(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2024-513048
(P2024-513048A)
(43)公表日　令和6年3月21日(2024.3.21)

(51)国際特許分類		FI		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ　9/51　(2006.01)		Ａ６１Ｋ	9/51	４Ｃ０７６
Ｃ１２Ｎ　15/54　(2006.01)		Ｃ１２Ｎ	15/54	ＺＮＡ　４Ｃ０８４
Ａ６１Ｋ　47/28　(2006.01)		Ａ６１Ｋ	47/28	４Ｃ０８６
Ａ６１Ｋ　47/20　(2006.01)		Ａ６１Ｋ	47/20	
Ａ６１Ｋ　47/22　(2006.01)		Ａ６１Ｋ	47/22	

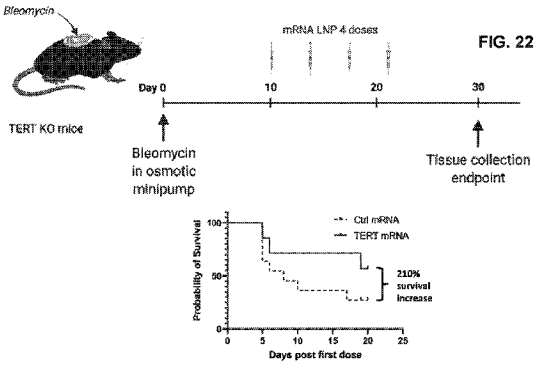
審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全148頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2023-560598(P2023-560598)
(86)(22)出願日　令和4年3月30日(2022.3.30)
(85)翻訳文提出日　令和5年9月29日(2023.9.29)
(86)国際出願番号　PCT/US2022/022642
(87)国際公開番号　WO2022/212576
(87)国際公開日　令和4年10月6日(2022.10.6)
(31)優先権主張番号　63/169,118
(32)優先日　令和3年3月31日(2021.3.31)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,
最終頁に続く

(71)出願人　523246503
リジュベネーション テクノロジーズ インク．
ＲＥＪＵＶＥＮＡＴＩＯＮ ＴＥＣＨＮＯＬＯＧＩＥＳ ＩＮＣ．
アメリカ合衆国 ９４０４３ カリフォルニア州 マウンテン ビュー，クライド アベニュー ４１５，ユニット １０７
(74)代理人　100092783
弁理士　小林 浩
(74)代理人　100120134
弁理士　大森 規雄
(74)代理人　100209037
弁理士　猪狩 俊博
(72)発明者　ラムナス，ジョン
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　ＲＮＡの送達のための組成物及び方法

(57)【要約】
本明細書で提供される脂質ナノ粒子組成物は、肺に優先的に送達及び／またはトランスフェクトされる。肺疾患及び線維症の処置のためにＬＮＰ製剤と共に送達され得る治療用ポリヌクレオチド、例えば、ＴＥＲＴ ｍＲＮＡも、本明細書で提供される。
【選択図】図２２



【特許請求の範囲】
【請求項１】
対象の肺にポリヌクレオチドを送達する方法であって、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）に封入されたポリヌクレオチドを静脈内注射により投与することを含み、
（ｉ）約２０％～約５０％のモル百分率のカチオン性脂質、
（ｉｉ）約２０％～約６０％のモル百分率のＳＳ－ＯＰまたはＳＳ－ＯＰアナログ
を含む、前記方法。
【請求項２】
前記ＬＮＰが、約２０％～６０％のモル百分率のＳＳ－ＯＰを含む、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記カチオン性脂質が、２－ジオレオイル－３－トリメチルアンモニウム－プロパン（ＤＯＴＡＰ）、ジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミド（ＤＤＡＢ）、イミダゾールコレステロールエステル（ＩＣＥ）、２５－ヒドロキシコレステロール（２５ＯＨ　Ｃｈｏｌ）、２０α－ヒドロキシコレステロール５－コレステン－３α、２０α－ジオール（２０α　Ｃｈｏｌ）、Ｎ－［１－（２，３－ジオレイルオキシ）プロピル］－Ｎ，Ｎ，Ｎ－トリメチルアンモニウムクロリド（ＤＯＴＭＡ）、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）、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－ジステアリルオキシ－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）、ジメチルジオクタデシルアンモニウム（ＤＤＡ）、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パ－３－イル）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－Ｎ－ヒドロキシエチルアンモニウムブロミド（ＤＭＲＩＥ）、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１－１－（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－ジメチルアミノプロパン（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）、または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）、及びそれらの混合物のうちのいずれか１つ以上である、請求項１または２に記載の方法。
【請求項４】
前記カチオン性脂質が、ＤＯＴＡＰである、請求項３に記載の方法。
【請求項５】
前記ＬＮＰが、約２５％～約３５％のモル百分率の前記カチオン性脂質を含む、請求項１～４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項６】
前記ＬＮＰが、約３０％のモル百分率の前記カチオン性脂質を含む、請求項１～４のいずれか１項に記載の方法。

【請求項７】
前記ＬＮＰが、構造脂質を含む、請求項１～６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項８】
前記構造脂質が、１，２－ジ－（９Ｚ－オクタデセノイル）－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＯＰＥ）、グリセロール－モノオレアート（ＧＭＯ）、ジステアロイルホスファチジルコリン（ＤＳＰＣ）、ジオレオイルホスファチジルコリン（ＤＯＰＣ）、ジパルミトイルホスファチジルコリン（ＤＰＰＣ）、ジオレオイルホスファチジルグリセロール（ＤＯＰＧ）、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール（ＤＰＰＧ）、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＯＰＥ）、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン（ＰＯＰＣ）、パルミトイルオレオイル－ホスファチジルエタノールアミン（ＰＯＰＥ）、ジオレオイル－ホスファチジルエタノールアミン４－（Ｎ－マレイミドメチル）－シクロヘキサン－１－カルボキシラート（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－ステアロイル－２－オレオイル－ホスファチジルエタノールアミン（ＳＯＰＥ）、コレステロール、または別のステロール、及びそれらの混合物のうちのいずれか１つ以上である、請求項７に記載の方法。
【請求項９】
前記構造脂質が、ＤＯＰＣである、請求項７に記載の方法。
【請求項１０】
前記ＬＮＰが、約１％～約５％のＤＯＰＣを含む、請求項９に記載の方法。
【請求項１１】
前記ＬＮＰが、構造脂質を実質的に含まない、及び／または最大１％の構造脂質を含む、請求項１～６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１２】
前記ＬＮＰが、約２０％～約４０％のコレステロールを含む、請求項１～１１のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１３】
前記ＬＮＰが、コレステロールを実質的に含まない、請求項１～１１のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１４】
前記ＬＮＰが、絶縁体脂質を含む、請求項１～１３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１５】
前記ＬＮＰが、絶縁体脂質を実質的に含まない、請求項１～１３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１６】
前記ＬＮＰが、肝臓と比較して、前記肺に優先的に送達及び／またはトランスフェクトされる、請求項１～１５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１７】
前記ポリヌクレオチドが、合成リボ核酸（ＲＮＡ）である、請求項１～１６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１８】
前記合成リボ核酸（ＲＮＡ）が、テロメラーゼ逆転写酵素（ＴＥＲＴ）をコードし、任意に、前記ＴＥＲＴ　ｍＲＮＡが、配列番号３８～４０のいずれか１つと、少なくとも５０％、少なくとも５５％、少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％同一の核酸配列を含む、請求項１７に記載の方法。

【請求項１９】
処置を必要とする対象における肺疾患及び／または肺線維症を処置する方法であって、テロメラーゼ逆転写酵素（ＴＥＲＴ）をコードする合成リボ核酸（ＲＮＡ）を含む送達ビヒクルを含む有効量の組成物を投与することを含み、前記送達ビヒクルが、ＳＳ－ＯＰまたはＳＳ－ＯＰアナログを含む脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）であり、任意に、前記ＴＥＲＴ ｍＲＮＡが、配列番号３８～４０のいずれか１つと、少なくとも５０％、少なくとも５５％、少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％同一の核酸配列を含む、前記方法。
【請求項２０】
前記送達ビヒクルが、約２０％～６０％のモル百分率のＳＳ－ＯＰを含む脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）である、請求項１９に記載の方法。
【請求項２１】
前記ＬＮＰが、約２０％～約５０％のモル百分率のカチオン性脂質、約２０％～６０％のモル百分率のＳＳ－ＯＰ、及び、任意に、構造脂質、絶縁体脂質、及びコレステロールのうちの１つ以上を含む、請求項２０に記載の方法。
【請求項２２】
前記ＴＥＲＴ合成ｍＲＮＡが、表２のリストの少なくとも１つの修飾ヌクレオシドを含む、請求項１９～２１のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２３】
前記修飾ヌクレオシドが、プソイドウリジンまたはプソイドウリジンアナログである、請求項２２に記載の方法。
【請求項２４】
前記プソイドウリジンアナログが、Ｎ－１－メチルプソイドウリジンである、請求項２２に記載の方法。
【請求項２５】
前記ＴＥＲＴ合成ｍＲＮＡが、非翻訳領域（ＵＴＲ）を含む、請求項１９～２４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２６】
前記ＴＥＲＴ合成ｍＲＮＡが、５’キャップ構造を含み、前記５’キャップ構造が、ｍ７（３’ＯＭｅＧ）（５’）ｐｐｐ（５’）（２’ＯＭｅＡ）ｐＧ、ＩＲＥＳ、Ｃａｐ０、Ｃａｐ１、ＡＲＣＡ、イノシン、Ｎ１－メチル－グアノシン、２’フルオロ－グアノシン、７－デアザ－グアノシン、ＣｌｅａｎＣａｐＴＭ、８－オキソ－グアノシン、２－アミノ－グアノシン、ＬＮＡ－グアノシン、２－アジド－グアノシン、Ｃａｐ２、Ｃａｐ４、ＣＡＰ－００３、またはＣＡＰ－２２５である、請求項１９～２５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２７】
前記ＴＥＲＴ合成ｍＲＮＡが、コード領域の３’側にポリ－アデノシン（ポリＡ）ヌクレオチド配列を含む、請求項１９～２６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２８】
前記ＴＥＲＴ合成ｍＲＮＡが、鎖終結ヌクレオチドを含み、前記ヌクレオチドが、３’－デオキシアデノシン（コルジセピン）、３’－デオキシウリジン、３’－デオキシシトシン、３’－デオキシグアノシン、３’－デオキシチミン、２’，３’－ジデオキシヌクレオシド、２’，３’－ジデオキシアデノシン、２’，３’－ジデオキシウリジン、２’，３’－ジデオキシシトシン、２’，３’－ジデオキシグアノシン、２’、３’－ジデオキシチミン、２’－デオキシヌクレオシド、または－Ｏ－メチルヌクレオシドである、請求項１９～２７のいずれか１項の方法。
【請求項２９】

前記ＴＥＲＴ合成ｍＲＮＡが、コドン最適化されている、請求項１９～２８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３０】
前記肺疾患が、肺線維症と関連する、請求項１９～２８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３１】
前記肺疾患が、肺線維症、家族性肺線維症、特発性肺線維症、先天性角化異常症を伴う肺線維症、間質性肺疾患、肺炎、間質性肺炎、肺気腫、慢性閉塞性肺疾患、嚢胞性線維症、感染症、コロナウイルス病、または肺癌である、請求項３０に記載の方法。
【請求項３２】
前記肺線維症が、ＴＥＲＴ変異と関連する、請求項１９～３１のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３３】
前記対象が、ヒトである、請求項１９～３２のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３４】
前記組成物が、静脈内注射を介して前記対象に投与される、請求項１９～３３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３５】
前記組成物が、吸入により前記対象に投与される、請求項１９～３３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３６】
（ｉ）約２０％～約５０％のモル百分率のカチオン性脂質、
（ｉｉ）約２０％～約６０％のモル百分率のＳＳ－ＯＰまたはＳＳ－ＯＰアナログ
を含む、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）に封入されたポリヌクレオチドを含む組成物。
【請求項３７】
前記ＬＮＰが、約２０％～６０％のモル百分率のＳＳ－ＯＰを含む、請求項３６に記載の組成物。
【請求項３８】
前記カチオン性脂質が、２－ジオレオイル－３－トリメチルアンモニウム－プロパン（ＤＯＴＡＰ）、ジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミド（ＤＤＡＢ）、イミダゾールコレステロールエステル（ＩＣＥ）、２５－ヒドロキシコレステロール（２５ＯＨ　Ｃｈｏｌ）、２０α－ヒドロキシコレステロール５－コレステン－３α、２０α－ジオール（２０α　Ｃｈｏｌ）、Ｎ－［１－（２，３－ジオレイルオキシ）プロピル］－Ｎ，Ｎ，Ｎ－トリメチルアンモニウムクロリド（ＤＯＴＭＡ）、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）、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－ジステアリルオキシ－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）、ジメチルジオクタデシルアンモニウム（ＤＤＡ）、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パ－３－イル）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－Ｎ－ヒドロキシエチルアンモニウムブロミド（ＤＭＲＩＥ）、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－オクータデカジエノキシ）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１－１－（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－ジメチルアミノプロパン（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）、または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）、及びそれらの混合物のうちのいずれか１つ以上である、請求項３６に記載の組成物。

【請求項３９】

前記カチオン性脂質が、ＤＯＴＡＰである、請求項３８に記載の組成物。

【請求項４０】

前記ＬＮＰが、約２５％～約３５％のモル百分率の前記カチオン性脂質を含む、請求項３６～３９のいずれか１項に記載の組成物。

【請求項４１】

前記ＬＮＰが、約３０％のモル百分率の前記カチオン性脂質を含む、請求項３６～３９のいずれか１項に記載の組成物。

【請求項４２】

前記ＬＮＰが、構造脂質を含む、請求項３６～４１のいずれか１項に記載の組成物。

【請求項４３】

前記構造脂質が、１，２－ジ－（９Ｚ－オクタデセノイル）－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＯＰＥ）、グリセロール－モノオレアート（ＧＭＯ）、ジステアロイルホスファチジルコリン（ＤＳＰＣ）、ジオレオイルホスファチジルコリン（ＤＯＰＣ）、ジパルミトイルホスファチジルコリン（ＤＰＰＣ）、ジオレオイルホスファチジルグリセロール（ＤＯＰＧ）、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール（ＤＰＰＧ）、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＯＰＥ）、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン（ＰＯＰＣ）、パルミトイルオレオイル－ホスファチジルエタノールアミン（ＰＯＰＥ）、ジオレオイル－ホスファチジルエタノールアミン４－（Ｎ－マレイミドメチル）－シクロヘキサン－１－カルボキシラート（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－ステアロイル－２－オレオイル－ホスファチジルエタノールアミン（ＳＯＰＥ）、コレステロール、または別のステロール、及びそれらの混合物のうちのいずれか１つ以上である、請求項４２に記載の組成物。

【請求項４４】

前記構造脂質が、ＤＯＰＣである、請求項４３に記載の組成物。

【請求項４５】

前記ＬＮＰが、約１％～約５％のＤＯＰＣを含む、請求項４４に記載の組成物。

【請求項４６】

前記ＬＮＰが、構造脂質を実質的に含まない、及び／または最大１％の構造脂質を含む、請求項３６～４５のいずれか１項に記載の組成物。

【請求項４７】

前記ＬＮＰが、約２０％～約４０％のコレステロールを含む、請求項３６～４６のいずれか１項に記載の組成物。

【請求項４８】

前記ＬＮＰが、コレステロールを実質的に含まない、請求項３６～４６のいずれか１項に記載の組成物。

【請求項４９】

前記ＬＮＰが、絶縁体脂質を含む、請求項３６～４８のいずれか１項に記載の組成物。

【請求項５０】

前記ＬＮＰが、絶縁体脂質を実質的に含まない、請求項３６～４８のいずれか１項に記載の組成物。
【請求項５１】
前記ＬＮＰが、肝臓と比較して、前記肺に優先的に送達及び／またはトランスフェクトされる、請求項３６～５０のいずれか１項に記載の組成物。
【請求項５２】
前記ポリヌクレオチドが、合成リボ核酸（ＲＮＡ）である、請求項３６～５１のいずれか１項に記載の組成物。
【請求項５３】
前記合成リボ核酸（ＲＮＡ）が、テロメラーゼ逆転写酵素（ＴＥＲＴ）をコードし、任意に、前記ＴＥＲＴ　ＲＮＡが、配列番号３８～４０のいずれか１つと、少なくとも５０％、少なくとも５５％、少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％同一の核酸配列を含む、請求項５２に記載の組成物。
【請求項５４】
前記ＴＥＲＴ　ＲＮＡが、表２のリストの少なくとも１つの修飾ヌクレオシドを含む、請求項５３に記載の組成物。
【請求項５５】
前記修飾ヌクレオシドが、プソイドウリジンまたはプソイドウリジンアナログである、請求項５４に記載の組成物。
【請求項５６】
前記プソイドウリジンアナログが、Ｎ－１－メチルプソイドウリジンである、請求項５４に記載の組成物。
【請求項５７】
前記ＴＥＲＴ　ＲＮＡが、非翻訳領域（ＵＴＲ）を含む、請求項５３～５６に記載の組成物。
【請求項５８】
前記ＴＥＲＴ　ＲＮＡが、５’キャップ構造を含み、前記５’キャップ構造が、ｍ７（３’ＯＭｅＧ）（５’）ｐｐｐ（５’）（２’ＯＭｅＡ）ｐＧ、ＩＲＥＳ、Ｃａｐ０、Ｃａｐ１、ＡＲＣＡ、イノシン、Ｎ１－メチル－グアノシン、２’フルオロ－グアノシン、７－デアザ－グアノシン、ＣｌｅａｎＣａｐＴＭ、８－オキソ－グアノシン、２－アミノ－グアノシン、ＬＮＡ－グアノシン、２－アジド－グアノシン、Ｃａｐ２、Ｃａｐ４、ＣＡＰ－００３、またはＣＡＰ－２２５である、請求項５３～５７のいずれか１項に記載の組成物。
【請求項５９】
前記ＴＥＲＴ　ＲＮＡが、前記コード領域の３’側にポリ－アデノシン（ポリＡ）ヌクレオチド配列を含む、請求項５３～５８のいずれか１項に記載の組成物。
【請求項６０】
前記ＴＥＲＴ　ＲＮＡが、鎖終結ヌクレオチドを含み、前記ヌクレオチドが、３’－デオキシアデノシン（コルジセピン）、３’－デオキシウリジン、３’－デオキシシトシン、３’－デオキシグアノシン、３’－デオキシチミン、２’，３’－ジデオキシヌクレオシド、２’，３’－ジデオキシアデノシン、２’，３’－ジデオキシウリジン、２’，３’－ジデオキシシトシン、２’，３’－ジデオキシグアノシン、２’、３’－ジデオキシチミン、２’－デオキシヌクレオシド、または－Ｏ－メチルヌクレオシドである、請求項５３～５９のいずれか１項に記載の組成物。
【請求項６１】
前記ＴＥＲＴ　ＲＮＡが、コドン最適化されている、請求項５３～６０のいずれか１項に記載の組成物。

【請求項６２】
処置を必要とする対象の肺疾患の前記処置のための、請求項３６～６１のいずれか１項に記載の組成物の使用。
【請求項６３】
前記肺疾患が、肺線維症、家族性肺線維症、特発性肺線維症、先天性角化異常症を伴う肺線維症、間質性肺疾患、肺炎、間質性肺炎、肺気腫、慢性閉塞性肺疾患、嚢胞性線維症、感染症、コロナウイルス病、または肺癌である、請求項６２に記載の組成物の使用。
【請求項６４】
前記肺疾患が、前記対象のＴＥＲＴ変異と関連する、請求項６２または６３に記載の組成物の使用。
【請求項６５】
前記組成物が、静脈内注射または静脈内注入により前記対象に投与される、請求項６２～６４のいずれか１項に記載の組成物の使用。
【請求項６６】
（ｉ）テロメラーゼ逆転写酵素（ＴＥＲＴ）をコードするリボ核酸（ＲＮＡ）を含む送達ビヒクルであって、任意に、前記ＴＥＲＴ　ｍＲＮＡが、配列番号３８～４０のいずれか１つと、少なくとも５０％、少なくとも５５％、少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％同一の核酸配列を含む前記送達ビヒクル及び、
（ｉｉ）薬学的に許容される溶媒または賦形剤
を含み、
前記送達ビヒクルが、ＳＳ－ＯＰまたはＳＳ－ＯＰアナログを含むＬＮＰであり、肺細胞に優先的に送達及び／またはトランスフェクトすることが可能である、医薬組成物。
【請求項６７】
前記ＬＮＰが、約２０％～約６０％のモル百分率のＳＳ－ＯＰを含む、請求項６６に記載の医薬組成物。
【請求項６８】
前記ＬＮＰが、約２０％～約５０％のモル百分率のカチオン性脂質を含む、請求項６７に記載の医薬組成物。
【請求項６９】
前記ＬＮＰが、約２０％～６０％のモル百分率のＳＳ－ＯＰアナログを含む、請求項６６に記載の医薬組成物。
【請求項７０】
前記カチオン性脂質が、２－ジオレオイル－３－トリメチルアンモニウム－プロパン（ＤＯＴＡＰ）、ジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミド（ＤＤＡＢ）、イミダゾールコレステロールエステル（ＩＣＥ）、２５－ヒドロキシコレステロール（２５ＯＨ　Ｃｈｏｌ）、２０α－ヒドロキシコレステロール５－コレステン－３α、２０α－ジオール（２０α　Ｃｈｏｌ）、Ｎ－［１－（２，３－ジオレイルオキシ）プロピル］－Ｎ，Ｎ，Ｎ－トリメチルアンモニウムクロリド（ＤＯＴＭＡ）、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）、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－ジステアリルオキシ－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）、ジメチルジオクタデシルアンモニウム（ＤＤＡ）、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パ－３－イル）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－Ｎ－ヒドロキシエチルアンモニウムブロミド（ＤＭＲＩＥ）、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１－１－（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－ジメチルアミノプロパン（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）、または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）、及びそれらの混合物のうちのいずれか１つ以上である、請求項６８または６９に記載の医薬組成物。

【請求項７１】

前記カチオン性脂質が、ＤＯＴＡＰである、請求項７０に記載の医薬組成物。

【請求項７２】

前記ＬＮＰが、約２５％～約３５％のモル百分率の前記カチオン性脂質を含む、請求項６８～７１のいずれか１項に記載の医薬組成物。

【請求項７３】

前記ＬＮＰが、約３０％のモル百分率の前記カチオン性脂質を含む、請求項６８～７１のいずれか１項に記載の医薬組成物。

【請求項７４】

前記ＬＮＰが、構造脂質を含む、請求項６８～７３のいずれか１項に記載の医薬組成物。

【請求項７５】

前記構造脂質が、１，２－ジ－（９Ｚ－オクタデセノイル）－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＯＰＥ）、グリセロール－モノオレアート（ＧＭＯ）、ジステアロイルホスファチジルコリン（ＤＳＰＣ）、ジオレオイルホスファチジルコリン（ＤＯＰＣ）、ジパルミトイルホスファチジルコリン（ＤＰＰＣ）、ジオレオイルホスファチジルグリセロール（ＤＯＰＧ）、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール（ＤＰＰＧ）、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＯＰＥ）、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン（ＰＯＰＣ）、パルミトイルオレオイル－ホスファチジルエタノールアミン（ＰＯＰＥ）、ジオレオイル－ホスファチジルエタノールアミン４－（Ｎ－マレイミドメチル）－シクロヘキサン－１－カルボキシラート（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－ステアロイル－２－オレオイル－ホスファチジルエタノールアミン（ＳＯＰＥ）、コレステロール、または別のステロール、及びそれらの混合物のうちのいずれか１つ以上である、請求項７４に記載の医薬組成物。

【請求項７６】

前記構造脂質が、ＤＯＰＣである、請求項７５に記載の医薬組成物。

【請求項７７】

前記ＬＮＰが、約１％～約５％のＤＯＰＣを含む、請求項７６に記載の医薬組成物。

【請求項７８】

前記ＬＮＰが、構造脂質を実質的に含まない、及び／または最大１％の構造脂質を含む、請求項６８～７７のいずれか１項に記載の医薬組成物。

【請求項７９】
前記ＬＮＰが、約２０％～約４０％のコレステロールを含む、請求項６８～７８のいずれか１項に記載の医薬組成物。
【請求項８０】
前記ＬＮＰが、コレステロールを実質的に含まない、請求項６８～７８のいずれか１項に記載の医薬組成物。
【請求項８１】
前記ＬＮＰが、絶縁体脂質を含む、請求項６８～８０のいずれか１項に記載の医薬組成物。
【請求項８２】
前記ＬＮＰが、絶縁体脂質を実質的に含まない、請求項６８～８０のいずれか１項に記載の医薬組成物。
【請求項８３】
前記ＬＮＰが、肝臓と比較して、前記肺に優先的に送達及び／またはトランスフェクトされる、請求項６８～８２のいずれか１項に記載の医薬組成物。
【請求項８４】
前記ＴＥＲＴ　ＲＮＡが、表２のリストの少なくとも１つの修飾ヌクレオシドを含む、請求項６６～８３のいずれか１項に記載の医薬組成物。
【請求項８５】
前記修飾ヌクレオシドが、プソイドウリジンまたはプソイドウリジンアナログである、請求項８４に記載の医薬組成物。
【請求項８６】
前記プソイドウリジンアナログが、Ｎ－１－メチルプソイドウリジンである、請求項８５に記載の医薬組成物。
【請求項８７】
前記ＴＥＲＴ　ＲＮＡが、非翻訳領域（ＵＴＲ）、任意に、天然に存在しないＵＴＲを含む、請求項６６～８６に記載の医薬組成物。
【請求項８８】
前記ＴＥＲＴ　ＲＮＡが、５’キャップ構造を含み、前記５’キャップ構造が、ｍ７（３’ＯＭｅＧ）（５’）ｐｐｐ（５’）（２’ＯＭｅＡ）ｐＧ、ＩＲＥＳ、Ｃａｐ０、Ｃａｐ１、ＡＲＣＡ、イノシン、Ｎ１－メチル－グアノシン、２’フルオロ－グアノシン、７－デアザ－グアノシン、ＣｌｅａｎＣａｐＴＭ、８－オキソ－グアノシン、２－アミノ－グアノシン、ＬＮＡ－グアノシン、２－アジド－グアノシン、Ｃａｐ２、Ｃａｐ４、ＣＡＰ－００３、またはＣＡＰ－２２５である、請求項６６～８７のいずれか１項に記載の医薬組成物。
【請求項８９】
前記ＴＥＲＴ　ＲＮＡが、前記コード領域の３’側にポリ－アデノシン（ポリＡ）ヌクレオチド配列を含む、請求項６６～８８のいずれか１項に記載の医薬組成物。
【請求項９０】
前記ＴＥＲＴ　ＲＮＡが、鎖終結ヌクレオチドを含み、前記ヌクレオチドが、３’－デオキシアデノシン（コルジセピン）、３’－デオキシウリジン、３’－デオキシシトシン、３’－デオキシグアノシン、３’－デオキシチミン、２’，３’－ジデオキシヌクレオシド、２’，３’－ジデオキシアデノシン、２’，３’－ジデオキシウリジン、２’，３’－ジデオキシシトシン、２’，３’－ジデオキシグアノシン、２’、３’－ジデオキシチミン、２’－デオキシヌクレオシド、または－Ｏ－メチルヌクレオシドである、請求項６６～８９のいずれか１項に記載の医薬組成物。
【請求項９１】
前記ＴＥＲＴ　ＲＮＡが、コドン最適化されている、請求項６６～９０のいずれか１項に記載の医薬組成物。
【請求項９２】

処置を必要とする対象の肺疾患及び／または肺線維症の前記処置のための、請求項６６～９１のいずれか１項に記載の医薬組成物の使用。
【請求項９３】
前記肺疾患が、肺線維症、家族性肺線維症、特発性肺線維症、先天性角化異常症を伴う肺線維症、間質性肺疾患、肺炎、間質性肺炎、肺気腫、慢性閉塞性肺疾患、嚢胞性線維症、感染症、コロナウイルス病、または肺癌である、請求項９２に記載の医薬組成物の使用。
【請求項９４】
前記肺線維症が、前記対象のＴＥＲＴ変異と関連する、請求項９２または９３に記載の医薬組成物の使用。
【請求項９５】
前記組成物が、静脈内注射を介して前記対象に投与される、請求項９２～９４のいずれかに記載の医薬組成物の使用。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願との相互参照
本出願は、２０２１年３月３１日に出願された米国仮特許出願第６３／１６９，１１８号の優先権及び利益を主張し、この開示は、全体が参照により本明細書に組み込まれる。
【０００２】
配列表の組み込み
２０２２年３月２９日に作成され、サイズが２０５ＫＢである「ＲＥＪＵ＿００５＿０１ＷＯ＿ＳｅｑＬｉｓｔ＿ＳＴ２５．ｔｘｔ」という名称のテキストファイルの内容は、全体が参照により本明細書に組み込まれる。
【０００３】
開示の分野
本開示は、一般に、肺疾患及び線維性疾患の処置におけるリボ核酸（ＲＮＡ）治療薬を送達するための組成物及び方法に関する。
【背景技術】
【０００４】
今日処置がない多数の肺疾患が確認されている。肺疾患、例えば、肺線維症、間質性肺疾患、及び肺癌は、多くの場合、疾患進行の一部として線維症を誘発し、これは、さらに、患者の回復が生じ得る程度を制限する。肺疾患の処置のための肺へのポリヌクレオチドの送達は、開発中の処置法の１つであるが、これらの処置を施すための組成物及び方法には改善の必要があり、結果として生じる線維症を処置するための処置は、全く、開発されていない。
【０００５】
従って、肺疾患及び／または肺線維症を処置するポリヌクレオチド、例えば、ｍＲＮＡ、を肺に送達することが可能な送達製剤に対する当該技術分野におけるニーズが依然としてある。以下の開示は、このニーズに対処するものである。
【発明の概要】
【０００６】
高いトランスフェクション率で肺細胞にｍＲＮＡを送達するための送達ビヒクル及びその組成物が本明細書で提供される。いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡは、低毒性で肺細胞に送達される。いくつかの実施形態では、肺細胞には、肺胞上皮及び血管内皮が含まれ、本明細書に開示の送達ビヒクルは、肺の疾患及び障害の処置または予防に有用なｍＲＮＡの送達に有用である。いくつかの実施形態では、肺細胞に送達されるｍＲＮＡは、肺の疾患または障害の処置に有用なタンパク質をコードする。いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡは、ＴＥＲＴタンパク質をコードする。いくつかの実施形態では、タンパク質は、病原体の抗原である。いくつかの実施形態では、肺の疾患及び障害には、肺線維症、特発性

肺線維症、肺気腫、間質性肺疾患、慢性閉塞性肺疾患（ＣＯＰＤ）、肺感染症、肺炎、結核、胃逆流、肺癌、嚢胞性線維症、先天性角化異常症、アルファ－１アンチトリプシン欠乏症、及び他の後天性または遺伝性肺疾患が含まれるが、これらに限定されない。本開示は、例えば、肺の、線維性疾患及び状態、ならびに肺の疾患及び状態を処置するためのテロメラーゼ逆転写酵素（ＴＥＲＴ）メッセンジャーリボ核酸（ｍＲＮＡ）療法に関する。ＴＥＲＴ　ｍＲＮＡを含む組成物による処置は、線維症ならびに線維性疾患及び／または肺疾患の他の病理学的特徴を予防、後退、または処置し、臓器全体の機能及び対象の健康状態の改善につながり得る。従って、いくつかの実施形態では、テロメラーゼ逆転写酵素（ＴＥＲＴ）をコードする１つ以上の合成メッセンジャーリボ核酸（ｍＲＮＡ）を含む組成物が本明細書で提供される。

【０００７】

いくつかの実施形態では、組成物は、（ｉ）テロメラーゼ逆転写酵素（ＴＥＲＴ）をコードするリボ核酸（ＲＮＡ）、及び、（ｉｉ）送達ビヒクルを含み、ＴＥＲＴをコードするＲＮＡは、１つ以上の修飾ヌクレオチドを含み、（ｉｉ）の送達ビヒクルが、ＴＥＲＴをコードするＲＮＡに作動可能に連結される。

【０００８】

本開示の組成物のいくつかの実施形態では、送達ビヒクルは、ナノ粒子、リポソーム、カチオン性脂質、エクソソーム、細胞外小胞、脂質ナノ粒子、天然リポタンパク質粒子、及び人工リポタンパク質粒子のうちの１つ以上を含む。

【０００９】

肺細胞集団の少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、または少なくとも９５％をトランスフェクトすることが可能な脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）が本明細書で提供される。

【００１０】

本開示の組成物のいくつかの実施形態では、送達ビヒクルは、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）を含む。いくつかの実施形態では、送達ビヒクルは、カチオン性脂質を含む。

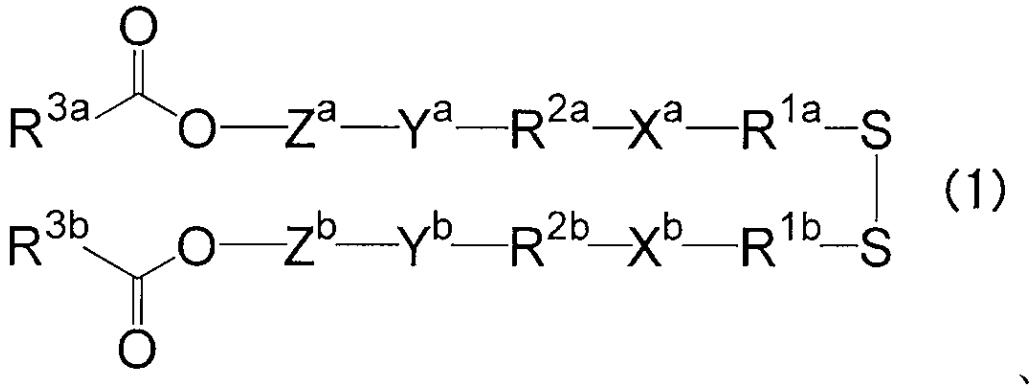
【００１１】

いくつかの実施形態では、送達ビヒクルは、標的化部分を含む。いくつかの実施形態では、標的化脂質により、送達ビヒクルが肺細胞と特異的または選択的に相互作用することになる。いくつかの実施形態では、標的化部分は、コレステロールを含む。いくつかの実施形態では、標的化部分は、肺細胞と特異的または選択的に相互作用する脂質である。いくつかの実施形態では、標的化脂質は、１，２－ジオレオイル－３－トリメチルアンモニウム－プロパン（ＤＯＴＡＰ）、Ｎ，Ｎ－ジステアリル－Ｎ，Ｎ－ジメチルアンモニウムブロミド（ＤＡＢＢ）、または１，２－ジミリストイル－ｓｎ－グリセロ－３－エチルホスホコリン（ＥＰＣ）を含む。

【００１２】

送達ビヒクルが脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）であるものを含む、本開示の組成物のいくつかの実施形態では、送達ビヒクルは、式Ｉの化合物を含む：

【化１】



(1)

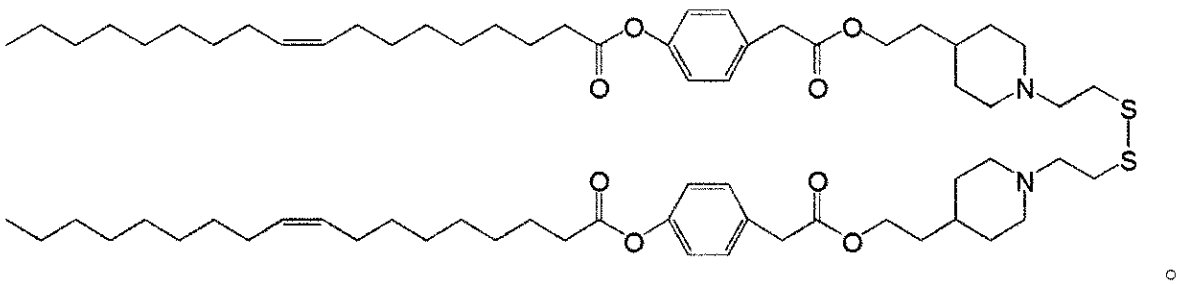
、

（式中、R^{1a}及びR^{1b}は、それぞれ独立して、１～６つの炭素原子を有するアルキレン基を表し、X^a及びX^bは、それぞれ独立して、１～６つの炭素原子を有する非環状アルキル３級アミノ基及び１つの３級アミノ基、または２～５つの炭素原子、ならびに１～２つの３級アミノ基を有する環状アルキレン３級アミノ基であり、R^{2a}及びR^{2b}は、それぞれ独立して、８以下の炭素原子を有するアルキレン基またはオキシジアルキレン基を表し、Y^a及びY^bは、それぞれ独立して、エステル結合、アミド結合、カルバマート結合、エーテル結合、またはウレア結合を表し、Z^a及びZ^bは、それぞれ独立して、３～１６の炭素原子を有し、少なくとも１つの芳香環を有し、任意に、ヘテロ原子を有する芳香族化合物から誘導される二価の基であり、R^{3a}及びR^{3b}は、それぞれ独立して、水酸基を有する脂溶性ビタミンと無水コハク酸もしくは無水グルタル酸との反応生成物、または、水酸基を有するステロール誘導体と無水コハク酸との反応生成物から誘導される残基、または、無水グルタル酸との反応生成物から誘導される残基、または１２～２２の炭素原子を有する脂肪族炭化水素基を指す）。

【００１３】

送達ビヒクルが脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）であるものを含む、本開示の組成物のいくつかの実施形態では、式Ｉの化合物は、以下である：

【化２】

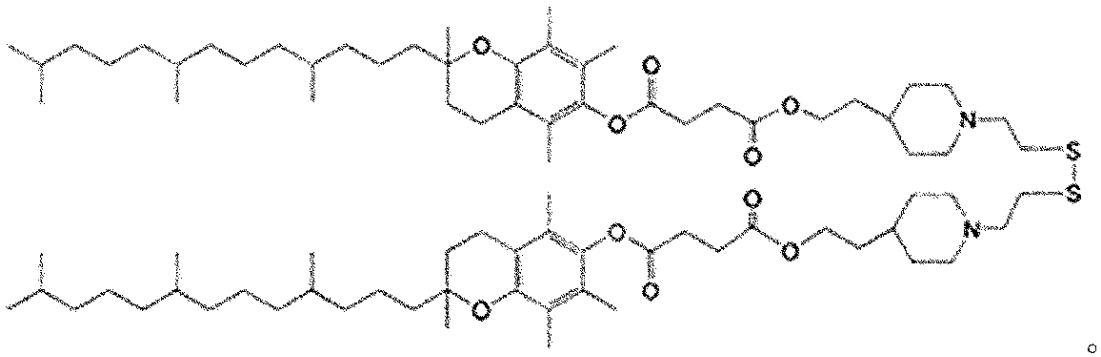


。

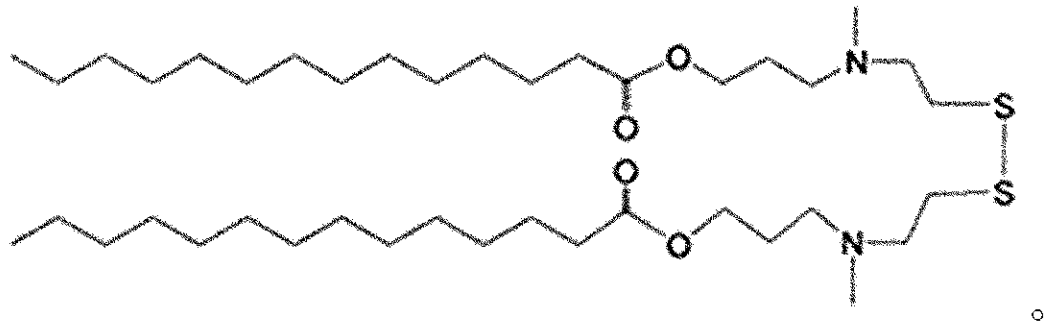
【００１４】

送達ビヒクルが脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）であるものを含む、本開示の組成物のいくつかの実施形態では、式Ｉの化合物は、以下である：

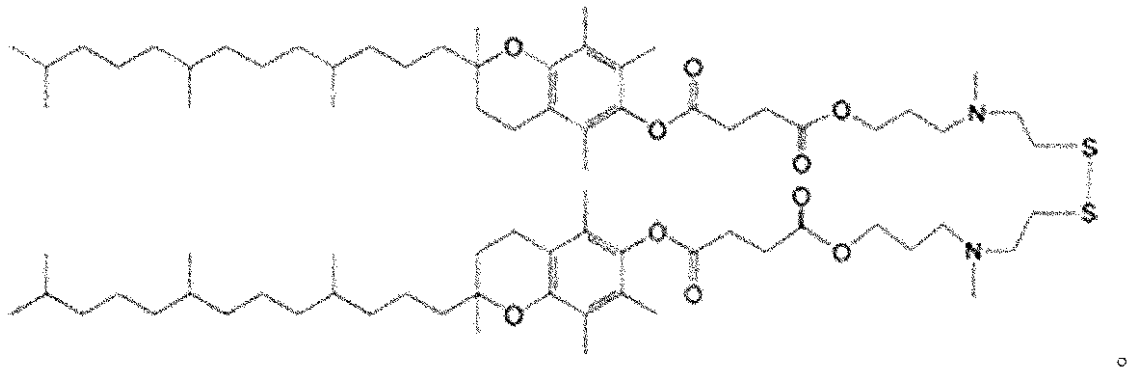
【化３】



【００１５】
送達ビヒクルが脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）であるものを含む、本開示の組成物のいくつかの実施形態では、式Ｉの化合物は、以下である：
【化４】

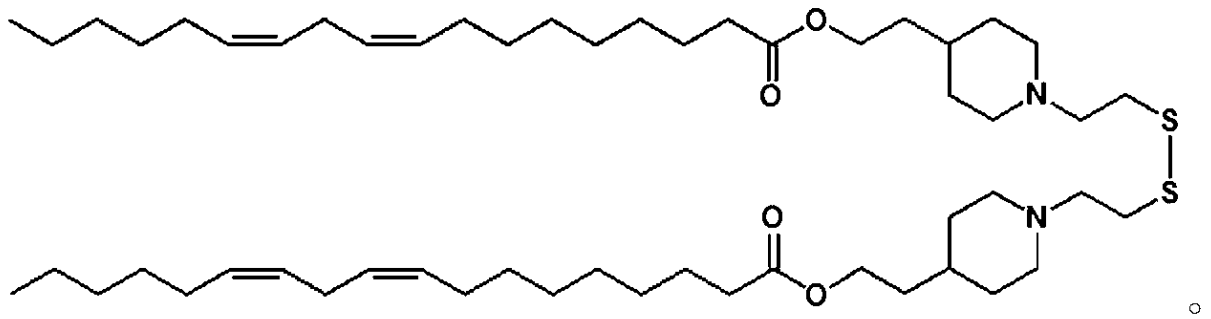


【００１６】
送達ビヒクルが脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）であるものを含む、本開示の組成物のいくつかの実施形態では、式Ｉの化合物は、以下である：
【化５】



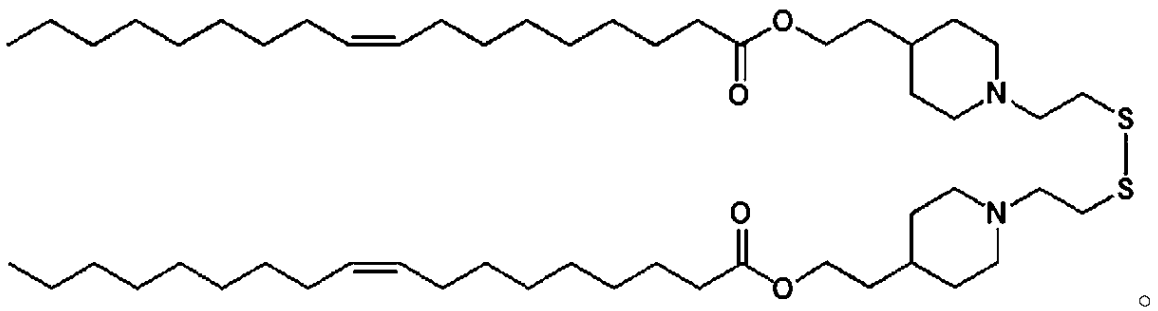
【００１７】
送達ビヒクルが脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）であるものを含む、本開示の組成物のいくつかの実施形態では、式Ｉの化合物は、以下である：

【化６】



【００１８】
送達ビヒクルが脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）であるものを含む、本開示の組成物のいくつかの実施形態では、式Ｉの化合物は、以下である：

【化７】



【００１９】
いくつかの実施形態では、ＲＮＡは、配列番号１～５、３０～３１、もしくは３７～４０の配列、または、それと少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、もしくは少なくとも９９％同一の核酸配列を含む。

【００２０】
送達ビヒクルが脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）であるものを含む、本開示の組成物のいくつかの実施形態では、ＲＮＡは、５’キャップを含む。いくつかの実施形態では、５’キャップは、アンチリバースキャップアナログ（ＡＲＣＡ）を含む。いくつかの実施形態では、ＡＲＣＡは、３’－Ｏ－Ｍｅ－ｍ７Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）Ｇ構造を含む。いくつかの実施形態では、５’キャップは、ｍ７Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）（２’ＯＭｅＡ）ｐＧを含む。いくつかの実施形態では、５’キャップは、ｍ７（３’ＯＭｅＧ）（５’）ｐｐｐ（５’）（２’ＯＭｅＡ）ｐＧを含む。

【００２１】
送達ビヒクルが脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）であるものを含む、本開示の組成物のいくつかの実施形態では、ＲＮＡは、さらに、少なくとも１つの非翻訳領域（ＵＴＲ）を含む。ＵＴＲは、配列番号３２～３６の配列、または、それと少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、それと少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、もしくは少なくとも９９％同一の核酸配列を含んでもよい。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのＵＴＲは、ＴＥＲＴをコードするＲＮＡの５’側に位置する。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのＵＴＲは、ＴＥＲＴをコードするＲＮＡの３’側に位置する。いくつかの実施形態では、ＵＴＲは、ヒト配列を含む。いくつかの実施形態では、ＵＴＲは、非ヒト配列または合成配列を含む。いくつかの実施形態では、ＵＴＲは、キメラ配列を含む。いくつかの

実施形態では、ＵＴＲは、ＴＥＲＴをコードするＲＮＡの安定性を増加させるか、半減期を増加させるか、転写速度を増加させるか、または転写開始までの時間を減少させる。いくつかの実施形態では、ＵＴＲは、α－グロビン、β－グロビン、ｃ－ｆｏｓ、及びタバコエッチウイルスのうちの１つ以上から単離するか、または、それに由来するＵＴＲ配列と少なくとも７０％の同一性を有する配列を含む。

【００２２】

送達ビヒクルが脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）である組成物を含む、本開示の組成物のいくつかの実施形態では、ＴＥＲＴをコードするＲＮＡの１つ以上の修飾ヌクレオチドは、修飾アデニンまたはそのアナログ、修飾シチジンまたはそのアナログ、修飾グアノシンまたはそのアナログ、及び修飾ウリジンまたはそのアナログのうちの１つ以上を含む。いくつかの実施形態では、ＴＥＲＴをコードするＲＮＡの１つ以上の修飾ヌクレオチドは、Ｎ１－メチルプソイドウリジンとしても知られる１－メチルプソイドウリジン、プソイドウリジン（Ｎ１ｍ）、２－チオウリジン、及び５－メチルシチジンのうちの１つ以上を含む。いくつかの実施形態では、ＴＥＲＴをコードするＲＮＡの１つ以上の修飾ヌクレオチドは、５－メトキシウリジン（５－ｍｏＵ）を含む。いくつかの実施形態では、ＴＥＲＴをコードするＲＮＡの１つ以上の修飾ヌクレオチドは、以下のうちの１つ以上を含む：ｍ１Ａ　１－メチルアデノシン、ｍ６Ａ　Ｎ６－メチルアデノシン、Ａｍ　２’－Ｏ－メチルアデノシン、ｉ６Ａ　Ｎ６－イソペンテニルアデノシン、ｉｏ６Ａ　Ｎ６－（ｃｉｓ－ヒドロキシイソペンテニル）アデノシン、ｍｓ２ｉｏ６Ａ　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、ｇ６Ａ　Ｎ６－グリシニルカルバモイルアデノシン、ｔ６Ａ　Ｎ６－トレオニルカルバモイルアデノシン、ｍｓ２ｔ６Ａ　２－メチルチオ－Ｎ６－トレオニ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（リン酸）、ｍ６　２Ａ　Ｎ６，Ｎ６－ジメチルアデノシン、ｍ６Ａｍ　Ｎ６，２’－Ｏ－ジメチルアデノシン、ｍ６　２Ａｍ　Ｎ６，Ｎ６，２’－Ｏ－トリメチルアデノシン、ｍ１Ａｍ　１，２’－Ｏ－ジメチルアデノシン、ｍ３Ｃ　３－メチルシチジン、ｍ５Ｃ　５－メチルシチジン、Ｃｍ　２’－Ｏ－メチルシチジン、ａｃ４Ｃ　Ｎ４－アセチルシチジン、ｆ５Ｃ　５－ホルミルシチジン、ｍ４Ｃ　Ｎ４－メチルシチジン、ｈｍ５Ｃ　５－ヒドロキシメチルシチジン、ｆ５Ｃｍ　５－ホルミル－２’－Ｏ－メチルシチジン、ｍ１Ｇ　１－メチルグアノシン、ｍ２Ｇ　Ｎ２－メチルグアノシン、ｍ７Ｇ　７－メチルグアノシン、Ｇｍ　２’－Ｏ－メチルグアノシン、ｍ２　２Ｇ　Ｎ２，Ｎ２－ジメチルグアノシン、Ｇｒ（ｐ）２’－Ｏ－リボシルグアノシン（リン酸）、ｙＷウィブトシン、ｏ２ｙＷペルオキシウィブトシン、ＯＨｙＷヒドロキシウィブトシン、ＯＨｙＷ＊低修飾ヒドロキシウィブトシン、ｉｍＧウィオシン、ｍ２，７Ｇ　Ｎ２，７－ジメチルグアノシン、ｍ２，２，７Ｇ　Ｎ２，Ｎ２，７－トリメチルグアノシンＩイノシン、ｍ１Ｉ　１－メチルイノシン、Ｉｍ　２’－Ｏ－メチルイノシン、Ｑキューオシン、ｇａｌＱガラクトシル－キューオシン、ｍａｎＱマンノシル－キューオシン、Ψプソイドウリジン、Ｄジヒドロウリジン、ｍ５Ｕ　５－メチルウリジン、Ｕｍ　２’－Ｏ－メチルウリジン、ｍ５Ｕｍ　５，２’－Ｏ－ジメチルウリジン、ｍ１Ψ　１－メチルプソイドウリジン、Ψｍ　２’－Ｏ－メチルプソイドウリジン、ｓ２Ｕ　２－チオウリジン、ｈｏ５Ｕ　５－ヒドロキシウリジン、ｃｈｍ５Ｕ　５－（カルボキシヒドロキシメチル）ウリジン、ｍｃｈｍ５Ｕ　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ｍｃｍ５Ｕ　５－メトキシカルボニルメチルウリジン、ｍｃｍ５Ｕｍ　５－メトキシカルボニルメチル－２’－Ｏ－メチルウリジン、ｍｃｍ５ｓ２Ｕ　５－メトキシカルボニルメチル－２－チオウリジン、ｎｃｍ５Ｕ　５－カルバモイルメチルウリジン、ｎｃｍ５Ｕｍ　５－カルバモイルメチル－２’－Ｏ－メチルウリジン、ｃｍｎｍ５Ｕ　５－カルボキシメチルアミノメチルウリジン、ｍ３Ｕ　３－メチルウリジン、ｍ１ａｃｐ３Ψ　１－メチル－３－（３－アミノ－３－カルボキシプロピル）プソイドウリジン、ｃｍ５Ｕ　５－カルボキシメチルウリジン、ｍ３Ｕｍ　３，２’－Ｏ－ジメチルウリジン、ｍ５Ｄ　５－メチルジヒドロウリジン、τｍ５Ｕ　５－タウリノメチルウリジン、τｍ５ｓ２Ｕ　５－タウリノメチル－２－チオウリジン、２－アミノアデノシン、２－アミノ－６－クロロプリンリボシド、８－アザアデノシン、６－

クロロプリンリボシド、５－ヨードシチジン、５－ヨードウリジン、イノシン、２’－Ｏ－メチルイノシン、キサントシン、４－チオウリジン、Ｏ６－メチルグアノシン、５，６－ジヒドロウリジン、２－チオシチジン、６－アザシチジン、６－アザウリジン、２’－Ｏ－メチル－２－アミノアデノシン、２’－Ｏ－メチルプソイドウリジン、Ｎ１－メチルアデノシン、２’－Ｏ－メチル－５－メチルウリジン、７－デアザグアノシン、８－アジドアデノシン、５－ブロモシチジン、５－ブロモウリジン、７－デアザアデノシン、５－アミノアリルウリジン、５－アミノアリルリシチジン、８－オキソグアノシン、２－アミノプリン－リボシド、プソイドイソシチジン、Ｎ１－メチルプソイドウリジン、５，６－ジヒドロ－５－メチルウリジン、Ｎ６－メチル－２－アミノアデノシン、５－カルボキシシチジン、５－ヒドロキシメチルウリジン、チエノグアノシン、５－ヒドロキシシチジン、５－ホルミルウリジン、５－カルボキシウリジン、５－メトキシウリジン、５－メトキシシチジン、チエノウリジン、５－カルボキシメチルエステルウリジン、チエノシチジン、８－オキソアデノオシン、イソグアノシン、Ｎ１－エチルプソイドウリジン、Ｎ１－メチル－２’－Ｏ－メチルプソイドウリジン、Ｎ１－メトキシメチルプソイドウリジン、Ｎ１－プロピルプソイドウリジン、２’－Ｏ－メチル－Ｎ６－メチルアデノシン、２－アミノ－６－Ｃｌ－プリン－２’－デオキシリボシド、２－アミノ－２’－デオキシアデノシン、２－アミノプリン－２’－デオキシリボシド、５－ブロモ－２’－デオキシシチジン、５－ブロモ－２’－デオキシウリジン、６－クロロプリン－２’－デオキシリボシド、７－デアザ－２’－デオキシアデノシン、７－デアザ－２’－デオキシグアノシン、２’－デオキシイノシン、５－プロピニル－２’－デオキシシチジン、５－プロピニル－２’－デオキシウリジン、５－フルオロ－２’－デオキシウリジン、５－ヨード－２’－デオキシシチジン、５－ヨード－２’－デオキシウリジン、Ｎ６－メチル－２’－デオキシアデノシン、５－メチル－２’－デオキシシチジン、Ｏ６－メチル－２’－デオキシグアノシン、Ｎ２－メチル－２’－デオキシグアノシン、８－オキソ－２’－デオキシアデノシン、８－オキソ－２’－デオキシグアノシン、２－チオチミジン、２’－デオキシ－Ｐ－ヌクレオシド、５－ヒドロキシ－２’－デオキシシチジン、４－チオチミジン、２－チオ－２’－デオキシシチジン、６－アザ－２’－デオキシウリジン、６－チオ－２’－デオキシグアノシン、８－クロロ－２’－デオキシアデノシン、５－アミノアリル－２’－デオキシシチジン、５－アミノアリル－２’－デオキシウリジン、Ｎ４－メチル－２’－デオキシシチジン、２’－デオキシゼブラリン、５－ヒドロキシメチル－２’－デオキシウリジン、５－ヒドロキシメチル－２’－デオキシシチジン、５－プロパルギルアミノ－２’－デオキシシチジン、５－プロパルギルアミノ－２’－デオキシウリジン、５－カルボキシ－２’－デオキシシチジン、５－ホルミル－２’－デオキシシチジン、５－［（３－インドリル）プロピオンアミド－Ｎ－アリル］－２’－デオキシウリジン、５－カルボキシ－２’－デオキシウリジン、５－ホルミル－２’－デオキシウリジン、７－デアザ－７－プロパルギルアミノ－２’－デオキシアデノシン、７－デアザ－７－プロパルギルアミノ－２’－デオキシグアノシン、ビオチン－１６－アミノアリル－２’－ｄＵＴＰ、ビオチン－１６－アミノアリル－２’－ｄＣＴＰ、ビオチン－１６－アミノアリルシチジン、Ｎ４－ビオチン－ＯＢＥＡ－２’－デオキシシチジン、ビオチン－１６－アミノアリルウリジン、ダブシル－５－３－アミノアリル－２’－ｄＵＴＰ、デスチオビオチン－６－アミノアリル－２’－デオキシシチジン、デスチオビオチン－１６－アミノアリル－ウリジン、ビオチン－１６－７－デアザ－７－プロパルギルアミノ－２’－デオキシグアノシン、シアニン３－５－プロパルギルアミノ－２’－デオキシシチジン、シアニン３－６－プロパルギルアミノ－２’－デオキシウリジン、シアニン５－６－プロパルギルアミノ－２’－デオキシシチジン、シアニン５－６－プロパルギルアミノ－２’－デオキシウリジン、シアニン３－アミノアリルシチジン、シアニン３－アミノアリルウリジン、シアニン５－アミノアリルシチジン、シアニン５－アミノアリルウリジン、シアニン７－アミノアリルウリジン、２’－フルオロ－２’－デオキシアデノシン、２’－フルオロ－２’－デオキシシチジン、２’－フルオロ－２’－デオキシグアノシン、２’－フルオロ－２’－デオキシウリジン、２’－Ｏ－メチルアデノシン、２’－Ｏ－メチルシチジン、２’－Ｏ－メチルグアノシン、２’－Ｏ－メチルウリジン、プロマイシ

ン、２’－アミノ－２’－デオキシシチジン、２’－アミノ－２’－デオキシウリジン、２’－アジド－２’－デオキシシチジン、２’－アジド－２’－デオキシウリジン、アラシチジン、アラウリジン、２’－アジド－２’－デオキシアデノシン、２’－アミノ－２’－デオキシアデノシン、アラアデノシン、２’－フルオロ－チミジン、３’－Ｏ－メチルアデノシン、３’－Ｏ－メチルシチジン、３’－Ｏ－メチルグアノシン、３’－Ｏ－メチルウリジン、２’－アジド－２’－デオキシグアノシン、アラグアノシン、２’－デオキシウリジン、３’－Ｏ－（２－ニトロベンジル）－２’－デオキシアデノシン、３’－Ｏ－（２－ニトロベンジル）－２’－デオキシイノシン、３’－デオキシアデノシン、３’－デオキシグアノシン、３’－デオキシシチジン、３’－デオキシ－５－メチルウリジン、３’－デオキシウリジン、２’，３’－ジデオキシアデノシン、２’，３’－ジデオキシグアノシン、２’，３’－ジデオキシウリジン、２’，３’－ジデオキシチミジン、２’，３’－ジデオキシシチジン、３’－アジド－２’，３’－ジデオキシアデノシン、３’－アジド－２’，３’－ジデオキシチミジン、３’－アミノ－２’，３’－ジデオキシアデノシン、３’－アミノ－２’，３’－ジデオキシシチジン、３’－アミノ－２’，３’－ジデオキシグアノシン、３’－アミノ－２’，３’－ジデオキシチミジン、３’－アジド－２’，３’－ジデオキシシチジン、３’－アジド－２’，３’－ジデオキシウリジン、５－ブロモ－２’，３’－ジデオキシウリジン、２’，３’－ジデオキシイノシン、２’－デオキシアデノシン－５’－Ｏ－（１－チオリン酸）、２’－デオキシシチジン－５’－Ｏ－（１－チオリン酸）、２’－デオキシグアノシン－５’－Ｏ－（１－チオ三リン酸）、２’－デオキシチミジン－５’－Ｏ－（１－チオリン酸）、アデノシン－５’－Ｏ－（１－チオリン酸）、シチジン－５’－Ｏ－（１－チオリン酸）、グアノシン－５’－Ｏ－（１－チオリン酸）、ウリジン－５’－Ｏ－（１－チオリン酸）、２’，３’－ジデオキシアデノシン－５’－Ｏ－（１－チオリン酸）、２’，３’－ジデオキシシチジン－５’－Ｏ－（１－チオリン酸）、２’，３’－ジデオキシグアノシン－５’－Ｏ－（１－チオリン酸）、３’－デオキシチミジン－５’－Ｏ－（１－チオリン酸）、３’－アジド－２’，３’－ジデオキシチミジン－５’－Ｏ－（１－チオリン酸）、２’，３’－ジデオキシウリジン－５’－Ｏ－（１－チオリン酸）、２’－デオキシアデノシン－５’－Ｏ－（１－ボラノリン酸）、２’－デオキシシチジン－５’－Ｏ－（１－ボラノリン酸）、２’－デオキシグアノシン－５’－Ｏ－（１－ボラノリン酸）、及び２’－デオキシチミジン－５’－Ｏ－（１－ボラノリン酸）。

