

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-549011

(P2023-549011A)

(43)公表日 令和5年11月22日(2023.11.22)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 C 219/06 (2006.01)	C 0 7 C 219/06	4 C 0 7 6
C 0 7 D 311/72 (2006.01)	C 0 7 D 311/72	1 0 2 4 C 0 8 4
C 0 7 D 295/088 (2006.01)	C 0 7 D 295/088	C S P 4 C 0 8 6
C 0 7 J 1/00 (2006.01)	C 0 7 J 1/00	4 C 0 9 1
A 6 1 K 9/14 (2006.01)	A 6 1 K 9/14	4 H 0 0 6
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全325頁) 最終頁に続く		

(21)出願番号	特願2023-517323(P2023-517323)	(71)出願人	522352030
(86)(22)出願日	令和3年9月15日(2021.9.15)		ヴァーヴ・セラピューティクス、インコ
(85)翻訳文提出日	令和5年5月15日(2023.5.15)		ーポレーテッド
(86)国際出願番号	PCT/US2021/050511		アメリカ合衆国マサチューセッツ州02
(87)国際公開番号	WO2022/060871		215, ボストン, ブルックライン・ア
(87)国際公開日	令和4年3月24日(2022.3.24)		ベニュー 201, 스위트 601
(31)優先権主張番号	63/078,738	(74)代理人	100118902
(32)優先日	令和2年9月15日(2020.9.15)		弁理士 山本 修
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100106208
			弁理士 宮前 徹
(31)優先権主張番号	63/220,340	(74)代理人	100196508
(32)優先日	令和3年7月9日(2021.7.9)		弁理士 松尾 淳一
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100122644
			弁理士 寺地 拓己
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA	(72)発明者	ラジーブ, カラントッタチル・ジー
	最終頁に続く		最終頁に続く

(54)【発明の名称】 遺伝子編集のための脂質製剤

(57)【要約】

本開示は、PEG-脂質、カチオン性および／またはイオン化可能な脂質、ならびにこれを含む核酸-脂質粒子組成物に関する。本開示は、記載の脂質および脂質含有粒子を作製、使用、および送達する方法にも関する。

【選択図】図24

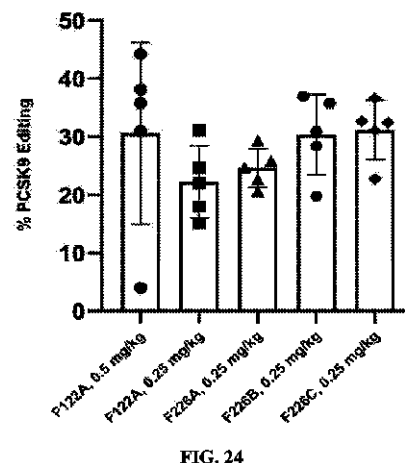


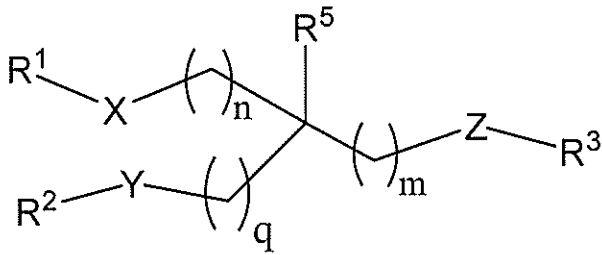
FIG. 24

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

式 (I*) :

【化 1】



式(I*)

10

の構造を有し、

式中、

R^1 が、水素、 $C_3 \sim C_{30}$ アルキル、 $C_3 \sim C_{30}$ アルケニル、 $C_3 \sim C_{30}$ アルキニル、 $C_3 \sim C_{30}$ ヘテロアルキル、 $C_3 \sim C_{30}$ ヘテロアルケニル、 $C_3 \sim C_{30}$ ヘテロアルキニル、 $C_3 \sim C_{10}$ シクロアルキル、 $-C_0 \sim C_{10}$ アルキレン- $L-R^6$ 、または
 $-C_2 \sim C_{10}$ アルケニレン- $L-R^6$ であり、アルキル、アルキレン、アルケニル、アルケニレン、アルキニル、ヘテロアルキル、ヘテロアルケニル、ヘテロアルキニル、およびシクロアルキルの各々が独立に置換されているか、または非置換であり、

20

R^2 が、水素、 $C_3 \sim C_{30}$ アルキル、 $C_3 \sim C_{30}$ アルケニル、 $C_3 \sim C_{30}$ アルキニル、 $C_3 \sim C_{30}$ ヘテロアルキル、 $C_3 \sim C_{30}$ ヘテロアルケニル、 $C_3 \sim C_{30}$ ヘテロアルキニル、 $C_3 \sim C_{10}$ シクロアルキル、 $-C_0 \sim C_{10}$ アルキレン- $L-R^6$ 、または
 $-C_2 \sim C_{10}$ アルケニレン- $L-R^6$ であり、アルキル、アルキレン、アルケニル、アルケニレン、アルキニル、ヘテロアルキル、ヘテロアルケニル、ヘテロアルキニル、およびシクロアルキルの各々が独立に置換されているか、または非置換であり、

X 、 Y 、および Z の各々が独立に、 $-C(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=O)-$ 、 $-C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)-$ 、 $-OC(=O)O-$ 、 $-NR^4C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=NR^4)NR^4-$ 、 $-C(=S)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=S)-$ 、 $-C(=S)O-$ 、 $-OC(=S)-$ 、 $OC(=S)O-$ 、 $-NR^4C(=S)O-$ 、 $-OC(=S)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=S)NR^4-$ 、 $-C(=O)S-$ 、 $-SC(=O)-$ 、 $-OC(=O)S-$ 、 $-NR^4C(=O)S-$ 、 $-SC(=O)NR^4-$ 、 $-C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)-$ 、 $-SC(=S)O-$ 、 $-NR^4C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)NR^4-$ 、 $-C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)-$ 、 $-SC(=O)S-$ 、 $-SC(=S)S-$ 、 $-NR^4C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)NR^4-$ 、 $-R^{11}C(=O)N(R^4)R^9-$ 、 $-NR^7C(=O)R^9-$ 、 $-C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)-$ 、 $-R^{11}C(=O)OR^9-$ 、 $-R^{11}OC(=O)R^9-$ 、 $-R^{11}OC(=O)OR^9-$ 、 $-R^{11}N(R^4)C(=O)OR^9-$ 、 $-R^{11}OC(=O)N(R^4)R^9-$ 、 $-R^{11}(NR^4)C(=O)N(R^4)R^9-$ 、 $-R^{11}N(R^4)C(=NR^4)R^9-$ 、 $-R^{11}C(=S)N(R^4)R^9-$ 、 $-R^{11}N(R^4)C(=S)R^9-$ 、 $-R^{11}C(=S)OR^9-$ 、 $-R^{11}OC(=S)R^9-$ 、 $-R^{11}OC(=S)OR^9-$ 、 $-R^{11}N(R^4)C(=S)OR^9-$ 、 $-R^{11}OC(=S)N(R^4)R^9-$ 、 $-R^{11}N(R^4)C(=S)N(R^4)R^9-$ 、 $-R^{11}C(=O)SR^9-$ 、 $-R^{11}SC(=O)R^9-$ 、 $-R^{11}OC(=O)SR^9-$ 、 $-R^{11}N(R^4)C(=O)SR^9-$ 、 $-R^{11}SC(=O)N(R^4)R^9-$ 、 $-R^{11}C(=S)SR^9-$ 、 $-R^{11}SC(=S)R^9-$ 、 $-R^{11}SC(=S)OR^9-$ 、 $-R^{11}N(R^4)C(=S)SR^9-$ 、 $-R^{11}SC(=S)N(R^4)R^9-$ 、 $-$

30

40

50

$R^{11}C(=S)SR^9-$ 、 $-R^{11}SC(=S)R^9-$ 、 $-R^{11}SC(=O)SR^9-$ 、 $-R^{11}SC(=S)SR^9-$ 、 $-R^{11}N(R^4)C(=S)SR^9-$ 、 $-R^{11}SC(=S)N(R^4)R^9-$ 、 $-R^{11}OR^9-$ 、 $-R^{11}SR^9-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、または結合であり、

Lの各々が独立に、 $-C(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=O)-$ 、 $-C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)-$ 、 $-C(=O)-$ 、 $-OC(=O)O-$ 、 $-NR^4C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=NR^4)NR^4-$ 、 $-C(=S)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=S)-$ 、 $-C(=S)O-$ 、 $-OC(=S)-$ 、 $OC(=S)O-$ 、 $-NR^4C(=S)O-$ 、 $-OC(=S)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=S)NR^4-$ 、 $-C(=O)S-$ 、 $-SC(=O)-$ 、 $-OC(=O)S-$ 、 $-NR^4C(=O)S-$ 、 $-SC(=O)NR^4-$ 、 $-C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)-$ 、 $-SC(=S)O-$ 、 $-NR^4C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)NR^4-$ 、 $-C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)-$ 、 $-SC(=O)S-$ 、 $-SC(=S)S-$ 、 $-NR^4C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)NR^4-$ 、 $-O-N=CR^4-$ 、 $-CR^4=N-O-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-R^{11}C(=O)N(R^4)R^9-$ 、 $-R^{11}N(R^4)C(=O)R^9-$ 、 $-R^{11}C(=O)OR^9-$ 、 $-R^{11}OC(=O)R^9-$ 、 $-R^{11}OC(=O)OR^9-$ 、 $-R^{11}N(R^4)C(=O)OR^9-$ 、 $-R^{11}OC(=O)N(R^4)R^9-$ 、 $-R^{11}N(R^4)C(=O)N(R^4)R^9-$ 、 $-R^{11}N(R^4)C(=NR^4)N(R^4)R^9-$ 、 $-R^{11}C(=S)N(R^4)R^9-$ 、 $-R^{11}N(R^4)C(=S)R^9-$ 、 $-R^{11}C(=S)OR^9-$ 、 $-R^{11}OC(=S)R^9-$ 、 $-R^{11}OC(=S)OR^9-$ 、 $-R^{11}N(R^4)C(=S)OR^9-$ 、 $-R^{11}OC(=S)N(R^4)R^9-$ 、 $-R^{11}N(R^4)C(=S)N(R^4)R^9-$ 、 $-R^{11}C(=O)SR^9-$ 、 $-R^{11}SC(=O)R^9-$ 、 $-R^{11}OC(=O)SR^9-$ 、 $-R^{11}N(R^4)C(=O)SR^9-$ 、 $-R^{11}SC(=O)N(R^4)R^9-$ 、 $-R^{11}C(=S)SR^9-$ 、 $-R^{11}SC(=S)R^9-$ 、 $-R^{11}SC(=S)OR^9-$ 、 $-R^{11}N(R^4)C(=S)SR^9-$ 、 $-R^{11}SC(=S)N(R^4)R^9-$ 、 $-R^{11}C(=S)SR^9-$ 、 $-R^{11}SC(=S)R^9-$ 、 $-R^{11}SC(=O)SR^9-$ 、 $-R^{11}SC(=S)SR^9-$ 、 $-R^{11}N(R^4)C(=S)SR^9-$ 、 $-R^{11}SC(=S)N(R^4)R^9-$ 、 $-R^{11}O-N=CR^9-$ 、 $-R^{11}C(R^{10})=N-OR^9-$ 、 $-R^{11}OR^9-$ 、 $-R^{11}SR^9-$ 、 $-C_1\sim C_{10}$ アルキレン $-C(=O)O-$ 、 $-C_1\sim C_{10}$ アルキレン $-OC(=O)-$ 、 $-C_1\sim C_{10}$ アルキレン $-O-$ 、 $-C_1\sim C_{10}$ アルキレン $-C(=O)O-$ 、 $-C_1\sim C_{10}$ アルキレン $-OC(=O)-$ 、または結合であり、アルキレンが置換されているか、または非置換であり、

R^3 が、 $-C_0\sim C_{10}$ アルキレン $-NR^7R^8$ 、 $-C_0\sim C_{10}$ アルキレン $-$ ヘテロシクロアルキル、 $-C_0\sim C_{10}$ アルキレン $-$ シクロアルキル、または $-C_0\sim C_{10}$ アルキレン $-$ ヘテロアリールであり、アルキレン、ヘテロシクロアルキル、およびヘテロシクロアリールが独立に置換されているか、または非置換であり、

R^4 の各々が独立に、水素、置換もしくは非置換の $C_1\sim C_{16}$ アルキルまたは置換もしくは非置換の $C_1\sim C_{16}$ ヘテロアルキルであり、

R^5 が、水素または置換もしくは非置換の $-C_0\sim C_{10}$ アルキレン $-L-R^4$ であり、

R^6 の各々が独立に、水素、 $C_3\sim C_{30}$ アルキル、 $C_3\sim C_{30}$ アルケニル、 $C_3\sim C_{30}$ アルキニル、 $C_y-C_3\sim C_{30}$ アルキル、 $C_y-C_3\sim C_{30}$ アルケニル、または $C_y-C_3\sim C_{30}$ アルキニルであり、アルキル、アルケニル、およびアルキニルがそれぞれ独立に、置換されているか、または非置換であり、

C_y の各々が、置換もしくは非置換のシクロアルキル、置換もしくは非置換のヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換のアリール、または置換もしくは非置換のヘテロアリールであり、

R^7 および R^8 の各々が独立に、水素もしくは置換もしくは非置換の $C_1\sim C_{16}$ アルキル、置換もしくは非置換の $C_1\sim C_{16}$ ヘテロアルキルであるか、または R^7 および R^8 が、それらが結合している窒素と一緒にあって、置換もしくは非置換の $C_2\sim C_6$ ヘテ

10

20

30

40

50

ロシクリルを形成し、

R^9 の各々が独立に、水素または置換もしくは非置換の $C_1 \sim C_{16}$ アルキレンまたは置換もしくは非置換の $C_1 \sim C_{16}$ ヘテロアルキレンであり、

R^{10} の各々が独立に、水素または置換もしくは非置換の $C_1 \sim C_{16}$ アルキレンまたは非置換の $C_1 \sim C_{16}$ ヘテロアルキレンであり、 R^{11} の各々が独立に、置換もしくは非置換の $C_1 \sim C_{16}$ アルキレンまたは非置換の $C_1 \sim C_{16}$ ヘテロアルキレンであり、

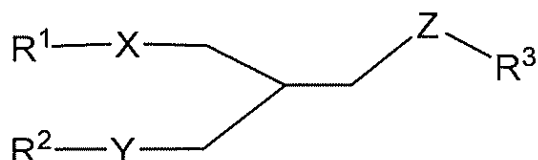
n 、 m 、および q の各々が独立に、0、1、2、3、4、または5である、
アミノ脂質またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物。

【請求項2】

式(Ia)：

10

【化2】



式(Ia)

の構造を有し、

20

式中、

R^1 および R^2 の各々が独立に、 $C_3 \sim C_{30}$ アルキル、 $C_3 \sim C_{30}$ アルケニル、 $C_3 \sim C_{30}$ アルキニル、 $C_3 \sim C_{30}$ ヘテロアルキル、 $C_3 \sim C_{30}$ ヘテロアルケニル、 $C_3 \sim C_{30}$ ヘテロアルキニル、 $C_3 \sim C_{10}$ シクロアルキル、 $-C_0 \sim C_{10}$ アルキレン- $L-R^6$ 、または $-C_2 \sim C_{10}$ アルケニレン- $L-R^6$ であり、アルキル、アルキレン、アルケニル、アルケニレン、アルキニル、ヘテロアルキル、ヘテロアルケニル、ヘテロアルキニル、およびシクロアルキルの各々が独立に置換されているか、または非置換であり、

X 、 Y 、および Z の各々が独立に、 $C(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=O)-$ 、 $-C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)-$ 、 $-OC(=O)O-$ 、 $-NR^4C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=NR^4)NR^4-$ 、 $-C(=S)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=S)-$ 、 $-C(=S)O-$ 、 $-OC(=S)-$ 、 $OC(=S)O-$ 、 $-NR^4C(=S)O-$ 、 $-OC(=S)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=S)NR^4-$ 、 $-C(=O)S-$ 、 $-SC(=O)-$ 、 $-OC(=O)S-$ 、 $-NR^4C(=O)S-$ 、 $-SC(=O)NR^4-$ 、 $-C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)-$ 、 $-SC(=S)O-$ 、 $-NR^4C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)NR^4-$ 、 $-C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)-$ 、 $-SC(=S)O-$ 、 $-SC(=O)S-$ 、 $-SC(=S)S-$ 、 $-NR^4C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)NR^4-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-C_1 \sim C_{10}$ アルキレン- $O-$ 、または結合であり、アルキレンが置換されているか、または非置換であり、

30

L の各々が独立に、 $-C(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=O)-$ 、 $-C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)-$ 、 $-OC(=O)O-$ 、 $-NR^4C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=NR^4)NR^4-$ 、 $-C(=S)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=S)-$ 、 $-C(=S)O-$ 、 $-OC(=S)-$ 、 $OC(=S)O-$ 、 $-NR^4C(=S)O-$ 、 $-OC(=S)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=S)NR^4-$ 、 $-C(=O)S-$ 、 $-SC(=O)-$ 、 $-OC(=O)S-$ 、 $-NR^4C(=O)S-$ 、 $-SC(=O)NR^4-$ 、 $-C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)-$ 、 $-SC(=S)O-$ 、 $-NR^4C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)NR^4-$ 、 $-C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)-$ 、 $-SC(=S)O-$ 、 $-SC(=O)S-$ 、 $-SC(=S)S-$ 、 $-NR^4C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)NR^4-$ 、 $-O-N=CR^4-$ 、 $-CR^4=N-O-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-C_1 \sim C_{10}$ アルキレン- $O-$ 、 $-C_1 \sim C_{10}$ アルキレン- $C(=O)O-$ 、 $-C_1 \sim C_{10}$ アル

40

50

キレン-OC(=O)-、または結合であり、アルキレンが置換されているか、または非置換であり、

R³が、-C₀~C₁₀アルキレン-NR⁷R⁸または-C₀~C₁₀アルキレン-ヘテロシクロアルキルであり、アルキレンおよびヘテロシクロアルキルがそれぞれ独立に、置換されているか、または非置換であり、

R⁴の各々が独立に、水素または置換もしくは非置換のC₁~C₆アルキルであり、

R⁶の各々が独立に、C₃~C₃₀アルキル、C₃~C₃₀アルケニル、C₃~C₃₀アルキニル、Cy-C₃~C₃₀アルキル、Cy-C₃~C₃₀アルケニル、またはCy-C₃~C₃₀アルキニルであり、アルキル、アルケニル、およびアルキニルがそれぞれ独立に、置換されているか、または非置換であり、

Cyの各々が、置換もしくは非置換のシクロアルキル、置換もしくは非置換のヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換のアリール、置換もしくは非置換のヘテロアリールであり、

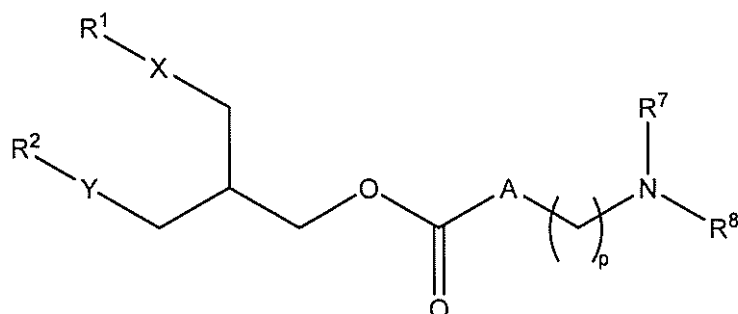
R⁷およびR⁸の各々が独立に、水素または置換もしくは非置換のC₁~C₆アルキルであるか、またはR⁷およびR⁸が、それらが結合している窒素と一緒に、置換もしくは非置換のC₂~C₆ヘテロシクリルを形成する、

請求項1に記載のアミノ脂質またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物。

【請求項3】

式(Ib)：

【化3】



式(Ib)

の構造を有し、

式中、

XおよびYの各々が同一であり、-OC(=O)-、-OC(=O)O-、-OC(=O)NR⁴-、-C(=S)O-、-OC(=S)-、OC(=S)O-、-NR⁴C(=S)O-、-OC(=S)NR⁴-、SC(=O)-、-OC(=O)S-、-SC(=S)O-、-O-、-C₁~C₁₀アルキレン-O-、および結合からなる群から選択され、アルキレンが置換されているか、または非置換であり、

R¹およびR²が、同一であり、水素、C₁~C₃₀アルキル、C₁~C₃₀ヘテロアルキル、およびCy-C₃~C₃₀アルキルからなる群から選択され、アルキルおよびヘテロアルキルがそれぞれ独立に、置換されているか、または非置換であり、

R⁴の各々が独立に、水素または置換もしくは非置換のC₁~C₆アルキルであり、

Cyの各々が、置換もしくは非置換のシクロアルキル、置換もしくは非置換のヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換のアリール、または置換もしくは非置換のヘテロアリールであり、

R⁷およびR⁸の各々が独立に、水素または置換もしくは非置換のC₁~C₆アルキル

であるか、または R^7 および R^8 が、それらが結合している窒素と一緒にあって、置換もしくは非置換の $C_2 \sim C_6$ ヘテロシクリルを形成し、

A が、 $-O-$ 、 $-CH_2-$ 、 $-S-$ 、または $-NR^{12}-$ であり、

R^{12} が、水素、 $C_1 \sim C_{10}$ アルキル、または $C_1 \sim C_{10}$ ヘテロアルキルであり、アルキルおよびヘテロアルキルがそれぞれ独立に、置換されているか、または非置換であり、

C_y が、置換もしくは非置換のシクロアルキル、置換もしくは非置換のヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換のアリール、または置換もしくは非置換のヘテロアリールであり、

p が、1、2、3、4、5、または6である、

10

請求項1に記載のアミノ脂質またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物。

【請求項4】

A が $-O$ である、請求項3に記載のアミノ脂質。

【請求項5】

X および Y が、 $-C(=O)O-$ または $-OC(=O)-$ である、請求項3または4に記載のアミノ脂質。

【請求項6】

X および Y の各々が、 $-C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)O-$ 、および $-N(H)C(=O)O-$ である、請求項3に記載のアミノ脂質。

【請求項7】

20

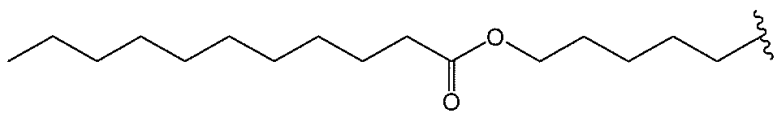
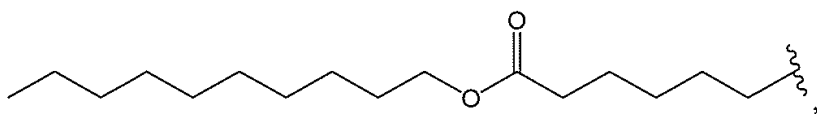
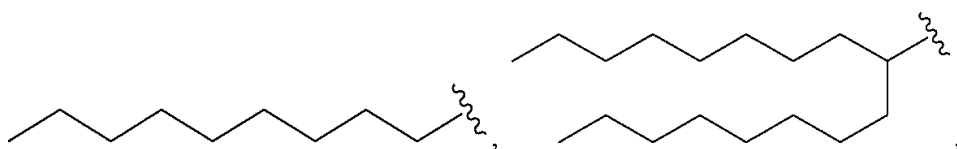
R^1 および R^2 の各々が、

30

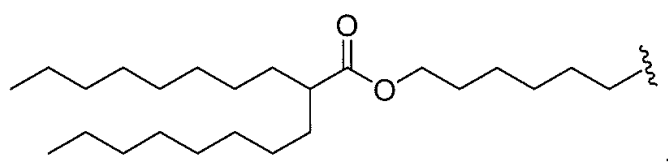
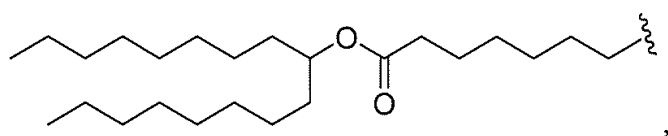
40

50

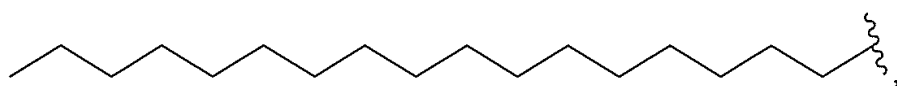
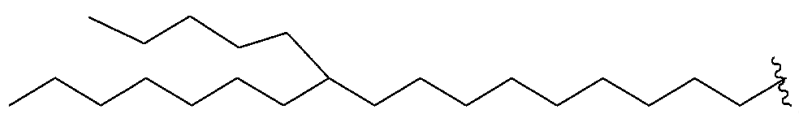
【化 4 - 1】



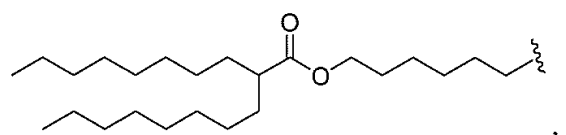
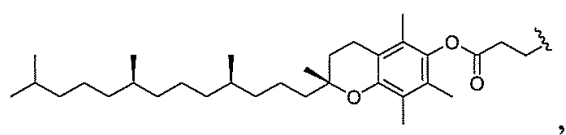
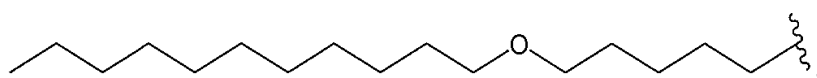
10



20



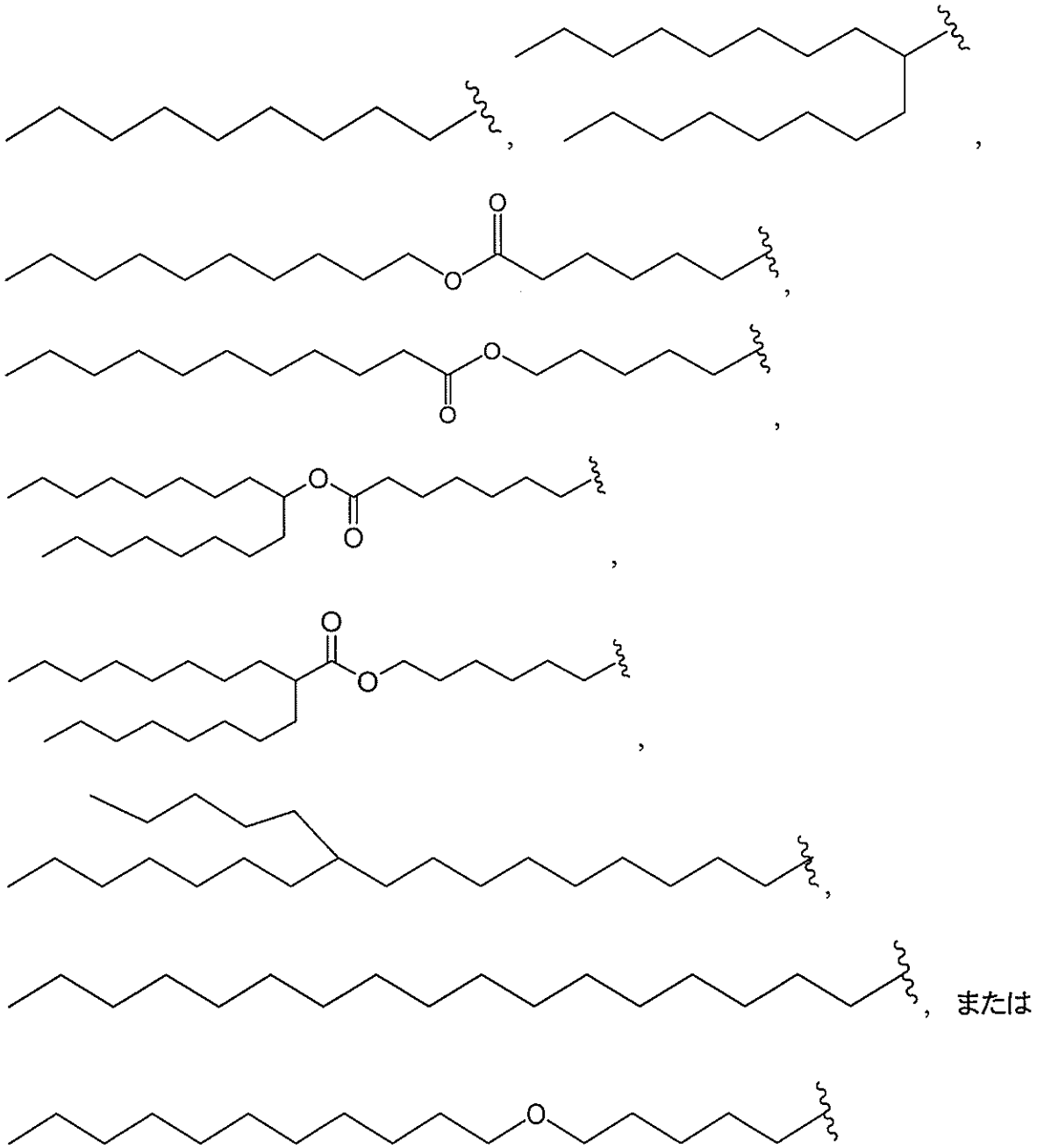
30



40

50

【化 4 - 2】



である、請求項 3、4、または 6 に記載のアミノ脂質。

【請求項 8】

10

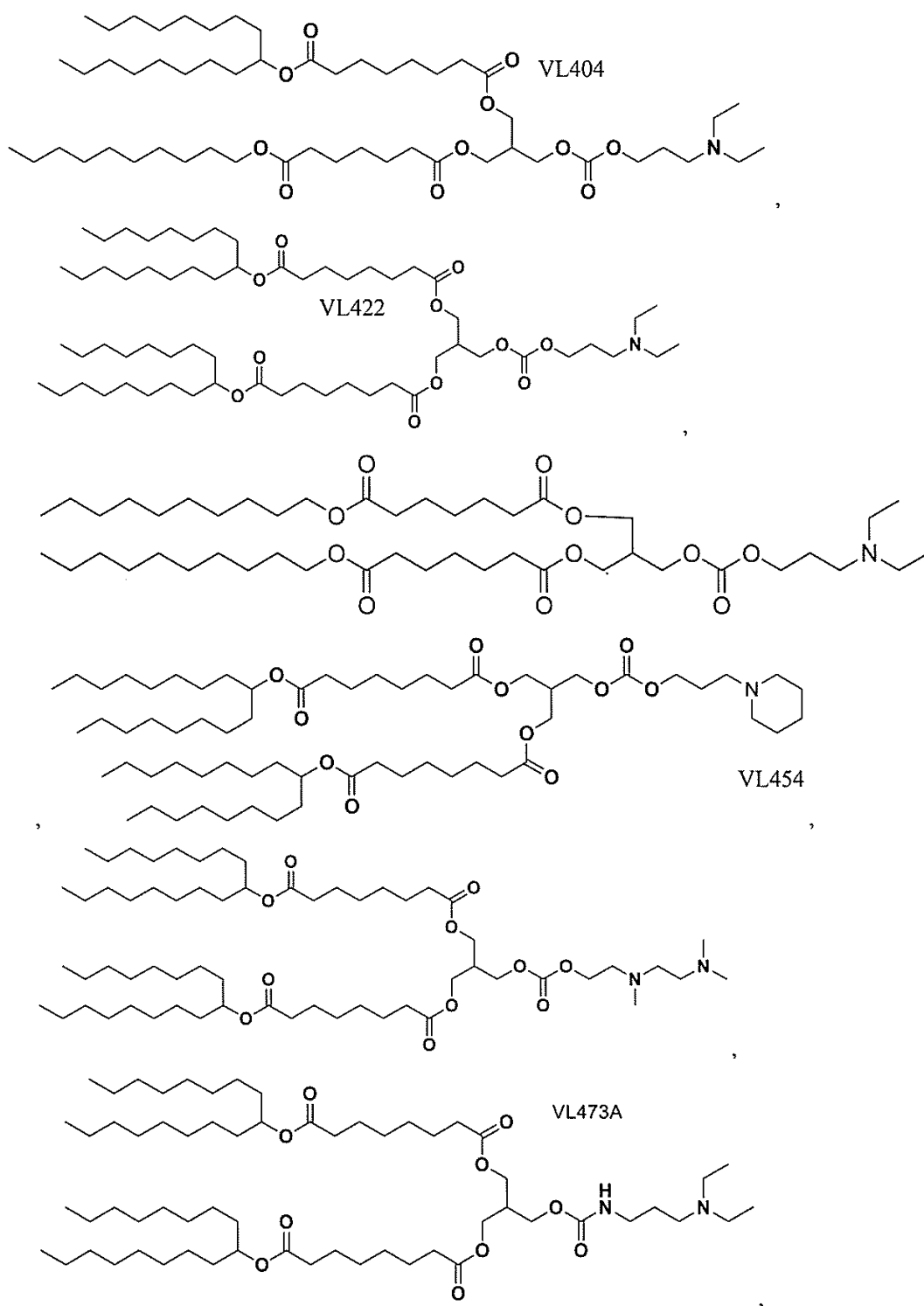
20

30

40

50

【化 5 - 1】



10

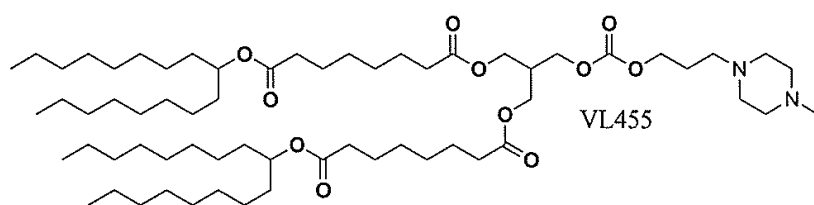
20

30

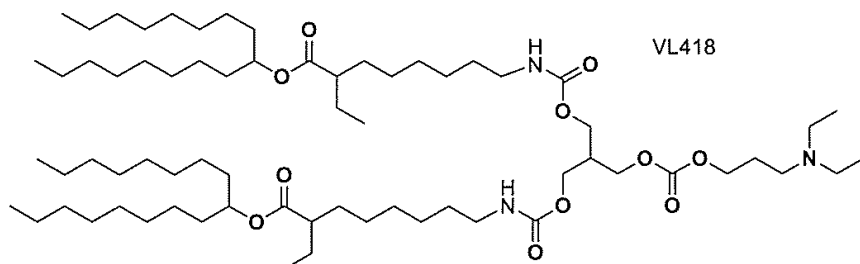
40

50

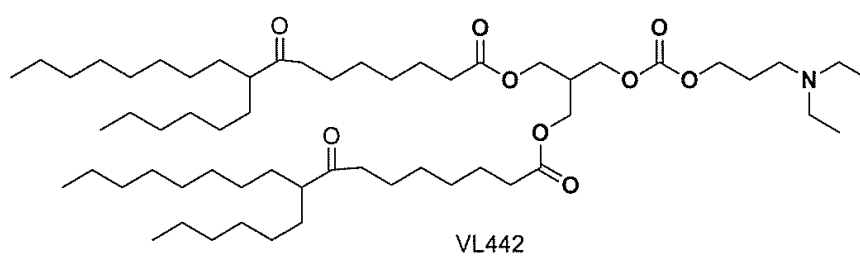
【化 5 - 2】



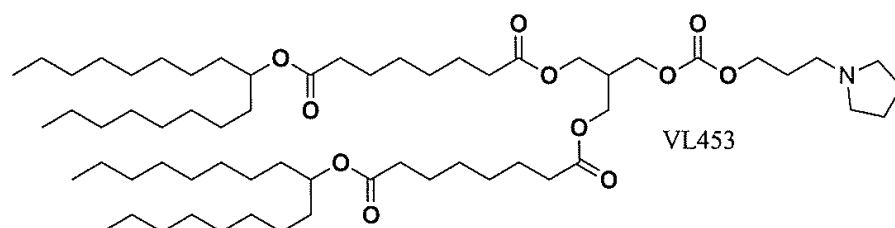
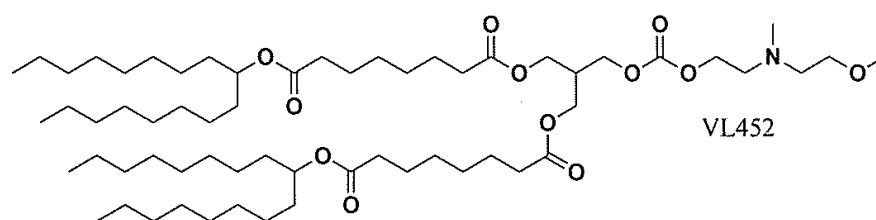
10



