "RNA Circularization Diminishes Immunogenicity and Can Extend Translation DurationIn Vivo", MOLECULAR CELL, vol. 74, no. 3, 19 March 2019 (2019-03-19), page 508, XP085676575, ISSN: 1097-2765, DOI: 10.1016/J.MOLCEL.2019.02.015 | 1 |
| Y | the whole document | 2-143, 147-183 |
| | ----- | |
| X | WO 2019/236673 A1 (MASSACHUSETTS INST TECHNOLOGY [US]) 12 December 2019 (2019-12-12) | 1 |
| Y | the whole document | 2-143, 147-183 |
| | ----- | |
| X | WO 2020/237227 A1 (MASSACHUSETTS INST TECHNOLOGY [US]; ORNA THERAPEUTICS INC [US] ET AL.) 26 November 2020 (2020-11-26) | 1 |
| Y | the whole document | 2-143, 147-183 |
| | ----- | |
| X | COSTELLO ALAN ET AL: "Reinventing the Wheel: Synthetic Circular RNAs for Mammalian Cell Engineering", TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, GB, vol. 38, no. 2, 14 August 2019 (2019-08-14), pages 217-230, XP086006294, ISSN: 0167-7799, DOI: 10.1016/J.TIBTECH.2019.07.008 [retrieved on 2019-08-14] | 1 |
| Y | the whole document | 2-143, 147-183 |
| | ----- | |
| X | WO 2017/222911 A1 (UNIV LELAND STANFORD JUNIOR [US]; CHANG HOWARD Y [US] ET AL.) 28 December 2017 (2017-12-28) | 1 |
| Y | the whole document | 2-143, 147-183 |
| | ----- | |
| A | LESCA M. HOLDT ET AL: "Circular RNAs as Therapeutic Agents and Targets", FRONTIERS IN PHYSIOLOGY, vol. 9, 9 October 2018 (2018-10-09), XP055645982, DOI: 10.3389/fphys.2018.01262 the whole document | 1-143, 147-183 |
| | ----- | |

2

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

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2022/033091

**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.:
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 additional sheet

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 an 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.:
1-143, 147-183

**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.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (2)) (April 2005)

International Application No. PCT/US2022/033091

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-143, 147-183

Precursor RNA polynucleotide having the following basic structure :a. a 5' enhanced intron element,b. a 5' enhanced exon element,c. a core functional element,d. a 3' enhanced exon element, and e. a 3' enhanced intron element,wherein the core functional element comprises, in the following order: i. a translation initiation element (TIE),ii. a coding element, and iii. optionally, a stop codon or a stop cassette.

---

2. claims: 144-146

A method of making a translation initiation element (TIE) comprising:a. obtaining a viral untranslated region (UTR);b. determining the functional unit of the UTR capable of binding to an initiation factor and/or initiating translation by progressively deleting sequence;c. removing non-functional units of the UTR; andd. optionally, modifying the ends of the UTR.

---

3. claims: 184-222

A method of purifying circular RNA comprising:a. contacting a composition comprising linear RNA and circular RNA with a binding agent that preferentially binds to the linear RNA over the circular RNA; andb. separating RNA bound to the binding agent from RNA that is not bound to the binding agent.

---

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2022/033091

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---|---|---|
| WO 2019236673 A1 | 12-12-2019 | AU 2019280583 A1 | 03-12-2020 |
| | | BR 112020024292 A2 | 02-03-2021 |
| | | CA 3100276 A1 | 12-12-2019 |
| | | CN 112399860 A | 23-02-2021 |
| | | EP 3801639 A1 | 14-04-2021 |
| | | IL 279157 A | 31-01-2021 |
| | | JP 2021526792 A | 11-10-2021 |
| | | KR 20210018323 A | 17-02-2021 |
| | | SG 11202011162R A | 30-12-2020 |
| | | US 2020080106 A1 | 12-03-2020 |
| | | US 2021198688 A1 | 01-07-2021 |
| | | US 2021363540 A1 | 25-11-2021 |
| | | US 2021403944 A1 | 30-12-2021 |
| | | US 2022025395 A1 | 27-01-2022 |
| | | WO 2019236673 A1 | 12-12-2019 |
| WO 2020237227 A1 | 26-11-2020 | AU 2020280105 A1 | 20-01-2022 |
| | | BR 112021023411 A2 | 01-02-2022 |
| | | CA 3139032 A1 | 26-11-2020 |
| | | EP 3972653 A1 | 30-03-2022 |
| | | IL 288284 A | 01-01-2022 |
| | | JP 2022533796 A | 25-07-2022 |
| | | KR 20220027855 A | 08-03-2022 |
| | | SG 11202112922W A | 30-12-2021 |
| | | US 2021371494 A1 | 02-12-2021 |
| | | US 2022177540 A1 | 09-06-2022 |
| | | WO 2020237227 A1 | 26-11-2020 |
| WO 2017222911 A1 | 28-12-2017 | AU 2017280943 A1 | 17-01-2019 |
| | | CA 3028682 A1 | 28-12-2017 |
| | | EP 3472193 A1 | 24-04-2019 |
| | | US 2019345503 A1 | 14-11-2019 |
| | | WO 2017222911 A1 | 28-12-2017 |