【００２３】

送達ビヒクルが脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）であるものを含む、本開示の組成物のいくつかの実施形態では、送達ビヒクルは、ＴＥＲＴをコードするＲＮＡを含む。いくつかの実施形態では、送達ビヒクルの表面、層、または体積のうちの１つ以上が、ＴＥＲＴをコードするＲＮＡを含む。いくつかの実施形態では、表面は、外面または内面を含む。いくつかの実施形態では、層は、脂質単層または脂質二重層を含む。いくつかの実施形態では、体積は、内部体積を含む。

【００２４】

いくつかの実施形態では、本開示は、（ｉ）テロメラーゼ逆転写酵素（ＴＥＲＴ）をコードするリボ核酸（ＲＮＡ）、及び、（ｉｉ）送達ビヒクルを含む組成物を提供し、ＴＥＲＴをコードするＲＮＡは、１つ以上の修飾ヌクレオチドを含み、（ｉｉ）の送達ビヒクルは、ＴＥＲＴをコードするＲＮＡに作動可能に連結される。

【００２５】

送達ビヒクルが脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）であるものを含む、本開示の組成物のいくつかの実施形態では、組成物は、さらに、テロメラーゼＲＮＡ要素（ＴＥＲＣ）をコードするリボ核酸（ＲＮＡ）を含む。いくつかの実施形態では、送達ビヒクルは、テロメラーゼＲＮＡ要素（ＴＥＲＣ）をコードするリボ核酸（ＲＮＡ）に作動可能に連結される。いくつかの実施形態では、送達ビヒクルは、ＴＥＲＣをコードするＲＮＡを含む。いくつかの実施形態では、送達ビヒクルの表面、層、または体積のうちの１つ以上が、ＴＥＲＣをコードするＲＮＡを含む。いくつかの実施形態では、表面は、外面または内面を含む。いくつかの実施形態では、層は、脂質単層または脂質二重層を含む。いくつかの実施形態では、

体積は、内部体積を含む。
【００２６】
いくつかの実施形態では、ＴＥＲＴをコードするＲＮＡは、配列番号１～５、７、９、１４～１７、１９、２１、２３、２５、２７、２９～３１、３７～４０の配列、または、それと少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、もしくは少なくとも９９％同一の核酸配列を含む。いくつかの実施形態では、ＴＥＲＴをコードするＲＮＡは、配列番号３２～３４、３５、及び３６のＵＴＲ配列、または、それと少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、もしくは少なくとも９９％同一の核酸配列を含む。
【００２７】
いくつかの実施形態では、ＲＮＡは、自己複製ＲＮＡを含む。いくつかの実施形態では、ＲＮＡは、環状ＲＮＡを含む。
【００２８】
本開示は、細胞におけるテロメラーゼ活性を増加させる方法を提供し、方法は、細胞及び本開示の組成物を接触させることを含む。いくつかの実施形態では、細胞は、ｉｎ　ｖｉｖｏ、ｅｘ　ｖｉｖｏ、またはｉｎ　ｖｉｔｒｏにある。
【００２９】
本開示は、細胞内のテロメアを伸長する方法を提供し、方法は、細胞及び本開示の組成物を接触させることを含む。いくつかの実施形態では、細胞は、ｉｎ　ｖｉｖｏ、ｅｘ　ｖｉｖｏ、またはｉｎ　ｖｉｔｒｏにある。
【００３０】
本開示は、本開示の組成物を含む細胞を提供する。
【００３１】
本開示は、本開示の組成物を含む、本開示の細胞を含む製剤を提供する。製剤のいくつかの実施形態では、複数の細胞は、本開示の組成物を含む、本開示の細胞を含む。製剤のいくつかの実施形態では、複数の細胞のそれぞれは、本開示の組成物を含む、本開示の細胞である。
【００３２】
本開示は、有効量の本開示の組成物を対象に投与することを含む、疾患または障害を処置する方法を提供する。
【００３３】
本開示は、本開示の組成物を含む有効量の本開示の細胞を対象に投与することを含む、疾患または障害を処置する方法を提供する。
【００３４】
本開示は、有効量の本開示の製剤を対象に投与することを含む、疾患または障害を処置する方法を提供する。
【００３５】
本開示は、有効量の本開示の組成物を対象に投与することを含む、疾患の発症を遅延させる方法を提供する。
【００３６】
本開示は、本開示の組成物を含む有効量の本開示の細胞を対象に投与することを含む、疾患の発症を遅延させる方法を提供する。
【００３７】
本開示は、有効量の本開示の製剤を対象に投与することを含む、疾患の発症を遅延させる方法を提供する。
【００３８】
参照による組み込み
本明細書で言及される全ての出版物、特許、及び特許出願は、あたかも個々の出版物、

特許、または特許出願が、参照により組み込まれることが具体的且つ個別に示されるのと同じ範囲で、参照により本明細書に組み込まれる。

【００３９】

本開示の新規な特徴は、添付の特許請求の範囲に詳細に記載される。本開示の特徴及び利点は、本開示の原理が利用される例示的な実施形態について記載する以下の詳細な説明及び添付の図面を参照することにより、よりよく理解されるであろう。

【図面の簡単な説明】

【００４０】

【図１】テロメラーゼ逆転写酵素（ＴＥＲＴ）ｍＲＮＡを介した一過性の急速なテロメア伸長による長期的な治療効果を示す概略図である。特に、ＴＥＲＴ　ｍＲＮＡ処置により可能になるテロメア伸長の速度により、ＴＥＲＴ　ｍＲＮＡの低頻度投与によるテロメアの維持が可能になる。ＴＥＲＴ　ｍＲＮＡ送達によりもたらされるテロメラーゼ活性は、ｍＲＮＡがターンオーバーされる前に、短期間でテロメアを急速に伸長し、それにより、ほとんどの時間、テロメア短縮の防御的な抗がん機序が機能することが可能になる。処置の間に、正常なテロメラーゼ活性及びテロメア短縮が存在し、それ故、制御不能な増殖を防ぐテロメア短縮による抗がん安全機序はそのまま維持されるが、短いテロメア関連疾患のリスクは低いままである。対照的に、テロメアを延長するための既存の最良の小分子処置は、長期にわたる送達を必要とし、それにより、慢性がんのリスクがあり、その後でさえも、テロメア長に対する影響は小さく、一貫性がなく、約半分の患者では、テロメア長に対する影響は全く検出されない。

【図２】本明細書に開示の例示的な脂質構成成分を使用して作製されたｍＲＮＡ－ＬＮＰの代表的な動的光散乱（ＤＬＳ）プロットを示す。

【図３】ｍＲＮＡ－ＬＮＰを注射されたマウスの臓器全体の生物発光イメージングを示す。

【図４】Ａ～Ｂは、ｍＲＮＡレポーターで処置されたマウス（図４Ａ）及び未処置の対照マウス（図４Ｂ）由来の肺細胞におけるｔｄＴｏｍａｔｏの免疫組織化学染色を示す。

【図５】Ａ～Ｂは、ＴＥＲＴ　ｍＲＮＡ－ＬＮＰ送達後のマウス肺（図５Ｂ）及び未処置の対照マウス肺（図５Ａ）におけるテロメラーゼ活性の測定値を示す。

【図６Ａ】例示的な肺送達ビヒクル製剤のトランスフェクション効率を示す棒グラフである。

【図６Ｂ】上記のようにマウスから採取された肺切片の代表的な画像を示す。レポータータンパク質は暗色化した染色として示される。

【図６Ｃ】上記のようにマウスから採取された肺切片の代表的な画像を示す。レポータータンパク質は暗色化した染色として示される。

【図６Ｄ】上記のようにマウスから採取された肺切片の代表的な画像を示す。レポータータンパク質は暗色化した染色として示される。

【図６Ｅ】上記のようにマウスから採取された肺切片の代表的な画像を示す。レポータータンパク質は暗色化した染色として示される。

【図６Ｆ】上記のようにマウスから採取された肺切片の代表的な画像を示す。レポータータンパク質は暗色化した染色として示される。

【図７Ａ】肺線維症について試験されたマウス肺のコンピュータ断層撮影（ＣＴ）Ｘ線スキャンを示す。

【図７Ｂ】肺線維症について試験されたマウス肺のコンピュータ断層撮影（ＣＴ）Ｘ線スキャンを示す。

【図７Ｃ】肺線維症について試験されたマウス肺のコンピュータ断層撮影（ＣＴ）Ｘ線スキャンを示す。

【図７Ｄ】は、Ａ～Ｃに示される結果を定量化する棒グラフである。

【図８】肺を標的としたＬＮＰの他の製剤と比較した、表６Ａの製剤を投与されたマウスの死亡率を示すグラフを示す。

【図９】Ａ～Ｄは、肺線維症を誘発するためにブレオマイシンで処置され、肺胞細胞への

ｍＲＮＡの送達を示すためにＣＲＥ　ｍＲＮＡまたは生理食塩水で処置されたマウス由来の様々な肺試料を示す。
【図１０】ＳＳ－ＯＰ　ＤＯＴＡＰ及びｃＫＫ　ＤＯＴＡＰ　ＬＮＰ製剤を用いた肺へのルシフェラーゼｍＲＮＡの静脈内（ＩＶ）及び気管（ＯＡ）送達の肺発光を示す。
【図１１】静脈内投与されたＳＳ－ＯＰ　ＤＯＴＡＰ製剤の肺への優先的な送達を示す。左から右へ、ディッシュのＬＮＰ製剤は、（１）ＳＳ－ＯＰ　ＤＯＴＡＰと７５：１で経口送達され；（２）ＳＳ－ＯＰ　ＤＯＴＡＰを７５：１で静脈内送達され；（３）ＰＢＳ対照（ＬＮＰなし）；（４）ｃＫＫ　ＤＯＴＡＰを４０：１で経口送達される。
【図１２】ＣＲＥ　ｍＲＮＡ含有ＬＮＰ製剤の静脈内送達による肺実質におけるＴｏｍａｔｏ（＋）細胞の割合を示す。
【図１３】ホタルルシフェラーゼｍＲＮＡを送達するＬＮＰ組成物を製剤化するために使用される流量に対する肺発光を示す。
【図１４】ルシフェラーゼＲＮＡを送達するＬＮＰ製剤のｅｘ　ｖｉｖｏ生物発光を示し、ＲＮＡ送達に必要な構造脂質またはコレステロールはなかった。
【図１５】ルシフェラーゼｍＲＮＡを送達するＬＮＰ製剤のｅｘ　ｖｉｖｏ肺平均放射輝度を示し、ＲＮＡ対ＬＮＰの比は、示された比に従って変化した。
【図１６】ルシフェラーゼｍＲＮＡを送達するＬＮＰ製剤のｅｘ　ｖｉｖｏ肺平均放射輝度を示し、ＲＮＡ対ＬＮＰの比は、示された比に従って変化し、製剤に使用されたＤＯＰＣ構造脂質はなかった。
【図１７】Ａ及びＢは、ルシフェラーゼｍＲＮＡを送達するＬＮＰ製剤のｅｘ　ｖｉｖｏ肺平均放射輝度を示し、ＰＥＧ化脂質の割合は、製剤中で変化する。
【図１８】Ａ及びＢは、ルシフェラーゼｍＲＮＡを送達するＬＮＰ製剤のｅｘ　ｖｉｖｏ肺平均放射輝度を示し、ＰＥＧ化脂質の割合は、１．５％未満であるか、または製剤中に存在しない。
【図１９】ルシフェラーゼｍＲＮＡを送達するＬＮＰ製剤のｅｘ　ｖｉｖｏ肺平均放射輝度を示し、ＤＯＴＡＰの割合は、製剤中で変化する。
【図２０】Ａ及びＢは、ＤＯＴＡＰの割合が変化する、例示的なＬＮＰ製剤の肺への優先的なｅｘ　ｖｉｖｏ送達を示す。Ａは、ＤＯＴＡＰの割合に応じたルシフェラーゼｍＲＮＡを送達するＬＮＰ製剤の肝臓平均放射輝度を示す。Ｂは、ＤＯＴＡＰの割合に応じたＬＮＰ製剤の肺／肝臓送達比を示す。
【図２１】Ａ及びＢは、肺胞上皮細胞におけるＬＮＰ製剤のトランスフェクションを示す。Ｃｒｅ　ｍＲＮＡを含むＬＮＰを投与されたｔｏｍａｔｏ　ｆｌ／ｆｌマウスにおいて誘発されたｔｄＴｏｍａｔｏの発現の免疫蛍光染色が示される。ＡＴ１及びＡＴ２肺上皮細胞マーカーも染色した。
【図２２】ＴＥＲＴ　ｍＲＮＡを含む、表６ＡのＳＳ－ＯＰ　ＤＯＴＡＰ　ＬＮＰを使用した、疾患処置としての治療用ｍＲＮＡのＳＳ－ＯＰ　ＤＯＴＡＰ送達を示す。ＬＮＰ　ＴＥＲＴ　ｍＲＮＡ製剤を、０日目にブレオマイシンで誘発された肺線維症モデルマウスに送達した。対照ｍＲＮＡと比較して、ＴＥＲＴ　ｍＲＮＡの送達は、マウスの生存率をエンドポイントで２１０％延長した。
【発明を実施するための形態】
【００４１】
本開示の組成物及び方法は、ＳＳ－ＯＰ脂質またはそのアナログを含む脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）、例えば、本明細書に記載の式Ｉの化合物、及び肺への静脈内送達のための、例えば、肺疾患及び／または肺線維症の処置のための、カチオン性脂質を提供する。いくつかの変形形態では、ＳＳ－ＯＰ脂質またはそのアナログは、ｃＫＫ脂質またはそのアナログと置き換えられるか、またはそれと組み合わされてもよい。本明細書に開示のように、上術のＬＮＰは、既知のＬＮＰ製剤と比較して、肺形質導入効率及び／または肺特異性が改善されていることがある。
【００４２】
例えば、肺線維症を処置するために肺に送達されるテロメラーゼ逆転写酵素（ＴＥＲＴ

）をコードするリボ核酸（ＲＮＡ）も本明細書で提供される。ＲＮＡコード化ＴＥＲＴは、任意に、上述のＳＳ－ＯＰ　ＬＮＰ組成物、または当該技術分野で既知の他のＬＮＰを用いて送達され得る。

【００４３】

テロメラーゼ逆転写酵素（ＴＥＲＴ）は、染色体末端（テロメア）を維持及び伸長することが既知の酵素である。ＴＥＲＴ酵素は、リボ核タンパク質テロメラーゼの触媒サブユニットである。ＴＥＲＴは、テロメラーゼのＲＮＡ要素内のテンプレート配列５’－ＧＧＴＴＡＧ－３’をコピーすることにより、単純な配列リピートをテロメアに追加する。反復デオキシリボ核酸（ＤＮＡ）配列のこの追加は、テロメア短縮を遅らせるのに役立ち、これは、例えば、有糸分裂中の不完全なＤＮＡ複製により、時間とともに生じる。

【００４４】

ＴＥＲＴは、核及び細胞質間で移行し、細胞増殖及びがん転移を含む、他の多くの生物学的プロセスにおいて重要な因子であることが示されている。従って、核内のＴＥＲＴレベルは、細胞及び生物の健康を調節する上で重要なステップであってよい。

【００４５】

テロメラーゼ逆転写酵素（ＴＥＲＴ）は、当該技術分野で、ＴＲＴ、皮膚悪性メラノーマ９（ＣＭＭ９）、常染色体優性２型先天性角化異常症（ＤＫＣＡ２）、常染色体劣性遺伝性先天性角化異常症４（ＤＫＣＢ４）、ヒトエバーショートテロメア２（ＨＥＳＴ２）、肺線維症／骨髄不全テロメア関連１（ＰＦＢＭＦＴ１）、テロメラーゼ触媒サブユニット（ＴＣＳ１）、及びテロメラーゼ関連タンパク質２（ＴＰ２）としても知られている。

【００４６】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の処置は、線維性疾患、例えば、肺疾患、または他の肺疾患、の進行を停止、遅延、または後退させ得る。

【００４７】

ＴＥＲＴ　ｍＲＮＡは、一過性であり、分解される前にヒト細胞のテロメアを伸長するのに数時間しか必要としない。従って、ＴＥＲＴ　ｍＲＮＡは、依然として、防御的な抗がんテロメア短縮機序を損なわない。本開示は、ＴＥＲＴ　ｍＲＮＡの送達ならびに線維性疾患及び肺疾患の処置のための組成物及び方法を提供する。

【００４８】

通常の老化において、細胞周期のＳ期中の酸化及び不完全なＤＮＡ複製により、テロメアは、約３０～１００塩基対／年だけ短くなる（Ｋｕｒｅｎｏｖａ　ＥＶ，ｅｔ　ａｌ．Ｔｅｌｏｍｅｒｅ　ｆｕｎｃｔｉｏｎｓ．Ａ　ｒｅｖｉｅｗ．Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ（Ｍｏｓｃ）１９９７；６２：１２４２－５３）。テロメラーゼは、ＴＥＲＴタンパク質及びポリヌクレオチドテンプレート（ＴＥＲＣ）で構成され、テロメアを伸長するが、ヒトでは、ほとんどの体細胞型では不活性であり、多くの前駆細胞型において正味テロメアの短縮を防ぐには不十分な低レベルの活性しかない。例外は、精子形成系統であり、テロメラーゼは、ヒトの生涯を通じてテロメア長を維持するのに十分活性がある（Ｔａｋｕｂｏ　Ｋ，Ａｉｄａ　Ｊ，Ｉｚｕｍｉｙａｍａ－Ｓｈｉｍｏｍｕｒａ　Ｎ，ｅｔ　ａｌ．Ｃｈａｎｇｅｓ　ｏｆ　ｔｅｌｏｍｅｒｅ　ｌｅｎｇｔｈ　ｗｉｔｈ　ａｇｉｎｇ．Ｇｅｒｉａｔｒｉｃ　Ｇｅｒｏｎｔｏｌｏｇｙ　Ｉｎｔ　２０１０；１０　Ｓｕｐｐｌ　１：Ｓ１９７－２０６）。ＴＥＲＣ要素は、全ての細胞型に高レベルで存在し、通常は、１０，０００コピー／細胞を超えるので、ＴＥＲＴが制限要素となる。短いテロメアは、細胞の増殖及び再生能力を制限するので、老化、早期死亡、ならびに膨大な数の疾患及び状態と関連している。

【００４９】

テロメアは、線状染色体の末端にある反復ＤＮＡ配列を含み、十分に長い場合、各染色体の末端に、末端が二本鎖または一本鎖のＤＮＡ切断として機能するのを防ぐループを形成させ得る。テロメアは、酸化的損傷及び不完全なＤＮＡ複製に一部起因して、経時的に短縮され得、最終的に、保護ループを形成できない極めて短いテロメア、染色体末端の露出、染色体と染色体の融合、ＤＮＡ損傷反応、及び細胞の老化、アポトーシス、または悪

性腫瘍がもたらされる。

【００５０】

テロメアの長さの維持は、細胞の老化及びアポトーシス、ならびに得られる細胞及び臓器機能不全の予防に関与し得る。多くの疾患では、基礎疾患の機序により損傷または死滅した細胞を置き換えるための細胞複製のニーズは、テロメアを通常よりも急速に短縮し、細胞の複製能力が枯渇し、組織の機能障害、悪化もしくは追加の症状、障害、または死がもたらされた。さらに、テロメラーゼ酵素（ＴＥＲＴ）の遺伝子変異は、先天性角化異常症と、肺線維症、肺疾患、及び無形成性貧血の形態を含む、不十分なテロメア維持の致死的な遺伝性疾患と関連している可能性がある。染色体間の融合及び短いテロメアによる細胞の老化は、がんのリスクを増加させ得る。短いテロメアは、老化の有害な状態及び疾患、ならびに多くの疾患の不良転帰とも関連している。肺線維症の原因となる肺疾患には、肺線維症、肺癌、家族性肺線維症、特発性肺線維症、先天性角化異常症を伴う肺線維症、間質性肺疾患、肺炎、間質性肺炎、結核、気管支炎、肺気腫、肺癌、慢性閉塞性肺疾患（ＣＯＰＤ）、老化関連線維症、肺高血圧症、喘息、及び嚢胞性線維症が含まれ得るが、これらに限定されない。

【００５１】

テロメア伸長により機能不全、症状、及び疾患を予防、遅延、または処置するという見通しは、ｉｎ　ｖｉｖｏ及び／またはｉｎ　ｖｉｔｒｏで動物細胞のテロメアを伸長させるための安全で効果的な処置、ならびに、テロメアを延長するために、動物細胞に治療を与えるための安全で効果的な組成物及び方法に対するニーズを刺激する。さらに、細胞治療、細胞及び組織工学、ならびに再生医療で使用される細胞内のテロメアを安全で迅速に伸長する必要がある。しかし、同時に、テロメラーゼ活性の一過性ではなく、構成的な活性化には危険が存在し得る。実に、細胞療法の用途では、細胞の不死化を回避する必要がある。この目的のために、例えば、テロメラーゼ活性の上昇が短時間であるだけでなく、治療を継続的に繰り返す必要がないほど十分に急速にテロメアを伸長する場合、構成的ではなく一時的なテロメラーゼ活性が安全性にとって有利となり得る。

【００５２】

従って、これら及び他の状態及び疾患を潜在的に予防、遅延、改善、または処置するために、経年的老化に伴う身体的形態及び機能及び精神機能の漸進的な低下の場合に同じことをするために、ならびに、細胞治療及び再生医療を可能にするために、テロメアを安全に延長する治療法にニーズがある。さらに、これらの治療法、例えば、テロメラーゼをコードする核酸分子、を細胞に送達する方法の改良のニーズがある。

【００５３】

本明細書で別途定義しない限り、本出願で使用される科学用語及び技術用語は、当業者らにより一般に理解される意味を有するものとする。一般に、本明細書に記載される化学、分子生物学、細胞及びがん生物学、免疫学、微生物学、薬理学、ならびにタンパク質及び核酸化学と関連して使用される命名法及びこれの手法は、当該技術分野に周知及び一般に使用されるものである。

【００５４】

本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用される場合、単数形「ａ」、「及び」、及び「ｔｈｅ」には、文脈に別途明示のない限り、複数の指示対象が含まれる。従って、例えば、「薬物候補」への言及は、そのような候補の１つまたは混合物を指し、「方法」への言及は、当業者らに既知の同等のステップ及び方法への言及などが含まれる。

【００５５】

本明細書で使用される「およそ」または「約」という用語は、１つ以上の目的の値に適用される場合、記載の基準値と大きさが類似している及び／または類似の範囲内の値を指す。特定の実施形態では、「およそ」または「約」という用語は、別途記載がない限り、または別途文脈から明らかでない限り（そのような数が可能な値の１００％を超える場合を除き）、記載の基準値からいずれかの方向（以上または以下）で、２５％、２０％、１９％、１８％、１７％、１６％、１５％、１４％、１３％、１２％、１１％、１０％、９

％、８％、７％、６％、５％、４％、３％、２％、１％以下に入る値の範囲を指し得る。

【００５６】

値の範囲が提供される場合、文脈により明確に別段の指示がない限り、その範囲の上限及び下限間にある下限の単位の１０の１の各介在値、ならびに、その記載の範囲内の他の任意の記載の値または介在値は、本開示に包含されると理解される。これらのより小さい範囲の上限及び下限は、記載の範囲内で、任意の特に除外される端を条件として、独立して、本開示内にも包含される小さい範囲に含まれ得る。記載の範囲が端の一方または両方を含む場合、それらの含まれる端の一方または両方を除く範囲も開示に含まれる。

【００５７】

「Ｇ」、「Ｃ」、「Ａ」、「Ｔ」、及び「Ｕ」は、通常、それぞれグアニン、シトシン、アデニン、チミジン、及びウラシルである塩基を表す。核酸塩基は、五炭糖の付加によりヌクレオシドを形成し得る。糖がリボースの場合、ヌクレオシドは、リボヌクレオシドである。ヌクレオシドは、順次、リン酸基などの１つ以上のリンカー基の付加によりヌクレオチドを形成し得る。ヌクレオチドは、順次、短いポリマー（オリゴヌクレオチド）を含むポリマー（ポリヌクレオチド）を形成し得る。しかし、「塩基」、「核酸塩基」、「ヌクレオシド」、「リボヌクレオシド」、「ヌクレオチド」、「リボヌクレオチド」という用語は、以下でさらに詳述されるような、修飾塩基、核酸塩基、ヌクレオシド、リボヌクレオシド、ヌクレオチド、もしくはリボヌクレオチド、または代替置換部分（例えば、表２及び本明細書の他の箇所を参照）も指し得ると理解されるであろう。グアニン、シトシン、アデニン、チミジン、ウラシルが、そのような置換部分を有するヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの特定の特性（例えば、塩基対形成特性、翻訳性、またはタンパク質結合特性）のうちの１つ以上を実質的に損なうことなく、他の部分で置換することができることは、当業者には周知である。そのような置換部分を含有する配列は、本開示で取り上げられる組成物及び方法に適している。同様に、そのような置換部分を有するヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの特定の特性（例えば、塩基対形成特性、翻訳性、またはタンパク質結合特性）を損なうことなく、リボースを他の部分で置換することができることを、当業者には周知である。そのような置換部分を含有する配列は、本開示で取り上げられる組成物及び方法に適している。同様に、そのような置換部分を有するヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの特定の特性（例えば、塩基対形成特性、翻訳性、またはタンパク質結合特性）を損なうことなく、リン酸を他の部分で置換することができることを、当業者には周知である。そのような置換部分を含有する配列は、本開示で取り上げられる組成物及び方法に適している。

【００５８】

本明細書で使用される場合、「ポリペプチド」、「ペプチド」、及び「タンパク質」という用語は、任意の長さのアミノ酸のポリマーを指す。用語は、例えば、ジスルフィド結合の形成、グリコシル化、脂質化、リン酸化、または標識構成成分とのコンジュゲーションを含むように修飾されているアミノ酸ポリマーも包含する。

【００５９】

本明細書で使用される場合、「同一性」及び「同一の」という用語は、ポリペプチドまたはポリヌクレオチドの目的配列に関して、参照配列に対する目的配列のアライメント、例えば、ＢＬＡＳＴアルゴリズムにより生成されたアライメントの正確に一致する残基の割合を指す。同一性は、別途明記のない限り、参照配列の全長にわたって計算される。従って、参照配列が（クエリ配列として）、（対象配列としての）目的配列とアラインメントされる時に、対象配列内の残基の少なくともｘ％（切り捨て）が、クエリ配列内の対応する残基と、完全に一致するものとしてアラインされる場合、目的配列は、参照配列と「少なくともｘ％の同一性を共有する」（分母は、参照配列の全長に、参照配列を目的配列にアラインすることにより参照配列に挿入されたギャップ長を加えたものである）。対象配列が、可変位置（例えば、Ｘで示される残基）を有する場合、クエリ配列内の任意の残基に対するアライメントは、一致としてカウントされる。配列アラインメントは、ＮＣＢ

Ｉ　Ｂｌａｓｔサービス（ＢＬＡＳＴ＋バージョン２．１２．０）または同じ結果が得られる別のプログラムを使用して実施され得る。

【００６０】

本明細書で使用される「天然」または「野生型」という用語は、野生型の細胞、組織、器官、または生物中に存在するヌクレオチド配列、例えば、遺伝子、または遺伝子産物、例えば、ＲＮＡまたはポリペプチドを指す。本明細書で使用される「バリアント」という用語は、参照ポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列、例えば、天然のポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列の、すなわち、参照ポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列と１００％未満の配列同一性を有する、変異体を指す。換言すれば、バリアントは、参照ポリヌクレオチド配列、例えば、天然のポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列、と比較して、少なくとも１つのヌクレオチドの差異（例えば、ヌクレオチド置換、ヌクレオチド挿入、ヌクレオチドの欠失）または１つのアミノ酸の差異（例えば、アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸の欠失）を含む。例えば、バリアントは、全長天然ポリヌクレオチド配列と５０％以上、６０％以上、または７０％以上の配列同一性、例えば、７５％または８０％以上の同一性、例えば、８５％、９０％、または９５％以上、例えば、全長天然ポリヌクレオチド配列と９８％または９９％の同一性を有するポリヌクレオチドであってよい。別の例として、バリアントは、全長天然ポリペプチド配列と７０％以上の配列同一性、例えば、７５％または８０％以上の配列同一性、例えば、全長の天然ポリペプチド配列と８５％、９０％、または９５％以上、例えば、９８％または９９％の同一性を有するポリペプチドであってよい。バリアントは、参照配列、例えば、天然配列のフラグメントと７０％以上の配列同一性、例えば、７５％または８０％以上の同一性、例えば、天然配列と８５％、９０％、または９５％以上、例えば、９８％または９９％の同一性を共有する参照配列、例えば、天然配列のバリアントフラグメントも含んでもよい。

【００６１】

本明細書で使用される場合、「コドン最適化」という用語は、宿主生物のコドンバイアスに適応することにより、遺伝子発現を改善し、目的の遺伝子の翻訳効率を増加させるため、及び／または、ポリヌクレオチドの免疫原性を低減させるために使用される任意のプロセスを指す。

【００６２】

「処置する」または「処置」という用語は、本明細書では、一般に、治療薬により所望の薬理学的及び／または生理学的効果を得ることを意味するために使用される。効果は、疾患またはその症状を完全または部分的に予防する、例えば、疾患またはその症状が対象において生じる可能性を低減するという点で予防的であり得、及び／または、症状の完全もしくは部分的な低減または疾患及び／または疾患に起因する有害反応に対する部分的もしくは完全な治癒という点で治療的であり得る。本明細書で使用される「処置」は、哺乳動物の疾患の任意の処置を網羅し、以下を含む：（ａ）疾患に罹患しやすいことがあるが、それを罹患すると診断されていない対象に、疾患が生じないようないすること；（ｂ）疾患の発症もしくは進行を阻害もしくは減速させること；または、（ｃ）疾患を軽減すること、例えば、疾患もしくは疾患と関連する症状の縮小を引き起こすこと。治療薬は、疾患の発症前、発症中、または発症後に投与され得る。処置が患者の望ましくない臨床症状を安定化または低減する進行中の疾患の処置は、特定の関心のものであってよい。いくつかの実施形態では、処置は、罹患組織の機能が完全に失われる前に実施される。いくつかの実施形態では、主題の治療法は、疾患の症候性段階の前に；いくつかの実施形態では、疾患の症候性段階中に；いくつかの実施形態では、疾患の症候性段階の後に投与されるであろう。

【００６３】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の治療法は、限定されないが、線維性肺疾患を含む、線維性疾患または肺疾患を処置する。

【００６４】

「個体」、「対象」、及び「患者」という用語は、本明細書で互換的に使用され、処置

または治療法が望まれる任意の対象を指す。対象は、哺乳動物対象であってよい。哺乳動物対象には、例えば、ヒト、非ヒト霊長類、齧歯動物（例えば、ラット、マウス）、ウサギ目（例えば、ウサギ）、有蹄動物（例えば、ウシ、ヒツジ、ブタ、ウマ、ヤギなど）などが含まれる。いくつかの実施形態では、対象は、ヒトである。いくつかの実施形態では、対象は、非ヒト霊長類、例えば、カニクイザルである。いくつかの実施形態では、対象は、ペットまたは介助動物（例えば、ネコまたはイヌ）である。

【００６５】

本明細書で使用される「それを必要とする」対象は、線維性疾患または肺疾患に罹患しているか、または、それを発症するリスクがあると確認された任意の対象を指す。

【００６６】

本開示は、そのような方法、装置、及び製剤が変化し得るので、記載された特定の方法論、製品、装置、及び要素に限定されないことを理解すべきである。本明細書で使用される用語は、特定の実施形態を説明することのみを目的としており、添付の特許請求の範囲によりのみ限定される本開示の範囲を限定するものではないことも理解されるべきである。

【００６７】

Ｉ．合成ｍＲＮＡ

本明細書で使用される合成リボ核酸（ＲＮＡ）は、野生型配列には見出されない変異（点もしくは欠失）または追加のヌクレオチドを含む任意のＲＮＡ配列を指し得る。例えば、合成ＴＥＲＴメッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）は、１、２、３、１０、１００またはそれ以上のヌクレオチドの付加に隣接する、ヒトＴＥＲＴ配列をコードする野生型配列を指し得る。同様に、ヌクレオチド自体が、野生型とは異なるアミノ酸をコードするか、または、細胞もしくは組織の免疫原性を低減させるように修飾され得る。いくつかの実施形態におけるｍＲＮＡ配列は、限定されないが、非翻訳領域（ＵＴＲ）、５’キャップ、及びポリアデノシンテールを含む、以下の修飾のいずれかを含んでもよい。いくつかの実施形態では、ＲＮＡは、環状及び／または自己複製性であってよい。

【００６８】

環状ｍＲＮＡの実例となる製造方法は、以下で提供される：Ｃｈｅｎ ｅｔ ａｌ．Ｓｃｉｅｎｃｅ．１９９５ Ａｐｒ ２１；２６８（５２０９）：４１５－７；Ｐｅｒｒｉｍａｎ Ｒ．（２００２）Ｃｉｒｃｕｌａｒ ｍＲＮＡ Ｅｎｃｏｄｉｎｇ ｆｏｒ Ｍｏｎｏｍｅｒｉｃ ａｎｄ Ｐｏｌｙｍｅｒｉｃ Ｇｒｅｅｎ Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｔ Ｐｒｏｔｅｉｎ．Ｉｎ：Ｈｉｃｋｓ Ｂ．Ｗ．（ｅｄｓ）Ｇｒｅｅｎ Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｔ Ｐｒｏｔｅｉｎ．Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，ｖｏｌ １８３．Ｈｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓ；Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．ＲＮＡ．２０１５ Ｆｅｂ；２１（２）：１７２－９．ｄｏｉ：１０．１２６１／ｒｎａ．０４８２７２．１１４．Ｅｐｕｂ ２０１４ Ｄｅｃ １；Ｗｅｓｓｅｌｈｏｅｆｔ ｅｔ ａｌ．Ｎａｔ Ｃｏｍｍｕｎ．２０１８ Ｊｕｌ ６；９（１）：２６２９；及びＷｅｓｓｅｌｈｏｅｆｔ ｅｔ ａｌ．Ｍｏｌ Ｃｅｌｌ．２０１９ Ｍａｙ ２；７４（３）：５０８－５２０．ｅ４。ｍＲＮＡを自己複製する製造方法の実例は、以下で提供される：Ｔｅｗｓ Ｂ．Ａ．，Ｍｅｙｅｒｓ Ｇ．（２０１７）Ｓｅｌｆ－Ｒｅｐｌｉｃａｔｉｎｇ ＲＮＡ．Ｉｎ：Ｋｒａｍｐｓ Ｔ．，Ｅｌｂｅｒｓ Ｋ．（ｅｄｓ）ＲＮＡ Ｖａｃｃｉｎｅｓ．Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，ｖｏｌ １４９９．Ｈｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓ；Ｌｅｙｍａｎ ｅｔ ａｌ．Ｍｏｌ Ｐｈａｒｍ．２０１８ Ｆｅｂ ５；１５（２）：３７７－３８４；及びＨｕｙｓｍａｎｓ ｅｔ ａｌ．Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ．２０１９ Ｓｅｐ ６；１７：３８８－３９５。

【００６９】

ＴＥＲＴ ｍＲＮＡ

いくつかの実施形態では、組成物は、線維性疾患または肺疾患に関連する１つ以上の表現型または症状を処置する逆転写酵素テロメラーゼ（ＴＥＲＴ）ｍＲＮＡ配列を含んでも

よい。いくつかの実施形態では、ＴＥＲＴ　ｍＲＮＡは、野生型配列またはそのバリアントを含む、ＴＥＲＴタンパク質の任意の全長の機能的フラグメントまたは部分をコードするｍＲＮＡを指す。

【００７０】

いくつかの実施形態では、ＴＥＲＴ　ｍＲＮＡは、コドン最適化された配列を含んでもよい。いくつかの実施形態では、ＴＥＲＴ　ｍＲＮＡは、ウリジン枯渇ヒトＴＥＲＴ配列を含んでもよい。いくつかの実施形態では、コドン最適化配列は、配列番号１、または、それと少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、もしくは少なくとも９９％同一の核酸配列を含んでもよい。

【００７１】

いくつかの実施形態では、ＴＥＲＴ　ｍＲＮＡは、変異型ヒトＴＥＲＴ配列を含んでもよい。いくつかの実施形態では、変異型ヒトＴＥＲＴ　ｍＲＮＡは、得られるペプチド配列においてＹ７０７Ｆ変異をコードし得る。いくつかの実施形態では、ＴＥＲＴ　ｍＲＮＡ配列における変異は、ＴＥＲＴペプチドの核保持をもたらし得る核外輸送シグナルにおける変異をコードする。いくつかの実施形態では、変異型ＴＥＲＴ　ｍＲＮＡ配列は、配列番号２、または、それと少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、もしくは少なくとも９９％同一の核酸配列を含んでもよい。

【００７２】

いくつかの実施形態では、マウスＴＥＲＴ　ｍＲＮＡは、コドン最適化された配列を含んでもよい。いくつかの実施形態では、ＴＥＲＴ　ｍＲＮＡは、ウリジン枯渇マウスＴＥＲＴ配列を含んでもよい。いくつかの実施形態では、コドン最適化配列は、配列番号３、または、それと少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、もしくは少なくとも９９％同一の核酸配列を含んでもよい。

【００７３】

いくつかの実施形態では、マウスＴＥＲＴ　ｍＲＮＡは、変異型マウスＴＥＲＴ配列を含んでもよい。いくつかの実施形態では、変異型マウスＴＥＲＴ　ｍＲＮＡは、得られるペプチド配列においてＹ７０７Ｆ変異をコードし得る。いくつかの実施形態では、ＴＥＲＴ　ｍＲＮＡ配列における変異は、ＴＥＲＴペプチドの核保持をもたらし得る核外輸送シグナルにおける変異をコードする。いくつかの実施形態では、変異型マウスＴＥＲＴ　ｍＲＮＡ配列は、配列番号４、または、それと少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、もしくは少なくとも９９％同一の核酸配列を含んでもよい。

【００７４】

いくつかの実施形態では、マウスＴＥＲＴ　ｍＲＮＡは、変異型マウスＴＥＲＴ配列を含んでもよい。いくつかの実施形態では、変異型マウスＴＥＲＴ　ｍＲＮＡは、得られるペプチド配列においてＹ６９７Ｆ変異をコードし得る。いくつかの実施形態では、ＴＥＲＴ　ｍＲＮＡ配列における変異は、ＴＥＲＴペプチドの核保持をもたらし得る核外輸送シグナルにおける変異をコードする。いくつかの実施形態では、変異型マウスＴＥＲＴ　ｍＲＮＡ配列は、配列番号５の配列、または、それと少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、もしくは少なくとも９９％同一の核酸配列を含んでもよい。

【００７５】

本開示の組成物は、リボ核酸、例えば、テロメラーゼ逆転写酵素（ＴＥＲＴ）をコードする合成リボ核酸を含んでもよく、テロメアは、化合物で処置された細胞内で伸長する。ＴＥＲＴの一過性発現に使用されるリボ核酸は、ＴＥＲＴタンパク質をコードするリボ核

酸を含み得る。リボ核酸は、さらに、細胞内でのリボ核酸の発現及び／または安定性に影響を与える１つ以上の配列を含み得る。例えば、リボ核酸は、コード配列の５’側及び／または３’側に５’キャップ及び非翻訳領域（ＵＴＲ）を含有し得る。リボ核酸は、さらに、ポリＡテールなどの３’テールを含んでもよい。例えば、ポリＡテールは、リボ核酸の安定性を高め得る。いくつかの実施形態では、ポリＡテールは、少なくとも２５ヌクレオチド、少なくとも５０ヌクレオチド、少なくとも７５ヌクレオチド、少なくとも１００ヌクレオチド、少なくとも１２５ヌクレオチド、少なくとも１５０ヌクレオチド、少なくとも２００ヌクレオチド、少なくとも２２５ヌクレオチド、少なくとも２５０ヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、ポリＡテールは、１～２５ヌクレオチド、２５～５０ヌクレオチド、５０～７５ヌクレオチド、７５～１００ヌクレオチド、１００～１２５ヌクレオチド、１２５～１５０ヌクレオチド、１５０～１７５ヌクレオチド、１７５～２００ヌクレオチド、２００～２２５ヌクレオチド、または２２５～２５０ヌクレオチド（各範囲の端点を含む）を含む。いくつかの実施形態では、ポリＡテールは、１００～２００（端点を含む）のヌクレオチドを含む。

【００７６】

いくつかの実施形態では、リボ核酸の５’キャップは、非免疫原性キャップである。いくつかの実施形態では、５’キャップは、リボ核酸の翻訳を増加させ得る。いくつかの実施形態では、５’キャップは、リボ核酸の自然免疫原性を調節するために、ホスファターゼで処理され得る。いくつかの実施形態では、５’キャップは、３’－Ｏ－Ｍｅ－ｍ７Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）ＧＲＮＡキャップ構造アナログなどのアンチリバースキャップアナログ（「ＡＲＣＡ」）である。いくつかの実施形態では、５’キャップは、ｍ７Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）（２’ＯｍｅＡ）ｐＧ（ＣｌｅａｎＣａｐ（登録商標）ＡＧとしても既知）である。いくつかの実施形態では、５’キャップは、ｍ７（３’ＯｍｅＧ）（５’）ｐｐｐ（５’）（２’ＯｍｅＡ）ｐＧ（ＣｌｅａｎＣａｐ（登録商標）ＡＧ（３’ＯＭｅ）としても既知）である。

【００７７】

上記の特徴または他の特徴は、リボ核酸にコードされるＴＥＲＴタンパク質の翻訳を増加させ得るか、細胞型特異的もしくは細胞型非依存的な様式でリボ核酸自体の安定性を増加もしくは減少させ得るか、または、その両方を行い得る。いくつかの実施形態では、５’ＵＴＲ及び／または３’ＵＴＲは、非常に安定なｍＲＮＡ及び／または急速に翻訳されるｍＲＮＡを有する遺伝子に由来するもの、例えば、α－グロビンもしくはβ－グロビン、ｃ－ｆｏｓ、またはタバコエッチウイルス、である。いくつかの実施形態では、５’ＵＴＲ及び３’ＵＴＲは、異なる遺伝子に由来するか、または組成物が送達される種とは異なる種に由来する。ＵＴＲは、また、異なる遺伝子のｍＲＮＡからのＵＴＲの部分の集合体であってよく、その部分は、翻訳の安定性及び効率の特定の組み合わせを達成するように選択される。ＵＴＲは、細胞型特異的安定性または細胞型非依存的安定性などの特性をＲＮＡに与える設計された配列も含んでもよい。

【００７８】

本開示のリボ核酸は、ＲＮＡの翻訳、安定性、または免疫原性を調節する、１つ以上の修飾ヌクレオシドを含み、及び／またはヌクレオシドの１次配列を含んでもよい。真核細胞内のほとんどの成熟ＲＮＡ分子は、修飾バージョンの標準的な未修飾ＲＮＡヌクレオシド、アデニン、シチジン、グアノシン、及びウリジンであるヌクレオシドを含有する。例えば、成熟ＲＮＡの５’キャップは、修飾ヌクレオシドを含み、他の修飾ヌクレオシドは、多くの場合、ＲＮＡの他の場所に存在する。これらの修飾により、ＲＮＡが外来ＲＮＡとして認識されないようにし得る。特定のヌクレオシドを使用して作成された合成ＲＮＡ分子は、未修飾のＲＮＡよりも免疫原性がはるかに低くなる。免疫原性は、さらに合成ｍＲＮＡを精製することにより、例えば、高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）を使用することにより低減させることができる。修飾ヌクレオシドは、例えば、以下に列挙するヌクレオシドから選択され得る。ヌクレオシドは、いくつかの実施形態では、プソイドウリジン、１－メチルプソイドウリジン、２－チオウリジン、５－メトキシウリジン、また

は５－メチルシチジンである。１次配列は、免疫原性を増加または減少させる方法で修飾され得る。いくつかの状況に基づき、修飾ＲＮＡがある程度の免疫原性を保持していることが望ましいことがある。

【００７９】

従って、いくつかの実施形態では、本組成物のリボ核酸は、１－メチルプソイドウリジン、プソイドウリジン、５－メトキシウリジン（５－ｍｏＵ）、２－チオウリジン、５－メチルシチジン、または別の修飾ヌクレオシドを含む。真核細胞で見出される修飾ヌクレオシドには、以下が含まれる：ｍ１Ａ　１－メチルアデノシン、ｍ６Ａ　Ｎ６－メチルアデノシン、Ａｍ２’－Ｏ－メチルアデノシン、ｉ６Ａ　Ｎ６－イソペンテニルアデノシン、ｉｏ６Ａ　Ｎ６－（ｃｉｓ－ヒドロキシイソペンテニル）アデノシン、ｍｓ２ｉｏ６Ａ　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、ｇ６Ａ　Ｎ６－グリシニルカルバモイルアデノシン、ｔ６Ａ　Ｎ６－トレオニルカルバモイルアデノシン、ｍｓ２ｔ６Ａ　２－メチルチオ－Ｎ６－トレオニ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（リン酸）、ｍ６　２Ａ　Ｎ６，Ｎ６－ジメチルアデノシン、ｍ６Ａｍ　Ｎ６，２’－Ｏ－ジメチルアデノシン、ｍ６　２Ａｍ　Ｎ６，Ｎ６，２’－Ｏ－トリメチルアデノシン、ｍ１Ａｍ　１，２’－Ｏ－ジメチルアデノシン、ｍ３Ｃ　３－メチルシチジン、ｍ５Ｃ　５－メチルシチジン、Ｃｍ　２’－Ｏ－メチルシチジン、ａｃ４Ｃ　Ｎ４－アセチルシチジン、ｆ５Ｃ　５－ホルミルシチジン、ｍ４Ｃ　Ｎ４－メチルシチジン、ｈｍ５Ｃ　５－ヒドロキシメチルシチジン、ｆ５Ｃｍ　５－ホルミル－２’－Ｏ－メチルシチジン、ｍ１Ｇ　１－メチルグアノシン、ｍ２Ｇ　Ｎ２－メチルグアノシン、ｍ７Ｇ　７－メチルグアノシン、Ｇｍ　２’－Ｏ－メチルグアノシン、ｍ２　２Ｇ　Ｎ２，Ｎ２－ジメチルグアノシン、Ｇｒ（ｐ）２’－Ｏ－リボシルグアノシン（リン酸）、ｙＷウィブトシン、ｏ２ｙＷペルオキシウィブトシン、ＯｈｙＷヒドロキシウィブトシン、ＯｈｙＷ＊低修飾ヒドロキシウィブトシン、ｉｍＧウィオシン、ｍ２，７Ｇ　Ｎ２，７－ジメチルグアノシン、ｍ２，２，７Ｇ　Ｎ２，Ｎ２，７－トリメチルグアノシンＩイノシン、ｍ１Ｉ　１－メチルイノシン、Ｉｍ　２’－Ｏ－メチルイノシン、Ｑキューオシン、ｇａｌＱガラクトシル－キューオシン、ｍａｎＱマンノシル－キューオシン、Ψプソイドウリジン、Ｄジヒドロウリジン、ｍ５Ｕ　５－メチルウリジン、Ｕｍ　２’－Ｏ－メチルウリジン、ｍ５Ｕｍ　５，２’－Ｏ－ジメチルウリジン、ｍ１Ψ　１－メチルプソイドウリジン、Ψｍ２’－Ｏ－メチルプソイドウリジン、ｓ２Ｕ　２－チオウリジン、ｈｏ５Ｕ　５－ヒドロキシウリジン、ｃｈｍ５Ｕ　５－（カルボキシヒドロキシメチル）ウリジン、ｍｃｈｍ５Ｕ　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ｍｃｍ５Ｕ　５－メトキシカルボニルメチルウリジン、ｍｃｍ５Ｕｍ　５－メトキシカルボニルメチル－２’－Ｏ－メチルウリジン、ｍｃｍ５ｓ２Ｕ　５－メトキシカルボニルメチル－２－チオウリジン、ｎｃｍ５Ｕ　５－カルバモイルメチルウリジン、ｎｃｍ５Ｕｍ　５－カルバモイルメチル－２’－Ｏ－メチルウリジン、ｃｍｎｍ５Ｕ　５－カルボキシメチルアミノメチルウリジン、ｍ３Ｕ　３－メチルウリジン、ｍ１ａｃｐ３Ψ　１－メチル－３－（３－アミノ－３－カルボキシプロピル）プソイドウリジン、ｃｍ５Ｕ　５－カルボキシメチルウリジン、ｍ３Ｕｍ　３，２’－Ｏ－ジメチルウリジン、ｍ５Ｄ　５－メチルジヒドロウリジン、τｍ５Ｕ　５－タウリノメチルウリジン、τｍ５ｓ２Ｕ　５－タウリノメチル－２－チオウリジン、２－アミノアデノシン、２－アミノ－６－クロロプリンリボシド、８－アザアデノシン、６－クロロプリンリボシド、５－ヨードシチジン、５－ヨードウリジン、イノシン、２’－Ｏ－メチルイノシン、キサントシン、４－チオウリジン、Ｏ６－メチルグアノシン、５，６－ジヒドロウリジン、２－チオシチジン、６－アザシチジン、６－アザウリジン、２’－Ｏ－メチル－２－アミノアデノシン、２’－Ｏ－メチルプソイドウリジン、Ｎ１－メチルアデノシン、２’－Ｏ－メチル－５－メチルウリジン、７－デアザグアノシン、８－アジドアデノシン、５－ブロモシチジン、５－ブロモウリジン、７－デアザアデノシン、５－アミノアリルウリジン、５－アミノアリルリシチジン、８－オキソグアノシン、２－アミノプリン－リボシド、プソイドイソシチジン、Ｎ１－メチルプソイドウリジン、５，６－ジヒドロ－５－メチルウリジン、Ｎ６－メチル－２－

アミノアデノシン、５－カルボキシシチジン、５－ヒドロキシメチルウリジン、チエノグアノシン、５－ヒドロキシシチジン、５－ホルミルウリジン、５－カルボキシウリジン、５－メトキシウリジン、５－メトキシシチジン、チエノウリジン、５－カルボキシメチルエステルウリジン、チエノシチジン、８－オキソアデノオシン、イソグアノシン、Ｎ１－エチルプソイドウリジン、Ｎ１－メチル－２’－Ｏ－メチルプソイドウリジン、Ｎ１－メトキシメチルプソイドウリジン、Ｎ１－プロピルプソイドウリジン、２’－Ｏ－メチル－Ｎ６－メチルアデノシン、２－アミノ－６－Ｃｌ－プリン－２’－デオキシリボシド、２－アミノ－２’－デオキシアデノシン、２－アミノプリン－２’－デオキシリボシド、５－ブロモ－２’－デオキシシチジン、５－ブロモ－２’－デオキシウリジン、６－クロロプリン－２’－デオキシリボシド、７－デアザ－２’－デオキシアデノシン、７－デアザ－２’－デオキシグアノシン、２’－デオキシイノシン、５－プロピニル－２’－デオキシシチジン、５－プロピニル－２’－デオキシウリジン、５－フルオロ－２’－デオキシウリジン、５－ヨード－２’－デオキシシチジン、５－ヨード－２’－デオキシウリジン、Ｎ６－メチル－２’－デオキシアデノシン、５－メチル－２’－デオキシシチジン、Ｏ６－メチル－２’－デオキシグアノシン、Ｎ２－メチル－２’－デオキシグアノシン、８－オキソ－２’－デオキシアデノシン、８－オキソ－２’－デオキシグアノシン、２－チオチミジン、２’－デオキシ－Ｐ－ヌクレオシド、５－ヒドロキシ－２’－デオキシシチジン、４－チオチミジン、２－チオ－２’－デオキシシチジン、６－アザ－２’－デオキシウリジン、６－チオ－２’－デオキシグアノシン、８－クロロ－２’－デオキシアデノシン、５－アミノアリル－２’－デオキシシチジン、５－アミノアリル－２’－デオキシウリジン、Ｎ４－メチル－２’－デオキシシチジン、２’－デオキシゼブラリン、５－ヒドロキシメチル－２’－デオキシウリジン、５－ヒドロキシメチル－２’－デオキシシチジン、５－プロパルギルアミノ－２’－デオキシシチジン、５－プロパルギルアミノ－２’－デオキシウリジン、５－カルボキシ－２’－デオキシシチジン、５－ホルミル－２’－デオキシシチジン、５－［（３－インドリル）プロピオンアミド－Ｎ－アリル］－２’－デオキシウリジン、５－カルボキシ－２’－デオキシウリジン、５－ホルミル－２’－デオキシウリジン、７－デアザ－７－プロパルギルアミノ－２’－デオキシアデノシン、７－デアザ－７－プロパルギルアミノ－２’－デオキシグアノシン、ビオチン－１６－アミノアリル－２’－ｄＵＴＰ、ビオチン－１６－アミノアリル－２’－ｄＣＴＰ、ビオチン－１６－アミノアリルシチジン、Ｎ４－ビオチン－ＯＢＥＡ－２’－デオキシシチジン、ビオチン－１６－アミノアリルウリジン、ダブシル－５－３－アミノアリル－２’－ｄＵＴＰ、デスチオビオチン－６－アミノアリル－２’－デオキシシチジン、デスチオビオチン－１６－アミノアリル－ウリジン、ビオチン－１６－７－デアザ－７－プロパルギルアミノ－２’－デオキシグアノシン、シアニン３－５－プロパルギルアミノ－２’－デオキシシチジン、シアニン３－６－プロパルギルアミノ－２’－デオキシウリジン、シアニン５－６－プロパルギルアミノ－２’－デオキシシチジン、シアニン５－６－プロパルギルアミノ－２’－デオキシウリジン、シアニン３－アミノアリルシチジン、シアニン３－アミノアリルウリジン、シアニン５－アミノアリルシチジン、シアニン５－アミノアリルウリジン、シアニン７－アミノアリルウリジン、２’－フルオロ－２’－デオキシアデノシン、２’－フルオロ－２’－デオキシシチジン、２’－フルオロ－２’－デオキシグアノシン、２’－フルオロ－２’－デオキシウリジン、２’－Ｏ－メチルアデノシン、２’－Ｏ－メチルシチジン、２’－Ｏ－メチルグアノシン、２’－Ｏ－メチルウリジン、プロマイシン、２’－アミノ－２’－デオキシシチジン、２’－アミノ－２’－デオキシウリジン、２’－アジド－２’－デオキシシチジン、２’－アジド－２’－デオキシウリジン、アラシチジン、アラウリジン、２’－アジド－２’－デオキシアデノシン、２’－アミノ－２’－デオキシアデノシン、アラアデノシン、２’－フルオロ－チミジン、３’－Ｏ－メチルアデノシン、３’－Ｏ－メチルシチジン、３’－Ｏ－メチルグアノシン、３’－Ｏ－メチルウリジン、２’－アジド－２’－デオキシグアノシン、アラグアノシン、２’－デオキシウリジン、３’－Ｏ－（２－ニトロベンジル）－２’－デオキシアデノシン、３’－Ｏ－（２－ニトロベンジル）－２’－デオキシイノシン、３’－デオキシアデノシン、３’－デオキシグアノシン、３’－デオキシシチジン、３’－デオキシ

－５－メチルウリジン、３’－デオキシウリジン、２’，３’－ジデオキシアデノシン、２’，３’－ジデオキシグアノシン、２’，３’－ジデオキシウリジン、２’，３’－ジデオキシチミジン、２’，３’－ジデオキシシチジン、３’－アジド－２’，３’－ジデオキシアデノシン、３’－アジド－２’，３’－ジデオキシチミジン、３’－アミノ－２’，３’－ジデオキシアデノシン、３’－アミノ－２’，３’－ジデオキシシチジン、３’－アミノ－２’，３’－ジデオキシグアノシン、３’－アミノ－２’，３’－ジデオキシチミジン、３’－アジド－２’，３’－ジデオキシシチジン、３’－アジド－２’，３’－ジデオキシウリジン、５－ブロモ－２’，３’－ジデオキシウリジン、２’，３’－ジデオキシイノシン、２’－デオキシアデノシン－５’－Ｏ－（１－チオリン酸）、２’－デオキシシチジン－５’－Ｏ－（１－チオリン酸）、２’－デオキシグアノシン－５’－Ｏ－（１－チオリン酸）、２’－デオキシチミジン－５’－Ｏ－（１－チオリン酸）、アデノシン－５’－Ｏ－（１－チオリン酸）、シチジン－５’－Ｏ－（１－チオリン酸）、グアノシン－５’－Ｏ－（１－チオリン酸）、ウリジン－５’－Ｏ－（１－チオリン酸）、２’，３’－ジデオキシアデノシン－５’－Ｏ－（１－チオリン酸）、２’，３’－ジデオキシシチジン－５’－Ｏ－（１－チオリン酸）、２’，３’－ジデオキシグアノシン－５’－Ｏ－（１－チオリン酸）、３’－デオキシチミジン－５’－Ｏ－（１－チオリン酸）、３’－アジド－２’，３’－ジデオキシチミジン－５’－Ｏ－（１－チオリン酸）、２’，３’－ジデオキシウリジン－５’－Ｏ－（１－チオリン酸）、２’－デオキシアデノシン－５’－Ｏ－（１－ボラノリン酸）、２’－デオキシシチジン－５’－Ｏ－（１－ボラノリン酸）、２’－デオキシグアノシン－５’－Ｏ－（１－ボラノリン酸）、及び２’－デオキシチミジン－５’－Ｏ－（１－ボラノリン酸）。

【００８０】

理論に束縛されるものではないが、ＲＮＡの２次構造及び／またはＲＮＡ結合タンパク質またはマイクロＲＮＡへのＲＮＡの結合を変化させる修飾ヌクレオシド及び／またはヌクレオシドの配列の存在により、Ｔｏｌｌ様受容体及びＲＩＧ－１を含む様々な受容体により媒介される免疫応答の活性化をｍＲＮＡが回避可能になり得る。非免疫原性ｍＲＮＡは、局所送達を介してマウスの治療薬として使用されている。Ｋｏｒｍａｎｎ　ｅｔ　ａｌ．（２０１１）Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　２９：１５４－１５７。いくつかの実施形態では、リボ核酸は、上記のヌクレオシドのうちの２つ以上、または上記のヌクレオシドの組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、リボ核酸は、１－メチルプソイドウリジン、５－メトキシウリジン、またはプソイドウリジン及び５－メチルシチジンを含む。

【００８１】

いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡに対する免疫応答が望まれ得、ＲＮＡが、自然免疫の最適レベルを誘発するように修飾され得る。他の実施形態では、ｍＲＮＡに対する免疫応答が望ましくないことがあり、ＲＮＡが、そのような反応を最小限に抑えるように修飾され得る。ＲＮＡは、いずれの状況でも修飾することができる。

【００８２】

リボ核酸分子は、合成リボ核酸であり得る。本明細書で使用される「合成」という用語は、いくつかの実施形態では、例えば、以下に記載するように、ヒトの指示の下、分子生物学のツールを使用してリボ核酸が調製されることを意味し得る。合成リボ核酸は、例えば、細胞抽出物または精製酵素及び核酸鋳型を使用するｉｎ　ｖｉｔｒｏ合成で調製され得る。合成リボ核酸は、いくつかの実施形態では、部分的または完全に化学合成で調製され得る。あるいは、または、さらに、いくつかの実施形態では、合成リボ核酸は、細胞内での発現の操作、その後の、細胞の破壊及びリボ核酸の少なくとも部分的な精製により調製され得る。

【００８３】

本開示のリボ核酸は、当業者には理解されるように、様々な技術を使用して調製され得る。いくつかの実施形態では、リボ核酸は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ合成で調製され得る。いくつかの実施形態では、リボ核酸は、化学合成で調製され得る。いくつかの実施形態では、リボ核酸は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ合成及び化学合成の組み合わせで調製され得る。上述した