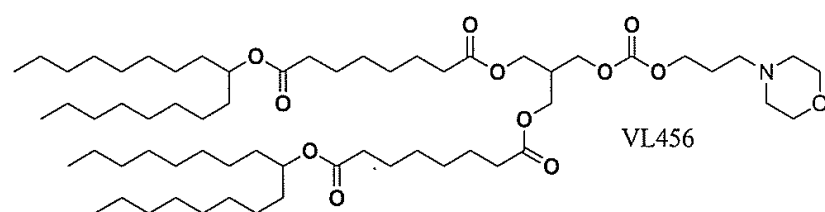
20



30

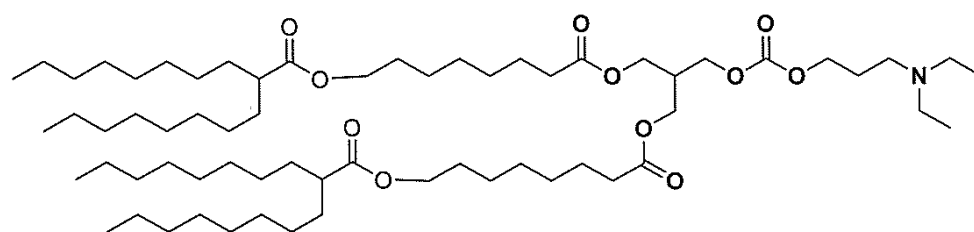
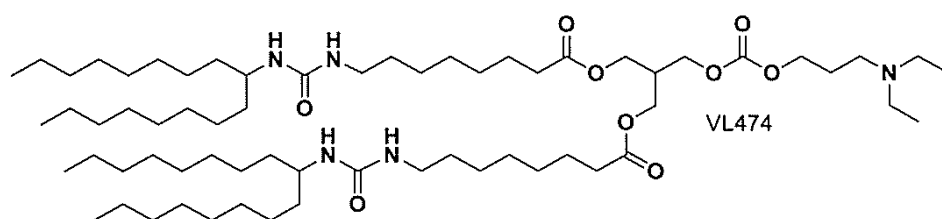
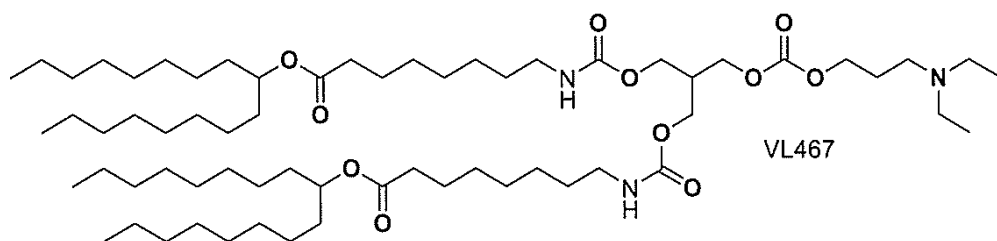
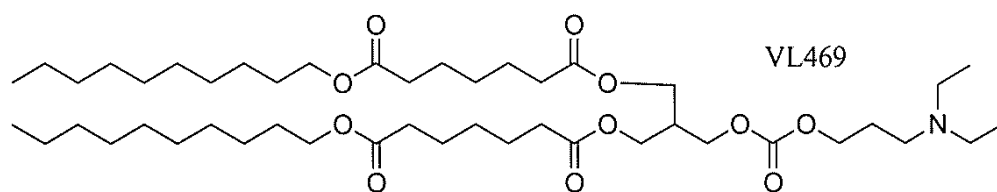
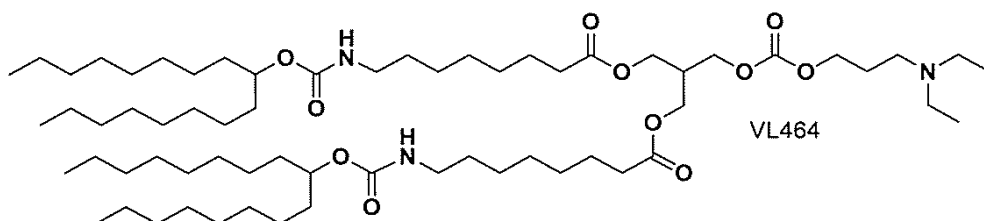
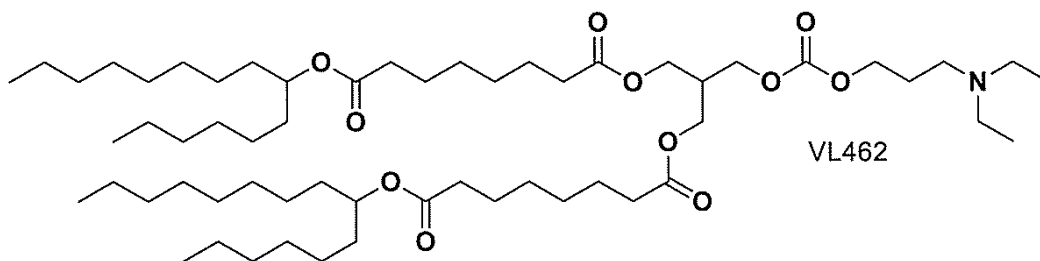


40



50

【化 5 - 3】



10

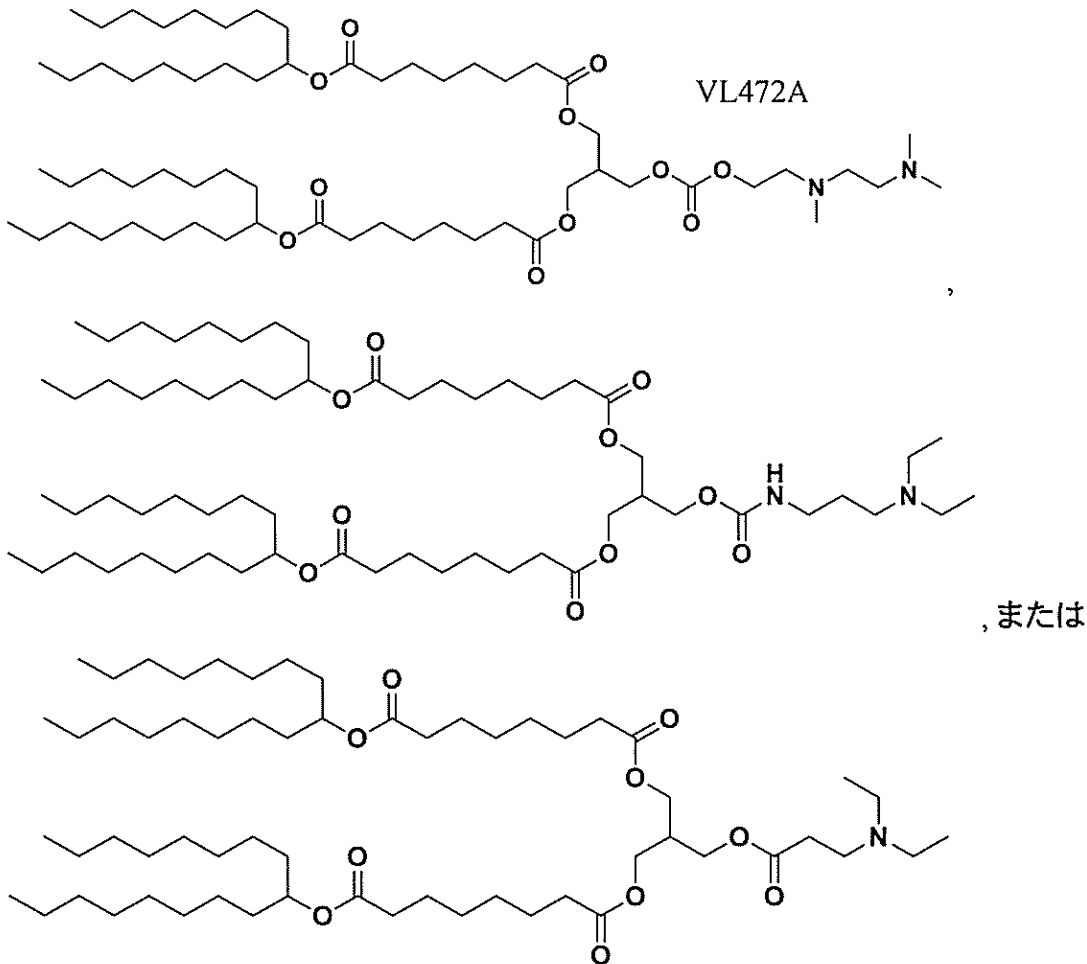
20

30

40

50

【化 5 - 4】



10

20

である、請求項 3 に記載のアミノ脂質。

30

【請求項 9】

X および Y がそれぞれ独立に、 $-\text{C}(=\text{O})\text{O}-$ 、 $-\text{OC}(=\text{O})\text{O}-$ 、 $-\text{N}(\text{H})\text{C}(=\text{O})\text{O}-$ 、および $-\text{OC}(=\text{O})-$ から選択される、請求項 1 または 2 に記載のアミノ脂質。

【請求項 10】

R^1 および R^2 がそれぞれ独立に、置換もしくは非置換の $\text{C}_3 \sim \text{C}_{30}$ アルキルまたは置換もしくは非置換の $\text{C}_3 \sim \text{C}_{30}$ アルケニルから選択される、請求項 1 または 2 に記載のナノ粒子組成物。

【請求項 11】

R^1 および R^2 がそれぞれ独立に、 $-\text{C}_0 \sim \text{C}_{10}$ アルキレン- $\text{L}-\text{R}^6$ から選択される、請求項 1 または 2 に記載のアミノ脂質。

40

【請求項 12】

L が独立に、 $-\text{C}(=\text{O})\text{O}-$ または $-\text{OC}(=\text{O})-$ である、請求項 11 に記載のアミノ脂質。

【請求項 13】

R^6 が、直鎖状または分岐状の $\text{C}_6 \sim \text{C}_{20}$ アルキルである、請求項 11 に記載のアミノ脂質。

【請求項 14】

R^6 が、 $\text{Cy}-\text{C}_3 \sim \text{C}_{30}$ アルキル、 $\text{Cy}-\text{C}_3 \sim \text{C}_{30}$ アルケニル、または $\text{Cy}-\text{C}_3 \sim \text{C}_{30}$ アルキニルである、請求項 11 に記載のアミノ脂質。

【請求項 15】

50

R^1 および／または R^2 が非対称ヘテロ原子を含む、請求項 1 ～ 14 のいずれか 1 項に記載のアミノ脂質。

【請求項 16】

Z が、 $-C(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)O-$ 、 $-C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)-$ 、または $-O-$ であり、 R^4 が、水素または CH_3 である、請求項 1 ～ 15 のいずれか 1 項に記載のアミノ脂質。

【請求項 17】

Z が、 $-OC(=O)O-$ 、 $-C(=O)O-$ または $-OC(=O)-$ である、請求項 1 ～ 2 または 9 ～ 14 のいずれか 1 項に記載のアミノ脂質。

【請求項 18】

R^3 が $-C_1 \sim C_6$ アルキレン- NR^7R^8 である、請求項 1 ～ 17 のいずれか 1 項に記載のアミノ脂質。

【請求項 19】

R^7 および R^8 がそれぞれが独立に、置換または非置換の $C_1 \sim C_6$ アルキルである、請求項 18 に記載のアミノ脂質。

【請求項 20】

R^7 および R^8 がそれぞれが $-CH_2CH_3$ である、請求項 18 に記載のアミノ脂質。

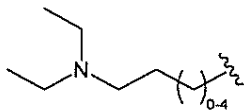
【請求項 21】

R^7 および R^8 が、それらが結合している窒素と一緒に、置換または非置換の 3 ～ 7 員のヘテロシクロアルキルを形成する、請求項 18 に記載のアミノ脂質。

【請求項 22】

R^3 が

【化 6】



である、請求項 1 ～ 2 または 9 ～ 14 のいずれか 1 項に記載のアミノ脂質。

【請求項 23】

10

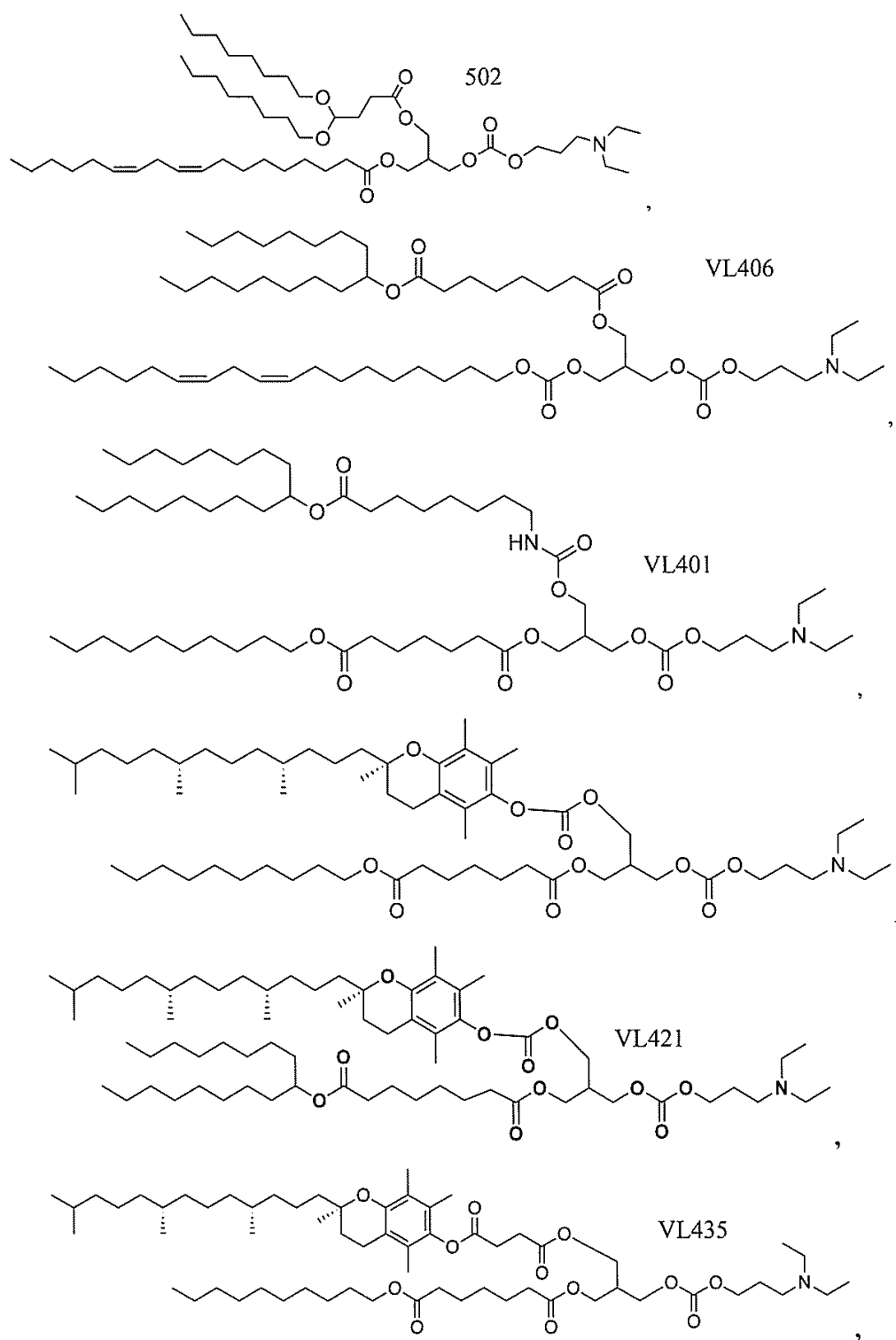
20

30

40

50

【化 7 - 1】



10

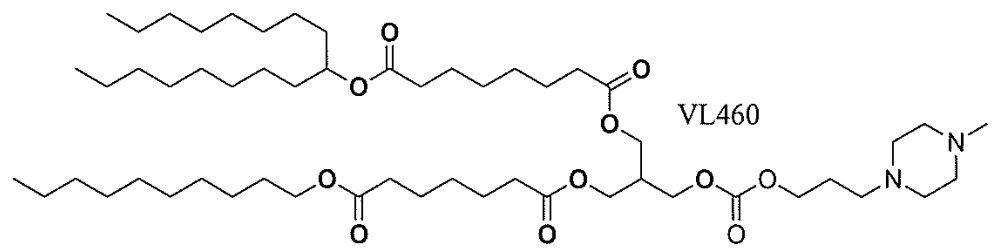
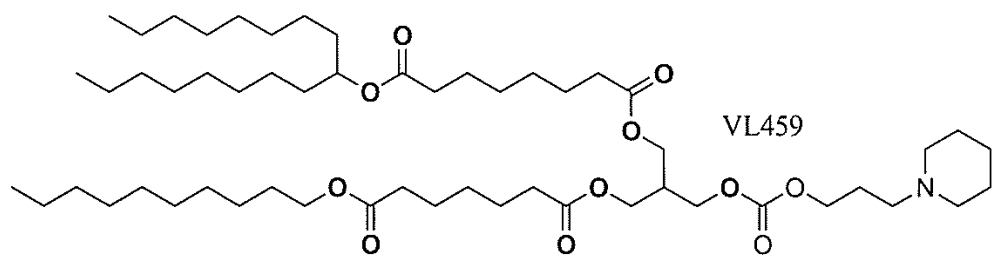
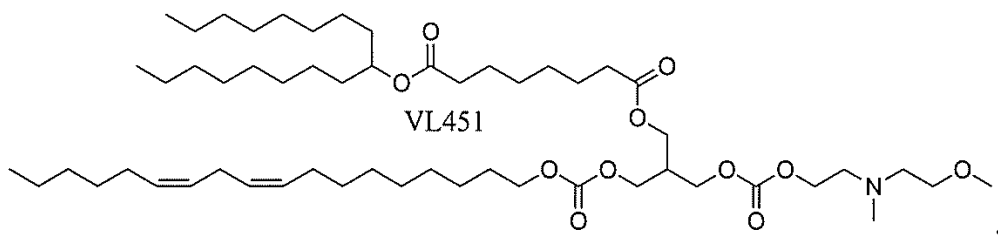
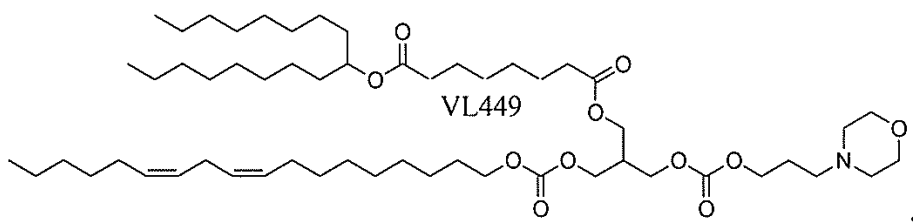
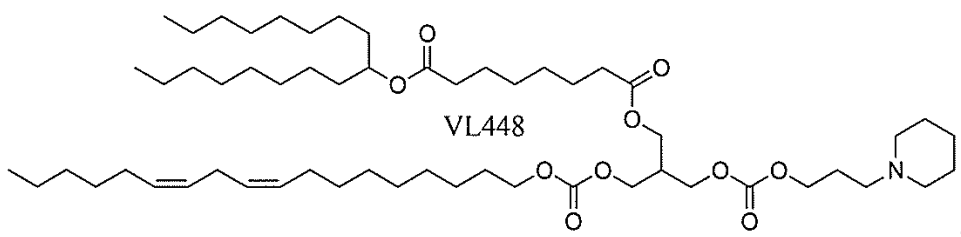
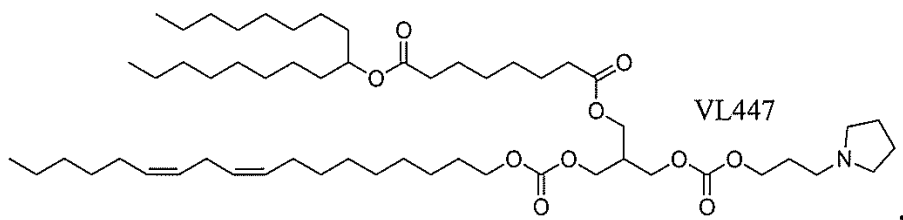
20

30

40

50

【化 7 - 2】



10

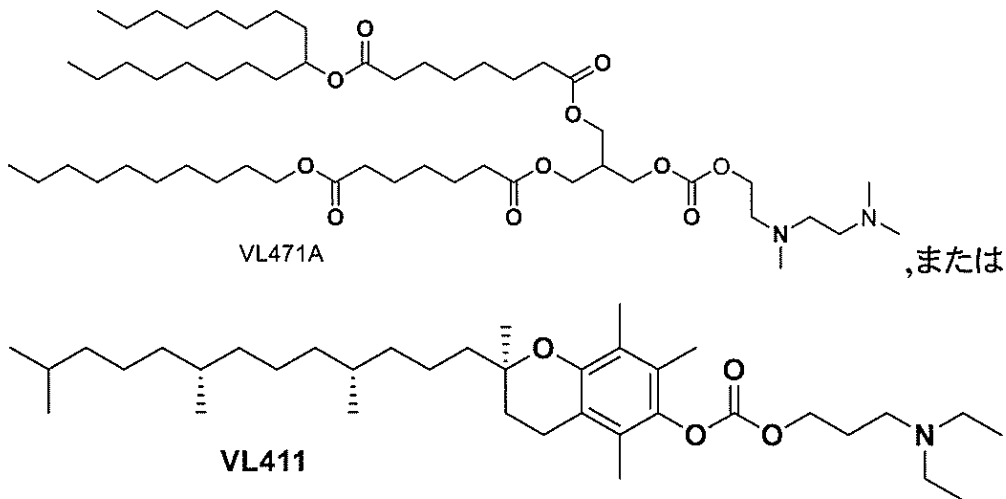
20

30

40

50

【化 7 - 3】



10

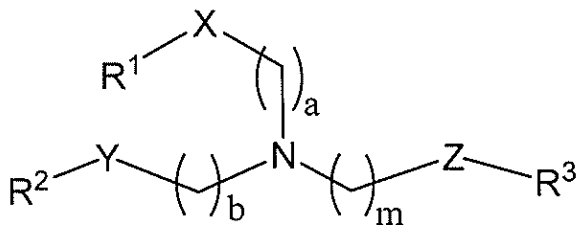
である、請求項 1 に記載のアミノ脂質。

【請求項 2 4】

式 (I I *)

【化 8】

20



式(II*)

30

の構造を有し、

式中、

R^1 および R^2 の各々が独立に、水素、 $C_3 \sim C_{30}$ アルキル、 $C_3 \sim C_{30}$ アルケニル、 $C_3 \sim C_{30}$ アルキニル、 $C_3 \sim C_{30}$ ヘテロアルキル、 $C_3 \sim C_{30}$ ヘテロアルケニル、 $C_3 \sim C_{30}$ ヘテロアルキニル、 $C_3 \sim C_{10}$ シクロアルキル、 $-C_0 \sim C_{10}$ アルキレン- $L-R^6$ 、または $-C_1 \sim C_{10}$ アルケニレン- $L-R^6$ であり、アルキル、アルキレン、アルケニル、アルケニレン、アルキニル、ヘテロアルキル、ヘテロアルケニル、ヘテロアルキニル、およびシクロアルキルの各々が、独立に置換されているか、または非置換であり、

X 、 Y 、および Z の各々が独立に、 $-C(=O)NR^4-$ 、 $-C(=O)-$ 、 $-NR^4C(=O)-$ 、 $-C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)-$ 、 $-OC(=O)O-$ 、 $-NR^4C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=NR^4)NR^4-$ 、 $-C(=S)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=S)-$ 、 $-C(=S)O-$ 、 $-OC(=S)-$ 、 $OC(=S)O-$ 、 $-NR^4C(=S)O-$ 、 $-OC(=S)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=S)NR^4-$ 、 $-C(=O)S-$ 、 $-SC(=O)-$ 、 $-OC(=O)S-$ 、 $-NR^4C(=O)S-$ 、 $-SC(=O)NR^4-$ 、 $-C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)-$ 、 $-SC(=S)O-$ 、 $-NR^4C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)NR^4-$ 、 $-C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)-$ 、 $-SC(=O)S-$ 、 $-SC(=S)S-$ 、 $-NR^4C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)NR^4-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、または結合であり、

40

L の各々が独立に、 $-C(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=O)-$ 、 $-C(=O)O-$

50

、 $-OC(=O)-$ 、 $-OC(=O)O-$ 、 $-NR^4C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=NR^4)NR^4-$ 、 $-C(=S)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=S)-$ 、 $-C(=S)O-$ 、 $-OC(=S)-$ 、 $OC(=S)O-$ 、 $-NR^4C(=S)O-$ 、 $-OC(=S)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=S)NR^4-$ 、 $-C(=O)S-$ 、 $-SC(=O)-$ 、 $-OC(=O)S-$ 、 $-NR^4C(=O)S-$ 、 $-SC(=O)NR^4-$ 、 $-C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)-$ 、 $-SC(=S)O-$ 、 $-NR^4C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)NR^4-$ 、 $-C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)S-$ 、 $-NR^4C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)NR^4-$ 、 $-O-N=CR^4-$ 、 $-CR^4=N-O-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-C_1\sim C_{10}$ アルキレン $-O-$ 、 $-C_1\sim C_{10}$ アルキレン $-C(=O)O-$ 、 $-C_1\sim C_{10}$ アルキレン $-OC(=O)-$ 、または結合であり、アルキレンが置換されているか、または非置換であり、

10

R^3 が、水素、 $-C_1\sim C_6$ アルキル、 $-C_0\sim C_{10}$ アルキレン $-NR^7R^8$ 、 $-C_0\sim C_{10}$ アルキレン $-$ ヘテロシクロアルキル、または $-C_0\sim C_{10}$ アルキレン $-$ ヘテロシクロアリールであり、アルキル、アルキレン、ヘテロシクロアルキル、およびヘテロシクロアリールが独立に、置換されているか、または非置換であり、

R^4 の各々が独立に、水素または置換もしくは非置換の $C_1\sim C_6$ アルキルであり、

R^6 の各々が独立に、 $C_3\sim C_{30}$ アルキル、 $C_3\sim C_{30}$ アルケニル、 $C_3\sim C_{30}$ アルキニル、 $Cy-C_3\sim C_{30}$ アルキル、 $Cy-C_3\sim C_{30}$ アルケニル、または $Cy-C_3\sim C_{30}$ アルキニルであり、アルキル、アルケニル、およびアルキニルがそれぞれ独立に、置換されているか、または非置換であり、

20

Cy の各々が、置換もしくは非置換のシクロアルキル、置換もしくは非置換のヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換のアリール、または置換もしくは非置換のヘテロアリールであり、

R^7 および R^8 の各々が独立に、水素または置換もしくは非置換の $C_1\sim C_6$ アルキルであるか、または R^7 および R^8 が、それらが結合している窒素と一緒にあって、置換もしくは非置換の $C_2\sim C_6$ ヘテロシクリルを形成し、

a および b の各々が独立に、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10であり、

m が、0、1、2、3、4、または5である、

30

アミノ脂質またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物。

【請求項25】

a および b の各々が独立に、3、4、5、6、7、8、9、または10である、請求項24に記載のアミノ脂質。

【請求項26】

m が、0、1、2、3、4、または5である、請求項24に記載のアミノ脂質。

【請求項27】

X および Y がそれぞれ独立に、 $-C(=O)O-$ および $-OC(=O)-$ から選択される、請求項24～26のいずれか1項に記載のアミノ脂質。

【請求項28】

L が独立に、 $-C(=O)O-$ または $-OC(=O)-$ である、請求項24に記載のアミノ脂質。

40

【請求項29】

R^6 が、直鎖状または分岐状の $C_6\sim C_{20}$ アルキルである、請求項24に記載のアミノ脂質。

【請求項30】

R^6 が、 $Cy-C_3\sim C_{30}$ アルキル、 $Cy-C_3\sim C_{30}$ アルケニル、または $Cy-C_3\sim C_{30}$ アルキニルである、請求項24に記載のアミノ脂質。