フロントページの続き

| (51)国際特許分類 | | | FI | | テーマコード（参考） |
|---|---|---|---|---|---|
| *A61K* | *47/10* | *(2017.01)* | A61K | 9/127 | |
| *A61K* | *47/34* | *(2017.01)* | A61K | 47/10 | |
| *A61K* | *47/36* | *(2006.01)* | A61K | 47/34 | |
| *A61K* | *47/28* | *(2006.01)* | A61K | 47/36 | |
| *A61K* | *47/12* | *(2006.01)* | A61K | 47/28 | |
| *A61P* | *35/00* | *(2006.01)* | A61K | 47/12 | |
| *A61P* | *35/02* | *(2006.01)* | A61P | 35/00 | |
| *A61P* | *37/06* | *(2006.01)* | A61P | 35/02 | |
| *A61P* | *25/00* | *(2006.01)* | A61P | 37/06 | |
| *A61P* | *21/00* | *(2006.01)* | A61P | 25/00 | |
| *A61P* | *21/04* | *(2006.01)* | A61P | 21/00 | |
| *A61P* | *1/00* | *(2006.01)* | A61P | 21/04 | |
| *A61P* | *27/02* | *(2006.01)* | A61P | 1/00 | |
| *A61P* | *17/06* | *(2006.01)* | A61P | 27/02 | |
| *A61K* | *48/00* | *(2006.01)* | A61P | 17/06 | |
| *A61P* | *5/14* | *(2006.01)* | A61K | 48/00 | |
| *A61K* | *31/7105* | *(2006.01)* | A61P | 5/14 | |
| *A61K* | *9/51* | *(2006.01)* | A61K | 31/7105 | |
| *A61K* | *47/69* | *(2017.01)* | A61K | 9/51 | |
| | | | A61K | 47/69 | |

,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,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

弁護士　山本 健策

(72)発明者　ウェッセルホーフト， ロバート アレクサンダー
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２４７２， ウォータータウン， フォージ ロード ５００ 気付

(72)発明者　オット， クリステン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２４７２， ウォータータウン， フォージ ロード ５００ 気付

(72)発明者　バーンズ， トーマス
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２４７２， ウォータータウン， フォージ ロード ５００ 気付

(72)発明者　モッツ， グレゴリー
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２４７２， ウォータータウン， フォージ ロード ５００ 気付

(72)発明者　ベッカー， エイミー エム．
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２４７２， ウォータータウン， フォージ ロード ５００ 気付

(72)発明者　ホルホタ， アレン ティー．
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２４７２， ウォータータウン， フォージ ロード ５００ 気付

(72)発明者　グッドマン， ブライアン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２４７２， ウォータータウン， フォージ ロード ５００ 気付

(72)発明者　シュー， フアン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２４７２， ウォータータウン， フォージ ロード ５００ 気付

(72)発明者　シバシャンカル， バルン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２４７２， ウォータータウン， フォージ ロード ５００ 気付

Fターム（参考）　4B065　AA90Y AA93X AA93Y AA95Y AB01 AC14 BA02 BA03 BA05 CA24
CA27 CA44
4C076　AA19 AA29 AA65 AA95 CC07 CC27 CC41 DD09 DD41 DD70
EE37 EE59

Fターム（参考）

4C084 AA13 MA24 MA41 MA52 MA55 MA66 NA13 NA14 ZA021 ZA022
ZA331 ZA332 ZA661 ZA662 ZA891 ZA892 ZA941 ZA942 ZB081 ZB082 ZB261
ZB262 ZB271 ZB272 ZC061 ZC062 ZC351 ZC352

4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA02 MA04 MA05 MA24 MA41
MA52 MA55 MA66 NA14 ZA02 ZA33 ZA66 ZA89 ZA94 ZB08 ZC06
ZC35