ように、「合成」という用語は、化学合成により、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ合成により、ｉｎ　ｖｉｖｏ発現及び少なくとも部分的精製により、またはそのようなもしくは他の化学もしくは分子生物学的方法の組み合わせにより、調製されるリボ核酸を含むと理解されるべきである。

【００８４】

いくつかの実施形態では、リボ核酸は、精製され得る。上で述べたように、精製は、リボ核酸の免疫原性を低減させ得、状況次第で有利であり得る。いくつかの実施形態では、リボ核酸は、ＨＰＬＣ、ＤＮＡｓｅ処理、プロテアーゼ処理、またはアフィニティーキャプチャー及び溶出のうちの１つ以上で精製される。

【００８５】

ＴＥＲＴのタンパク質構造には、少なくとも３つの異なるドメインが含まれ得る：保存されたドメイン及び構造化されていないリンカー領域を含有するアミノ末端の長い伸長部分（Ｎ末端伸長、ＮＴＥ）；７つの保存された逆転写酵素（ＲＴ）モチーフが含まれる１次配列の中央にある触媒逆転写酵素ドメイン；ならびにカルボキシル末端での短い伸長。いくつかの実施形態では、リボ核酸は、全長ＴＥＲＴをコードする。いくつかの実施形態では、リボ核酸は、ＴＥＲＴの触媒逆転写酵素ドメインをコードする。いくつかの実施形態では、リボ核酸は、ＴＥＲＴ活性を有するポリペプチドをコードする。ＴＥＲＴ活性は、テロメラーゼ反復増幅プロトコール（ＴＲＡＰ）を含む既知の方法を使用して測定され得る。

【００８６】

本開示のリボ核酸にコードされるＴＥＲＴは、哺乳動物、鳥類、爬虫類、または魚類ＴＥＲＴであり得る。いくつかの実施形態では、ＴＥＲＴは、ヒトＴＥＲＴなどの哺乳動物ＴＥＲＴである。Ｍｅｙｅｒｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．（１９９７）Ｃｅｌｌ　９０：７８５－７９５；Ｎａｋａｍｕｒａ　ｅｔ　ａｌ．（１９９７）Ｓｃｉｅｎｃｅ　２７７：９５５－９５９；Ｗｉｃｋ　ｅｔ　ａｌ．（１９９９）Ｇｅｎｅ　２３２：９７－１０６。

【００８７】

２つのヒトＴＥＲＴアイソフォームのアミノ酸配列は、ＮＣＢＩ参照配列：ＮＰ＿９３７９８３．２及びＮＰ＿００１１８０３０５．１として入手可能である。

【００８８】

ヒトＴＥＲＴアイソフォーム１のアミノ酸配列は、配列番号６（ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号ＮＰ＿９３７９８３．２にも記載）の配列を含んでも、それから構成されてもよい。

【００８９】

ヒトＴＥＲＴアイソフォーム１の核酸配列は、配列番号７（ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号ＮＭ＿１９８２５３．３にも記載）の配列を含んでも、それから構成されてもよい。

【００９０】

ヒトＴＥＲＴアイソフォーム２のアミノ酸配列は、配列番号８（ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号ＮＰ＿００１１８０３０５．１にも記載）の配列を含んでも、それから構成されてもよい。

【００９１】

ヒトＴＥＲＴアイソフォーム２のアミノ酸配列は、配列番号９（ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号ＮＭ＿００１１９３３７６．３にも記載）の配列を含んでも、それから構成されてもよい。

【００９２】

いくつかの実施形態では、ヒトＴＥＲＴ　ｍＲＮＡは、野生型ＴＥＲＴ配列を含んでもよい。いくつかの実施形態では、野生型ＴＥＲＴ配列は、配列番号３０の配列、または、それと少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、もしくは少なくとも９９％同一の核酸配列を含んでもよい。

【００９３】
いくつかの実施形態では、マウスＴＥＲＴ　ｍＲＮＡは、野生型ＴＥＲＴ配列を含んでもよい。いくつかの実施形態では、野生型ＴＥＲＴ配列は、配列番号３１、または、それと少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、もしくは少なくとも９９％同一の核酸配列を含んでもよい。
【００９４】
いくつかの実施形態では、ＴＥＲＴ　ｍＲＮＡは、配列番号１～５、７、９、または３０のいずれか１つと、少なくとも５０％、少なくとも５５％、少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％同一の核酸配列を含んでもよい。
【００９５】
いくつかの実施形態では、ＴＥＲＴ　ｍＲＮＡは、実質的なＴＥＲＴ活性を保持しながら、配列番号６または８と比較して、１つ以上のアミノ酸置換、欠失、及び／または挿入を含有する修飾ＴＥＲＴタンパク質をコードし得る。いくつかの実施形態では、ＴＥＲＴ　ｍＲＮＡは、配列番号６または配列番号８と、少なくとも５０％、少なくとも５５％、少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％と同一のアミノ酸配列をコードし得る。
【００９６】
他の実施形態では、ＴＥＲＴ　ｍＲＮＡは、配列番号６のアミノ酸配列に対して、Ｌ５５Ｑ、Ｐ６５Ａ、Ｖ７０Ｍ、Ａ２０２Ｔ、Ａ２７９Ｔ、Ｖ２９９Ｍ、Ｈ４１２Ｙ、残基４４１の欠失、Ｒ５２２Ｋ、Ｋ５７０Ｎ、Ｒ６３１Ｑ、Ｇ６８２Ｄ、Ｖ６９４Ｍ、Ｙ６９７Ｆ、Ｐ７０４Ｓ、Ｙ７０７Ｆ、Ａ７１６Ｔ、Ｐ７２１Ｒ、Ｔ７２６Ｍ、Ｙ７７２Ｃ、Ｐ７８５Ｌ、Ｖ７９１Ｉ、Ｒ８１１Ｃ、Ｌ８４１Ｆ、Ｒ８６５Ｈ、Ｖ８６７Ｍ、Ｒ９０１Ｗ、Ｋ９０２Ｎ、Ｐ９２３Ｌ、Ｓ９４８Ｒ、Ｒ９７９Ｗ、Ｖ１０２５Ｆ、Ａ１０６２Ｔ、Ｖ１０９０Ｍ、Ｔ１１１０Ｍ、及び／またはＦ１１２７Ｌの変異を有するアミノ酸配列をコードし得る。いくつかの実施形態では、ＴＥＲＴ　ｍＲＮＡは、翻訳されたタンパク質が配列番号６のアミノ酸配列に対して、アミノ酸残基７１１～７２２、７６４～８０７、８０８～１１３２、または８８５～９４７を欠くＴＥＲＴアイソフォームをコードし得る。いくつかの実施形態では、ドメインの前後の約１、約５、約１０、約２０、または約１００のアミノ酸も、配列番号６のアミノ酸配列から欠失される。
【００９７】
いくつかの実施形態では、ＴＥＲＴ　ｍＲＮＡは、タンパク質領域の１つ以上が、以下の配列番号６のアミノ酸配列に対して欠失または反復されているアミノ酸配列をコードし得る：ＲＮＡ相互作用ドメイン１に対応する残基１～２３０、「ＧＱ」残基モチーフに対応する残基５８～１９７、テロメアＤＮＡの特異性及びプライマー伸長と関連する残基１３７～１４１、無秩序領域に対応する残基２１０～３２０、リンカー配列と関連する残基２３１～３２４、オリゴマー化と関連する残基３０１～５３８、ＲＮＡ相互作用ドメインに対応する残基３２５～５５０もしくは４６０～５９４、「ＱＦＰ」残基モチーフに対応する残基３７６～５２１、「ＣＰ」残基モチーフに対応する残基３９７～４１７、ＤＮＡリピートテンプレートに対応する残基８２５～８８４、逆転写酵素様エレメントに対応する残基６１８～７２９、オリゴマー化と関連する残基９１４～９２８、プライマーグリップ配列と関連する残基９３０～９３４、及び／またはＣ末端に対応する残基９３６～１１３２。いくつかの実施形態では、ドメインの前後の約１、約５、約１０、約２０、または約１００のアミノ酸も、欠失または反復される。

【００９８】
いくつかの実施形態では、ＴＥＲＴ　ｍＲＮＡは、開示された核酸配列の任意の部分配列、例えば、開示された核酸配列の任意の１００塩基対（ｂｐ）、２００ｂｐ、３００ｂｐ、４００ｂｐ、５００ｂｐ以上と、少なくとも５０％、少なくとも５５％、少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％以上同一のヌクレオチド配列を含んでも、それから構成されてもよい。いくつかの実施形態では、ＴＥＲＴ　ｍＲＮＡは、開示されたポリペプチド配列、または開示されたポリペプチド配列の任意の部分配列、例えば、開示されたポリペプチド配列の任意の５０アミノ酸（ａａ）、１００ａａ、２００ａａ、３００ａａ、４００ａａ、５００ａａ以上のいずれか１つと、少なくとも５０％、少なくとも５５％、少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％以上同一のアミノ酸配列をコードし得る。
【００９９】
本開示の非限定的なＴＥＲＴ配列としては、表１に列挙されるＴＥＲＴ核酸配列及びアミノ酸配列が挙げられる。

【表１】

表１：非ヒトＴＥＲＴ配列

TERT 種	アミノ酸配列番号	アミノ酸配列	核酸の配列番号の例	核酸配列の例
ネコ		ASO67359.1		KX620456.1
イヌ		NP_001026800.1		NM_001031630.1
マウス		AAI27069.1		BC127068.1
マウス、アイソフォーム 1	10	NP_033380.1	14	NM_009354.2
マウス、アイソフォーム 2	11	NP_001349316.1	15	NM_001362387.1
マウス、アイソフォーム 3	12	NP_001349317.1	16	NM_001362388.1
マウス		EDL37055.1		EDL37055.1 の機械逆翻訳
ウシ		NP_001039707.1		NM_001046242.1
ヒツジ、アイソフォーム 1		XP_027835754.1		XM_027979953.1
ヒツジ、アイソフォーム 2		XP_027835755.1		XM_027979954.1
ブタ		NP_001231229.1		NM_001244300.1
アフリカゾウ		XP_023401395.1		XM_023545627.1
ニワトリ		NP_001026178.1		NM_001031007.1
ラット	13	NP_445875.1	17	NM_053423.1
ゼブラフィッシュ		NP_001077335.1		NM_001083866.1
ニホンメダカ		NP_001098286.1		NM_001104816.1
ウマ、アイソフォーム 1		XP_023481649.1		XM_023625881.1
ウマ、アイソフォーム 2		XP_023481650.1		XM_023625882.1
ウマ、アイソフォーム 3		XP_023481651.1		XM_023625883.1

【０１００】

本開示の組成物及び方法のいくつかの実施形態では、ＴＥＲＴのアミノ酸配列は、配列番号６～８もしくは１０～１３の配列、または、それと少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を含んでも、それらから構成されてもよい。本開示の組成物及び方法のいくつかの実施形態では、機能的または非機能的なＴＥＲＴのいくつかのアミノ酸配列は、配列番号６～８または１０～１３のうちの１つ以上の配列と、少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９７％、９９％の同一性を有する配列を含んでも、それから構成されてもよい。

【０１０１】
本開示の組成物及び方法のいくつかの実施形態では、ＴＥＲＴの核酸配列は、配列番号１～５、７、９、１４～１７、３０、もしくは３１の配列、または、それと少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％同一の核酸配列を含んでも、それらから構成されてもよい。
【０１０２】
非ヒト霊長類ＴＥＲＴアイソフォーム１のアミノ酸配列は、配列番号１８（ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号ＸＰ＿０１６８０８３９１．２にも記載）の配列を含んでも、それから構成されてもよい。
【０１０３】
非ヒト霊長類ＴＥＲＴアイソフォーム１の核酸配列は、配列番号１９（ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号ＸＭ＿０１６９５２９０２．２にも記載）の配列を含んでも、それから構成されてもよい。
【０１０４】
非ヒト霊長類ＴＥＲＴアイソフォーム２のアミノ酸配列は、配列番号２０（ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号ＰＮＩ２７６６２．１）の配列を含んでも、それから構成されてもよい。
【０１０５】
非ヒト霊長類ＴＥＲＴアイソフォーム２の核酸配列は、配列番号２１（ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号ＰＮＩ２７６６２．１の逆機械翻訳）の配列を含んでも、それから構成されてもよい。
【０１０６】
非ヒト霊長類ＴＥＲＴアイソフォーム３のアミノ酸配列は、配列番号２２（ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号ＰＮＩ２７６６３．１にも記載）の配列を含んでも、それから構成されてもよい。
【０１０７】
非ヒト霊長類ＴＥＲＴアイソフォーム３の核酸配列は、配列番号２３（ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号ＰＮＩ２７６６３．１の逆機械翻訳）の配列を含んでも、それから構成されてもよい。
【０１０８】
非ヒト霊長類ＴＥＲＴアイソフォーム４のアミノ酸配列は、配列番号２４（ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号ＰＮＩ２７６６４．１にも記載）の配列を含んでも、それから構成されてもよい。
【０１０９】
非ヒト霊長類ＴＥＲＴアイソフォーム４の核酸配列は、配列番号２５（ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号ＰＮＩ２７６６４．１の逆機械翻訳）の配列を含んでも、それから構成されてもよい。
【０１１０】
非ヒト霊長類ＴＥＲＴアイソフォーム５のアミノ酸配列は、配列番号２６（ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号ＰＮＩ２７６６５．１にも記載）の配列を含んでも、それから構成されてもよい。
【０１１１】
非ヒト霊長類ＴＥＲＴアイソフォーム５の核酸配列は、配列番号２７（ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号ＰＮＩ２７６６５．１の逆機械翻訳）の配列を含んでも、それから構成されてもよい。
【０１１２】
非ヒト霊長類ＴＥＲＴアイソフォーム６のアミノ酸配列は、配列番号２８（ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号ＰＮＩ２７６６６．１にも記載）の配列を含んでも、それから構成されてもよい。

【０１１３】
非ヒト霊長類ＴＥＲＴアイソフォーム６の核酸配列は、配列番号２９（ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号ＰＮＩ２７６６６．１の逆機械翻訳）の配列を含んでも、それから構成されてもよい。
【０１１４】
本開示の組成物及び方法のいくつかの実施形態では、ＴＥＲＴのアミノ酸配列は、配列番号６、８、１０～１３、１８、２０、２２、２４、２６、もしくは２８の配列、または、それと少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を含んでも、それらから構成されてもよい。
【０１１５】
本開示の組成物及び方法のいくつかの実施形態では、ＴＥＲＴの核酸配列は、配列番号１～５、７、９、１４～１７、１９、２１、２３、２５、２７、２９、３０、または３１の配列、それと少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％同一の配列を含んでも、それらから構成されてもよい。いくつかの実施形態では、本リボ核酸は、当業者には理解されるように、上記のＴＥＲＴタンパク質をコードする天然の遺伝子配列に対応し得るか、または、遺伝コードの冗長性により可能になるバリアントに対応し得る。いくつかの実施形態では、コドン選択は、当業者らに公知のアルゴリズム及び方法を使用して、タンパク質発現を最適化し、及び／または免疫原性を低減もしくは増大させるように最適化され得る。
【０１１６】
いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡ配列は、未修飾または修飾ｍＲＮＡとして合成され得る。ｍＲＮＡは、安定性を高め、及び／または免疫による検出及び分解を回避するように修飾され得る。修飾ｍＲＮＡには、例えば、ヌクレオチド修飾、ヌクレオシド修飾、主鎖修飾、糖修飾、及び／または塩基修飾のうちの１つ以上が含まれ得る。いくつかの実施形態では、修飾ヌクレオシドは、プソイドウリジンまたはプソイドウリジンアナログである。いくつかの実施形態では、プソイドウリジンアナログは、Ｎ－１－メチルプソイドウリジンである。いくつかの実施形態では、修飾ヌクレオシドは、５－メトキシウリジンである。いくつかの実施形態では、本明細書で使用される修飾ヌクレオシドは、表２に記載の部分のいずれかを含んでもよい。

【表２－１】

表２

一般名
プソイドウリジン
N-1-メチルプソイドウリジン
5-メトキシウリジン
1,2'-O-ジメチルアデノシン
1-メチル-3-(3-アミノ-3-カルボキシプロピル)プソイドウリジン
1-メチルアデノシン
1-メチルグアノシン
1-メチルイノシン
1-メチルプソイドウリジン
2,2-ジメチル-グアノシン
2',3'-ジデオキシアデノシン
2',3'-ジデオキシシチジン
2',3'-ジデオキシグアノシン
2',3'-ジデオキシイノシン
2',3'-ジデオキシヌクレオシド
2',3'-ジデオキシチミジン
2',3'-ジデオキシチミン
2',3'-ジデオキシウリジン
2,6-ジアミノプリン
2'-O-リボシルアデノシン(リン酸)
2'-アミノ-2'-デオキシアデノシン
2-アミノ-2'-デオキシアデノシン
2'-アミノ-2'-デオキシウリジン
2-アミノ-6-クロロプリンリボシド
2-アミノ-6-Cl-プリン-2'-デオキシリボシド
2-アミノアデノシン
2-アミノアデノシン
2-アミノプリン-2'-デオキシリボシド
2-アミノプリン-リボシド
2'-アジド-2'-デオキシアデノシン
2'-アジド-2'-デオキシシチジン
2'-アジド-2'-デオキシグアノシン
2'-アジド-2'-デオキシウリジン
2'-デオキシイノシン
2'-デオキシ-P-ヌクレオシド

【表２－２】

2'-デオキシウリジン
2'-デオキシゼブラリン
2'-フルオロ-2'-デオキシアデノシン
2'-フルオロ-2'-デオキシシチジン
2'-フルオロ-2'-デオキシグアノシン
2'-フルオロ-2'-デオキシウリジン
2'-フルオロ-チミジン
2-メチル-アデノシン
2-メチル-グアノシン
2-メチルチオ-N^6-(cis-ヒドロキシイソペンテニル)アデノシン
2-メチルチオ-N-6-イソペンテニル-アデノシン
2-メチルチオ-N^6-スレオニルカルバモイルアデノシン
2'-O-メチル-2-アミノアデノシン
2'-O-メチル-5-メチルウリジン
2'-O-メチルアデノシン
2'-O-メチルシチジン
2'-O-メチルグアノシン
2'-O-メチルイノシン
2'-O-メチル-N6-メチルアデノシン
2'-O-メチルプソイドウリジン
2'-O-メチルウリジン
2'-O-リボシルグアノシン(リン酸)
2-チオ-2'-デオキシシチジン
2-チオシチジン
2-チオチミジン
2-チオウリジン
3,2'-O-ジメチルウリジン
3'-アミノ-2',3'-ジデオキシアデノシン
3'-アミノ-2',3'-ジデオキシシチジン
3'-アミノ-2',3'-ジデオキシグアノシン
3'-アミノ-2',3'-ジデオキシチミジン
3'-アジド-2',3'-ジデオキシアデノシン
3'-アジド-2',3'-ジデオキシシチジン
3'-アジド-2',3'-ジデオキシチミジン
3'-アジド-2',3'-ジデオキシウリジン
3'-デオキシ-5-メチルウリジン
3'-デオキシアデノシン
3'-デオキシアデノシン(コルジセピン)

【表２－３】

3'-デオキシシチジン
3'-デオキシグアノシン
3'-デオキシチミン
3'-デオキシウリジン
3-メチルシチジン
3-メチルウリジン
3'-O-(2-ニトロベンジル)-2'-デオキシアデノシン
3'-O-(2-ニトロベンジル)-2'-デオキシイノシン
3'-O-メチルアデノシン
3'-O-メチルシチジン
3'-O-メチルグアノシン
3'-O-メチルウリジン
4-アセチル-シチジン
4-チオチミジン
4-チオウリジン
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
5-(カルボキシヒドロキシメチル)ウリジン
5,2'-O-ジメチルウリジン
5,6-ジヒドロ-5-メチルウリジン
5,6-ジヒドロウリジン
5-[(3-インドリル)プロピオンアミド-N-アリル]-2'-デオキシウリジン
5-アミノアリル-2'-デオキシシチジン
5-アミノアリル-2'-デオキシウリジン
5-アミノアリルシチジン
5-アミノアリルウリジン
5-ブロモ-2',3'-ジデオキシウリジン
5-ブロモ-2'-デオキシシチジン
5-ブロモ-2'-デオキシウリジン
5-ブロモシチジン
5-ブロモウリジン
5-カルバモイルメチル 1-2'-O-メチルウリジン
5-カルバモイルメチルウリジン
5-カルボキシ-2'-デオキシシチジン
5-カルボキシシチジン
5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン
5-カルボキシメチルアミノメチルウリジン
5-カルボキシメチルエステルウリジン
5-カルボキシメチルウリジン

【表２－４】

5-カルボキシウリジン
5-フルオロ-2'-デオキシウリジン
5-フルオロ-ウリジン
5-ホルミル-2'-デオキシシチジン
5-ホルミル-2'-デオキシウリジン
5-ホルミル-2'-O-メチルシチジン
5-ホルミルシチジン
5-ホルミルウリジン
5-ヒドロキシ-2'-デオキシシチジン
5-ヒドロキシシチジン
5-ヒドロキシメチル-2'-デオキシシチジン
5-ヒドロキシメチル-2'-デオキシウリジン
5-ヒドロキシメチルシチジン
5-ヒドロキシメチルウリジン
5-ヒドロキシウリジン
5-ヨード-2'-デオキシシチジン
5-ヨード-2'-デオキシウリジン
5-ヨードシチジン
5-ヨードウリジン
5-メトキシアミノメチル-2-チオ-ウリジン
5-メトキシカルボニルメチル 1-2'-O-メチルウリジン
5-メトキシカルボニルメチル-2-チオウリジン
5'-メトキシカルボニルメチル-ウリジン
5-メトキシカルボニルメチルウリジン
5-メトキシシチジン
5-メトキシウリジン
5-メトキシ-ウリジン
5-メチル-2'-デオキシシチジン
5-メチル-2-チオ-ウリジン
5-メチルアミノメチル-ウリジン
5-メチルシチジン
5-メチルジヒドロウリジン
5-メチルウリジン
5-プロパルギルアミノ-2'-デオキシシチジン
5-プロパルギルアミノ-2'-デオキシウリジン
5-プロピニル-2'-デオキシシチジン
5-タウリノメチル-2-チオウリジン
5-タウリノメチルウリジン

【表２－５】

6-アザ-2'-デオキシウリジン
6-アザシチジン
6-アザウリジン
6-クロロプリンリボシド
6-クロロプリン-2'-デオキシリボシド
6-O-メチルグアノシン
6-チオ-2'-デオキシグアノシン
7-デアザ-2'-デオキシアデノシン
7-デアザ-2'-デオキシグアノシン
7-デアザ-7-プロパルギルアミノ-2'-デオキシアデノシン
7-デアザ-7-プロパルギルアミノ-2'-デオキシグアノシン
7-デアザアデノシン
7-デアザグアノシン
7-メチルグアノシン
7-メチル-グアノシン
8-アザアデノシン
8-アジドアデノシン
8-クロロ-2'-デオキシアデノシン
8-オキソ-2'-デオキシアデノシン
8-オキソ-2'-デオキシグアノシン
8-オキソアデノオシン
8-オキソグアノシン
2'-デオキシヌクレオシド
ac4C N4-アセチルシチジン
Am 2'-O-メチルアデノシン
O-メチルヌクレオシド
Ar(p)2'-O-リボシルアデノシン(リン酸)
アラアデノシン
アラシチジン
アラグアノシン
アラウリジン
ベンゾイミダゾールリボシド
ベータ-D-マンノシル-キュエオシン
ビオチン-16-7-デアザ-7-プロパルギルアミノ-2'-デオキシグアノシン
ビオチン-16-アミノアリル-2'-dCTP
ビオチン-16-アミノアリル-2'-dUTP
ビオチン-16-アミノアリルシチジン
ビオチン-16-アミノアリルウリジン

【表２－６】

chm5U 5-(カルボキシヒドロキシメチル)ウリジン
2'-O-メチルシチジン
5-カルボキシメチルウリジン
5-カルボキシメチルアミノメチルウリジン
シアニン 3-5-プロパルギルアミノ-2'-デオキシシチジン
シアニン 3-6-プロパルギルアミノ-2'-デオキシウリジン
シアニン 3-アミノアリルシチジン
シアニン 3-アミノアリルウリジン
シアニン 5-6-プロパルギルアミノ-2'-デオキシシチジン
シアニン 5-6-プロパルギルアミノ-2'-デオキシウリジン
シアニン 5-アミノアリルシチジン
シアニン 5-アミノアリルウリジン
シアニン 7-アミノアリルウリジン
ジヒドロウリジン
ダブシル-5-3-アミノアリル-2'-dUTP
デスチオビオチン-16-アミノアリル-ウリジン
デスチオビオチン-6-アミノアリル-2'-デオキシシチジン
ジヒドロウリジン
5-ホルミルシチジン
5-ホルミル-2'-O-メチルシチジン
N6-グリシニルカルバモイルアデノシン
ガラクトシル-キューオシン
2'-O-メチルグアノシン
2'-O-リボシルグアノシン(リン酸)
5-ヒドロキシメチルシチジン
5-ヒドロキシウリジン
ヒドロキシウィブトシン
N6-イソペンテニルアデノシン
2'-O-メチルイノシン
ウィオシン
イノシン
N6-(cis-ヒドロキシイソペンテニル)アデノシン
イソグアノシン
1-メチルグアノシン
1-メチルアデノシン
1-メチル-3-(3-アミノ-3-カルボキシプロピル)プソイドウリジン
1,2'-O-ジメチルアデノシン
1-メチルグアノシン

【表２－７】

1-メチルイノシン
1-メチルプソイドウリジン
N2,N2-ジメチルグアノシン
N2,N2,7-トリメチルグアノシンIイノシン
N2,7-ジメチルグアノシン
N2-メチルグアノシン
3-メチルシチジン
3-メチルウリジン
3,2'-O-ジメチルウリジン
N4-メチルシチジン
5-メチルシチジン
5-メチルジヒドロウリジン
5-メチルウリジン
5,2'-O-ジメチルウリジン
N6,N6-ジメチルアデノシン
N6,N6,2'-O-トリメチルアデノシン
N6-メチルアデノシン
N6,2'-O-ジメチルアデノシン
7-メチルグアノシン
マンノシル-キューオシン
5-(カルボキシヒドロキシメチル)ウリジン
5-メトキシカルボニルメチル-2-チオウリジン
5-メトキシカルボニルメチル-2'-O-メチルウリジン
5-メトキシカルボニルメチルウリジン
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
2-メチルチオ-N6-トレオニルカルバモイルアデノシン
N1-エチルプソイドウリジン
N1-メトキシメチルプソイドウリジン
N1-メチル-2'-O-メチルプソイドウリジン
N1-メチルアデノシン
N1-プロピルプソイドウリジン
N^2,7-ジメチルグアノシン
N^2,N^2,7-トリメチルグアノシン
N^2,N^2-ジメチルグアノシン
N2-メチル-2'-デオキシグアノシン
N^2-メチルグアノシン
N^4-アセチルシチジン
N4-ビオチン-OBEA-2'-デオキシシチジン

【表２－８】

N4-メチル-2'-デオキシシチジン
N^4-メチルシチジン
N^6-(cis-ヒドロキシイソペンテニル)-アデノシン
N^6,2'-O-ジメチルアデノシン
N^6,N^6,2'-O-トリメチルアデノシン
N^6,N^6-ジメチルアデノシン
N^6-グリシニルカルバモイルアデノシン
N^6-イソペンテニルアデノシン
N6-イソペンテニル-アデノシン
N6-メチル-2-アミノアデノシン
N6-メチル-2'-デオキシアデノシン
N^6-メチルアデノシン
N6-メチル-アデノシン
N^6-スレオニルカルバモイルアデノシン
ncm5U 5-カルバモイルメチルウリジン
ncm5Um 5-カルバモイルメチル-2'-O-メチルウリジン
N1-メチルアデノシン
N-ウリジン-5-オキシ酢酸メチルエステル
ペルオキシウィブトシン
O6-メチル-2'-デオキシグアノシン
O6-メチルグアノシン
ヒドロキシウィブトシン
修飾が不十分なヒドロキシウィブトシン
O-メチルプソイドウリジン
ペルオキシウィブトシン
プソイドイソシチジン
プロマイシン
キュエオシン
2-チオウリジン
N6-スレオニルカルバモイルアデノシン
チエノシチジン
チエノグアノシン
チエノウリジン
2'-O-メチルウリジン
修飾が不十分なヒドロキシウィブトシン
ウリジン-5-オキシ酢酸(v)
ウリジン-5-オキシ酢酸メチルエステル
ウィブトシン

【表２－９】

ウィブトキソシン
ウィオシン
キサントシン
5-タウリノメチル-2-チオウリジン
5-タウリノメチルウリジン
2'-O-メチルプソイドウリジン

【０１１７】
いくつかの実施形態では、ＲＮＡ、例えば、ｍＲＮＡは、天然に存在する塩基及び／または塩基アナログ（修飾塩基）から合成され得、これらには、プリン（アデニン（Ａ）、グアニン（Ｇ））またはピリミジン（チミン（Ｔ）、シトシン（Ｃ）、ウラシル（Ｕ））、ならびに、そのアナログ及び誘導体、例えば、１－メチル－アデニン、２－メチル－アデニン、２－メチルチオ－Ｎ－６－イソペンテニル－アデニン、Ｎ６－メチル－アデニン、Ｎ６－イソペンテニル－アデニン、２－チオ－シトシン、３－メチル－シトシン、４－アセチル－シトシン、５－メチル－シトシン、２，６－ジアミノプリン、１－メチル－グアニン、２－メチル－グアニン、２，２－ジメチル－グアニン、７－メチル－グアニン、イノシン、１－メチル－イノシン、プソイドウラシル（５－ウラシル）、プソイドウリジン、Ｎ－１－メチル－プソイドウリジン、ジヒドロ－ウラシル、２－チオ－ウラシル、４－チオ－ウラシル、５－カルボキシメチルアミノメチル－２－チオ－ウラシル、５－（カルボキシヒドロキシメチル）－ウラシル、５－フルオロ－ウラシル、５－ブロモ－ウラシル、５－カルボキシメチルアミノメチル－ウラシル、５－メチル－２－チオ－ウラシル、５－メチル－ウラシル、Ｎ－ウラシル－５－オキシ酢酸メチルエステル、５－メチルアミノメチル－ウラシル、５－メトキシアミノメチル－２－チオ－ウラシル、５’－メトキシカルボニルメチル－ウラシル、５－メトキシ－ウラシル、ウラシル－５－オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル－５－オキシ酢酸（ｖ）、１－メチル－プソイドウラシル、キュエオシン、ベータ－Ｄ－マンノシル－キュエオシン、ウィブトキソシン（ｗｙｂｕｔｏｘｏｓｉｎｅ）、及びホスホルアミダート、ホスホロチオアート、ペプチドヌクレオチド、メチルホスホナート、７－デアザグアノシン、５－メチルシトシン、ならびにイノシンが含まれるが、これらに限定されない。

【０１１８】
いくつかの実施形態では、ＲＮＡ、例えば、ｍＲＮＡは、天然に存在するヌクレオシド及び／またはヌクレオシドアナログ（修飾ヌクレオシド）から合成され得、これらには、アデノシン（Ａ）、グアノシン（Ｇ）、またはピリミジン（チミン（Ｔ）、シチジン（Ｃ）、ウリジン（Ｕ））を含むヌクレオシド、ならびに、そのアナログ及び誘導体を含むヌクレオシド、例えば、３’－デオキシアデノシン（コルジセピン）、３’－デオキシウリジン、３’－デオキシシトシン、３’－デオキシグアノシン、３’－デオキシチミン、２’，３’－ジデオキシヌクレオシド、２’，３’－ジデオキシアデノシン、２’，３’－ジデオキシウリジン、２’，３’－ジデオキシシトシン、２’，３’－ジデオキシグアノシン、２’，３’－ジデオキシチミン、２’－デオキシヌクレオシド、－Ｏ－メチルヌクレオシド、１－メチル－アデニン、２－メチル－アデニン、２－メチルチオ－Ｎ－６－イソペンテニル－アデニン、Ｎ６－メチル－アデニン、Ｎ６－イソペンテニル－アデニン、２－チオ－シトシン、３－メチル－シトシン、４－アセチル－シトシン、５－メチル－シトシン、２，６－ジアミノプリン、１－メチル－グアニン、２－メチル－グアニン、２，２－ジメチル－グアニン、７－メチル－グアニン、イノシン、１－メチル－イノシン、プソイドウリジン、Ｎ－１－メチル－プソイドウリジン、ジヒドロ－ウラシル、２－チオ－ウラシル、４－チオ－ウリジン、５－カルボキシメチルアミノメチル－２－チオウリジン、５－（カルボキシヒドロキシメチル）－ウリジン、５－フルオロウリジン、５－ブロモ－ウリジン、５－カ

ルボキシメチルアミノメチル－ウリジン、５－メチル－２－チオウリジン、５－メチル－ウリジン、Ｎ－ウリジン－５－オキシ酢酸メチルエステル、５－メチルアミノメチル－ウリジン、５－メトキシアミノメチル－２－チオウリジン、５’－メトキシカルボニルメチル－ウラシル、５－メトキシ－ウラシル、ウラシル－５－オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル－５－オキシ酢酸（ｖ）、１－メチル－プソイドウリジン、キュエオシン、ベータ－Ｄ－マンノシル－キュエオシン、ウィブトキソシン、７－デアザグアノシン、５－メチルシトシン、及びイノシンが含まれるが、これらに限定されない。

【０１１９】

そのような塩基、ヌクレオシド、ヌクレオチド、ならびに主鎖のアナログ、修飾、及び誘導体の調製は、例えば、米国特許第４，３７３，０７１号、米国特許第４，４０１，７９６号、米国特許第４，４１５，７３２号、米国特許第４，４５８，０６６号、米国特許第４，５００，７０７号、米国特許第４，６６８，７７７号、米国特許第４，９７３，６７９号、米国特許第５，０４７，５２４号、米国特許第５，１３２，４１８号、米国特許第５，１５３，３１９号、米国特許第５，２６２，５３０号、及び同第５，７００，６４２号により、当業者らに既知であり、これらの全ては、全体が参照により組み込まれる。

【０１２０】

いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡのウラシルヌクレオシドは、約８０％、約９０％、９５％、９９％、または１００％枯渇し、ウラシルヌクレオシドアナログ、例えば、プソイドウリジン、５－メトキシウリジン、またはＮ－１－メチル－プソイドウリジンで置換されている。

【０１２１】

いくつかの実施形態では、ＲＮＡは、ＲＮＡ主鎖修飾を含有してもよい。通常、主鎖修飾は、ＲＮＡに含有されるヌクレオチドの主鎖のリン酸が化学的に修飾される修飾である。例示的な主鎖修飾としては、ホスホジエステル結合が、ペプチド、メチルホスホナート、メチルホスホルアミダート、ホスホルアミダート、ホスホロチオアート（例えば、シチジン５’－Ｏ－（１－チオリン酸））、ボラノリン酸、及び／または正荷電グアニジウム基からなる群のメンバーで置換される修飾、またはホスホジエステル結合を置換する他の手段が挙げられ得るが、これらに限定されない。

【０１２２】

いくつかの実施形態では、ＲＮＡは、糖修飾を含有してもよい。糖修飾には、２’Ｏ－メチル糖修飾、２’フルオロ糖修飾（例えば、２’－フルオロリボース）、３’アミノ糖修飾、２’チオ糖修飾、２’－Ｏ－アルキル糖修飾、５－メチルチオリボース、及び２’－デオキシ－２’－フルオロ－リボヌクレオチドの糖修飾（２’－フルオロ－２’－デオキシシチジン、２’－フルオロ－２’－デオキシウリジン）、２’－デオキシ－２’－デアミンリボヌクレオチド（２’－アミノ－２’－デオキシシチジン、２，－アミノ－２’－デオキシウリジン）、２’－Ｏ－アルキルリボヌクレオチド、２’－デオキシ－２’－Ｃ－アルキルリボヌクレオチド（２’－Ｏ－メチルシチジン、２’－メチルウリジン）、２’－Ｃ－アルキルリボヌクレオチド、及びその異性体（２’－アラシチジン、２’－アラウリジン）、またはアジドリン酸（２’－アジド－２’－デオキシシチジン、２’－アジド－２’－デオキシウリジンが含まれ得るが、これらに限定されない。

【０１２３】

いくつかの実施形態では、ＲＮＡは、本明細書に開示のヌクレオシド及びヌクレオチドのいずれか、または以下のヌクレオシド三リン酸のいずれかを含むヌクレオチド三リン酸のうちの１つ以上から合成され得る：２’－デオキシアデノシン－５’－Ｏ－（１－チオ三リン酸）、２’－デオキシシチジン－５’－Ｏ－（１－チオ三リン酸）、２’－デオキシグアノシン－５’－Ｏ－（１－チオ三リン酸）、２’－デオキシチミジン－５’－Ｏ－（１－チオ三リン酸）、アデノシン－５’－Ｏ－（１－チオ三リン酸）、シチジン－５’－Ｏ－（１－チオ三リン酸）、グアノシン－５’－Ｏ－（１－チオ三リン酸）、ウリジン－５’－Ｏ－（１－チオ三リン酸）、２’，３’－ジデオキシアデノシン－５’－Ｏ－（１－チオ三リン酸）、２’，３’－ジデオキシシチジン－５’－Ｏ－（１－チオ三リン酸）、２’，３’－ジ

デオキシグアノシン－５’－Ｏ－（１－チオ三リン酸）、３’－デオキシチミジン－５’－Ｏ－（１－チオ三リン酸）、３’－アジド－２’、３’－ジデオキシチミジン－５’－Ｏ－（１－チオ三リン酸）、２’、３’－ジデオキシウリジン－５’－Ｏ－（１－チオ三リン酸）、２’－デオキシアデノシン－５’－Ｏ－（１－ボラノ三リン酸）、２’－デオキシシチジン－５’－Ｏ－（１－ボラノ三リン酸）、２’－デオキシグアノシン－５’－Ｏ－（１－ボラノ三リン酸）、及び２’－デオキシチミジン－５’－Ｏ－（１－ボラノ三リン酸）。

【０１２４】

いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡには、Ｎ末端（５’）末端の「キャップ」、及びＣ末端（３’）末端の「テール」の付加が含まれ得る。キャップの存在により、真核細胞に見出されるヌクレアーゼに対する耐性がもたらされ得る。「テール」の存在は、ｍＲＮＡをエキソヌクレアーゼ分解から保護し得る。

【０１２５】

キャップ構造

いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡには、５’キャップ構造が含まれ得る。５’キャップは、例えば、三リン酸結合、及び７－窒素がメチル化されるグアニンヌクレオチドを含んでもよい。キャップ構造の例としては、ｍ７Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）Ａ、Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）Ａ、及びＧ（５’）ｐｐｐ（５’）Ｇが含まれるが、これらに限定されない。天然に存在するキャップ構造は、最初に転写ヌクレオチドの５’末端に三リン酸架橋を介して結合している７－メチルグアノシンを含み、これにより、ｍ７Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）Ｎ（式中、Ｎは、任意のヌクレオシドである）のジヌクレオチドキャップがもたらされる。ｉｎ　ｖｉｖｏでは、キャップは、転写開始直後に酵素グアニリルトランスフェラーゼにより核内で付加される。

【０１２６】

いくつかの実施形態では、５’キャップは、ｍ７（３’ＯｍｅＧ）（５’）ｐｐｐ（５’）（２’ＯｍｅＡ）ｐＧまたは（ＣｌｅａｎＣａｐ（商標）３’ＯＭｅ）構造を含んでもよい。いくつかの実施形態では、５’キャップは、ｍ７Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）Ｇを含んでもよい。いくつかの実施形態では、アンチリバースキャップアナログ（「ＡＲＣＡ」）または修飾ＡＲＣＡは、２’または３’ＯＨ基が－ＯＣＨ３で置換される５’キャップである。いくつかの実施形態では、ＡＲＣＡは、３’－Ｏ－Ｍｅ－ｍ７Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）Ｇ構造を含む。いくつかの実施形態では、５’キャップは、ｍ７Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）（２’ＯｍｅＡ）ｐＧを含む。追加のｍＲＮＡキャップには、ｍ７ＧｐｐｐＧ、ｍ７ＧｐｐｐＡ、ｍ７ＧｐｐｐＣからなる群より選択される化学構造；メチル化されていないキャップ（例えば、ＧｐｐｐＧ）；メチル化キャップ（例えば、ｍ２’７ＧｐｐｐＧ）、トリメチル化キャップアナログ、またはアンチリバースキャップアナログ（例えば、ＡＲＣＡ；ｍ７，２’０ｍｅＧｐｐｐＧ、ｍ７２’ｄＧｐｐｐＧ、ｍ７’３’０ｍｅＧｐｐｐＧ、ｍ７，３ｄＧｐｐｐＧ、及びそれらの四リン酸誘導体）が含まれ得るが、これらに限定されない（例えば、以下を参照のこと、Ｊｅｍｉｅｌｉｔｙ，Ｊ．ｅｔ　ａｌ，‘Ｗｏｖｅ　ａｎｔｉ－ｒｅｖｅｒｓｅ　ｃａｐ　ａｎａｌｏｇｓ　ｗｉｔｈ　ｓｕｐｅｒｉｏｒ　ｔｒａｎｓｌａｔｉｏｎａｌ　ｐｒｏｐｅｒｔｉｅｓ”，ＲＮＡ，９：１１０８－１１２２（２００３））。

【０１２７】

いくつかの実施形態では、好適なキャップは、三リン酸架橋を介して最初に転写されたヌクレオチドの５’末端に連結された７－メチルグアニル酸（「ｍ７Ｇ」）であり、それにより、ｍ７Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）Ｎ（式中、Ｎは、任意のヌクレオシドである）がもたらされる。本開示の実施形態で利用されるｍ７Ｇキャップの実施形態は、ｍ７Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）Ｇである。いくつかの実施形態では、キャップは、Ｃａｐ０構造である。Ｃａｐ０構造は、塩基１及び２に結合しているリボースの２’－Ｏ－メチル残基を欠いている。いくつかの実施形態では、キャップは、Ｃａｐ１構造である。Ｃａｐ１構造は、塩基２に２’－Ｏ－メチル残基を有する。いくつかの実施形態では、キャップは、Ｃａｐ２構造である。Ｃａｐ２構造は、塩基２及び３の両方に結合している２’－Ｏ－メチル残

基を有する。
【０１２８】
様々なｍ７Ｇキャップアナログが当該技術分野で既知であり、この多くは、市販されている。これらには、上記のｍ７　ＧｐｐｐＧ、ならびにＡＲＣＡ３’－ＯＣＨ３及び２’－ＯＣＨ３キャップアナログが含まれる（Ｊｅｍｉｅｌｉｔｙ，Ｊ．ｅｔ　ａｌ．，ＲＮＡ，９：１１０８－１１２２（２００３））。本開示の実施形態で使用される追加のキャップアナログとしては、Ｎ７－ベンジル化ジヌクレオシド四リン酸アナログ（Ｇｒｕｄｚｉｅｎ，Ｅ．ｅｔ　ａｔ，ＲＮＡ，１０：１４７９－１４８７（２００４）に記載）、ホスホロチオアートキャップアナログ（Ｇｒｕｄｚｉｅｎ－Ｎｏｇａｌｓｋａ，Ｅ．，ｅｔ　ａｌ，ＲＮＡ，１３：１７４５－１７５５（２００７）に記載）、ならびに米国特許第８，０９３，３６７号及び同第８，３０４，５２９号（参照により本明細書に組み込まれる）に記載のキャップアナログ（ビオチン化キャップアナログを含む）が含まれる。
【０１２９】
いくつかの実施形態では、５’キャップは、イノシン、Ｎ１－メチル－グアノシン、２’フルオロ－グアノシン、７－デアザ－グアノシン、ｍ７（３’ＯｍｅＧ）（５’）ｐｐｐ（５’）（２’ＯｍｅＡ）ｐＧ、ＣｌｅａｎＣａｐ（商標）、ｍ７（３’ＯｍｅＧ）（５’）ｐｐｐ（５’）（２’ＯｍｅＡ）ｐＧ、８－オキソ－グアノシン、２－アミノ－グアノシン、ＬＮＡ－グアノシン、２－アジド－グアノシン、Ｃａｐ２、Ｃａｐ４、ＣＡＰ－００３、またはＣＡＰ－２２５である。
【０１３０】
いくつかの実施形態では、５’キャップは、内部リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ）を含むか、または、それから構成される。いくつかの実施形態では、ＩＲＥＳは、５’ＵＴＲ内にある。いくつかの実施形態では、５’キャップは、２Ａ自己切断ペプチド、例えば、Ｐ２Ａ、Ｔ２Ａ、Ｅ２Ａ、及びＦ２Ａのうちの１つ以上、を含むか、または、それから構成される。
【０１３１】
テールの構造
「テール」の存在は、ｍＲＮＡをエキソヌクレアーゼ分解から保護するのに役立ち得る。ポリＡテールは、天然メッセンジャー及び合成センスＲＮＡを安定化すると考えられている。従って、特定の実施形態では、長いポリＡテールを、ｍＲＮＡ分子に付加して、それにより、ＲＮＡをより安定にすることができる。ポリＡテールは、当該技術分野で認められている様々な技術を使用して追加することができる。例えば、ポリＡポリメラーゼを使用して、長いポリＡテールを、合成またはｉｎ　ｖｉｔｒｏ転写ＲＮＡに付加することができる（Ｙｏｋｏｅ，ｅｔ　ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ．１９９６；１４：１２５２－１２５６）。転写ベクターは、長いポリＡテールをコードすることもできる。さらに、ポリＡテールを、ＰＣＲ産物から直接転写により付加することができる。ポリＡは、また、ＲＮＡリガーゼを用いてセンスＲＮＡの３’末端に連結され得る（例えば、以下を参照のこと、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ　Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ，２ｎｄ　Ｅｄ．，ｅｄ．Ｂｙ　Ｓａｍｂｒｏｏｋ，Ｆｒｉｔｓｃｈ　ａｎｄ　Ｍａｎｉａｔｉｓ（Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｐｒｅｓｓ：１９９１　ｅｄｉｔｉｏｎ））。
【０１３２】
いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡには、３’ポリ（Ａ）テール構造が含まれ得る。ポリＡテールの長さは、少なくとも約１０、５０、１００、２００、３００、４００、または少なくとも約５００ヌクレオチドであってよい。いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡの３’末端のポリＡテールは、約１０～３００のアデノシンヌクレオチド（例えば、約１０～２００のアデノシンヌクレオチド、約１０～１５０のアデノシンヌクレオチド、約１０～１００のアデノシンヌクレオチド、約２０～７０のアデノシンヌクレオチド、または約２０～６０のアデノシンヌクレオチド）が含まれ得る。いくつかの実施形態では、ポリＡテールは、１２０のアデノシンヌクレオチドである。

【０１３３】
いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡには、３’ポリＣテール構造が含まれ得る。ｍＲＮＡの３’末端のポリＣテールには、約１０～２００のシトシンヌクレオチド（例えば、約１０～１５０のシトシンヌクレオチド、約１０～１００のシトシンヌクレオチド、約２０～７０のシトシンヌクレオチド、約２０～６０のシトシンヌクレオチド、または約１０～４０のシトシンヌクレオチド）が含まれ得る。ポリＣテールは、ポリＡテールに付加されても、ポリＡテールを置換してもよい。いくつかの実施形態では、ポリＡテールまたはポリＣテールの長さは、修飾センスｍＲＮＡの安定性に関連し、従って、タンパク質の転写に関連する。例えば、ポリＡテールの長さがセンスｍＲＮＡ分子の半減期に影響を与え得るので、ポリＡテールの長さは、ヌクレアーゼに対するｍＲＮＡの耐性レベルを変更し、それにより、ポリヌクレオチド発現及び／またはポリペプチド生成の時間経過にわたるより多くの制御がもたらされるように調整され得る。

【０１３４】
５’及び３’非翻訳領域（ＵＴＲ）
いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡには、５’非翻訳領域（ＵＴＲ）及び／または３’ＵＴＲが含まれ得る。いくつかの実施形態では、５’ＵＴＲには、ｍＲＮＡの安定性または翻訳に影響を与える１つ以上の要素が含まれ得る。いくつかの実施形態では、例えば、５’ＵＴＲには、鉄応答性要素が含まれ得る。いくつかの実施形態では、５’ＵＴＲには、約５０～約１００、または約５０～約５００ヌクレオチド長であってもよい。いくつかの実施形態では、３’ＵＴＲには、ポリＡシグナル、ｍＲＮＡの安定性もしくは局在化に影響を及ぼし得るタンパク質の結合部位、またはｍｉＲＮＡの１つ以上の結合部位のうちの１つ以上が含まれる。いくつかの実施形態では、３’ＵＴＲは、約０～約５０ヌクレオチド長、または約５０～約１００ヌクレオチド長であってよい。

【０１３５】
例示的な３’及び５’ＵＴＲ配列は、センスｍＲＮＡ分子の安定性を高めるために、比較的長い半減期を有するｍＲＮＡ（例えば、グロビン、アクチン、ＧＡＰＤＨ、チューブリン、ヒストン、またはクエン酸サイクル酵素）に由来し得る。例えば、５’ＵＴＲ配列は、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）最初期１（ＩＥ１）遺伝子の部分配列、またはそのフラグメントを含み、それにより、ヌクレアーゼ耐性が改善され、及び／または、ポリヌクレオチドの半減期が改善される得る。一般に、これらの修飾は、未修飾の対応物と比較して、ポリヌクレオチドの安定性及び／または薬物動態特性（例えば、半減期）を改善し、例えば、ｉｎ　ｖｉｖｏのヌクレアーゼ消化に対するそのようなポリヌクレオチドの耐性を改善するためになされた修飾を含む。

【０１３６】
いくつかの実施形態では、ＵＴＲは、例えば、肺における、組織特異的発現を改善し得る。いくつかの実施形態では、３’ＵＴＲは、マウスαグロビン３’ＵＴＲである。いくつかの実施形態では、３’ＵＴＲは、配列番号３２の配列、または、それと少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％同一の核酸配列を含む。

【０１３７】
いくつかの実施形態では、３’ＵＴＲは、野生型ヒトβグロビン３’ＵＴＲである。いくつかの実施形態では、３’ＵＴＲは、配列番号３３の配列、または、それと少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％同一の核酸を含む。

【０１３８】
いくつかの実施形態では、３’ＵＴＲは、バリアントヒトβグロビン３’ＵＴＲである。いくつかの実施形態では、３’ＵＴＲは、配列番号３４の配列、または、それと少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％

、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％同一の核酸配列を含む。

【０１３９】

いくつかの実施形態では、５’ＵＴＲは、合成５’ＵＴＲである。いくつかの実施形態では、５’ＵＴＲは、配列番号３５の配列、または、それと少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％同一の核酸を含む。

【０１４０】

いくつかの実施形態では、５’ＵＴＲは、ヒトβグロビン５’ＵＴＲである。いくつかの実施形態では、５’ＵＴＲは、配列番号３６の配列、または、それと少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％同一の核酸を含む。

【０１４１】

いくつかの実施形態では、ＵＴＲは、ＰＣＴ出願第ＷＯ２０１７０５３２９７Ａ１号及び特許第ＵＳ１０５１９１８９Ｂ２号のいずれかに記載されているもののいずれか、またはその機能的変形であり得、これらの両方は、全体が本明細書に組み込まれる。

【０１４２】

例示的な治療的ＴＥＲＴ　ｍＲＮＡ配列

いくつかの実施形態では、ＴＥＲＴ　ｍＲＮＡは、組織、例えば、肺に送達される、全長ｍＲＮＡ配列、すなわち、コーディング及びノンコーディングのもの、を指し得る。配列の例としては、配列番号３７及び３８のマウスＴＥＲＴを含む配列、ならびに配列番号３９及び４０のヒトＴＥＲＴを含む配列が挙げられる。

【０１４３】

いくつかの実施形態では、マウスＴＥＲＴ　ｍＲＮＡは、配列番号３７の配列、または、それと少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％同一の核酸配列を含む。

【０１４４】

いくつかの実施形態では、マウスＴＥＲＴ　ｍＲＮＡは、配列番号３８の配列、または、それと少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％同一の核酸配列を含む。

【０１４５】

いくつかの実施形態では、ヒトＴＥＲＴ　ｍＲＮＡは、配列番号３９の配列、または、それと少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％同一の核酸を含む。

【０１４６】

いくつかの実施形態では、ヒトＴＥＲＴ　ｍＲＮＡは、配列番号４０の配列、または、それと少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％同一の核酸配列を含む。

【０１４７】

いくつかの実施形態では、ＴＥＲＴ　ｍＲＮＡは、配列番号３８～４０のいずれか１つと、少なくとも５０％、少なくとも５５％、少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少な

くとも９９％同一の核酸配列を含んでもよい。

【０１４８】

本開示は、細胞内でテロメアを伸長するための組成物を提供し、組成物は、上記のような本開示の化合物及びさらなる構成成分を含む。いくつかの実施形態では、さらなる構成成分は、テロメラーゼＲＮＡ要素（ＴＥＲＣ）を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、さらに、テロメラーゼＲＮＡ要素（ＴＥＲＣ）を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、さらに、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ及び／またはｉｎ　ｖｉｖｏでの細胞へのＲＮＡの送達を促進し得る１つ以上の追加の構成成分を含む。いくつかの実施形態では、１つ以上の追加の構成成分は、ナノ粒子を含む。いくつかの実施形態では、ナノ粒子は、脂質を含む。いくつかの実施形態では、ナノ粒子または脂質は、本開示のコートソーム様脂質または化合物を含む。いくつかの実施形態では、ナノ粒子または脂質は、式Ｉによる本開示の化合物を含む。

【０１４９】

ＩＩ．送達ビヒクル

いくつかの実施形態では、１つ以上のｍＲＮＡは、送達ビヒクルを介して細胞または組織に送達され得る。いくつかの実施形態では、送達ビヒクルは、ナノ粒子であり得る。いくつかの実施形態では、送達ビヒクルは、限定されないが、脂質及び／またはポリマーを含むナノ粒子、リポソーム、リポソームナノ粒子、カチオン性脂質、またはエクソソームを含む脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）である。本明細書で使用される場合、リポソームナノ粒子は、１つ以上の二重層の膜により外部媒体から隔離された内部水性空間を有する微細小胞が特徴付けされ得る。

【０１５０】

いくつかの実施形態では、ナノ粒子は、ポリマーナノ粒子である。いくつかの実施形態では、ナノ粒子は、金属ナノ粒子である。他の実施形態では、送達ビヒクルは、組み換えウイルスまたはウイルス様粒子、例えば、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）、ヘルペスウイルス、またはレトロウイルス、例えば、レンチウイルス、を含むか、または、それから構成される。いくつかの実施形態では、送達ビヒクルは、修飾ウイルスベクター、例えば、アデノウイルス十二面体または組み換えアデノウイルス集合体を含むか、または、それから構成される。他の実施形態では、送達ビヒクルは、リン酸カルシウムヌクレオチド、アプタマー、細胞透過ペプチド、または他のベクトルタグを含むか、または、それらから構成され得る。

【０１５１】

いくつかの実施形態では、好適な送達ビヒクルは、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）である。例示的なＬＮＰは、１つ以上の異なる脂質及び／またはポリマーを含んでもよい。いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、イオン性脂質、カチオン性脂質、構造脂質、コレステロール、及び／または絶縁体脂質（例えば、ＰＥＧ化脂質）のうちの１つ以上を含む。

【０１５２】

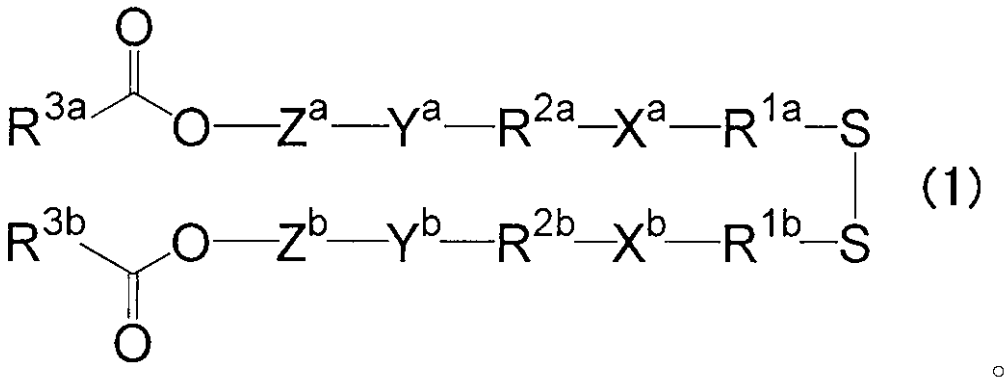
本開示の組成物は、細胞へのＲＮＡの送達を促進し得る１つ以上の構成成分を含んでもよい。集合的にまたは部分的に、組成物の構成成分は、送達ビヒクルを含んでもよい。いくつかの実施形態では、送達ビヒクルは、本開示の組成物のリボ核酸の標的細胞への標的化及び取り込みを促進する。例示的な送達ビヒクルには、ナノ粒子、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）、リポソーム、ミセル、エクソソーム、カチオン性脂質、及び天然または人工リポタンパク質粒子が挙げられるが、これらに限定されない。

【０１５３】

イオン性脂質

本開示のいくつかの実施形態では、ＬＮＰは、イオン性脂質、例えば、ＳＳ－ＯＰまたはそのアナログ、を含んでもよい。脂質の電荷は、周囲の溶液のｐＨに依存し、イオン性脂質となり得る。イオン性脂質は、また、切断可能であってよい。イオン性脂質は、哺乳動物細胞のエンドソームまたはリソソームに見出されるｐＨの範囲でカチオン性であってよい。

【０１５４】
イオン性脂質は、生理学的ｐＨなどの選択されたｐＨで正味の正電荷を有する多くの脂質種のいずれかを指し得る。いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、ＷＯ２０１０／０５３５７２もしくはＷＯ２０１２／１７０９３０のいずれか、またはそれらの変形形態が開示のイオン性脂質を含んでもよく、これらの両方は、全体が参照により取り込まれる。
【０１５５】
いくつかの実施形態では、ＴＥＲＴ　ｍＲＮＡの肺送達のためのＬＮＰは、以下のうちの１つ以上を含んでもよい：ＭＣ３（（（６Ｚ，９Ｚ，２８Ｚ，３１Ｚ）－ヘプタトリアコンター６，９，２８，３１－テトラエン－１９－イル４－（ジメチルアミノ）ブタノアート）、１，２－ジリネオイル－３－ジメチルアンモニウム－プロパン（ＤＬｉｎＤＡＰ）、ＤＬｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡ４－（ジメチルアミノ）－ブタノアート、（１０Ｚ，１３Ｚ）－１－（９Ｚ，１２Ｚ）－９，１２－オクタデカジエン－１－イル－１０，１３－ノナデカジエン－１－イルエステル、及び／またはｃＫＫ－Ｅ１２　３，６－ビス（４－（ビス（２－ヒドロキシドデシル）アミノ）ブチル）ピペラジン－２，５－ジオン。いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、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－ＫＣ２－ＤＭＡ，１）及び／または（６Ｚ，９Ｚ，２８Ｚ，３１Ｚ）－ヘプタトリアコンター６，９，２８，３１－テトラエン－１９－イル４－（ジメチルアミノ）ブタノアートを含む。
【０１５６】
いくつかの実施形態では、イオン性脂質は、ＳＳ－ＯＰまたはそのアナログを含んでもよい。いくつかの実施形態では、イオン性脂質は、式（１）の化合物である：
【化８】



(1)

。

【０１５７】
式（１）では、Ｒ^{1a}及びＲ^{1b}は、それぞれ独立して、１～６の炭素原子を有するアルキレン基を表し、直鎖状であっても、分岐状でもよい。アルキレン基は、１～４の炭素原子を有しても、１～２の炭素原子を有してもよい。１～６の炭素原子を有するアルキレン基の具体例としては、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、及びネオペンチレン基が挙げられる。Ｒ^{1a}及びＲ^{1b}は、それぞれ独立して、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ってよく、エチレン基であってよい。
【０１５８】
Ｒ^{1a}は、Ｒ^{1b}と異なっていても、同一であってよい。
【０１５９】
Ｘ^{a}及びＸ^{b}は、それぞれ独立して、１～６つの炭素原子及び１つの３級アミノ基、または２～５の炭素原子を非環状アルキル３級アミノ基、ならびに１～２つの３級アミノ基を有する環状アルキレン３級アミノ基、及び／または、それぞれ独立して、２～５の炭素