【請求項31】

Z が、 $-C(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)O-$ 、 $-C($

50

= O) O -, - O C (= O) -, または - O - であり、 R^4 が、水素または CH_3 である、請求項 24～30 のいずれか 1 項に記載のアミノ脂質。

【請求項 32】

R^7 および R^8 がそれぞれが $-CH_2CH_3$ である、請求項 24 に記載のアミノ脂質。

【請求項 33】

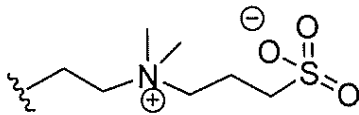
R^7 および R^8 が、それらが結合している窒素と一緒に、置換または非置換の 3～7 員のヘテロシクロアルキルを形成する、請求項 24 に記載のアミノ脂質。

【請求項 34】

R^3 が、

【化 9】

10



である、請求項 1～2 または 9～14 のいずれか 1 項に記載のアミノ脂質。

【請求項 35】

表 1 A から選択される構造を有するアミノ脂質またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物。

【請求項 36】

20

表 1 A から選択される構造を有するアミノ脂質またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物を含むナノ粒子組成物。

【請求項 37】

請求項 8 に記載のアミノ脂質またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物を含むナノ粒子組成物。

【請求項 38】

前記アミノ脂質またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物が、前記ナノ粒子組成物中に存在する総脂質含有量の 20 mol %～80 mol % を構成する、請求項 1～34 または 36 のいずれか 1 項に記載のナノ粒子組成物。

【請求項 39】

30

前記アミノ脂質またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物が、前記ナノ粒子組成物中に存在する総脂質含有量の 40 mol %～60 mol % を構成する、請求項 1～34 または 36～37 のいずれか 1 項に記載のナノ粒子組成物。

【請求項 40】

前記アミノ脂質またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物が、前記ナノ粒子組成物中に存在する総脂質含有量の 50 mol %～60 mol % を構成する、請求項 1～34 または 36～39 のいずれか 1 項に記載のナノ粒子組成物。

【請求項 41】

前記アミノ脂質またはその塩もしくは溶媒和物が、1 つまたは複数のイオン化可能な窒素原子を含む、請求項 1～34 または 36～40 のいずれか 1 項に記載のナノ粒子組成物。

40

【請求項 42】

1 つまたは複数のアミノ脂質に由来する 1 つまたは複数のイオン化可能な窒素原子を含む、請求項 1 または 36～40 のいずれか 1 項に記載のナノ粒子組成物。

【請求項 43】

1 つのアミノ脂質またはその塩もしくは溶媒和物のみを含む、請求項 1 または 36～42 のいずれか 1 項に記載のナノ粒子組成物。

【請求項 44】

1 つまたは複数の核酸分子実体を含む、請求項 1 または 36～43 のいずれか 1 項に記載のナノ粒子組成物。

50

【請求項 45】

前記核酸分子実体に存在するリン酸基に対する前記イオン化可能な窒素原子のモル比（P に対する N の比または N / P 比）が、約 2 ～ 20 である、請求項 44 に記載のナノ粒子組成物。

【請求項 46】

前記 N / P 比が、約 2 ～ 約 15、約 2 ～ 約 10、約 2 ～ 約 8、約 2 ～ 約 6、約 3 ～ 約 15、約 3 ～ 約 10、約 3 ～ 約 8、約 3 ～ 6、約 4 ～ 約 15、約 4 ～ 約 10、約 4 ～ 約 8、または約 4 ～ 約 6 である、請求項 45 に記載のナノ粒子組成物。

【請求項 47】

前記 N / P 比が約 3.5 ～ 約 10 である、請求項 45 に記載のナノ粒子組成物。

10

【請求項 48】

中性脂質を含む、請求項 1 または 36 ～ 47 のいずれか 1 項に記載のナノ粒子組成物。

【請求項 49】

前記中性脂質が、前記ナノ粒子組成物中に存在する総脂質含有量の約 1 mol % ～ 約 20 mol % を構成する、請求項 48 に記載のナノ粒子組成物。

【請求項 50】

前記中性脂質が、前記ナノ粒子組成物中に存在する総脂質含有量の約 2 mol % ～ 約 25 mol % を構成する、請求項 48 または 49 に記載のナノ粒子組成物。

【請求項 51】

前記中性脂質が、前記ナノ粒子組成物中に存在する総脂質含有量の約 5 mol % ～ 約 10 mol % を構成する、請求項 48 または 49 に記載のナノ粒子組成物。

20

【請求項 52】

前記中性脂質が、1, 2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (DSPC)、1, 2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (DPPC)、1, 2-ジミリストイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (DMPC)、2-オレオイル-1-パルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (POPC)、1, 2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン (DOPE)、およびスフィンゴミエリンから選択される、請求項 48 ～ 51 のいずれか 1 項に記載のナノ粒子組成物。

【請求項 53】

前記中性脂質が DSPC である、請求項 48 ～ 51 のいずれか 1 項に記載のナノ粒子組成物。

30

【請求項 54】

構造脂質を含む、請求項 1 または 36 ～ 53 のいずれか 1 項に記載のナノ粒子組成物。

【請求項 55】

前記構造脂質が、ステロールまたはその誘導体である、請求項 54 に記載のナノ粒子組成物。

【請求項 56】

前記ステロールまたは前記その誘導体が、コレステロールまたはコレステロール誘導体である、請求項 54 または 55 に記載のナノ粒子組成物。

【請求項 57】

前記構造脂質が、前記ナノ粒子組成物中に存在する総脂質含有量の約 15 mol % ～ 約 65 mol % を構成する、請求項 54 ～ 56 のいずれか 1 項に記載のナノ粒子組成物。

40

【請求項 58】

前記構造脂質が、前記ナノ粒子組成物中に存在する総脂質含有量の約 30 mol % ～ 約 60 mol % を構成する、請求項 54 ～ 56 のいずれか 1 項に記載のナノ粒子組成物。

【請求項 59】

前記構造脂質が、前記ナノ粒子組成物中に存在する総脂質含有量の約 30 mol % ～ 約 40 mol % を構成する、請求項 54 ～ 56 のいずれか 1 項に記載のナノ粒子組成物。

【請求項 60】

PEG-脂質を含む、請求項 1 または 36 ～ 59 のいずれか 1 項に記載のナノ粒子組成

50

物。

【請求項 6 1】

前記 P E G - 脂質が、表 2 の P E G - 脂質である、請求項 6 0 に記載のナノ粒子組成物。

【請求項 6 2】

前記 P E G - 脂質が、前記ナノ粒子組成物中に存在する総脂質含有量の約 0 . 1 m o l % ~ 約 6 m o l % を構成する、請求項 6 0 または 6 1 に記載のナノ粒子組成物。

【請求項 6 3】

前記 P E G - 脂質が、前記ナノ粒子組成物中に存在する総脂質含有量の約 2 . 0 m o l % ~ 約 2 . 5 m o l % を構成する、請求項 6 0 または 6 1 に記載のナノ粒子組成物。

10

【請求項 6 4】

前記 P E G - 脂質の数平均分子量が約 2 0 0 D a ~ 約 5 0 0 0 D a である、請求項 6 0 ~ 6 3 のいずれか 1 項に記載のナノ粒子組成物。

【請求項 6 5】

前記 1 つまたは複数の核酸分子実体が、目的の病原遺伝子をターゲティングするガイド R N A (g R N A) を含む、請求項 4 4 ~ 6 4 のいずれか 1 項に記載のナノ粒子組成物。

【請求項 6 6】

前記ガイド R N A が、シングルガイド R N A (s g R N A) である、請求項 6 5 に記載のナノ粒子組成物。

【請求項 6 7】

目的の病原遺伝子が肝細胞で生成される、請求項 6 5 または 6 6 に記載のナノ粒子組成物。

20

【請求項 6 8】

前記 1 つまたは複数の核酸分子実体が、S p C a s 9、C B E、および／または A B E タンパク質をコードする m R N A を含む、請求項 4 4 ~ 6 7 のいずれか 1 項に記載のナノ粒子組成物。

【請求項 6 9】

核酸安定化剤をさらに含む、請求項 1 または 3 6 ~ 6 8 のいずれか 1 項に記載のナノ粒子組成物。

【請求項 7 0】

(a) 1 つまたは複数の核酸分子実体と、

(b) 表 1 A のアミノ脂質またはその塩もしくは溶媒和物であって、

前記アミノ脂質またはその塩が、前記ナノ粒子組成物中に存在する総脂質含有量の 2 0 m o l % ~ 8 0 m o l % を構成し、

前記アミノ脂質またはその塩が、1 つまたは複数のイオン化可能な窒素原子を含み、

前記核酸分子実体内に存在するリン酸基に対する前記イオン化可能な窒素原子のモル比が、2 ~ 1 2 である、アミノ脂質またはその塩もしくは溶媒和物と、

(c) 前記ナノ粒子組成物中に存在する前記総脂質含有量の 2 m o l % ~ 2 5 m o l % を構成する中性脂質と、

(d) 前記ナノ粒子組成物中に存在する前記総脂質含有量の 3 0 m o l % ~ 6 0 m o l % を構成する構造脂質と、

40

(e) 前記ナノ粒子組成物中に存在する前記総脂質含有量の 0 . 1 m o l % ~ 6 m o l % を構成する表 2 の P E G - 脂質を含むナノ粒子組成物。

【請求項 7 1】

核酸安定化剤をさらに含む、請求項 3 6 ~ 7 0 のいずれか 1 項に記載のナノ粒子組成物。

【請求項 7 2】

核酸安定化剤が、ポリエチレングリコール、臭化セトリモニウム、またはキトサンを含む、請求項 7 1 に記載のナノ粒子組成物。

50

【請求項 7 3】

核酸安定化剤が、約 120～約 2000 Da の数平均分子量を有するポリエチレングリコールを含む、請求項 7 1 に記載のナノ粒子組成物。

【請求項 7 4】

(a) 1 つまたは複数の核酸分子実体と、

(b) 表 1 A のアミノ脂質またはその塩であって、

前記アミノ脂質またはその塩が、前記ナノ粒子組成物中に存在する総脂質含有量の 20 mol %～80 mol % を構成し、

前記アミノ脂質またはその塩が、1 つまたは複数のイオン化可能な窒素原子を含み、

前記核酸分子実体内に存在するリン酸基に対する前記イオン化可能な窒素原子のモル比が 2～12 である、アミノ脂質またはその塩と、

(c) 前記ナノ粒子組成物中に存在する前記総脂質含有量の 2 mol %～25 mol % を構成する中性脂質と、

(d) 前記ナノ粒子組成物中に存在する前記総脂質含有量の 30 mol %～60 mol % を構成する構造脂質と、

(e) 前記ナノ粒子組成物中に存在する前記総脂質含有量の 0.1 mol %～6 mol % を構成する表 2 の PEG-脂質と、

(f) 約 120～約 2000 Da の数平均分子量を有する、キトサン、臭化セトリモニウム、ポリエチレングリコール、またはこれらの組合せを含む核酸安定化剤とを含むナノ粒子組成物。

【請求項 7 5】

核酸安定化剤が、PEG 200、PEG 400、または PEG 600 を含む、請求項 7 1～7 4 のいずれか 1 項に記載のナノ粒子組成物。

【請求項 7 6】

核酸安定化剤が PEG 400 である、請求項 7 1～7 4 のいずれか 1 項に記載のナノ粒子組成物。

【請求項 7 7】

核酸安定化剤が、ナノ粒子組成物中に、全重量で約 0.01 %～約 20 % の量で存在する、請求項 7 1～7 6 のいずれか 1 項に記載のナノ粒子組成物。

【請求項 7 8】

核酸安定化剤が、全重量で約 0.5 %～約 5 % の量でナノ粒子組成物中に存在する、請求項 7 1～7 6 のいずれか 1 項に記載のナノ粒子組成物。

【請求項 7 9】

前記 1 つまたは複数の核酸分子実体が PCSK9 gRNA を含む、請求項 4 4～7 8 のいずれか 1 項に記載のナノ粒子組成物。

【請求項 8 0】

前記 1 つまたは複数の核酸分子実体が、Casヌクレアーゼをコードする mRNA を含む、請求項 4 4～7 8 のいずれか 1 項に記載のナノ粒子組成物。

【請求項 8 1】

前記 1 つまたは複数の核酸分子実体が、mRNA、gRNA、siRNA、アンチセンスオリゴヌクレオチド、マイクロRNA、抗マイクロRNA、RNA 活性化因子、アプタマー、またはこれらの組合せを含む、請求項 4 4～7 8 のいずれか 1 項に記載のナノ粒子組成物。

【請求項 8 2】

酸化防止剤を含む、請求項 1 または 3 6～8 1 のいずれか 1 項に記載のナノ粒子組成物。

【請求項 8 3】

前記酸化防止剤が EDTA を含む、請求項 8 2 に記載のナノ粒子組成物。

【請求項 8 4】

界面活性剤をさらに含む、請求項 1 または 3 6～8 3 のいずれか 1 項に記載のナノ粒子

10

20

30

40

50

組成物。

【請求項 8 5】

界面活性剤が、脂肪酸または脂肪アルコールである、請求項 8 4 に記載のナノ粒子組成物。

【請求項 8 6】

界面活性剤が、 $C_{12} \sim C_{24}$ 脂肪アルコールである、請求項 8 4 に記載のナノ粒子組成物。

【請求項 8 7】

$C_{12} \sim C_{24}$ 脂肪アルコールが、ラウリルアルコール、トリデシルアルコール、ミリスチルアルコール、ペンタデシルアルコール、セチルアルコール、パルミトレイルアルコール、ヘプタデシルアルコール、ステアリルアルコール、オレイルアルコール、ノナデシルアルコール、アラキジルアルコール、またはこれらの組合せである、請求項 8 6 に記載のナノ粒子組成物。

10

【請求項 8 8】

$C_{12} \sim C_{24}$ 脂肪アルコールが、オレイルアルコール、ステアリルアルコール、またはその混合物である、請求項 8 6 に記載のナノ粒子組成物。

【請求項 8 9】

界面活性剤が、前記ナノ粒子組成物中に存在する総脂質含有量の約 1.0 mol % ~ 約 10 mol % を構成する、請求項 8 4 ~ 8 8 のいずれか 1 項に記載のナノ粒子組成物。

【請求項 9 0】

ナノ粒子のメディアン径が、約 50 nm ~ 約 150 nm である、請求項 1 または 3 6 ~ 8 9 のいずれか 1 項に記載のナノ粒子組成物。

20

【請求項 9 1】

ナノ粒子の多分散指数が 0 ~ 0.15 である、請求項 1 または 3 6 ~ 9 0 のいずれか 1 項に記載のナノ粒子組成物。

【請求項 9 2】

ナノ粒子の多分散指数が 0 ~ 0.05 である、請求項 1 または 3 6 ~ 9 0 のいずれか 1 項に記載のナノ粒子組成物。

【請求項 9 3】

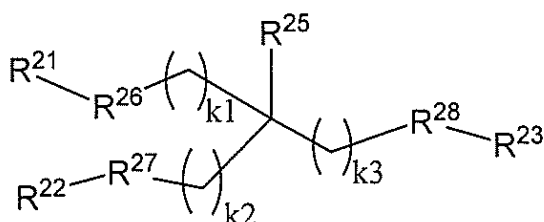
ナノ粒子組成物の核酸捕捉効率が、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % である、請求項 4 4 ~ 9 2 のいずれか 1 項に記載のナノ粒子組成物。

30

【請求項 9 4】

式 (III*) :

【化 1 0】



40

式(III*)

の構造を有し、

式中、

R^{21} が、水素、置換もしくは非置換の $C_1 \sim C_{30}$ アルキル、置換もしくは非置換の $C_3 \sim C_{30}$ アルケニル、または置換もしくは非置換の $C_3 \sim C_{30}$ アルキニルであり、

50

R^{22} が、水素、置換もしくは非置換の $C_1 \sim C_{30}$ アルキル、置換もしくは非置換の $C_3 \sim C_{30}$ アルケニル、または置換もしくは非置換の $C_3 \sim C_{30}$ アルキニルであり、

R^{26} 、 R^{27} 、および R^{28} の各々が独立に、 $-C(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=O)-$ 、 $-C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)-$ 、 $-OC(=O)O-$ 、 $-NR^4C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=NR^4)NR^4-$ 、 $-C(=S)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=S)-$ 、 $-C(=S)O-$ 、 $-OC(=S)-$ 、 $OC(=S)O-$ 、 $-NR^4C(=S)O-$ 、 $-OC(=S)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=S)NR^4-$ 、 $-C(=O)S-$ 、 $-SC(=O)-$ 、 $-OC(=O)S-$ 、 $-NR^4C(=O)S-$ 、 $-N(Ac)-$ 、 $-OC(O)OCH_2C(O)O-$ 、 $-OC(O)OCH_2C(O)NH-$ 、 $-OC(O)NHCH_2C(O)O-$ 、 $-OC(O)NHCH_2C(O)NH-$ 、 $-OC(O)O(CH_2)_2C(O)O-$ 、 $-OC(O)O(CH_2)_2C(O)NH-$ 、 $-OC(O)NH(CH_2)_2C(O)O-$ 、 $-OC(O)NH(CH_2)_2C(O)NH-$ 、 $-OC(O)O(CH_2)_3C(O)O-$ 、 $-OC(O)O(CH_2)_3C(O)NH-$ 、 $-OC(O)NH(CH_2)_3C(O)O-$ 、 $-OC(O)NH(CH_2)_3C(O)NH-$ 、 $-C(O)OCH_2C(O)NH-$ 、 $-C(O)NHCH_2C(O)O-$ 、 $-C(O)NHCH_2C(O)NH-$ 、 $-C(O)O(CH_2)_2C(O)NH-$ 、 $-C(O)NH(CH_2)_2C(O)NH-$ 、 $-C(O)O(CH_2)_3C(O)O-$ 、 $-C(O)O(CH_2)_3C(O)NH-$ 、 $-C(O)NH(CH_2)_3C(O)NH-$ 、 $-OC(=O)NR^4(CH_2)_{1\sim3}C(=O)NH-$ 、 $-OC(=O)NR^4(CH_2)_{1\sim3}C(=O)O-$ 、 $-C(=O)NR^4(CH_2)_{1\sim3}C(=O)NH-$ 、 $-SC(=O)NR^4-$ 、 $-C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)-$ 、 $-SC(=S)O-$ 、 $-NR^4C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)NR^4-$ 、 $-C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)-$ 、 $-SC(=O)S-$ 、 $-SC(=S)S-$ 、 $-NR^4C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)NR^4-$ 、 $-O(CH_2)_2C(O)O-$ 、 $-O(CH_2)_2C(O)NH-$ 、 $-OC(O)(CH_2)_2O-$ 、 $-OC(O)(CH_2)_2NH-$ 、 $-O(CH_2)_2C(O)N(CH_3)-$ 、 $-O(CH_2)_2C(NH)O-$ 、 $-O(CH_2)_2C(NAc)NH-$ 、 $-O(CH_2)_2C(NH)N(CH_3)-$ 、 $-NH(CH_2)_2C(O)O-$ 、 $-NH(CH_2)_2C(O)NH-$ 、 $NH(CH_2)_2C(O)N(CH_3)-$ 、 $-NH(CH_2)_2C(NH)O-$ 、 $-NH(CH_2)_2C(NAc)NH-$ 、 $-NH(CH_2)_2C(NH)N(CH_3)-$ 、 $-NH(CH_2)_2C(NH)NH-$ 、 $-NH(CH_2)_2C(NH)N(CH_3)-$ 、 $-OC(O)(CH_2)_2N(CH_3)-$ 、 $-OC(NH)(CH_2)_2O-$ 、 $-OC(NMe)(CH_2)_2NH-$ 、 $-O_2C(NH)(CH_2)N(CH_3)-$ 、 $-O(CH_2)_2C(NH)NH-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、または結合であり、

R^4 の各々が独立に、水素または置換もしくは非置換の $C_1 \sim C_6$ アルキルであり、

R^{23} が、 $-C_0 \sim C_{10}$ アルキレン $(CH_2-CH_2-O)_{k4}-R^{24}$ 、 $-C_1 \sim C_{10}$ ヘテロアルキレン $-(CH_2-CH_2-O)_{k4}-R^{24}$ 、 $-C_0 \sim C_{10}$ アルキレン $-(O-CH_2-CH_2)_{k4}-R^{24}$ 、または $-C_0 \sim C_{10}$ ヘテロアルキレン $-(O-CH_2-CH_2)_{k4}-R^{24}$ であり、アルキレンおよびヘテロアルキレンがそれぞれ独立に、置換されているか、または非置換であり、

R^{24} が独立に、水素、置換もしくは非置換の $C_1 \sim C_3$ アルキル、 $-O-R^4$ 、 $-C(=O)OR^4$ 、または $-C(=O)R^4$ 、

R^{25} が、水素または置換もしくは非置換の $C_1 \sim C_{22}$ アルキルであり、

k_1 、 k_2 、および k_3 の各々が独立に、0、1、2、3、4、または5であり、

k_4 が、1～100から選択される整数である、

PEG-脂質A PEG-脂質またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物。

【請求項95】

R^{21} が、置換もしくは非置換の $C_3 \sim C_{30}$ アルキル、置換もしくは非置換の $C_3 \sim$

C₃₀アルケニル、または置換もしくは非置換のC₃～C₃₀アルキニルであり、

R²²が、水素、置換もしくは非置換のC₃～C₃₀アルキル、置換もしくは非置換のC₃～C₃₀アルケニル、または置換もしくは非置換のC₃～C₃₀アルキニルであり、

R²⁶、R²⁷、およびR²⁸の各々が独立に、-C(=O)NR⁴-、-NR⁴C(=O)-、-C(=O)O-、-OC(=O)-、-OC(=O)O-、-NR⁴C(=O)O-、-OC(=O)NR⁴-、-NR⁴C(=O)NR⁴-、-NR⁴C(=NR⁴)NR⁴-、-C(=S)NR⁴-、-NR⁴C(=S)-、-C(=S)O-、-OC(=S)-、OC(=S)O-、-NR⁴C(=S)O-、-OC(=S)NR⁴-、-NR⁴C(=S)NR⁴-、-C(=O)S-、-SC(=O)-、-OC(=O)S-、-NR⁴C(=O)S-、-OC(=O)NR⁴(CH₂)_{1~3}C(=O)NH-、-OC(=O)NR⁴(CH₂)_{1~3}C(=O)O-、-C(=O)NR⁴(CH₂)_{1~3}C(=O)NH-、-SC(=O)NR⁴-、-C(=S)S-、-SC(=S)-、-SC(=S)O-、-NR⁴C(=S)S-、-SC(=S)NR⁴-、-C(=S)S-、-SC(=S)-、-SC(=O)S-、-SC(=S)S-、-NR⁴C(=S)S-、-SC(=S)NR⁴-、-O(CH₂)₂C(O)O-、-O(CH₂)₂C(O)NH-、-OC(O)(CH₂)₂O-、-OC(O)(CH₂)₂NH-、-O(CH₂)₂C(O)N(CH₃)-、-O(CH₂)₂C(NH)O-、-O(CH₂)₂C(NAc)NH-、-O(CH₂)₂C(NH)N(CH₃)-、-O(CH₂)₂C(NH)NH-、-O(CH₂)₂C(NH)N(CH₃)-、-NH(CH₂)₂C(O)O-、-NH(CH₂)₂C(O)NH-、NH(CH₂)₂C(O)N(CH₃)-、-NH(CH₂)₂C(NH)O-、-NH(CH₂)₂C(NAc)NH-、-NH(CH₂)₂C(NH)N(CH₃)-、-NH(CH₂)₂C(NH)NH-、-NH(CH₂)₂C(NH)N(CH₃)-、-OC(O)(CH₂)₂N(CH₃)-、-OC(NH)(CH₂)₂O-、-OC(NMe)(CH₂)₂NH-、-O₂C(NH)(CH₂)₂N(CH₃)-、-O(CH₂)₂C(NH)NH-、-O-、-S-、または結合であり、

R⁴の各々が独立に、水素または置換もしくは非置換のC₁～C₆アルキルであり、

R²³が、-C₀～C₁₀アルキレン-(CH₂-CH₂-O)_{k4}-R²⁴または-C₁～C₁₀ヘテロアルキレン-(CH₂-CH₂-O)_{k4}-R²⁴であり、アルキレンおよびヘテロアルキレンがそれぞれ独立に、置換されているか、または非置換であり、

R²⁴が独立に、水素、置換もしくは非置換のC₁～C₃アルキル、-O-R⁴、-C(=O)OH、または-C(=O)R⁴であり、

R²⁵が、水素または置換もしくは非置換のC₁～C₆アルキルであり、

k₁、k₂、およびk₃の各々が独立に、0、1、2、3、4、または5であり、

k₄が、1～100から選択される整数である、

請求項94に記載のナノ粒子組成物。

【請求項96】

R²¹およびR²²の各々が独立に、非置換の直鎖状C₁₂～C₂₅アルキルである、請求項94～95のいずれか1項に記載のPEG-脂質。

【請求項97】

R²⁶、R²⁷、およびR²⁸の各々が独立に、-O(CH₂)₂C(O)O-、-O(CH₂)₂C(O)NH-、-OC(O)(CH₂)₂O-、-OC(O)(CH₂)₂NH-、-O(CH₂)₂C(O)N(CH₃)-、-O(CH₂)₂C(NH)O-、-O(CH₂)₂C(NAc)NH-、-O(CH₂)₂C(NH)N(CH₃)-、-O(CH₂)₂C(NH)NH-、-O(CH₂)₂C(NH)N(CH₃)-、-NH(CH₂)₂C(O)O-、-NH(CH₂)₂C(O)NH-、NH(CH₂)₂C(O)N(CH₃)-、-NH(CH₂)₂C(NH)O-、-NH(CH₂)₂C(NAc)NH-、-NH(CH₂)₂C(NH)N(CH₃)-、-NH(CH₂)₂C(NH)NH-、-NH(CH₂)₂C(NH)N(CH₃)-、-OC(O)(CH₂)₂N(CH₃)-、-OC(NH)(CH₂)₂O-、-OC(NMe)(CH₂)₂NH

ー、 $-\text{O}_2\text{C}(\text{NH})(\text{CH}_2)\text{N}(\text{CH}_3)-$ 、および $-\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{C}(\text{NH})\text{NH}$ から選択される、請求項94～96のいずれか1項に記載のPEG-脂質。

【請求項98】

R^{26} および R^{27} の各々が、 $-\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{C}(\text{O})\text{O}-$ または $-\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{C}(\text{O})\text{NH}-$ である、請求項94～96のいずれか1項に記載のPEG-脂質。

【請求項99】

R^{28} が、 $-\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{C}(\text{O})\text{O}-$ または $-\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{C}(\text{O})\text{NH}-$ である、請求項94～98のいずれか1項に記載のPEG-脂質。

【請求項100】

R^{28} が、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{O}-$ 、または $-\text{OC}(=\text{O})-$ である、請求項94～98のいずれか1項に記載のPEG-脂質。

10

【請求項101】

k_1 が0であり、 k_2 が1であり、 k_3 が1である、請求項94～100のいずれか1項に記載のPEG-脂質。

【請求項102】

R^{23} が、 $-\text{C}_0\sim\text{C}_3$ アルキレン $-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_{k_4}-\text{R}^{24}$ であり、 R^{24} がHまたはメチルである、請求項94～101のいずれか1項に記載のPEG-脂質。

【請求項103】

k_4 が1～50である、請求項94～102のいずれか1項に記載のPEG-脂質。

【請求項104】

R^{25} が水素である、請求項94～103のいずれか1項に記載のPEG-脂質。

20

【請求項105】

表2から選択される構造を有するPEG-脂質またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物。

【請求項106】

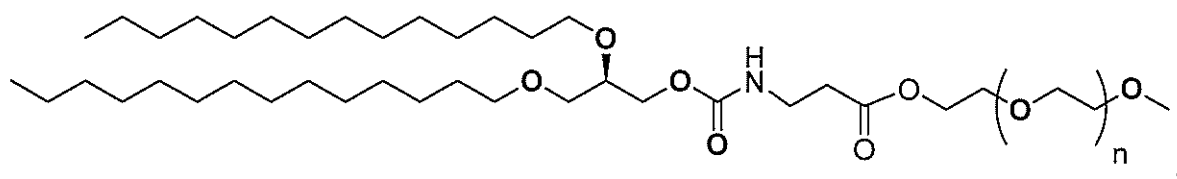
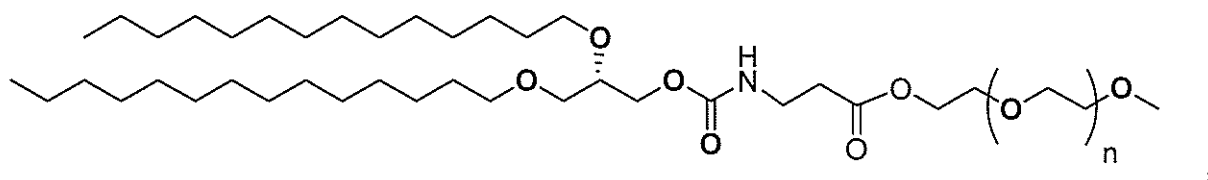
PEG-脂質が、

30

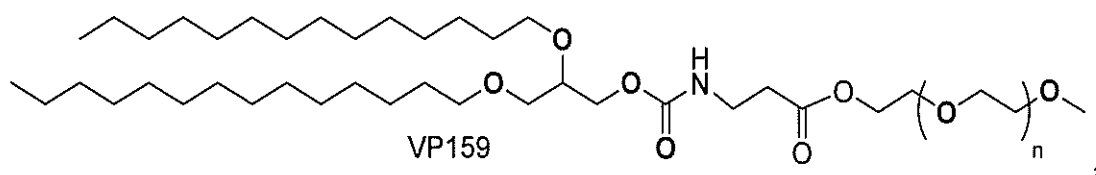
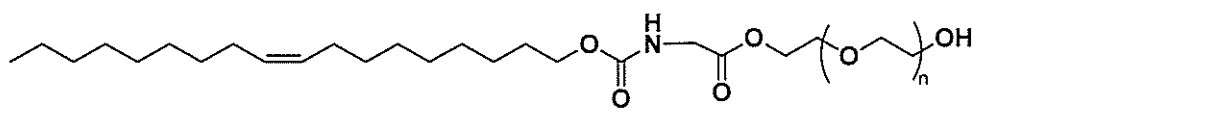
40

50

【化 1 1 - 1】

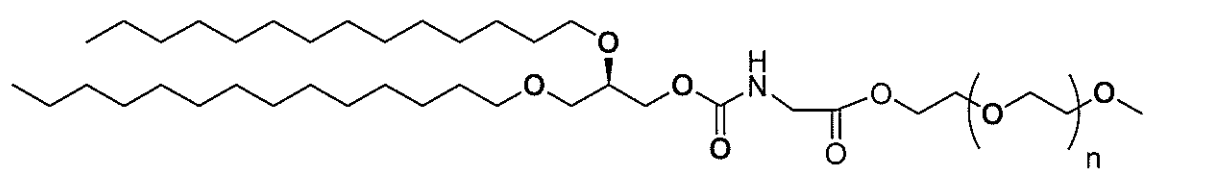
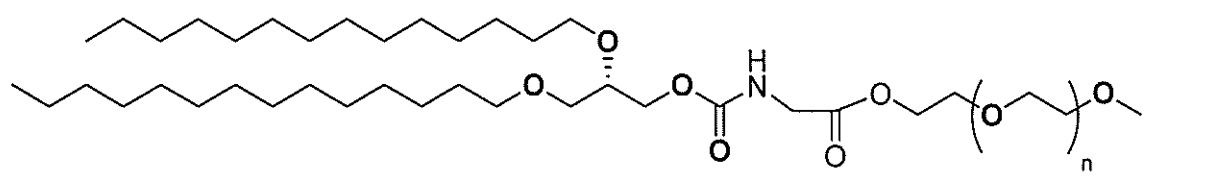


10

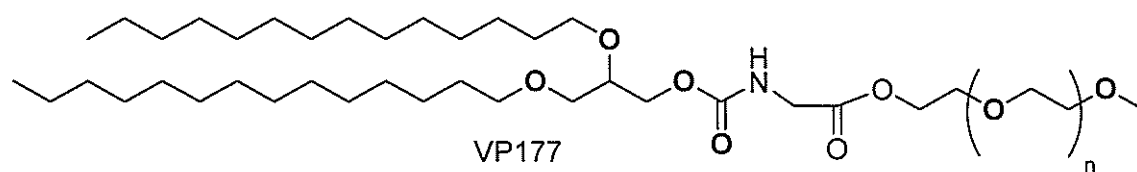


VP159

20



30

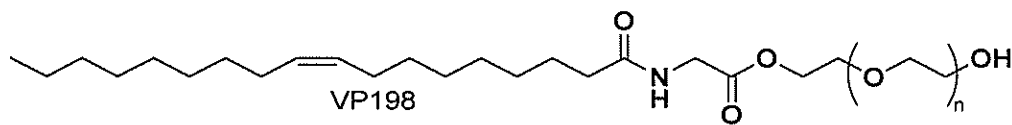
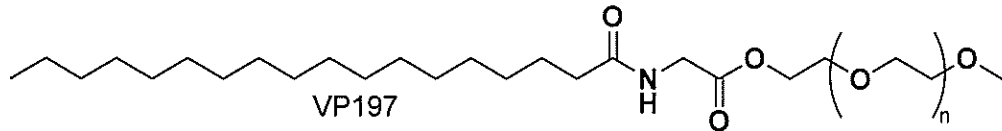
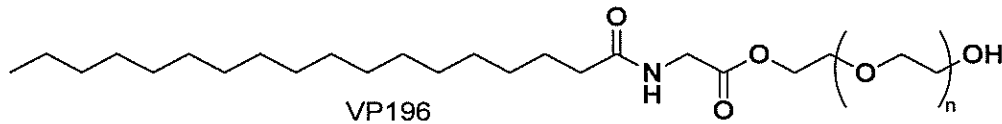


VP177

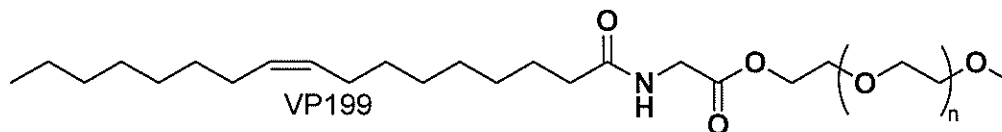
40

50

【化 1 1 - 2】



, または



である、請求項 9 4 に記載の P E G - 脂質。

【請求項 1 0 7】

請求項 3 6 ~ 9 3 のいずれか 1 項に記載の前記ナノ粒子組成物および賦形剤または担体を含む薬学的組成物。

【請求項 1 0 8】

遺伝子編集因子ヌクレアーゼをコードする m R N A を含む、請求項 1 0 7 に記載の薬学的組成物。

【請求項 1 0 9】

1 つまたは複数のガイド R N A 分子を含む、請求項 1 0 7 または 1 0 8 に記載の薬学的組成物。

【請求項 1 1 0】

P C S K 9 ガイド R N A を含む、請求項 1 0 7 または 1 0 8 に記載の薬学的組成物。

【請求項 1 1 1】

2 つ以上のガイド R N A 分子を含む、請求項 1 0 7 または 1 0 8 の薬学的組成物。

【請求項 1 1 2】

前記 2 つ以上のガイド R N A 分子が、2 つ以上の目的の遺伝子をターゲッティングする、請求項 1 1 1 に記載の薬学的組成物。

【請求項 1 1 3】

前記 m R N A が、C a s 9 ヌクレアーゼをコードする、請求項 1 0 8 ~ 1 1 2 のいずれか 1 項に記載の薬学的組成物。

【請求項 1 1 4】

前記 m R N A が、塩基編集ヌクレアーゼをコードする、請求項 1 0 8 ~ 1 1 2 のいずれか 1 項に記載の薬学的組成物。

【請求項 1 1 5】

前記 m R N A および前記 1 つまたは複数のガイド R N A 分子が、同じナノ粒子組成物中に存在する、請求項 1 0 9 ~ 1 1 4 のいずれか 1 項に記載の薬学的組成物。

【請求項 116】

前記 mRNA および前記 1 つまたは複数のガイド RNA 分子が、異なるナノ粒子組成物中に存在する、請求項 109～114 のいずれか 1 項に記載の薬学的組成物。

【請求項 117】

前記薬学的組成物中の前記 mRNA に対する前記 gRNA 分子の比が、重量またはモルで約 0.01～約 100 である、請求項 109～116 のいずれか 1 項に記載の薬学的組成物。

【請求項 118】

前記薬学的組成物中の前記 mRNA に対する前記 gRNA 分子の比が、重量またはモルで約 50:1、約 40:1、約 30:1、約 20:1、約 18:1、約 16:1、約 14:1、約 12:1、約 10:1、約 9:1、約 8:1、約 7:1、約 6:1、約 5:1、約 4:1、約 3:1、約 2:1、約 1:1、約 1:2、約 1:3、約 1:4、約 1:5、約 1:6、約 1:7、約 1:8、約 1:9、または約 1:10 である、請求項 117 に記載の薬学的組成物。

10

【請求項 119】

(a) 請求項 36～93 のいずれか 1 項に記載の第 1 のナノ粒子組成物と、

(b) 請求項 36～93 のいずれか 1 項に記載の第 2 のナノ粒子組成物と

を含む薬学的組成物。

【請求項 120】

前記第 1 のナノ粒子組成物が遺伝子編集因子 mRNA を含み、前記第 2 のナノ粒子組成物が、1 つまたは複数のガイド RNA 分子を含む、請求項 119 に記載の薬学的組成物。

20

【請求項 121】

前記薬学的組成物中の mRNA に対するガイド RNA 分子の比が、重量またはモルで約 50:1、約 40:1、約 30:1、約 20:1、約 18:1、約 16:1、約 14:1、約 12:1、約 10:1、約 9:1、約 8:1、約 7:1、約 6:1、約 5:1、約 4:1、約 3:1、約 2:1、約 1:1、約 1:2、約 1:3、約 1:4、約 1:5、約 1:6、約 1:7、約 1:8、約 1:9、または約 1:10 である、請求項 119 または 120 に記載の薬学的組成物。

【請求項 122】

前記薬学的組成物中の mRNA に対するガイド RNA の比が、重量またはモルで約 1:1 である、請求項 119 または 120 に記載の薬学的組成物。

30

【請求項 123】

核酸分子実体を細胞に送達する方法であって、前記細胞を、請求項 36～93 のいずれか 1 項に記載のナノ粒子組成物または請求項 107～122 のいずれか 1 項に記載の薬学的組成物と接触させるステップを含み、それによって、前記核酸分子実体が前記細胞に送達される、方法。

【請求項 124】

前記細胞がインビボ、エクスピボ、またはインビトロで接触する、請求項 123 に記載の方法。

【請求項 125】

細胞内で目的のポリペプチドを生成する方法であって、前記細胞を、請求項 36～93 のいずれか 1 項に記載のナノ粒子組成物または請求項 107～122 のいずれか 1 項に記載の薬学的組成物と接触させるステップを含み、前記ナノ粒子組成物または前記薬学的組成物が、核酸分子実体を含み、前記核酸分子実体が細胞内で翻訳され、それによって、ポリペプチドを生成する、方法。

40

【請求項 126】

薬学的組成物を作製する方法であって、請求項 36～93 のいずれか 1 項に記載の第 1 のナノ粒子組成物と、請求項 36～93 のいずれか 1 項に記載の第 2 のナノ粒子組成物とを組み合わせるステップを含む方法。

【請求項 127】

50

哺乳動物における疾患または状態を処置する方法であって、治療有効量の、請求項 107～122 のいずれか 1 項に記載の薬学的組成物を哺乳動物に投与するステップを含む方法。

【請求項 128】

細胞内の PCSK9 遺伝子を編集する方法であって、前記細胞を、請求項 36～93 のいずれか 1 項に記載のナノ粒子組成物または請求項 107～122 のいずれか 1 項に記載の薬学的組成物と接触させるステップを含み、前記ナノ粒子組成物または前記薬学的組成物が PCSK9 ガイド RNA を含む、方法。

【請求項 129】

請求項 71～93 のいずれか 1 項に記載の安定したナノ粒子組成物を生成する方法であって、核酸安定化剤を、核酸安定化剤を欠くナノ粒子組成物と組み合わせるステップを含む方法。

【請求項 130】

核酸安定化剤が、冷凍または保存の前にナノ粒子組成物と組み合わせられる、請求項 129 に記載の方法。

【請求項 131】

核酸安定化剤が、1 つまたは複数の核酸実体の添加の前、それと同時、またはその後にナノ粒子組成物と組み合わせられる、請求項 129 に記載の方法。

【請求項 132】

組み合わせるステップが、核酸安定化剤を、水性緩衝液中で 1 つまたは複数の核酸実体と混合するステップを含む、請求項 129～131 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 133】

安定したナノ粒子組成物を生成する方法であって、

(a) 核酸安定化剤を、1 つまたは複数の核酸分子実体と組み合わせ、それによって安定化された 1 つまたは複数の核酸分子実体を含む溶液を生成するステップと、

(b) (a) の溶液を、アミノ脂質、中性脂質、構造脂質、および PEG-脂質のうちの 1 つまたは複数を含むナノ粒子組成物と組み合わせるステップとを含む方法。

【請求項 134】

(a) における組み合わせるステップが、核酸安定化剤を、水性緩衝液中で 1 つまたは複数の核酸実体と混合するステップを含む、請求項 133 に記載の方法。

【請求項 135】

ナノ粒子組成物を収集し、約 6.5～約 8.0 の pH を有する緩衝液に対して透析するステップをさらに含む、請求項 129～134 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 136】

核酸安定化剤が、約 120～約 1000 の数平均分子量を有するポリエチレングリコールである、請求項 129～135 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 137】

脂質ナノ粒子を含む製剤を調製する方法であって、ナノ粒子が、(i) 1 つまたは複数の核酸分子実体、(ii) アミノ脂質、ならびに (iii) 構造脂質、中性脂質、および PEG-脂質から選択される 1 つまたは複数の脂質を含み、方法が、

(a) アミノ脂質の第 1 の画分を、第 1 の溶液中で 1 つまたは複数の核酸分子実体と組み合わせるステップであって、第 1 の画分が総アミノ脂質の 0.1 mol %～99 mol % を構成するステップと、

(b) アミノ脂質の残りを、第 2 の溶液中で構造脂質、中性脂質、および PEG-脂質から選択される 1 つまたは複数の脂質と組み合わせるステップと、

(c) 第 1 の溶液および第 2 の溶液を混合するステップであって、それによって脂質ナノ粒子を生成するステップとを含む、方法。

【請求項 138】

10

20

30

40

50

アミノ脂質の第 1 の画分が、1 つまたは複数の核酸分子実体内のリン酸の 0 . 1 ~ 9 9 % (N : P ベース) を中和するように構成される、請求項 1 3 7 に記載の方法。

【請求項 1 3 9】

アミノ脂質の第 1 の画分が、1 つまたは複数の核酸分子実体内のリン酸の 0 . 5 ~ 9 9 % (N : P ベース) を中和するように構成される、請求項 1 3 7 に記載の方法。

【請求項 1 4 0】

アミノ脂質の第 1 の画分が、1 つまたは複数の核酸分子実体内のリン酸の約 1 0 %、1 5 %、2 5 %、5 0 %、または 7 5 % (N : P ベース) を中和するように構成される、請求項 1 3 7 に記載の方法。

【請求項 1 4 1】

第 1 の溶液が水性緩衝溶液である、請求項 1 3 7 ~ 1 4 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 1 4 2】

第 1 の溶液が核酸安定化剤をさらに含む、請求項 1 3 7 ~ 1 4 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 4 3】

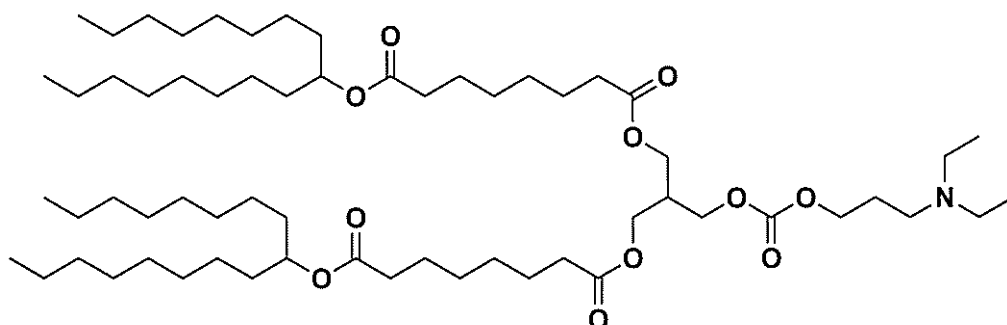
第 1 の溶液および第 2 の溶液がインラインミキサーで混合される、請求項 1 3 7 ~ 1 4 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 4 4】

アミノ脂質

20

【化 1 2】



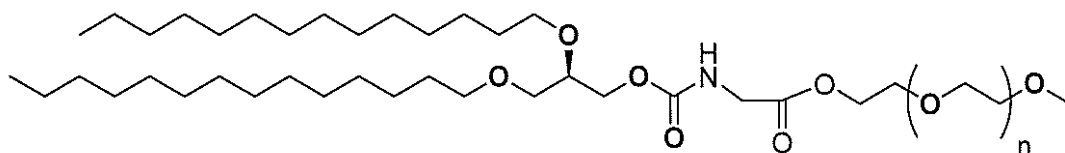
30

、表 2 の P E G - 脂質、コレステロール、および D S P C を含む脂質ナノ粒子製剤。

【請求項 1 4 5】

P E G - 脂質が、

【化 1 3】



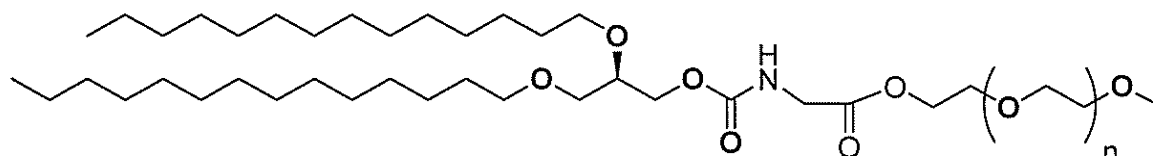
40

である、請求項 1 4 4 に記載の脂質ナノ粒子製剤。

【請求項 1 4 6】

P E G - 脂質が、

【化 1 4】



50

である、請求項 1 4 4 に記載の脂質ナノ粒子製剤。

【請求項 1 4 7】

(a) 1 つまたは複数の核酸分子実体と、

(b) 請求項 8 に記載のアミノ脂質またはその塩であって、

前記アミノ脂質またはその塩が、前記ナノ粒子組成物中に存在する総脂質含有量の 2 0 m o l % ~ 8 0 m o l % を構成し、

前記アミノ脂質またはその塩が、1 つまたは複数のイオン化可能な窒素原子を含み、

前記核酸分子実体内に存在するリン酸基に対する、前記イオン化可能な窒素原子のモル比が、2 ~ 1 2 である、アミノ脂質またはその塩と、

(c) 前記ナノ粒子組成物中に存在する前記総脂質含有量の 2 m o l % ~ 2 5 m o l % を構成する中性脂質と、 10

(d) 前記ナノ粒子組成物中に存在する前記総脂質含有量の 3 0 m o l % ~ 6 0 m o l % を構成する構造脂質と、

(e) 前記ナノ粒子組成物中に存在する前記総脂質含有量の 0 . 1 m o l % ~ 6 m o l % を構成する請求項 1 0 6 に記載の P E G - 脂質と、

(f) 約 1 2 0 ~ 約 2 0 0 0 D a の数平均分子量を有する、キトサン、臭化セトリモニウム、ポリエチレングリコール、またはこれらの組合せを含む核酸安定化剤とを含むナノ粒子組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

20

【0 0 0 1】

相互参照

【0 0 0 1】本出願は、それぞれが参照により全体として本明細書に組み込まれる、2 0 2 0 年 9 月 1 5 日に出願された米国仮出願第 6 3 / 0 7 8 , 7 3 8 号および 2 0 2 1 年 7 月 9 日に出願された米国特許仮出願第 6 3 / 2 2 0 , 3 4 0 号の利益を主張する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

【0 0 0 2】脂質含有粒子は、核酸、小分子化合物、およびタンパク質などの治療剤をカプセル化するため、およびそのような治療剤を細胞および他の細胞内区画内に輸送するビヒクルとして使用されている。治療剤をカプセル化する新しい脂質を開発し、そのようなナノ粒子ベースの輸送ビヒクルの安全性、有効性、および特異性を改善する継続的な必要性がある。 30

【発明の概要】

【0 0 0 3】

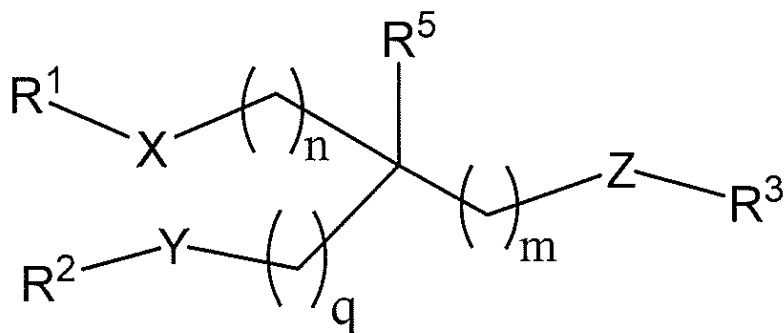
【0 0 0 3】新規な脂質およびそれから構成される脂質ナノ粒子が本明細書に記載される。一態様では、新規なアミノ脂質が記載される。別の態様では、新規な P E G - 脂質が記載される。さらに別の態様では、1 つまたは複数の新規なアミノ脂質および / または新規な P E G - 脂質を含む新規な脂質ナノ粒子が記載される。本明細書に記載のナノ粒子は、一態様において、以下：アミノ脂質、中性脂質、P E G - 脂質、ステロール、またはその誘導体、ならびに任意選択で、核酸分子実体、核酸安定化剤、界面活性剤、および酸化防止剤のうちの 1 つまたは複数のうちの 1 つまたは複数で構成される。本明細書ではさらに、上記のものを使用および作製する方法が記載される。 40

【0 0 0 4】

【0 0 0 4】一態様では、本明細書に開示されるのは、式 (I) :

【0 0 0 5】

【化 1】



式(I)

10

【0006】

の構造を有し、

式中、

R^1 および R^2 の各々が独立に、 $C_3 \sim C_{30}$ アルキル、 $C_3 \sim C_{30}$ アルケニル、 $C_3 \sim C_{30}$ アルキニル、 $C_3 \sim C_{30}$ ヘテロアルキル、 $C_3 \sim C_{30}$ ヘテロアルケニル、 $C_3 \sim C_{30}$ ヘテロアルキニル、 $C_3 \sim C_{10}$ シクロアルキル、 $-C_0 \sim C_{10}$ アルキレン- L - R^6 、または $-C_2 \sim C_{10}$ アルケニレン- L - R^6 であり、アルキル、アルキレン、アルケニル、アルケニレン、アルキニル、ヘテロアルキル、ヘテロアルケニル、ヘテロアルキニル、およびシクロアルキルの各々が独立に置換されているか、または非置換であり、

20

X 、 Y 、および Z の各々が独立に、 $-C(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=O)-$ 、 $-C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)-$ 、 $-OC(=O)O-$ 、 $-NR^4C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=NR^4)NR^4-$ 、 $-C(=S)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=S)-$ 、 $-C(=S)O-$ 、 $-OC(=S)-$ 、 $OC(=S)O-$ 、 $-NR^4C(=S)O-$ 、 $-OC(=S)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=S)NR^4-$ 、 $-C(=O)S-$ 、 $-SC(=O)-$ 、 $-OC(=O)S-$ 、 $-NR^4C(=O)S-$ 、 $-SC(=O)NR^4-$ 、 $-C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)-$ 、 $-SC(=S)O-$ 、 $-NR^4C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)NR^4-$ 、 $-C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)-$ 、 $-SC(=O)S-$ 、 $-SC(=S)S-$ 、 $-NR^4C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)NR^4-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、または結合であり、

30

L の各々が独立に、 $-C(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=O)-$ 、 $-C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)-$ 、 $-OC(=O)O-$ 、 $-NR^4C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=NR^4)NR^4-$ 、 $-C(=S)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=S)-$ 、 $-C(=S)O-$ 、 $-OC(=S)-$ 、 $OC(=S)O-$ 、 $-NR^4C(=S)O-$ 、 $-OC(=S)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=S)NR^4-$ 、 $-C(=O)S-$ 、 $-SC(=O)-$ 、 $-OC(=O)S-$ 、 $-NR^4C(=O)S-$ 、 $-SC(=O)NR^4-$ 、 $-C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)-$ 、 $-SC(=S)O-$ 、 $-NR^4C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)NR^4-$ 、 $-C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)-$ 、 $-SC(=O)S-$ 、 $-SC(=S)S-$ 、 $-NR^4C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)NR^4-$ 、 $-O-N=CR^4-$ 、 $-CR^4=N-O-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-C_1 \sim C_{10}$ アルキレン- $O-$ 、 $-C_1 \sim C_{10}$ アルキレン- $C(=O)O-$ 、 $-C_1 \sim C_{10}$ アルキレン- $OC(=O)-$ 、または結合であり、アルキレンが置換されているか、または非置換であり、

40

R^3 が、 $-C_0 \sim C_{10}$ アルキレン- NR^7R^8 、 $-C_0 \sim C_{10}$ アルキレン-ヘテロシクロアルキル、または $-C_0 \sim C_{10}$ アルキレン-ヘテロシクロアリアルであり、アルキレン、ヘテロシクロアルキル、およびヘテロシクロアリアルが独立に、置換されているか

50

、または非置換であり、

R^4 の各々が独立に、水素または置換もしくは非置換の $C_1 \sim C_6$ アルキルであり、

R^5 が、水素または置換もしくは非置換の $C_1 \sim C_6$ アルキルであり、

R^6 の各々が独立に、 $C_3 \sim C_{30}$ アルキル、 $C_3 \sim C_{30}$ アルケニル、 $C_3 \sim C_{30}$ アルキニル、 $Cy-C_3 \sim C_{30}$ アルキル、 $Cy-C_3 \sim C_{30}$ アルケニル、または $Cy-C_3 \sim C_{30}$ アルキニルであり、アルキル、アルケニル、およびアルキニルがそれぞれ独立に、置換されているか、または非置換であり、

Cy の各々が、置換もしくは非置換のシクロアルキル、置換もしくは非置換のヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換のアリール、または置換もしくは非置換のヘテロアリールであり、

R^7 および R^8 の各々が独立に、水素または置換もしくは非置換の $C_1 \sim C_6$ アルキルであるか、または R^7 および R^8 が、それらが結合している窒素と一緒にあって、置換もしくは非置換の $C_2 \sim C_6$ ヘテロシクリルを形成し、

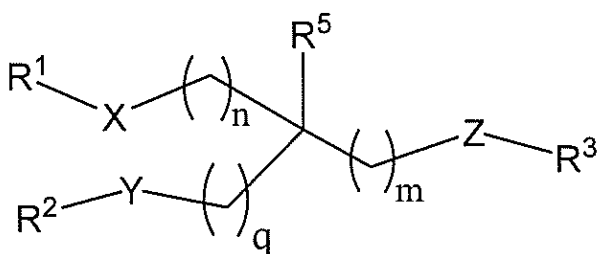
n 、 m 、および q の各々が独立に、0、1、2、3、4、または5である、
アミノ脂質またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物である。

【0007】

【0005】一態様では、本明細書に開示されるのは、式(I*)：

【0008】

【化2】



式(I*)

【0009】

の構造を有し、

式中、

R^1 が、水素、 $C_3 \sim C_{30}$ アルキル、 $C_3 \sim C_{30}$ アルケニル、 $C_3 \sim C_{30}$ アルキニル、 $C_3 \sim C_{30}$ ヘテロアルキル、 $C_3 \sim C_{30}$ ヘテロアルケニル、 $C_3 \sim C_{30}$ ヘテロアルキニル、 $C_3 \sim C_{10}$ シクロアルキル、 $-C_0 \sim C_{10}$ アルキレン- $L-R^6$ 、または $-C_2 \sim C_{10}$ アルケニレン- $L-R^6$ であり、アルキル、アルキレン、アルケニル、アルケニレン、アルキニル、ヘテロアルキル、ヘテロアルケニル、ヘテロアルキニル、およびシクロアルキルの各々が独立に置換されているか、または非置換であり、

R^2 が、水素、 $C_3 \sim C_{30}$ アルキル、 $C_3 \sim C_{30}$ アルケニル、 $C_3 \sim C_{30}$ アルキニル、 $C_3 \sim C_{30}$ ヘテロアルキル、 $C_3 \sim C_{30}$ ヘテロアルケニル、 $C_3 \sim C_{30}$ ヘテロアルキニル、 $C_3 \sim C_{10}$ シクロアルキル、 $-C_0 \sim C_{10}$ アルキレン- $L-R^6$ 、または $-C_2 \sim C_{10}$ アルケニレン- $L-R^6$ であり、アルキル、アルキレン、アルケニル、アルケニレン、アルキニル、ヘテロアルキル、ヘテロアルケニル、ヘテロアルキニル、およびシクロアルキルの各々が独立に置換されているか、または非置換であり、

X 、 Y 、および Z の各々が独立に、 $-C(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=O)-$ 、 $-C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)-$ 、 $-OC(=O)O-$ 、 $-NR^4C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=NR^4)NR^4-$ 、 $-C(=S)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=S)-$ 、 $-C(=S)O-$ 、 $-OC(=S)-$ 、 $OC(=S)O-$ 、 $-NR^4C(=S)O-$ 、 $-OC(=S)NR^4-$ 、 $-NR^4C($

$=S) NR^4-$ 、 $-C(=O)S-$ 、 $-SC(=O)-$ 、 $-OC(=O)S-$ 、 $-NR^4C(=O)S-$ 、 $-SC(=O)NR^4-$ 、 $-C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)-$ 、 $-SC(=S)O-$ 、 $-NR^4C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)NR^4-$ 、 $-C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)-$ 、 $-SC(=O)S-$ 、 $-SC(=S)S-$ 、 $-NR^4C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)NR^4-$ 、 $-R^{11}C(=O)N(R^4)R^9-$ 、 $-NR^7C(=O)R^9-$ 、 $-C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)-$ 、 $-R^{11}C(=O)OR^9-$ 、 $-R^{11}OC(=O)R^9-$ 、 $-R^{11}OC(=O)OR^9-$ 、 $-R^{11}N(R^4)C(=O)OR^9-$ 、 $-R^{11}OC(=O)N(R^4)R^9-$ 、 $-R^{11}(NR^4)C(=O)N(R^4)R^9-$ 、 $-R^{11}N(R^4)C(=NR^4)R^9-$ 、 $-R^{11}C(=S)N(R^4)R^9-$ 、 $-R^{11}N(R^4)C(=S)R^9-$ 、 $-R^{11}C(=S)OR^9-$ 、 $-R^{11}OC(=S)R^9-$ 、 $-R^{11}OC(=S)OR^9-$ 、 $-R^{11}N(R^4)C(=S)OR^9-$ 、 $-R^{11}OC(=S)N(R^4)R^9-$ 、 $-R^{11}N(R^4)C(=S)N(R^4)R^9-$ 、 $-R^{11}C(=O)SR^9-$ 、 $-R^{11}SC(=O)R^9-$ 、 $-R^{11}OC(=O)SR^9-$ 、 $-R^{11}N(R^4)C(=O)SR^9-$ 、 $-R^{11}SC(=O)N(R^4)R^9-$ 、 $-R^{11}C(=S)SR^9-$ 、 $-R^{11}SC(=S)R^9-$ 、 $-R^{11}SC(=S)OR^9-$ 、 $-R^{11}N(R^4)C(=S)SR^9-$ 、 $-R^{11}SC(=S)N(R^4)R^9-$ 、 $-R^{11}C(=S)SR^9-$ 、 $-R^{11}SC(=S)R^9-$ 、 $-R^{11}SC(=O)SR^9-$ 、 $-R^{11}SC(=S)SR^9-$ 、 $-R^{11}N(R^4)C(=S)SR^9-$ 、 $-R^{11}SC(=S)N(R^4)R^9-$ 、 $-R^{11}OR^9-$ 、 $-R^{11}SR^9-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、または結合であり、

L の各々が独立に、 $-C(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=O)-$ 、 $-C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)-$ 、 $-C(=O)-$ 、 $-OC(=O)O-$ 、 $-NR^4C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=NR^4)NR^4-$ 、 $-C(=S)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=S)-$ 、 $-C(=S)O-$ 、 $-OC(=S)-$ 、 $OC(=S)O-$ 、 $-NR^4C(=S)O-$ 、 $-OC(=S)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=S)NR^4-$ 、 $-C(=O)S-$ 、 $-SC(=O)-$ 、 $-OC(=O)S-$ 、 $-NR^4C(=O)S-$ 、 $-SC(=O)NR^4-$ 、 $-C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)-$ 、 $-SC(=S)O-$ 、 $-NR^4C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)NR^4-$ 、 $-C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)-$ 、 $-SC(=O)S-$ 、 $-SC(=S)S-$ 、 $-NR^4C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)NR^4-$ 、 $-O-N=CR^4-$ 、 $-CR^4=N-O-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-R^{11}C(=O)N(R^4)R^9-$ 、 $-R^{11}N(R^4)C(=O)R^9-$ 、 $-R^{11}C(=O)OR^9-$ 、 $-R^{11}OC(=O)R^9-$ 、 $-R^{11}OC(=O)OR^9-$ 、 $-R^{11}N(R^4)C(=O)OR^9-$ 、 $-R^{11}OC(=O)N(R^4)R^9-$ 、 $-R^{11}N(R^4)C(=O)N(R^4)R^9-$ 、 $-R^{11}N(R^4)C(=NR^4)N(R^4)R^9-$ 、 $-R^{11}C(=S)N(R^4)R^9-$ 、 $-R^{11}N(R^4)C(=S)R^9-$ 、 $-R^{11}C(=S)OR^9-$ 、 $-R^{11}OC(=S)R^9-$ 、 $-R^{11}OC(=S)OR^9-$ 、 $-R^{11}N(R^4)C(=S)OR^9-$ 、 $-R^{11}OC(=S)N(R^4)R^9-$ 、 $-R^{11}N(R^4)C(=S)N(R^4)R^9-$ 、 $-R^{11}C(=O)SR^9-$ 、 $-R^{11}SC(=O)R^9-$ 、 $-R^{11}OC(=O)SR^9-$ 、 $-R^{11}N(R^4)C(=O)SR^9-$ 、 $-R^{11}SC(=O)N(R^4)R^9-$ 、 $-R^{11}C(=S)SR^9-$ 、 $-R^{11}SC(=S)R^9-$ 、 $-R^{11}SC(=S)OR^9-$ 、 $-R^{11}N(R^4)C(=S)SR^9-$ 、 $-R^{11}SC(=S)N(R^4)R^9-$ 、 $-R^{11}C(=S)SR^9-$ 、 $-R^{11}SC(=S)SR^9-$ 、 $-R^{11}N(R^4)C(=S)SR^9-$ 、 $-R^{11}SC(=S)N(R^4)R^9-$ 、 $-R^{11}O-N=CR^9-$ 、 $-R^{11}C(R^{10})=N-OR^9-$ 、 $-R^{11}OR^9-$ 、 $-R^{11}SR^9-$ 、 $-C_1\sim C_{10}$ アルキレン- $C(=O)O-$ 、 $-C_1\sim C_{10}$ アルキレン- $OC(=O)-$ 、 $-C_1\sim C_{10}$ アルキレン- $O-$ 、 $-C_1\sim C_{10}$ アルキレン- $C(=O)O-$ 、 $-C_1\sim C_{10}$ アルキレン- $OC(=O)-$ 、または結合であり、アルキレンが置換されているか、または非置換であり、

R^3 が、 $-C_0\sim C_{10}$ アルキレン- NR^7R^8 、 $-C_0\sim C_{10}$ アルキレン-ヘテロシ

クロアルキル、または $-C_0 \sim C_{10}$ アルキレン-ヘテロシクロアリールであり、アルキレン、ヘテロシクロアルキル、およびヘテロシクロアリールが独立に、置換されているか、または非置換であり、

R^4 の各々が独立に水素、置換もしくは非置換の $C_1 \sim C_{16}$ アルキルまたは置換もしくは非置換の $C_1 \sim C_{16}$ ヘテロアルキルであり、