原子及び１～２の３級アミノ基及びアルキレン３級アミノ基を有する環状アルキレンである。

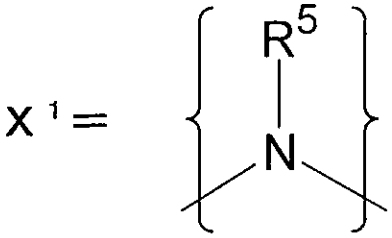
【０１６０】

１～６つの炭素原子及び１つの３級アミノ基を有する非環状アルキル３級アミノ基における、１～６の炭素原子を有するアルキル基は、直鎖状であっても、分岐状である。アルキル基は、環状であってよい。アルキル基は、１～３つの炭素原子を有してもよい。１～６つの炭素原子を有するアルキル基の具体例としては、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、及びイソペンチル基が挙げられる。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を言及することができる。

【０１６１】

１～６つの炭素原子及び１つの３級アミノ基を有する非環状アルキル３級アミノ基の具体的な構造が、X^1で表される。

【化９】



【０１６２】

X^1のR^5は、１～６つの炭素原子を有するアルキル基を表し、直鎖状、分岐鎖状、または環状であってよい。アルキル基は、１～３つの炭素原子を有してもよい。１～６つの炭素原子を有するアルキル基の具体例としては、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、及びイソペンチル基が挙げられる。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を言及することができる。

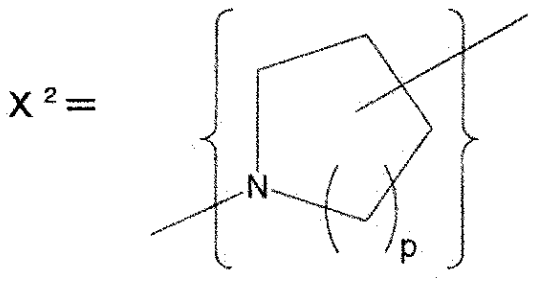
【０１６３】

２～５つの炭素原子及び１～２つの３級アミノ基を有する環状アルキレン３級アミノ基の炭素原子数は、４～５であってよい。２～５つの炭素原子及び１～２つの３級アミノ基を有する環状アルキレン３級アミノ基の具体例としては、アジリジレン基、アゼチジレン基、ピロリジレン基、ピペリジレン基、イミダゾリジレン基、ピペラジレン基、任意に、ピロリジレン基、ピペリジレン基、またはピペラジレン基が挙げられる。

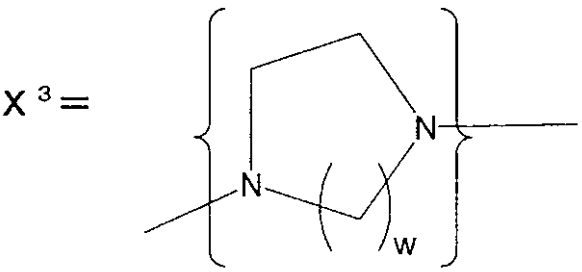
【０１６４】

数は、２～５つの炭素原子であり、X^2で表される１つの環状３級アミノ基を含有するアルキレン３級アミノ基の具体的な構造である。

【化１０】



【０１６５】
Ｘ^{2}のＰは、１または２である。ｐが１である場合、Ｘ^{2}は、ピロリジレン基であり、ｐが２の場合、Ｘ^{2}は、ピペリジレン基である。
【０１６６】
２～５つの炭素原子及び２つの３級アミノ基を有する環状アルキレン３級アミノ基の具体的な構造は、Ｘ^{3}で表される。
【化１１】



【０１６７】
Ｘ^{3}のＷは、１または２である。ｗが１の場合、Ｘ^{3}は、イミダゾリジレン基であり、ｗが２の場合、Ｘ^{3}は、ピペラジレン基である。
【０１６８】
Ｘ^{a}は、Ｘ^{b}と異なっていても、同一であってもよい。
【０１６９】
Ｒ^{2a}及びＲ^{2b}は、それぞれ独立して、８以下の炭素原子を有するアルキレン基またはオキシジアルキレン基、任意に、それぞれ独立して、８以下の炭素原子を有するアルキレン基を表す。
【０１７０】
８以下の炭素原子を有するアルキレン基は、直鎖状であっても分岐鎖状であってもよいが、任意に、直鎖状である。アルキレン基に含有される炭素原子数は、任意に、６以下であり、任意に、４以下である。８以下の炭素原子を有するアルキレン基の具体例としては、メチレン基、エチレン基、プロピレン基、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、ヘキサメチレン基、ヘプタメチレン基、オクタメチレン基等が挙げられる。いくつかの実施形態では、メチレン基、エチレン基、プロピレン基、及びテトラメチレン基を含む。
【０１７１】
８つ以下の炭素原子を有するオキシジアルキレン基は、エーテル結合を介したアルキレン基（アルキレン－Ｏ－アルキレン）を指し、２つのアルキレン基の炭素原子数の合計が８以下である。ここで、２つのアルキレンは、同一でも異なっていてもよいが、任意に、同じである。８以下の炭素原子を有するオキシジアルキレン基の具体例としては、オキシ

ジメチレン基、オキシジエチレン基、オキシジプロピレン基、及びオキシジブチレン基が挙げられる。

【０１７２】

R^{2a}及びR^{2b}は、同一であっても異なっていてもよい。

【０１７３】

Y^a及びY^bは、それぞれ独立して、エステル結合、アミド結合、カルバマート結合、エーテル結合、または尿素結合であり、任意に、それぞれ独立して、エステル結合、アミド結合、またはカルバマート結合である。Y^a及びY^bのＹ結合方向が限定されないが、Y^a及びY^bがエステル結合である場合、任意に、－Z^a－ＣＯ－－－R^{2a}－及び－Z^b－ＣＯ－Ｏ－R^{2b}－構造である。

【０１７４】

Y^aは、Y^bと異なっていても同一であってもよい。

【０１７５】

Z^a及びZ^bは、それぞれ独立して、３～１６の炭素原子を有し、少なくとも１つの芳香環を有し、任意に、ヘテロ原子を有する芳香族化合物から誘導される２価の基である。以下を表す。芳香族化合物に含有された炭素原子数は、任意に、６～１２または６～７である。さらに、芳香族化合物に含有される芳香環の数は、任意に１つである。

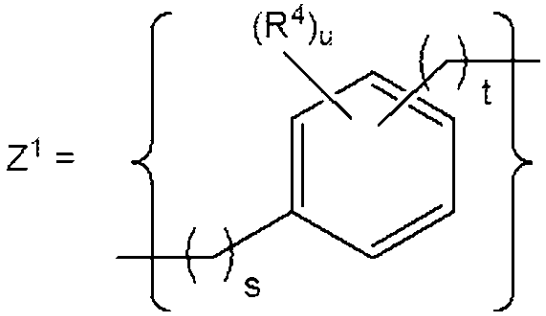
【０１７６】

３～１６の炭素原子を有する芳香族化合物に含有される芳香環のタイプとしては、芳香族炭化水素環に関しては、ベンゼン環、ナフタレン環、アントラセン環、芳香族複素環としては、イミダゾール環、ピラゾール環、オキサゾール環、イソオキサゾール環、チアゾール環、イソチアゾール環、トリアジン環、ピロール環、フランチオフェン環、ピリミジン環、ピリダジン環、ピラジン環、ピリジン環、プリン環、プテリジン環、ベンズイミダゾール環、インドール環、ベンゾフラン環、キナゾリン環、フタラジン環、キノリン環、イソキノリン環、クマリン環、クロモン環、ベンゾジアゼピン環、フェノキサジン環、フェノチアジン環、アクリジン環など、任意に、ベンゼン環、ナフタレン環、アントラセン環。芳香環は、置換基を有してもよい。置換基の例としては、２～４つの炭素原子を有するアシル基、２～４つの炭素原子を有するアルコキシカルボニル基、２～４つの炭素原子を有するカルバモイル基、２～４つの炭素原子を有するアシルオキシ基、２～４つの炭素原子を有するアシルアミノ基、２～４つの炭素原子を有するアルコキシカルボニルアミノ基、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子、１～４つの炭素原子を有するアルキルスルファニル基、１～４つの炭素原子を有するアルキルスルホニル基、６～１０の炭素原子を有するアリールスルホニル基、ニトロ基、トリフルオロメチル基、シアノ基、１～４つの炭素原子を有するアルキル基、１～４つの炭素原子を有するウレイド基、１～４つの炭素原子を有するアルコキシ基、６～１０の炭素原子を有するアリール基、６～１０の炭素原子を有するアリールオキシ基などが挙げられる。いくつかの例としては、アセチル基、メトキシカルボニル基、メチルカルボナート基など、モイル基（ｍｏｙｌ　ｇｒｏｕｐ）、アセトキシ基、アセトアミド基、メトキシカルボニルアミノ基、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子、メチルスルファニル基、フェニルスルホニル基、ニトロ基、トリフルオロメチル基、シアノ基、メチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、ｔ－ブチル基、ウレイド基、メトキシ基、エトキシ基、プロポキシ基、イソプロポキシ基、ｔ－ブトキシ基、フェニル基、及びフェノキシ基が挙げられる。

【０１７７】

Z^a及びZ^bの具体的な構造としては、Z^1が挙げられる。

【化１２】



【０１７８】
ｓは、０～３の整数を表し、ｔは、０～３の整数を表し、ｕは、０～４の整数を表し、Ｒ４は、独立して、置換基である。
【０１７９】
Ｚ[1]におけるＳは、任意に、０～１の整数である。
【０１８０】
Ｚ[1]におけるＴは、任意に、０～２の整数である。
【０１８１】
Ｚ[1]におけるＵは、任意に、０～２の整数である。
【０１８２】
Ｚ[1]におけるＲ４は、イオン性脂質の合成プロセスにおける反応を阻害しない３～１６の炭素原子を有する芳香族化合物に含有される芳香環（ベンゼン環）の置換基である。置換基の例としては、２～４つの炭素原子を有するアシル基、２～４つの炭素原子を有するアルコキシカルボニル基、２～４つの炭素原子を有するカルバモイル基、２～４つの炭素原子を有するアシルオキシ基、及び２～４つの炭素原子を有するアシルアミノ基、２～４つの炭素原子を有するアルコキシカルボニルアミノ基、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子、１～４つの炭素原子を有するアルキルスルファニル基、１～４つの炭素原子を有するアルキルスルホニル基、６～１０の炭素原子を有するアリールスルホニル基、ニトロ基、トリフルオロメチル基、シアノ基、１～４つの炭素原子を有するアルキル基、１～４つの炭素原子を有するウレイド基、１～４つの炭素原子を有するアルコキシ基、６～１０の炭素原子を有するアリール基、及び６～１０の炭素原子を有するアリールオキシ基が挙げられ、例としては、アセチル、メトキシカルボニル、メチルカルバモイル、アセトキシ、ミド基（Ｍｉｄｏ　ｇｒｏｕｐ）、メトキシカルボニルアミノ基、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子、メチルスルファニル基、フェニルスルホニル基、ニトロ基、トリフルオロメチル基、シアノ基、メチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、ｔ－ブチル基、ウレイド基、メトキシ基、エトキシ基、プロポキシ基、イソプロポキシ基、ｔ－ブトキシ基、フェニル基、及びフェノキシ基が挙げられる。複数のＲ[4]が存在する場合、各Ｒ[4]は、同じであっても、異なっていてもよい。
【０１８３】
Ｚ[a]は、Ｚ[b]と異なっていても、同一であってもよい。
【０１８４】
Ｒ[3a]及びＲ[3b]は、それぞれ独立して、水酸基を有する脂溶性ビタミンと無水コハク酸もしくは無水グルタル酸との反応生成物、または水酸基を有するステロール誘導体と無水コハク酸もしくはグルタル酸との反応生成物から誘導される残基である。無水物、または１２～２２の炭素原子を有する脂肪族炭化水素基と、任意に、それぞれ独立して、ヒドロキシル基を有する脂溶性ビタミン及び無水コハク酸または無水グルタル酸との反応生成物から誘導される残基、または、Ｃ１２－２２脂肪族炭化水素基、及び、任意に、それぞれ独立して、１２～２２の炭素原子を有する脂肪族炭化水素基を表す。

【０１８５】
水酸基を有する脂溶性ビタミンの例としては、レチノール、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、コルカルシフェロール、ジヒドロエルゴカルシフェロール、ジヒドロタキソロール、トコフェロール、及びトコトリエノールが挙げられる。水酸基を有する脂溶性ビタミンは、任意に、トコフェロールである。
【０１８６】
水酸基を有するステロール誘導体の例としては、コレステロール、コレスタノール、スチグマステロール、β－シトステロール、ラノステロール、エルゴステロールなど、任意に、コレステロールまたはコレスタノールが挙げられる。
【０１８７】
１２～２２の炭素原子を有する脂肪族炭化水素基は、直鎖であっても、分岐鎖であってもよい。脂肪族炭化水素基は、飽和であっても、不飽和であってもよい。不飽和脂肪族炭化水素基の場合、脂肪族炭化水素基に含有される不飽和結合の数は、通常、１～６つ、任意に、１～３つ、または１～２つである。不飽和結合には、炭素－炭素二重結合及び炭素－炭素三重結合が含まれる。脂肪族炭化水素基に含有される炭素原子数は、任意に、１３～１９または１３～１７である。脂肪族炭化水素基には、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基などが挙げられ、任意に、アルキル基またはアルケニル基が挙げられる。１２～２２の炭素原子を有する脂肪族炭化水素基の具体例としては、可能なドデシル、トリデシル、テトラデシル、ペンタデシル、ヘキサデシル、ヘプタデシル、オクタデシル、ノナデシル、イコシル、ヘイコシル、ドコシル、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、ドデカジエニル基、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、イコサデニル基、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、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、１－ヘキシルヘプチル基、１－ヘキシルノニル基、１－オクチルノニル基、１－オクチルウンデシル基、１－デシルウンデシル基等が挙げられる。１２～２２の炭素原子を有する脂肪族炭化水素基は、任意に、トリデシル基、ペンタデシル基、ヘプタデシル基、ノナデシル基、ヘプタデセニル基、ヘプタデカジエニル基、もしくは１－ヘキシルノニル基、またはトリデシル基、ヘプタデシル基、ヘプタデセニル基、及びヘプタデカジエニル基である。
【０１８８】
本開示の一実施形態では、R^{3a}及びR^{3b}で表される１２～２２の炭素原子を有する脂肪族炭化水素基は、脂肪酸から誘導される。この場合、脂肪酸から誘導されるカルボニル炭素は、式（１）中の－ＣＯ－Ｏ－に含有される。脂肪族炭化水素基の具体例としては、リノール酸が脂肪酸として使用される場合、ヘプタデセニル基が挙げられ、オレイン酸が脂肪酸として使用される場合、ヘプタデセニル基が挙げられる。
【０１８９】
R^{3a}は、R^{3b}と異なっていても、同じであってもよい。
【０１９０】
本開示の一実施形態では、R^{1a}は、R^{1b}と同じであり、X^{a}は、X^{b}と同じであり、R^{2a}は、R^{2b}と同じであり、Y^{a}は、Y^{b}と同じであり、Z^{a}は、Z^{b}と同一であり、R^{3a}は、R^{3b}と同じである。
【０１９１】
式（１）で表されるイオン性脂質の好ましい例としては、以下のイオン性脂質が挙げられる：イオン性脂質（１－１）；Ｒ１ａ及びＲ１ｂは、それぞれ独立して、１～６つの炭素原子を有するアルキレン基（例えば、メチレン基、エチレン基）であり；Ｘａ及びＸｂは、それぞれ独立して、１～６つの炭素原子及び１つの３級アミノ基を有する非環状アルキル３級アミノ基（例えば、－Ｎ（ＣＨ３）－）、または２～５つの炭素原子及び１～２

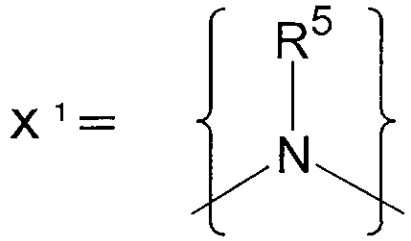
つの３級アミノ基を有する環状アルキレン３級アミノ基（例えば、ピペリジレン基）；R^{2a}及びR^{2b}は、それぞれ独立して、８以下の炭素原子を有するアルキレン基（例えば、メチレン基、エチレン基、プロピレン基）であり；Y^{a}及びY^{b}は、それぞれ独立して、エステル結合またはアミド結合を表し；Z^{a}及びZ^{b}は、それぞれ独立して、３～１６の炭素原子、少なくとも１つの芳香環、及び、任意に、ヘテロ原子を有する芳香族化合物から誘導される２価の基（例えば、－Ｃ６Ｈ４－ＣＨ２－、－ＣＨ２－Ｃ６Ｈ４－ＣＨ２－）であり；R^{3a}及びR^{3b}は、それぞれ独立して、ヒドロキシル基を有する脂溶性ビタミン（例えば、トコフェロール）と無水コハク酸もしくは無水グルタル酸との反応生成物から誘導される残基、または１２～２２の炭素原子を有する脂肪族基である炭化水素基（例えば、ヘプタデセニル基、ヘプタデカジエニル基、１－ヘキシルノニル基）である。

【０１９２】

イオン性脂質（１－２）；R^{1a}及びR^{1b}は、それぞれ独立して、１～４つの炭素原子を有するアルキレン基（例えば、メチレン基、エチレン基）であり；Ｘａ及びＸｂは、それぞれ独立して、１～３つの炭素原子及び１つの３級アミノ基を有する非環状アルキル３級アミノ基（例えば、－Ｎ（ＣＨ３）－）、または２～５つの炭素原子及び１つの３級アミノ基を有する環状アルキレン３級アミノ基（例えば、ピペリジレン基）であり；R^{2a}及びR^{2b}は、それぞれ独立して、６以下の炭素原子を有するアルキレン基（例えば、メチレン基、エチレン基、プロピレン基）であり；Y^{a}及びY^{b}は、それぞれ独立して、エステル結合またはアミド結合を表し；Ｚａ及びＺｂは、それぞれ独立して、６～１２の炭素原子、１つの芳香環、及び、任意に、ヘテロ原子を有する芳香族化合物から誘導される２価の基（例えば、－Ｃ６Ｈ４－ＣＨ２－、－ＣＨ２－Ｃ６Ｈ４－ＣＨ２－）であり；R^{3a}及びR^{3b}は、それぞれ独立して、ヒドロキシル基を有する脂溶性ビタミン（例えば、トコフェロール）と無水コハク酸との反応生成物から誘導される残基、または１３～１９の炭素原子を有する脂肪族炭化水素基（例えば、ヘプタデセニル基、ヘプタデカジエニル基、１－ヘキシルノニル基）である。

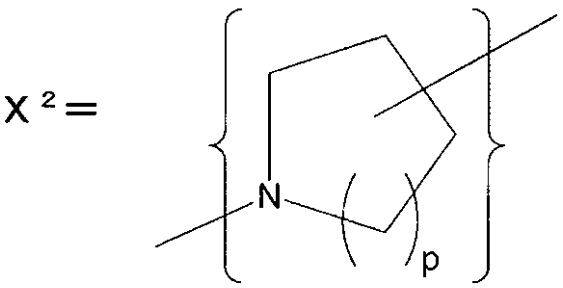
イオン性脂質（１－３）；R^{1a}及びR^{1b}は、それぞれ独立して、１～２つの炭素原子を有するアルキレン基（例えば、メチレン基、エチレン基）であり；X^{a}及びX^{b}は、それぞれ独立して、X^{1}であり、

【化１３】



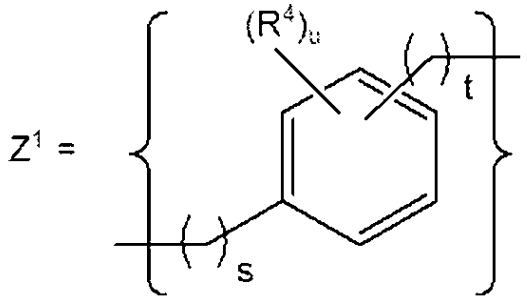
（式中、R^{5}は、１～３つの炭素原子を有するアルキル基（例えば、メチル基）である）、または、X^{2}：

【化１４】



（式中、ｐは、１または２である）、Ｒ^{2a}及びＲ^{2b}は、それぞれ独立して、４以下の炭素原子を有するアルキレン基（例えば、メチレン基、エチレン基、プロピレン基）であり；Ｙ^{a}及びＹ^{b}は、それぞれ独立して、エステル結合またはアミド結合を表し；Ｚ^{a}及びＺ^{b}は、それぞれ独立して、Ｚ^{1}であり、

【化１５】



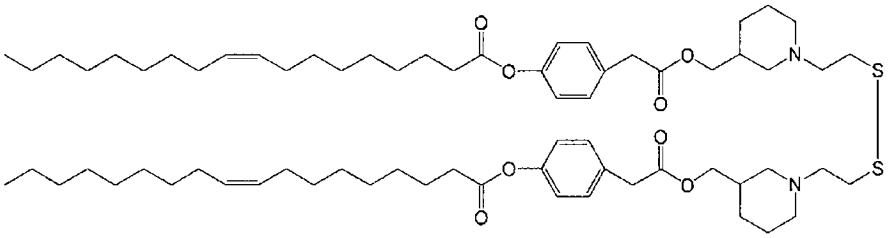
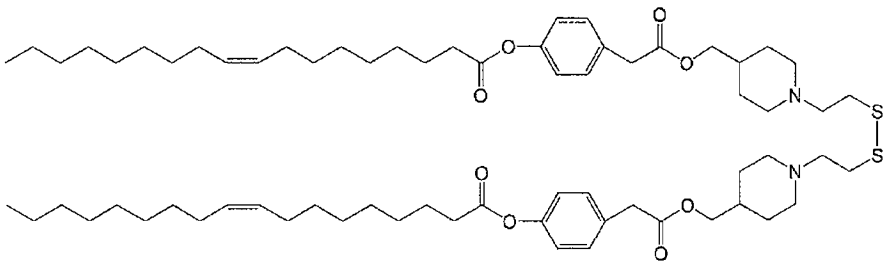
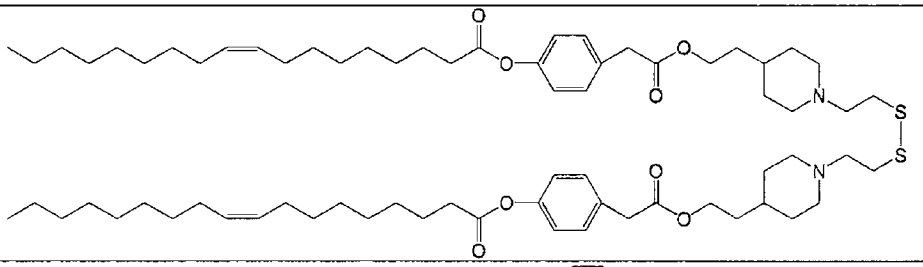
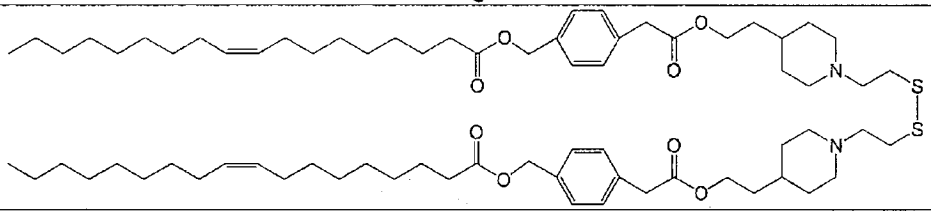
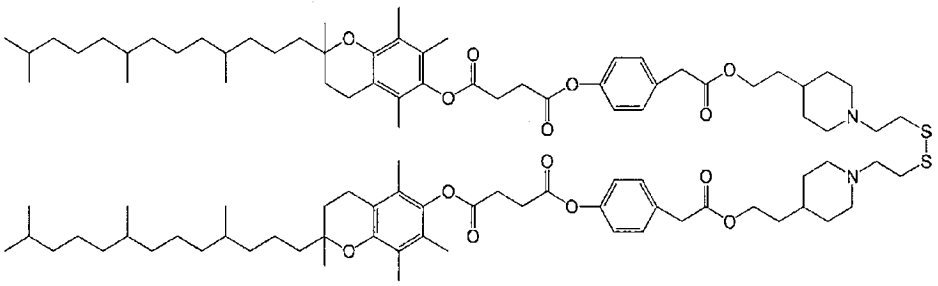
式中、ｓは、０～１の整数であり、ｔは、０～２の整数であり、ｕは、０～２（任意に、０）の整数であり、（Ｒ^{4}）ｕは、それぞれ独立して、置換基を表し、Ｒ^{3a}及びＲ^{3b}は、それぞれ独立して、水酸基を有する脂溶性ビタミン（例えば、トコフェロール）と無水コハク酸との反応生成物から誘導される残基、または１３～１７の炭素原子を有する脂肪族炭化水素基（例えば、ヘプタデセニル基、ヘプタデカジエニル基、１－ヘキシルノニル基）である。

【０１９３】

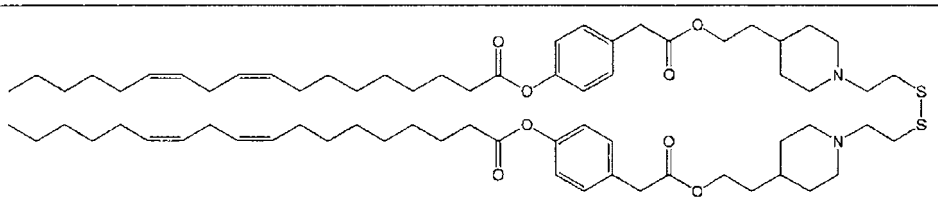
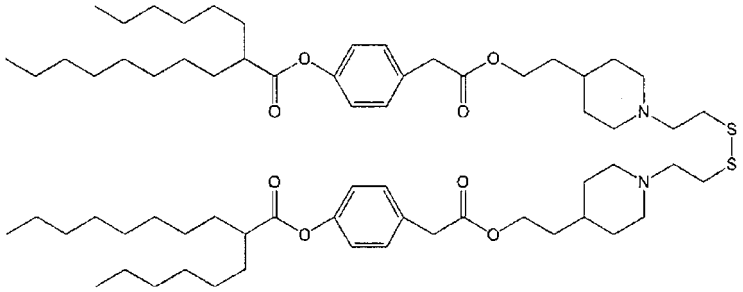
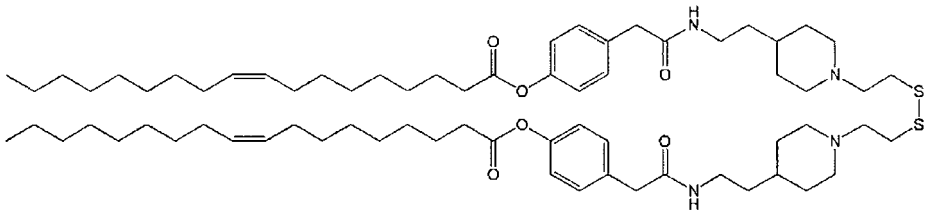
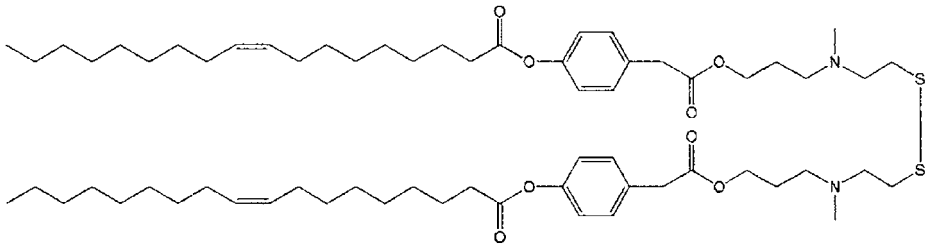
本開示の式１によるイオン性脂質の具体例としては、表３、４、及び５に示される以下のＯ－Ｐｈ－Ｐ３Ｃ１、Ｏ－Ｐｈ－Ｐ４Ｃ１、Ｏ－Ｐｈ－Ｐ４Ｃ２、Ｏ－Ｂｎ－Ｐ４Ｃ２、Ｅ－Ｐｈ－Ｐ４Ｃ２、Ｌ－Ｐｈ－Ｐ４Ｃ２、ＨＤ－Ｐｈ－Ｐ４Ｃ２、Ｏ－Ｐｈ－アミド－Ｐ４Ｃ２、及びＯ－Ｐｈ－Ｃ３Ｍが挙げられる。

表３：イオン性脂質

【表３－１】

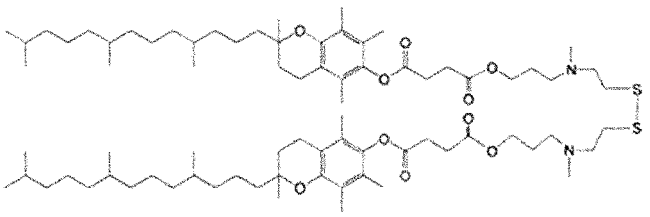
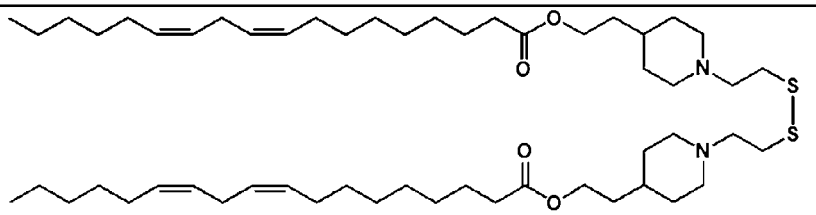
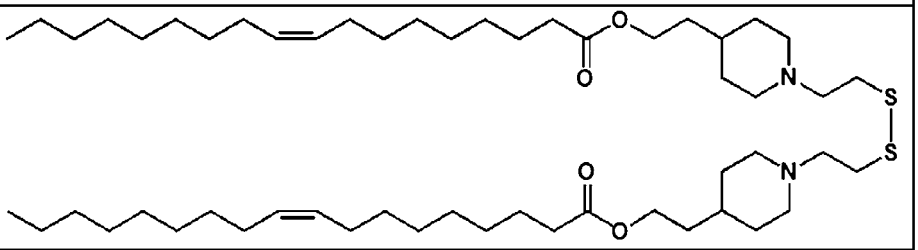
O-Ph-P3C1	
O-Ph-P4C1	
O-Ph-P4C2	
O-Bn-P4C2	
E-Ph-P4C2	

【表３－２】

L-Ph-P4C2	
HD-Ph-P4C2	
O-Ph- アミド-P4C2	
O-Ph-C3M	

【表４】

表４：イオン性脂質

α-D-トコフェロールスクシノイル	
リノレオイル	
オレオイル	

【０１９４】

いくつかの実施形態では、送達ビヒクルは、肺細胞集団の少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、または少なくとも９５％をトランスフェクトすることが可能なＬＮＰであり、イオン性脂質は、ＬＮＰのモル百分率の少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、または少なくとも８０％である。

【０１９５】

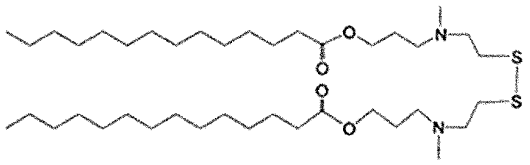
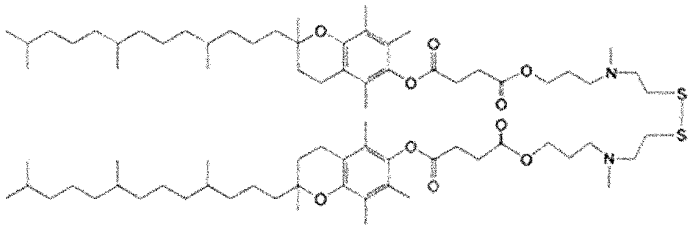
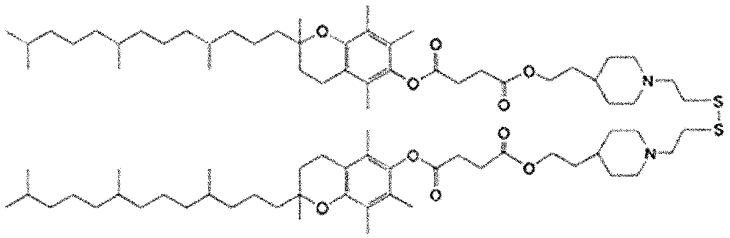
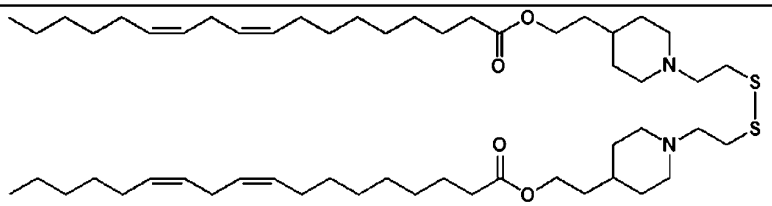
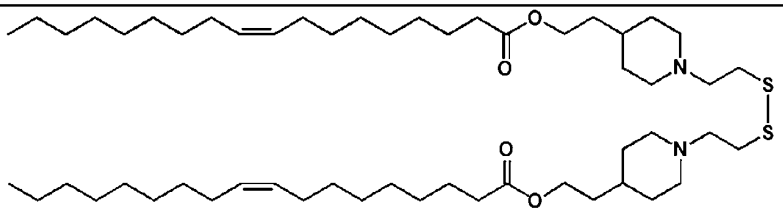
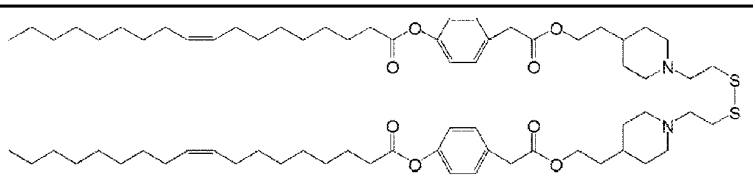
いくつかの実施形態では、イオン性脂質は、ＬＮＰのモル百分率の２０％以下、３０％以下、４０％以下、５０％以下、６０％以下、７０％以下、または９０％以下である。イオン性脂質の例としては、（１５Ｚ，１８Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－６－（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イル）テトラコサ－１５，１８－ジエン－１－アミン（ＨＧＴ５０００）、（１５Ｚ，１８Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－６－（（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イル）テトラコサ－４，１５，１８－トリエン－１－アミン（ＨＧＴ５００１）、及び（１５Ｚ，１８Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－６－（（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イル）テトラコサ－５，１５，１８－トリエン－１－アミン（ＨＧＴ５００２）が挙げられるが、これらに限定されない。

【０１９６】

式Ｉの構造を有する脂質が、以下の表５に示される。例えば、ＳＳ－ＯＰは、０－Ｐｈ－Ｐ４Ｃ２とも呼ばれる。本明細書で使用される「ＳＳ－ＯＰアナログ」という用語は、式Ｉの化合物を指す。

【表５】

表５：脂質の命名法

名称	構造
SS-M	
SS-E	
SS-EC	
SS-LC	
SS-OC	
SS-OP	

【０１９７】

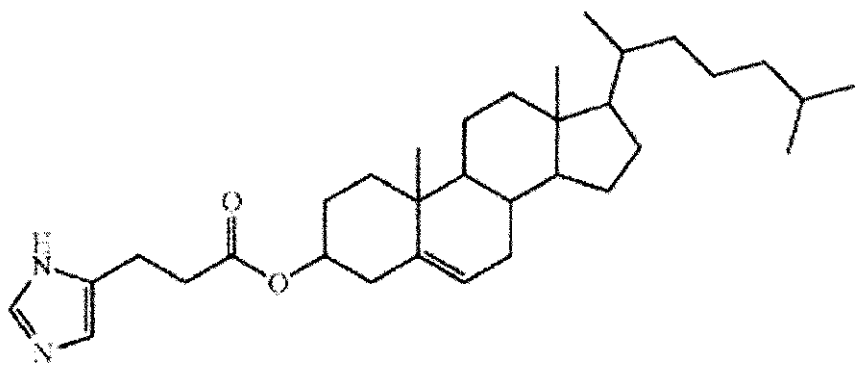
カチオン性脂質

いくつかの実施形態では、本開示の脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）は、カチオン性脂質、例えば、ＤＯＴＡＰまたはその変形形態を含む。カチオン性脂質は、「永久カチオン性脂質」であってよい。カチオン性脂質という用語は、血液または間質液などの哺乳動物の生理学的環境に見出されるｐＨ範囲のカチオン性であってよい。カチオン性脂質は、カチオン性アミン部分及び脂質部分から構成され得、カチオン性アミン部分及びポリアニオン核酸は、正荷電リポソームまたは脂質膜構造を形成するように相互作用し得る。従って、細胞への取り込みが、促進され、核酸が、細胞内に送達され得る。

【０１９８】
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つ以上から選択され得る：１，２－ジオレオイル－３－トリメチルアンモニウム－プロパン（ＤＯＴＡＰ）、Ｎ，Ｎ－ジステアリル－Ｎ，Ｎ－ジメチルアンモニウムブロミド（ＤＡＢＢ）、または１，２－ジミリストイル－ｓｎ－グリセロ－３－エチルホスホコリン（ＥＰＣ）。いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、イオン性脂質を含み、イオン性脂質は、Ｎ－［１－（２，３－ジオレイルオキシ）プロピル］－Ｎ，Ｎ，Ｎ－トリメチルアンモニウムクロリド（ＤＯＴＭＡ）、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）、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－ジステアリルオキシ－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）、ジメチルジオクタデシルアンモニウム（ＤＤＡ）、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パ－３－イル）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－Ｎ－ヒドロキシエチルアンモニウムブロミド（ＤＭＲＩＥ）、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１－１－（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－ジメチルアミノプロパン（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）、または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）、及びそれらの混合物のうちのいずれか１つ以上である。

【０１９９】
いくつかの実施形態では、カチオン性脂質は、カチオン性コレステロール脂質を指す。本開示のいくつかの実施形態では、ＬＮＰは、イミダゾールコレステロールエステル（ＩＣＥ）を含む。いくつかの実施形態では、ＩＣＥ構造は、以下と実質的に類似している：

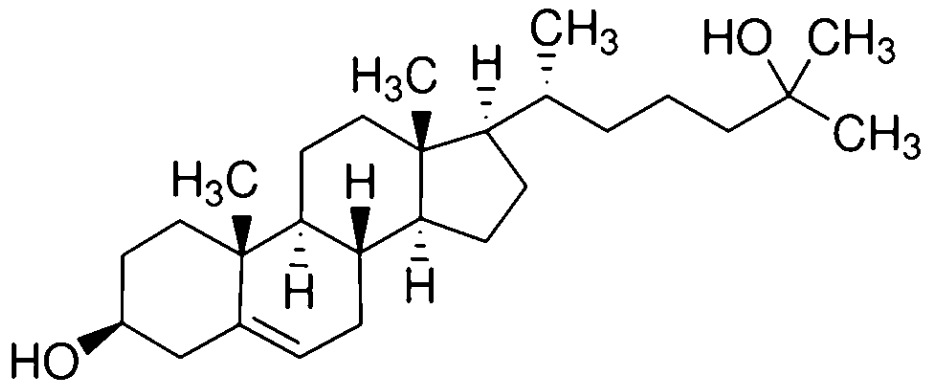
【化１６】



【０２００】

本開示のいくつかの実施形態では、ＬＮＰは、２５－ヒドロキシコレステロール（２５ＯＨ　Ｃｈｏｌ）を含む。いくつかの実施形態では、２５ＯＨ　Ｃｈｏｌ構造は、以下と実質的に類似している：

【化１７】



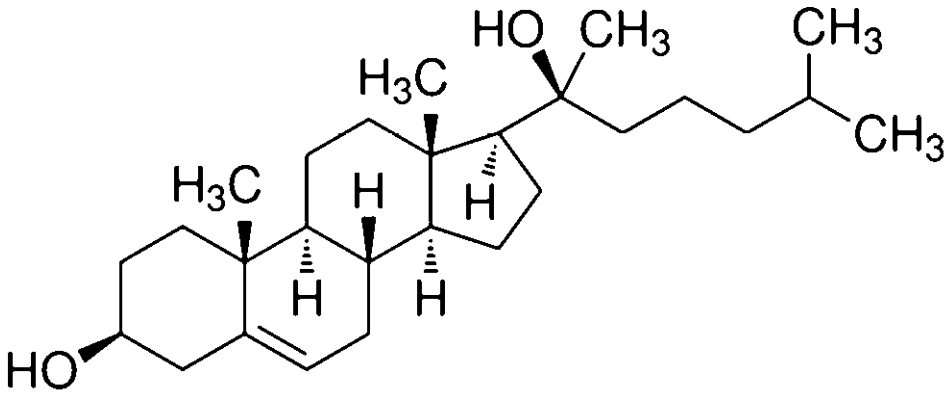
【０２０１】

本開示のいくつかの実施形態では、ＬＮＰは、２０α－ヒドロキシコレステロール５－コレステン－３αを含む。

【０２０２】

いくつかの実施形態では、２０α－ヒドロキシコレステロール５－コレステン－３α（２０α－ジオールまたは２０α　ｃｈｏｌ構造としても既知）は、以下と実質的に類似している：

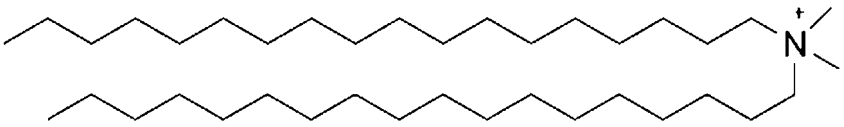
【化１８】



【０２０３】

いくつかの実施形態では、カチオン性脂質は、ジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミド（ＤＤＡＢ）を指す。本開示のいくつかの実施形態では、ＬＮＰは、ジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミド（ＤＤＡＢ）を含む。いくつかの実施形態では、ジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミド（ＤＤＡＢ）構造は、以下と実質的に類似している：

【化１９】



【０２０４】

構造脂質

いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、構造脂質を含む。本明細書で使用される場合、構造脂質は、電荷に加えて、または電荷とは無関係のＬＮＰに、物理的または化学的特性を与える脂質である。一例として、構造脂質は、形状、サイズ、剛性、疎水性、または、例えば、安定性、半減期、変形性、トランスフェクション効率、指向性、熱安定性、凝集に対する抵抗性、膜流動性、または他のパラメーターを増加させることにより、ＬＮＰの治療的有用性を増加させる他の特性を有する傾向があり得る。いくつかの実施形態では、構造脂質は、荷電部分が欠如しているため、またはバランスの取れた電荷が合計されて正味電荷がゼロになる両性イオンであるため、電荷が中性である。

【０２０５】

いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、１，２－ジ－（９Ｚ－オクタデセノイル）－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＯＰＥ）、グリセロール－モノオレアート（ＧＭＯ）、ジステアロイルホスファチジルコリン（ＤＳＰＣ）、ジオレオイルホスファチジルコリン（ＤＯＰＣ）、ジパルミトイルホスファチジルコリン（ＤＰＰＣ）、ジオレオイルホスファチジルグリセロール（ＤＯＰＧ）、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール（ＤＰＰＧ）、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＯＰＥ）、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン（ＰＯＰＣ）、パルミトイルオレオイル－ホスファチジルエタノールアミン（ＰＯＰＥ）、ジオレオイル－ホスファチジルエタノールアミン４－（Ｎ－マレイミドメチル）－シクロヘキサン－１－カルボキシラート（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－ステアロイル－２－オレオイル－ホスファチジルエタノールアミン（ＳＯＰＥ）、またはそのバリアントのうちの１つ以上から選択される構造脂質を含んでもよい。

【０２０６】

いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、１つ以上のホスファチジル脂質、例えば、ホスファチジル化合物（例えば、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、及びホスファチジルエタノールアミン）を含んでもよい。いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、スフィンゴ脂質、例えば、スフィンゴシン、セラミド、スフィンゴミエリン、セレブロシド、及びガングリオシドを含んでもよいが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、上述の「構造」脂質は、ＬＮＰ組成物の安定性及び／または特異性に寄与する。

【０２０７】

コレステロールベースの脂質

いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、１つ以上のコレステロールベースの脂質を含んでもよい。コレステロールベースの脂質には、ＰＥＧ化コレステロール、ＤＣ－Ｃｈｏｉ（Ｎ，Ｎ－ジメチル－Ｎ－エチルカルボキサミドコレステロール）、１，４－ビス（３－Ｎ－オレイルアミノ－プロピル）ピペラジンが含まれ得るが、これらに限定されない。

【０２０８】

ＰＥＧ化脂質

本開示のいくつかの実施形態では、ＬＮＰは、１つ以上のＰＥＧ化脂質を含んでもよい

。例えば、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）（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］（Ｃ８ＰＥＧ－２０００セラミド）を含む）は、１つ以上のイオン性脂質及び／または他の脂質と組み合わせて本開示により企図される。いくつかの実施形態では、ＰＥＧ化脂質は、より短いアシル鎖（例えば、Ｃ１４またはＣ１８）を有するＰＥＧセラミドを含む。いくつかの実施形態では、ＰＥＧ化脂質ＤＳＰＥ－ＰＥＧ－マレイミド－レクチンが使用され得る。他の企図されるＰＥＧ修飾脂質には、Ｃ６～Ｃ２０長のアルキル鎖（複数可）を有する脂質に共有結合している長さ５ｋＤａまで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。特定の理論に束縛されるものではないが、ＰＥＧ化脂質の添加は、複雑な凝集を防止し、循環寿命を延ばして、リポソーム封入ｍＲＮＡの標的細胞への送達を促進し得ると企図される。

【０２０９】

いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子製剤は、以下に記載のもののいずれかを含むか、それから本質的になるか、またはそれからなり得る：米国特許第１１，１８５，５９５号；同第９，８６８，６９３号；同第１０，１９５，１５６号；同第９，８７７，９１９号；同第９，７３８，５９３号；同第１０，３９９，９３７号；同第１０，１０６，４９０号；同第９，７３８，５９３号；同第１０，８２１，１８６号；もしくは同第８，０５８，０６９号（これらのそれぞれは、全体が参照により組み込まれる）に記載のもの；または、米国特許出願公開第ＵＳ２０１８００８５４７４Ａ１号、同第ＵＳ２０２１０２５９９８０Ａ１号、同第ＵＳ２０２００２０６３６２Ａ１号、同第ＵＳ２０２１０２６７８９５Ａ１号、同第ＵＳ２０２００２８３３７２Ａ１号、もしくは同第ＵＳ２０２００１６３８７８Ａ１号（これらのそれぞれは、全体が参照により組み込まれる）。

【０２１０】

脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）組成物

以下の例示的なＬＮＰ製剤は、限定されることを意図されない。

本開示のいくつかの実施形態では、ＬＮＰは、イオン性脂質、例えばＳＳ－ＯＰまたはＳＳ－ＯＰアナログを、総脂質に対して約２０、約２５、約３０、約３５、約４０、約４５、約５５、または約６０のモル百分率で；及びカチオン性脂質、例えば、ＤＯＴＡＰ、ＩＣＥ、ＤＤＡＢ、またはカチオン性コレステロール脂質を、全脂質に対して約１５、約２０、約２５、約３０、約３５、約４０、約４５、または約５０のモル百分率で含んでもよい。

【０２１１】

本開示のいくつかの実施形態では、ＬＮＰは、約２５％～約３５％のモル百分率のカチオン性脂質を含む。いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、約３０％のモル百分率のカチオン性脂質を含む。

【０２１２】

本開示のいくつかの実施形態では、ＬＮＰは、構造脂質を含む。いくつかの実施形態では、構造脂質は、ＤＯＰＣである。いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、総脂質の約１％、約２％、約３％、約４％、または約５％のモル比でＤＯＰＣを含む。

【０２１３】

本開示のいくつかの実施形態では、ＬＮＰは、構造脂質を実質的に含まない、及び／または最大１％の構造脂質を含む。

【０２１４】

本開示のいくつかの実施形態では、ＬＮＰは、コレステロールを含む。いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、総脂質に対して約２０％～約４０％のモル百分率のコレステロールを含む。いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、コレステロールを実質的に含まない。

【０２１５】

本開示のいくつかの実施形態では、ＬＮＰは、絶縁体脂質を含む。いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、約０．１％～約２％のモル比で絶縁体脂質を含む。いくつかの実施形態

では、ＬＮＰは、約０．５％～約１．５％のモル比で絶縁体脂質を含む。いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、絶縁体脂質を実質的に含まない。

【０２１６】

ポリマーナノ粒子

いくつかの実施形態では、好適な送達ビヒクルは、担体としてポリマーを単独で、または本明細書に記載の様々な脂質を含む他の担体と組み合わせて使用して製剤化される。従って、いくつかの実施形態では、本明細書で使用されるリポソーム送達ビヒクルは、ナノ粒子を含むポリマーも包含する。好適なポリマーとしては、例えば、ポリアクリラート、ポリアルアルキルシアノアクリラート、ポリラクチド、ポリラクチド－ポリグリコリドコポリマー、ポリカプロラクトン、デキストラン、アルブミン、ゼラチン、アルギナート、コラーゲン、キトサン、シクロデキストリン、プロタミン、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）修飾（ＰＥＧ化）プロタミン、ポリ－Ｄ－リジン（ＰＬＬ）、ＰＥＧ化ＰＬＬ、及びポリエチレンイミン（ＰＥＩ）が挙げられる。ＰＥＩが存在する場合、それは、１０～４０ｋＤＡの範囲の分子量の直鎖状または分枝状ＰＥＩ、例えば、２５ｋＤａの分枝状ＰＥＩ（Ｓｉｇｍａ番号４０８７２７）であってよい。いくつかの実施形態では、ＰＥＧ化脂質は、１４：０のＰＥＧ２０００ＰＥ及び／またはＤＭＧ－ＰＥＧ２０００である。

【０２１７】

肺標的化

本明細書に開示の送達ビヒクルは、肺を優先的に標的とする。様々な実施形態では、送達ビヒクルは、肝臓と比較して、ポリヌクレオチド、例えば、ｍＲＮＡ、を肺細胞に１０、10^2、10^3、10^4、10^5、10^6、10^7、10^8、10^9、または10^{10}倍効果的に送達及び／またはトランスフェクトし得る。本明細書で提供されるＬＮＰ組成物は、肝臓と比較して、肺にポリヌクレオチド、例えば、ＲＮＡ、を優先的に送達及び／またはトランスフェクトする。

【０２１８】

しかし、非標的細胞／器官へのあるレベルの送達は、標的器官／細胞における有効性を減少させることなく許容され得ることが理解されるであろう。いくつかの実施形態では、送達ビヒクルの脂質組成物は、当該技術分野で既知の他の脂質組成物と比較して、肺への送達を増強する。他の実施形態では、送達ビヒクルの脂質組成物は、他の脂質組成物と比較して肺への送達を増強する。いくつかの実施形態では、コレステロールの存在またはレベルは、肺への送達ビヒクル、例えば、ＬＮＰまたは細胞外小胞の送達を増強する。いくつかの実施形態では、送達ビヒクルは、特定の器官、例えば、肺、への送達を強化する器官特異的標的化リガンドを含む。

【０２１９】

ＩＩＩ．ｍＲＮＡ及びナノ粒子送達ビヒクル組成物の製剤

ｍＲＮＡ及び脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）の合成方法は、十分に確立されている。例えば、５’キャップ、５’及び３’ＵＴＲコード配列、ならびにポリＡテールを含む合成ｍＲＮＡは、ＲＮＡポリメラーゼ、例えば、Ｔ７　ＲＮＡポリメラーゼを使用したＤＮＡテンプレートのｉｎ　ｖｉｔｒｏ転写により修飾及び未修飾ヌクレオチドから合成され得る。ＤＮＡテンプレートは、例えば、ＰＣＲまたはプラスミド増幅及び制限消化、それに続く精製により生成され得る。

【０２２０】

ｍＲＮＡを担持する脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）、リポソーム、またはポリマーナノ粒子送達ビヒクルは、例えば、有機溶媒、例えば、エタノール中の脂質またはポリマーを、水性緩衝液中の１つ以上のｍＲＮＡと混合し、次に、緩衝液交換及び濃縮にかけることにより生成され得る。いくつかの実施形態では、ＬＮＰ、リポソーム、またはポリマーナノ粒子送達ビヒクルは、試薬を迅速に混合し、制御されたサイズの単分散粒子を形成するために、マイクロ流体デバイスを使用して生成され得る。例えば、マイクロ流体ミキサーは、ｓｔａｇｇｅｒｅｄ　ｈｅｒｒｉｎｇｂｏｎｅ　ｍｉｘｅｒ（ＳＨＭ）であり得る。例えば、マイクロ流体ミキサーは、Ｐｒｅｃｉｓｉｏｎ　Ｎａｎｏｓｙｓｔｅｍｓ（ＰＮＩ）製

のＮａｎｏＡｓｓｓｅｍｂｌｒで製造することができる。他の実施形態では、ＬＮＰ、リポソーム、またはポリマーナノ粒子送達ビヒクルは、Ｔミキサーで生成され得る。いくつかの実施形態では、ＬＮＰ、リポソーム、またはポリマーナノ粒子は、ｍＲＮＡを封入し、及び／または静電相互作用を通じて１つ以上のｍＲＮＡと結合させ得る。ＬＮＰ、リポソーム、またはポリマーナノ粒子の緩衝液交換及び濃縮は、タンジェンシャルフロー濾過で実施され得る。他の実施形態では、ＬＮＰ、リポソーム、またはポリマーナノ粒子の緩衝液交換及び濃縮は、公称分子量カットオフが５００，０００Ｄａ以下、例えば、１００，０００Ｄａ、の膜を使用する遠心限外濾過で実施され得る。

【０２２１】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）製剤は、肺細胞集団の少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、または少なくとも９５％をトランスフェクトすることが可能である。

【０２２２】

本開示の脂質膜構造体の形態は、特に限定されない。例えば、本開示の脂質が水性溶媒に分散される形態として、リポソーム（例えば、単層リポソーム、多層リポソームなど）、球状ミセル、紐状ミセル、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）、または不特定の層状の構造物。

【０２２３】

本開示の脂質膜構造体は、さらに、他の構成成分を含有してもよい。他の構成成分の例としては、脂質（リン脂質（例えば、ホスファチジルイノシトール、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、ホスファチジン酸、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルコリン）、糖脂質、ペプチド脂質、コレステロール、イオン性脂質、カチオン性脂質、ＰＥＧ化脂質など）、界面活性剤（例えば、３［（３－コールアミドプロピル）ジメチルアンモニオ］プロパンスルホナート、コール酸ナトリウム塩、オクチルグリコシド、ＮＤ－グルコ－Ｎ－メチルアルカンアミド）、ポリエチレングリコール、タンパク質などが挙げられる。本開示の脂質膜構造体におけるその他の成分の含有量は、通常、５～９５モル％、任意に、１０～９０モル％、または３０～８０モル％、である。

【０２２４】

本開示の脂質膜構造体は、好適な溶媒または分散媒、例えば、水系溶媒またはアルコール系溶媒に、本開示の脂質及び他の構成成分（脂質など）、ならびに、必要に応じて、組織、を懸濁させることにより調製される。それは、結晶化を誘発する操作を実施ことにより調製することができる。

【０２２５】

「組織化を誘発するための操作」の例としては、マイクロ流路やボルテックスを使用したエタノール希釈法、簡易水和法、例えば、超音波処理、加熱、ボルテックス、エーテル注入法、フレンチプレス法、及びコール酸法が挙げられる。その例としては、それ自体既知の方法、例えば、Ｃａ２＋融合法、凍結融解法、及び逆相蒸発法が挙げられるが、これらに限定されない。

【０２２６】

核酸は、本開示のイオン性脂質を含有する脂質膜構造中に核酸を封入し、それを細胞と接触させることにより、ｉｎ　ｖｉｖｏ及び／またはｉｎ　ｖｉｔｒｏで細胞に導入することができる。従って、本開示は、本開示のイオン性脂質または脂質膜構造体を含む核酸導入剤を提供する。

【０２２７】

本開示の核酸導入剤は、任意の核酸を細胞に導入し得る。核酸の例としては、ＤＮＡ、ＲＮＡ、ＲＮＡキメラ核酸、ＤＮＡ／ＲＮＡハイブリッドなどが挙げられるが、これらに限定されない。核酸は、１～３本鎖のいずれか１つであり得るが、任意に、一本鎖または二本鎖である。核酸は、プリンもしくはピリミジン塩基のＮ－グリコシドである他のタイプのヌクレオチド、または非ヌクレオチド主鎖を有する他のオリゴマー（例えば、市販のペプチド核酸（ＰＮＡ）など）もしくは特別な結合を有する他のオリゴマーであってよい。オリゴマーは、ＤＮＡまたはＲＮＡに見出されるような塩基対合または塩基結合を可能

にする構成を有するヌクレオチドを含有し得る。さらに、核酸は、例えば、既知の修飾核酸、標識核酸、キャップされた核酸、メチル化核酸、または当該技術分野で既知の１つ以上の天然ヌクレオチド、分子内ヌクレオチド修飾核酸、非荷電結合を有する核酸（例えば、メチルスルホナート、ホスホトリエステル、ホスホルアミダート、カルバマートなど）、荷電結合または硫黄含有結合（例えば、ホスホロチオアート）、タンパク質などの側鎖基（例えば、ヌクレアーゼ、ヌクレアーゼ阻害剤、毒素、抗体、シグナルペプチド、ポリ－Ｌ－リジンなど）及び糖（例えば、単糖）、核酸及び相互化合物を含む核酸（例えば、アクリジン、ソラレンなど）、キレート化合物（例えば、金属、放射性金属、ホウ素、酸化性金属など）を含有する核酸、アルキル化剤を含む核酸、ならびに修飾結合を有する核酸（例えば、アルファアノマー核酸など）で置換されてもよい。

【０２２８】

本開示で使用することができるＤＮＡのタイプは、特に限定されず、使用目的に応じて適宜選択することができる。例としては、プラスミドＤＮＡ、ｃＤＮＡ、アンチセンスＤＮＡ、染色体ＤＮＡ、ＰＡＣ、ＢＡＣ、及びＣｐＧオリゴ、任意に、プラスミドＤＮＡ、ｃＤＮＡ、及びアンチセンスＤＮＡ、またはプラスミドＤＮＡが挙げられる。プラスミドＤＮＡなどの環状ＤＮＡは、制限酵素などで適宜消化して、直鎖状ＤＮＡとして使用することができる。

【０２２９】

本開示で使用することができるＲＮＡのタイプは、特に限定されず、使用目的に応じて適宜選択することができる。例えば、ｓｉＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ、アンチセンスＲＮＡ、メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）、一本鎖ＲＮＡゲノム、二本鎖ＲＮＡゲノム、ＲＮＡレプリコン、トランスファーＲＮＡ、リボソームＲＮＡなど、任意に、ｓｉＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ、ｍＲＮＡ、アンチセンスＲＮＡ、ＲＮＡレプリコン。

【０２３０】

本開示で使用される核酸は、任意に、当業者らに通常使用される方法で精製される。

【０２３１】

核酸を封入した本開示の核酸導入剤は、例えば、疾患の予防及び／または処置を目的としてｉｎ　ｖｉｖｏで投与することができる。従って、本開示で使用される核酸は、任意に、所与の疾患に対する予防活性及び／または治療活性を有する核酸（予防／治療用核酸）である。そのような核酸の例としては、いわゆる遺伝子治療に使用される核酸が挙げられる。

【０２３２】

本開示の核酸導入剤を使用して、細胞に核酸を導入するために、本開示の脂質膜構造体を形成する場合に、標的核酸を共存させることにより核酸を封入した。本開示の脂質膜構造体が形成される。例えば、リポソームがエタノール希釈法で形成される場合、核酸水溶液と、本開示の脂質膜構造体の構成成分（脂質など）のエタノール溶液とを、ボルテックスまたはマイクロチャネルなどで激しく混合される。適切な緩衝液で希釈される。リポソームが単純水和法で形成される場合、本開示の脂質膜構造体の構成成分（脂質など）を適切な有機溶媒に溶解し、その溶液は、ガラス容器に入れて、溶媒は、減圧下で乾燥させることにより保持させ、放置して脂質フィルムを得る。ここで、核酸の水溶液を添加し、水和させ、続いて、ソニケーターで超音波処理する。本開示は、そのような核酸が封入される上記脂質膜構造体も提供する。