R^5 が、水素、置換もしくは非置換の $-C_0 \sim C_{10}$ アルキレン- $L-R^4$ であり、

R^6 の各々が独立に、水素、 $C_3 \sim C_{30}$ アルキル、 $C_3 \sim C_{30}$ アルケニル、 $C_3 \sim C_{30}$ アルキニル、 $C_y - C_3 \sim 30$ アルキル、 $C_y - C_3 \sim 30$ アルケニル、または $C_y - C_3 \sim 30$ アルキニルであり、アルキル、アルケニル、およびアルキニルがそれぞれ独立に、置換されているか、または非置換であり、

C_y の各々が、置換もしくは非置換のシクロアルキル、置換もしくは非置換のヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換のアリール、または置換もしくは非置換のヘテロアリールであり、

R^7 および R^8 の各々が独立に、水素または置換もしくは非置換の $C_1 \sim C_{16}$ アルキル、置換もしくは非置換の $C_1 \sim C_{16}$ ヘテロアルキルであるか、または R^7 および R^8 が、それらが結合している窒素と一緒にあって置換もしくは非置換の $C_2 \sim C_6$ ヘテロシクリルを形成し、

R^9 の各々が独立に、水素または置換もしくは非置換の $C_1 \sim C_{16}$ アルキレンまたは置換もしくは非置換の $C_1 \sim C_{16}$ ヘテロアルキレンであり、

R^{10} の各々が独立に、水素または置換もしくは非置換の $C_1 \sim C_{16}$ アルキレンまたは非置換の $C_1 \sim C_{16}$ ヘテロアルキレンであり、 R^{11} の各々が独立に、置換もしくは非置換の $C_1 \sim C_{16}$ アルキレンまたは非置換の $C_1 \sim C_{16}$ ヘテロアルキレンであり、

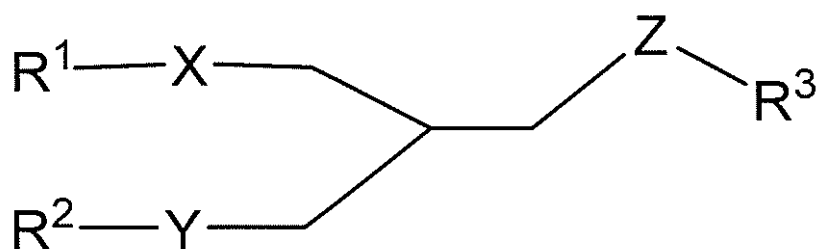
n 、 m 、および q の各々が独立に、0、1、2、3、4、または5である、
アミノ脂質またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物である。

【0010】

【0006】いくつかの実施形態では、式(I)または(I*)のアミノ脂質が、式(Ia)：

【0011】

【化3】



式(Ia)

【0012】

の構造、またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物を有し、
式中、

R^1 および R^2 の各々が独立に、 $C_3 \sim C_{30}$ アルキル、 $C_3 \sim C_{30}$ アルケニル、 $C_3 \sim C_{30}$ アルキニル、 $C_3 \sim C_{30}$ ヘテロアルキル、 $C_3 \sim C_{30}$ ヘテロアルケニル、 $C_3 \sim C_{30}$ ヘテロアルキニル、 $C_3 \sim C_{10}$ シクロアルキル、 $-C_0 \sim C_{10}$ アルキレン- $L-R^6$ 、または $-C_2 \sim C_{10}$ アルケニレン- $L-R^6$ であり、アルキル、アルキレン、アルケニル、アルケニレン、アルキニル、ヘテロアルキル、ヘテロアルケニル、ヘテロアルキニル、およびシクロアルキルの各々が独立に置換されているか、または非置換であり、

X、Y、およびZの各々が独立に、 $C(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=O)-$ 、 $-C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)-$ 、 $-OC(=O)O-$ 、 $-NR^4C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=NR^4)NR^4-$ 、 $-C(=S)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=S)-$ 、 $-C(=S)O-$ 、 $-OC(=S)-$ 、 $OC(=S)O-$ 、 $-NR^4C(=S)O-$ 、 $-OC(=S)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=S)NR^4-$ 、 $-C(=O)S-$ 、 $-SC(=O)-$ 、 $-OC(=O)S-$ 、 $-NR^4C(=O)S-$ 、 $-SC(=O)NR^4-$ 、 $-C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)-$ 、 $-SC(=S)O-$ 、 $-NR^4C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)NR^4-$ 、 $-C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)-$ 、 $-SC(=O)S-$ 、 $-SC(=S)S-$ 、 $-NR^4C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)NR^4-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-C_1 \sim C_{10}$ アルキレン- $O-$ 、または結合であり、アルキレンが置換されているか、または非置換であり、

10

Lの各々が独立に、 $-C(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=O)-$ 、 $-C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)-$ 、 $-OC(=O)O-$ 、 $-NR^4C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=NR^4)NR^4-$ 、 $-C(=S)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=S)-$ 、 $-C(=S)O-$ 、 $-OC(=S)-$ 、 $OC(=S)O-$ 、 $-NR^4C(=S)O-$ 、 $-OC(=S)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=S)NR^4-$ 、 $-C(=O)S-$ 、 $-SC(=O)-$ 、 $-OC(=O)S-$ 、 $-NR^4C(=O)S-$ 、 $-SC(=O)NR^4-$ 、 $-C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)-$ 、 $-SC(=S)O-$ 、 $-NR^4C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)NR^4-$ 、 $-C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)-$ 、 $-SC(=O)S-$ 、 $-SC(=S)S-$ 、 $-NR^4C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)NR^4-$ 、 $-O-N=CR^4-$ 、 $-CR^4=N-O-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-C_1 \sim C_{10}$ アルキレン- $O-$ 、 $-C_1 \sim C_{10}$ アルキレン- $C(=O)O-$ 、 $-C_1 \sim C_{10}$ アルキレン- $OC(=O)-$ 、または結合であり、アルキレンが置換されているか、または非置換であり、

20

R^3 が、 $-C_0 \sim C_{10}$ アルキレン- NR^7R^8 または $-C_0 \sim C_{10}$ アルキレン-ヘテロシクロアルキルであり、アルキレンおよびヘテロシクロアルキルがそれぞれ独立に、置換されているか、または非置換であり、

R^4 の各々が独立に、水素または置換もしくは非置換の $C_1 \sim C_6$ アルキルであり、

R^6 の各々が独立に、 $C_3 \sim C_{30}$ アルキル、 $C_3 \sim C_{30}$ アルケニル、 $C_3 \sim C_{30}$ アルキニル、 $C_y - C_3 \sim C_{30}$ アルキル、 $C_y - C_3 \sim C_{30}$ アルケニル、または $C_y - C_3 \sim C_{30}$ アルキニルであり、アルキル、アルケニル、およびアルキニルがそれぞれ独立に、置換されているか、または非置換であり、

30

C_y の各々が、置換もしくは非置換のシクロアルキル、置換もしくは非置換のヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換のアリール、置換もしくは非置換のヘテロアリールであり、

R^7 および R^8 の各々が独立に、水素または置換もしくは非置換の $C_1 \sim C_6$ アルキルであるか、または R^7 および R^8 が、それらが結合している窒素と一緒にあって、置換もしくは非置換の $C_2 \sim C_6$ ヘテロシクリルを形成する。

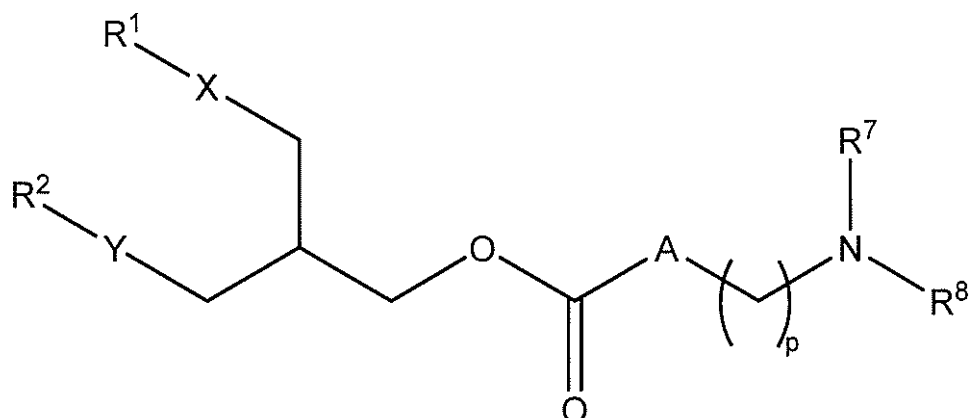
【0013】

【0007】別の態様では、本明細書に開示されるのは、式(Ib)：

40

【0014】

【化 4】



式(b)

10

【0015】

の構造を有し、
式中、

X および Y の各々が同一であり、 $-\text{OC}(=\text{O})-$ 、 $-\text{OC}(=\text{O})\text{O}-$ 、 $-\text{OC}(=\text{O})\text{NR}^4-$ 、 $-\text{C}(=\text{S})\text{O}-$ 、 $-\text{OC}(=\text{S})-$ 、 $\text{OC}(=\text{S})\text{O}-$ 、 $-\text{NR}^4\text{C}(=\text{S})\text{O}-$ 、 $-\text{OC}(=\text{S})\text{NR}^4-$ 、 $\text{SC}(=\text{O})-$ 、 $-\text{OC}(=\text{O})\text{S}-$ 、 $-\text{SC}(=\text{S})\text{O}-$ 、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{C}_1\sim\text{C}_{10}$ アルキレン $-\text{O}-$ 、および結合からなる群から選択され、アルキレンが置換されているか、または非置換であり、

20

R^1 および R^2 が、同一であり、水素、 $\text{C}_1\sim\text{C}_{30}$ アルキル、 $\text{C}_1\sim\text{C}_{30}$ ヘテロアルキル、および $\text{C}_y\sim\text{C}_{30}$ アルキルからなる群から選択され、アルキルおよびヘテロアルキルがそれぞれ独立に、置換されているか、または非置換であり、

R^4 の各々が独立に、水素または置換もしくは非置換の $\text{C}_1\sim\text{C}_6$ アルキルであり、

C_y の各々が、置換もしくは非置換のシクロアルキル、置換もしくは非置換のヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換のアリール、または置換もしくは非置換のヘテロアリールであり、

30

R^7 および R^8 の各々が独立に、水素または置換もしくは非置換の $\text{C}_1\sim\text{C}_6$ アルキルであるか、または R^7 および R^8 が、それらが結合している窒素と一緒に、置換もしくは非置換の $\text{C}_2\sim\text{C}_6$ ヘテロシクリルを形成し、

A が、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{S}-$ 、または $-\text{NR}^{12}-$ であり、

R^{12} が、水素、 $\text{C}_1\sim\text{C}_{10}$ アルキル、または $\text{C}_1\sim\text{C}_{10}$ ヘテロアルキルであり、アルキルおよびヘテロアルキルがそれぞれ独立に、置換されているか、または非置換であり、

C_y が、置換もしくは非置換のシクロアルキル、置換もしくは非置換のヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換のアリール、または置換もしくは非置換のヘテロアリールであり、

40

p が、1、2、3、4、5、または6である、

アミノ脂質またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物である。

【0016】

【0008】いくつかの実施形態では、 R^6 が独立に、 $\text{C}_3\sim\text{C}_{30}$ アルキル、 $\text{C}_3\sim\text{C}_{30}$ アルケニル、 $\text{C}_3\sim\text{C}_{30}$ アルキニル、 $\text{C}_y\sim\text{C}_{30}$ アルキル、 $\text{C}_y\sim\text{C}_{30}$ アルケニル、または $\text{C}_y\sim\text{C}_{30}$ アルキニルであり、アルキル、アルケニル、およびアルキニルがそれぞれ独立に、置換されているか、または非置換である。

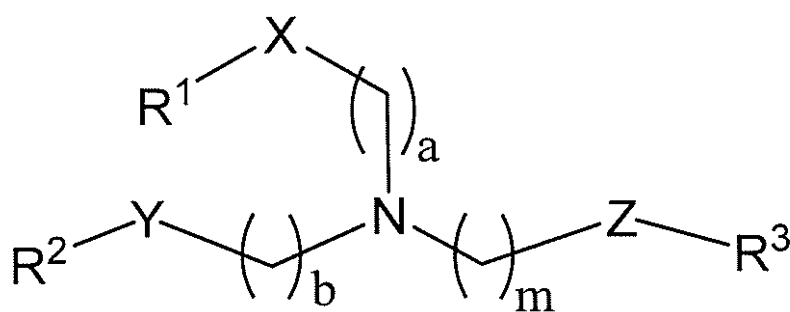
【0017】

【0009】一態様では、本明細書に開示されるのは、式 (I I) :

50

【 0 0 1 8 】

【 化 5 】



式(II)

10

【 0 0 1 9 】

の構造を有し、

式中、

R^1 および R^2 の各々が独立に、 $C_3 \sim C_{30}$ アルキル、 $C_3 \sim C_{30}$ アルケニル、 $C_3 \sim C_{30}$ アルキニル、 $C_3 \sim C_{30}$ ヘテロアルキル、 $C_3 \sim C_{30}$ ヘテロアルケニル、 $C_3 \sim C_{30}$ ヘテロアルキニル、 $C_3 \sim C_{10}$ シクロアルキル、 $-C_0 \sim C_{10}$ アルキレン-L- R^6 、または $-C_1 \sim C_{10}$ アルケニレン-L- R^6 であり、アルキル、アルキレン、アルケニル、アルケニレン、アルキニル、ヘテロアルキル、ヘテロアルケニル、ヘテロアルキニル、およびシクロアルキルの各々が独立に置換されているか、または非置換であり、

20

X、Y、およびZの各々が独立に、 $-C(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=O)-$ 、 $-C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)-$ 、 $-OC(=O)O-$ 、 $-NR^4C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=NR^4)NR^4-$ 、 $-C(=S)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=S)-$ 、 $-C(=S)O-$ 、 $-OC(=S)-$ 、 $OC(=S)O-$ 、 $-NR^4C(=S)O-$ 、 $-OC(=S)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=S)NR^4-$ 、 $-C(=O)S-$ 、 $-SC(=O)-$ 、 $-OC(=O)S-$ 、 $-NR^4C(=O)S-$ 、 $-SC(=O)NR^4-$ 、 $-C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)-$ 、 $-SC(=S)O-$ 、 $-NR^4C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)NR^4-$ 、 $-C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)-$ 、 $-SC(=O)S-$ 、 $-SC(=S)S-$ 、 $-NR^4C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)NR^4-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、または結合であり、

30

Lの各々が独立に、 $-C(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=O)-$ 、 $-C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)-$ 、 $-OC(=O)O-$ 、 $-NR^4C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=NR^4)NR^4-$ 、 $-C(=S)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=S)-$ 、 $-C(=S)O-$ 、 $-OC(=S)-$ 、 $OC(=S)O-$ 、 $-NR^4C(=S)O-$ 、 $-OC(=S)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=S)NR^4-$ 、 $-C(=O)S-$ 、 $-SC(=O)-$ 、 $-OC(=O)S-$ 、 $-NR^4C(=O)S-$ 、 $-SC(=O)NR^4-$ 、 $-C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)-$ 、 $-SC(=S)O-$ 、 $-NR^4C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)NR^4-$ 、 $-C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)-$ 、 $-SC(=O)S-$ 、 $-SC(=S)S-$ 、 $-NR^4C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)NR^4-$ 、 $-O-N=CR^4-$ 、 $-CR^4=N-O-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-C_1 \sim C_{10}$ アルキレン-O-、 $-C_1 \sim C_{10}$ アルキレン-C(=O)O-、 $-C_1 \sim C_{10}$ アルキレン-OC(=O)-、または結合であり、アルキレンが置換されているか、または非置換であり、

40

R^3 が、 $-C_0 \sim C_{10}$ アルキレン- NR^7R^8 、 $-C_0 \sim C_{10}$ アルキレン-ヘテロシクロアルキル、または $-C_0 \sim C_{10}$ アルキレン-ヘテロシクロアリールであり、アルキ

50

レン、ヘテロシクロアルキル、およびヘテロシクロアリールが独立に、置換されているか、または非置換であり、

R^4 の各々が独立に、水素または置換もしくは非置換の $C_1 \sim C_6$ アルキルであり、

R^6 の各々が独立に、 $C_3 \sim C_{30}$ アルキル、 $C_3 \sim C_{30}$ アルケニル、 $C_3 \sim C_{30}$ アルキニル、 $C_y - C_3 \sim C_{30}$ アルキル、 $C_y - C_3 \sim C_{30}$ アルケニル、または $C_y - C_3 \sim C_{30}$ アルキニルであり、アルキル、アルケニル、およびアルキニルがそれぞれ独立に、置換されているか、または非置換であり、

C_y の各々が、置換もしくは非置換のシクロアルキル、置換もしくは非置換のヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換のアリール、または置換もしくは非置換のヘテロアリールであり、

10

R^7 および R^8 の各々が独立に、水素または置換もしくは非置換の $C_1 \sim C_6$ アルキルであるか、または R^7 および R^8 が、それらが結合している窒素と一緒にあって、置換もしくは非置換の $C_2 \sim C_6$ ヘテロシクリルを形成し、

a および b の各々が独立に、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10であり、
 m が、0、1、2、3、4、または5である。

アミノ脂質またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物である。

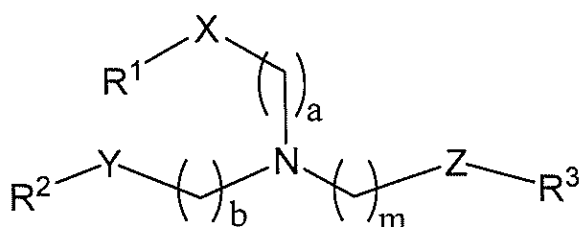
【0020】

【0010】一態様では、本明細書に開示されるのは、式 (II*) :

【0021】

20

【化6】



式(II*)

30

【0022】

の構造を有し、

式中、

R^1 および R^2 の各々が独立に、水素、 $C_3 \sim C_{30}$ アルキル、 $C_3 \sim C_{30}$ アルケニル、 $C_3 \sim C_{30}$ アルキニル、 $C_3 \sim C_{30}$ ヘテロアルキル、 $C_3 \sim C_{30}$ ヘテロアルケニル、 $C_3 \sim C_{30}$ ヘテロアルキニル、 $C_3 \sim C_{10}$ シクロアルキル、 $-C_0 \sim C_{10}$ アルキレン- $L-R^6$ 、または $-C_1 \sim C_{10}$ アルケニレン- $L-R^6$ であり、アルキル、アルキレン、アルケニル、アルケニレン、アルキニル、ヘテロアルキル、ヘテロアルケニル、ヘテロアルキニル、およびシクロアルキルの各々が独立に置換されているか、または非置換であり、

40

X 、 Y 、および Z の各々が独立に、 $-C(=O)NR^4-$ 、 $-C(=O)NR^4-$ 、 $-C(=O)-$ 、 $-NR^4C(=O)-$ 、 $-C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)-$ 、 $-OC(=O)O-$ 、 $-NR^4C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=NR^4)NR^4-$ 、 $-C(=S)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=S)-$ 、 $-C(=S)O-$ 、 $-OC(=S)-$ 、 $OC(=S)O-$ 、 $-NR^4C(=S)O-$ 、 $-OC(=S)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=S)NR^4-$ 、 $-C(=O)S-$ 、 $-SC(=O)-$ 、 $-OC(=O)S-$ 、 $-NR^4C(=O)S-$ 、 $-SC(=O)NR^4-$ 、 $-C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)-$ 、 $-SC(=S)O-$ 、 $-NR^4C(=S)S-$ 、 $-$

50

S C (=S) N R⁴ -, - C (=S) S -, - S C (=S) -, - S C (=O) S -, - S C (=S) S -, - N R⁴ C (=S) S -, - S C (=S) N R⁴ -, - O -, - S -, または結合であり、

L の各々が独立に、- C (=O) N R⁴ -, - N R⁴ C (=O) -, - C (=O) O -, - O C (=O) -, - O C (=O) O -, - N R⁴ C (=O) O -, - O C (=O) N R⁴ -, - N R⁴ C (=O) N R⁴ -, - N R⁴ C (=N R⁴) N R⁴ -, - C (=S) N R⁴ -, - N R⁴ C (=S) -, - C (=S) O -, - O C (=S) -, O C (=S) O -, - N R⁴ C (=S) O -, - O C (=S) N R⁴ -, - N R⁴ C (=S) N R⁴ -, - C (=O) S -, - S C (=O) -, - O C (=O) S -, - N R⁴ C (=O) S -, - S C (=O) N R⁴ -, - C (=S) S -, - S C (=S) -, - S C (=S) O -, - N R⁴ C (=S) S -, - S C (=S) N R⁴ -, - C (=S) S -, - S C (=S) -, - S C (=O) S -, - S C (=S) S -, - N R⁴ C (=S) S -, - S C (=S) N R⁴ -, - O - N = C R⁴ -, - C R⁴ = N - O -, - O -, - S -, - C₁ ~ C₁₀ アルキレン - O -, - C₁ ~ C₁₀ アルキレン - C (=O) O -, - C₁ ~ C₁₀ アルキレン - O C (=O) -, または結合であり、アルキレンが置換されているか、または非置換であり、

10

R³ が、水素、- C₁ ~ C₆ アルキル、- C₀ ~ C₁₀ アルキレン - N R⁷ R⁸、- C₀ ~ C₁₀ アルキレン - ヘテロシクロアルキル、または - C₀ ~ C₁₀ アルキレン - ヘテロシクロアリールであり、アルキル、アルキレン、ヘテロシクロアルキル、およびヘテロシクロアリールが独立に、置換されているか、または非置換であり、

20

R⁴ の各々が独立に、水素または置換もしくは非置換の C₁ ~ C₆ アルキルであり、

R⁶ の各々が独立に、C₃ ~ C₃₀ アルキル、C₃ ~ C₃₀ アルケニル、C₃ ~ C₃₀ アルキニル、C_y - C₃ ~ C₃₀ アルキル、C_y - C₃ ~ C₃₀ アルケニル、または C_y - C₃ ~ C₃₀ アルキニルであり、アルキル、アルケニル、およびアルキニルがそれぞれ独立に、置換されているか、または非置換であり、

C_y の各々が、置換もしくは非置換のシクロアルキル、置換もしくは非置換のヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換のアリール、または置換もしくは非置換のヘテロアリールであり、

R⁷ および R⁸ の各々が独立に、水素または置換もしくは非置換の C₁ ~ C₆ アルキルであるか、または R⁷ および R⁸ が、それらが結合している窒素と一緒にあって、置換もしくは非置換の C₂ ~ C₆ ヘテロシクリルを形成し、

30

a および b の各々が独立に、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または 10 であり、

m が、0、1、2、3、4、または 5 である、

アミノ脂質またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物である。

【0023】

【0011】一態様では、本明細書に開示されるのは、本明細書に記載のアミノ脂質またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物を含むナノ粒子組成物である。一態様では、本明細書に開示されるのは、表 1 A から選択される構造を有するアミノ脂質またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物である。一態様では、本明細書に開示されるのは、表 1 A から選択される構造を有するアミノ脂質またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物を含むナノ粒子組成物である。いくつかの実施形態では、前記アミノ脂質またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物が、前記ナノ粒子組成物中に存在する総脂質含有量の 20 mol % ~ 80 mol % を構成する。いくつかの実施形態では、前記アミノ脂質またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物が、前記ナノ粒子組成物中に存在する総脂質含有量の 40 mol % ~ 60 mol % を構成する。いくつかの実施形態では、前記アミノ脂質またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物が、前記ナノ粒子組成物中に存在する総脂質含有量の 50 mol % ~ 60 mol % を構成する。いくつかの実施形態では、前記アミノ脂質またはその塩もしくは溶媒和物が、1 つまたは複数のイオン化可能な窒素原子を含む。いくつかの実施形態では、ナノ粒子組成物が、1 つまたは複数の

40

50

アミノ脂質に由来する1つまたは複数のイオン化可能な窒素原子を含む。いくつかの実施形態では、前記ナノ粒子組成物が、1つのアミノ脂質またはその塩もしくは溶媒和物のみを含む。いくつかの実施形態では、前記ナノ粒子組成物が、1つまたは複数の核酸分子実体を含む。いくつかの実施形態では、前記核酸分子実体に存在するリン酸基に対する前記イオン化可能な窒素原子のモル比（Pに対するNの比またはN/P比）が、約2～約20である。いくつかの実施形態では、前記N/P比が、約2～約15、約2～約10、約2～約8、約2～約6、約3～約15、約3～約10、約3～約8、約3～6、約4～約15、約4～約10、約4～約8、または約4～約6である。いくつかの実施形態では、前記N/P比が約3.5～約10ある。いくつかの実施形態では、前記ナノ粒子組成物が中性脂質を含む。いくつかの実施形態では、前記中性脂質が、前記ナノ粒子組成物中に存在する総脂質含有量の約1mol%～約20mol%を構成する。いくつかの実施形態では、前記中性脂質が、前記ナノ粒子組成物中に存在する総脂質含有量の約2mol%～約25mol%を構成する。いくつかの実施形態では、前記中性脂質が、前記ナノ粒子組成物中に存在する総脂質含有量の約5mol%～約10mol%を構成する。いくつかの実施形態では、前記中性脂質が、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DSPC)、1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DPPC)、1,2-ジミリストイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DMPC)、2-オレオイル-1-パルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(POPC)、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン(DOPE)、およびスフィンゴミエリンから選択される。いくつかの実施形態では、前記中性脂質がDSPCである。いくつかの実施形態では、前記ナノ粒子組成物が構造脂質を含む。いくつかの実施形態では、前記構造脂質が、ステロールまたはその誘導体である。いくつかの実施形態では、前記ステロールまたは前記その誘導体が、コレステロールまたはコレステロール誘導体である。いくつかの実施形態では、前記構造脂質が、前記ナノ粒子組成物中に存在する総脂質含有量の約15mol%～約65mol%を構成する。いくつかの実施形態では、前記構造脂質が、前記ナノ粒子組成物中に存在する総脂質含有量の約30mol%～約60mol%を構成する。いくつかの実施形態では、前記構造脂質が、前記ナノ粒子組成物中に存在する総脂質含有量の約30mol%～約40mol%を構成する。いくつかの実施形態では、前記ナノ粒子組成物がPEG-脂質を含む。いくつかの実施形態では、前記PEG-脂質が、表2のPEG-脂質である。いくつかの実施形態では、前記PEG-脂質が、前記ナノ粒子組成物中に存在する総脂質含有量の約0.1mol%～約6mol%を含む。いくつかの実施形態では、前記PEG-脂質が、前記ナノ粒子組成物中に存在する総脂質含有量の約2.0mol%～約2.5mol%を含む。いくつかの実施形態では、前記PEG-脂質の数平均分子量が約200Da～約5000Daである。いくつかの実施形態では、前記1つまたは複数の核酸分子実体が、目的の病原遺伝子をターゲティングするガイドRNA(gRNA)を含む。いくつかの実施形態では、ガイドRNAが、シングルガイドRNA(sgRNA)である。いくつかの実施形態では、目的の病原遺伝子が肝細胞で生成される。いくつかの実施形態では、前記1つまたは複数の核酸分子実体が、SpCas9、CBE、および／またはABEタンパク質をコードするmRNAを含む。いくつかの実施形態では、組成物が核酸安定化剤を含む。

10

20

30

40

【0024】

【0012】一態様では、本明細書に開示されるのは、(a) 1つまたは複数の核酸分子実体と、(b) 本明細書に記載のアミノ脂質またはその塩もしくは溶媒和物であって、前記アミノ脂質またはその塩が、前記ナノ粒子組成物中に存在する総脂質含有量の20mol%～80mol%を構成し、前記アミノ脂質またはその塩が、1つまたは複数のイオン化可能な窒素原子を含み、前記核酸分子実体内に存在するリン酸基に対する、前記イオン化可能な窒素原子のモル比が、2～12である、アミノ脂質またはその塩もしくは溶媒和物と、(c) 前記ナノ粒子組成物中に存在する前記総脂質含有量の2mol%～25mol%を構成する中性脂質と、(d) 前記ナノ粒子組成物中に存在する前記総脂質含有量の30mol%～60mol%を構成する構造脂質と、(e) 前記ナノ粒子組成物中に存在す

50

る前記総脂質含有量の $0.1\text{mol}\%$ ～ $6\text{mol}\%$ を構成するPEG-脂質とを含むナノ粒子組成物である。いくつかの実施形態では、組成物が核酸安定化剤をさらに含む。いくつかの実施形態では、核酸安定化剤が、ポリエチレングリコール、臭化セトリモニウム、またはキトサンを含む。いくつかの実施形態では、核酸安定化剤が、約 $120\sim 2000\text{Da}$ の数平均分子量を有するポリエチレングリコールを含む。

【0025】

【0013】一態様では、本明細書に開示されるのは、(a) 1つまたは複数の核酸分子実体と、(b) アミノ脂質またはその塩であって、前記アミノ脂質またはその塩が、前記ナノ粒子組成物中に存在する総脂質含有量の $20\text{mol}\%$ ～ $80\text{mol}\%$ を構成し、前記アミノ脂質またはその塩が、1つまたは複数のイオン化可能な窒素原子を含み、前記核酸分子実体内に存在するリン酸基に対する、前記イオン化可能な窒素原子のモル比が、 $2\sim 12$ である、アミノ脂質またはその塩と、(c) 前記ナノ粒子組成物中に存在する前記総脂質含有量の $2\text{mol}\%$ ～ $25\text{mol}\%$ を構成する中性脂質と、(d) 前記ナノ粒子組成物中に存在する前記総脂質含有量の $30\text{mol}\%$ ～ $60\text{mol}\%$ を構成する構造脂質と、(e) 前記ナノ粒子組成物中に存在する前記総脂質含有量の $0.1\text{mol}\%$ ～ $6\text{mol}\%$ を構成するPEG-脂質と、(f) 約 $120\sim 2000\text{Da}$ の数平均分子量を有する、キトサン、臭化セトリモニウム、ポリエチレングリコール、またはこれらの組合せを含む核酸安定化剤とを含むナノ粒子組成物である。いくつかの実施形態では、核酸安定化剤が、PEG200、PEG400、またはPEG600を含む。いくつかの実施形態では、核酸安定化剤がPEG400である。いくつかの実施形態では、核酸安定化剤が、ナノ粒子組成物中に、全重で約 0.01% ～約 20% の量で存在する。いくつかの実施形態では、核酸安定化剤が、全重量で約 0.5% ～約 5% の量でナノ粒子組成物中に存在する。いくつかの実施形態では、前記1つまたは複数の核酸分子実体がPCSK9 gRNAを含む。いくつかの実施形態では、前記1つまたは複数の核酸分子実体が、CasヌクレアーゼをコードするmRNAを含む。いくつかの実施形態では、前記1つまたは複数の核酸分子実体が、mRNA、gRNA、siRNA、アンチセンスオリゴヌクレオチド、マイクロRNA、抗マイクロRNA、RNA活性化因子、アプタマー、またはこれらの組合せを含む。いくつかの実施形態では、前記ナノ粒子組成物が酸化防止剤を含む。いくつかの実施形態では、前記酸化防止剤がEDTAを含む。いくつかの実施形態では、組成物が界面活性剤を含む。いくつかの実施形態では、界面活性剤が、脂肪酸または脂肪アルコールである。いくつかの実施形態では、界面活性剤が、 $C_{12}\sim C_{24}$ 脂肪アルコールである。いくつかの実施形態では、 $C_{12}\sim C_{24}$ 脂肪アルコールが、ラウリルアルコール、トリデシルアルコール、ミリスチルアルコール、ペンタデシルアルコール、セチルアルコール、パルミトレイルアルコール、ヘプタデシルアルコール、ステアリルアルコール、オレイルアルコール、ノナデシルアルコール、アラキジルアルコール、またはこれらの組合せである。いくつかの実施形態では、 $C_{12}\sim C_{24}$ 脂肪アルコールが、オレイルアルコール、ステアリルアルコール、またはその混合物である。いくつかの実施形態では、界面活性剤が、前記ナノ粒子組成物中に存在する総脂質含有量の約 $1.0\text{mol}\%$ ～約 $10\text{mol}\%$ を構成する。いくつかの実施形態では、ナノ粒子のメディアン径が、約 $50\text{nm}\sim 150\text{nm}$ である。いくつかの実施形態では、ナノ粒子の多分散指数が $0\sim 0.15$ である。いくつかの実施形態では、ナノ粒子の多分散指数が $0\sim 0.05$ である。いくつかの実施形態では、ナノ粒子組成物の核酸捕捉効率が、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% である。

【0026】

【0014】一態様では、本明細書に開示されるのは、式(III)：

【0027】

10

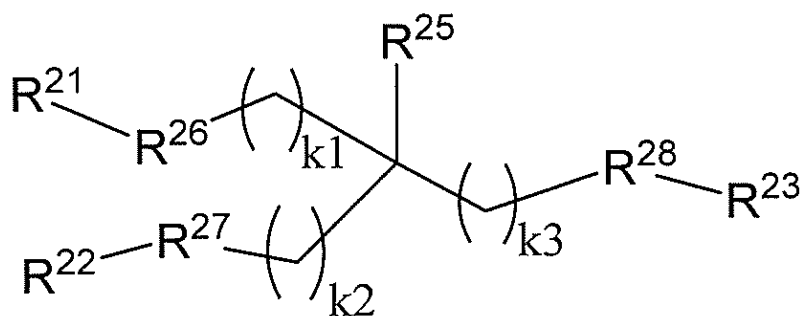
20

30

40

50

【化 7】



式(III)

10

【0028】

の構造を有し、

式中、

R²¹ および R²² の各々が独立に、置換もしくは非置換の C₃ ~ C₃₀ アルキル、置換もしくは非置換の C₃ ~ C₃₀ アルケニル、または置換もしくは非置換の C₃ ~ C₃₀ アルキニルであり、

20

R²⁶、R²⁷、および R²⁸ の各々が独立に、-C(=O)NR⁴-, -NR⁴C(=O)-, -C(=O)O-, -OC(=O)-, -OC(=O)O-, -NR⁴C(=O)O-, -OC(=O)NR⁴-, -NR⁴C(=O)NR⁴-, -NR⁴C(=NR⁴)NR⁴-, -C(=S)NR⁴-, -NR⁴C(=S)-, -C(=S)O-, -OC(=S)-, OC(=S)O-, -NR⁴C(=S)O-, -OC(=S)NR⁴-, -NR⁴C(=S)NR⁴-, -C(=O)S-, -SC(=O)-, -OC(=O)S-, -NR⁴C(=O)S-, -SC(=O)NR⁴-, -C(=S)S-, -SC(=S)-, -SC(=S)O-, -NR⁴C(=S)S-, -SC(=S)NR⁴-, -C(=S)S-, -SC(=S)-, -SC(=O)S-, -SC(=S)S-, -NR⁴C(=S)S-, -SC(=S)NR⁴-, -O(CH₂)₂C(O)O-, -O(CH₂)₂C(O)NH-, -OC(O)(CH₂)₂O-, -OC(O)(CH₂)₂NH-, -O(CH₂)₂C(O)N(CH₃)-, -O(CH₂)₂C(NH)O-, -O(CH₂)₂C(NAc)NH-, -O(CH₂)₂C(NH)N(CH₃)-, -O(CH₂)₂C(NH)NH-, -O(CH₂)₂C(NH)N(CH₃)-, -NH(CH₂)₂C(O)O-, -NH(CH₂)₂C(O)NH-, NH(CH₂)₂C(O)N(CH₃)-, -NH(CH₂)₂C(NH)O-, -NH(CH₂)₂C(NAc)NH-, -NH(CH₂)₂C(NH)N(CH₃)-, -NH(CH₂)₂C(NH)NH-, -NH(CH₂)₂C(NH)N(CH₃)-, -OC(O)(CH₂)₂N(CH₃)-, -OC(NH)(CH₂)₂O-, -OC(NMe)(CH₂)₂NH-, -O₂C(NH)(CH₂)₂N(CH₃)-, -O(CH₂)₂C(NH)NH-, -O-, -S-, または結合であり、

30

40

R⁴ の各々が独立に、水素または置換もしくは非置換の C₁ ~ C₆ アルキルであり、

R²³ が、-C₀ ~ C₁₀ アルキレン-(CH₂-CH₂-O)_{k4}-R²⁴ または -C₁ ~ C₁₀ ヘテロアルキレン-(CH₂-CH₂-O)_{k4}-R²⁴ であり、アルキレンおよびヘテロアルキレンがそれぞれ独立に、置換されているか、または非置換であり、

R²⁴ が独立に、水素または置換もしくは非置換の C₁ ~ C₃ アルキルであり、

R²⁵ が、水素または置換もしくは非置換の C₁ ~ C₆ アルキルであり、

k₁、k₂、および k₃ の各々が独立に、0、1、2、3、4、または 5 であり、

k₄ が、1 ~ 100 から選択される整数である、

PEG-脂質またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物である。

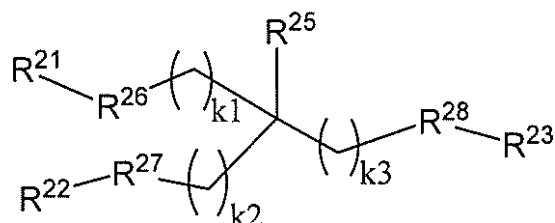
50

【 0 0 2 9 】

【 0 0 1 5 】一態様では、本明細書に開示されるのは、式 (I I I *) :

【 0 0 3 0 】

【 化 8 】



式(III*)

10

【 0 0 3 1 】

の構造を有し、

式中、

R^{21} が、水素、置換もしくは非置換の $C_1 \sim C_{30}$ アルキル、置換もしくは非置換の $C_3 \sim C_{30}$ アルケニル、または置換もしくは非置換の $C_3 \sim C_{30}$ アルキニルであり、

20

R^{22} が、水素、置換もしくは非置換の $C_1 \sim C_{30}$ アルキル、置換もしくは非置換の $C_3 \sim C_{30}$ アルケニル、または置換もしくは非置換の $C_3 \sim C_{30}$ アルキニルであり、

R^{26} 、 R^{27} 、および R^{28} の各々が独立に、 $-C(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=O)-$ 、 $-C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)-$ 、 $-OC(=O)O-$ 、 $-NR^4C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=NR^4)NR^4-$ 、 $-C(=S)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=S)-$ 、 $-C(=S)O-$ 、 $-OC(=S)-$ 、 $OC(=S)O-$ 、 $-NR^4C(=S)O-$ 、 $-OC(=S)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=S)NR^4-$ 、 $-C(=O)S-$ 、 $-SC(=O)-$ 、 $-OC(=O)S-$ 、 $-NR^4C(=O)S-$ 、 $-N(Ac)-$ 、 $-OC(O)OCH_2C(O)O-$ 、 $-OC(O)OCH_2C(O)NH-$ 、 $-OC(O)NHCH_2C(O)O-$ 、 $-OC(O)NHCH_2C(O)NH-$ 、 $-OC(O)O(CH_2)_2C(O)O-$ 、 $-OC(O)O(CH_2)_2C(O)NH-$ 、 $-OC(O)NH(CH_2)_2C(O)O-$ 、 $-OC(O)NH(CH_2)_2C(O)NH-$ 、 $-OC(O)O(CH_2)_3C(O)O-$ 、 $-OC(O)O(CH_2)_3C(O)NH-$ 、 $-OC(O)NH(CH_2)_3C(O)O-$ 、 $-OC(O)NH(CH_2)_3C(O)NH-$ 、 $-C(O)OCH_2C(O)NH-$ 、 $-C(O)NHCH_2C(O)O-$ 、 $-C(O)NHCH_2C(O)NH-$ 、 $-C(O)O(CH_2)_2C(O)O-$ 、 $-C(O)O(CH_2)_2C(O)NH-$ 、 $-C(O)NH(CH_2)_2C(O)O-$ 、 $-C(O)NH(CH_2)_2C(O)NH-$ 、 $-C(O)O(CH_2)_3C(O)O-$ 、 $-C(O)O(CH_2)_3C(O)NH-$ 、 $-C(O)NH(CH_2)_3C(O)O-$ 、 $-C(O)NH(CH_2)_3C(O)NH-$ 、 $-OC(=O)NR^4(CH_2)_{1\sim3}C(=O)NH-$ 、 $-OC(=O)NR^4(CH_2)_{1\sim3}C(=O)O-$ 、 $-C(=O)NR^4(CH_2)_{1\sim3}C(=O)NH-$ 、 $-SC(=O)NR^4-$ 、 $-C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)-$ 、 $-SC(=S)O-$ 、 $-NR^4C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)NR^4-$ 、 $-C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)-$ 、 $-SC(=O)S-$ 、 $-SC(=S)S-$ 、 $-NR^4C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)NR^4-$ 、 $-O(CH_2)_2C(O)O-$ 、 $-O(CH_2)_2C(O)NH-$ 、 $-OC(O)(CH_2)_2O-$ 、 $-OC(O)(CH_2)_2NH-$ 、 $-O(CH_2)_2C(O)N(CH_3)-$ 、 $-O(CH_2)_2C(NH)O-$ 、 $-O(CH_2)_2C(NAc)NH-$ 、 $-O(CH_2)_2C(NH)N(CH_3)-$ 、 $-O(CH_2)_2C(NH)NH-$ 、 $-O(CH_2)_2C(NH)N(CH_3)-$ 、 $-NH(CH_2)_2C(O)O-$ 、 $-NH(CH_2)_2C(O)$

30

40

50

) NH-、NH(CH₂)₂C(O)N(CH₃)-、-NH(CH₂)₂C(NH)O-、-NH(CH₂)₂C(NAc)NH-、-NH(CH₂)₂C(NH)N(CH₃)-、-NH(CH₂)₂C(NH)NH-、-NH(CH₂)₂C(NH)N(CH₃)-、-OC(O)(CH₂)₂N(CH₃)-、-OC(NH)(CH₂)₂O-、-OC(NMe)(CH₂)₂NH-、-O₂C(NH)(CH₂)N(CH₃)-、-O(CH₂)₂C(NH)NH-、-O-、-S-、または結合であり、

R⁴の各々が独立に、水素または置換もしくは非置換のC₁~C₆アルキルであり、
R^{2 3}が、-C₀~C₁₀アルキレン(CH₂-CH₂-O)_{k 4}-R^{2 4}、-C₁~C₁₀ヘテロアルキレン-(CH₂-CH₂-O)_{k 4}-R^{2 4}、-C₀~C₁₀アルキレン-(O-CH₂-CH₂)_{k 4}-R^{2 4}、または-C₀~C₁₀ヘテロアルキレン-(O-CH₂-CH₂)_{k 4}-R^{2 4}であり、アルキレンおよびヘテロアルキレンがそれぞれ独立に、置換されているか、または非置換であり、

10

R^{2 4}が独立に、水素、置換もしくは非置換のC₁~C₃アルキル、-O-R⁴、-C(=O)OH、または-C(=O)R⁴であり、

R^{2 5}が、水素または置換もしくは非置換のC₁~C₂₂アルキルであり、

k₁、k₂、およびk₃の各々が独立に、0、1、2、3、4、または5であり、

k₄が、1~100から選択される整数である、

PEG-脂質またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物である。

[00032]

[0016]いくつかの実施形態では、

20

R^{2 1}が、置換もしくは非置換のC₃~C₃₀アルキル、置換もしくは非置換のC₃~C₃₀アルケニル、または置換もしくは非置換のC₃~C₃₀アルキニルであり、

R^{2 2}が、水素、置換もしくは非置換のC₃~C₃₀アルキル、置換もしくは非置換のC₃~C₃₀アルケニル、または置換もしくは非置換のC₃~C₃₀アルキニルであり、

R^{2 6}、R^{2 7}、およびR^{2 8}の各々が独立に、-C(=O)NR⁴-、-NR⁴C(=O)-、-C(=O)O-、-OC(=O)-、-OC(=O)O-、-NR⁴C(=O)O-、-OC(=O)NR⁴-、-NR⁴C(=O)NR⁴-、-NR⁴C(=NR⁴)NR⁴-、-C(=S)NR⁴-、-NR⁴C(=S)-、-C(=S)O-、-OC(=S)-、OC(=S)O-、-NR⁴C(=S)O-、-OC(=S)NR⁴-、-NR⁴C(=S)NR⁴-、-C(=O)S-、-SC(=O)-、-OC(=O)S-、-NR⁴C(=O)S-、-OC(=O)NR⁴(CH₂)_{1~3}C(=O)NH-、-OC(=O)NR⁴(CH₂)_{1~3}C(=O)O-、-C(=O)NR⁴(CH₂)_{1~3}C(=O)NH-、-SC(=O)NR⁴-、-C(=S)S-、-SC(=S)-、-SC(=S)O-、-NR⁴C(=S)S-、-SC(=S)NR⁴-、-C(=S)S-、-SC(=S)-、-SC(=O)S-、-SC(=S)S-、-NR⁴C(=S)S-、-SC(=S)NR⁴-、-O(CH₂)₂C(O)O-、-O(CH₂)₂C(O)NH-、-OC(O)(CH₂)₂O-、-OC(O)(CH₂)₂NH-、-O(CH₂)₂C(O)N(CH₃)-、-O(CH₂)₂C(NH)O-、-O(CH₂)₂C(NAc)NH-、-O(CH₂)₂C(NH)N(CH₃)-、-O(CH₂)₂C(NH)NH-、-O(CH₂)₂C(NH)N(CH₃)-、-NH(CH₂)₂C(O)O-、-NH(CH₂)₂C(O)NH-、NH(CH₂)₂C(O)N(CH₃)-、-NH(CH₂)₂C(NH)O-、-NH(CH₂)₂C(NAc)NH-、-NH(CH₂)₂C(NH)N(CH₃)-、-NH(CH₂)₂C(NH)NH-、-NH(CH₂)₂C(NH)N(CH₃)-、-OC(O)(CH₂)₂N(CH₃)-、-OC(NH)(CH₂)₂O-、-OC(NMe)(CH₂)₂NH-、-O₂C(NH)(CH₂)N(CH₃)-、-O(CH₂)₂C(NH)NH-、-O-、-S-、または結合であり、

30

40

R⁴の各々が独立に、水素または置換もしくは非置換のC₁~C₆アルキルであり、

R^{2 3}が、-C₀~C₁₀アルキレン-(CH₂-CH₂-O)_{k 4}-R^{2 4}または-C₁~C₁₀ヘテロアルキレン-(CH₂-CH₂-O)_{k 4}-R^{2 4}であり、アルキレンお

50

よびヘテロアルキレンがそれぞれ独立に、置換されているか、または非置換であり、

R^{24} が独立に、水素、置換もしくは非置換の $C_1 \sim C_3$ アルキル、 $-O-R^4$ 、 $-C(=O)OR^4$ 、または $-C(=O)R^4$ であり、

R^{25} が、水素または置換もしくは非置換の $C_1 \sim C_6$ アルキルであり、

k_1 、 k_2 、および k_3 の各々が独立に、0、1、2、3、4、または5であり、

k_4 が、1～100から選択される整数である、

式(III)または(III*)のPEG-脂質、またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物。

【0033】

【0017】一態様では、本明細書に開示されるのは、表2から選択される構造を有するPEG-脂質またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物である。一態様では、本明細書に開示されるのは、記載のナノ粒子組成物および賦形剤または担体を含む薬学的組成物である。いくつかの実施形態では、前記薬学的組成物は、遺伝子編集因子ヌクレアーゼをコードするmRNAを含む。いくつかの実施形態では、前記薬学的組成物は、1つまたは複数のガイドRNA分子を含む。いくつかの実施形態では、前記薬学的組成物が、PCSK9ガイドRNAを含む。いくつかの実施形態では、前記薬学的組成物が、2つ以上のガイドRNA分子を含む。いくつかの実施形態では、前記2つ以上のガイドRNA分子は、2つ以上の目的の遺伝子を標的とする。いくつかの実施形態では、前記mRNAは、Cas9ヌクレアーゼをコードする。いくつかの実施形態では、前記mRNAは、塩基編集因子ヌクレアーゼをコードする。いくつかの実施形態では、前記mRNAおよび前記1つまたは複数のガイドRNA分子は、同じナノ粒子組成物中に存在する。いくつかの実施形態では、前記mRNAおよび前記1つまたは複数のガイドRNA分子は、異なるナノ粒子組成物中に存在する。いくつかの実施形態では、前記薬学的組成物中の前記mRNAに対する前記gRNA分子の比は、重量またはモルで約0.01～約100である。いくつかの実施形態では、前記薬学的組成物中の前記gRNA分子と前記mRNAの比は、重量またはモルによって、約50:1、約40:1、約30:1、約20:1、約18:1、約16:1、約14:1、約12:1、約10:1、約9:1、約8:1、約7:1、約6:1、約5:1、約4:1、約3:1、約2:1、約1:1、約1:2、約1:3、約1:4、約1:5、約1:6、約1:7、約1:8、約1:9、または約1:10である。一態様では、本明細書に記載の第1のナノ粒子組成物、および本明細書に記載の第2のナノ粒子組成物を含む薬学的組成物が、本明細書に開示される。いくつかの実施形態では、前記第1のナノ粒子組成物は、遺伝子編集因子mRNAを含み、前記第2のナノ粒子組成物は、1つまたは複数のガイドRNA分子を含む。いくつかの実施形態では、前記薬学的組成物中のガイドRNA分子とmRNAの比は、重量またはモルで、約50:1、約40:1、約30:1、約20:1、約18:1、約16:1、約14:1、約12:1、約10:1、約9:1、約8:1、約7:1、約6:1、約5:1、約4:1、約3:1、約2:1、約1:1、約1:2、約1:3、約1:4、約1:5、約1:6、約1:7、約1:8、約1:9、または約1:10である。いくつかの実施形態では、前記薬学的組成物中のmRNAに対するガイドRNA分子の比が、重量またはモルで約1:1である。

【0034】

【0018】一態様では、本明細書に開示されるのは、核酸分子実体を細胞に送達する方法であって、前記細胞を、ナノ粒子組成物または本明細書に記載の薬学的組成物と接触させるステップを含み、それによって前記核酸分子実体が前記細胞に送達される、方法である。いくつかの実施形態では、前記細胞がインビボ、エクスピボ、またはインビトロで接触する。一態様では、本明細書に開示されるのは、細胞内で目的のポリペプチドを生成する方法であって、前記細胞を、ナノ粒子組成物または本明細書に記載の薬学的組成物と接触させるステップを含み、前記ナノ粒子組成物または前記薬学的組成物が、核酸分子実体を含み、前記核酸分子実体が細胞内で翻訳され、それによって、ポリペプチドを生成する、方法である。一態様では、本明細書に開示されるのは、薬学的組成物を作製する方法であって、第1のナノ粒子組成物と、本明細書に記載の第2のナノ粒子組成物とを組み合わせ

るステップを含む方法である。一態様では、本明細書に開示されるのは、哺乳動物における疾患または状態を処置する方法であって、治療有効量の、本明細書に記載の薬学的組成物を哺乳動物に投与するステップを含む方法である。一態様では、本明細書に開示されるのは、細胞内の P C S K 9 遺伝子を編集する方法であって、前記細胞を、ナノ粒子組成物または本明細書に記載の薬学的組成物と接触させるステップを含み、前記ナノ粒子組成物または前記薬学的組成物が、P C S K 9 ガイド R N A を含む方法である。一態様では、本明細書に開示されるのは、本明細書に記載の安定したナノ粒子組成物を生成する方法であって、核酸安定化剤を、核酸安定化剤を欠くナノ粒子組成物と組み合わせるステップを含む方法である。いくつかの実施形態では、核酸安定化剤が、冷凍または保存の前にナノ粒子組成物と組み合わせられる。いくつかの実施形態では、核酸安定化剤が、1つまたは複数の核酸実体の添加の前、それと同時に、またはその後にナノ粒子組成物と組み合わせられる。いくつかの実施形態では、組み合わせるステップが、核酸安定化剤を、水性緩衝液中で1つまたは複数の核酸実体と混合するステップを含む。

10

【0035】

【0019】一態様では、本明細書に開示されるのは、安定したナノ粒子組成物を生成する方法であって、(a) 核酸安定化剤を、1つまたは複数の核酸分子実体と組み合わせ、それによって、安定化された1つまたは複数の核酸分子実体を含む溶液を生成するステップと、(b) (a) の溶液を、アミノ脂質、中性脂質、構造脂質、および P E G - 脂質のうちの1つまたは複数を含むナノ粒子組成物と組み合わせるステップとを含む方法である。いくつかの実施形態では、(a) における組み合わせるステップが、核酸安定化剤を、水性緩衝液中で1つまたは複数の核酸実体と混合するステップを含む。いくつかの実施形態では、方法が、ナノ粒子組成物を収集し、約 6.5 ~ 約 8.0 の p H を有する緩衝液に対して透析するステップを含む。いくつかの実施形態では、核酸安定化剤が、約 120 ~ 約 1000 の数平均分子量を有するポリエチレングリコールである。

20

【0036】

【0020】一態様では、本明細書に開示されるのは、脂質ナノ粒子を含む製剤を調製する方法であって、ナノ粒子が、(i) 1つまたは複数の核酸分子実体、(ii) アミノ脂質、および (iii) 構造脂質、中性脂質、および P E G - 脂質から選択される1つまたは複数の脂質を含み、方法が、(a) アミノ脂質の第1の画分を、第1の溶液中で1つまたは複数の核酸分子実体と組み合わせるステップであって、第1の画分が総アミノ脂質の 0.1 mol % ~ 99 mol % を構成する、ステップと、(b) アミノ脂質の残りを、第2の溶液中で構造脂質、中性脂質、および P E G - 脂質から選択される1つまたは複数の脂質と組み合わせるステップと、(c) 第1の溶液および第2の溶液を混合するステップであって、それによって脂質ナノ粒子を生成する、ステップとを含む、方法である。いくつかの実施形態では、アミノ脂質の第1の画分が、1つまたは複数の核酸分子実体内のリン酸の 0.1 ~ 99 % (N : P ベース) を中和するように構成される。いくつかの実施形態では、アミノ脂質の第1の画分が、1つまたは複数の核酸分子実体内のリン酸の 0.5 ~ 99 % (N : P ベース) を中和するように構成される。いくつかの実施形態では、アミノ脂質の第1の画分が、1つまたは複数の核酸分子実体内のリン酸の約 10 %、15 %、25 %、50 %、または 75 % (N : P ベース) を中和するように構成される。いくつかの実施形態では、第1の溶液が水性緩衝溶液である。いくつかの実施形態では、第1の溶液が核酸安定化剤をさらに含む。いくつかの実施形態では、第1の溶液および第2の溶液がインラインミキサーで混合される。

30

40

【0037】

【0021】本開示の追加の態様および利点は、本開示の例示的实施形態のみが示され、記載されている下記の詳細な説明から当業者には容易に明らかだろう。理解されるように、本開示は、他の異なる実施形態が可能であり、そのいくつかの詳細は、様々な明白な点で変更が可能であり、それらすべてが本開示から逸脱せずに可能である。したがって、図面および記載は、本質的に例示であり、限定はでないと考えべきである。

【0038】

50

参照による組み込み

【0022】本明細書で言及された全ての刊行物、特許、および特許出願は、あたかも各個々の刊行物、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かつ個別に示された場合と同程度まで、参照により本明細書に組み込まれる。参照によって組み込まれた刊行物および特許または特許出願が本明細書に含有される開示に矛盾する程度において、本明細書は、このような矛盾する資料に取って代わり、および／または優先することを意図している。

【0039】

【0023】本開示の種々の態様は、添付の特許請求の範囲に詳細に記載される。本開示の特徴および利点のより良い理解は、本開示の原理が利用される例示的な実施形態を記載する以下の詳細な説明、およびその添付図面を参照することによって得られる。

【図面の簡単な説明】

【0040】

【図1】【0024】野生型 C57BL/6 雌性マウス (n=5) における PCSK9 遺伝子編集を、F1 を除く LNP について 0.5 mg/kg の総 RNA 用量で示す図である。総 RNA 用量 F1: 0.75 mg/kg。LNP F1~F5 は、SpCas9 mRNA および PCSK9 gRNA を用いて構成されていた。

【図2】【0025】図2Aは、PEG400 (w/w) % を決定するために使用される IP-RPLC-HPLC-ELSD 法からの検量線および例示的なクロマトグラムを示す図である。検量線は、ELSD 検出が非線形応答を有するため、立方フィットに適合する。図2Bは、PEG400 (w/w) % を決定するために使用される IP-RPLC-HPLC-ELSD 法からの検量線および例示的なクロマトグラムを示す図である。検量線は、ELSD 検出が非線形応答を有するため、立方フィットに適合する。

【図3】【0026】GFP mRNA 負荷 LNP (脂質組成および凍結緩衝液において同一であるが、PEG400 の存在および位置が異なる) を、HUH7 ヒト肝細胞株に、非凍結と3つの凍結/解凍サイクルアリコート の両方で適用したことを示す図である。GFP 蛍光を72時間後に測定した。PEG400 含有製剤は、3回の凍結/解凍サイクル後に GFP 発現および mRNA デリバリー効果の低下を示さなかったが、PEG400 を含まない製剤はデリバリー効果の喪失を経験した。

【図4】【0027】表9および10に与えられ、実施例14に記載される用量の LNP F45~F51 についての野生型 C57BL/6 雌性マウス (n=5) におけるマウス肝細胞の PCSK9 遺伝子編集を示す図である。

【図5】【0028】表9および10に与えられ、実施例14に記載される用量の LNP F52~F60 についての野生型 C57BL/6 雌性マウス (n=5) におけるマウス肝細胞の PCSK9 遺伝子編集を示す図である。これらの表に用量および積荷を見出すことができる。

【図6】【0029】表9および10に与えられ、実施例14に記載される用量の LNP F32、F61、F62、F63 についての野生型 C57BL/6 雌性マウス (n=5) におけるマウス肝細胞の PCSK9 遺伝子編集を示す図である。これらの表に用量および積荷を見出すことができる。

【図7】【0030】表9および10に与えられ、実施例14に記載される用量の LNP F64~F68 についての野生型 C57BL/6 雌性マウス (n=5) におけるマウス肝細胞の PCSK9 遺伝子編集を示す図である。これらの表に用量および積荷を見出すことができる。

【図8】【0031】表9および10に与えられ、実施例14に記載される用量の LNP F69~F83 についての野生型 C57BL/6 雌性マウス (n=5) におけるマウス肝細胞の PCSK9 遺伝子編集を示す図である。これらの表に用量および積荷を見出すことができる。全ての LNP を野生型 C57BL/6 雌性マウス (n=5) に静脈内投与した (RO)。

【図9】【0032】表9および10に与えられ、実施例14に記載される用量の LNP F

10

20

30

40

50

84～F91についての野生型C57BL/6雌性マウス（n＝5）におけるマウス肝細胞のPCSK9遺伝子編集を示す図である。

【図10】[0033]表9および10に与えられ、実施例14に記載される用量のF110、F123、F124、およびF143～F146についての野生型C57BL/6雌性マウス（n＝3～5）におけるマウス肝細胞のPCSK9遺伝子編集を示す図である。

【図11】[0034]表11および実施例15に与えられる用量のLNP F92およびF97～F100についての野生型C57BL/6雌性マウス（n＝5）におけるマウス肝細胞のPCSK9遺伝子編集を示す図である。

【図12】[0035]表12に与えられ、実施例16に記載される用量のLNP F93、F101～F103およびF155についての野生型C57BL/6雌性マウス（n＝5）におけるマウス肝細胞のPCSK9遺伝子編集を示す図である。全てのLNPを野生型C57BL/6雌性マウス（n＝3～5）に静脈内投与した（RO）。

【図13】[0036]表15および16に記載されているように、LNP F106～109についての総RNA用量1mg/kgでの野生型C57BL/6雌性マウス（n＝5）における肝細胞のPCSK9遺伝子編集を示す図である。全てのLNPを野生型C57BL/6雌性マウス（n＝5）に静脈内投与した（RO）。

【図14】[0037]表15および16に記載されているように、LNP F111～118について0.5mg/kgの総RNA用量での野生型C57BL/6雌性マウス（n＝5）におけるマウス肝細胞のPCSK9遺伝子編集を示す図である。全てのLNPを野生型C57BL/6雌性マウス（n＝5）に静脈内投与した（RO）。

【図15】[0038]表9、15および16に記載されているように、LNP F110、F111、F119、120、121および122について0.5mg/kgの総RNA用量で野生型C57BL/6雌性マウス（n＝5）におけるマウス肝細胞のPCSK9遺伝子編集を示す図である。全てのLNPを野生型C57BL/6雌性マウス（n＝5）に静脈内投与した（RO）。

【図16】[0039]実施例17、18および23にそれぞれ記載されているように、LNP F104およびF105について与えられたPCSK9肝臓編集%を示す図である。F104およびF105について製剤組成および特性データをそれぞれ表13および14に示す。

【図17】[0040]LNP F94～F96およびF147～F150についてのPCSK9編集を示す図である。これらは、実施例14ならびに表9および10において参照される。

【図18】[0041]表15および16に記載されているように、LNP F128およびF129について0.05mg/kgの総RNA用量で野生型C57BL/6雌性マウス（n＝5）におけるマウス肝細胞のPCSK9遺伝子編集を示す図である。全てのLNPを野生型C57BL/6雌性マウス（n＝5）に静脈内投与した（RO）。

【図19】[0042]実施例22および表17に記載されているように、F151～F154の編集%を示す図である。

【図20】[0043]実施例24に記載されているように、0.125mg/kg用量で、表18に示されるN/P比6および8でアミノ脂質VL454、VL459およびVL455を含むLNP F160～F165を単回投与した後、野生型C57BL/6雌性マウス肝臓（n＝5）において達成されたPCSK9遺伝子編集のパーセンテージを示す図である。F151Aは、アミノ脂質502を使用して構成される参照LNPである。

【図21】[0044]実施例24、表19に記載されているように、0.1mg/kg用量の総RNAでLNP F172～F177を単回投与した後の野生型C57BL/6雌性マウス肝臓（n＝5）におけるPCSK9遺伝子編集のパーセンテージを示す図である（表19）。投与された全てのLNPは、アミノ脂質VL422を用いて構成された。

【図22】[0045]（A）は、0.1mg/kg用量の総RNAでLNP F151A、172および178～181を単回投与した後の野生型C57BL/6雌性マウス肝臓（n＝5）におけるPCSK9遺伝子編集のパーセンテージを示す図である（表20）。F

10

20

30

40

50

151Aは、アミノ脂質502を使用して構成された参照LNPである。市販のPEG-脂質507を、LNP F178、F180およびF181においてPEG-脂質VP159で置き換えた。アミノ脂質VL422を含むF179～F181。図22(B)は、0.1mg/kg用量の総RNAでLNP F151B、F193A～F193Cを単回投与した後の野生型C57BL/6雌性マウス肝臓(n=5)におけるPCSK9遺伝子編集のパーセンテージを示す図である(表20)。F151Bは、アミノ脂質502を使用して構成された参照基LNPである。市販のPEG-脂質507を、LNP F19BおよびF193CにおいてPEG-脂質VP177に置き換え、アミノ脂質VL422で製剤化した。

【図23】[0046](A)は、実施例25、表23に記載されているように、LNP F188、F190～F193を単回投与した後のカニクイザル(n=3)の肝臓におけるANGPTL3遺伝子編集のパーセンテージを示す図である。F188およびF192は、1.5mg/kgの総RNA用量で投薬された。F190、F191およびF193は、2mg/kgの総RNA用量で投薬された。F188は、アミノ脂質502およびPEG-脂質507を含む参照LNPである。F188のPEG-脂質507は、アミノ脂質VL422およびPEG-脂質507を含むF192、F190、190A、F191およびF193において、PEG-脂質VP159に置き換えられる。図23(B)は、実施例25、表23に記載されているように、LNP F190AおよびF190Bを単回投与した後のカニクイザル(n=3)の肝臓におけるANGPTL3遺伝子編集のパーセンテージを示す図である。F190AおよびF190Bを2mg/kgの総RNA用量で投薬した。F190AのPEG-脂質507は、F190BにおいてPEG-脂質VP159に置き換えられる。