【０２３３】

核酸が封入される脂質膜構造の例は、核酸及びイオン性脂質間で静電複合体を形成することにより核酸に封入されたＬＮＰである。このＬＮＰは、核酸などを特定の細胞に選択的に送達する薬物送達システムとして使用することができる。例えば、樹状細胞に抗原遺伝子、腫瘍の遺伝子治療薬、ＲＮＡを導入するＤＮＡワクチン。それは、干渉を使用して標的遺伝子の発現を抑制する核酸薬物に有用である。

【０２３４】

本開示の核酸を封入する脂質膜構造体の粒子径は、特に限定されないが、任意に、１０

ｎｍ～５００ｎｍまたは２０ｎｍ～２００ｎｍである。粒子径は、Ｚｅｔａｓｉｚｅｒ Ｎａｎｏ（Ｍａｌｖｅｒｎ）などの粒度分布測定装置を使用して測定することができる。脂質膜構造体の粒径は、脂質膜構造体の調製方法に応じて適宜調整することができる。

【０２３５】

核酸を封入する本開示の脂質膜構造体の表面電位（ゼータ電位）は、特に限定されないが、－６０～＋６０ｍＶ、－４５～４５ｍＶ、－３０～＋３０ｍＶ、－１５～＋１５ｍＶ、または－１０～＋１０ｍＶであり得る。脂質膜構造体のゼータ電位は、正（＞０ｍＶ）、＋５ｍＶ～＋６０ｍＶ、＋３０ｍＭ～＋４５ｍＶ、または＋１０ｍＶ～＋４５ｍＶであり得る。従来の遺伝子導入では、正の表面電位を有する粒子が、主に使用されている。これは、負荷電細胞表面のヘパリン硫酸との静電相互作用を促進し、細胞への取り込みを促進する方法として有用であるが、表面正電荷は、細胞内に送達される。核酸との相互作用による担体からの核酸遊離が抑制され、ｍＲＮＡ及び送達核酸との相互作用によるタンパク質合成が抑制される可能性がある。表面電荷を上記範囲内に調整することにより、この問題を解決することができる。表面電荷は、Ｚｅｔａｓｉｚｅｒ Ｎａｎｏなどのゼータ電位測定デバイスを使用することにより測定することができる。脂質膜構造体の表面電荷は、脂質膜構造体の構成成分の組成により調整することができる。

【０２３６】

本開示の脂質膜構造体の脂質膜表面ｐＫａ（以下、リポソームｐＫａと呼ばれる）は、特に限定されないが、ｐＫａが５．５～７．２またはｐＫａが６．０～６．８を有してもよい。リポソームのｐＫａは、エンドサイトーシスにより取り込まれた脂質膜構造が、エンドソーム内の弱酸性環境下において脂質膜構造のプロトン化を受けやすいことを示す指標として使用される。リポソームのｐＫａは、脂質膜構造体の構成成分の組成により調整することができる。

【０２３７】

本開示の脂質膜構造体の溶血活性（膜融合能）は、特に限定されないが、生理的ｐＨ（ｐＨ７．４）において溶血活性を有さない（５％未満）ことがあり、エンドソーム性のものであってよい。溶血活性が高いほど、核酸は、より効率的に細胞質に送達することができる。しかし、溶血活性が生理学的ｐＨで存在する場合、核酸は、血液中に存在中に意図しない細胞に送達され、その結果、標的指向性及び毒性が低下する。従って、上述のようにエンドソーム環境においてのみ溶血活性を有することが好ましい。溶血活性は、脂質膜構造体の構成成分の組成により調整することができる。

【０２３８】

核酸が封入される本開示の脂質膜構造体を細胞に接触させることにより、封入された核酸を細胞に導入することができる。細胞は、がん細胞を含有する培養細胞株、個体もしくは組織から単離された細胞、または組織もしくは細胞の組織片であってよい。さらに、細胞は、接着細胞であっても非接着細胞であってもよい。

【０２３９】

本開示の、核酸を封入する脂質膜構造体をｉｎ ｖｉｔｒｏで細胞に接触させるステップは、以下に具体的に説明されるであろう。

【０２４０】

細胞は、脂質膜構造体と接触する数日前に、適切な培地に懸濁され、適切な条件下で培養される。脂質膜構造体と接触すると、細胞は、成長期にあっても、なくてもよい。

【０２４１】

接触時の培地は、血清含有培地でも無血清培地でもよいが、培地中の血清濃度は、３０重量％以下であってもよく、２０重量％以下であってもよい。培地が過剰な血清などのタンパク質を含有する場合、脂質膜構造体及び細胞間の接触が阻害され得る。

【０２４２】

接触時の細胞密度は、特に限定されず、細胞型を考慮して適宜設定することができるが、通常、1×10^{4}～1×10^{7}細胞／ｍＬの範囲である。

【０２４３】

例えば、上記核酸が封入される本開示の脂質膜構造体の懸濁液は、このようにして調製された細胞に添加される。懸濁液の添加量は、特に限定されず、細胞数等を考慮して適宜設定することができる。細胞に接触させる時の脂質膜構造体の濃度は、標的核酸の細胞への導入を達成することができる限りは、特に限定されないが、脂質濃度は、通常、１～１００ｎｍｏｌ／ｍＬであり、０．１～１０μｇ／ｍＬであってよい。

【０２４４】

上記懸濁液を細胞に添加した後、細胞が培養される。培養温度、湿度、CO_2濃度などは、細胞型を考慮して適宜設定される。細胞が哺乳動物細胞である場合、温度は、通常、約３７℃であり、湿度は、約９５％であり、CO_2濃度は、約５％である。加えて、培養時間は、使用される細胞型などの条件を考慮して適宜設定することができるが、０．１～７６時間の範囲または０．２～２４時間の範囲であってよく、０．５～１２時間であってよい。培養時間が短すぎる場合、核酸が細胞内に十分に導入されず、培養時間が長すぎる場合、細胞が弱ることがある。

【０２４５】

核酸は、上記の培養により細胞に導入される。培地は、新しい培地に交換されてもよく、新たな培地は、培地に添加され、培養は、さらに続けられる。細胞が、哺乳動物細胞である場合、新鮮な培地は、血清または栄養因子を含有し得る。

【０２４６】

本開示の脂質膜構造体は、本開示のイオン性脂質に加えて、さらに、他の成分を含有してもよい。他の構成成分の例としては、脂質（リン脂質（例えば、ホスファチジルイノシトール、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、ホスファチジン酸、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルコリン）、糖脂質、ペプチド脂質、コレステロール、カチオン性脂質以外のイオン性脂質、ＰＥＧ脂質など）、界面活性剤（例えば、３－［（３－コールアミドプロピル）ジメチルアンモニオ］プロパンスルホナート、コール酸ナトリウム塩、オクチルグリコシド、ＮＤ－グルコ－Ｎ－メチルアルカンアミド）、ポリエチレングリコール、タンパク質などが挙げられる。

【０２４７】

本開示の脂質膜構造体は、本開示のイオン性脂質及び他の構成成分（脂質など）ならびに必要に応じて、組織を、好適な溶媒または分散媒、例えば、水系溶媒またはアルコール系溶媒に分散させることにより調製される。結晶化を誘発する操作を実施することにより調製することができる。

【０２４８】

「組織化を誘発するための操作」の例としては、マイクロ流路やボルテックスを使用したエタノール希釈法、簡易水和法、例えば、超音波処理、加熱、ボルテックス、エーテル注入法、フレンチプレス法、及びコール酸法が挙げられる。その例としては、それ自体既知の方法、例えば、Ｃａ２＋融合法、凍結融解法、及び逆相蒸発法が挙げられるが、これらに限定されない。

【０２４９】

核酸は、本開示のイオン性脂質を含有する脂質膜構造体中に核酸を封入し、それを細胞と接触させることにより、ｉｎ　ｖｉｖｏ及び／またはｉｎ　ｖｉｔｒｏで細胞に導入することができる。従って、本開示は、本開示のイオン性脂質または脂質膜構造体を含む核酸導入剤を提供する。

【０２５０】

本開示の核酸導入剤は、任意の核酸を細胞に導入し得る。核酸の例としては、ＤＮＡ、ＲＮＡ、ＲＮＡキメラ核酸、ＤＮＡ／ＲＮＡハイブリッドなどが挙げられるが、これらに限定されない。核酸は、１～３本鎖のいずれか１つであり得るが、一本鎖でも二本鎖でもよい。核酸は、プリンもしくはピリミジン塩基のＮ－グリコシドである他のタイプのヌクレオチド、または非ヌクレオチド主鎖を有する他のオリゴマー（例えば、市販のペプチド核酸（ＰＮＡ）など）または特別な結合を有する他のオリゴマーであってよい。オリゴマーは、ＤＮＡまたはＲＮＡに見出されるような塩基対合または塩基結合を可能にする構成

を有するヌクレオチドを含有し得る。

【０２５１】

本開示で使用することができるＲＮＡのタイプは、特に限定されず、使用目的に応じて適宜選択することができる。例えば、ｓｉＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ、アンチセンスＲＮＡ、メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）、一本鎖ＲＮＡゲノム、二本鎖ＲＮＡゲノム、ＲＮＡレプリコン、トランスファーＲＮＡ、リボソームＲＮＡなど、またはｓｉＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ、ｍＲＮＡ、アンチセンスＲＮＡ、もしくはＲＮＡレプリコン。

【０２５２】

本開示で使用される核酸は、当業者らに通常使用される方法で精製され得る。

【０２５３】

核酸を封入した本開示の核酸導入剤は、例えば、疾患の予防及び／または処置を目的としてｉｎ　ｖｉｖｏで投与することができる。従って、本開示で使用される核酸は、所定の疾患に対する予防活性及び／または治療活性を有する核酸（予防／治療用核酸）であってよい。そのような核酸の例としては、いわゆる遺伝子治療に使用される核酸が挙げられる。

【０２５４】

ＩＶ．処置方法

本明細書に記載の処置方法は、１つ以上のＴＥＲＴ　ｍＲＮＡ配列を含む組成物の投与による、それを必要とする対象の線維性疾患及び／または肺疾患及び／または肺線維症の処置を指す。本開示の組成物及び方法は、線維症を含む線維症状態の処置に使用され得る。いくつかの実施形態では、線維症を含む線維症状態の処置を目的とした本開示の組成物及び／または組成物の使用方法は、肺細胞においてＴＥＲＴ発現を誘発するか、またはＴＥＲＴ活性を増加させる。いくつかの実施形態では、線維症を含む線維症状態の処置を目的とした本開示の組成物及び／または組成物の使用方法は、細胞毒性、組織毒性、または全身毒性を誘発しない。組成物は、全身的に、例えば、静脈内に投与され得る。

【０２５５】

テロメラーゼ逆転写酵素（ＴＥＲＴ）ｍＲＮＡの投与量及びタイミング

本明細書に記載の組成物及び方法において、いくつかの実施形態では、ＴＥＲＴ　ｍＲＮＡは、それを必要とする対象に、約０．００１ｍｇ／ｋｇ対象の体重～約２．０ｍｇ／ｋｇ対象の体重の用量で投与される。いくつかの実施形態では、ＴＥＲＴ　ｍＲＮＡは、それを必要とする対象に、約０．０１ｍｇ／ｋｇの用量で；いくつかの実施形態では、約０．０２５ｍｇ／ｋｇの用量で；いくつかの実施形態では、約０．０５ｍｇ／ｋｇの用量で；いくつかの実施形態では、約０．０７５ｍｇ／ｋｇの用量で；いくつかの実施形態では、約０．１ｍｇ／ｋｇの用量で；いくつかの実施形態では、約０．１２５ｍｇ／ｋｇの用量で；いくつかの実施形態では、約０．１５０ｍｇ／ｋｇの用量で；いくつかの実施形態では、約０．１７５ｍｇ／ｋｇの用量で；いくつかの実施形態では、約０．２ｍｇ／ｋｇの用量で；いくつかの実施形態では、約０．５ｍｇ／ｋｇの用量で；いくつかの実施形態では、約０．７５ｍｇ／ｋｇの用量で；いくつかの実施形態では、約１．０ｍｇ／ｋｇの用量で；いくつかの実施形態では、約１．２５ｍｇ／ｋｇの用量で；いくつかの実施形態では、約１．５ｍｇ／ｋｇの用量で；または、いくつかの実施形態では、約２．０ｍｇ／ｋｇの用量で投与される。いくつかの実施形態では、ＴＥＲＴ　ｍＲＮＡは、それを必要とする対象に０．１ｍｇ／ｋｇの用量で投与される。いくつかの実施形態では、ＴＥＲＴ　ｍＲＮＡは、それを必要とする対象に０．１２５ｍｇ／ｋｇの用量で投与される。

【０２５６】

いくつかの実施形態では、ＴＥＲＴ　ｍＲＮＡは、それを必要とする対象に単回投与される。いくつかの実施形態では、ＴＥＲＴ　ｍＲＮＡは、それを必要とする対象に２回、３回、４回、または５回以上投与される。いくつかの実施形態では、ＴＥＲＴ　ｍＲＮＡは、週に２回、毎週、２週間毎、４週間毎、６週間毎、１２週間毎、または１５週毎に投与される。いくつかの実施形態では、ＴＥＲＴ　ｍＲＮＡは、毎月、２ヶ月毎、３ヶ月毎

、６ヶ月毎、年に１回、継続的に、または医師が決定することにより、投与される。
【０２５７】
ＴＥＲＴ　ｍＲＮＡ併用療法
　いくつかの実施形態では、ＴＥＲＴ　ｍＲＮＡの同時投与は、線維性疾患及び／または肺疾患の処置に使用される他の抗線維化薬と組み合わされ得る。使用され得る薬剤としては、ニンテダニブ、ピルフェニドン、プレドニゾン、アザチオプリン、シクロホスファミド、ミコフェノラートモフェチル、パムレブルマブ、及びＮ－アセチルシステインが挙げられるが、これらに限定されない。
【０２５８】
投与経路
　いくつかの実施形態では、ＴＥＲＴ　ｍＲＮＡは、経口、皮下、静脈内、鼻腔内、皮内、経皮、腹腔内、筋肉内、肺内、膣内、直腸内、または眼内に送達され得る。例示的な実施形態では、ＴＥＲＴ　ｍＲＮＡは、静脈内または吸入により投与され得る。
【０２５９】
対象及び処置
　本明細書に記載される処置方法は、それを必要とする対象における肺疾患及び／または肺線維症の処置に有用である。肺及び肺線維性疾患には、肺線維症、肺癌、家族性肺線維症、特発性肺線維症、先天性角化異常症を伴う肺線維症、間質性肺疾患（ＩＬＤ）、肺炎、間質性肺炎、結核、気管支炎、肺気腫、肺癌、慢性閉塞性肺疾患（ＣＯＰＤ）、老化関連線維症、肺高血圧症、喘息、及び嚢胞性線維症が含まれ得るが、これらに限定されない。
【０２６０】
　いくつかの実施形態では、本明細書に記載の併用処置を必要とする対象は、遺伝的障害またはテロメラーゼ逆転写酵素（ＴＥＲＴ）の変異を有する対象である。いくつかの実施形態では、対象は、線維症の症状を有さない。他の実施形態では、対象は、症状を有し、処置により症状が完全または部分的に改善される。他の実施形態では、処置は、症状の進行を遅らせる。
【０２６１】
　いくつかの実施形態では、本明細書に記載の処置を必要とする対象は、遺伝的障害またはテロメラーゼ逆転写酵素（ＴＥＲＴ）の変異を有する対象である。いくつかの実施形態では、対象は、肺疾患及び／または肺線維症の症状を有さない。他の実施形態では、対象は、症状を有し、処置により症状が完全または部分的に改善される。他の実施形態では、処置は、症状の進行を遅らせる。
【０２６２】
　いくつかの実施形態では、対象は、ヒトである。
【０２６３】
　いくつかの実施形態では、処置の有効性は、肺で測定され得るか、または、肺機能は、限定されないが、以下を含む方法で実施され得る：スパイロメトリー、体積脈波検査、メタコリン吸入チャレンジ、６分間歩行試験、呼気一酸化窒素試験、動脈血ガス試験、肺体積検査、肺拡散能、心肺運動試験、歩行による酸素濃度測定、呼吸筋力検査、高度シミュレーション試験、運動チャレンジ（前後の肺活量測定あり）、シャント試験（１００％のO_2）、努力性呼気肺活量（ＦＥＶ１）、努力性肺活量（ＦＶＣ）、及び最大換気量（ＭＶＶ）。
【０２６４】
　いくつかの実施形態では、ＴＥＲＴ　ｍＲＮＡの投与は、治療期間中及び／または治療期間後に、対象における線維化組織を、少なくとも５％、少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９９％、または少なくとも１００％低減させる。
【０２６５】

いくつかの実施形態では、ＴＥＲＴ　ｍＲＮＡの投与は、処置を受けていない対象と比較して、経時的な線維化組織の増加を停止または遅延させる。いくつかの実施形態では、ＴＥＲＴ　ｍＲＮＡの投与は、処置期間中及び／または処置期間後に、対象における線維化組織の量の増加を、少なくとも５％、少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９９％、または少なくとも１００％減速させる。

【０２６６】

いくつかの実施形態では、ＴＥＲＴ　ｍＲＮＡの投与は、処置を受けていない対象と比較して肺機能を増加させる。いくつかの実施形態では、ＴＥＲＴ　ｍＲＮＡの投与は、処置期間中及び／または処置期間後に、対象の肺機能を少なくとも５％、少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、または少なくとも５０％増加させる。

【０２６７】

いくつかの実施形態では、ＴＥＲＴ　ｍＲＮＡの投与は、処置を受けない対象と比較して生存を延長する。いくつかの実施形態では、ＴＥＲＴ　ｍＲＮＡの投与は、処置を受けていない対象と比較して、肺移植を受けない生存期間を延長する。いくつかの実施形態では、ＴＥＲＴ　ｍＲＮＡの投与は、治療期間中及び／または治療期間後に、対象の生存を、少なくとも５％、少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９９％、少なくとも１００％、少なくとも２００％、少なくとも３００％、少なくとも４００％、少なくとも５００％、少なくとも１０００％延長する。いくつかの実施形態では、ＴＥＲＴ　ｍＲＮＡの投与は、肺疾患及び／または肺線維症を処置するための入院時間及び／または入院回数を低減させる。いくつかの実施形態では、ＴＥＲＴ ｍＲＮＡの投与は、肺移植までの時間を延長する。

【０２６８】

Ｖ．医薬品の組み合わせ

いくつかの実施形態では、ＴＥＲＴ　ｍＲＮＡを含む組成物には、賦形剤または担体、例えば、水性担体が含まれる。様々な水性担体、例えば、緩衝生理食塩水を使用することができる。組成物は、ｐＨなどの適切な生理学的条件に要求されるような薬学的に許容される補助物質及び緩衝剤、毒性対抗剤、例えば、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、クエン酸ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、及び乳酸ナトリウムを含有してもよい。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、ｐＨ６．４に緩衝された１０ｍＭのクエン酸ナトリウムを含む。組成物は、凍結保護剤、例えば、グリセロール、エチレングリコール、スクロース、プロピレングリコール、またはジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）を含有してもよい。これらの製剤中の活性薬の濃度は、変化し得、選択された特定の投与様式及び患者のニーズに従って、流体の体積、粘度、及び体重に基づいて選択される（例えば、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　Ｓｃｉｅｎｃｅ（１５ｔｈ　ｅｄ．，１９８０）及びＧｏｏｄｍａｎ　＆　Ｇｉｌｌｍａｎ，Ｔｈｅ　Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｂａｓｉｓ　ｏｆ　Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ（Ｈａｒｄｍａｎ　ｅｔ　ａｌ．，ｅｄｓ．，１９９６））。

【０２６９】

ＶＩ．テロメアを伸長する方法

別の態様では、本開示は、テロメアを伸長する方法を提供し、方法は、上記の化合物または組成物のいずれかを、テロメアが短縮された細胞に投与するステップを含み、テロメアは、細胞内で伸長する。本開示は、処置方法も提供し、方法は、上記の化合物または組成物のいずれかを、テロメア伸長を必要とするか、または、それから恩恵を受け得る動物対象に投与するステップを含む。

【０２７０】

いくつかの実施形態では、化合物または組成物は、細胞に投与され、細胞は、単離細胞

であるか、または、細胞培養物、単離組織培養物、単離器官などの一部である（すなわち、投与は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏである）。

【０２７１】

他の実施形態では、化合物または組成物は、対象由来の細胞（複数可）、組織、または器官を単離することなく投与される（すなわち、投与は、ｉｎ　ｖｉｖｏである）。これらの実施形態のいくつかでは、化合物または組成物は、対象の体内の全て、または、ほぼ全ての細胞に送達される。いくつかの実施形態では、化合物または組成物は、対象の体内の特定の細胞、細胞型、組織、または器官に送達される。

【０２７２】

本開示の化合物または組成物の投与は、細胞内でテロメラーゼ活性の一過性発現をもたらし得る。活性の増加は、例えば、テロメラーゼリピート増幅プロトコール（ＴＲＡＰ）アッセイなどの様々なアッセイで測定され得る。ＴＲＡＰアッセイの市販バージョン、例えば、テロメラーゼ活性の高感度検出及び定量を提供するＴｒａｐｅｚｅ（登録商標）テロメラーゼ検出キット（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）が利用可能であるが、他の測定技術も可能である。

【０２７３】

以前に認められるように、本手法の利点の１つは、処置された細胞においてテロメラーゼ活性の発現が一過性であることである。特に、そのような一過性発現は、テロメラーゼ逆転写酵素遺伝子がエピソームＤＮＡ部分に存続するか、または、細胞のゲノム配列に挿入されるか、あるいは、別の方法で、標的細胞の遺伝子構成を永久に改変し且つ核酸配列の構成的活性がもたらされる以前の技術とは対照的である。

【０２７４】

図１は、本明細書に開示の化合物、組成物、及び方法の利点のいくつかをグラフで示す。特に、これらの化合物、組成物、及び方法により可能になるテロメア伸長の速度により、ＴＥＲＴ　ｍＲＮＡの非常に稀な送達によるテロメアの維持が可能になる。発現されたテロメラーゼ活性は、ターンオーバーされる前に短期間でテロメアを急速に延長し、それにより、ほとんどの時間、テロメア短縮の防御的な抗がん機序が機能することが可能になる。処置の間に、正常なテロメラーゼ活性及びテロメア短縮が存在し、それ故、制御不能な増殖を防ぐテロメア短縮による抗がん安全機序はそのまま維持されるが、短いテロメア関連疾患のリスクは低いままである。対照的に、テロメアを延長するための小分子処置は、長期にわたる送達を要求し、それにより、慢性がんのリスクが存在し得、治療効果が最小限である。

【０２７５】

本発明の方法のいくつかの実施形態では、一過性発現は、細胞周期とは無関係である。

【０２７６】

上述したように、テロメラーゼ逆転写酵素の一過性発現により、処置された細胞内で短縮テロメアが伸長する。テロメア長は、当業者には理解されるように、末端制限フラグメント（ＴＲＦ）長分析、ｑＰＣＲ、ＭＭｑＰＣＲ、ＴｅＳＬＡ、フローＦＩＳＨ、及びＱ－ＦＩＳＨなどの手法を使用して測定することができる。いくつかの実施形態では、本方法は、処置された細胞の平均テロメア長を、少なくとも０．１ｋｂ、少なくとも０．２ｋｂ、少なくとも０．３ｋｂ、少なくとも０．４ｋｂ、少なくとも０．５ｋｂ、少なくとも１ｋｂ、少なくとも２ｋｂ、少なくとも３ｋｂ、少なくとも４ｋｂ、少なくとも５ｋｂ、またはそれ以上増加させる。いくつかの実施形態では、本方法は、特定の長さ未満の、例えば、１ｋｂ、２ｋｂ、３ｋｂ、４ｋｂ、５ｋｂ、またはそれ以上の長さを有するテロメアの割合を低減させる。

【０２７７】

本発明の化合物、組成物、及び方法の利点の１つは、これらの手法で達成されるテロメアの伸長の迅速さである。技術は、処置を短時間にし、それにより、処置間隔を長くすることができ、それにより、処置が安全に行え得る。その理由は、通常の保護的なテロメア短縮機序が、ほとんどの場合、すなわち、処置間に、そのまま維持される。

【０２７８】
テロメラーゼ逆転写酵素の一過性発現は、処置された細胞の複製能力の増加ももたらす。複製能力の増加は、そのような細胞中のさらなる集団倍加を測定することにより、複製老化に近づいている細胞において容易に監視される。老化細胞は、正常な細胞を分裂させる多くの条件、例えば、培養中の継代または血清による処置、に応じて分裂しない。さらに、老化細胞は、多くの場合、ｐＨ依存性のβ－ガラクトシダーゼ活性の発現、細胞周期阻害剤ｐ５３及びｐ１９の発現、ならびに遺伝子発現パターンの他の変化、及び細胞サイズの拡大を特徴とする。ＴＥＲＴ　ｍＲＮＡによる処置がなければ、特定の細胞型（例えば、ヒト肺線維芽細胞）は、通常、出生後老化する前に５０～６０倍に倍増することが、当該技術分野で既知である。しかし、ＴＥＲＴ　ｍＲＮＡ処置を行うと、これらの細胞は、さらに１６～２８倍の集団倍加を達成する。数週間後に再度処置される場合、追加の増殖能力が再び与えられる。テロメアを定期的に再延長する断続的な処置のこのプロセスは、要因、例えば、テロメアの短縮速度、細胞分裂の速度、及び処置によりもたらされるテロメア伸長の量に応じた処置間の間隔で、さらに何回も適用され得る。同様に、本組成物を用いる処置をしなかった高齢者由来のヒト微小血管真皮内皮細胞は、１～２の集団倍加のみを達成し得るが、処置された細胞は、３、４、またはそれ以上の集団倍加を達成し得る。

【０２７９】
従って、いくつかの実施形態では、本処置方法は、処置された細胞の集団倍加数を増加させる。

【０２８０】
本開示の組成物は、テロメアの維持には直接関与しないが、テロメアの短縮をもたらす遺伝子の変異に起因する遺伝性疾患を処置し得る。そのような疾患には、例えば、先天性角化異常症（ＤＣ）と、肺線維症、肺疾患、骨髄不全、及び無形成性貧血の形態が含まれる。

【０２８１】
さらに、様々なタイプのがんが、本開示の化合物を用いる処置により予防または遅延され得、実に、極めて短いテロメアにより引き起こされる染色体間融合が、がんの原因であると考えられている。

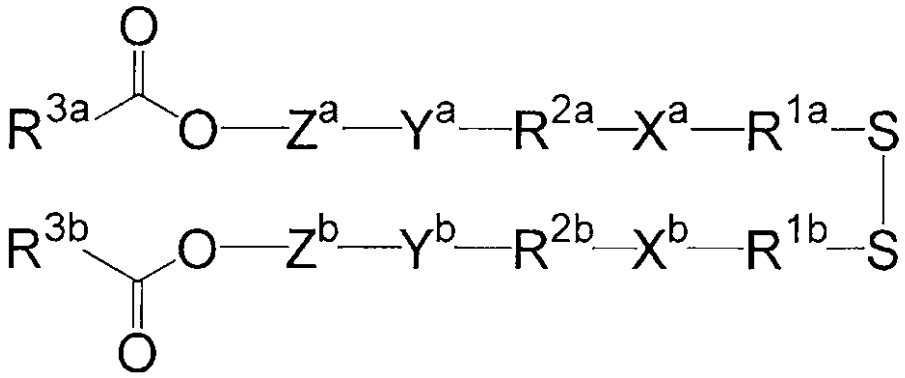
【０２８２】
ＶＩＩ．治療キット
ＴＥＲＴ　ｍＲＮＡまたはその配列（相補的配列を含む）の医薬組成物、及び使用説明書を含む治療キットも本明細書で企図される。いくつかの実施形態では、治療キットは、限定されないが、注射器、吸入器、ネブライザー、及びバイアルまたは容器を含む、投与のためのデバイスを含む。

【０２８３】
別の態様では、本開示は、哺乳動物細胞のテロメアの伸長に使用される、すぐに使用できるキットを提供する。キットは、上記の化合物または組成物のいずれかを、使用説明書と共に含む。いくつかの実施形態では、キットは、さらに、パッケージ材料を含む。いくつかの実施形態では、パッケージ材料は、気密である。これらの実施形態では、パッケージ材料は、任意に、不活性ガス、例えば、窒素、アルゴンなどを充填されてもよい。いくつかの実施形態では、パッケージ材料は、例えば、密封アルミニウムパウチなどの金属箔容器を含む。そのようなパッケージ材料は、当業者らには周知である。キットは、本明細書に記載の脂質などの送達ビヒクルも含んでもよい。いくつかの実施形態では、製剤の１つ以上の構成成分は、凍結保護剤と共に凍結されて、または凍結乾燥されて提供される。

【０２８４】
いくつかの実施形態では、キットは、さらに、乾燥剤、培地、ＲＮａｓｅ阻害剤、またはそのような他の構成成分を含んでもよい。いくつかの実施形態では、キットは、さらに、これらの追加の構成成分のうちの２つ以上の組み合わせを含んでもよい。いくつかのキットの実施形態では、キットの組成物は、無菌である。

【０２８５】
列挙された実施形態
本開示は、以下に列挙された例示的な実施形態を参照することにより定義され得る。
【０２８６】
実施形態Ｉ
実施形態Ｉ－１．（ｉ）テロメラーゼ逆転写酵素（ＴＥＲＴ）をコードするリボ核酸（ＲＮＡ）及び（ｉｉ）送達ビヒクルを含み、（ｉ）のＲＮＡが、１つ以上の修飾ヌクレオチドを含み、（ｉｉ）の送達ビヒクルが、（ｉ）のＲＮＡに作動可能に連結されている、組成物。
【０２８７】
実施形態Ｉ－２．前記送達ビヒクルが、ナノ粒子、リポソーム、カチオン性脂質、イオン性脂質、エクソソーム、脂質ナノ粒子、天然リポタンパク質粒子、及び人工リポタンパク質粒子のうちの１つ以上を含む、実施形態Ｉ－１の組成物。
【０２８８】
実施形態Ｉ－３．前記送達ビヒクルが、脂質ナノ粒子を含む、実施形態Ｉ－１の組成物。
【０２８９】
実施形態Ｉ－４．前記送達ビヒクルが、イオン性脂質ナノ粒子を含む、実施形態Ｉ－１の組成物。
【０２９０】
実施形態Ｉ－５．前記送達ビヒクルが、標的化脂質を含む、実施形態Ｉ－１～Ｉ－４のいずれか１つの組成物。
【０２９１】
実施形態Ｉ－６．前記標的化脂質が、肝細胞と特異的または選択的に相互作用する、実施形態Ｉ－５の組成物。
【０２９２】
実施形態Ｉ－７．前記標的化脂質が、コレステロールを含む、実施形態Ｉ－６の組成物。
【０２９３】
実施形態Ｉ－８．前記標的化脂質が、肺細胞と特異的または選択的に相互作用する、実施形態Ｉ－５の組成物。
【０２９４】
実施形態Ｉ－９．前記標的化脂質が、１，２－ジオレオイル－３－トリメチルアンモニウム－プロパン（ＤＯＴＡＰ）、Ｎ，Ｎ－ジステアリル－Ｎ，Ｎ－ジメチルアンモニウムブロミド（ＤＡＢＢ）、または１，２－ジミリストイル－ｓｎ－グリセロ－３－エチルホスホコリン（ＥＰＣ）を含む、実施形態Ｉ－８の組成物。
【０２９５】
実施形態Ｉ－１０．前記送達ビヒクルが、以下の式Ｉの化合物を含む、実施形態Ｉ－１～Ｉ－９のいずれか１つの組成物：

【化２０】



（１）

（式中、R^{1a}及びR^{1b}は、それぞれ独立して、１～６つの炭素原子を有するアルキレン基を表し、X^a及びX^bは、それぞれ独立して、１～６つの炭素原子を有する非環状アルキル３級アミノ基及び１つの３級アミノ基、または２～５つの炭素原子、ならびに１～２つの３級アミノ基を有する環状アルキレン３級アミノ基であり、

【０２９６】

R^{2a}及びR^{2b}は、それぞれ独立して、８以下の炭素原子を有するアルキレン基またはオキシジアルキレン基を表し、

【０２９７】

Y^a及びY^bは、それぞれ独立して、エステル結合、アミド結合、カルバマート結合、エーテル結合、またはウレア結合を表し、

【０２９８】

Z^a及びZ^bは、それぞれ独立して、３～１６の炭素原子を有し、少なくとも１つの芳香環を有し、任意に、ヘテロ原子を有する芳香族化合物から誘導される二価の基であり、

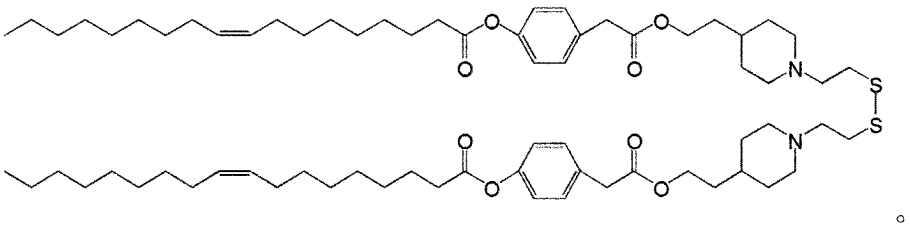
【０２９９】

R^{3a}及びR^{3b}は、それぞれ独立して、水酸基を有する脂溶性ビタミンと無水コハク酸もしくは無水グルタル酸との反応生成物、または水酸基を有するステロール誘導体と無水コハク酸との反応生成物から誘導される残基、または無水グルタル酸との反応生成物から誘導される残基、または１２～２２の炭素原子を有する脂肪族炭化水素基を指す）。

【０３００】

実施形態Ｉ－１１．式Ｉの化合物が、以下である、実施形態Ｉ－１０の組成物：

【化２１】

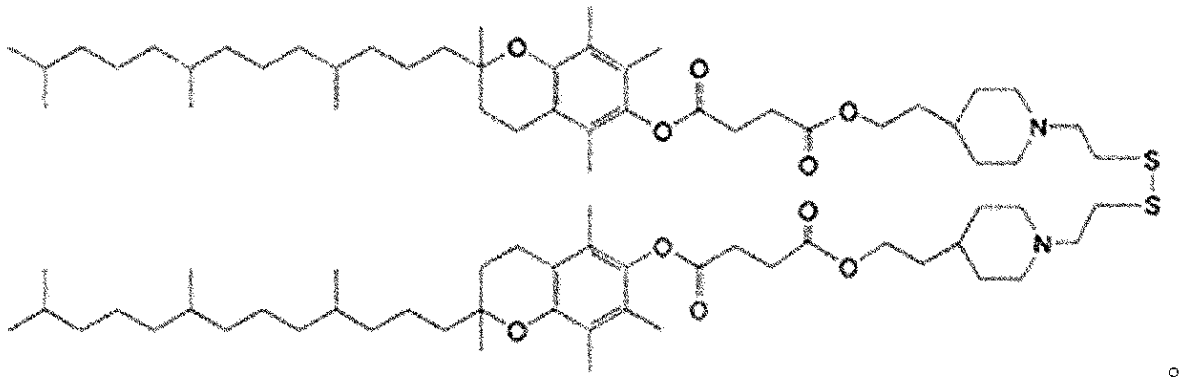


。

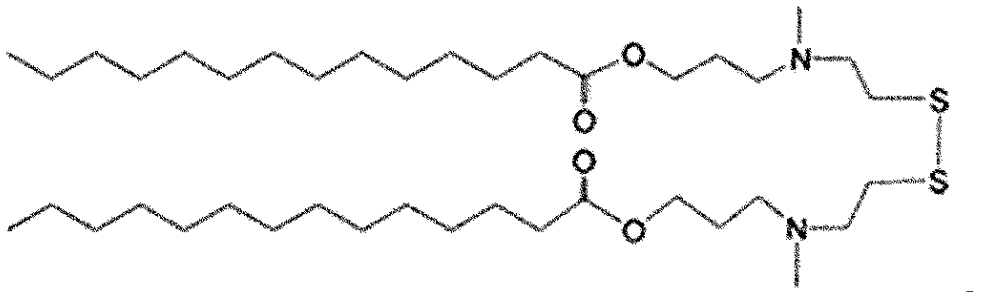
【０３０１】

実施形態Ｉ－１２．式Ｉの化合物が、以下である、実施形態Ｉ－１０の組成物：

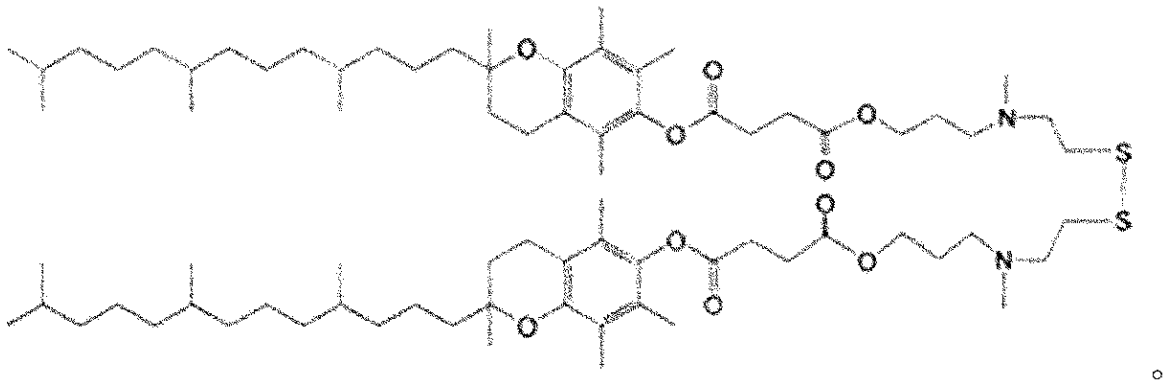
【化２２】



【０３０２】
実施形態Ｉ－１３．式Ｉの化合物が、以下である、実施形態Ｉ－１０の組成物：
【化２３】

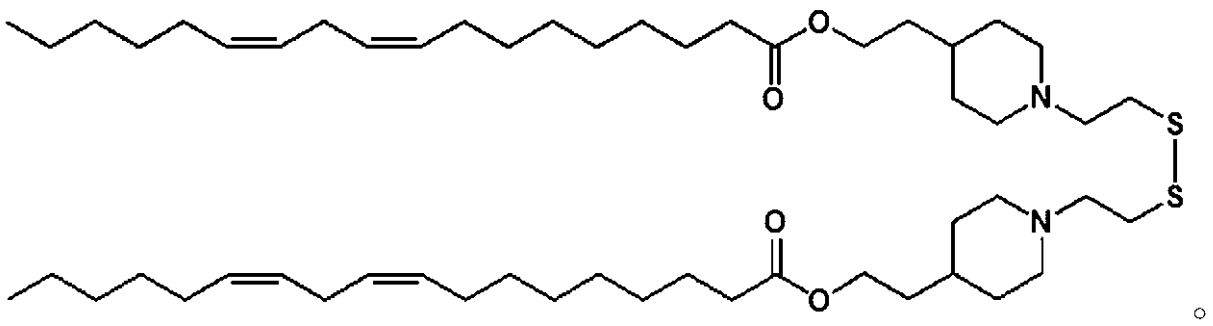


【０３０３】
実施形態Ｉ－１４．式Ｉの化合物が、以下である、実施形態Ｉ－１０の組成物：
【化２４】

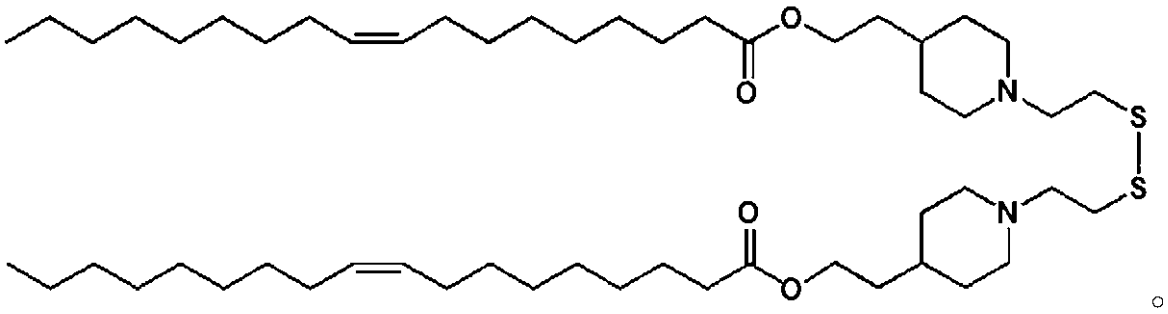


【０３０４】
実施形態Ｉ－１５．式Ｉの化合物が、以下である、実施形態Ｉ－１０の組成物：

【化２５】



【０３０５】
実施形態Ｉ－１６．式Ｉの化合物が、以下である、実施形態Ｉ－１０の組成物：
【化２６】



【０３０６】
実施形態Ｉ－１７．前記ＲＮＡが、配列番号３もしくは４のヒト配列、または配列番号３もしくは４の配列と少なくとも７０％同一の配列を含む、実施形態Ｉ－１～Ｉ－１６のいずれか１つの組成物。
【０３０７】
実施形態Ｉ－１８．前記ＲＮＡが、５’キャップを含む、実施形態Ｉ－１７の組成物。
【０３０８】
実施形態Ｉ－１９．前記５’キャップが、アンチリバースキャップアナログ（ＡＲＣＡ）を含む、実施形態Ｉ－１８の組成物。
【０３０９】
実施形態Ｉ－２０．前記ＡＲＣＡが、３’－Ｏ－Ｍｅ－ｍ７Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）Ｇ構造を含む、実施形態Ｉ－１９の組成物。
【０３１０】
実施形態Ｉ－２１．前記５’キャップが、ｍ７Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）（２’ＯＭｅＡ）ｐＧを含む、実施形態Ｉ－１８の組成物。
【０３１１】
実施形態Ｉ－２２．前記ＲＮＡが、さらに、少なくとも１つの非翻訳領域（ＵＴＲ）を含む、実施形態Ｉ－１～Ｉ－２１のいずれか１つの組成物。
【０３１２】
実施形態Ｉ－２３．前記少なくとも１つのＵＴＲが、（ｉ）のＲＮＡの５’側に位置する、実施形態Ｉ－２２の組成物。
【０３１３】
実施形態Ｉ－２４．前記少なくとも１つのＵＴＲが、（ｉ）のＲＮＡの３’側に位置する、実施形態Ｉ－２２の組成物。

【０３１４】
実施形態Ｉ－２５．前記ＵＴＲが、ヒト配列を含む、実施形態Ｉ－２２～Ｉ－２４のいずれか１つの組成物。
【０３１５】
実施形態Ｉ－２６．前記ＵＴＲが、非ヒト配列を含む、実施形態Ｉ－２２～Ｉ－２４のいずれか１つの組成物。
【０３１６】
実施形態Ｉ－２７．前記ＵＴＲが、キメラ配列を含む、実施形態Ｉ－２２～Ｉ－２６のいずれか１つの組成物。
【０３１７】
実施形態Ｉ－２８．前記キメラ配列が、（ｉ）のＲＮＡの安定性を増加させ、転写速度を増加させ、または転写開始までの時間を減少させる、実施形態Ｉ－２７の組成物。
【０３１８】
実施形態Ｉ－２９．前記ＵＴＲが、α－グロビン、β－グロビン、ｃ－ｆｏｓ、及びタバコエッチウイルスのうちの１つ以上から単離するか、または、それに由来するＵＴＲ配列と少なくとも７０％の同一性を有する配列を含む、実施形態Ｉ－２２～Ｉ－２８のいずれか１つの組成物。
【０３１９】
実施形態Ｉ－３０．前記（ｉ）のＲＮＡの１つ以上の修飾ヌクレオチドが、修飾アデニンまたはそのアナログ、修飾シチジンまたはそのアナログ、修飾グアノシンまたはそのアナログ、及び修飾ウリジンまたはそのアナログのうちの１つ以上を含む、実施形態Ｉ－１～Ｉ－２９のいずれか１つの組成物。
【０３２０】
実施形態Ｉ－３１．前記（ｉ）のＲＮＡの１つ以上の修飾ヌクレオチドが、１－メチルプソイドウリジン、プソイドウリジン、２－チオウリジン、及び５－メチルシチジンのうちの１つ以上を含む、実施形態Ｉ－１～Ｉ－３０のいずれか１つの組成物。
【０３２１】
実施形態Ｉ－３２．前記（ｉ）のＲＮＡの１つ以上の修飾ヌクレオチドが、５－メトキシウリジン（５－ｍｏＵ）を含む、実施形態Ｉ－１～Ｉ－３１のいずれか１つの組成物。
【０３２２】
実施形態Ｉ－３３．前記（ｉ）のＲＮＡのうちの１つ以上の修飾ヌクレオチドが、ｍ１Ａ　１－メチルアデノシン、ｍ６Ａ　Ｎ６－メチルアデノシン、Ａｍ　２’－Ｏ－メチルアデノシン、ｉ６Ａ　Ｎ６－イソペンテニルアデノシン、ｉｏ６Ａ　Ｎ６－（ｃｉｓ－ヒドロキシイソペンテニル）アデノシン、ｍｓ２ｉｏ６Ａ　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、ｇ６Ａ　Ｎ６－グリシニルカルバモイルアデノシン、ｔ６Ａ　Ｎ６－トレオニルカルバモイルアデノシン、ｍｓ２ｔ６Ａ　２－メチルチオ－Ｎ６－トレオニ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（リン酸）、ｍ６　２Ａ　Ｎ６，Ｎ６－ジメチルアデノシン、ｍ６Ａｍ　Ｎ６，２’－Ｏ－ジメチルアデノシン、ｍ６　２Ａｍ　Ｎ６，Ｎ６，２’－Ｏ－トリメチルアデノシン、ｍ１Ａｍ　１，２’－Ｏ－ジメチルアデノシン、ｍ３Ｃ　３－メチルシチジン、ｍ５Ｃ　５－メチルシチジン、Ｃｍ　２’－Ｏ－メチルシチジン、ａｃ４Ｃ　Ｎ４－アセチルシチジン、ｆ５Ｃ　５－ホルミルシチジン、ｍ４Ｃ　Ｎ４－メチルシチジン、ｈｍ５Ｃ　５－ヒドロキシメチルシチジン、ｆ５Ｃｍ　５－ホルミル－２’－Ｏ－メチルシチジン、ｍ１Ｇ　１－メチルグアノシン、ｍ２Ｇ　Ｎ２－メチルグアノシン、ｍ７Ｇ　７－メチルグアノシン、Ｇｍ　２’－Ｏ－メチルグアノシン、ｍ２　２Ｇ　Ｎ２，Ｎ２－ジメチルグアノシン、Ｇｒ（ｐ）２’－Ｏ－リボシルグアノシン（リン酸）、ｙＷウィブトシン、ｏ２ｙＷペルオキシウィブトシン、ＯＨｙＷヒドロキシウィブトシン、ＯＨｙＷ＊低修飾ヒドロキシウィブトシン、ｉｍＧウィオシン、ｍ２，７Ｇ　Ｎ２，７－ジメチルグアノシン、ｍ２，２，７Ｇ　Ｎ２，Ｎ２，７－トリメチルグアノシンＩイノシン、ｍ１Ｉ　１－メチルイノシン、Ｉｍ　２’－Ｏ－メチルイノシン、Ｑキューオシン、ｇａｌＱガラクトシル－キ

ューオシン、ｍａｎＱマンノシル－キューオシン、Ψプソイドウリジン、Ｄジヒドロウリジン、ｍ５Ｕ　５－メチルウリジン、Ｕｍ　２’－Ｏ－メチルウリジン、ｍ５Ｕｍ　５，２’－Ｏ－ジメチルウリジン、ｍ１Ψ　１－メチルプソイドウリジン、Ψｍ２’－Ｏ－メチルプソイドウリジン、ｓ２Ｕ　２－チオウリジン、ｈｏ５Ｕ　５－ヒドロキシウリジン、ｃｈｍ５Ｕ　５－（カルボキシヒドロキシメチル）ウリジン、ｍｃｈｍ５Ｕ　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ｍｃｍ５Ｕ　５－メトキシカルボニルメチルウリジン、ｍｃｍ５Ｕｍ　５－メトキシカルボニルメチル－２’－Ｏ－メチルウリジン、ｍｃｍ５ｓ２Ｕ　５－メトキシカルボニルメチル－２－チオウリジン、ｎｃｍ５Ｕ　５－カルバモイルメチルウリジン、ｎｃｍ５Ｕｍ　５－カルバモイルメチル－２’－Ｏ－メチルウリジン、ｃｍｎｍ５Ｕ　５－カルボキシメチルアミノメチルウリジン、ｍ３Ｕ　３－メチルウリジン、ｍ１ａｃｐ３Ψ　１－メチル－３－（３－アミノ－３－カルボキシプロピル）プソイドウリジン、ｃｍ５Ｕ　５－カルボキシメチルウリジン、ｍ３Ｕｍ　３，２’－Ｏ－ジメチルウリジン、ｍ５Ｄ　５－メチルジヒドロウリジン、τｍ５Ｕ　５－タウリノメチルウリジン、τｍ５ｓ２Ｕ　５－タウリノメチル－２－チオウリジン、２－アミノアデノシン、２－アミノ－６－クロロプリンリボシド、８－アザアデノシン、６－クロロプリンリボシド、５－ヨードシチジン、５－ヨードウリジン、イノシン、２’－Ｏ－メチルイノシン、キサントシン、４－チオウリジン、Ｏ６－メチルグアノシン、５，６－ジヒドロウリジン、２－チオシチジン、６－アザシチジン、６－アザウリジン、２’－Ｏ－メチル－２－アミノアデノシン、２’－Ｏ－メチルプソイドウリジン、Ｎ１－メチルアデノシン、２’－Ｏ－メチル－５－メチルウリジン、７－デアザグアノシン、８－アジドアデノシン、５－ブロモシチジン、５－ブロモウリジン、７－デアザアデノシン、５－アミノアリルウリジン、５－アミノアリルリシチジン、８－オキソグアノシン、２－アミノプリン－リボシド、プソイドイソシチジン、Ｎ１－メチルプソイドウリジン、５，６－ジヒドロ－５－メチルウリジン、Ｎ６－メチル－２－アミノアデノシン、５－カルボキシシチジン、５－ヒドロキシメチルウリジン、チエノグアノシン、５－ヒドロキシシチジン、５－ホルミルウリジン、５－カルボキシウリジン、５－メトキシウリジン、５－メトキシシチジン、チエノウリジン、５－カルボキシメチルエステルウリジン、チエノシチジン、８－オキソアデノオシン、イソグアノシン、Ｎ１－エチルプソイドウリジン、Ｎ１－メチル－２’－Ｏ－メチルプソイドウリジン、Ｎ１－メトキシメチルプソイドウリジン、Ｎ１－プロピルプソイドウリジン、２’－Ｏ－メチル－Ｎ６－メチルアデノシン、２－アミノ－６－Ｃｌ－プリン－２’－デオキシリボシド、２－アミノ－２’－デオキシアデノシン、２－アミノプリン－２’－デオキシリボシド、５－ブロモ－２’－デオキシシチジン、５－ブロモ－２’－デオキシウリジン、６－クロロプリン－２’－デオキシリボシド、７－デアザ－２’－デオキシアデノシン、７－デアザ－２’－デオキシグアノシン、２’－デオキシイノシン、５－プロピニル－２’－デオキシシチジン、５－プロピニル－２’－デオキシウリジン、５－フルオロ－２’－デオキシウリジン、５－ヨード－２’－デオキシシチジン、５－ヨード－２’－デオキシウリジン、Ｎ６－メチル－２’－デオキシアデノシン、５－メチル－２’－デオキシシチジン、Ｏ６－メチル－２’－デオキシグアノシン、Ｎ２－メチル－２’－デオキシグアノシン、８－オキソ－２’－デオキシアデノシン、８－オキソ－２’－デオキシグアノシン、２－チオチミジン、２’－デオキシ－Ｐ－ヌクレオシド、５－ヒドロキシ－２’－デオキシシチジン、４－チオチミジン、２－チオ－２’－デオキシシチジン、６－アザ－２’－デオキシウリジン、６－チオ－２’－デオキシグアノシン、８－クロロ－２’－デオキシアデノシン、５－アミノアリル－２’－デオキシシチジン、５－アミノアリル－２’－デオキシウリジン、Ｎ４－メチル－２’－デオキシシチジン、２’－デオキシゼブラリン、５－ヒドロキシメチル－２’－デオキシウリジン、５－ヒドロキシメチル－２’－デオキシシチジン、５－プロパルギルアミノ－２’－デオキシシチジン、５－プロパルギルアミノ－２’－デオキシウリジン、５－カルボキシ－２’－デオキシシチジン、５－ホルミル－２’－デオキシシチジン、５－［（３－インドリル）プロピオンアミド－Ｎ－アリル］－２’－デオキシウリジン、５－カルボキシ－２’－デオキシウリジン、５－ホルミル－２’－デオキシウリジン、７－デアザ－７－プロパルギルアミノ－２’－デオキシ

アデノシン、７－デアザ－７－プロパルギルアミノ－２’－デオキシグアノシン、ビオチン－１６－アミノアリル－２’－ｄＵＴＰ、ビオチン－１６－アミノアリル－２’－ｄＣＴＰ、ビオチン－１６－アミノアリルシチジン、Ｎ４－ビオチン－ＯＢＥＡ－２’－デオキシシチジン、ビオチン－１６－アミノアリルウリジン、ダブシル－５－３－アミノアリル－２’－ｄＵＴＰ、デスチオビオチン－６－アミノアリル－２’－デオキシシチジン、デスチオビオチン－１６－アミノアリル－ウリジン、ビオチン－１６－７－デアザ－７－プロパルギルアミノ－２’－デオキシグアノシン、シアニン３－５－プロパルギルアミノ－２’－デオキシシチジン、シアニン３－６－プロパルギルアミノ－２’－デオキシウリジン、シアニン５－６－プロパルギルアミノ－２’－デオキシシチジン、シアニン５－６－プロパルギルアミノ－２’－デオキシウリジン、シアニン３－アミノアリルシチジン、シアニン３－アミノアリルウリジン、シアニン５－アミノアリルシチジン、シアニン５－アミノアリルウリジン、シアニン７－アミノアリルウリジン、２’－フルオロ－２’－デオキシアデノシン、２’－フルオロ－２’－デオキシシチジン、２’－フルオロ－２’－デオキシグアノシン、２’－フルオロ－２’－デオキシウリジン、２’－Ｏ－メチルアデノシン、２’－Ｏ－メチルシチジン、２’－Ｏ－メチルグアノシン、２’－Ｏ－メチルウリジン、プロマイシン、２’－アミノ－２’－デオキシシチジン、２’－アミノ－２’－デオキシウリジン、２’－アジド－２’－デオキシシチジン、２’－アジド－２’－デオキシウリジン、アラシチジン、アラウリジン、２’－アジド－２’－デオキシアデノシン、２’－アミノ－２’－デオキシアデノシン、アラアデノシン、２’－フルオロ－チミジン、３’－Ｏ－メチルアデノシン、３’－Ｏ－メチルシチジン、３’－Ｏ－メチルグアノシン、３’－Ｏ－メチルウリジン、２’－アジド－２’－デオキシグアノシン、アラグアノシン、２’－デオキシウリジン、３’－Ｏ－（２－ニトロベンジル）－２’－デオキシアデノシン、３’－Ｏ－（２－ニトロベンジル）－２’－デオキシイノシン、３’－デオキシアデノシン、３’－デオキシグアノシン、３’－デオキシシチジン、３’－デオキシ－５－メチルウリジン、３’－デオキシウリジン、２’，３’－ジデオキシアデノシン、２’，３’－ジデオキシグアノシン、２’，３’－ジデオキシウリジン、２’，３’－ジデオキシチミジン、２’，３’－ジデオキシシチジン、３’－アジド－２’，３’－ジデオキシアデノシン、３’－アジド－２’，３’－ジデオキシチミジン、３’－アミノ－２’，３’－ジデオキシアデノシン、３’－アミノ－２’，３’－ジデオキシシチジン、３’－アミノ－２’，３’－ジデオキシグアノシン、３’－アミノ－２’，３’－ジデオキシチミジン、３’－アジド－２’，３’－ジデオキシシチジン、３’－アジド－２’，３’－ジデオキシウリジン、５－ブロモ－２’，３’－ジデオキシウリジン、２’，３’－ジデオキシイノシン、２’－デオキシアデノシン－５’－Ｏ－（１－チオ三リン酸）、２’－デオキシシチジン－５’－Ｏ－（１－チオ三リン酸）、２’－デオキシグアノシン－５’－Ｏ－（１－チオ三リン酸）、２’－デオキシチミジン－５’－Ｏ－（１－チオ三リン酸）、アデノシン－５’－Ｏ－（１－チオ三リン酸）、シチジン－５’－Ｏ－（１－チオ三リン酸）、グアノシン－５’－Ｏ－（１－チオ三リン酸）、ウリジン－５’－Ｏ－（１－チオ三リン酸）、２’，３’－ジデオキシアデノシン－５’－Ｏ－（１－チオ三リン酸）、２’，３’－ジデオキシシチジン－５’－Ｏ－（１－チオ三リン酸）、２’，３’－ジデオキシグアノシン－５’－Ｏ－（１－チオ三リン酸）、３’－デオキシチミジン－５’－Ｏ－（１－チオ三リン酸）、３’－アジド－２’、３’－ジデオキシチミジン－５’－Ｏ－（１－チオ三リン酸）、２’、３’－ジデオキシウリジン－５’－Ｏ－（１－チオ三リン酸）、２’－デオキシアデノシン－５’－Ｏ－（１－ボラノ三リン酸）、２’－デオキシシチジン－５’－Ｏ－（１－ボラノ三リン酸）、２’－デオキシグアノシン－５’－Ｏ－（１－ボラノ三リン酸）、及び２’－デオキシチミジン－５’－Ｏ－（１－ボラノ三リン酸）のうちの１つ以上を含む、実施形態Ｉ－１～Ｉ－３２のいずれか１つの組成物。

【０３２３】

実施形態Ｉ－３４．組成物が、さらに、テロメラーゼＲＮＡ要素（ＴＥＲＣ）をコードするリボ核酸（ＲＮＡ）を含む、実施形態Ｉ－１～Ｉ－３３のいずれか１つの組成物。

【０３２４】

実施形態Ｉ－３５．前記送達ビヒクルが、前記ＴＥＲＴをコードするＲＮＡを含む、実

施形態Ｉ－１～Ｉ－３４のいずれか１つの組成物。
【０３２５】
実施形態Ｉ－３６．前記送達ビヒクルの表面、層、または体積のうちの１つ以上が、前記ＴＥＲＴをコードするＲＮＡを含む、実施形態Ｉ－３５の組成物。
【０３２６】
実施形態Ｉ－３７．前記表面が、外面または内面を含む、実施形態Ｉ－３６の組成物。
【０３２７】
実施形態Ｉ－３８．前記層が、脂質単層または脂質二重層を含む、実施形態Ｉ－３６の組成物。
【０３２８】
実施形態Ｉ－３９．前記体積が、内部体積を含む、実施形態Ｉ－３６の組成物。
【０３２９】
実施形態Ｉ－４０．前記送達ビヒクルが、テロメラーゼＲＮＡ要素（ＴＥＲＣ）をコードするリボ核酸（ＲＮＡ）に作動可能に連結されている、実施形態Ｉ－１～Ｉ－３９のいずれか１つの組成物。
【０３３０】
実施形態Ｉ－４１．前記送達ビヒクルが、ＴＥＲＣをコードするＲＮＡを含む、実施形態Ｉ－４０の組成物。
【０３３１】
実施形態Ｉ－４２．前記送達ビヒクルの表面、層、または体積のうちの１つ以上が、ＴＥＲＣをコードするＲＮＡを含む、実施形態Ｉ－３５の組成物。
【０３３２】
実施形態Ｉ－４３．前記表面が、外面または内面を含む、実施形態Ｉ－４２の組成物。
【０３３３】
実施形態Ｉ－４４．前記層が、脂質単層または脂質二重層を含む、実施形態Ｉ－４２の組成物。
【０３３４】
実施形態Ｉ－４５．前記体積が、内部体積を含む、実施形態Ｉ－４２の組成物。
【０３３５】
実施形態Ｉ－４６．細胞及び実施形態Ｉ－１～Ｉ－４５のいずれか１つの組成物を接触させることを含む、前記細胞におけるテロメラーゼ活性を増加させる方法。
【０３３６】
実施形態Ｉ－４７．細胞及び実施形態Ｉ－１～Ｉ－４５のいずれか１つの組成物を接触させることを含む、前記細胞内のテロメアを伸長する方法。
【０３３７】
実施形態Ｉ－４８．前記細胞が、ｉｎ　ｖｉｖｏ、ｅｘ　ｖｉｖｏ、またはｉｎ　ｖｉｔｒｏである、実施形態Ｉ－４６またはＩ－４７の方法。
【０３３８】
実施形態Ｉ－４９．実施形態Ｉ－１～Ｉ－４５のいずれか１つの組成物を含む、細胞。
【０３３９】
実施形態Ｉ－５０．実施形態Ｉ－４９の細胞を含む、製剤。
【０３４０】
実施形態Ｉ－５１．複数の細胞が、実施形態Ｉ－４９の細胞を含む、実施形態Ｉ－５０の製剤。
【０３４１】
実施形態Ｉ－５２．前記複数の細胞のそれぞれが、実施形態Ｉ－４９の細胞である、実施形態Ｉ－５１の製剤。
【０３４２】
実施形態Ｉ－５３．有効量の実施形態Ｉ－１～Ｉ－４５のいずれか１つの組成物を対象に投与することを含む、疾患または障害を処置する方法。