【図24】[0047](A)は、実施例26、表24に記載されているように、0.25mg/kgの総RNA用量でLNP F122AおよびF221～F226を単回投与した後の野生型C57BL/6雌性マウス肝臓(n=5)におけるPCSK9遺伝子編集のパーセンテージを示し、図24(B)は、0.5および0.25mg/kgの総RNA用量でLNP F122A、ならびに0.25mg/kgの総RNA用量でF226A～F226Cを単回投与した後の野生型C57BL/6雌性マウス肝臓(n=5)におけるPCSK9遺伝子編集のパーセンテージを示す図である。アミノ脂質VL422を含むLNPへの脂肪アルコールのドーピングは編集を改善する。0.25mg/kgの総RNAで約6mol%の脂肪アルコール504を含むF223は、0.5mg/kgで、脂肪アルコールを含まない対応するLNP F122Aと同等の編集を生じた。LNP組成物中の10mol%のアルコール504は編集効率をさらに改善した。評価された全てのLNPは、アミノ脂質VL422を含む。0.25mg/kgの総RNA用量で、約6mol%および10mol%の脂肪アルコール513を含む製剤F226BおよびF226Cは、0.25mg/kgの総RNA用量で、脂肪アルコールを含まない対応するLNP F122Aと比較して、編集効果を改善した。評価された全てのLNPは、アミノ脂質VL422を含む。

【図25】[0048]実施例40(表26)に記載されているように、LNP F190A、F235～F237を単回投与した後のカニクイザルの肝臓(n=3)におけるANGPTL3遺伝子編集のパーセンテージを示す図である。LNP F190Aを2、1.5および1mg/kgの総RNAで投薬した。F236、F235およびF237を2mg/kgの総RNAで投薬した。

【図26】[0049]LNP F190A、F235～F237を単回投与した後のカニクイザルの血清(n=3)における15日目のベースラインからのANGPTL3タンパク質ノックダウンのパーセンテージを示す図である(実施例40)。F190Aをそれぞれ2、1.5および1mg/kgのRNAで投薬した。F235、F236およびF237を2mg/kgのRNAで投薬した。

【図27】[0050]実施例42(表27)に記載されているように、LNP F238およびF239を単回投与した後のカニクイザルの肝臓(n=3)におけるANGPTL3

10

20

30

40

50

遺伝子編集のパーセンテージを示す図である。

【図28】[0051]0、1、6および24時間で、ヒト肝臓S9におけるアミノ脂質502、VL422およびVL454の分解速度を示す図である。

【図29】[0052]LNP投与後のカニクイザル由来の血漿中のアミノ脂質VL422曝露プロファイルを示す図である。実施例25および表23に記載されているように、LNP F188を1.5mg/kgの総RNA用量で投与し、F190、F191およびF193として2mg/kgの総RNA用量での投薬であった。

【発明を実施するための形態】

【0041】

[0053]本開示は、カチオン性および／またはイオン化可能な脂質、ならびにそれを含む脂質含有粒子に関する。本開示はまた、治療剤（例えば、核酸）を哺乳動物細胞に送達する方法、哺乳動物細胞中で目的のポリペプチドを生成する方法、および疾患または障害の処置を必要とする哺乳動物における疾患または障害を処置する方法に関する。例えば、細胞内で目的のポリペプチドを生成する方法は、本明細書に記載の脂質含有粒子を細胞と接触させ、それによって目的のポリペプチドをコードするmRNAを細胞に送達し、それによってmRNAを翻訳して目的のポリペプチドを生成し得る工程を含むことができる。別の例では、治療剤を哺乳動物細胞または臓器に送達する方法は、治療剤を含む本明細書に記載される脂質含有粒子の対象への投与を伴うことができ、その投与は、細胞または臓器を脂質含有粒子と接触させることを含み、それによって治療剤が細胞または臓器に送達される。

【0042】

[0054]以下の説明および実施例は、本開示の実施形態を詳細に例証する。本開示は、本明細書に記載する特定の実施形態に限定されるものではなく、それ自体が変化し得ることを理解されたい。当業者は、本開示の範囲内に包含される、本開示の多数の変形および修飾があることを認識する。

【0043】

[0055]本開示の種々の特徴は、単一の実施形態の文脈で記載することができるが、それらの特徴は、別個にまたは任意の適切な組合せで提供することもできる。逆に、本開示は、明確化のために別々の実施形態の文脈で本明細書に記載され得るが、本開示は、単一の実施形態で実施され得る。

【0044】

[0056]本明細書で使用されているセクションの見出しは、構成のみを目的としており、説明されている主題を限定するものとして解釈されるべきではない。

[0057]全ての用語は、当業者に理解されるものとして理解されるように意図される。別段の定義がない限り、本明細書で 사용되는全ての技術用語および科学用語は、開示が関係する当業者に一般的に理解されるものと同じ意味を有する。

【0045】

[0058]以下の定義は、当該技術分野の定義を補足するものであり、現在の出願を対象としており、例えば、共通して所有される特許もしくは出願に関連するかまたは関係しない場合に帰属されるものではない。本明細書に記載されたものと類似または同等の任意の方法および材料を、本開示の試験のための実施において使用することができるが、好ましい材料および方法を本明細書に記載する。したがって、本明細書において使用される用語は、特定の実施形態のみを記載する目的であり、限定することを意図しない。

【0046】

I. 定義

[0059]本明細書で 사용되는用語は、特定のケースのみを記載する目的であり、限定することを意図しない。本出願において、単数形の使用は、特に断らない限り、複数形を含む。本明細書で 사용되는場合、単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」および「その(the)」は、文脈が明確に別の意味を示さない限り、複数形も含むことを意図している。

【0047】

【0060】本出願において、「または」の使用は、特に断らない限り、「および／または」を意味する。用語「および／または」および「それらの任意の組合せ」ならびに本明細書で使用されるそれらの文法的同等物は、互換的に使用することができる。これらの用語は、任意の組合せが特に意図されていることを伝えることができる。例示の目的のためだけに、以下の語句「A、B、および／またはC」または「A、B、C、またはそれらの任意の組合せ」は、「Aを個別に；Bを個別に；Cを個別に；AとB；BとC；AとC；AとBとC」を意味することができる。用語「または」は、文脈が特に離接的使用を指していない限り、接続的または離接的に使用することができる。

【0048】

【0061】用語「約」または「ほぼ」とは、当業者によって決定される特定の値について許容可能な誤差範囲内を意味することができ、部分的には、値がどのように測定または決定されるか、すなわち、測定システムの限界に依存する。例えば、「約」とは、当該技術分野における実施毎に、1標準偏差内または1を超える標準偏差内を意味することができる。あるいは、「約」とは、所与の値の最大20%、最大10%、最大5%、または最大1%の範囲を意味することができる。あるいは、特に生物学的システムまたはプロセスに関して、この用語は、値の1桁以内、5倍以内、または2倍以内を意味することができる。特定の値が出願および請求項に記載されている場合、別段の記載がない限り、特定の値に対する許容可能な誤差範囲内の用語「約」の意味が仮定されるべきである。

【0049】

【0062】本明細書および請求項（複数可）において使用される場合、用語「含んでいる（comprising）」（ならびに「含む（comprise）」および「含む（comprises）」などの任意の形態の含むこと）、「有している」（ならびに「有する（have）」および「有する（has）」などの任意の形態の有すること）、「含んでいる（including）」（ならびに「含む（includes）」および「含む（include）」などの任意の形態の含むこと）、または「含有している」（ならびに「含有する（contains）」および「含有する（contain）」などの任意の形態の含有すること）は、包括的または開放的であり、追加の引用されていない要素または方法ステップを排除しない。本明細書で検討される任意の実施形態は、本開示の任意の方法または組成物に関して実施することができ、その逆も可能であることが企図される。さらに、本開示の組成物を使用して、本開示の方法を達成することができる。

【0050】

【0063】本明細書において、「いくつかの実施形態」、「ある実施形態」、「一実施形態」または「他の実施形態」への言及は、実施形態に関連して記載される特定の特徴、構造または特性が、本開示の少なくともいくつかの実施形態に含まれているが、必ずしも全ての実施形態ではないことを意味する。本開示の理解を容易にするために、多くの用語および語句が以下に定義される。

【0051】

【0064】本明細書で使用される「誘導体」という用語は、第2の物質に構造的に関連し、第2の物質の修飾を介して第2の物質から誘導可能な化学物質または生物学的物質を示す。特に、第1の化合物が第2の化合物の誘導体であり、第2の化合物が化学的および／または生物学的活性と関連している場合、第1の化合物は、第2の化合物の化学的および／または生物学的活性およびそれに関連する少なくとも1つの構造的な特徴（例えば、配列、断片、官能基およびその他）を保持しながら（少なくともある種の程度まで）、少なくとも1つの構造的な特徴について第2の化合物と異なる。当業者は、ケースバイケースで、本開示を読むことにより、第2の化合物の化学的および／または生物学的活性を保持するために第1の化合物中に維持されなければならない第2の化合物の構造的な特徴、ならびに化学的および／または生物学的活性の保持を証明するために使用することができるアッセイを同定することができる。例示的な「誘導体」としては、プロドラッグ、代謝物、エナンチオマー、ジアステレオマー、エステル（例えば、アシルオキシアルキルエステル、ア

10

20

30

40

50

ルコキシカルボニルオキシアルキルエステル、アルキルエステル、アリアルエステル、リン酸エステル、スルホン酸エステル、硫酸エステルおよびジスルフィド含有エステル)、エーテル、アミド、カーボネート、チオカーボネート、N-アシル誘導体、N-アシルオキシアルキル誘導体、第三級アミンの第四級誘導体、N-マンニッヒ塩基、シッフ塩基、アミノ酸コンジュゲート、リン酸エステル、金属塩、スルホン酸エステルなどが挙げられる。場合によっては、誘導体は、親化合物の化学的および／または生物学的活性を保持する親化合物への取るに足らない置換(すなわち、追加のアルキル／アキレン基)を含み得る。

【0052】

[0065]用語「薬学的に許容される」とは、連邦もしくは州政府の規制機関により承認されるかまたは承認され得るか、あるいはヒトを含む動物での使用のために米国薬局方または他一般に認知されている薬局方に列挙されているものを指す。

10

【0053】

[0066]「薬学的に許容される賦形剤、担体または希釈剤」とは、薬剤とともに対象に投与することができ、その薬理活性を破壊せず、治療量の薬剤を送達するのに十分な用量で投与した場合に非毒性である賦形剤、担体または希釈剤を指す。

【0054】

[0067]「薬学的に許容される塩」は、過剰な毒性、刺激、アレルギー反応、または他の問題もしくは合併症なしに、ヒトまたは動物の組織と接触して使用するのに適していると当該技術分野において一般的に考えられている酸または塩基塩であり得る。このような塩には、アミンなどの塩基性残基の鉱酸塩および有機酸塩、ならびにカルボン酸などの酸性残基のアルカリ塩または有機塩が含まれる。特定の薬学的塩には、限定されないが、酸、例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、リンゴ酸、グリコール酸、フマル酸、硫酸、スルファミン酸、スルファニル酸、ギ酸、トルエンスルホン酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、エタンスルホン酸、2-ヒドロキシエチルスルホン酸などの酸の塩が含まれるが、これらに限定されないが、硝酸、安息香酸、2-アセトキシ安息香酸、クエン酸、酒石酸、乳酸、ステアリン酸、サリチル酸、グルタミン酸、アスコルビン酸、パモ酸、コハク酸、フマル酸、マレイン酸、プロピオン酸、ヒドロキシマレイン酸、ヨウ化水素酸、フェニル酢酸、アルカン酸、例えば、酢酸、 $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$ (nは0~4)などの酸の塩が含まれる。同様に、薬学的に許容されるカチオンには、限定されないが、ナトリウム、カリウム、カルシウム、アルミニウム、リチウムおよびアンモニウムが含まれる。当業者であれば、本開示および当該技術分野における知識から、さらなる薬学的に許容される塩には、Remington's Pharmaceutical Sciences、第17版、Mack Publishing Company、Easton、PA、p. 1418 (1985年)によって列挙されている塩が含まれることを理解する。一般に、薬学的に許容される酸または塩基塩は、任意の従来の化学的方法によって、塩基性または酸性部分を含有する親化合物から合成することができる。簡単に述べると、このような塩は、これらの化合物の遊離酸または塩基形態を、適切な溶媒中で化学量論量の適切な塩基または酸と反応させることによって調製することができる。

20

30

【0055】

[0068]本明細書で使用される場合、用語「治療有効量」とは、感染、疾患、障害、および／または状態に罹患しているかまたは感受性である対象に投与された場合、感染、疾患、障害、および／または状態の症状を処置し、改善し、診断し、予防し、および／またはその発症を遅らせるのに十分である、送達される物質(例えば、核酸、薬物、ペイロード、組成物、治療剤、診断剤、予防剤など)の量を意味する。

40

【0056】

[0069]本明細書に提供される範囲は、範囲内の全ての値についての略称であると理解される。例えば、1~50の範囲は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、3

50

8、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、もしくは50からなる群から選択される任意の数、数の組合せ、またはサブ範囲、ならびに前述の整数間の全ての小数值、例えば、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、および1.9を含むことが理解される。サブ範囲に関しては、その範囲のいずれかの終点から延長される「ネストされたサブ範囲」が具体的に企図される。例えば、1～50の例示的な範囲のネストされたサブ範囲は、一方向に1から10、1から20、1から30、および1から40、または他方向に50から40、50から30、50から20、および50から10を含み得る。

【0057】

【0070】用語「対象」とは、処置、観察または実験の目的物である動物を指す。例としてのみでは、対象は、限定されないが、哺乳動物を含み、限定されないが、ヒトまたは非ヒト哺乳動物、例えば非ヒト霊長類、ウシ、ウマ、イヌ、ヒツジ、またはネコが含まれる。

10

【0058】

【0071】用語「治療する」、「治療した」、「治療すること」、「治療」などは、それに関連する障害および／または症状（例えば、新生物または腫瘍）を減少または改善することを意味する。「治療すること」とは、疾患または状態の発症後またはその疑いのある対象へのLNP組成物の投与を指すことができる。「治療すること」には、疾患もしくは状態に関連する任意の症状または他の悪影響、および／または疾患もしくは状態に関連する副作用の発生または再発の頻度または重症度を低下させることを指す「緩和すること」の概念が含まれる。用語「治療すること」はまた、患者における特定の疾患または障害の重症度を減少させること、またはその再発を遅らせること、例えば、疾患に苦しんだ患者における寛解期間を延長することを指す「管理すること」という概念を包含する。「治療する」という用語は、以前に述べたように、「予防する（prevent）」、「予防する（preventing）」、および「予防」という概念をさらに包含する。排除されないが、障害または状態を治療するステップは、その障害、状態、またはそれに関連する症状が完全に排除されることは必要としないことが理解される。

20

【0059】

【0072】用語「置換される」とは、別段の指示がない限り、限定されないが、ハロ、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、ヘテロシクリル、チオール、アルキルチオ、オキソ、チオキシ、アリールチオ、アルキルチオアルキル、アリールチオアルキル、アルキルスルホニル、アルキルスルホニルアルキル、アリールスルホニルアルキル、アルコキシ、アリールオキシ、アラルコキシ、アミノカルボニル、アルキルアミノカルボニル、アリールアミノカルボニル、アルコキシカルボニル、アリールオキシカルボニル、ハロアルキル、アミノ、トリフルオロメチル、シアノ、ニトロ、アルキルアミノ、アリールアミノ、アルキルアミノアルキル、アリールアミノアルキル、アミノアルキルアミノ、ヒドロキシ、アルコキシアルキル、カルボキシアルキル、アルコキシカルボニルアルキル、アミノカルボニルアルキル、アシル、アラルコキシカルボニル、カルボン酸、スルホン酸、スルホニル、ホスホン酸、アリール、ヘテロアリール、複素環、および脂肪族基を含む特定される置換基のラジカルによる、所定の構造における1つまたは複数の水素ラジカルの置き換えを指す。置換基はさらに置換され得ることが理解される。置換基の例としては、アミノ、アルキルアミノなどが挙げられる。

30

40

【0060】

【0073】本明細書で使用される場合、用語「置換基」とは、指定された原子位置で置換され、指定された原子の通常の原子価を超えず、置換が安定な化合物をもたらすという条件で、指定された原子上の1つまたは複数の水素を置き換える、コア分子の原子上の位置変数を意味する。置換基および／または変数の組合せは、このような組合せが安定な化合物をもたらす場合にのみ許容される。当業者は、本明細書に記載されるかまたは示されるように満たさないとされる原子価を有する任意の炭素およびヘテロ原子は、記載されるかまたは示される原子価を満たすのに十分な数の水素原子（複数可）を有すると仮定され

50

ることに留意すべきである。ある種の場合には、結合点として二重結合（例えば、「オキソ」または「=O」）を有する1つまたは複数の置換基を置換基群内に記載し、示したものは列挙することができ、構造は、式（I）、式（I*）、式（Ia）、式（II）、式（II*）、式（III）または式（III*）のコア構造への結合点として単結合のみを示すことができる。当業者は、単結合のみが示されているが、二重結合はそれらの置換基を意図していることを理解する。

【0061】

【0074】「アルキル」という用語は、1個から20個の炭素原子を有し、単結合によって分子の残りの部分に結合している、直鎖または分枝炭化水素鎖基を指す。最大で10個の炭素原子を含むアルキルは、 $C_1 \sim C_{10}$ アルキルと呼ばれ、同様に、例えば、最大で6個の炭素原子を含むアルキルは、 $C_1 \sim C_6$ アルキルである。他の数の炭素原子を含むアルキル（および本明細書で定義される他の部分）も同様に表される。アルキル基としては、限定するものではないが、 $C_1 \sim C_{10}$ アルキル、 $C_1 \sim C_9$ アルキル、 $C_1 \sim C_8$ アルキル、 $C_1 \sim C_7$ アルキル、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_1 \sim C_5$ アルキル、 $C_1 \sim C_4$ アルキル、 $C_1 \sim C_3$ アルキル、 $C_1 \sim C_2$ アルキル、 $C_2 \sim C_8$ アルキル、 $C_3 \sim C_8$ アルキルおよび $C_4 \sim C_8$ アルキルが挙げられる。代表的なアルキル基としては、限定するものではないが、メチル、エチル、*n*-プロピル、1-メチルエチル（*i*-プロピル）、*n*-ブチル、*i*-ブチル、*s*-ブチル、*n*-ペンチル、1, 1-ジメチルエチル（*t*-ブチル）、3-メチルヘキシル、2-メチルヘキシル、1-エチル-プロピルなどが挙げられる。いくつかの実施形態では、アルキルはメチルまたはエチルである。いくつかの実施形態では、アルキルは $-CH(CH_3)_2$ または $-C(CH_3)_3$ である。本明細書において特に断りのない限り、アルキル基は、以下に記載するように任意選択で置換されていてもよい。「アルキレン」または「アルキレン鎖」は、分子の残りをラジカル基に連結する直鎖または分枝鎖の二価炭化水素鎖を指す。いくつかの実施形態では、アルキレンは、 $-CH_2-$ 、 $-CH_2CH_2-$ 、または $-CH_2CH_2CH_2-$ である。いくつかの実施形態では、アルキレンは、 $-CH_2-$ である。いくつかの実施形態では、アルキレンは、 $-CH_2CH_2CH_2-$ である。

【0062】

【0075】用語「アリール」は、少なくとも1つの芳香族環を含む炭化水素環系から誘導されるラジカルを指す。いくつかの実施形態では、アリールは、水素および6～30個の炭素原子を含む。アリール基は、単環式、二環式、三環式、または四環式環系であり得、縮合された環系（シクロアルキル環またはヘテロシクロアルキル環と縮合する場合、アリールは、芳香族環原子を介して結合される）または架橋された環系を含み得る。いくつかの実施形態では、アリールは、6～10員のアリールである。いくつかの実施形態では、アリールは、6員のアリールである。アリールラジカルには、限定されないが、アントリレン、ナフチレン、フェナントリレン、アントラセン、アズレン、ベンゼン、クリセン、フルオランテン、フルオレン、インダン、インデン、ナフタレン、フェナレン、フェナントレン、プレアデン、ピレン、およびトリフェニレンの炭化水素環系から誘導されるアリールラジカルが含まれる。いくつかの実施形態では、アリールはフェニルである。本明細書において特に断らない限り、アリールは、任意選択で、例えば、ハロゲン、アミノ、アルキルアミノ、アミノアルキル、ニトリル、ニトロ、ヒドロキシル、アルキル、アルケニル、アルキニル、ハロアルキル、ヘテロアルキル、アルコキシ、アリール、シクロアルキル、ヘテロシクロアルキル、ヘテロアリール、 $-S(O)_2NH-C_1 \sim C_6$ アルキルなどで置換され得る。いくつかの実施形態では、アリールは、任意選択で、ハロゲン、メチル、エチル、 $-CN$ 、 $-CF_3$ 、 $-OH$ 、 $-OMe$ 、 $-NH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-S(O)_2NH_2$ 、 $-S(O)_2NHCH_3$ 、 $-S(O)_2NHCH_2CH_3$ 、 $-S(O)_2NHC(CH_3)_2$ 、 $-S(O)_2N(CH_3)_2$ 、または $-S(O)_2NHC(CH_3)_3$ で置換される。いくつかの実施形態では、アリールは、任意選択で、ハロゲン、メチル、エチル、 $-CN$ 、 $-CF_3$ 、 $-OH$ または $-OMe$ で置換される。いくつかの実施形態では

10

20

30

40

50

、アリアルは、任意選択で、ハロゲンで置換される。いくつかの実施形態では、アリアルは、アルキル、アルケニル、アルキニル、ハロアルキル、またはヘテロアルキルで置換され、各アルキル、アルケニル、アルキニル、ハロアルキル、ヘテロアルキルは、独立して非置換であるか、またはハロゲン、メチル、エチル、 $-CN$ 、 $-CF_3$ 、 $-OH$ 、 $-OMe$ 、 $-NH_2$ 、または $-NO_2$ で置換される。

【0063】

【0076】「アルケニル」という用語は、少なくとも1つの炭素-炭素二重結合が存在する種類のアルキル基を指す。一実施形態では、アルケニル基は、式 $-C(R^a)=CR^a_2$ を有し、ここで、 R^a はアルケニル基の残りの部分を指し、同じであっても異なってもよい。いくつかの実施形態では、 R^a はHまたはアルキルである。いくつかの実施形態では、アルケニルは、エテニル（すなわちビニル）、プロペニル（すなわちアリル）、ブテニル、ペンテニル、ペンタジエニルなどから選択される。アルケニル基の非限定的な例としては、 $-CH=CH_2$ 、 $-C(CH_3)=CH_2$ 、 $-CH=CHCH_3$ 、 $-C(CH_3)=CHCH_3$ 、および $-CH_2CH=CH_2$ が挙げられる。「アルケニレン」または「アルケニレン鎖」とは、少なくとも1つの炭素-炭素二重結合が存在するアルキレン基を指す。いくつかの実施形態では、アルケニレンは、 $-CH=CH-$ 、 $-CH_2CH_2CH=CH-$ または $-CH=CHCH_2CH_2-$ である。いくつかの実施形態では、アルケニレンは $-CH=CH-$ である。いくつかの実施形態では、アルケニレンは $-CH_2CH_2CH=CH-$ である。いくつかの実施形態では、アルケニレンは $-CH=CHCH_2CH_2-$ である。

【0064】

【0077】「アルキニル」という用語は、少なくとも1つの炭素-炭素三重結合が存在する種類のアルキル基を指す。一実施形態では、アルキニル基は、式 $-C\equiv CR^a$ を有し、ここで R^a はアルキニル基の残りの部分を指す。いくつかの実施形態では、 R^a はHまたはアルキルである。いくつかの実施形態では、アルキニルは、エチニル（すなわちアセチレニル）、プロピニル（すなわちプロパルギル）、ブチニル、ペンチニルなどから選択される。アルキニル基の非限定的な例としては、 $-C\equiv CH$ 、 $-C\equiv CCH_3$ 、および $-CH_2C\equiv CH$ が挙げられる。「アルキニレン」または「アルキニレン鎖」とは、少なくとも1つの炭素-炭素三重結合が存在するアルキレン基を指す。いくつかの実施形態では、アルキニレンは、 $-C\equiv C-$ 、 $-CH_2CH_2C\equiv C-$ または $-C\equiv CCH_2CH_2-$ である。いくつかの実施形態では、アルキニレンは $-C\equiv C-$ である。いくつかの実施形態では、アルキニレンは $-CH_2CH_2C\equiv C-$ である。いくつかの実施形態では、アルキニレンは $-C\equiv CCH_2CH_2-$ である。

【0065】

【0078】「シクロアルキル」という用語は、環を形成する原子（すなわち、骨格原子）の各々が炭素原子である、単環式または多環式の非芳香族ラジカルを指す。いくつかの実施形態では、シクロアルキルは、飽和または部分不飽和である。いくつかの実施形態では、シクロアルキルは、スピロ環または架橋化合物である。いくつかの実施形態では、シクロアルキルは芳香環と縮合している（この場合、シクロアルキルは非芳香環炭素原子を介して結合されている）。シクロアルキル基には、3～10個の環原子を有する基が含まれる。代表的なシクロアルキルとしては、限定するものではないが、3～10個の炭素原子、3～8個の炭素原子、3～6個の炭素原子、または3～5個の炭素原子を有するシクロアルキルが挙げられる。単環式シクロアルキルラジカルとしては、例えば、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、およびシクロオクチルが挙げられる。いくつかの実施形態では、単環式シクロアルキルは、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチルまたはシクロヘキシルである。いくつかの実施形態では、単環式シクロアルキルは、シクロペンテニルまたはシクロヘキセニルである。いくつかの実施形態では、単環式シクロアルキルは、シクロペンテニルである。多環式基としては、例えば、アダマンチル、1,2-ジヒドロナフタレニル、1,4-ジヒドロナフタレニル、テトライニル、デカリニル、3,4-ジヒドロナフタレニル-1(2H)-オン、

スピロ〔2.2〕ペンチル、ノルボルニルおよびビシクロ〔1.1.1〕ペンチルが挙げられる。本明細書において特に断りのない限り、シクロアルキル基は任意選択で置換されていてもよい。構造に応じて、シクロアルキル基は一価または二価（すなわち、シクロアルキレン基）であってもよい。

【0066】

〔0079〕用語「複素環」または「複素環」は、窒素、酸素および硫黄から選択される少なくとも1つの複素原子を含む複素芳香族環（ヘテロアリアルとしても公知である）およびヘテロシクロアルキル環（ヘテロ脂環基としても公知である）を指し、各複素環基は、その環系において3～12個の原子を有し、ただし、任意の環が2つの隣接するOまたはS原子を含まない。「ヘテロシクリル」は、複素環化合物の任意の環原子から水素原子を除去することによって形成される一価基である。いくつかの実施形態では、複素環は、単環式、二環式、多環式、スピロ環式または架橋化合物である。非芳香族複素環基（ヘテロシクロアルキルとしても公知である）は、その環系に3～12個の原子を有する環を含み、芳香族複素環基は、その環系に5～12個の原子を有する環を含む。複素環基にはベンゾ縮合環系が含まれる。非芳香族複素環基の例は、ピロリジニル、テトラヒドロフラニル、ジヒドロフラニル、テトラヒドロチエニル、オキサゾリジノニル、テトラヒドロピラニル、ジヒドロピラニル、テトラヒドロチオピラニル、ピペリジニル、モルホリニル、チオモルホリニル、チオキサニル、ピペラジニル、アジリジニル、アゼチジニル、オキセタニル、チエタニル、ホモピペリジニル、オキセパニル、チエパニル、オキサゼピニル、ジアゼピニル、チアゼピニル、1,2,3,6-テトラヒドロピリジニル、ピロリン-2-イル、ピロリン-3-イル、インドリニル、2H-ピラニル、4H-ピラニル、ジオキサニル、1,3-ジオキサラニル、ピラゾリニル、ジチアニル、ジチオラニル、ジヒドロピラニル、ジヒドロチエニル、ジヒドロフラニル、ピラゾリジニル、イミダゾリニル、イミダゾリジニル、3-アザビシクロ〔3.1.0〕ヘキサニル、3-アザビシクロ〔4.1.0〕ヘプタニル、3H-インドリル、インドリン-2-オニル、イソインドリン-1-オニル、イソインドリン-1,3-ジオニル、3,4-ジヒドロイソキノリン-1(2H)-オニル、3,4-ジヒドロキノリン-2(1H)-オニル、イソインドリン-1,3-ジチオニル、ベンゾ〔d〕オキサゾール-2(3H)-オニル、1H-ベンゾ〔d〕イミダゾール-2(3H)-オニル、ベンゾ〔d〕チアゾール-2(3H)-オニル、およびキノリジニルである。芳香族複素環式基の例は、ピリジニル、イミダゾリル、ピリミジニル、ピラゾリル、トリアゾリル、ピラジニル、テトラゾリル、フリル、チエニル、イソオキサゾリル、チアゾリル、オキサゾリル、イソチアゾリル、ピロリル、キノリニル、イソキノリニル、インドリル、ベンズイミダゾリル、ベンゾフラニル、シンノリニル、インダゾリル、インドリジニル、フタラジニル、ピリダジニル、トリアジニル、イソインドリル、プテリジニル、プリニル、オキサジアゾリル、チアジアゾリル、フラザニル、ベンゾフラザニル、ベンゾチオフエニル、ベンゾチアゾリル、ベンゾオキサゾリル、キナゾリニル、キノキサリニル、ナフチリジニル、およびフロピリジニルである。上記の基は、可能であれば、C-結合（またはC-連結）またはN-結合のいずれかである。例えば、ピロールから誘導される基は、ピロール-1-イル（N-結合）またはピロール-3-イル（C-結合）の両方を含む。さらに、イミダゾールから誘導される基は、イミダゾール-1-イルまたはイミダゾール-3-イル（両方のN-結合）またはイミダゾール-2-イル、イミダゾール-4-イルまたはイミダゾール-5-イル（全てのC-結合）を含む。複素環基にはベンゾ縮合環系が含まれる。非芳香族複素環は、1個または2個のオキソ(=O)部分で任意に置換され、例えばピロリジン-2-オンである。いくつかの実施形態では、二環式複素環の2つの環のうちの少なくとも1つは芳香族である。いくつかの実施形態では、二環式複素環の両方の環は芳香族である。

【0067】

〔0080〕「ヘテロシクロアルキル」という用語は、窒素、酸素、および硫黄から選択される少なくとも1つの環ヘテロ原子を含むシクロアルキル基を指す。本明細書で特に断りのない限り、ヘテロシクロアルキル基は、単環式または二環式の環系であってもよく、こ

10

20

30

40

50

れは縮合（アリールまたはヘテロアリール環と縮合する場合、ヘテロシクロアルキルは非芳香族環原子を介して結合される）または架橋の環系を含んでもよい。ヘテロシクロリル基中の窒素、炭素または硫黄原子は、任意選択で酸化されていてもよい。窒素原子は、任意選択で四級化されていてもよい。ヘテロシクロアルキル基は部分的または完全に飽和されている。ヘテロシクロアルキル基の例としては、限定するものではないが、ジオキサニル、チエニル〔1, 3〕ジチアニル、テトラヒドロキノリル、テトラヒドロイソキノリル、デカヒドロキノリル、デカヒドロイソキノリル、イミダゾリニル、イミダゾリジニル、イソチアゾリジニル、イソキサゾリジニル、モルホリニル、オクタヒドロインドリル、オクタヒドロイソインドリル、2-オキソピペラジニル、2-オキソピペリジニル、2-オキソピロリジニル、オキサゾリジニル、ピペリジニル、ピペラジニル、4-ピペリドニル、ピロリジニル、ピラゾリジニル、キヌクリジニル、チアゾリジニル、テトラヒドロフリル、トリチアニル、テトラヒドロピラニル、チオモルホリニル、チアモルホリニル、1-オキソチオモルホリニル、1, 1-ジオキソチオモルホリニルが挙げられる。ヘテロシクロアルキルという用語には、また単糖、二糖、およびオリゴ糖を含むがこれらに限定されない炭水化物の全ての環形も含まれる。いくつかの実施形態では、ヘテロシクロアルキルは、環に2~10個の炭素を有する。いくつかの実施形態では、ヘテロシクロアルキルは、環内に2~10個の炭素および1個または2個のN原子を有する。いくつかの実施形態では、ヘテロシクロアルキルは、環内に2~10個の炭素および3または4個のN原子を有する。いくつかの実施形態では、ヘテロシクロアルキルは、環内に2~12個の炭素、0~2個のN原子、0~2個のO原子、0~2個のP原子、および0~1個のS原子を有する。いくつかの実施形態では、ヘテロシクロアルキルは、環内に2個~12個の炭素、1個~3個のN原子、0個~1個のO原子、および0個~1個のS原子を有する。ヘテロシクロアルキル中の炭素原子の数に言及するとき、ヘテロシクロアルキル中の炭素原子の数は、ヘテロシクロアルキルを構成する原子（すなわち、ヘテロシクロアルキル環の骨格原子）の総数（ヘテロ原子を含む）と同じではないことが理解される。本明細書において特に断りのない限り、ヘテロシクロアルキル基は任意選択で置換されていてもよい。本明細書で使用される「ヘテロシクロアルキレン」という用語は、二価のヘテロシクロアルキル基を指す場合がある。