【０３４３】
実施形態Ｉ－５４．有効量の実施形態Ｉ－４９の細胞を対象に投与することを含む、疾患または障害を処置する方法。
【０３４４】
実施形態Ｉ－５５．有効量の実施形態Ｉ－５０～Ｉ－５２のいずれか１つの製剤を対象に投与することを含む、疾患または障害を処置する方法。
【０３４５】
実施形態Ｉ－５６．有効量の実施形態Ｉ－１～Ｉ－４５のいずれか１つの組成物を対象に投与することを含む、疾患の発症を遅延させる方法。
【０３４６】
実施形態Ｉ－５７．有効量の実施形態Ｉ－４９の細胞を対象に投与することを含む、疾患の発症を遅延させる方法。
【０３４７】
実施形態Ｉ－５８．有効量の実施形態Ｉ－５０～Ｉ－５２のいずれか１つの製剤を対象に投与することを含む、疾患の発症を遅延させる方法。
【０３４８】
実施形態Ｉ－５９．前記組成物が、肺細胞集団の少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、または少なくとも９５％をトランスフェクトすることが可能である、実施形態Ｉ－１～Ｉ－４５のいずれか１つの組成物。
【０３４９】
実施形態Ｉ－６０．肺細胞集団の少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、または少なくとも９５％をトランスフェクトすることが可能な脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）を含む、組成物。
【０３５０】
実施形態Ｉ－６１．ポリヌクレオチドを含む、実施形態Ｉ－６０の組成物。
【０３５１】
実施形態Ｉ－６２．前記ポリヌクレオチドが、ＲＮＡである、実施形態Ｉ－６１の組成物。
【０３５２】
実施形態Ｉ－６３．前記ＲＮＡが、ｍＲＮＡである、実施形態Ｉ－６２の組成物。
【０３５３】
実施形態Ｉ－６４．前記ＬＮＰが、肺細胞集団の約５０％～９９％、約６０％～９９％、約７０％～９９％、約８０％～９９％、または約９０％～９９％をトランスフェクトすることが可能である、実施形態Ｉ－６０～Ｉ－６３のいずれか１つの組成物。
【０３５４】
実施形態Ｉ－６５．前記ＬＮＰが、肺細胞集団の５０％～９５％、約６０％～９５％、約７０％～９５％、約８０％～９５％、または約９０％～９５％をトランスフェクトすることが可能である、実施形態Ｉ－６０～Ｉ－６３のいずれか１つの組成物。
【０３５５】
実施形態Ｉ－６６．前記肺細胞集団が、肺内皮細胞を含む、実施形態Ｉ－６０～Ｉ－６５のいずれか１つの組成物。
【０３５６】
実施形態Ｉ－６７．前記肺内皮細胞が、血管内皮細胞を含む、実施形態Ｉ－６６の組成物。
【０３５７】
実施形態Ｉ－６８．前記肺内皮細胞が、肺胞内皮細胞を含む、実施形態Ｉ－６６の組成物。
【０３５８】
実施形態Ｉ－６９．前記肺細胞集団が、肺上皮細胞を含む、実施形態Ｉ－６０～Ｉ－６

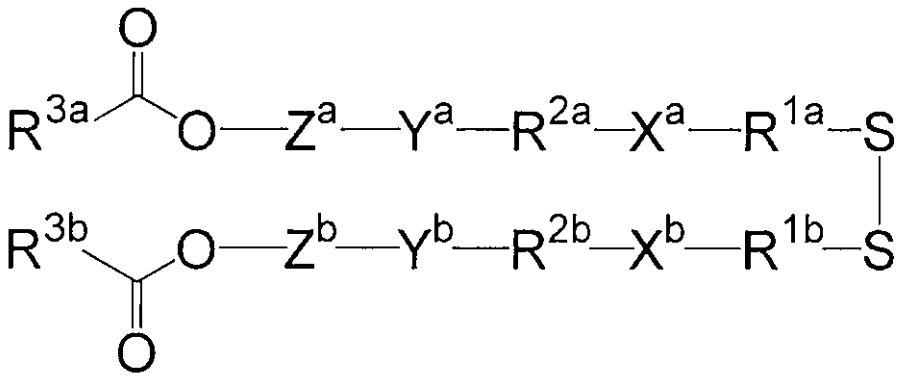
８のいずれか１つの組成物。
【０３５９】
実施形態Ｉ－７０．前記肺上皮細胞が、肺胞上皮細胞を含む、実施形態Ｉ－６９の組成物。
【０３６０】
実施形態Ｉ－７１．前記肺胞上皮細胞が、肺胞１型（ＡＴ１）細胞を含む、実施形態Ｉ－７０の組成物。
【０３６１】
実施形態Ｉ－７２．肺胞上皮細胞が、肺胞２型（ＡＴ２）細胞を含む、実施形態Ｉ－７０の組成物。
【０３６２】
実施形態Ｉ－７３．前記肺細胞が、マクロファージ、マスト細胞、クラブ細胞、ブラシ細胞、神経上皮細胞、及び杯細胞のうちのいずれか１つ以上を含む、実施形態Ｉ－６０～Ｉ－７２のいずれか１つの組成物。
【０３６３】
実施形態Ｉ－７４．前記肺細胞が、線維芽細胞、筋線維芽細胞、脂肪線維芽細胞、及び線維筋細胞のうちの１つ以上を含む、実施形態Ｉ－６０～Ｉ－７３のいずれか１つの組成物。
【０３６４】
実施形態Ｉ－７５．前記肺細胞集団が、気管支細胞を含む、実施形態Ｉ－６０～Ｉ－７４のいずれか１つの組成物。
【０３６５】
実施形態Ｉ－７６．前記肺細胞集団が、気管支肺胞幹細胞を含む、実施形態Ｉ－６０～Ｉ－７５のいずれか１つの組成物。
【０３６６】
実施形態Ｉ－７７．前記肺細胞集団が、肺免疫細胞を含む、実施形態Ｉ－６０～Ｉ－７６のいずれか１つの組成物。
【０３６７】
実施形態Ｉ－７８．前記肺細胞集団が、肺線維芽細胞を含む、実施形態Ｉ－６０～Ｉ－７７のいずれか１つの組成物。
【０３６８】
実施形態Ｉ－７９．前記肺細胞集団が、肺前癌細胞及び癌細胞のうちの１つ以上を含む、実施形態Ｉ－６０～Ｉ－７８のいずれか１つの組成物。
【０３６９】
実施形態Ｉ－８０．前記肺細胞集団が、肺胞内皮細胞及び肺胞上皮細胞を含み、前記肺内皮細胞の少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、または少なくとも９０％がトランスフェクトされ、前記肺上皮細胞の少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、または少なくとも９０％がトランスフェクトされる、実施形態Ｉ－６０～Ｉ－７９のいずれか１つの組成物。
【０３７０】
実施形態Ｉ－８１．静脈内注射により対象に投与された場合に、前記肺細胞が、トランスフェクトされる、実施形態Ｉ－６０～Ｉ－８０のいずれか１つの組成物。
【０３７１】
実施形態Ｉ－８２．エアロゾル注射、エアロゾル化、吸入、噴霧、または点滴注入のうちの１つ以上で対象に投与される場合に、前記肺細胞がトランスフェクトされる、実施形態Ｉ－６０～Ｉ－８０のいずれか１つの組成物。
【０３７２】
実施形態Ｉ－８３．前記組成物が、イオン性脂質を含む、実施形態Ｉ－６０～Ｉ－８２のいずれか１つの組成物。
【０３７３】

実施形態Ｉ－８４．前記イオン性脂質が、前記ＬＮＰのモル百分率の約４０～６０％である、実施形態Ｉ－８３の組成物。

【０３７４】

実施形態Ｉ－８５．前記組成物が、以下の式Ｉの化合物を含む、実施形態Ｉ－６０～Ｉ－８４のいずれか１つの組成物：

【化２７】



(1)

、

【０３７５】

（式中、R^{1a}及びR^{1b}は、それぞれ独立して、１～６つの炭素原子を有するアルキレン基を表し、X^a及びX^bは、それぞれ独立して、１～６つの炭素原子を有する非環状アルキル３級アミノ基及び１つの３級アミノ基、または２～５つの炭素原子、ならびに１～２つの３級アミノ基を有する環状アルキレン３級アミノ基であり、

【０３７６】

R^{2a}及びR^{2b}は、それぞれ独立して、８以下の炭素原子を有するアルキレン基またはオキシジアルキレン基を表し、

【０３７７】

Y^a及びY^bは、それぞれ独立して、エステル結合、アミド結合、カルバマート結合、エーテル結合、またはウレア結合を表し、

【０３７８】

Z^a及びZ^bは、それぞれ独立して、３～１６の炭素原子を有し、少なくとも１つの芳香環を有し、任意に、ヘテロ原子を有する芳香族化合物から誘導される二価の基であり、

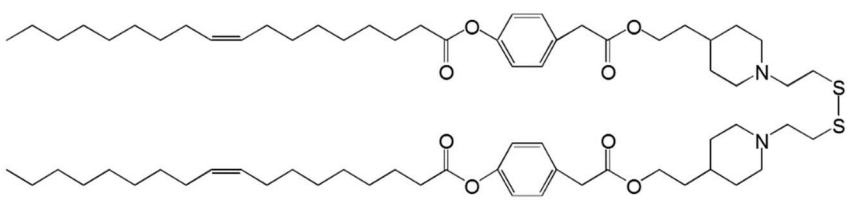
【０３７９】

R^{3a}及びR^{3b}は、それぞれ独立して、水酸基を有する脂溶性ビタミンと無水コハク酸もしくは無水グルタル酸との反応生成物、または水酸基を有するステロール誘導体と無水コハク酸との反応生成物から誘導される残基、または無水グルタル酸との反応生成物から誘導される残基、または１２～２２の炭素原子を有する脂肪族炭化水素基を指す）。

【０３８０】

実施形態Ｉ－８６．式Ｉの化合物が、以下である、実施形態Ｉ－８４の組成物：

【化２８】

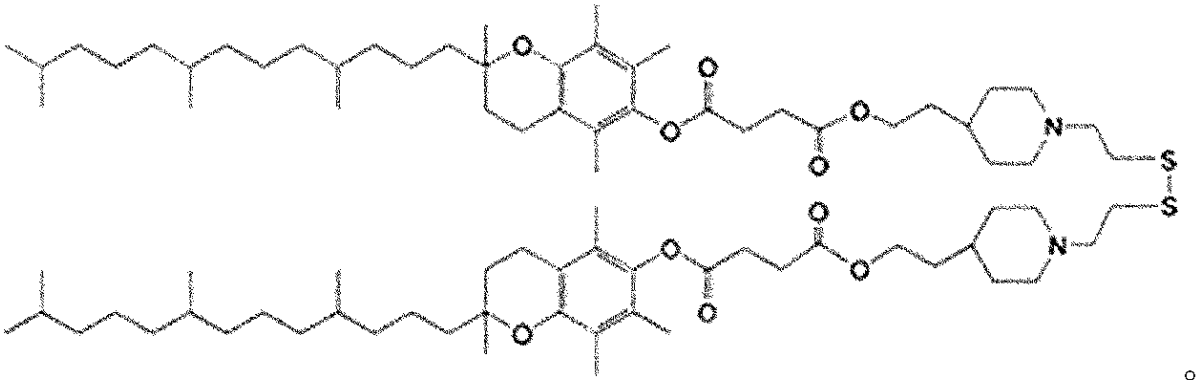


。

【０３８１】

実施形態Ｉ－８７．式Ｉの化合物が、以下である、実施形態Ｉ－８４の組成物：

【化２９】

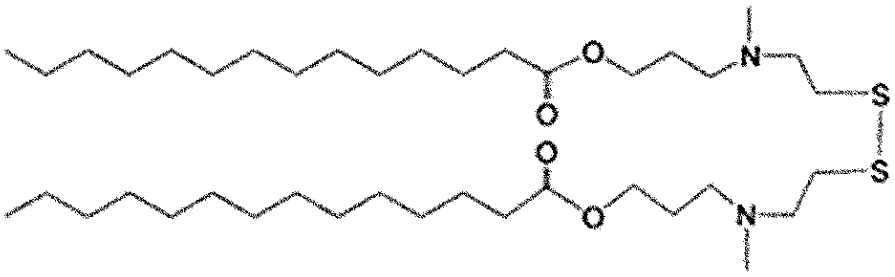


。

【０３８２】

実施形態Ｉ－８８．式Ｉの化合物が、以下である、実施形態Ｉ－８４の組成物：

【化３０】

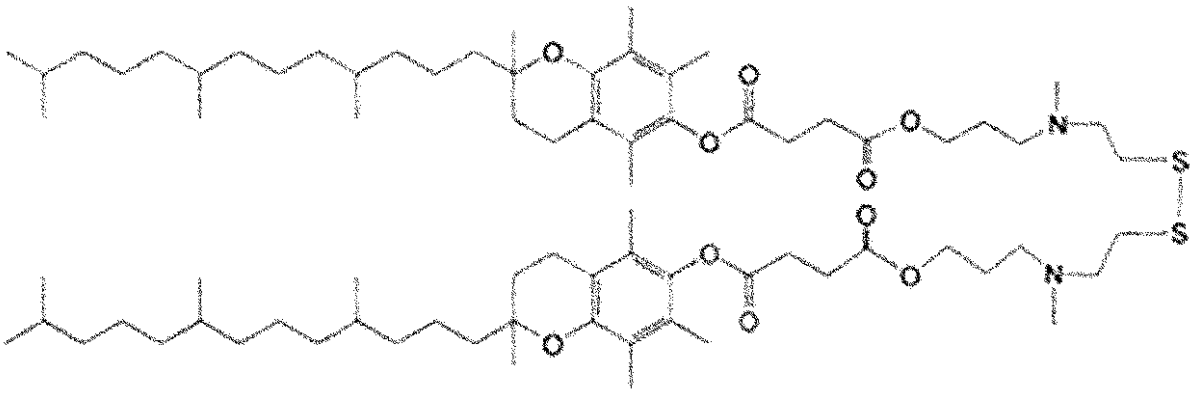


。

【０３８３】

実施形態Ｉ－８９．式Ｉの化合物が、以下である、実施形態Ｉ－８４の組成物：

【化３１】

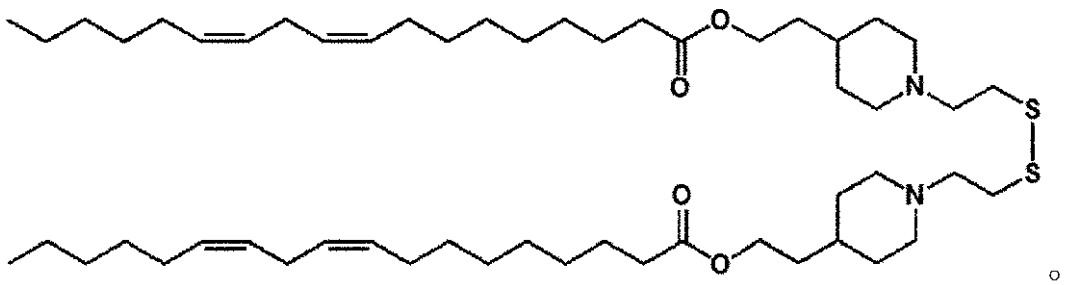


。

【０３８４】

実施形態Ｉ－９０．式Ｉの化合物が、以下である、実施形態Ｉ－８４の組成物：

【化３２】

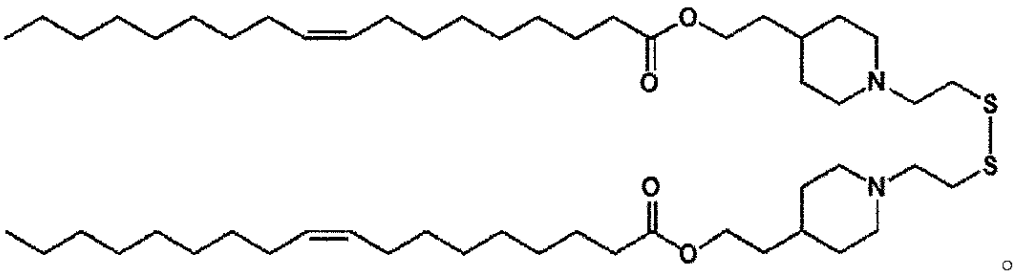


。

【０３８５】

実施形態Ｉ－９１．式Ｉの化合物が、以下である、実施形態Ｉ－８４の組成物：

【化３３】



。

【０３８６】

実施形態Ｉ－９２．式Ｉの化合物が、８～２４の炭素原子を有する炭素鎖を含む、実施形態Ｉ－６０～Ｉ－９１のいずれか１つの組成物。

【０３８７】

実施形態Ｉ－９３．前記ＬＮＰが、２つ以上のイオン性脂質の混合物を含む、実施形態Ｉ－６０～Ｉ－９２のいずれか１つの組成物。

【０３８８】

実施形態Ｉ－９４．前記カチオン性脂質が、イオン性脂質及び標的化脂質である、実施形態Ｉ－８２～Ｉ－９２のいずれか１つの組成物。

【０３８９】

実施形態Ｉ－９５．前記ＬＮＰが、ステロールを含む、実施形態Ｉ－６０～Ｉ－９３のいずれか１つの組成物。

【０３９０】

実施形態Ｉ－９６．前記ステロールが、コレステロールである、実施形態Ｉ－９４の組成物。

【０３９１】

実施形態Ｉ－９７．前記ステロールが、前記ＬＮＰのモル百分率の約１０～３０％である、実施形態Ｉ－９４～Ｉ－９６のいずれか１つの組成物。

【０３９２】

実施形態Ｉ－９８．前記ＬＮＰが、絶縁体脂質を含む、実施形態Ｉ－１～Ｉ－９７のいずれか１つの組成物。

【０３９３】

実施形態Ｉ－９９．前記絶縁体脂質が、ＰＥＧ化脂質である、実施形態Ｉ－９８の組成物。

【０３９４】

実施形態Ｉ－１００．前記ＰＥＧ化脂質が、直鎖状である、実施形態Ｉ－９８～Ｉ－９

９のいずれか１つの組成物。
【０３９５】
実施形態Ｉ－１０１．前記ＰＥＧ化脂質が、分岐している、実施形態Ｉ－９８～Ｉ－９９のいずれか１つの組成物。
【０３９６】
実施形態Ｉ－１０２．前記ＰＥＧ化脂質が、８～２４の炭素原子を有する炭素鎖を含む、実施形態Ｉ－９８～Ｉ－１０１のいずれか１つの組成物。
【０３９７】
実施形態Ｉ－１０３．前記絶縁体脂質が、血液タンパク質または血液タンパク質のペプチド配列にコンジュゲートされており、前記血液タンパク質が、アルブミンまたはグロブリンである、実施形態Ｉ－９８～Ｉ－１０２のいずれか１つの組成物。
【０３９８】
実施形態Ｉ－１０４．前記絶縁体脂質が、前記ＬＮＰのモル百分率の少なくとも０．２５～５％である、実施形態Ｉ－９８～Ｉ－１０１のいずれか１つの組成物。
【０３９９】
実施形態Ｉ－１０５．前記ＬＮＰが、カチオン性脂質を含む、実施形態Ｉ－１～Ｉ－１０４のいずれか１つの組成物。
【０４００】
実施形態Ｉ－１０６．前記カチオン性脂質が、１，２－ジオレオイル－３－トリメチルアンモニウム－プロパン（ＤＯＴＡＰ）及びＤＯＴＡＰアナログのうちのいずれか１つ以上である、実施形態Ｉ－１０５の組成物。
【０４０１】
実施形態Ｉ－１０７．前記カチオン性脂質が、Ｎ－［１－（２，３－ジオレイルオキシ）プロピル］－Ｎ，Ｎ，Ｎ－トリメチルアンモニウムクロリド（ＤＯＴＭＡ）、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）、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（ＤＯＴＡＰ）、１，２－ジステアリルオキシ－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）、ジメチルジオクタデシルアンモニウム（ＤＤＡ）、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パ－３－イル）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－Ｎ－ヒドロキシエチルアンモニウムブロミド（ＤＭＲＩＥ）、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１－１－（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－ジメチルアミノプロパン（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）、または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）、及びそれらの混合物のうちのいずれか１つ以上である、実施形態Ｉ－１０５の組成物。

【０４０２】
実施形態Ｉ－１０８．前記ＬＮＰが、構造脂質を含む、実施形態Ｉ－１～Ｉ－１０７のいずれか１つの組成物。
【０４０３】
実施形態Ｉ－１０９．前記構造脂質が、１，２－ジ－（９Ｚ－オクタデセノイル）－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＯＰＥ）、グリセロール－モノオレアート（ＧＭＯ）、ジステアロイルホスファチジルコリン（ＤＳＰＣ）、ジオレオイルホスファチジルコリン（ＤＯＰＣ）、ジパルミトイルホスファチジルコリン（ＤＰＰＣ）、ジオレオイルホスファチジルグリセロール（ＤＯＰＧ）、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール（ＤＰＰＧ）、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＯＰＥ）、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン（ＰＯＰＣ）、パルミトイルオレオイル－ホスファチジルエタノールアミン（ＰＯＰＥ）、ジオレオイル－ホスファチジルエタノールアミン４－（Ｎ－マレイミドメチル）－シクロヘキサン－１－カルボキシラート（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－ステアロイル－２－オレオイル－ホスファチジルエタノールアミン（ＳＯＰＥ）、コレステロール、または別のステロール、及びそれらの混合物のうちのいずれか１つ以上である、実施形態Ｉ－１０８の組成物。
【０４０４】
実施形態Ｉ－１１０．前記ＬＮＰが、少なくとも第１の構成成分、第２の構成成分、及び第３の構成成分を含み、
【０４０５】
前記第１の構成成分が、イオン性脂質であり、
【０４０６】
前記第２の構成成分が、カチオン性脂質であり、
【０４０７】
前記第３の構成成分が、構造脂質である、
実施形態Ｉ－１～Ｉ－１０９のいずれか１つの組成物。
【０４０８】
実施形態Ｉ－１１１．さらに、ステロールを含む、実施形態Ｉ－１１０の組成物。
【０４０９】
実施形態Ｉ－１１２．１４：０のＰＥＧ２０００　ＰＥ及びＤＭＧ－ＰＥＧ化脂質、ならびに、血液タンパク質または血液タンパク質のペプチド配列にコンジュゲートされた脂質から選択される絶縁体脂質を含み、前記血液タンパク質が、アルブミンまたはグロブリンである、実施形態Ｉ－１１０～Ｉ－１１１のいずれか１つの組成物。
【０４１０】
実施形態Ｉ－１１３．前記ＬＮＰが、ＳＳ－ＯＰまたはＳＳ－ＯＰアナログ、ＤＯＰＣ、コレステロール、ＤＭＧ－ＰＥＧ２０００、及びＤＯＴＡＰを含む、実施形態Ｉ－１～Ｉ－１１２のいずれか１つの組成物。
【０４１１】
実施形態Ｉ－１１４．前記ＬＮＰが、４５～５５％のカチオン性脂質及び２０～４０％のＳＳ－ＯＰまたはそのアナログを含む、実施形態Ｉ－１１３の組成物。
【０４１２】
実施形態Ｉ－１１５．前記ＬＮＰが、４５～５５％のＤＯＴＡＰを含む、実施形態Ｉ－１１４の組成物。
【０４１３】
実施形態Ｉ－１１６．前記ＬＮＰが、ＳＳ－ＯＰ、ＤＯＰＣ、コレステロール、ＤＭＧ－ＰＥＧ２０００、及びＤＯＴＡＰを含む、実施形態Ｉ－１１３のＬＮＰ。
【０４１４】

実施形態Ｉ－１１７．前記ＬＮＰが、２５～２９％のＳＳ－ＯＰ；１～３％のＤＯＰＣ；１５～３５％のコレステロール；０．８～１．６％のＤＭＧ－ＰＥＧ２０００；及び４５～５５％のＤＯＴＡＰを含む、実施形態Ｉ－１１４の組成物。

【０４１５】

実施形態Ｉ－１１８．前記ＬＮＰが、２７％のＳＳ－ＯＰ；２．５％のＤＯＰＣ；２０％のコレステロール；１．２％のＤＭＧ－ＰＥＧ２０００；及び５０％のＤＯＴＡＰを含む、実施形態Ｉ－１１４の組成物。

【０４１６】

実施形態Ｉ－１１９．前記ＬＮＰが、ｃＫＫ－Ｅ１２またはｃＫＫ－Ｅ１２アナログ、ＤＯＰＥ、コレステロール、ＰＥＧ２０００ＰＥ、及びＤＯＴＡＰを含む、実施形態Ｉ－６０～Ｉ－１１８のいずれか１つの組成物。

【０４１７】

実施形態Ｉ－１２０．実施形態Ｉ－１～Ｉ－４５または実施形態Ｉ－１～Ｉ－１１９のいずれか１つの組成物を対象に投与することを含む、それを必要とする前記対象の肺細胞集団にカーゴを送達する方法。

【０４１８】

実施形態Ｉ－１２１．実施形態Ｉ－１～Ｉ－４５または実施形態Ｉ－６０～Ｉ－１１９のいずれか１つの組成物を対象に投与することを含む、それを必要とする前記対象の肺疾患または障害を処置する方法。

【０４１９】

実施形態Ｉ－１２２．静脈内注射により前記組成物を投与することを含む、実施形態Ｉ－１２０～Ｉ－１２１のいずれか１つの方法。

【０４２０】

実施形態Ｉ－１２３．エアロゾル注射、エアロゾル化、吸入、噴霧、または点滴注入のうちの１つ以上で前記ＬＮＰを投与することを含む、実施形態Ｉ－１２０～Ｉ－１２１のいずれか１つの方法。

【０４２１】

実施形態Ｉ－１２４．前記カーゴが、ポリヌクレオチドを含む、実施形態Ｉ－１２０～Ｉ－１２３のいずれか１つの方法。

【０４２２】

実施形態Ｉ－１２５．前記ポリヌクレオチドが、ＲＮＡである、実施形態Ｉ－１２４の方法。

【０４２３】

実施形態Ｉ－１２６．前記ＲＮＡが、ｍＲＮＡである、実施形態Ｉ－１２５の方法。

【０４２４】

実施形態Ｉ－１２７．前記ｍＲＮＡが、ＴＥＲＴ、嚢胞性線維症膜貫通コンダクタンス調節因子（ＣＦＴＲ）タンパク質、成長因子、転写因子、及び遺伝子編集タンパク質のうちの１つ以上をコードする、実施形態Ｉ－１２６の方法。

【０４２５】

実施形態Ｉ－１２８．前記対象の肺細胞集団の少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、または少なくとも９０％が、トランスフェクトされる、実施形態Ｉ－１２０～Ｉ－１２７のいずれか１つの方法。

【０４２６】

実施形態Ｉ－１２９．前記対象の肺細胞集団の約５０％～９９％、約６０％～９９％、約７０％～９９％、約８０％～９９％、または約９０％～９９％が、トランスフェクトされる、実施形態Ｉ－１２０～Ｉ－１２８のいずれか１つの方法。

【０４２７】

実施形態Ｉ－１３０．前記対象の肺細胞集団の約５０％～９５％、約６０％～９５％、約７０％～９５％、約８０％～９５％、または約９０％～９５％が、トランスフェクトされる、実施形態Ｉ－１２０～Ｉ－１２９のいずれか１つの方法。

【０４２８】
実施形態Ｉ－１３１．前記肺の疾患または障害が、肺線維症、特発性肺線維症、肺気腫、間質性肺疾患、慢性閉塞性肺疾患（ＣＯＰＤ）、肺感染症、肺炎、結核、胃逆流、肺癌、嚢胞性線維症、先天性角化異常症、アルファ－１アンチトリプシン欠乏症、及び他の遺伝性肺疾患から選択される、実施形態Ｉ－１２０～Ｉ－１３０のいずれか１つの方法。
【０４２９】
実施形態Ｉ－１３２．前記ＬＮＰが、単回用量として前記対象に投与される、実施形態Ｉ－１２０～Ｉ－１３１のいずれか１つの方法。
【０４３０】
実施形態Ｉ－１３３．前記ＬＮＰが、複数回用量として前記対象に投与され、前記複数回用量が、少なくとも２回の用量を含む、実施形態Ｉ－１２０～Ｉ－１３１のいずれか１つの方法。
【０４３１】
実施形態Ｉ－１３４．前記対象に投与される前記ＬＮＰの用量が、前記対象の重量により、少なくとも０．０１、０．１、１、２、５、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、または８０ｍｇ／ｋｇである、実施形態Ｉ－１２０～Ｉ－１３３のいずれか１つの方法。
【０４３２】
実施形態Ｉ－１３５．前記カーゴが、ｍＲＮＡであり、前記ｍＲＮＡが、前記対象の重量により、約０．１、約０．２、約０．３、約０．４、約０．５、約０．６、約０．７、約０．８、約０．９、約１、約１．５、約２、または約２．５ｍｇ／ｋｇの用量で前記対象に投与される、実施形態Ｉ－１２０～Ｉ－１３４のいずれか１つの方法。
【０４３３】
実施形態Ｉ－１３６．前記対象が、ヒトである、実施形態Ｉ－１２０～Ｉ－１３５のいずれか１つの方法。
【０４３４】
実施形態ＩＩ
実施形態ＩＩ－１．脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）に封入されたポリヌクレオチドを静脈内注射により投与することを含み、
【０４３５】
（ｉ）約２０％～約５０％のモル百分率のカチオン性脂質、
【０４３６】
（ｉｉ）約２０％～約６０％のモル百分率のＳＳ－ＯＰまたはＳＳ－ＯＰアナログ
を含む、対象の肺にポリヌクレオチドを送達する方法。
【０４３７】
実施形態ＩＩ－２．前記ＳＳ－ＯＰアナログが、ＳＳ－Ｍ、ＳＳ－Ｅ、ＳＳ－ＥＣ、ＳＳ－ＬＣ、及びＳＳ－ＯＣのうちのいずれか１つ以上である、実施形態ＩＩ－１の方法。
【０４３８】
実施形態ＩＩ－３．前記カチオン性脂質が、２－ジオレオイル－３－トリメチルアンモニウム－プロパン（ＤＯＴＡＰ）、ジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミド（ＤＤＡＢ）、イミダゾールコレステロールエステル（ＩＣＥ）、２５－ヒドロキシコレステロール（２５ＯＨ　Ｃｈｏｌ）、２０α－ヒドロキシコレステロール５－コレステン－３α、２０α－ジオール（２０α　Ｃｈｏｌ）、Ｎ－［１－（２，３－ジオレイルオキシ）プロピル］－Ｎ，Ｎ，Ｎ－トリメチルアンモニウムクロリド（ＤＯＴＭＡ）、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）、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－ジステアリルオキシ－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（Ｄ

ＬｉｎＤＭＡ）、ジメチルジオクタデシルアンモニウム（ＤＤＡ）、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パ－３－イル）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－Ｎ－ヒドロキシエチルアンモニウムブロミド（ＤＭＲＩＥ）、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１－１－（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－ジメチルアミノプロパン（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）、または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）、及びそれらの混合物のうちのいずれか１つ以上である、実施形態ＩＩ－１またはＩＩ－２の方法。

【０４３９】

実施形態ＩＩ－４．前記カチオン性脂質が、ＤＯＴＡＰである、実施形態ＩＩ－４の方法。

【０４４０】

実施形態ＩＩ－５．前記ＬＮＰが、約２５％～約３５％のモル百分率の前記カチオン性脂質を含む、実施形態ＩＩ－１～ＩＩ－４のいずれか１つの方法。

【０４４１】

実施形態ＩＩ－６．前記ＬＮＰが、約３０％のモル百分率の前記カチオン性脂質を含む、実施形態ＩＩ－１～ＩＩ－４のいずれか１つの方法。

【０４４２】

実施形態ＩＩ－７．前記ＬＮＰが、構造脂質を含む、実施形態ＩＩ－１～ＩＩ－６のいずれか１つの方法。

【０４４３】

実施形態ＩＩ－８．前記構造脂質が、１，２－ジ－（９Ｚ－オクタデセノイル）－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＯＰＥ）、グリセロール－モノオレアート（ＧＭＯ）、ジステアロイルホスファチジルコリン（ＤＳＰＣ）、ジオレオイルホスファチジルコリン（ＤＯＰＣ）、ジパルミトイルホスファチジルコリン（ＤＰＰＣ）、ジオレオイルホスファチジルグリセロール（ＤＯＰＧ）、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール（ＤＰＰＧ）、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＯＰＥ）、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン（ＰＯＰＣ）、パルミトイルオレオイル－ホスファチジルエタノールアミン（ＰＯＰＥ）、ジオレオイル－ホスファチジルエタノールアミン４－（Ｎ－マレイミドメチル）－シクロヘキサン－１－カルボキシラート（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－ステアロイル－２－オレオイル－ホスファチジルエタノールアミン（ＳＯＰＥ）、コレステロール、または別のステロール、及びそれらの混合物のうちのいずれか１つ以上である、実施形態ＩＩ－７の方法。

【０４４４】

実施形態ＩＩ－９．前記構造脂質が、ＤＯＰＣである、実施形態ＩＩ－７の方法。

【０４４５】

実施形態ＩＩ－１０．前記ＬＮＰが、約１％～約５％のＤＯＰＣを含む、実施形態ＩＩ－９の方法。

【０４４６】

実施形態ＩＩ－１１．前記ＬＮＰが、構造脂質を実質的に含まない、及び／または最大１％の構造脂質を含む、実施形態ＩＩ－１～ＩＩ－６のいずれか１つの方法。

【０４４７】

実施形態ＩＩ－１２．前記ＬＮＰが、約２０％～約４０％のコレステロールを含む、実施形態ＩＩ－１～ＩＩ－１１のいずれか１つの方法。

【０４４８】

実施形態ＩＩ－１３．前記ＬＮＰが、コレステロールを実質的に含まない、実施形態ＩＩ－１～ＩＩ－１１のいずれか１つの方法。

【０４４９】

実施形態ＩＩ－１４．前記ＬＮＰが、絶縁体脂質を含む、実施形態ＩＩ－１～ＩＩ－１３のいずれか１つの方法。

【０４５０】

実施形態ＩＩ－１５．前記ＬＮＰが、絶縁体脂質を実質的に含まない、実施形態ＩＩ－１～ＩＩ－１３のいずれか１つの方法。

【０４５１】

実施形態ＩＩ－１６．前記ＬＮＰが、肝臓と比較して、肺に優先的に送達及び／またはトランスフェクトされる、実施形態ＩＩ－１～ＩＩ－１５のいずれか１つの方法。

【０４５２】

実施形態ＩＩ－１７．前記ポリヌクレオチドが、合成リボ核酸（ＲＮＡ）である、実施形態ＩＩ－１～ＩＩ－１６のいずれか１つの方法。

【０４５３】

実施形態ＩＩ－１８．前記合成リボ核酸（ＲＮＡ）が、テロメラーゼ逆転写酵素（ＴＥＲＴ）をコードする、実施形態ＩＩ－１７の方法。

【０４５４】

実施形態ＩＩ－１９．テロメラーゼ逆転写酵素（ＴＥＲＴ）をコードする合成リボ核酸（ＲＮＡ）を含む送達ビヒクルを含む有効量の組成物を投与することを含む、それを必要とする対象の肺線維症を処置する方法。

【０４５５】

実施形態ＩＩ－２０．前記送達ビヒクルが、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）である、実施形態ＩＩ－１９の方法。

【０４５６】

実施形態ＩＩ－２１．前記ＬＮＰが、約２０％～約５０％のモル百分率のカチオン性脂質、約２０％～約６０％のモル百分率のＳＳ－ＯＰまたはＳＳ－ＯＰアナログ、任意に、構造脂質、絶縁体脂質、及びコレステロールのうちの１つ以上を含む、実施形態ＩＩ－２０の方法。

【０４５７】

実施形態ＩＩ－２２．前記ＴＥＲＴ合成ｍＲＮＡが、表２のリストからの少なくとも１つの修飾ヌクレオシドを含む、実施形態ＩＩ－１９～ＩＩ－２１のいずれか１つの方法。

【０４５８】

実施形態ＩＩ－２３．前記修飾ヌクレオシドが、プソイドウリジンまたはプソイドウリジンアナログである、実施形態ＩＩ－２２の方法。

【０４５９】

実施形態ＩＩ－２４．前記プソイドウリジンアナログが、Ｎ－１－メチルプソイドウリジンである、実施形態ＩＩ－２２の方法。

【０４６０】

実施形態ＩＩ－２５．前記ＴＥＲＴ合成ｍＲＮＡが、非翻訳領域（ＵＴＲ）を含む、実施形態ＩＩ－１９～ＩＩ－２４のいずれか１つの方法。

【０４６１】
実施形態ＩＩ－２６．前記ＴＥＲＴ合成ｍＲＮＡが、５’キャップ構造を含み、前記５’キャップ構造が、ｍ７（３’ＯＭｅＧ）（５’）ｐｐｐ（５’）（２’ＯＭｅＡ）ｐＧ、ＩＲＥＳ、Ｃａｐ０、Ｃａｐ１、ＡＲＣＡ、イノシン、Ｎ１－メチル－グアノシン、２’フルオロ－グアノシン、７－デアザ－グアノシン、ＣｌｅａｎＣａｐＴＭ、８－オキソ－グアノシン、２－アミノ－グアノシン、ＬＮＡ－グアノシン、２－アジド－グアノシン、Ｃａｐ２、Ｃａｐ４、ＣＡＰ－００３、またはＣＡＰ－２２５である、実施形態ＩＩ－１９～ＩＩ－２５のいずれか１つの方法。
【０４６２】
実施形態ＩＩ－２７．前記ＴＥＲＴ合成ｍＲＮＡが、前記コード領域の３’側にポリアデノシン（ポリＡ）ヌクレオチド配列を含む、実施形態ＩＩ－１９～ＩＩ－２６のいずれか１つの方法。
【０４６３】
実施形態ＩＩ－２８．前記ＴＥＲＴ合成ｍＲＮＡが、鎖終結ヌクレオチドを含み、前記ヌクレオチドが、３’－デオキシアデノシン（コルジセピン）、３’－デオキシウリジン、３’－デオキシシトシン、３’－デオキシグアノシン、３’－デオキシチミン、２’，３’－ジデオキシヌクレオシド、２’，３’－ジデオキシアデノシン、２’，３’－ジデオキシウリジン、２’，３’－ジデオキシシトシン、２’，３’－ジデオキシグアノシン、２’、３’－ジデオキシチミン、２’－デオキシヌクレオシド、または－Ｏ－メチルヌクレオシドである、実施形態ＩＩ－１９～ＩＩ－２７のいずれか１つの方法。
【０４６４】
実施形態ＩＩ－２９．前記ＴＥＲＴ合成ｍＲＮＡが、コドン最適化されている、実施形態ＩＩ－１９～ＩＩ－２８のいずれか１つの方法。
【０４６５】
実施形態ＩＩ－３０．前記肺線維症が、肺疾患に関連する、実施形態ＩＩ－１９～ＩＩ－２８のいずれか１つの方法。
【０４６６】
実施形態ＩＩ－３１．前記肺疾患が、肺線維症、家族性肺線維症、特発性肺線維症、先天性角化異常症を伴う肺線維症、間質性肺疾患、肺炎、間質性肺炎、肺気腫、または肺癌である、実施形態ＩＩ－３０の方法。
【０４６７】
実施形態ＩＩ－３２．前記肺線維症が、ＴＥＲＴ変異と関連している、実施形態ＩＩ－１９～ＩＩ－３１のいずれか１つの方法。
【０４６８】
実施形態ＩＩ－３３．前記対象が、ヒトである、実施形態ＩＩ－１９～ＩＩ－３２のいずれか１つの方法。
【０４６９】
実施形態ＩＩ－３４．前記組成物が、静脈内注射を介して前記対象に投与される、実施形態ＩＩ－１９～ＩＩ－３３のいずれか１つの方法。
【０４７０】
実施形態ＩＩ－３５．前記組成物が、吸入により前記対象に投与される、実施形態ＩＩ－１９～ＩＩ－３３のいずれか１つの方法。
【０４７１】
実施形態ＩＩ－３６．
【０４７２】
（ｉ）約２０％～約５０％のモル百分率のカチオン性脂質、
【０４７３】
（ｉｉ）約２０％～約６０％のモル百分率のＳＳ－ＯＰまたはＳＳ－ＯＰアナログを含む、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）に封入されたポリヌクレオチドを含む組成物。
【０４７４】

実施形態ＩＩ－３７．前記ＳＳ－ＯＰアナログが、ＳＳ－Ｍ、ＳＳ－Ｅ、ＳＳ－ＥＣ、ＳＳ－ＬＣ、及びＳＳ－ＯＣのいずれか１つ以上である、実施形態ＩＩ－３６の組成物。

【０４７５】

実施形態ＩＩ－３８．前記カチオン性脂質が、２－ジオレオイル－３－トリメチルアンモニウム－プロパン（ＤＯＴＡＰ）、ジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミド（ＤＤＡＢ）、イミダゾールコレステロールエステル（ＩＣＥ）、２５－ヒドロキシコレステロール（２５ＯＨ　Ｃｈｏｌ）、２０α－ヒドロキシコレステロール５－コレステン－３α、２０α－ジオール（２０α　Ｃｈｏｌ）、Ｎ－［１－（２，３－ジオレイルオキシ）プロピル］－Ｎ，Ｎ，Ｎ－トリメチルアンモニウムクロリド（ＤＯＴＭＡ）、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）、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－ジステアリルオキシ－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）、ジメチルジオクタデシルアンモニウム（ＤＤＡ）、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パ－３－イル）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－Ｎ－ヒドロキシエチルアンモニウムブロミド（ＤＭＲＩＥ）、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１－１－（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－ジメチルアミノプロパン（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）、または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）、及びそれらの混合物のうちのいずれか１つ以上である、実施形態ＩＩ－３６の組成物。

【０４７６】

実施形態ＩＩ－３９．前記カチオン性脂質が、ＤＯＴＡＰである、実施形態ＩＩ－３８の組成物。

【０４７７】

実施形態ＩＩ－４０．前記ＬＮＰが、約２５％～約３５％のモル百分率の前記カチオン性脂質を含む、実施形態ＩＩ－３６～ＩＩ－３９のいずれか１つの組成物。

【０４７８】

実施形態ＩＩ－４１．前記ＬＮＰが、約３０％のモル百分率の前記カチオン性脂質を含む、実施形態ＩＩ－３６～ＩＩ－３９のいずれか１つの組成物。

【０４７９】

実施形態ＩＩ－４２．前記ＬＮＰが、構造脂質を含む、実施形態ＩＩ－３６～ＩＩ－４１のいずれか１つの組成物。

【０４８０】

実施形態ＩＩ－４３．前記構造脂質が、１，２－ジ－（９Ｚ－オクタデセノイル）－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＯＰＥ）、グリセロール－モノオレアート（ＧＭＯ）、ジステアロイルホスファチジルコリン（ＤＳＰＣ）、ジオレオイルホスフ

ァチジルコリン（ＤＯＰＣ）、ジパルミトイルホスファチジルコリン（ＤＰＰＣ）、ジオレオイルホスファチジルグリセロール（ＤＯＰＧ）、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール（ＤＰＰＧ）、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＯＰＥ）、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン（ＰＯＰＣ）、パルミトイルオレオイル－ホスファチジルエタノールアミン（ＰＯＰＥ）、ジオレオイル－ホスファチジルエタノールアミン４－（Ｎ－マレイミドメチル）－シクロヘキサン－１－カルボキシラート（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－ステアロイル－２－オレオイル－ホスファチジルエタノールアミン（ＳＯＰＥ）、コレステロール、または別のステロール、及びそれらの混合物のうちのいずれか１つ以上である、実施形態ＩＩ－４２の組成物。

【０４８１】

実施形態ＩＩ－４４．前記構造脂質が、ＤＯＰＣである、実施形態ＩＩ－４３の組成物。

【０４８２】

実施形態ＩＩ－４５．前記ＬＮＰが、約１％～約５％のＤＯＰＣを含む、実施形態ＩＩ－４４の組成物。

【０４８３】

実施形態ＩＩ－４６．前記ＬＮＰが、構造脂質を実質的に含まない、及び／または最大１％の構造脂質を含む、実施形態ＩＩ－３６～ＩＩ－４５のいずれか１つの組成物。

【０４８４】

実施形態ＩＩ－４７．前記ＬＮＰが、約２０％～約４０％のコレステロールを含む、実施形態ＩＩ－３６～ＩＩ－４６のいずれか１つの組成物。

【０４８５】

実施形態ＩＩ－４８．前記ＬＮＰが、コレステロールを実質的に含まない、実施形態ＩＩ－３６～ＩＩ－４６のいずれか１つの組成物。

【０４８６】

実施形態ＩＩ－４９．前記ＬＮＰが、絶縁体脂質を含む、実施形態ＩＩ－３６～ＩＩ－４８のいずれか１つの組成物。

【０４８７】

実施形態ＩＩ－５０．前記ＬＮＰが、絶縁体脂質を実質的に含まない、実施形態ＩＩ－３６～ＩＩ－４８のいずれか１つの組成物。

【０４８８】

実施形態ＩＩ－５１．前記ＬＮＰが、肝臓と比較して、前記肺に優先的に送達及び／またはトランスフェクトされる、実施形態ＩＩ－３６～ＩＩ－５０のいずれか１つの組成物。

【０４８９】

実施形態ＩＩ－５２．前記ポリヌクレオチドが、合成リボ核酸（ＲＮＡ）である、実施形態ＩＩ－３６～ＩＩ－５１のいずれか１つの組成物。

【０４９０】

実施形態ＩＩ－５３．前記合成リボ核酸（ＲＮＡ）が、テロメラーゼ逆転写酵素（ＴＥＲＴ）をコードする、実施形態ＩＩ－５２の組成物。

【０４９１】

実施形態ＩＩ－５４．前記ＴＥＲＴ合成ＲＮＡが、表２のリストの少なくとも１つの修飾ヌクレオシドを含む、実施形態ＩＩ－５３の組成物。

【０４９２】

実施形態ＩＩ－５５．前記修飾ヌクレオシドが、プソイドウリジンまたはプソイドウリジンアナログである、実施形態ＩＩ－５４の組成物。

【０４９３】

実施形態ＩＩ－５６．前記プソイドウリジンアナログが、Ｎ－１－メチルプソイドウリジンである、実施形態ＩＩ－５４の組成物。

【０４９４】

実施形態ＩＩ－５７．前記ＴＥＲＴ合成ＲＮＡが、非翻訳領域（ＵＴＲ）を含む、実施形態ＩＩ－５３～ＩＩ－５６の組成物。

【０４９５】

実施形態ＩＩ－５８．前記ＴＥＲＴ合成ＲＮＡが、５’キャップ構造を含み、前記５’キャップ構造が、ｍ７（３’ＯＭｅＧ）（５’）ｐｐｐ（５’）（２’ＯＭｅＡ）ｐＧ、ＩＲＥＳ、Ｃａｐ０、Ｃａｐ１、ＡＲＣＡ、イノシン、Ｎ１－メチル－グアノシン、２’フルオロ－グアノシン、７－デアザ－グアノシン、ＣｌｅａｎＣａｐＴＭ、８－オキソ－グアノシン、２－アミノ－グアノシン、ＬＮＡ－グアノシン、２－アジド－グアノシン、Ｃａｐ２、Ｃａｐ４、ＣＡＰ－００３、またはＣＡＰ－２２５である、実施形態ＩＩ－５３～ＩＩ－５７のいずれか１つの組成物。

【０４９６】

実施形態ＩＩ－５９．前記ＴＥＲＴ合成ＲＮＡが、前記コード領域の３’側にポリ－アデノシン（ポリＡ）ヌクレオチド配列を含む、実施形態ＩＩ－５３～ＩＩ－５８のいずれか１つの組成物。

【０４９７】

実施形態ＩＩ－６０．前記ＴＥＲＴ合成ＲＮＡが、鎖終結ヌクレオチドを含み、前記ヌクレオチドが、３’－デオキシアデノシン（コルジセピン）、３’－デオキシウリジン、３’－デオキシシトシン、３’－デオキシグアノシン、３’－デオキシチミン、２’，３’－ジデオキシヌクレオシド、２’，３’－ジデオキシアデノシン、２’，３’－ジデオキシウリジン、２’，３’－ジデオキシシトシン、２’，３’－ジデオキシグアノシン、２’、３’－ジデオキシチミン、２’－デオキシヌクレオシド、または－Ｏ－メチルヌクレオシドである、実施形態ＩＩ－５３～ＩＩ－５９のいずれか１つの組成物。

【０４９８】

実施形態ＩＩ－６１．前記ＴＥＲＴ合成ＲＮＡが、コドン最適化されている、実施形態ＩＩ－５３～ＩＩ－６０のいずれか１つの組成物。

【０４９９】

実施形態ＩＩ－６２．処置を必要とする対象の肺線維症を処置するための、実施形態ＩＩ－３６～ＩＩ－６１のいずれか１つの組成物の使用。

【０５００】

実施形態ＩＩ－６３．前記肺線維化が、肺疾患と関連しており、前記肺疾患が、肺線維症、家族性肺線維症、特発性肺線維症、先天性角化異常症を伴う肺線維症、間質性肺疾患、肺炎、間質性肺炎、肺気腫、または肺癌である、実施形態ＩＩ－６２による組成物の使用。

【０５０１】

実施形態ＩＩ－６４．前記肺線維症が、前記対象のＴＥＲＴ変異と関連する、実施形態ＩＩ－６２またはＩＩ－６３による組成物の使用。

【０５０２】

実施形態ＩＩ－６５．前記組成物が、静脈内注射により前記対象に投与される、実施形態ＩＩ－６２～ＩＩ－６４のいずれかによる組成物の使用。

【０５０３】

実施形態ＩＩ－６６．

【０５０４】

（ｉ）テロメラーゼ逆転写酵素（ＴＥＲＴ）をコードするリボ核酸（ＲＮＡ）を含む送達ビヒクル；及び

【０５０５】

（ｉｉ）薬学的に許容される溶媒または賦形剤、

を含み、

【０５０６】
前記送達ビヒクルが、肺細胞に優先的に送達及び／またはトランスフェクトされることが可能である、医薬組成物。
【０５０７】
実施形態ＩＩ－６７．前記送達ビヒクルが、ＬＮＰである、実施形態ＩＩ－６６の医薬組成物。
【０５０８】
実施形態ＩＩ－６８．前記ＬＮＰが、
【０５０９】
（ｉ）約２０％～約５０％のモル百分率のカチオン性脂質、及び
【０５１０】
（ｉｉ）約２０％～約６０％のモル百分率のＳＳ－ＯＰまたはＳＳ－ＯＰアナログを含む、実施形態ＩＩ－６７の医薬組成物。
【０５１１】
実施形態ＩＩ－６９．前記ＳＳ－ＯＰアナログが、ＳＳ－Ｍ、ＳＳ－Ｅ、ＳＳ－ＥＣ、ＳＳ－ＬＣ、及びＳＳ－ＯＣのいずれか１つ以上である、実施形態ＩＩ－６８の医薬組成物。
【０５１２】
実施形態ＩＩ－７０．前記カチオン性脂質が、２－ジオレオイル－３－トリメチルアンモニウム－プロパン（ＤＯＴＡＰ）、ジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミド（ＤＤＡＢ）、イミダゾールコレステロールエステル（ＩＣＥ）、２５－ヒドロキシコレステロール（２５ＯＨ　Ｃｈｏｌ）、２０α－ヒドロキシコレステロール５－コレステン－３α、２０α－ジオール（２０α　Ｃｈｏｌ）、Ｎ－［１－（２，３－ジオレイルオキシ）プロピル］－Ｎ，Ｎ，Ｎ－トリメチルアンモニウムクロリド（ＤＯＴＭＡ）、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）、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－ジステアリルオキシ－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）、ジメチルジオクタデシルアンモニウム（ＤＤＡ）、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パ－３－イル）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－Ｎ－ヒドロキシエチルアンモニウムブロミド（ＤＭＲＩＥ）、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１－１－（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－ジメチルアミノプロパン（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）、または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）、及びそれらの混合物のうちのいずれか１つ以上である、実施形態ＩＩ－６８またはＩＩ－６９の医薬組成物。
【０５１３】

実施形態ＩＩ－７１．前記カチオン性脂質が、ＤＯＴＡＰである、実施形態ＩＩ－７０の医薬組成物。

【０５１４】

実施形態ＩＩ－７２．前記ＬＮＰが、約２５％～約３５％のモル百分率の前記カチオン性脂質を含む、実施形態ＩＩ－６８～ＩＩ－７１のいずれか１つの医薬組成物。

【０５１５】

実施形態ＩＩ－７３．前記ＬＮＰが、約３０％のモル百分率の前記カチオン性脂質を含む、実施形態ＩＩ－６８～ＩＩ－７１のいずれか１つの医薬組成物。

【０５１６】

実施形態ＩＩ－７４．前記ＬＮＰが、構造脂質を含む、実施形態ＩＩ－６８～ＩＩ－７３のいずれか１つの医薬組成物。

【０５１７】

実施形態ＩＩ－７５．前記構造脂質が、１，２－ジ－（９Ｚ－オクタデセノイル）－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＯＰＥ）、グリセロール－モノオレアート（ＧＭＯ）、ジステアロイルホスファチジルコリン（ＤＳＰＣ）、ジオレオイルホスファチジルコリン（ＤＯＰＣ）、ジパルミトイルホスファチジルコリン（ＤＰＰＣ）、ジオレオイルホスファチジルグリセロール（ＤＯＰＧ）、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール（ＤＰＰＧ）、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＯＰＥ）、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン（ＰＯＰＣ）、パルミトイルオレオイル－ホスファチジルエタノールアミン（ＰＯＰＥ）、ジオレオイル－ホスファチジルエタノールアミン４－（Ｎ－マレイミドメチル）－シクロヘキサン－１－カルボキシラート（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－ステアロイル－２－オレオイル－ホスファチジルエタノールアミン（ＳＯＰＥ）、コレステロール、または別のステロール、及びそれらの混合物のうちのいずれか１つ以上である、実施形態ＩＩ－７４の医薬組成物。

【０５１８】

実施形態ＩＩ－７６．前記構造脂質が、ＤＯＰＣである、実施形態ＩＩ－７５の医薬組成物。

【０５１９】

実施形態ＩＩ－７７．前記ＬＮＰが、約１％～約５％のＤＯＰＣを含む、実施形態ＩＩ－７６の医薬組成物。

【０５２０】

実施形態ＩＩ－７８．前記ＬＮＰが、構造脂質を実質的に含まない、及び／または最大１％の構造脂質を含む、実施形態ＩＩ－６８～ＩＩ－７７のいずれか１つの医薬組成物。

【０５２１】

実施形態ＩＩ－７９．前記ＬＮＰが、約２０％～約４０％のコレステロールを含む、実施形態ＩＩ－６８～ＩＩ－７８のいずれか１つの医薬組成物。

【０５２２】

実施形態ＩＩ－８０．前記ＬＮＰが、コレステロールを実質的に含まない、実施形態ＩＩ－６８～ＩＩ－７８のいずれか１つの医薬組成物。

【０５２３】

実施形態ＩＩ－８１．前記ＬＮＰが、絶縁体脂質を含む、実施形態ＩＩ－６８～ＩＩ－８０のいずれか１つの医薬組成物。

【０５２４】

実施形態ＩＩ－８２．前記ＬＮＰが、絶縁体脂質を実質的に含まない、実施形態ＩＩ－６８～ＩＩ－８０のいずれか１つの医薬組成物。

【０５２５】

実施形態ＩＩ－８３．前記ＬＮＰが、肝臓と比較して、前記肺に優先的に送達及び／ま

たはトランスフェクトされる、実施形態ＩＩ－６８～ＩＩ－８２のいずれか１つの医薬組成物。

【０５２６】

実施形態ＩＩ－８４．前記ＴＥＲＴ合成ＲＮＡが、表２のリストの少なくとも１つの修飾ヌクレオシドを含む、実施形態ＩＩ－６６～ＩＩ－８３のいずれか１つの医薬組成物。

【０５２７】

実施形態ＩＩ－８５．前記修飾ヌクレオシドが、プソイドウリジンまたはプソイドウリジンアナログである、実施形態ＩＩ－８４の医薬組成物。

【０５２８】

実施形態ＩＩ－８６．前記プソイドウリジンアナログが、Ｎ－１－メチルプソイドウリジンである、実施形態ＩＩ－８５の医薬組成物。

【０５２９】

実施形態ＩＩ－８７．前記ＴＥＲＴ合成ＲＮＡが、非翻訳領域（ＵＴＲ）を含む、実施形態ＩＩ－６６～ＩＩ－８６の医薬組成物。

【０５３０】

実施形態ＩＩ－８８．前記ＴＥＲＴ合成ＲＮＡが、５’キャップ構造を含み、前記５’キャップ構造が、ｍ７（３’ＯＭｅＧ）（５’）ｐｐｐ（５’）（２’ＯＭｅＡ）ｐＧ、ＩＲＥＳ、Ｃａｐ０、Ｃａｐ１、ＡＲＣＡ、イノシン、Ｎ１－メチル－グアノシン、２’フルオロ－グアノシン、７－デアザ－グアノシン、ＣｌｅａｎＣａｐＴＭ、８－オキソ－グアノシン、２－アミノ－グアノシン、ＬＮＡ－グアノシン、２－アジド－グアノシン、Ｃａｐ２、Ｃａｐ４、ＣＡＰ－００３、またはＣＡＰ－２２５である、実施形態ＩＩ－６６～ＩＩ－８７のいずれか１つの医薬組成物。

【０５３１】

実施形態ＩＩ－８９．前記ＴＥＲＴ合成ＲＮＡが、前記コード領域の３’側にポリ－アデノシン（ポリＡ）ヌクレオチド配列を含む、実施形態ＩＩ－６６～ＩＩ－８８のいずれか１つの医薬組成物。

【０５３２】

実施形態ＩＩ－９０．前記ＴＥＲＴ合成ＲＮＡが、鎖終結ヌクレオチドを含み、前記ヌクレオチドが、３’－デオキシアデノシン（コルジセピン）、３’－デオキシウリジン、３’－デオキシシトシン、３’－デオキシグアノシン、３’－デオキシチミン、２’，３’－ジデオキシヌクレオシド、２’，３’－ジデオキシアデノシン、２’，３’－ジデオキシウリジン、２’，３’－ジデオキシシトシン、２’，３’－ジデオキシグアノシン、２’、３’－ジデオキシチミン、２’－デオキシヌクレオシド、または－Ｏ－メチルヌクレオシドである、実施形態ＩＩ－６６～ＩＩ－８９のいずれか１つの医薬組成物。

【０５３３】

実施形態ＩＩ－９１．前記ＴＥＲＴ合成ＲＮＡが、コドン最適化されている、実施形態ＩＩ－６６～ＩＩ－９０のいずれか１つの医薬組成物。

【０５３４】

実施形態ＩＩ－９２．処置を必要とする対象の肺線維症を処置するための、実施形態ＩＩ－６６～ＩＩ－９１のいずれか１つの医薬組成物の使用。

【０５３５】

実施形態ＩＩ－９３．前記肺線維化が、肺疾患と関連しており、前記肺疾患が、肺線維症、家族性肺線維症、特発性肺線維症、先天性角化異常症を伴う肺線維症、間質性肺疾患、肺炎、間質性肺炎、肺気腫、または肺癌である、実施形態ＩＩ－９２による医薬組成物の使用。

【０５３６】

実施形態ＩＩ－９４．前記肺線維症が、前記対象のＴＥＲＴ変異と関連する、実施形態ＩＩ－９２またはＩＩ－９３による医薬組成物の使用。

【０５３７】

実施形態ＩＩ－９５．前記組成物が、静脈内注射により前記対象に投与される、実施形

態ＩＩ－９２～ＩＩ－９４のいずれかによる医薬組成物の使用。

【実施例】

【０５３８】

以下の実施例は、説明の目的で含まれており、本開示の範囲を限定することを意図するものではない。

【０５３９】

実施例１：脂質ナノ粒子製剤

本開示の組成物及び方法は、送達ビヒクルによる肺細胞へのポリヌクレオチドなどのカーゴの送達に使用され得る。いくつかの実施形態では、送達ビヒクルは、本明細書に開示の脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）である。いくつかの実施形態では、本明細書に開示のＬＮＰは、肺細胞集団へのｍＲＮＡの送達のために使用される。

【０５４０】

以下の表６Ａ～６Ｂは、送達ビヒクルとして使用することができるＬＮＰの例示的な製剤を示し、以下の表６Ｃは、送達ビヒクルとして使用することができる脂質のクラスを含むＬＮＰのモル百分率の範囲の例を示す。

【０５４１】

図２は、表６Ａに示される例示的な脂質構成成分を使用して作製されたｍＲＮＡ－ＬＮＰの代表的な動的光散乱（ＤＬＳ）プロットを示す。

【表６】

表６Ａ

化合物		pK	モル比	モル百分率
SS-OP	イオン性脂質	約 6.4	55	27.2%
DOPC			5	2.5%
コレステロール			40	19.8%
DMG-PEG2000			2.5	1.2%
DOTAP	カチオン性脂質		100	49.4%

【表７】

表６Ｂ

化合物	モル比	モル百分率
cKK-E12	35	17.5%
DOPE	16	8.0%
コレステロール	46.5	23.3%
14:0 の PEG2000 PE	2.5	1.3%
DOTAP	100	50.0%

【表８】

表６Ｃ

化合物	モル百分率
イオン性脂質	10～50%
構造脂質	0～15%
コレステロール	0～40%
絶縁体脂質	0.2～6%
カチオン性脂質	20～80%

【０５４２】

実施例２：マウスへのｍＲＮＡ－ＬＮＰの静脈内注射

図３は、ｍＲＮＡ－ＬＮＰを注射されたマウスの臓器全体の生物発光イメージングを示す。ｍＲＮＡ－ＬＮＰは、マイクロ流体混合を使用して製剤化することにより調製され、次いで注入前に濃縮及びバッファー交換により処理された。マウスに、体重に対し０．６ｍｇ／ｋｇの合計ｍＲＮＡのルシフェラーゼｍＲＮＡ－ＬＮＰを、静脈内投与した２６時間後に、臓器を採取し、イメージングした。生物発光イメージングは、ＬＮＰ送達ビヒクルが、ｍＲＮＡカーゴを肺に送達可能であることを示す。

【０５４３】

実施例３：マウスの静脈内注射によるｍＲＮＡ翻訳

図４Ａ～４Ｂは、それぞれ、ｍＲＮＡレポーターで処置されたマウス、及び未処置の対照マウス由来の肺細胞におけるｔｄＴｏｍａｔｏの免疫組織化学染色を示す。ｔｄＴｏｍａｔｏ　ｆｌ／ｆｌマウスに、０．６ｍｇ／ｋｇのＣｒｅ　ｍＲＮＡ　ＬＮＰまたは生理食塩水を静脈内投与した。４日後に、肺を採取した。これらの図は、Ｃｒｅ　ｍＲＮＡ－ＬＮＰによる標的化に成功した細胞において、Ｃｒｅ　ｍＲＮＡを翻訳し、Ｃｒｅリコンビナーゼは、ＳＴＯＰコドンを切除し、Ｒｏｓａ２６遺伝子座のＣＡＧプロモーター下で、ｔｄＴｏｍａｔｏ発現が可能になったことを示す。図４Ａ～４Ｂでは、スケールバーは、５０μＭである。

【０５４４】

実施例４：ＴＥＲＴ ｍＲＮＡ－ＬＮＡ送達後のマウス肺におけるテロメラーゼ活性の測定

図５Ａ～５Ｂは、それぞれ、ＴＥＲＴ　ｍＲＮＡ－ＬＮＰ送達後のマウス肺、及び未処置の対照マウス肺におけるテロメラーゼ活性の測定を示す。ＴＥＲＴノックアウト（ＫＯ）マウスに、ＴＥＲＴ　ｍＲＮＡ　ＬＮＰを２．０ｍｇ／ｋｇで静脈内投与し、１９時間後に肺を採取した。対照として、未処置ＴＥＲＴ　ＫＯマウスからも肺を採取した。テロメアリピート増幅プロトコール（ＴＲＡＰ）を、肺溶解物に対して実施した。ＴＥＲＴ　ｍＲＮＡ　ＬＮＰ処置マウスの肺溶解物で観察されたバンドパターンは、テロメラーゼ活性が存在したことを示す。

【０５４５】

ＴＲＡＰアッセイを、以下のように実施した。細胞または組織由来のタンパク質溶解物を、人工テロメア（ＤＮＡオリゴヌクレオチド）と共にインキュベートした。活性テロメラーゼが存在する場合、人工テロメアを一度に６ｂｐ伸長し、はしごパターンを生成する。次に、この伸長反応を、ＰＣＲで増幅し、ゲル上で実施する（Ａｇｉｌｅｎｔバイオアナライザー、マイクロ流体アガロースゲルを使用）。６ｂｐの増分のラダーの存在は、テロメラーゼ活性を示す。

【０５４６】
実施例５：肺送達ビヒクル製剤のトランスフェクション効率
図６Ａは、マウスにおけるＣｒｅ用量、用量回数、及び遺伝子型の関数として、例示的な肺送達ビヒクル製剤のトランスフェクション効率を示す棒グラフである。表６ＡのＬＮＰ肺ビヒクルと複合化されたＣｒｅ　ｍＲＮＡを、Ｃｒｅをオンにするのに必要なｔｄＴｏｍａｔｏレポーター遺伝子を保有するマウスに尾静脈注射を介して示された用量で送達した。レポーター遺伝子の免疫染色による組織学的分析のために肺を採取した。図６Ａは、Ｃｒｅ　ｍＲＮＡ　ＬＮＰ製剤が肺の細胞にトランスフェクトされ、用量依存的にレポーター遺伝子をオンにしたことを示す。
【０５４７】
図６Ｂ～６Ｆは、上記のマウスから採取された肺切片の代表的な画像を示し、レポータータンパク質は、暗色化した染色として示される。肺細胞を、生理食塩水対照（図６Ｂ）、体重用量のｍＲＮＡの０．１ｍｇ／ｋｇ（図６Ｃ）、０．３ｍｇ／ｋｇ（図６Ｄ）、０．６ｍｇ／ｋｇ（図６Ｅ）、または２．０ｍｇ／ｋｇ（図６Ｆ）で処置した後に採取した。
【０５４８】
実施例６：ＴＥＲＴ　ｍＲＮＡ　ＬＮＰを用いるマウスにおける肺線維症の処置
図７Ａ～７Ｃは、肺線維症について試験されたマウス肺のコンピュータ断層撮影（ＣＴ）Ｘ線スキャンを示す。マウスに、０日目に１Ｕ／ｋｇのブレオマイシンを気管内に点滴注入し、４、７、及び１１日目に０．６ｍｇ／ｋｇのＴＥＲＴ　ｍＲＮＡ　ＬＮＰまたは生理食塩水を静脈内注射した。２週間後に、ＣＴ画像を取得した。図７Ａは、ブレオマイシン処置なしの対照を示し、図７Ｂ～７Ｃは、肺線維症を誘発するための１Ｕ／ｋｇのブレオマイシンの使用を示す。図７Ｂ～７Ｃは、それぞれ、生理食塩水及びＴＥＲＴ　ｍＲＮＡ　ＬＮＰで処置された。健康な肺組織は、より暗く見え、線維性肺組織は、より明るく見える。生理食塩水で処置された対照よりも、ＴＥＲＴ　ｍＲＮＡ　ＬＮＰ処置マウスでは、少ない線維症が示される。これらの図は、肺線維症のブレオマイシンマウスモデルにおける線維症の低減に対するＴＥＲＴ　ｍＲＮＡ　ＬＮＰによる処置の効果を示す。
【０５４９】
実施例７：マウスにおけるＳＳ－ＯＰ　ＤＯＴＡＰの使用による毒性の低減
図８は、肺標的化ＬＮＰの様々な製剤を投与されたマウスの死亡率を示すグラフを示す。Ｃ５７Ｂｌ／６マウスに、表６Ａの例示的な製剤に従って、ＳＳ－ＯＰ及びＤＯＴＡＰを含有する肺標的化ＬＮＰの製剤（時点毎にＮ＝２～１２）、または表６Ｂの例示的な製剤に従って、ｃＫＫ　ＤＯＴＡＰを含有する肺標的化ＬＮＰの製剤（時点毎にＮ＝２～４）を投与した。死亡率は、急性期治療で生き残ったマウスのパーセントとして示される。マウスに、総レポーターｍＲＮＡのｍｇ／ｋｇに基づいて投与した。これらの結果は、ＳＳ－ＯＰ及びＤＯＴＡＰを使用した表６Ａの例示的な製剤の忍容性の改善及び毒性率の低減を示す。
【０５５０】
実施例８：マウス線維症モデルにおける肺胞細胞へのｍＲＮＡの送達
図９Ａ～９Ｄは、肺線維症を誘発するためにブレオマイシンで処置し、肺胞細胞へのｍＲＮＡの送達を示すためにＣＲＥ　ｍＲＮＡまたは生理食塩水で処置されたマウス由来の様々な肺試料を示す。要約すると、Ａｉ１４（ＲＯＳＡ２６　Ｌｏｘ－ｓｔｏｐ－ｌｏｘｔｄＴｏｍａｔｏ）マウスに、経口吸引（ＯＡ）により１Ｕ／ｋｇのブレオマイシンを与え、線維症を誘発した。ブレオマイシン投与後２１日目に、マウスに、生理食塩水または２ｍｇ／ｋｇのＣｒｅ　ｍＲＮＡを投与し、この翻訳により、ｔｄＴｏｍａｔｏの発現が可能になる。投与後３日目（２４日目）に、マウスを死亡させ、肺をＰＦＡで膨張させて固定した。肺切片を、抗ｔｄＴｏｍａｔｏ抗体及びトリクロームで染色した。これらの結果は、肺線維症マウスにおいてもＣｒｅ　ｍＲＮＡが肺胞細胞にうまく送達することができることを示し、これは、疾患状況におけるＬＮＰのシャントがｍＲＮＡ送達に影響を与えるかどうかという問題に取り組み得る。

【０５５１】
実施例９：ＳＳ－ＯＰ　ＤＯＴＡＰ　ＩＶ及びＯＡ経路によるｍＲＮＡの肺送達
　ＳＳ－ＯＰ　ＤＯＴＡＰ　ＬＮＰ製剤の静脈内投与と経口投与を比較するために、ホタルルシフェラーゼ（Ｌｕｃ）ｍＲＮＡを封入する脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）組成物を、表２Ａ及び２Ｂに従って製剤化した。これらの実験で使用された脂質対ｍＲＮＡの比（ｗｔ／ｗｔ）は、７５：１及び４０：１であった。Ｃ５７Ｂｌ／６マウスに、静脈内注射（ＩＶ）により０．５ｍｇ／ｋｇ、または口腔咽頭吸引（ＯＡ）により０．２ｍｇ／ｋｇのＬＮＰ－ｍＲＮＡを投与した。肺を、２４時間後にｅｘ　ｖｉｖｏでイメージングした。図１０は、肺におけるルシフェラーゼの平均放射輝度（光子／秒／ｃｍ２／ｓｒ）を示す。ＳＳ－ＯＰ　ＤＯＴＡＰ製剤の静脈内投与は、経口投与よりも有意に高い肺トランスフェクションをもたらした（図１０及び１１）。さらに、脂質：ＲＮＡ　７５：１または４０：１のいずれかの脂質：ＲＮＡ比を有するＳＳ－ＯＰ　ＤＯＴＡＰ　ＬＮＰは、静脈内に投与された場合、同様のトランスフェクション効率を示した。
【０５５２】
実施例１０：肺へのｍＲＮＡを標的とする正荷電脂質
　ＳＳ－ＯＰ　ＬＮＰ製剤を他のカチオン性脂質と比較するために、図１２に示されるように、Ｔｏｍａｔｏ　ｆｌ／ｆｌマウスに、Ｃｒｅ　ｍＲＮＡを封入した様々なＬＮＰ製剤を投与し、０．１～０．５ｍｇ／ｋｇの範囲で静脈内送達した。ＳＳ－ＯＰ　ＤＯＴＡＰ製剤、ＳＳ－ＯＰ　２０α　Ｃｈｏｌ製剤、ＳＳ－ＯＰ　ＤＤＡＢ製剤、及び２５ＯＨ　Ｃｈｏｌの脂質対ｍＲＮＡ比は、８０μｍｏｌの脂質：１ｍｇのｍＲＮＡであった。ＳＳ－ＯＰ　ＩＣＥの脂質対ｍＲＮＡの比は、５０：１であった。ＳＳ－ＯＰ　ＤＯＴＡＰ　ＩＣＥ製剤の脂質対ｍＲＮＡの比は、７０：１であった。３日後に、肺を採取し、ホルマリン固定及びパラフィン包埋により処理した。陽性細胞を、抗ｔｄＴｏｍａｔｏ抗体で標識した。図１２は、肺実質における陽性Ｔｏｍａｔｏ細胞のパーセントを示す。
【０５５３】
　トランスフェクションの結果を図１２に示す。注目すべきことに、ＳＳ－ＯＰ　ＬＮＰ製剤中の正荷電形態のコレステロール（ＩＣＥ）を含む、生理学的ｐＨ（７．４）で正味正電荷を有する他のカチオン性脂質は、ＤＯＴＡＰと置換され得る。試験されたＬＮＰ製剤を、以下の表７～１２に示す。
【表９】

表７：ＳＳ－ＯＰ　ＤＯＴＡＰ

化合物	モル比	パーセント
SS-OP	55	27.2
DOPC	5	2.5
コレステロール	40	19.8
DMG-PEG2000	2.5	1.2
DOTAP	100	49.4

【表１０】

表８：ＳＳ－ＯＰ　ＩＣＥ

化合物	モル比	パーセント
SS-OP	55	54.2
DOPC	5	4.9
コレステロール	0	0
ICE	40	39.4
DMG-PEG2000	1.5	1.5

【表１１】

表９：ＳＳ－ＯＰ　２０α　Ｃｈｏｌ

化合物	モル比	パーセント
SS-OP	55	27.2
DOPC	5	2.5
20αChol	40	19.8
DMG-PEG2000	2.5	1.2
DOTAP	100	49.4

【表１２】

表１０：ＳＳ－ＯＰ　ＤＤＡＢ

化合物	モル比	パーセント
SS-OP	55	27.2
DOPC	5	2.5
コレステロール	40	19.8
DMG-PEG2000	2.5	1.2
DDAB	100	49.4

【表１３】

表１１：ＳＳ－ＯＰ　２５ＯＨ　Ｃｈｏｌ

化合物	モル比	パーセント
SS-OP	55	27.2
DOPC	5	2.5
25 OH Chol	40	19.8
DMG-PEG2000	2.5	1.2
DOTAP	100	49.4

【表１４】

表１２：ＳＳ－ＯＰ　ＤＯＴＡＰ　ＩＣＥ

化合物	モル比	パーセント
SS-OP	55	30.2
DOPC	5	2.7
ICE	40	22
コレステロール	20	11
DMG-PEG2000	2.2	1.2
DOTAP	60	32.9

【０５５４】

実施例１１：肺送達のためのｍＲＮＡ　ＬＮＰ製剤の異なる流量

ｍＲＮＡのＳＳ－ＯＰ　ＤＯＴＡＰ　ＬＮＰ（表６Ａ）封入の製剤の流量を比較するために、ルシフェラーゼｍＲＮＡを封入するＳＳ－ＯＰ　ＤＯＴＡＰ　ＬＮＰを表６Ａの比で製剤化した。脂質：ｍＲＮＡのｗｔ／ｗｔ比は、５０：１であった。水性（ｍＲＮＡ）対エタノール（脂質）の流量比は、３：１であった。全体の流量を、図１３に示されるように変化させた。Ｃ５７Ｂｌ／６マウスに静脈内注射により０．１ｍｇ／ｋｇを投与し、２０時間後にｅｘ　ｖｉｖｏで肺をイメージングした。肺の平均放射輝度（光子／秒／ｃｍ２／ｓｒ）が示される。ＳＳ　ＯＰ　ＤＯＴＡＰ製剤についての最も高いシグナルは、ＬＮＰ　ｍＲＮＡ封入について８ｍｌ／分の流量で見出された（図１３）。表１３は、表６ＡのＳＳ　ＯＰ　ＤＯＴＡＰ製剤の流量と、粒径、ゼータ電位、及び封入効率を比較する。

【表１５】

表１３：流量、対、粒子サイズ、ゼータ電位、及び封入効率

流量	粒径	ゼータ電位	封入効率
1ml/分	69	41.8	95
4ml/分	73	30.8	96
8ml/分	52	17.3	95
12ml/分	54	-2.6	94

【０５５５】

実施例１２：ＤＯＰＣ及びコレステロールは、ＳＳ－ＯＰ　ＤＯＴＡＰ　ＬＮＰ　ｍＲＮＡ送達には必要ではなかった。

肺にトランスフェクトするのに必要なＳＳ－ＯＰ　ＤＯＴＡＰ　ＬＮＰの構成成分を決定するために、表６ＡのＳＳ－ＯＰ　ＤＯＴＡＰ　ＬＮＰ製剤を、以下の表１４に提示される製剤化に従って変更した。Ｃ５７Ｂｌ／６マウスに、ルシフェラーゼｍＲＮＡを含む、表１４のＬＮＰ製剤を静脈内注射により投与し、１６時間後に肺をｅｘ　ｖｉｖｏでイメージングした。図１４は、製剤毎の肺におけるルシフェラーゼ活性の平均放射輝度（光子／秒／ｃｍ^2／ｓｒ）を示す。特に、ＳＳ－ＯＰ　ＤＯＴＡＰ　ＬＮＰ製剤による肺トランスフェクションには、中性脂質、例えば、ＤＯＰＣも、コレステロールも必要とされなかった。表１４は、ＤＯＰＣ及び／またはコレステロールを有り無しの両方で、試験されたＳＳ－ＯＰ　ＤＯＴＡＰ製剤を示す。

【表１６】

表１４：ＤＯＰＣ及び／またはコレステロールを含まないＳＳ－ＯＰ　ＤＯＴＡＰ製剤

混合物番号	SS-OP	DOPC	コレステロール	DMG-PEG2000	DOTAP	名称	DOTAP%	PEG%
1	55	5	40	2.5	100	SSOP DOTAP	49.4%	1.2%
2	55	0	40	2.5	95	DOPC なし	49.4%	1.3%
3	55	0	20	2.5	75	DOPC なし、Chol 少ない	49.2%	1.6%
4	55	0	0	2.5	55	DOPC なし、Chol なし	48.9%	2.2%
5	55	0	40	4	95	DOPC なし、2%の PEG	49.0%	2.1%

【０５５６】

実施例１３：ｍＲＮＡ：脂質比の変化により、異なる活性が示された

ｍＲＮＡ対脂質の比でのｍＲＮＡ送達の関連を決定するために、表６Ａの製剤による、且つ、１：６２、１：４５、及び１：３０のｍＲＮＡ：脂質の比（ｗｔ／ｗｔ）のルシフェラーゼｍＲＮＡを含むＳＳ－ＯＰ　ＤＯＴＡＰ　ＬＮＰを、Ｃ５７Ｂｌ／６マウスに静脈内投与した。マウスに、１．５ｍｇ／ｋｇを静脈内注射して投与し、２６時間後にｅｘ　ｖｉｖｏで肺をイメージングした。図１５は、１：３０～１：６２のｍＲＮＡ：脂質比が、最も優れた性能を示すｍＲＮＡ：脂質比であり、１：３０が最も高い生物発光を示したことを示す。

【０５５７】

ＤＯＰＣを含まず且つ様々な比でホタルルシフェラーゼ（Ｌｕｃ）ｍＲＮＡを含むＳＳ－ＯＰ　ＤＯＴＡＰ　ＬＮＰを、１．５ｍｇ／ｋｇの用量でＣ５７Ｂｌ／６マウスに静脈内注射した。２６時間後に、肺をｅｘ　ｖｉｖｏでイメージングした。肺の平均放射輝度（光子／秒／ｃｍ２／ｓｒ）が示される。

【０５５８】

ＬＮＰは、１：５のｍＲＮＡ：脂質の比で形成されなかった（Ｎ．Ｄ．は、投与されなかったことを意味する）。ＤＯＰＣを含まないこれらのＳＳ－ＯＰ　ＤＯＴＡＰ　ＬＮＰ製剤では、１：６２のｍＲＮＡ：脂質の比が、最も高いルシフェラーゼシグナルを示した（図１６）。

【０５５９】

実施例１４：ＰＥＧ化脂質パーセントの変化により、異なる活性が示された

ＳＳ－ＯＰ　ＤＯＴＡＰ　ＬＮＰによるｍＲＮＡ送達に対するＰＥＧ化脂質パーセントの影響を決定するために、ＬＮＰをルシフェラーゼｍＲＮＡと共に以下の表１５の比率毎に製剤化し、１．５ｍｇ／ｋｇの用量で、Ｃ５７Ｂｌ／６マウスに静脈内投与した。１９時間後に、肺をｅｘ　ｖｉｖｏでイメージングした。図１７Ａ及び１７Ｂは、肺の平均放射輝度（光子／秒／ｃｍ^2／ｓｒ）を示す。ＰＥＧシグナルが増加するにつれて、生物発光シグナルが減少することが観察された。

【０５６０】

ＳＳ－ＯＰ　ＤＯＴＡＰ　ＬＮＰｗの最適なＰＥＧ化脂質範囲は、０～３％であることが判明し、０．５％が、ｍＲＮＡの最良のＬＮＰ送達を提供する（図１７Ａ及び１７Ｂ）。表１５は、様々な割合のＰＥＧ化脂質を含むＳＳ－ＯＰ　ＤＯＴＡＰ製剤を示す。

【表１７】

表１５：様々な割合のＰＥＧ化脂質を含むＳＳ－ＯＰ　ＤＯＴＡＰ製剤

名称	SS-OP	DOPC	コレステロール	DMG-PEG2000	DOTAP	DOTAP%	PEG%	脂質:mRNA wt/wt
0.5%のPEG	55	5	40	1.0	100	50%	0.5%	62
1.2%のPEG	55	5	40	2.5	100	49%	1.2%	62
3.5%のPEG	55	5	40	7.3	100	48%	3.5%	63
6% PEG	55	5	40	12.8	100	47%	6.0%	65
7% PEG	55	5	40	15.0	100	47%	7.0%	66

実施例１６：肺の標的化に、ＰＥＧ化脂質は必要とされない

ＰＥＧ化脂質が、ＳＳ－ＯＰ　ＤＯＴＡＰ　ＬＮＰ　ｍＲＮＡ送達にさえ必要であるかどうかを判定するために、ルシフェラーゼｍＲＮＡを用いて、ＬＮＰを以下の表１６の比毎に製剤化した。Ｃ５７Ｂｌ／６マウスに静脈内注射により投与し、２１時間後に、ｅｘｖｉｖｏで肺をイメージングした。ＬＮＰ－ｍＲＮＡ用量は、１．２％のＰＥＧ条件及び０．１％のＰＥＧ条件では動物体重１ｋｇ当たり１．５ｍｇのｍＲＮＡであった。ｍＲＮＡに対する脂質の比は、６３であった。０％のＰＥＧ条件では、マウスに、０．２ｍｇ／ｋｇを投与した。図１８Ａ及び１８Ｂは、肺の平均放射輝度（光子／秒／ｃｍ２／ｓｒ）を示す。これらの結果は、０．１～１．２％のＰＥＧ化物を含有するＳＳ－ＯＰ　ＤＯＴＡＰ　ＬＮＰ製剤が最適であり得ることを示す。しかし、ＰＥＧ化脂質を含まないＬＮＰ製剤は、ｍＲＮＡを肺にうまく送達した。表１６は、低ＰＥＧ化及び非ＰＥＧ化脂質ＳＳ－ＯＰ　ＤＯＴＡＰ製剤を示す。

【表１８】

表１６：低ＰＥＧ化及び非ＰＥＧ化脂質ＳＳ－ＯＰ　ＤＯＴＡＰ製剤

脂質混合物	SSOP%	DOPC%	コレステロール%	DMG-PEG2000%	DOTAP%
1.2%のPEG	38%	3%	27%	1.2%	30%
0.1%のPEG	38%	3%	28%	0.1%	30%
0%のPEG	38%	3%	28%	0.0%	30%

【０５６１】

実施例１５：ＤＯＴＡＰ割合の変化により、肺活動の差異が示される

ＳＳ－ＯＰ　ＤＯＴＡＰ　ＬＮＰに対する様々なＤＯＴＡＰ割合の影響を判定するために、ＳＳ－ＯＰ　ＤＯＴＡＰ　ＬＮＰに、表１７の比毎に、ホタルルシフェラーゼ（Ｌｕｃ）ｍＲＮＡと共に製剤化した。Ｃ５７Ｂｌ／６マウスに、１．５ｍｇ／ｋｇで静脈内注射により投与し、１９時間後に、肺をｅｘ　ｖｉｖｏでイメージングした。図１９は、ＬＮＰ中のＤＯＴＡＰの割合に対する肺の平均放射輝度（光子／秒／ｃｍ^2／ｓｒ）を示す。表１７の製剤化の中で、肺へのＳＳ－ＯＰ　ＤＯＴＡＰ　ＬＮＰの最も効果的な送達は、３０％のＤＯＴＡＰであった。２０％以上のＤＯＴＡＰ　ＬＮＰでは、最小の肝臓標的

化が観察されたが、１０％のＤＯＴＡＰでは、強い肝臓シグナルが見られた（図２０Ａ及び２０Ｂ）。表１７は、様々なＤＯＴＡＰ割合でのＳＳ－ＯＰ　ＤＯＴＡＰ製剤を示している。

【表１９】

表１７：様々なＤＯＴＡＰ割合を有するＳＳ－ＯＰ　ＤＯＴＡＰ製剤

名称	SS-OP	DOPC	コレステロール	DMG-PEG2000	DOTAP	DOTAP%	PEG%	脂質:mRNA wt/wt
49%のDOTAP	55	5	40	2.5	100	49%	1.2%	62
40%のDOTAP	55	5	40	2.5	69	40%	1.5%	53
30%のDOTAP	55	5	40	2.5	44	30%	1.7%	45
20%のDOTAP	55	5	40	2.5	26	20%	1.9%	39
10%のDOTAP	55	5	40	2.5	11	10%	2.2%	35

【０５６２】

実施例１７：肺へのＬＮＰ－ｍＲＮＡの送達は、肺胞上皮細胞をトランスフェクトする

表６Ａの式に従ってＳＳ－ＯＰ　ＤＯＴＡＰ　ＬＮＰでトランスフェクトされた細胞型を観察するために、ＬＮＰをＣｒｅ　ｍＲＮＡと共に製剤化し、ｔｏｍａｔｏ　ｆｌ／ｆｌマウスに２．０ｍｇ／ｋｇで投与した（図２１Ａ）。図２１Ｂは、ＰＢＳ陰性対照を示す。３日後に、肺を採取し、ホルマリン固定及びパラフィン包埋により処理した。４μｍの切片を、以下で染色した。

【０５６３】

ＡＴ１肺胞上皮肺細胞のマーカーである抗ＩＧＦＢＰ２、ＡＴ２肺胞上皮肺幹細胞のマーカーである抗Ｐｒｏｓｕｒｆａｃｔａｎｔプロテイン Ｃ（ＳＰＣ）、抗ｔｄＴｏｍａｔｏ、及び細胞を同定するためのＤＮＡマーカーとしてのＤＡＰＩ。ＳＰＣ及びｔｄＴｏｍａｔｏの両方に対して陽性の細胞は、ＬＮＰ製剤が肺ＡＴ２肺胞上皮幹細胞をうまくトランスフェクトしたことを示した。ＩＧＦＢＰ２及びｔｄＴｏｍａｔｏの両方に対して陽性の細胞は、ＬＮＰ製剤が肺ＡＴ１肺胞上皮細胞にうまくトランスフェクトしたことを示した。対照にｔｄＴｏｍａｔｏ染色が存在しないので、抗ｔｄＴｏｍａｔｏ染色が特異的であることが示された。

【０５６４】

実施例１８：ＳＳ－ＯＰ　ＤＯＴＡＰを用いるＫＯマウスにおけるＴＥＲＴ　ｍＲＮＡ送達

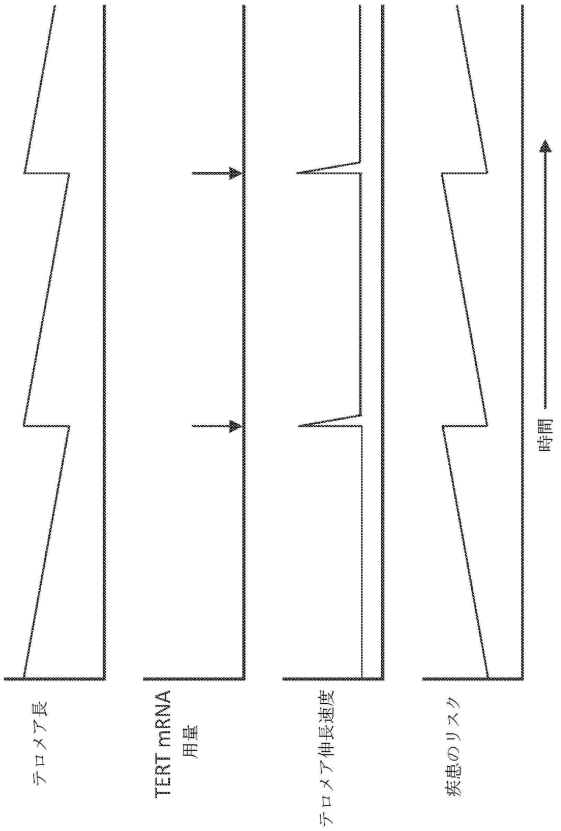
疾患処置としての治療用ｍＲＮＡのＳＳ－ＯＰ　ＤＯＴＡＰ送達を判定するために、ＴＥＲＴ　ｍＲＮＡを封入したＳＳ－ＯＰ　ＤＯＴＡＰ　ＬＮＰを、肺線維症モデルマウスに投与した。マウス肺線維症モデル肺及び処置のタイムラインが図２２に示される。肺線維症を、ヒトと同様のテロメア長を有する第３世代（Ｇ３）ＴＥＲＴノックアウト（ＫＯ）マウスで誘発した。ブレオマイシンを、皮下に埋め込まれた浸透圧ミニポンプを介して継続的に投与した。送達された総用量は、１００Ｕ／ｋｇであった。表６ＡのＳＳ－ＯＰ　ＤＯＴＡＰ　ＬＮＰ製剤中に封入されたＴＥＲＴ　ｍＲＮＡを、示されるように、１０日目から始めて４回静脈内投与した。ホタルルシフェラーゼｍＲＮＡである対照と比較して、ＴＥＲＴ　ｍＲＮＡの送達により、エンドポイントでマウスの生存率が２１０％延長した。

【０５６５】

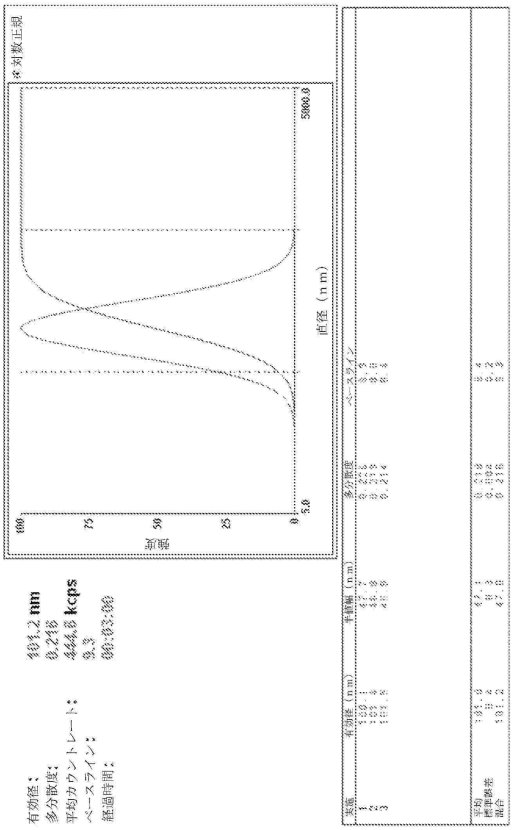
本開示の好ましい実施形態が本明細書に示され記載されているが、そのような実施形態が、単なる例として提供されることは、当業者らには明らかであろう。ここで、数多くの変形、変更、及び置換は、本開示から逸脱することなく、当業者らに想起されるであろう。本明細書の本開示の実施形態に対する様々な代替案が、本開示を実施する際に用いられ得ると理解すべきである。以下の特許請求の範囲が、本開示の範囲を定義し、これらの特許請求の範囲内の方法及び構造、ならびに、それらの均等物が、それにより網羅されることが意図される。

【図面】

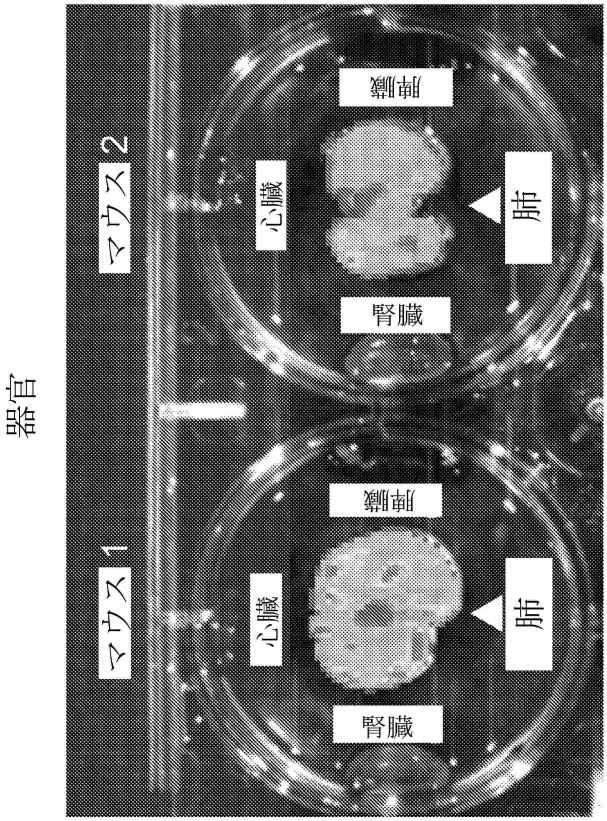
【図１】



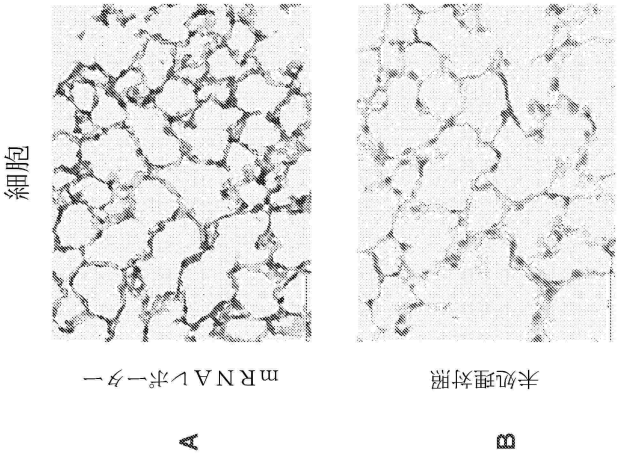
【図２】



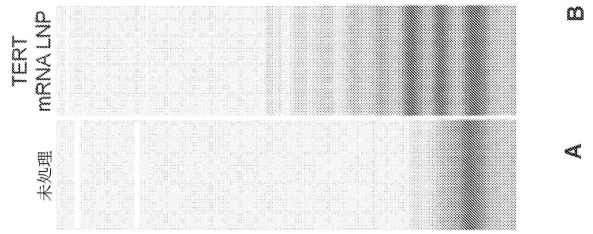
【図３】


器官
マウス１
マウス２
肺
心臓
脾臓
腎臓
肺
心臓
脾臓
腎臓

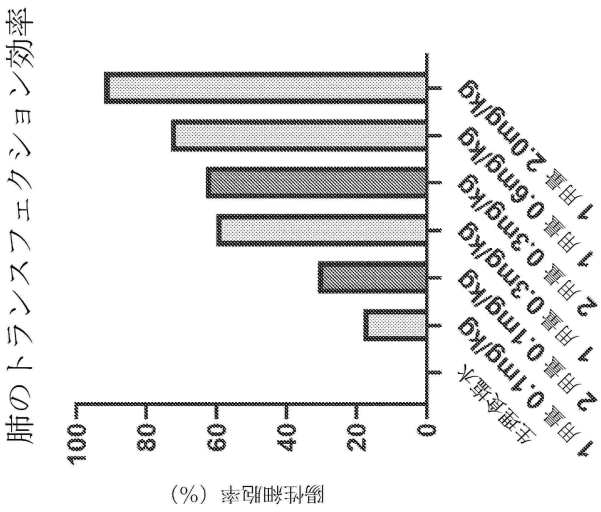
【図４】


細胞
mRNAレポーター
未処理対照
A
B

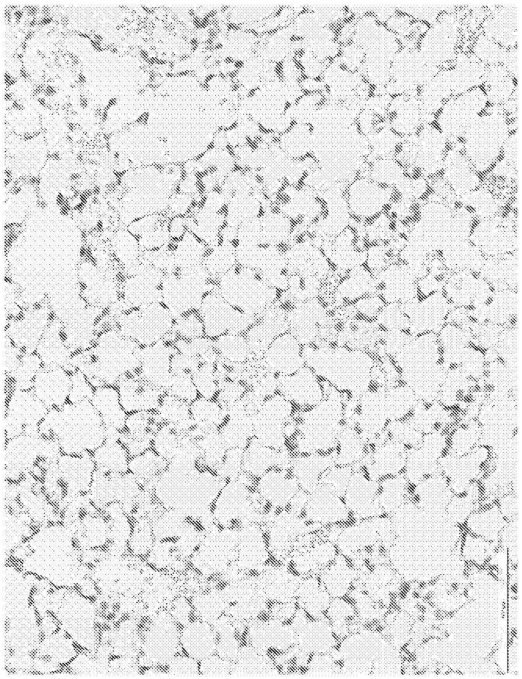
【図５】


TERT mRNA LNP
未処理
A
B

【図６Ａ】

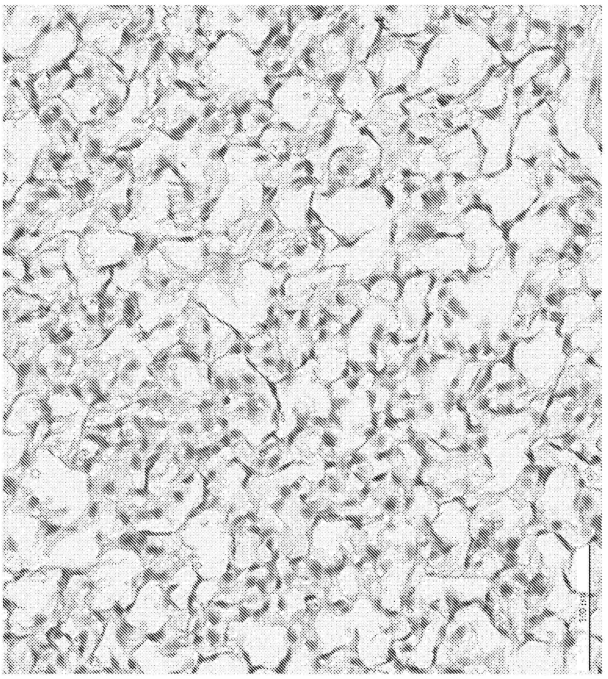

肺のトランスフェクション効率
陽性細胞率（%）
100
80
60
40
20
0
生理食塩水
1 用量 0.1mg/kg
2 用量 0.1mg/kg
1 用量 0.3mg/kg
2 用量 0.3mg/kg
1 用量 0.6mg/kg
1 用量 2.0mg/kg

【図６Ｂ】



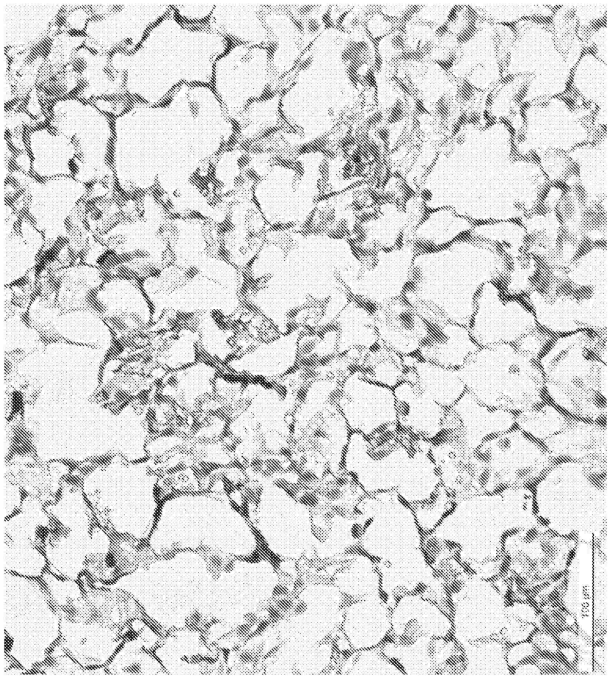
0 mg/kg

【図６Ｃ】



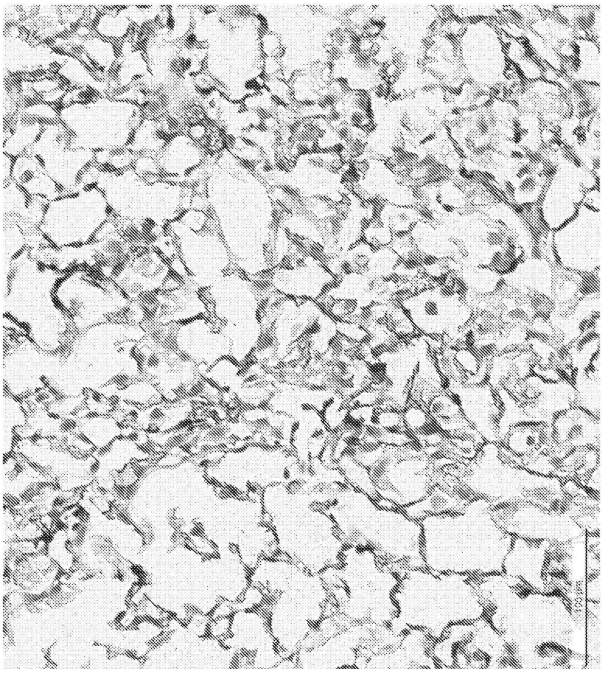
0.1 mg/kg

【図６Ｄ】



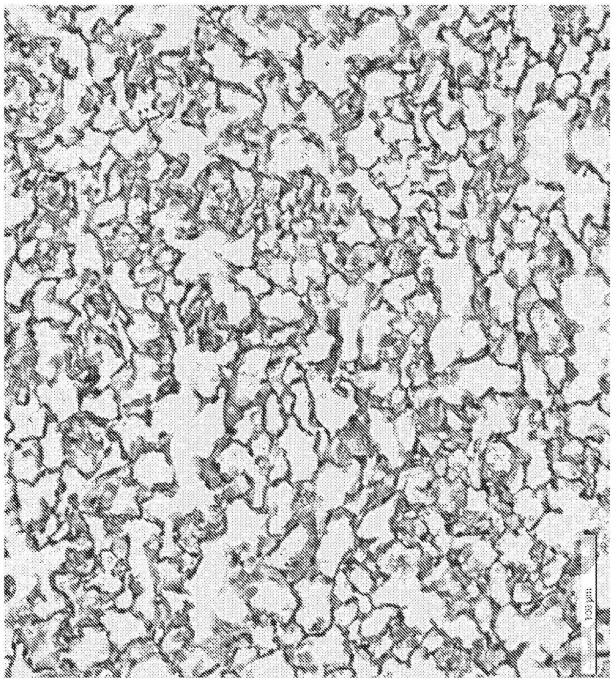
0.3 mg/kg

【図６Ｅ】

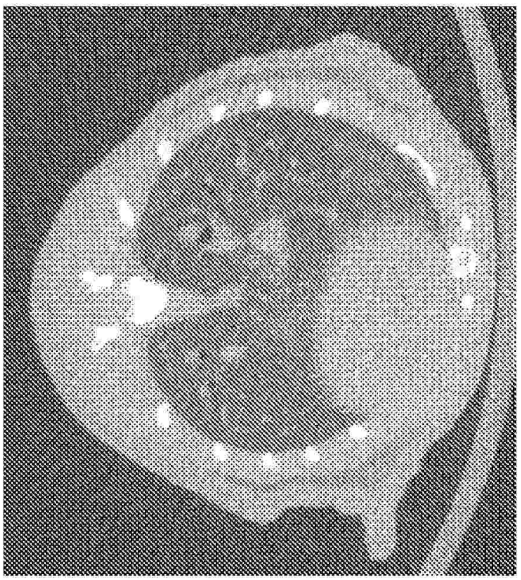


0.6 mg/kg

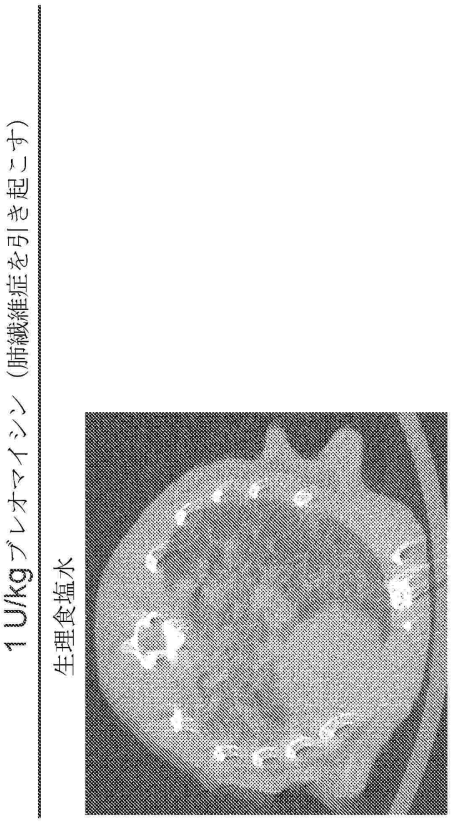
【図６Ｆ】



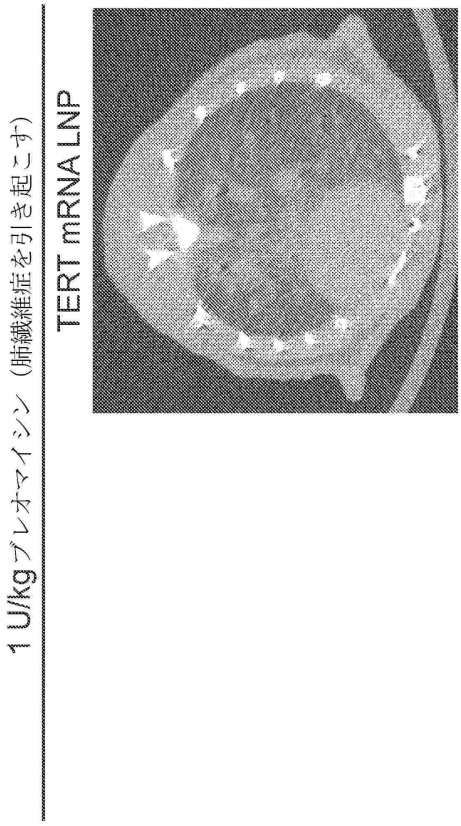
【図７Ａ】



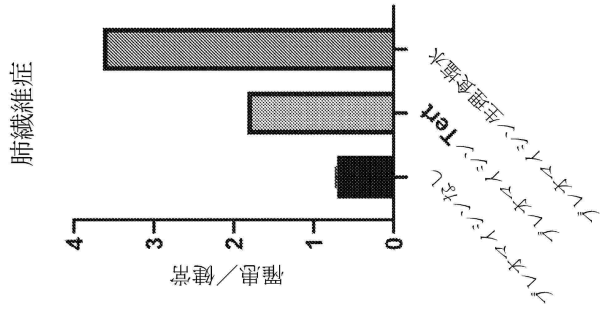
【図７Ｂ】



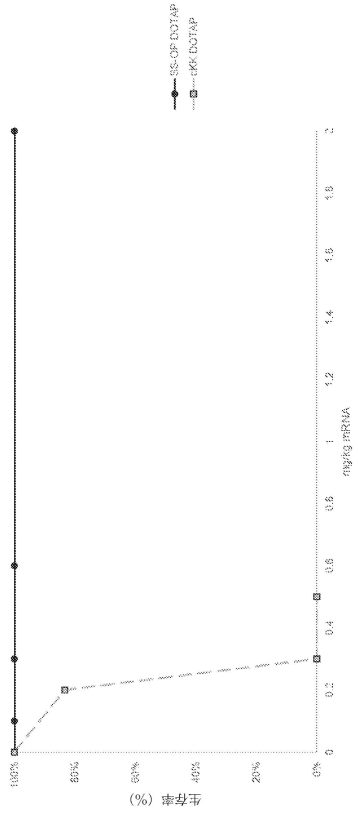
【図７Ｃ】



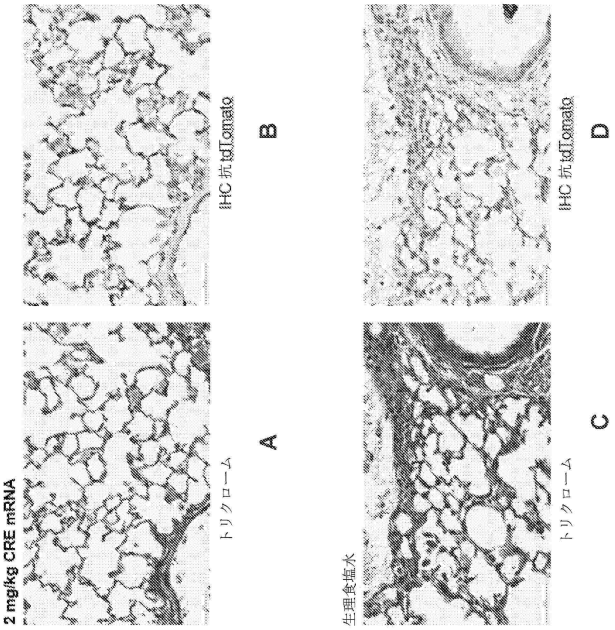
【図７Ｄ】


肺繊維症
罹患／健常
0
1
2
3
4
Tert
ノンターゲティング生理食塩水
ノンターゲティングTert
ターゲティング生理食塩水
ターゲティングTert

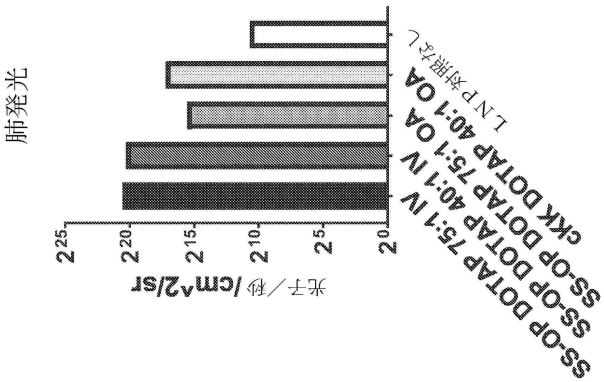
【図８】


SS-OP DOTAP
cKK DOTAP
生存率（%）
100%
80%
60%
40%
20%
0%
0
0.2
0.4
0.6
0.8
1
1.2
1.4
1.6
1.8
2
mg/kg mRNA

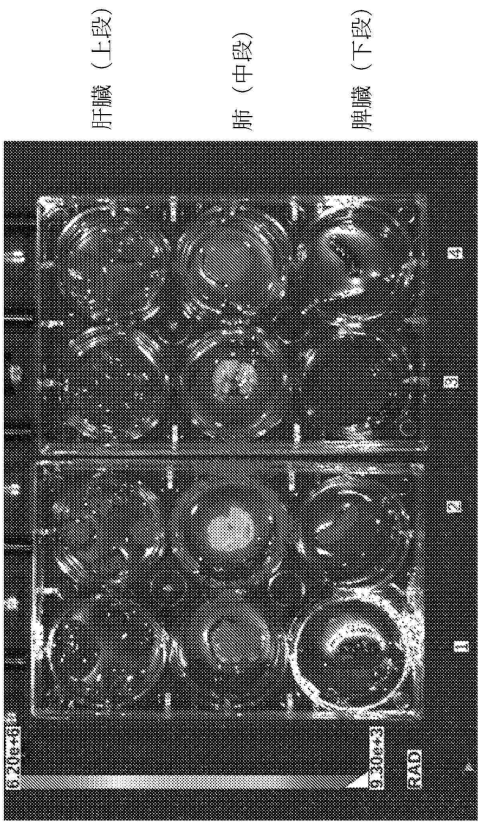
【図９】


2 mg/kg CRE mRNA
生理食塩水
トリクローム
IHC 抗tdTomato
A
B
C
D

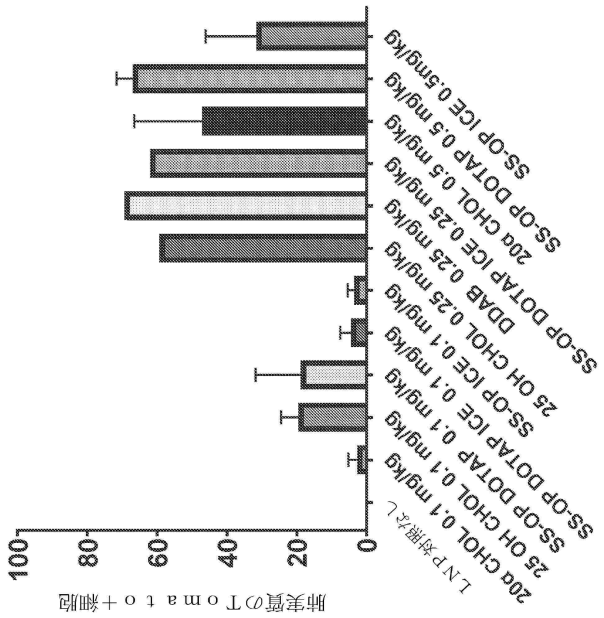
【図１０】


肺発光
光子／秒/cm^2/sr
2^25
2^20
2^15
2^10
2^5
2^0
SS-OP DOTAP 75:1 IV
SS-OP DOTAP 40:1 IV
SS-OP DOTAP 75:1 OA
SS-OP DOTAP 40:1 OA
cKK DOTAP 40:1 OA
LNP 対照なし

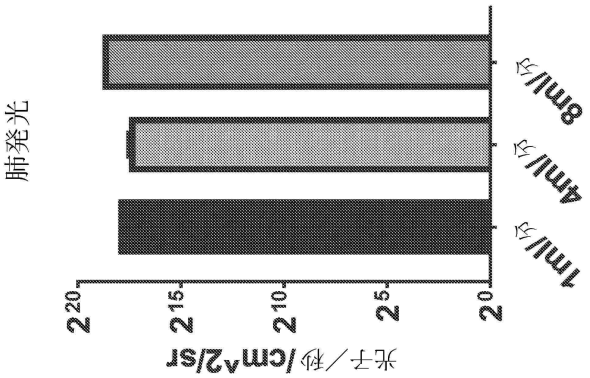
【図１１】



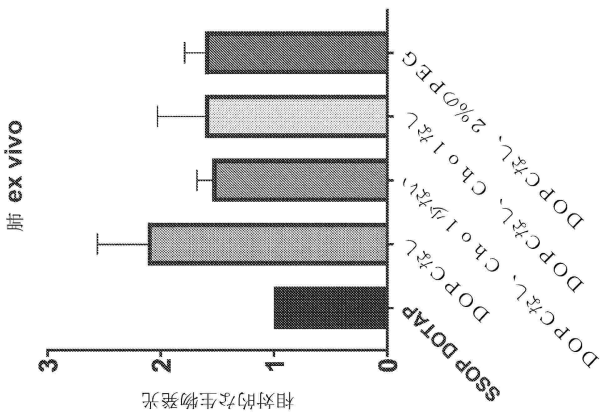
【図１２】



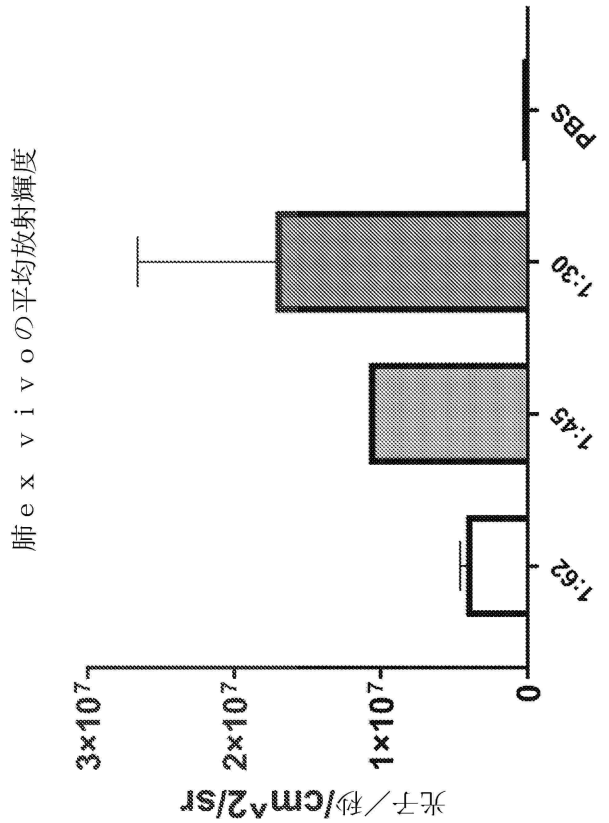
【図１３】



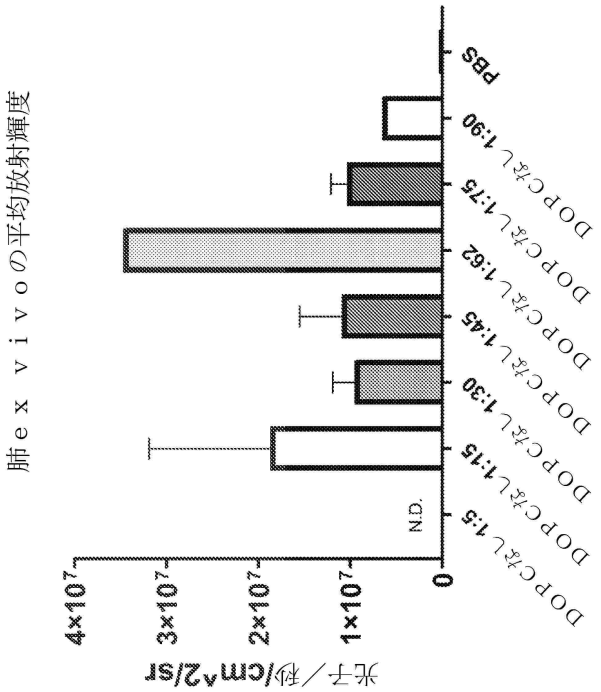
【図１４】



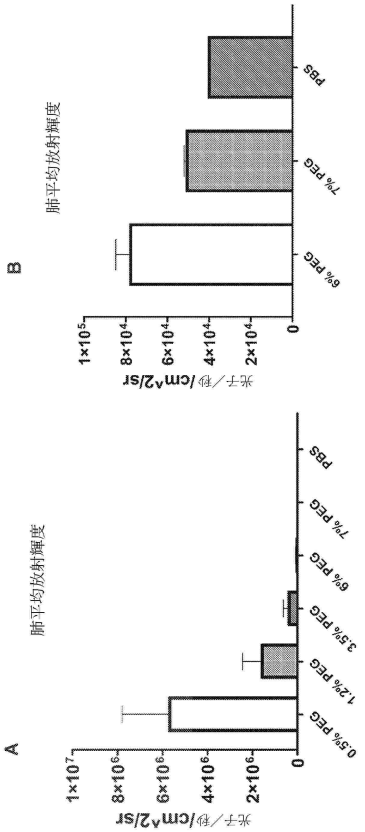
【図１５】



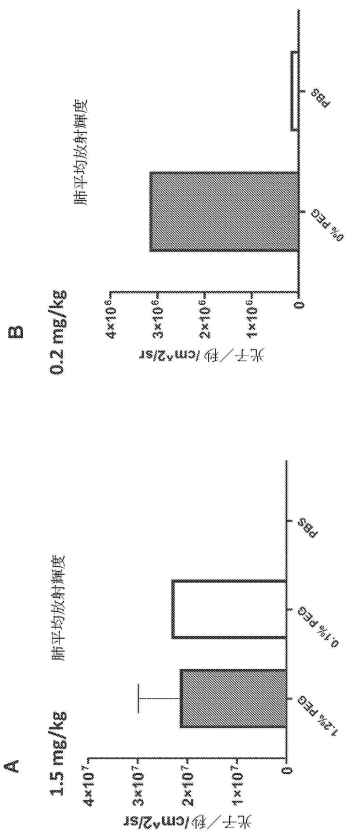
【図１６】



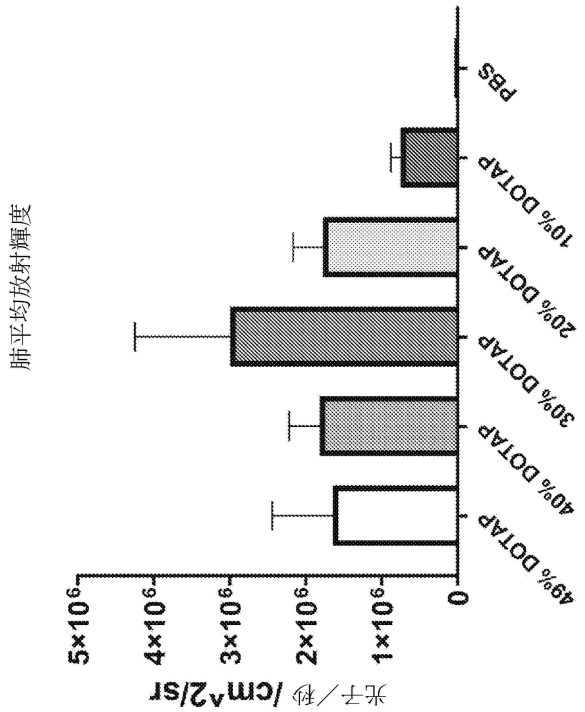
【図１７】



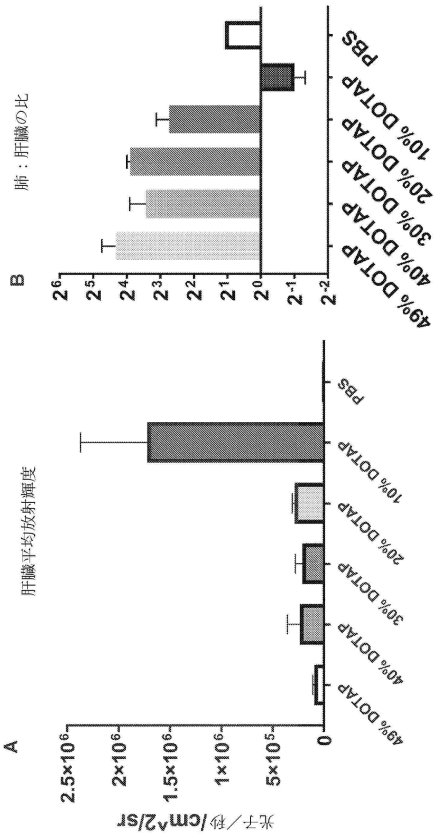
【図１８】



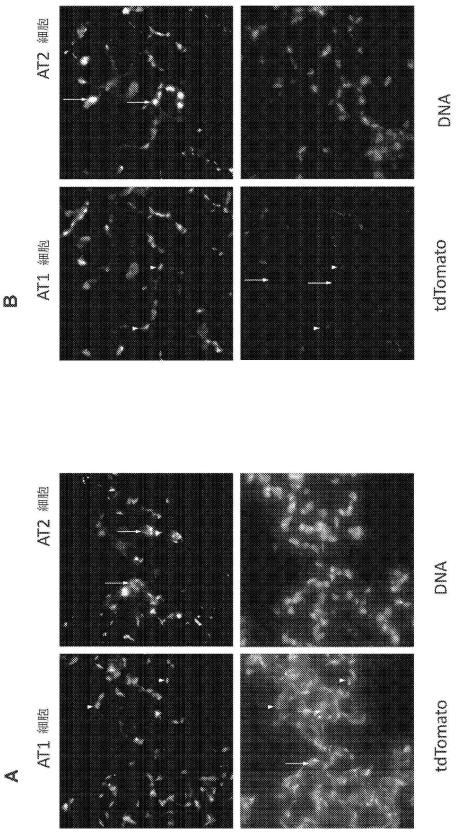
【図１９】



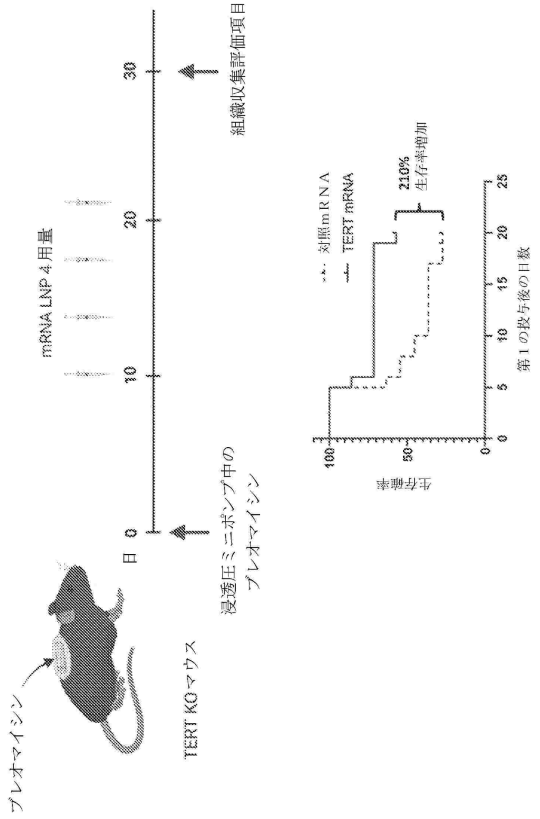
【図２０】



【図２１】



【図２２】



【配列表】
20245130480000001.app

【手続補正書】
【提出日】令和5年12月19日(2023.12.19)
【手続補正１】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
対象の肺への静脈内送達に使用するための製剤化された、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）及びリボ核酸（ＲＮＡ）を含む、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）組成物であって、
前記ＬＮＰが、
（ａ）ＬＮＰ中の総脂質の０％～１５％のモル百分率の構造脂質、
（ｂ）ＬＮＰ中の総脂質の０．２％～６％のモル百分率の絶縁体脂質
（ｃ）ＬＮＰ中の総脂質の０％～約４０％のモル百分率のコレステロール、
（ｄ）ＬＮＰ中の総脂質の１０％～約５０％のモル百分率のイオン性脂質、および
（ｅ）ＬＮＰ中の総脂質の約２０％～８０％のモル百分率のカチオン性脂質、
を含み、
前記（ｄ）イオン性脂質が、ＳＳ－ＯＰまたはＳＳ－ＯＰアナログを含み、
ＬＮＰのリポソームｐＫａが５．５～７．２であり、
ＲＮＡが、ＬＮＰに封入され、１つ以上の修飾ヌクレオチドを有するテロメラーゼ逆転写酵素（ＴＥＲＴ）ｍＲＮＡをコードする、ＬＮＰ組成物。
【請求項２】
（ａ）構造脂質が、ＤＯＰＣを含み、
（ｂ）絶縁体脂質が、ＰＥＧ化脂質を含み、
（ｄ）イオン性脂質が、約２０％～６０％のモル百分率のＳＳ－ＯＰを含み、
（ｅ）カチオン性脂質が、ＤＯＴＡＰを含む、請求項１に記載のＬＮＰ組成物。
【請求項３】
（ｅ）カチオン性脂質が、２－ジオレオイル－３－トリメチルアンモニウム－プロパン（ＤＯＴＡＰ）、ジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミド（ＤＤＡＢ）、イミダゾールコレステロールエステル（ＩＣＥ）、２５－ヒドロキシコレステロール（２５ＯＨ Ｃｈｏｌ）、２０α－ヒドロキシコレステロール５－コレステン－３α、２０α－ジオール（２０α Ｃｈｏｌ）、Ｎ－［１－（２，３－ジオレイルオキシ）プロピル］－Ｎ，Ｎ，Ｎ－トリメチルアンモニウムクロリド（ＤＯＴＭＡ）、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）、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－ジステアリルオキシ－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）、ジメチルジオクタデシルアンモニウム（ＤＤＡ）、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パ－３－イル）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－Ｎ－ヒドロキシエチルアンモニウムブロミド（ＤＭＲＩＥ）、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１－１－（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－ジメチルアミノプロパン（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）、または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）、及びそれらの混合物のうちのいずれか１つ以上である、請求項１または２に記載のＬＮＰ組成物。

【請求項４】

（ａ）構造脂質が、約１％～約５％のモル百分率のＤＯＰＣを含み、

（ｂ）絶縁体脂質が、約０．１％～約２％のモル百分率のＰＥＧ化脂質を含み、

（ｃ）コレステロールが、１５％～３５％のモル百分率で含有され、

（ｄ）イオン性脂質が、約２０％～約４０％のモル百分率のＳＳ－ＯＰを含み、

（ｅ）カチオン性脂質が、約２５％～約３５％のモル百分率のＤＯＴＡＰを含む、請求項１～３のいずれか１項に記載のＬＮＰ組成物。

【請求項５】

（ａ）構造脂質が、１，２－ジ－（９Ｚ－オクタデセノイル）－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＯＰＥ）、グリセロール－モノオレアート（ＧＭＯ）、ジステアロイルホスファチジルコリン（ＤＳＰＣ）、ジオレオイルホスファチジルコリン（ＤＯＰＣ）、ジパルミトイルホスファチジルコリン（ＤＰＰＣ）、ジオレオイルホスファチジルグリセロール（ＤＯＰＧ）、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール（ＤＰＰＧ）、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＯＰＥ）、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン（ＰＯＰＣ）、パルミトイルオレオイル－ホスファチジルエタノールアミン（ＰＯＰＥ）、ジオレオイル－ホスファチジルエタノールアミン４－（Ｎ－マレイミドメチル）－シクロヘキサン－１－カルボキシラート（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－ステアロイル－２－オレオイル－ホスファチジルエタノールアミン（ＳＯＰＥ）、コレステロール、または別のステロール、及びそれらの混合物のうちのいずれか１つ以上である、請求項１～４のいずれか１項に記載のＬＮＰ組成物。

【請求項６】

前記ＬＮＰが、肝臓と比較して、前記肺に優先的に送達及び／またはトランスフェクトされる、請求項１～５のいずれか１項に記載のＬＮＰ組成物。

【請求項７】

前記ＴＥＲＴ　ｍＲＮＡが、配列番号３８～４０のいずれか１つと、少なくとも５０％同一の核酸配列を含む、請求項１～６のいずれか１項に記載のＬＮＰ組成物。

【請求項８】

処置を必要とする対象における肺疾患及び／または肺線維症を処置することに使用するための製剤化された、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）及び合成リボ核酸（ＲＮＡ）を含む、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）組成物であって、

前記ＬＮＰが、

（ａ）ＬＮＰ中の総脂質の０％～１５％のモル百分率の構造脂質、

（ｂ）ＬＮＰ中の総脂質の０．２％～６％のモル百分率の絶縁体脂質

（ｃ）ＬＮＰ中の総脂質の０％～約４０％のモル百分率のコレステロール、

（ｄ）ＬＮＰ中の総脂質の１０％～約５０％のモル百分率のイオン性脂質、および

（ｅ）ＬＮＰ中の総脂質の約２０％～８０％のモル百分率のカチオン性脂質、

を含み、

前記（ｄ）イオン性脂質が、ＳＳ－ＯＰまたはＳＳ－ＯＰアナログを含み、

ＬＮＰのリポソームｐＫａが５．５～７．２であり、
ＬＮＰが合成リボ核酸（ＲＮＡ）を封入し、
前記合成ＲＮＡが、配列番号３８～４０のいずれか１つと、少なくとも５０％同一の核酸配列を含むＴＥＲＴ　ｍＲＮＡをコードする、ＬＮＰ組成物。
【請求項９】
前記ＴＥＲＴ合成ｍＲＮＡが、下記リスト：
【表１－１】

プソイドウリジン
N-1-メチルプソイドウリジン
5-メトキシウリジン
1,2'-O-ジメチルアデノシン
1-メチル-3-(3-アミノ-3-カルボキシプロピル)プソイドウリジン
1-メチルアデノシン
1-メチルグアノシン
1-メチルイノシン
1-メチルプソイドウリジン
2,2-ジメチル-グアノシン
2',3'-ジデオキシアデノシン
2',3'-ジデオキシシチジン
2',3'-ジデオキシグアノシン
2',3'-ジデオキシイノシン
2',3'-ジデオキシヌクレオシド
2',3'-ジデオキシチミジン
2',3'-ジデオキシチミン
2',3'-ジデオキシウリジン
2,6-ジアミノプリン
2'-O-リボシルアデノシン(リン酸)
2'-アミノ-2'-デオキシアデノシン
2-アミノ-2'-デオキシアデノシン
2'-アミノ-2'-デオキシウリジン
2-アミノ-6-クロロプリンリボシド
2-アミノ-6-Cl-プリン-2'-デオキシリボシド
2-アミノアデノシン
2-アミノアデノシン
2-アミノプリン-2'-デオキシリボシド
2-アミノプリン-リボシド
2'-アジド-2'-デオキシアデノシン
2'-アジド-2'-デオキシシチジン
2'-アジド-2'-デオキシグアノシン
2'-アジド-2'-デオキシウリジン
2'-デオキシイノシン
2'-デオキシ-P-ヌクレオシド

【表１－２】

2'-デオキシウリジン
2'-デオキシゼブラリン
2'-フルオロ-2'-デオキシアデノシン
2'-フルオロ-2'-デオキシシチジン
2'-フルオロ-2'-デオキシグアノシン
2'-フルオロ-2'-デオキシウリジン
2'-フルオロ-チミジン
2-メチル-アデノシン
2-メチル-グアノシン
2-メチルチオ-N^6-(cis-ヒドロキシイソペンテニル)アデノシン
2-メチルチオ-N-6-イソペンテニル-アデノシン
2-メチルチオ-N^6-スレオニルカルバモイルアデノシン
2'-O-メチル-2-アミノアデノシン
2'-O-メチル-5-メチルウリジン
2'-O-メチルアデノシン
2'-O-メチルシチジン
2'-O-メチルグアノシン
2'-O-メチルイノシン
2'-O-メチル-N6-メチルアデノシン
2'-O-メチルプソイドウリジン
2'-O-メチルウリジン
2'-O-リボシルグアノシン(リン酸)
2-チオ-2'-デオキシシチジン
2-チオシチジン
2-チオチミジン
2-チオウリジン
3,2'-O-ジメチルウリジン
3'-アミノ-2',3'-ジデオキシアデノシン
3'-アミノ-2',3'-ジデオキシシチジン
3'-アミノ-2',3'-ジデオキシグアノシン
3'-アミノ-2',3'-ジデオキシチミジン
3'-アジド-2',3'-ジデオキシアデノシン
3'-アジド-2',3'-ジデオキシシチジン
3'-アジド-2',3'-ジデオキシチミジン
3'-アジド-2',3'-ジデオキシウリジン
3'-デオキシ-5-メチルウリジン
3'-デオキシアデノシン
3'-デオキシアデノシン(コルジセピン)

【表１－３】

3'-デオキシシチジン
3'-デオキシグアノシン
3'-デオキシチミン
3'-デオキシウリジン
3-メチルシチジン
3-メチルウリジン
3'-O-(2-ニトロベンジル)-2'-デオキシアデノシン
3'-O-(2-ニトロベンジル)-2'-デオキシイノシン
3'-O-メチルアデノシン
3'-O-メチルシチジン
3'-O-メチルグアノシン
3'-O-メチルウリジン
4-アセチル-シチジン
4-チオチミジン
4-チオウリジン
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
5-(カルボキシヒドロキシメチル)ウリジン
5,2'-O-ジメチルウリジン
5,6-ジヒドロ-5-メチルウリジン
5,6-ジヒドロウリジン
5-[(3-インドリル)プロピオンアミド-N-アリル]-2'-デオキシウリジン
5-アミノアリル-2'-デオキシシチジン
5-アミノアリル-2'-デオキシウリジン
5-アミノアリルシチジン
5-アミノアリルウリジン
5-ブロモ-2',3'-ジデオキシウリジン
5-ブロモ-2'-デオキシシチジン
5-ブロモ-2'-デオキシウリジン
5-ブロモシチジン
5-ブロモウリジン
5-カルバモイルメチル 1-2'-O-メチルウリジン
5-カルバモイルメチルウリジン
5-カルボキシ-2'-デオキシシチジン
5-カルボキシシチジン
5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン
5-カルボキシメチルアミノメチルウリジン
5-カルボキシメチルエステルウリジン
5-カルボキシメチルウリジン

【表１－４】

5-カルボキシウリジン
5-フルオロ-2'-デオキシウリジン
5-フルオロ-ウリジン
5-ホルミル-2'-デオキシシチジン
5-ホルミル-2'-デオキシウリジン
5-ホルミル-2'-O-メチルシチジン
5-ホルミルシチジン
5-ホルミルウリジン
5-ヒドロキシ-2'-デオキシシチジン
5-ヒドロキシシチジン
5-ヒドロキシメチル-2'-デオキシシチジン
5-ヒドロキシメチル-2'-デオキシウリジン
5-ヒドロキシメチルシチジン
5-ヒドロキシメチルウリジン
5-ヒドロキシウリジン
5-ヨード-2'-デオキシシチジン
5-ヨード-2'-デオキシウリジン
5-ヨードシチジン
5-ヨードウリジン
5-メトキシアミノメチル-2-チオ-ウリジン
5-メトキシカルボニルメチル 1-2'-O-メチルウリジン
5-メトキシカルボニルメチル-2-チオウリジン
5'-メトキシカルボニルメチル-ウリジン
5-メトキシカルボニルメチルウリジン
5-メトキシシチジン
5-メトキシウリジン
5-メトキシ-ウリジン
5-メチル-2'-デオキシシチジン
5-メチル-2-チオ-ウリジン
5-メチルアミノメチル-ウリジン
5-メチルシチジン
5-メチルジヒドロウリジン
5-メチルウリジン
5-プロパルギルアミノ-2'-デオキシシチジン
5-プロパルギルアミノ-2'-デオキシウリジン
5-プロピニル-2'-デオキシシチジン
5-タウリノメチル-2-チオウリジン
5-タウリノメチルウリジン

【表１－５】

6-アザ-2'-デオキシウリジン
6-アザシチジン
6-アザウリジン
6-クロロプリンリボシド
6-クロロプリン-2'-デオキシリボシド
6-O-メチルグアノシン
6-チオ-2'-デオキシグアノシン
7-デアザ-2'-デオキシアデノシン
7-デアザ-2'-デオキシグアノシン
7-デアザ-7-プロパルギルアミノ-2'-デオキシアデノシン
7-デアザ-7-プロパルギルアミノ-2'-デオキシグアノシン
7-デアザアデノシン
7-デアザグアノシン
7-メチルグアノシン
7-メチル-グアノシン
8-アザアデノシン
8-アジドアデノシン
8-クロロ-2'-デオキシアデノシン
8-オキソ-2'-デオキシアデノシン
8-オキソ-2'-デオキシグアノシン
8-オキソアデノオシン
8-オキソグアノシン
2'-デオキシヌクレオシド
ac4C N4-アセチルシチジン
Am 2'-O-メチルアデノシン
O-メチルヌクレオシド
Ar(p)2'-O-リボシルアデノシン(リン酸)
アラアデノシン
アラシチジン
アラグアノシン
アラウリジン
ベンゾイミダゾールリボシド
ベータ-D-マンノシル-キュエオシン
ビオチン-16-7-デアザ-7-プロパルギルアミノ-2'-デオキシグアノシン
ビオチン-16-アミノアリル-2'-dCTP
ビオチン-16-アミノアリル-2'-dUTP
ビオチン-16-アミノアリルシチジン
ビオチン-16-アミノアリルウリジン

【表１－６】

chm5U 5-(カルボキシヒドロキシメチル)ウリジン
2'-O-メチルシチジン
5-カルボキシメチルウリジン
5-カルボキシメチルアミノメチルウリジン
シアニン 3-5-プロパルギルアミノ-2'-デオキシシチジン
シアニン 3-6-プロパルギルアミノ-2'-デオキシウリジン
シアニン 3-アミノアリルシチジン
シアニン 3-アミノアリルウリジン
シアニン 5-6-プロパルギルアミノ-2'-デオキシシチジン
シアニン 5-6-プロパルギルアミノ-2'-デオキシウリジン
シアニン 5-アミノアリルシチジン
シアニン 5-アミノアリルウリジン
シアニン 7-アミノアリルウリジン
ジヒドロウリジン
ダブシル-5-3-アミノアリル-2'-dUTP
デスチオビオチン-16-アミノアリル-ウリジン
デスチオビオチン-6-アミノアリル-2'-デオキシシチジン
ジヒドロウリジン
5-ホルミルシチジン
5-ホルミル-2'-O-メチルシチジン
N6-グリシニルカルバモイルアデノシン
ガラクトシル-キューオシン
2'-O-メチルグアノシン
2'-O-リボシルグアノシン(リン酸)
5-ヒドロキシメチルシチジン
5-ヒドロキシウリジン
ヒドロキシウィブトシン
N6-イソペンテニルアデノシン
2'-O-メチルイノシン
ウィオシン
イノシン
N6-(cis-ヒドロキシイソペンテニル)アデノシン
イソグアノシン
1-メチルグアノシン
1-メチルアデノシン
1-メチル-3-(3-アミノ-3-カルボキシプロピル)プソイドウリジン
1,2'-O-ジメチルアデノシン
1-メチルグアノシン

【表１－７】

1-メチルイノシン
1-メチルプソイドウリジン
N2,N2-ジメチルグアノシン
N2,N2,7-トリメチルグアノシンIイノシン
N2,7-ジメチルグアノシン
N2-メチルグアノシン
3-メチルシチジン
3-メチルウリジン
3,2'-O-ジメチルウリジン
N4-メチルシチジン
5-メチルシチジン
5-メチルジヒドロウリジン
5-メチルウリジン
5,2'-O-ジメチルウリジン
N6,N6-ジメチルアデノシン
N6,N6,2'-O-トリメチルアデノシン
N6-メチルアデノシン
N6,2'-O-ジメチルアデノシン
7-メチルグアノシン
マンノシル-キューオシン
5-(カルボキシヒドロキシメチル)ウリジン
5-メトキシカルボニルメチル-2-チオウリジン
5-メトキシカルボニルメチル-2'-O-メチルウリジン
5-メトキシカルボニルメチルウリジン
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
2-メチルチオ-N6-トレオニルカルバモイルアデノシン
N1-エチルプソイドウリジン
N1-メトキシメチルプソイドウリジン
N1-メチル-2'-O-メチルプソイドウリジン
N1-メチルアデノシン
N1-プロピルプソイドウリジン
N^2,7-ジメチルグアノシン
N^2,N^2,7-トリメチルグアノシン
N^2,N^2-ジメチルグアノシン
N2-メチル-2'-デオキシグアノシン
N^2-メチルグアノシン
N^4-アセチルシチジン
N4-ビオチン-OBEA-2'-デオキシシチジン

【表１－８】

N4-メチル-2'-デオキシシチジン
N^4-メチルシチジン
N^6-(cis-ヒドロキシイソペンテニル)-アデノシン
N^6,2'-O-ジメチルアデノシン
N^6,N^6,2'-O-トリメチルアデノシン
N^6,N^6-ジメチルアデノシン
N^6-グリシニルカルバモイルアデノシン
N^6-イソペンテニルアデノシン
N6-イソペンテニル-アデノシン
N6-メチル-2-アミノアデノシン
N6-メチル-2'-デオキシアデノシン
N^6-メチルアデノシン
N6-メチル-アデノシン
N^6-スレオニルカルバモイルアデノシン
ncm5U 5-カルバモイルメチルウリジン
ncm5Um 5-カルバモイルメチル-2'-O-メチルウリジン
N1-メチルアデノシン
N-ウリジン-5-オキシ酢酸メチルエステル
ペルオキシウィブトシン
O6-メチル-2'-デオキシグアノシン
O6-メチルグアノシン
ヒドロキシウィブトシン
修飾が不十分なヒドロキシウィブトシン
O-メチルプソイドウリジン
ペルオキシウィブトシン
プソイドイソシチジン
プロマイシン
キュエオシン
2-チオウリジン
N6-スレオニルカルバモイルアデノシン
チエノシチジン
チエノグアノシン
チエノウリジン
2'-O-メチルウリジン
修飾が不十分なヒドロキシウィブトシン
ウリジン-5-オキシ酢酸(v)
ウリジン-5-オキシ酢酸メチルエステル
ウィブトシン

【表１－９】

ウィブトキソシン
ウィオシン
キサントシン
5-タウリノメチル-2-チオウリジン
5-タウリノメチルウリジン
2'-O-メチルプソイドウリジン

の少なくとも１つの修飾ヌクレオシドを含む、請求項８に記載のＬＮＰ組成物。
【請求項１０】
前記肺疾患及び／または肺線維症が、家族性肺線維症、特発性肺線維症、先天性角化異常症を伴う肺線維症、間質性肺疾患、肺炎、間質性肺炎、肺気腫、慢性閉塞性肺疾患、嚢胞性線維症、感染症、コロナウイルス病、または肺癌である、請求項８または９に記載のＬＮＰ組成物。
【請求項１１】
前記肺線維症が、ＴＥＲＴ変異と関連する、請求項８～１０のいずれか１項に記載のＬＮＰ組成物。
【請求項１２】
前記ＬＮＰ組成物が、静脈内注射を介して前記対象に投与される、請求項８～１１のいずれか１項に記載のＬＮＰ組成物。
【請求項１３】
前記ＬＮＰ組成物が、吸入により前記対象に投与される、請求項８～１１のいずれか１項に記載のＬＮＰ組成物。
【請求項１４】
前記ＬＮＰが、テロメラーゼＲＮＡ要素（ＴＥＲＣ）をコードするリボ核酸（ＲＮＡ）をさらに含む、請求項１～１３のいずれか１項に記載のＬＮＰ組成物。
【請求項１５】
前記ＲＮＡまたは前記合成ＲＮＡが自己複製ＲＮＡまたは環状ＲＮＡを含む、請求項１～１４のいずれか１項に記載のＬＮＰ組成物。
【手続補正２】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０５６５
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０５６５】
本開示の好ましい実施形態が本明細書に示され記載されているが、そのような実施形態が、単なる例として提供されることは、当業者らには明らかであろう。ここで、数多くの変形、変更、及び置換は、本開示から逸脱することなく、当業者らに想起されるであろう。本明細書の本開示の実施形態に対する様々な代替案が、本開示を実施する際に用いられ得ると理解すべきである。以下の特許請求の範囲が、本開示の範囲を定義し、これらの特許請求の範囲内の方法及び構造、ならびに、それらの均等物が、それにより網羅されることが意図される。
なお、本発明は以下の態様を含みうる。
［１］対象の肺にポリヌクレオチドを送達する方法であって、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）に封入されたポリヌクレオチドを静脈内注射により投与することを含み、
（ｉ）約２０％～約５０％のモル百分率のカチオン性脂質、
（ｉｉ）約２０％～約６０％のモル百分率のＳＳ－ＯＰまたはＳＳ－ＯＰアナログ
を含む、前記方法。
［２］前記ＬＮＰが、約２０％～６０％のモル百分率のＳＳ－ＯＰを含む、上記［１］に記載の方法。
［３］前記カチオン性脂質が、２－ジオレオイル－３－トリメチルアンモニウム－プロパン（ＤＯＴＡＰ）、ジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミド（ＤＤＡＢ）、イミダゾールコレステロールエステル（ＩＣＥ）、２５－ヒドロキシコレステロール（２５ＯＨ　Ｃｈｏｌ）、２０α－ヒドロキシコレステロール５－コレステン－３α、２０α－ジオール（２０α　Ｃｈｏｌ）、Ｎ－［１－（２，３－ジオレイルオキシ）プロピル］－Ｎ，Ｎ，Ｎ－トリメチルアンモニウムクロリド（ＤＯＴＭＡ）、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（Ｄ

ＯＳＰＡ）、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－ジステアリルオキシ－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）、ジメチルジオクタデシルアンモニウム（ＤＤＡ）、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パ－３－イル）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－Ｎ－ヒドロキシエチルアンモニウムブロミド（ＤＭＲＩＥ）、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１－１－（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－ジメチルアミノプロパン（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）、または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）、及びそれらの混合物のうちのいずれか１つ以上である、上記［１］または［２］に記載の方法。

［４］前記カチオン性脂質が、ＤＯＴＡＰである、上記［３］に記載の方法。

［５］前記ＬＮＰが、約２５％～約３５％のモル百分率の前記カチオン性脂質を含む、上記［１］～［４］のいずれかに記載の方法。

［６］前記ＬＮＰが、約３０％のモル百分率の前記カチオン性脂質を含む、上記［１］～［４］のいずれかに記載の方法。

［７］前記ＬＮＰが、構造脂質を含む、上記［１］～［６］のいずれかに記載の方法。

［８］前記構造脂質が、１，２－ジ－（９Ｚ－オクタデセノイル）－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＯＰＥ）、グリセロール－モノオレアート（ＧＭＯ）、ジステアロイルホスファチジルコリン（ＤＳＰＣ）、ジオレオイルホスファチジルコリン（ＤＯＰＣ）、ジパルミトイルホスファチジルコリン（ＤＰＰＣ）、ジオレオイルホスファチジルグリセロール（ＤＯＰＧ）、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール（ＤＰＰＧ）、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＯＰＥ）、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン（ＰＯＰＣ）、パルミトイルオレオイル－ホスファチジルエタノールアミン（ＰＯＰＥ）、ジオレオイル－ホスファチジルエタノールアミン４－（Ｎ－マレイミドメチル）－シクロヘキサン－１－カルボキシラート（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－ステアロイル－２－オレオイル－ホスファチジルエタノールアミン（ＳＯＰＥ）、コレステロール、または別のステロール、及びそれらの混合物のうちのいずれか１つ以上である、上記［７］に記載の方法。

［９］前記構造脂質が、ＤＯＰＣである、上記［７］に記載の方法。

［１０］前記ＬＮＰが、約１％～約５％のＤＯＰＣを含む、上記［９］に記載の方法。

［１１］前記ＬＮＰが、構造脂質を実質的に含まない、及び／または最大１％の構造脂質を含む、上記［１］～［６］のいずれかに記載の方法。

［１２］前記ＬＮＰが、約２０％～約４０％のコレステロールを含む、上記［１］～［１１］のいずれかに記載の方法。

［１３］前記ＬＮＰが、コレステロールを実質的に含まない、上記［１］～［１１］のいずれかに記載の方法。
［１４］前記ＬＮＰが、絶縁体脂質を含む、上記［１］～［１３］のいずれかに記載の方法。
［１５］前記ＬＮＰが、絶縁体脂質を実質的に含まない、上記［１］～［１３］のいずれかに記載の方法。
［１６］前記ＬＮＰが、肝臓と比較して、前記肺に優先的に送達及び／またはトランスフェクトされる、上記［１］～［１５］のいずれかに記載の方法。
［１７］前記ポリヌクレオチドが、合成リボ核酸（ＲＮＡ）である、上記［１］～［１６］のいずれかに記載の方法。
［１８］前記合成リボ核酸（ＲＮＡ）が、テロメラーゼ逆転写酵素（ＴＥＲＴ）をコードし、任意に、前記ＴＥＲＴ　ｍＲＮＡが、配列番号３８～４０のいずれか１つと、少なくとも５０％、少なくとも５５％、少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％同一の核酸配列を含む、上記［１７］に記載の方法。
［１９］処置を必要とする対象における肺疾患及び／または肺線維症を処置する方法であって、テロメラーゼ逆転写酵素（ＴＥＲＴ）をコードする合成リボ核酸（ＲＮＡ）を含む送達ビヒクルを含む有効量の組成物を投与することを含み、前記送達ビヒクルが、ＳＳ－ＯＰまたはＳＳ－ＯＰアナログを含む脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）であり、任意に、前記ＴＥＲＴ　ｍＲＮＡが、配列番号３８～４０のいずれか１つと、少なくとも５０％、少なくとも５５％、少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％同一の核酸配列を含む、前記方法。
［２０］前記送達ビヒクルが、約２０％～６０％のモル百分率のＳＳ－ＯＰを含む脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）である、上記［１９］に記載の方法。
［２１］前記ＬＮＰが、約２０％～約５０％のモル百分率のカチオン性脂質、約２０％～６０％のモル百分率のＳＳ－ＯＰ、及び、任意に、構造脂質、絶縁体脂質、及びコレステロールのうちの１つ以上を含む、上記［２０］に記載の方法。
［２２］前記ＴＥＲＴ合成ｍＲＮＡが、表２のリストの少なくとも１つの修飾ヌクレオシドを含む、上記［１９］～［２１］のいずれかに記載の方法。
［２３］前記修飾ヌクレオシドが、プソイドウリジンまたはプソイドウリジンアナログである、上記［２２］に記載の方法。
［２４］前記プソイドウリジンアナログが、Ｎ－１－メチルプソイドウリジンである、上記［２２］に記載の方法。
［２５］前記ＴＥＲＴ合成ｍＲＮＡが、非翻訳領域（ＵＴＲ）を含む、上記［１９］～［２４］のいずれかに記載の方法。
［２６］前記ＴＥＲＴ合成ｍＲＮＡが、５’キャップ構造を含み、前記５’キャップ構造が、ｍ７（３’ＯＭｅＧ）（５’）ｐｐｐ（５’）（２’ＯＭｅＡ）ｐＧ、ＩＲＥＳ、Ｃａｐ０、Ｃａｐ１、ＡＲＣＡ、イノシン、Ｎ１－メチル－グアノシン、２’フルオロ－グアノシン、７－デアザ－グアノシン、ＣｌｅａｎＣａｐＴＭ、８－オキソ－グアノシン、２－アミノ－グアノシン、ＬＮＡ－グアノシン、２－アジド－グアノシン、Ｃａｐ２、Ｃａｐ４、ＣＡＰ－００３、またはＣＡＰ－２２５である、上記［１９］～［２５］のいずれかに記載の方法。
［２７］前記ＴＥＲＴ合成ｍＲＮＡが、コード領域の３’側にポリ－アデノシン（ポリＡ）ヌクレオチド配列を含む、上記［１９］～［２６］のいずれかに記載の方法。
［２８］前記ＴＥＲＴ合成ｍＲＮＡが、鎖終結ヌクレオチドを含み、前記ヌクレオチド

が、３’－デオキシアデノシン（コルジセピン）、３’－デオキシウリジン、３’－デオキシシトシン、３’－デオキシグアノシン、３’－デオキシチミン、２’，３’－ジデオキシヌクレオシド、２’，３’－ジデオキシアデノシン、２’，３’－ジデオキシウリジン、２’，３’－ジデオキシシトシン、２’，３’－ジデオキシグアノシン、２’、３’－ジデオキシチミン、２’－デオキシヌクレオシド、または－Ｏ－メチルヌクレオシドである、上記［１９］～［２７］のいずれかの方法。

［２９］前記ＴＥＲＴ合成ｍＲＮＡが、コドン最適化されている、上記［１９］～［２８］のいずれかに記載の方法。

［３０］前記肺疾患が、肺線維症と関連する、上記［１９］～［２８］のいずれかに記載の方法。

［３１］前記肺疾患が、肺線維症、家族性肺線維症、特発性肺線維症、先天性角化異常症を伴う肺線維症、間質性肺疾患、肺炎、間質性肺炎、肺気腫、慢性閉塞性肺疾患、嚢胞性線維症、感染症、コロナウイルス病、または肺癌である、上記［３０］に記載の方法。

［３２］前記肺線維症が、ＴＥＲＴ変異と関連する、上記［１９］～［３１］のいずれかに記載の方法。

［３３］前記対象が、ヒトである、上記［１９］～［３２］のいずれかに記載の方法。

［３４］前記組成物が、静脈内注射を介して前記対象に投与される、上記［１９］～［３３］のいずれかに記載の方法。

［３５］前記組成物が、吸入により前記対象に投与される、上記［１９］～［３３］のいずれかに記載の方法。

［３６］（ｉ）約２０％～約５０％のモル百分率のカチオン性脂質、

（ｉｉ）約２０％～約６０％のモル百分率のＳＳ－ＯＰまたはＳＳ－ＯＰアナログ

を含む、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）に封入されたポリヌクレオチドを含む組成物。

［３７］前記ＬＮＰが、約２０％～６０％のモル百分率のＳＳ－ＯＰを含む、上記［３６］に記載の組成物。

［３８］前記カチオン性脂質が、２－ジオレオイル－３－トリメチルアンモニウム－プロパン（ＤＯＴＡＰ）、ジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミド（ＤＤＡＢ）、イミダゾールコレステロールエステル（ＩＣＥ）、２５－ヒドロキシコレステロール（２５ＯＨ　Ｃｈｏｌ）、２０α－ヒドロキシコレステロール５－コレステン－３α、２０α－ジオール（２０α　Ｃｈｏｌ）、Ｎ－［１－（２，３－ジオレイルオキシ）プロピル］－Ｎ，Ｎ，Ｎ－トリメチルアンモニウムクロリド（ＤＯＴＭＡ）、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）、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－ジステアリルオキシ－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）、ジメチルジオクタデシルアンモニウム（ＤＤＡ）、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パ－３－イル）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－Ｎ－ヒドロキシエチルアンモニウムブロミド（ＤＭＲＩＥ）、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１－１－（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－ジメチルアミノプロパン（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）、または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）、及びそれらの混合物のうちのいずれか１つ以上である、上記［３６］に記載の組成物。

［３９］前記カチオン性脂質が、ＤＯＴＡＰである、上記［３８］に記載の組成物。

［４０］前記ＬＮＰが、約２５％～約３５％のモル百分率の前記カチオン性脂質を含む、上記［３６］～［３９］のいずれかに記載の組成物。

［４１］前記ＬＮＰが、約３０％のモル百分率の前記カチオン性脂質を含む、上記［３６］～［３９］のいずれかに記載の組成物。

［４２］前記ＬＮＰが、構造脂質を含む、上記［３６］～［４１］のいずれかに記載の組成物。

［４３］前記構造脂質が、１，２－ジ－（９Ｚ－オクタデセノイル）－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＯＰＥ）、グリセロール－モノオレアート（ＧＭＯ）、ジステアロイルホスファチジルコリン（ＤＳＰＣ）、ジオレオイルホスファチジルコリン（ＤＯＰＣ）、ジパルミトイルホスファチジルコリン（ＤＰＰＣ）、ジオレオイルホスファチジルグリセロール（ＤＯＰＧ）、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール（ＤＰＰＧ）、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＯＰＥ）、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン（ＰＯＰＣ）、パルミトイルオレオイル－ホスファチジルエタノールアミン（ＰＯＰＥ）、ジオレオイル－ホスファチジルエタノールアミン４－（Ｎ－マレイミドメチル）－シクロヘキサン－１－カルボキシラート（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－ステアロイル－２－オレオイル－ホスファチジルエタノールアミン（ＳＯＰＥ）、コレステロール、または別のステロール、及びそれらの混合物のうちのいずれか１つ以上である、上記［４２］に記載の組成物。

［４４］前記構造脂質が、ＤＯＰＣである、上記［４３］に記載の組成物。

［４５］前記ＬＮＰが、約１％～約５％のＤＯＰＣを含む、上記［４４］に記載の組成物。

［４６］前記ＬＮＰが、構造脂質を実質的に含まない、及び／または最大１％の構造脂質を含む、上記［３６］～［４５］のいずれかに記載の組成物。

［４７］前記ＬＮＰが、約２０％～約４０％のコレステロールを含む、上記［３６］～［４６］のいずれかに記載の組成物。

［４８］前記ＬＮＰが、コレステロールを実質的に含まない、上記［３６］～［４６］のいずれかに記載の組成物。

［４９］前記ＬＮＰが、絶縁体脂質を含む、上記［３６］～［４８］のいずれかに記載の組成物。

［５０］前記ＬＮＰが、絶縁体脂質を実質的に含まない、上記［３６］～［４８］のいずれかに記載の組成物。

［５１］前記ＬＮＰが、肝臓と比較して、前記肺に優先的に送達及び／またはトランスフェクトされる、上記［３６］～［５０］のいずれかに記載の組成物。

［５２］前記ポリヌクレオチドが、合成リボ核酸（ＲＮＡ）である、上記［３６］～［５１］のいずれかに記載の組成物。

［５３］前記合成リボ核酸（ＲＮＡ）が、テロメラーゼ逆転写酵素（ＴＥＲＴ）をコードし、任意に、前記ＴＥＲＴ　ＲＮＡが、配列番号３８～４０のいずれか１つと、少なくとも５０％、少なくとも５５％、少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９

５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％同一の核酸配列を含む、上記［５２］に記載の組成物。

［５４］前記ＴＥＲＴ　ＲＮＡが、表２のリストの少なくとも１つの修飾ヌクレオシドを含む、上記［５３］に記載の組成物。

［５５］前記修飾ヌクレオシドが、プソイドウリジンまたはプソイドウリジンアナログである、上記［５４］に記載の組成物。

［５６］前記プソイドウリジンアナログが、Ｎ－１－メチルプソイドウリジンである、上記［５４］に記載の組成物。

［５７］前記ＴＥＲＴ　ＲＮＡが、非翻訳領域（ＵＴＲ）を含む、上記［５３］～［５６］に記載の組成物。

［５８］前記ＴＥＲＴ　ＲＮＡが、５’キャップ構造を含み、前記５’キャップ構造が、ｍ７（３’ＯＭｅＧ）（５’）ｐｐｐ（５’）（２’ＯＭｅＡ）ｐＧ、ＩＲＥＳ、Ｃａｐ０、Ｃａｐ１、ＡＲＣＡ、イノシン、Ｎ１－メチル－グアノシン、２’フルオロ－グアノシン、７－デアザ－グアノシン、ＣｌｅａｎＣａｐＴＭ、８－オキソ－グアノシン、２－アミノ－グアノシン、ＬＮＡ－グアノシン、２－アジド－グアノシン、Ｃａｐ２、Ｃａｐ４、ＣＡＰ－００３、またはＣＡＰ－２２５である、上記［５３］～［５７］のいずれかに記載の組成物。

［５９］前記ＴＥＲＴ　ＲＮＡが、前記コード領域の３’側にポリ－アデノシン（ポリＡ）ヌクレオチド配列を含む、上記［５３］～［５８］のいずれかに記載の組成物。

［６０］前記ＴＥＲＴ　ＲＮＡが、鎖終結ヌクレオチドを含み、前記ヌクレオチドが、３’－デオキシアデノシン（コルジセピン）、３’－デオキシウリジン、３’－デオキシシトシン、３’－デオキシグアノシン、３’－デオキシチミン、２’，３’－ジデオキシヌクレオシド、２’，３’－ジデオキシアデノシン、２’，３’－ジデオキシウリジン、２’，３’－ジデオキシシトシン、２’，３’－ジデオキシグアノシン、２’、３’－ジデオキシチミン、２’－デオキシヌクレオシド、または－Ｏ－メチルヌクレオシドである、上記［５３］～［５９］のいずれかに記載の組成物。

［６１］前記ＴＥＲＴ　ＲＮＡが、コドン最適化されている、上記［５３］～［６０］のいずれかに記載の組成物。

［６２］処置を必要とする対象の肺疾患の前記処置のための、上記［３６］～［６１］のいずれかに記載の組成物の使用。

［６３］前記肺疾患が、肺線維症、家族性肺線維症、特発性肺線維症、先天性角化異常症を伴う肺線維症、間質性肺疾患、肺炎、間質性肺炎、肺気腫、慢性閉塞性肺疾患、嚢胞性線維症、感染症、コロナウイルス病、または肺癌である、上記［６２］に記載の組成物の使用。

［６４］前記肺疾患が、前記対象のＴＥＲＴ変異と関連する、上記［６２］または［６３］に記載の組成物の使用。

［６５］前記組成物が、静脈内注射または静脈内注入により前記対象に投与される、上記［６２］～［６４］のいずれかに記載の組成物の使用。

［６６］（ｉ）テロメラーゼ逆転写酵素（ＴＥＲＴ）をコードするリボ核酸（ＲＮＡ）を含む送達ビヒクルであって、任意に、前記ＴＥＲＴ　ｍＲＮＡが、配列番号３８～４０のいずれか１つと、少なくとも５０％、少なくとも５５％、少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％同一の核酸配列を含む前記送達ビヒクル及び、

（ｉｉ）薬学的に許容される溶媒または賦形剤

を含み、

前記送達ビヒクルが、ＳＳ－ＯＰまたはＳＳ－ＯＰアナログを含むＬＮＰであり、肺細胞に優先的に送達及び／またはトランスフェクトすることが可能である、医薬組成物。

［６７］前記ＬＮＰが、約２０％～約６０％のモル百分率のＳＳ－ＯＰを含む、上記［

６６］に記載の医薬組成物。
［６８］前記ＬＮＰが、約２０％～約５０％のモル百分率のカチオン性脂質を含む、上記［６７］に記載の医薬組成物。
［６９］前記ＬＮＰが、約２０％～６０％のモル百分率のＳＳ－ＯＰアナログを含む、上記［６６］に記載の医薬組成物。
［７０］前記カチオン性脂質が、２－ジオレオイル－３－トリメチルアンモニウム－プロパン（ＤＯＴＡＰ）、ジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミド（ＤＤＡＢ）、イミダゾールコレステロールエステル（ＩＣＥ）、２５－ヒドロキシコレステロール（２５ＯＨ　Ｃｈｏｌ）、２０α－ヒドロキシコレステロール５－コレステン－３α、２０α－ジオール（２０α　Ｃｈｏｌ）、Ｎ－［１－（２，３－ジオレイルオキシ）プロピル］－Ｎ，Ｎ，Ｎ－トリメチルアンモニウムクロリド（ＤＯＴＭＡ）、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）、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－ジステアリルオキシ－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）、ジメチルジオクタデシルアンモニウム（ＤＤＡ）、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パ－３－イル）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－Ｎ－ヒドロキシエチルアンモニウムブロミド（ＤＭＲＩＥ）、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１－１－（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－ジメチルアミノプロパン（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）、または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）、及びそれらの混合物のうちのいずれか１つ以上である、上記［６８］または［６９］に記載の医薬組成物。
［７１］前記カチオン性脂質が、ＤＯＴＡＰである、上記［７０］に記載の医薬組成物。
［７２］前記ＬＮＰが、約２５％～約３５％のモル百分率の前記カチオン性脂質を含む、上記［６８］～［７１］のいずれかに記載の医薬組成物。
［７３］前記ＬＮＰが、約３０％のモル百分率の前記カチオン性脂質を含む、上記［６８］～［７１］のいずれかに記載の医薬組成物。
［７４］前記ＬＮＰが、構造脂質を含む、上記［６８］～［７３］のいずれかに記載の医薬組成物。
［７５］前記構造脂質が、１，２－ジ－（９Ｚ－オクタデセノイル）－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＯＰＥ）、グリセロール－モノオレアート（ＧＭＯ）、ジステアロイルホスファチジルコリン（ＤＳＰＣ）、ジオレオイルホスファチジルコリン（ＤＯＰＣ）、ジパルミトイルホスファチジルコリン（ＤＰＰＣ）、ジオレオイルホスファチジルグリセロール（ＤＯＰＧ）、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール（ＤＰＰＧ）、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＯＰＥ）、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン（ＰＯＰＣ）、パルミトイルオレオイル－ホスファチジル

エタノールアミン（ＰＯＰＥ）、ジオレオイル－ホスファチジルエタノールアミン４－（Ｎ－マレイミドメチル）－シクロヘキサン－１－カルボキシラート（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－ステアロイル－２－オレオイル－ホスファチジルエタノールアミン（ＳＯＰＥ）、コレステロール、または別のステロール、及びそれらの混合物のうちのいずれか１つ以上である、上記［７４］に記載の医薬組成物。

［７６］前記構造脂質が、ＤＯＰＣである、上記［７５］に記載の医薬組成物。

［７７］前記ＬＮＰが、約１％～約５％のＤＯＰＣを含む、上記［７６］に記載の医薬組成物。

［７８］前記ＬＮＰが、構造脂質を実質的に含まない、及び／または最大１％の構造脂質を含む、上記［６８］～［７７］のいずれかに記載の医薬組成物。

［７９］前記ＬＮＰが、約２０％～約４０％のコレステロールを含む、上記［６８］～［７８］のいずれかに記載の医薬組成物。

［８０］前記ＬＮＰが、コレステロールを実質的に含まない、上記［６８］～［７８］のいずれかに記載の医薬組成物。

［８１］前記ＬＮＰが、絶縁体脂質を含む、上記［６８］～［８０］のいずれかに記載の医薬組成物。

［８２］前記ＬＮＰが、絶縁体脂質を実質的に含まない、上記［６８］～［８０］のいずれかに記載の医薬組成物。

［８３］前記ＬＮＰが、肝臓と比較して、前記肺に優先的に送達及び／またはトランスフェクトされる、上記［６８］～［８２］のいずれかに記載の医薬組成物。

［８４］前記ＴＥＲＴ　ＲＮＡが、表２のリストの少なくとも１つの修飾ヌクレオシドを含む、上記［６６］～［８３］のいずれかに記載の医薬組成物。

［８５］前記修飾ヌクレオシドが、プソイドウリジンまたはプソイドウリジンアナログである、上記［８４］に記載の医薬組成物。

［８６］前記プソイドウリジンアナログが、Ｎ－１－メチルプソイドウリジンである、上記［８５］に記載の医薬組成物。

［８７］前記ＴＥＲＴ　ＲＮＡが、非翻訳領域（ＵＴＲ）、任意に、天然に存在しないＵＴＲを含む、上記［６６］～［８６］に記載の医薬組成物。

［８８］前記ＴＥＲＴ　ＲＮＡが、５’キャップ構造を含み、前記５’キャップ構造が、ｍ７（３’ＯＭｅＧ）（５’）ｐｐｐ（５’）（２’ＯＭｅＡ）ｐＧ、ＩＲＥＳ、Ｃａｐ０、Ｃａｐ１、ＡＲＣＡ、イノシン、Ｎ１－メチル－グアノシン、２’フルオロ－グアノシン、７－デアザ－グアノシン、ＣｌｅａｎＣａｐＴＭ、８－オキソ－グアノシン、２－アミノ－グアノシン、ＬＮＡ－グアノシン、２－アジド－グアノシン、Ｃａｐ２、Ｃａｐ４、ＣＡＰ－００３、またはＣＡＰ－２２５である、上記［６６］～［８７］のいずれかに記載の医薬組成物。

［８９］前記ＴＥＲＴ　ＲＮＡが、前記コード領域の３’側にポリ－アデノシン（ポリＡ）ヌクレオチド配列を含む、上記［６６］～［８８］のいずれかに記載の医薬組成物。

［９０］前記ＴＥＲＴ　ＲＮＡが、鎖終結ヌクレオチドを含み、前記ヌクレオチドが、３’－デオキシアデノシン（コルジセピン）、３’－デオキシウリジン、３’－デオキシシトシン、３’－デオキシグアノシン、３’－デオキシチミン、２’，３’－ジデオキシヌクレオシド、２’，３’－ジデオキシアデノシン、２’，３’－ジデオキシウリジン、２’，３’－ジデオキシシトシン、２’，３’－ジデオキシグアノシン、２’、３’－ジデオキシチミン、２’－デオキシヌクレオシド、または－Ｏ－メチルヌクレオシドである、上記［６６］～［８９］のいずれかに記載の医薬組成物。

［９１］前記ＴＥＲＴ　ＲＮＡが、コドン最適化されている、上記［６６］～［９０］のいずれかに記載の医薬組成物。

［９２］処置を必要とする対象の肺疾患及び／または肺線維症の前記処置のための、上

記［６６］～［９１］のいずれかに記載の医薬組成物の使用。
［９３］前記肺疾患が、肺線維症、家族性肺線維症、特発性肺線維症、先天性角化異常症を伴う肺線維症、間質性肺疾患、肺炎、間質性肺炎、肺気腫、慢性閉塞性肺疾患、嚢胞性線維症、感染症、コロナウイルス病、または肺癌である、上記［９２］に記載の医薬組成物の使用。
［９４］前記肺線維症が、前記対象のＴＥＲＴ変異と関連する、上記［９２］または［９３］に記載の医薬組成物の使用。
［９５］前記組成物が、静脈内注射を介して前記対象に投与される、上記［９２］～［９４のいずれかに記載の医薬組成物の使用。

【国際調査報告】

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference		FOR FURTHER ACTION
REJU-005-01WO		see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.
International application No.	International filing date *(day/month/year)*	(Earliest) Priority Date *(day/month/year)*
PCT/US 22/22642	30 March 2022 (30.03.2022)	31 March 2021 (31.03.2021)
Applicant REJUVENATION TECHNOLOGIES INC.		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 6 sheets.

☐ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. **Basis of the report**

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:

☒ the international application in the language in which it was filed.

☐ a translation of the international application into _____ which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b)).

b. ☐ This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6*bis*(a)).

c. ☒ With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☒ **Certain claims were found unsearchable** (see Box No. II).

3. ☒ **Unity of invention is lacking** (see Box No. III).

4. With regard to the **title**,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established, according to Rule 38.2, by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. With regard to the **drawings**,

a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. 22

☒ as suggested by the applicant.

☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure.

☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention.

b. ☐ none of the figures is to be published with the abstract.

Form PCT/ISA/210 (first sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 22/22642

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 22/22642

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.: 5-18, 25-35, 42-65, 72-95
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:
This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

Group I: Claims 1-4 and 19-24 directed to a method of delivering a polynucleotide to the lung.

Group II: Claims 36-41 and 66-71 directed to a composition, comprising a polynucleotide encapsulated in a lipid nanoparticle (LNP).

The inventions listed as Groups I and II do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special Technical Features

----------continued on supplemental 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 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.:
1-4, 19-24

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 22/22642

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC - continued on supplemental sheet
CPC - INV. A61K 9/145, A61K 9/0019, A61K 38/43, A61K 48/0008, A61P 11/00, C12N 9/1276, B82Y 5/00; ADD. A61K 47/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
See Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
See Search History document

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2018/0333457 A1 (TRANSLATE BIO, INC.) 22 November 2018 (22.11.2018) para [0014]; para [0105]; para [0129]; para [0147]; claim 39; claim 47	1-4
Y	WO 2019/188867 A1 (NOF CORPORATION) 3 October 2019 (03.10.2019) para [0099]; claim 1; claim 9; claim 10, translations at page 10, para 2; claim 10	1-4, 19-24
Y	US 2020/0215094 A1 (THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY) 9 July 2020 (09.07.2020) para [0088]; para [0115]; para [0122]; para [0126]; para [0169]; claim 67; Table 4	19-24

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
15 June 2022	SEP 01 2022
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Kari Rodriquez Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 22/22642

Box III: Observations where unity of invnetion is lacking:

Group I requires a method of delivering a polynucleotide, not required by Group II.

Group II requires a composition comprising a polynucleotide encapsulated in a lipid nanoparticle, not required by Group I.

Common Technical Features

The features shared by the inventions listed as Group I and II are a polynucleotide encapsulated in a lipid nanoparticle (LNP) comprising: (i) a cationic lipid, (ii) an SS-OP or an SS-OP analog.

However, these shared technical features do not represent a contribution over prior art, because the shared technical features are taught by US 2020/0215094 A1 to the Board of Trustees of the Leland Stanford Junior University (hereinafter Stanford') in view of WO 2019/188867 A1 to NOF Corporation (hereinafter 'NOF').

Stanford discloses a polynucleotide encapsulated in a lipid nanoparticle (LNP) comprising: (i) a cationic lipid (para [0235]- "complexing 2 .mu.g of modRNA encoding luciferase with a cationic lipid vehicle"), but does not teach an SS-OP or an SS-OP analog.
NOF discloses an SS-OP for use in delivery of nucleic acids (claim 1; claim 9; claim 10). Since NOF teaches the disclosed lipid can be used to deliver nucleotides (claim 9; claim 10), it would have been obvious to one of ordinary skill in the art, to have combined the teachings of Stanford with NOF and used the cationic lipid, to achieve a desired delivery efficiency, using routine experimentation.

As the technical features were known in the art at the time of the invention, they cannot be considered special technical features that would otherwise unify the groups.

Groups I and II therefore lack unity of invention under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

Item 4 (continued)
Claims 5-18, 25-35, 42-65 and 72-95 are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Form PCT/ISA/210 (extra sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 22/22642

Continuation of A. Classification of subject matter:

INV. A61K 9/14, A61K 9/00, A61K 31/7115, A61K 38/43, A61K 48/00, A61P 11/00, B82Y 5/00; ADD. A61K 47/00 (2022.01)

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	*47/24*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	47/24	
Ａ６１Ｋ	*47/10*	*(2017.01)*	Ａ６１Ｋ	47/10	
Ａ６１Ｋ	*47/18*	*(2017.01)*	Ａ６１Ｋ	47/18	
Ａ６１Ｋ	*48/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	48/00	
Ａ６１Ｋ	*31/7105*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/7105	
Ａ６１Ｐ	*11/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	11/00	
Ａ６１Ｐ	*29/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	29/00	
Ａ６１Ｐ	*31/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	31/00	
Ａ６１Ｐ	*31/14*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	31/14	
Ａ６１Ｐ	*35/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/00	

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,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

アメリカ合衆国 ９４０４３ カリフォルニア州 マウンテン ビュー，クライド アベニュー ４１５，ユニット １０７，リジュベネーション テクノロジーズ インク．内

(72)発明者 マルコフ，グレン ジェレミー
アメリカ合衆国 ９４０４３ カリフォルニア州 マウンテン ビュー，クライド アベニュー ４１５，ユニット １０７，リジュベネーション テクノロジーズ インク．内

(72)発明者 オルセン，ウィリアム ギリス
アメリカ合衆国 ９４０４３ カリフォルニア州 マウンテン ビュー，クライド アベニュー ４１５，ユニット １０７，リジュベネーション テクノロジーズ インク．内

(72)発明者 ブリュワー，カイル ダニエル
アメリカ合衆国 ９４０４３ カリフォルニア州 マウンテン ビュー，クライド アベニュー ４１５，ユニット １０７，リジュベネーション テクノロジーズ インク．内

Ｆターム（参考） 4C076 AA65 AA95 BB13 BB27 CC15 CC27 CC29 CC35 DD48A DD55A DD59A DD63A DD70A EE23A
4C084 AA13 MA37 MA55 MA65 MA66 NA05 ZA59 ZB11 ZB26 ZB32 ZB33
4C086 AA01 AA02 EA16 MA03 MA05 MA37 MA55 MA65 MA66 NA05 ZA59 ZB11 ZB26 ZB32 ZB33