10

20

30

40

50

【0068】

〔0081〕「ヘテロアリール」という用語は、窒素、酸素、および硫黄から選択される1つまたは複数の環ヘテロ原子を含むアリール基を指す。ヘテロアリールは単環式または二環式である。単環式ヘテロアリールの具体例としては、ピリジニル、イミダゾリル、ピリミジニル、ピラゾリル、トリアゾリル、ピラジニル、テトラゾリル、フリル、チエニル、イソオキサゾリル、チアゾリル、オキサゾリル、イソチアゾリル、ピロリル、ピリダジニル、トリアジニル、オキサジアゾリル、チアジアゾリル、フラザニル、インドリジン、インドール、ベンゾフラン、ベンゾチオフエン、インダゾール、ベンゾイミダゾール、プリン、キノリジン、キノリン、イソキノリン、シンノリン、フタラジン、キナゾリン、キノキサリン、1, 8-ナフチリジン、およびプテリジンが挙げられる。単環式ヘテロアリールの具体例としては、ピリジニル、イミダゾリル、ピリミジニル、ピラゾリル、トリアゾリル、ピラジニル、テトラゾリル、フリル、チエニル、イソオキサゾリル、チアゾリル、オキサゾリル、イソチアゾリル、ピロリル、ピリダジニル、トリアジニル、オキサジアゾリル、チアジアゾリル、およびフラザニルが挙げられる。二環式ヘテロアリールの具体例としては、インドリジン、インドール、ベンゾフラン、ベンゾチオフエン、インダゾール、ベンゾイミダゾール、プリン、キノリジン、キノリン、イソキノリン、シンノリン、フタラジン、キナゾリン、キノキサリン、1, 8-ナフチリジン、およびプテリジンが挙げられる。いくつかの実施形態では、ヘテロアリールは、ピリジニル、ピラジニル、ピリミジニル、チアゾリル、チエニル、チアジアゾリルまたはフリルである。いくつかの実施形態では、ヘテロアリールは、環内に0~6個のN原子を含有する。いくつかの実施形態では、ヘテロアリールは、環内に1~4個のN原子を含有する。いくつかの実施形態では、ヘテロアリールは、環内に4~6個のN原子を含有する。いくつかの実施形態では、ヘテ

ロアリールは、環内に0～4個のN原子、0～1個のO原子、0～1個のP原子、および0～1個のS原子を含有する。いくつかの実施形態では、ヘテロアリールは、環内に1～4個のN原子、0～1個のO原子、および0～1個のS原子を含有する。いくつかの実施形態では、ヘテロアリールは、C₁～C₉ヘテロアリールである。いくつかの実施形態では、単環式ヘテロアリールは、C₁～C₅ヘテロアリールである。いくつかの実施形態では、単環式ヘテロアリールは、5員または6員のヘテロアリールである。いくつかの実施形態では、二環式ヘテロアリールは、C₆～C₉ヘテロアリールである。いくつかの実施形態において、ヘテロアリール基は、部分的に還元されて、本明細書で定義されるヘテロシクロアルキル基を形成する。いくつかの実施形態では、ヘテロアリール基は完全に還元されて、本明細書で定義されるヘテロシクロアルキル基を形成する。

10

【0069】

【0082】用語「ヘテロアルキル」とは、アルキルの1つまたは複数の骨格原子が炭素以外の原子、例えば酸素、窒素（例えば、-NH-、-N（アルキル）-、または-N（アリール）-）、硫黄（例えば、-S-、-S（=O）-、または-S（=O）₂-）、またはこれらの組合せから選択されるアルキル基を指す。いくつかの実施形態では、ヘテロアルキルは、ヘテロアルキルの炭素原子で分子の残りの部分に結合される。いくつかの実施形態では、ヘテロアルキルは、ヘテロアルキルのヘテロ原子で分子の残りの部分に結合される。いくつかの実施形態では、ヘテロアルキルは、C₁～C₆ヘテロアルキルである。代表的なヘテロアルキル基には、限定されないが、-OCH₂OMe、-OCH₂CH₂OH、-OCH₂CH₂OMe、または-OCH₂CH₂OCH₂CH₂NH₂が含まれる。「ヘテロアルキレン」または「ヘテロアルキレン鎖」は、分子の残りをラジカル基に連結する直鎖または分枝鎖の二価ヘテロアルキル鎖を指す。本明細書で特に断りのない限り、ヘテロアルキルまたはヘテロアルキレン基は、任意選択で置換されていてもよい。代表的なヘテロアルキレン基としては、限定するものではないが、-OCH₂CH₂O-、-OCH₂CH₂OCH₂CH₂O-、または-OCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂O-が挙げられる。

20

【0070】

【0083】用語「ヘテロアルケニル」とは、アルケニルの1つまたは複数の骨格原子が炭素以外の原子、例えば酸素、窒素（例えば、-NH-、-N（アルキル）-、または-N（アリール）-）、硫黄（例えば、-S-、-S（=O）-、または-S（=O）₂-）、またはこれらの組合せから選択されるアルケニル基を指す。いくつかの実施形態では、ヘテロアルケニルは、ヘテロアルケニルの炭素原子で分子の残りの部分に結合される。いくつかの実施形態では、ヘテロアルケニルは、ヘテロアルケニルのヘテロ原子で分子の残りの部分に結合される。いくつかの実施形態では、ヘテロアルケニルは、C₁～C₆ヘテロアルケニルである。

30

【0071】

【0084】用語「ヘテロアルキニル」とは、アルキニルの1つまたは複数の骨格原子が炭素以外の原子、例えば酸素、窒素（例えば、-NH-、-N（アルキル）-、または-N（アリール）-）、硫黄（例えば、-S-、-S（=O）-、または-S（=O）₂-）、またはこれらの組合せから選択されるアルキニル基を指す。いくつかの実施形態では、ヘテロアルキニルは、ヘテロアルキニルの炭素原子で分子の残りの部分に結合される。いくつかの実施形態では、ヘテロアルキニルは、ヘテロアルキニルのヘテロ原子で分子の残りの部分に結合される。いくつかの実施形態では、ヘテロアルキニルは、C₁～C₆ヘテロアルキニルである。

40

【0072】

【0085】本明細書中で用いる「N/P比」は、例えば、脂質成分およびRNAを含むナノ粒子組成物中の、核酸分子実体（または複数の核酸分子実体）内のリン酸基に対する、アミノ脂質（または複数の脂質）内のイオン化可能な（例えば、脂質ナノ粒子のpK_aに近いpH範囲内の）窒素原子のモル比である。イオン化可能な窒素原子は、例えば、約pH1、約pH2、約pH3、約pH4、約pH5、約pH6、約pH7、約pH7.5、

50

または約 pH 8 以上でプロトン化され得る窒素原子を含み得る。生理的 pH 範囲は、例えば、異なる細胞区画（器官、組織、および細胞など）および体液（血液、CSF、胃液、牛乳、胆汁、唾液、涙、および尿など）の pH 範囲を含み得る。ある種の実施形態では、生理学的 pH 範囲とは、哺乳動物における血液の pH 範囲、例えば、約 7.35 ~ 約 7.45 を指す。いくつかの実施形態では、イオン化可能な窒素原子とは、5 ~ 14 の pH 範囲内でイオン化可能な窒素原子を指す。

【0073】

【0086】リン酸基を含有しないペイロードについては、N/P 比は、ペイロード内の全負電荷に対する、脂質内のイオン化可能な窒素原子のモル比を指すことができる。例えば、LNP 組成物の N/P 比とは、組成物中に存在するペイロード内の全負電荷に対する、LNP 組成物内の全イオン化可能な窒素原子のモル比を指すことができる。

10

【0074】

【0087】本明細書で使用される場合、アミノ脂質は、pH 範囲 4 ~ 14 でプロトン化可能（またはイオン化可能）である少なくとも 1 つの第一級、第二級または第三級アミン部分を含有することができる。いくつかの実施形態では、アミン部分/複数のアミン部分は、表 1 A および 1 B に記載されるアミノ脂質の親水性頭部基として機能する。核酸-脂質ナノ粒子製剤中のアミノ脂質（または複数のアミノ脂質）のアミン部分（複数可）の大部分が生理学的 pH でプロトン化される場合、ナノ粒子はカチオン性脂質ナノ粒子（cLNP）と称される。核酸-脂質ナノ粒子製剤中のアミノ脂質（またはアミノ脂質）のアミン部分の大部分が生理的 pH でプロトン化されず、酸性 pH でプロトン化され得る場合、例えば、エンドソーム pH は、イオン化可能な脂質ナノ粒子（iLNP）と称され得る。cLNP を構成するアミノ脂質は、一般にカチオン性アミノ脂質（cLipid）と呼ばれる。iLNP を構成するアミノ脂質はイオン化可能なアミノ脂質（iLipid）と呼ばれる。表 1 A および 1 B に記載されるアミノ脂質は、生理学的 pH では iLipid または cLipid であり得る。

20

【0075】

【0088】本明細書で使用される場合、「脂質ナノ粒子（LNP）組成物」または「ナノ粒子組成物」は、1 つまたは複数の記載された脂質を含む組成物である。LNP 組成物は、典型的にはマイクロメートル以下のオーダーのサイズであり、脂質二重層を含み得る。ナノ粒子組成物には、脂質ナノ粒子（LNP）、リポソーム（脂質小胞など）、およびリポブレンクスが含まれる。例えば、ナノ粒子組成物は、直径 500 nm 以下の脂質二重層を有するリポソームであってもよい。本明細書に記載の LNP は、約 1 nm ~ 約 2500 nm、約 10 nm ~ 約 1500 nm、約 20 nm ~ 約 1000 nm、約 30 nm ~ 約 150 nm、約 40 nm ~ 約 150 nm、約 50 nm ~ 約 150 nm、約 60 nm ~ 約 130 nm、約 70 nm ~ 約 110 nm、約 70 nm ~ 約 100 nm、約 80 nm ~ 約 100 nm、約 90 nm ~ 約 100 nm、約 70 nm ~ 約 90 nm、約 80 nm ~ 約 90 nm、または約 70 nm ~ 約 80 nm の平均直径を有し得る。本明細書に記載の LNP は、約 30 nm、35 nm、40 nm、45 nm、50 nm、55 nm、60 nm、65 nm、70 nm、75 nm、80 nm、85 nm、90 nm、95 nm、100 nm、105 nm、110 nm、115 nm、120 nm、125 nm、130 nm、135 nm、140 nm、145 nm、150 nm、またはそれ以上の平均直径を有し得る。本明細書に記載の LNP は、実質的に非毒性であり得る。

30

40

【0076】

【0089】本明細書で使用される場合、「PEG-脂質」または「PEG-脂質」とは、ポリエチレングリコール成分を含む脂質を指す。

【0090】本明細書で使用される場合、「リン脂質」とは、リン酸部分および 1 つまたは複数の炭素鎖を含む脂質、例えば、不飽和脂肪酸鎖を指すことができる。リン脂質は、1 つまたは複数の複数の（例えば、二重または三重）結合を含み得る。いくつかの実施形態では、リン脂質は、膜への融合を促進し得る。例えば、カチオン性リン脂質は、膜（例えば、細胞膜または細胞内膜）の 1 つまたは複数の負に帯電したリン脂質と相互作用し得る

50

。リン脂質の膜への融合は、LNPの1つまたは複数のエレメントが膜を通過すること、すなわち、1つまたは複数のエレメントの細胞への送達を可能にし得る。

【0077】

【0091】用語「治療剤」とは、対象に投与された場合、治療効果、診断効果、および／または予防効果を有し、ならびに／または所望の生物学および／もしくは薬理学的効果を誘発する任意の薬剤を指すことができる。治療剤は、「活性剤」または「活性薬剤」とも呼ぶことができる。このような薬剤には、限定されないが、細胞毒素、放射性イオン、化学療法剤、小分子薬物、タンパク質および核酸が含まれる。

【0078】

【0092】用語「核酸分子実体」は、「核酸」と互換的に使用される。本明細書で使用される「核酸」という用語は、一般に、1つまたは複数の核酸塩基、ヌクレオシド、またはヌクレオチドを指し、この用語には、ポリ核酸塩基、ポリヌクレオシド、およびポリヌクレオチドが含まれる。核酸には、ポリヌクレオチド、モノヌクレオチド、およびオリゴヌクレオチドが含まれ得る。核酸は、DNA、RNA、またはそれらの混合物を含んでもよく、一本鎖、二本鎖、または部分的に一本鎖もしくは二本鎖であってもよく、二次構造を形成してもよい。いくつかの実施形態では、核酸は、複数の二本鎖セグメントおよび一本鎖セグメントを有する。例えば、核酸は、ポリヌクレオチド例えば、その中に複数の二本鎖セグメントを持つmRNAを含んでもよい。DNAは、例えば、アンチセンス分子、プラスミドDNA、予め凝縮されたDNA、PCR産物、ベクター、発現カセット、キメラ配列、染色体DNA、またはこれらの群の誘導体および組合せの形態であり得る。RNAは、siRNA、非対称干渉RNA (aiRNA)、マイクロRNA (miRNA)、mRNA、tRNA、rRNA、ウイルスRNA (vRNA)、CRISPR RNA、塩基編集因子RNAおよびそれらの組合せの形態であり得る。核酸としては、合成、天然、および非天然であり、かつ参照核酸と同様の結合特性を有する、既知のヌクレオチド類似体または改変された主鎖残基もしくは結合を含む核酸が挙げられる。このような類似体の例としては、限定されないが、ホスホロチオエート、ホスホルアミデート、メチルホスホネート、キラルーメチルホスホネート、2', 3', 4' および 5' 置換リボヌクレオチド、2', 3', 4' および 5' 置換 2'-リボヌクレオチド、置換および非置換炭素環式ヌクレオチド、置換および非置換非環式ヌクレオチド、ならびにペプチド-核酸 (PNA) が挙げられる。核酸の例には、非環状ヌクレオチドおよび炭素環状ヌクレオチド、例えばグリコール核酸も含まれる。特に限定しない限り、この用語は、参照核酸と同様の結合特性を有する天然ヌクレオチドの公知の類似体を含む核酸を包含する。特に断りのない限り、特定の核酸配列は、明示的に示された配列だけでなく、その保存的に改変されたバリエーション (例えば、縮重コドン置換)、対立遺伝子、オルソログ、SNP、および相補的配列も暗黙のうちに包含する。具体的には、縮重コドン置換は、1つまたは複数の選択された (または全ての) コドンの3番目の位置が混合塩基および／またはデオキシイノシン残基で置換されている配列を生成することによって達成され得る (Batzeraら、Nucleic Acid Res.、19:5081 (1991); Ohtsukaら、J Biol. Chem.、260:2605-2608 (1985); Rossoliniら、Mol. Cell. Probes、8:91-98 (1994))。「ヌクレオチド」は、置換および／もしくは非置換糖デオキシリボース (DNA)、または置換および／もしくは非置換糖リボース (RNA)、または置換および／もしくは非置換炭素環式、または置換および／または非置換非環式部分 (例えば、グリコール核酸)、塩基、およびリン酸基を含有する。ヌクレオチドは、リン酸基を介して一緒に結合されている。「塩基」には、プリンおよびピリミジンが挙げられ、これらにはさらに天然化合物のアデニン、チミン、グアニン、シトシン、ウラシル、イノシン、ならびにプリンおよびピリミジンの天然類似体および合成誘導体が含まれ、これには限定するものではないが、アミン、アルコール、チオール、カルボキシレート、およびハロゲン化アルキルなどの新しい反応基を配置する修飾を含む。「遺伝子」という用語は、ポリペプチドまたは前駆体ポリペプチドの産生に必要な部分長または全長コード配列を含む核酸 (例えば、DNAまたはRNA) 配

10

20

30

40

50

列を指す。

【0079】

【0093】別段の指示がない限り、特定の核酸配列はまた、その保存的に修飾されたバリエーション（例えば、縮重コドン置換）、対立遺伝子、オルソログ、SNP、および相補的配列、ならびに明示的に示された配列を暗黙的に包含する。具体的には、縮重コドン置換は、1つまたは複数の選択された（または全ての）コドンの第3の位置が、混合塩基および／またはデオキシイノシン残基で置換される配列を生成することによって達成することができる（Batzeraら、Nucleic Acid Res.、19巻：5081頁（1991年）；Ohtsukaら、J. Biol. Chem.、260巻：2605～2608頁（1985年）；Rossoliniら、Mol. Cell. Probes、8巻：91～98頁（1994年））。

10

【0080】

【0094】本開示は、単離または実質的に精製された核酸分子およびそれらの分子を含む組成物を包含する。本明細書で使用される場合、「単離された」もしくは「精製された」DNA分子またはRNA分子は、その天然環境から離れて存在するDNA分子またはRNA分子である。単離されたDNA分子またはRNA分子は、精製された形態で存在し得るか、または、例えば、トランスジェニック宿主細胞などの非天然環境で存在し得る。例えば、「単離された」または「精製された」核酸分子またはその生物学的に活性な部分は、組換え技術によって生成された場合、他の細胞材料もしくは培養培地を実質的に含まず、または化学的に合成された場合、化学的前駆体もしくは他の化学物質を実質的に含まない。一実施形態では、「単離された」核酸は、核酸が由来する生物のゲノムDNA中の核酸（すなわち、核酸の5'および3'末端に位置する配列）に天然に隣接する配列を含まない。例えば、いくつかの実施形態では、単離された核酸分子は、核酸が由来する細胞のゲノムDNA中の核酸分子に天然に隣接する約5 kb、4 kb、3 kb、2 kb、1 kb、0.5 kb、または0.1 kb未満のヌクレオチド配列を含有することができる。

20

【0081】

II. 脂質ナノ粒子（LNP）組成

アミノ脂質

【0095】本明細書には、アミノ脂質、リン脂質、PEG-脂質、コレステロールまたはその誘導体、パイロード、またはそれらの任意の組合せを含むLNP組成物が記載される。いくつかの実施形態では、LNP組成物はアミノ脂質を含む。例示的なアミノ脂質としては、限定されないが、表1Aの脂質が含まれる。いくつかの実施形態では、LNP組成物は、式（I）、式（I*）、式（Ia）、式（II）、式（II*）の構造を有するアミノ脂質、または薬学的に許容されるその塩もしくは溶媒和物を含む。いくつかの実施形態では、LNP組成物は、式（Ia）の構造を有するアミノ脂質、または薬学的に許容されるその塩もしくは溶媒和物を含む。いくつかの実施形態では、LNPは、複数のアミノ脂質を含む。例えば、LNP組成物は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれ以上のアミノ脂質を含んでもよい。別の例では、LNP組成物は、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも9、少なくとも10、または少なくとも20のアミノ脂質を含んでもよい。さらに別の例では、LNP組成物は、最大2個、最大3個、最大4個、最大5個、最大6個、最大7個、最大9個、最大10個、最大20個、または最大30個のアミノ脂質を含んでもよい。

30

40

【0082】

【0096】いくつかの実施形態では、LNP組成物は、1つまたは複数のアミノ脂質を含む。いくつかの実施形態では、1つまたは複数のアミノ脂質は、粒子中に存在する総脂質のうち約40 mol %～約65 mol %を構成する。いくつかの実施形態では、1つまたは複数のアミノ脂質は、粒子中に存在する総脂質のうち約40 mol %、約41 mol %、約42 mol %、約43 mol %、約44 mol %、約45 mol %、約46 mol %、約47 mol %、約48 mol %、約49 mol %、約50 mol %、約51 mol %、約52 mol %、約53 mol %、約54 mol %、約55 mol %、約56 mol %

50

、約 57 mol %、約 58 mol %、約 59 mol %、約 60 mol %、約 61 mol %、約 62 mol %、約 63 mol %、約 64 mol %、または約 65 mol % を構成する。

【0083】

【0097】いくつかの実施形態では、アミノ脂質はイオン化可能な脂質である。イオン性脂質は、1つまたは複数のイオン性窒素原子を含んでもよい。いくつかの実施形態では、1つまたは複数のイオン化可能な窒素原子のうちの少なくとも1つは、正に帯電している。いくつかの実施形態では、LNP組成物中のイオン化可能な窒素原子のうち少なくとも10 mol %、20 mol %、30 mol %、40 mol %、50 mol %、60 mol %、70 mol %、80 mol %、90 mol %、95 mol %、または99 mol %が、正に帯電している。いくつかの実施形態では、アミノ脂質は、第一級アミン、第二級アミン、第三級アミン、イミン、アミド、グアニジン部分、ヒスチジン残基、リジン残基、アルギニン残基、またはそれらの任意の組合せを含む。いくつかの実施形態では、アミノ脂質は、第一級アミン、第二級アミン、第三級アミン、グアニジン部分、またはそれらの任意の組合せを含む。いくつかの実施形態では、アミノ脂質は、第三級アミンを含む。

10

【0084】

【0098】いくつかの実施形態では、アミノ脂質はカチオン性脂質である。いくつかの実施形態では、アミノ脂質はイオン化可能な脂質である。いくつかの実施形態では、アミノ脂質は、1つまたは複数の窒素原子を含む。いくつかの実施形態では、アミノ脂質は、1つまたは複数のイオン化可能な窒素原子を含む。例示的なカチオン性および／またはイオン性脂質としては、限定するものではないが、3-(ジドデシルアミノ)-N1, N1, 4-トリドデシル-1-ピペラジンエタナミン(KL10)、N1-[2-(ジドデシルアミノ)エチル]-N1, N4, N4-トリドデシル-1, 4-ピペラジンジエタンアミン(KL22)、14, 25-ジトリドデシル-15, 18, 21, 24-テトラアザオクタトリアコンタン(KL25)、1, 2-ジリノレイルオキシ-N, N-ジメチルアミノプロパン(DLin-DMA)、2, 2-ジリノレイル-4-ジメチルアミノメチル-[1, 3]-ジオキソラン(DLin-K-DMA)、ヘプタトリアコンタ-6, 9, 28, 31-テトラエン-19-イル 4-(ジメチルアミノ)ブタノエート(DLin-MC3-DMA)、2, 2-ジリノレイル-4-(2-ジメチルアミノエチル)-[1, 3]-ジオキソラン(DLin-KC2-DMA)、1, 2-ジオレイルオキシ-N, N-ジメチルアミノプロパン(DODMA)、2-({8-[(3β)-コレスト-5-エン-3-イルオキシ] オクチル} オキシ)-N, N-ジメチル-3-[(9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエン-1-イルオキシ] プロパン-1-アミン(オクチル-CLinDMA)、(2R)-2-({8-[(3β)-コレスト-5-エン-3-イルオキシ] オクチル} オキシ)-N, N-ジメチル-3-[(9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエン-1-イルオキシ] プロパン-1-アミン(オクチル-CLinDMA(2R))、および(2S)-2-({8-[(3β)-コレスト-5-エン-3-イルオキシ] オクチル} オキシ)-N, N-ジメチル-3-[(9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエン-1-イルオキシ] プロパン-1-アミン(オクチル-CLinDMA(2S))が挙げられる。

20

30

40

【0085】

【0099】いくつかの実施形態では、アミノ脂質は、対称性であり、より少ない代謝産物をもたらす、分子をアキラルにすることができる。いくつかの実施形態では、アミノ脂質は、より多くの加水分解可能な結合を含み、その結果、脂質を含むナノ粒子のより速い代謝クリアランスをもたらす。いくつかの実施形態では、対称アキラルアミノ脂質は、LNP形成後の非対称アミノ脂質よりも、より大きいサイズのLNP粒子と比較して、哺乳動物対象の肝臓への効率的な送達をトランスアラートする、より密でありおよび／またはより小さな脂質ナノ粒子を生成するのを助ける。

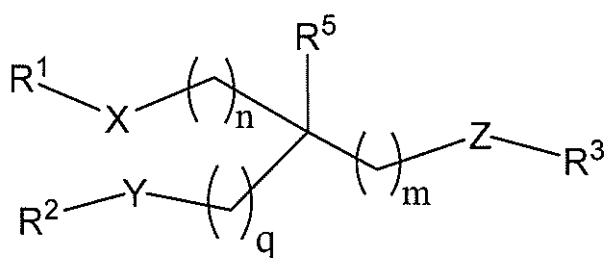
【0086】

【0100】一態様では、本明細書には、式(I)の構造

50

【 0 0 8 7 】

【 化 9 】



式(I)

10

【 0 0 8 8 】

を有するアミノ脂質、またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物が開示され、式中、

R¹ および R² の各々が独立に C₃ ~ C₃₀ アルキル、C₃ ~ C₃₀ アルケニル、C₃ ~ C₃₀ アルキニル、C₃ ~ C₁₀ シクロアルキル、C₃ ~ C₃₀ ヘテロアルキル、C₃ ~ C₃₀ ヘテロアルケニル、C₃ ~ C₃₀ ヘテロアルキニル、-C₀ ~ C₁₀ アルキレン-L-R⁶、または -C₂ ~ C₁₀ アルケニレン-L-R⁶ であり、アルキル、アルケニル、アルケニレン、アルキニル、ヘテロアルキル、ヘテロアルケニル、ヘテロアルキニル、およびシクロアルキルの各々が独立に置換されているか、または非置換であり；

20

X、Y、および Z の各々が独立に -C(=O)NR⁴-, -NR⁴C(=O)-, -C(=O)O-, -OC(=O)-, -OC(=O)O-, -NR⁴C(=O)O-, -OC(=O)NR⁴-, -NR⁴C(=O)NR⁴-, -NR⁴C(=NR⁴)NR⁴-, -C(=S)NR⁴-, -NR⁴C(=S)-, -C(=S)O-, -OC(=S)-, OC(=S)O-, -NR⁴C(=S)O-, -OC(=S)NR⁴-, -NR⁴C(=S)NR⁴-, -C(=O)S-, -SC(=O)-, -OC(=O)S-, -NR⁴C(=O)S-, -SC(=O)NR⁴-, -C(=S)S-, -SC(=S)-, -SC(=S)O-, -NR⁴C(=S)S-, -SC(=S)NR⁴-, -C(=S)S-, -SC(=S)-, -SC(=O)S-, -SC(=S)S-, -NR⁴C(=S)S-, -SC(=S)NR⁴-, -O-, -S-, または結合であり；

30

L の各々が独立に、-C(=O)NR⁴-, -NR⁴C(=O)-, -C(=O)O-, -OC(=O)-, -OC(=O)O-, -NR⁴C(=O)O-, -OC(=O)NR⁴-, -NR⁴C(=O)NR⁴-, -NR⁴C(=NR⁴)NR⁴-, -C(=S)NR⁴-, -NR⁴C(=S)-, -C(=S)O-, -OC(=S)-, OC(=S)O-, -NR⁴C(=S)O-, -OC(=S)NR⁴-, -NR⁴C(=S)NR⁴-, -C(=O)S-, -SC(=O)-, -OC(=O)S-, -NR⁴C(=O)S-, -SC(=O)NR⁴-, -C(=S)S-, -SC(=S)-, -SC(=S)O-, -NR⁴C(=S)S-, -SC(=S)NR⁴-, -C(=S)S-, -SC(=S)-, -SC(=O)S-, -SC(=S)S-, -NR⁴C(=S)S-, -SC(=S)NR⁴-, -O-N=CR⁴-, -CR⁴=N-O-, -O-, -S-, -C₁ ~ C₁₀ アルキレン-O-, -C₁ ~ C₁₀ アルキレン-C(=O)O-, -C₁ ~ C₁₀ アルキレン-OC(=O)-, または結合であり、アルキレンが置換されているか、または非置換であり；

40

R³ は、-C₀ ~ C₁₀ アルキレン-NR⁷R⁸、-C₀ ~ C₁₀ アルキレン-ヘテロシクロアルキル、または -C₀ ~ C₁₀ アルキレン-ヘテロシクロアリールであり、アルキレン、ヘテロシクロアルキルおよびヘテロシクロアリールが独立に置換されているか、または非置換であり；

R⁴ の各々が独立に水素または置換もしくは非置換の C₁ ~ C₆ アルキルであり；

50

R^5 は水素または置換もしくは非置換の $C_1 \sim C_6$ アルキルであり；

【0089】

R^6 の各々が独立に $C_3 \sim C_{30}$ アルキル、 $C_3 \sim C_{30}$ アルケニル、 $C_3 \sim C_{30}$ アルキニル、 $C_y - C_3 \sim C_{30}$ アルキル、 $C_y - C_3 \sim C_{30}$ アルケニル、または $C_y - C_3 \sim C_{30}$ アルキニルであり、アルキル、アルケニル、およびアルキニルがそれぞれ独立に、置換されているか、または非置換であり；

C_y の各々は、置換または非置換のシクロアルキル、置換または非置換のヘテロシクロアルキル、置換または非置換のアリール、置換または非置換のヘテロアリールであり；

R^7 および R^8 の各々が独立に水素または置換もしくは非置換の $C_1 \sim C_6$ アルキルであり、または R^7 および R^8 は、それらが結合している窒素と一緒にあって、置換もしくは非置換の $C_2 \sim C_6$ ヘテロシクリルを形成し；

n 、 m 、および q の各々が独立に 0、1、2、3、4、または 5 である。

【0090】

[0101] 式 (I) のいくつかの実施形態では、

X 、 Y 、 Z の各々が独立に $-R^{11}C(=O)N(R^9)R^4-$ 、 $-NR^7C(=O)R^4-$ 、 $-C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)-$ 、 $-R^{11}C(=O)OR^4-$ 、 $-R^{11}OC(=O)R^4-$ 、 $-R^{11}OC(=O)OR^4-$ 、 $-R^{11}N(R^9)C(=O)OR^4-$ 、 $-R^{11}OC(=O)N(R^9)R^4-$ 、 $-R^{11}(NR^9)C(=O)N(R^9)R^4-$ 、 $-R^{11}N(R^9)C(=NR^9)R^4-$ 、 $-R^{11}C(=S)N(R^9)R^4-$ 、 $-R^{11}N(R^9)C(=S)R^4-$ 、 $-R^{11}C(=S)OR^4-$ 、 $-R^{11}OC(=S)R^4-$ 、 $-R^{11}OC(=S)OR^4-$ 、 $-R^{11}N(R^9)C(=S)OR^4-$ 、 $-R^{11}OC(=S)N(R^9)R^4-$ 、 $-R^{11}N(R^9)C(=S)N(R^9)R^4-$ 、 $-R^{11}C(=O)SR^4-$ 、 $-R^{11}SC(=O)R^4-$ 、 $-R^{11}OC(=O)SR^4-$ 、 $-R^{11}N(R^9)C(=O)SR^4-$ 、 $-R^{11}SC(=O)N(R^9)R^4-$ 、 $-R^{11}C(=S)SR^4-$ 、 $-R^{11}SC(=S)R^4-$ 、 $-R^{11}SC(=S)OR^4-$ 、 $-R^{11}N(R^9)C(=S)SR^4-$ 、 $-R^{11}SC(=S)N(R^9)R^4-$ 、 $-R^{11}C(=S)SR^4-$ 、 $-R^{11}SC(=S)R^4-$ 、 $-R^{11}SC(=O)SR^4-$ 、 $-R^{11}SC(=S)SR^4-$ 、 $-R^{11}N(R^9)C(=S)SR^4-$ 、 $-R^{11}SC(=S)N(R^9)R^4-$ 、 $-R^{11}OR^4-$ 、 $-R^{11}SR^4-$ 、または結合であり；

L の各々が独立に、 $-R^{11}C(=O)N(R^9)R^4-$ 、 $-R^{11}N(R^9)C(=O)R^4-$ 、 $-R^{11}C(=O)OR^4-$ 、 $-R^{11}OC(=O)R^4-$ 、 $-R^{11}OC(=O)OR^4-$ 、 $-R^{11}N(R^9)C(=O)OR^4-$ 、 $-R^{11}OC(=O)N(R^9)R^4-$ 、 $-R^{11}N(R^9)C(=O)N(R^9)R^4-$ 、 $-R^{11}C(=S)N(R^9)R^4-$ 、 $-R^{11}N(R^9)C(=S)R^4-$ 、 $-R^{11}C(=S)OR^4-$ 、 $-R^{11}OC(=S)R^4-$ 、 $-R^{11}OC(=S)OR^4-$ 、 $-R^{11}N(R^9)C(=S)OR^4-$ 、 $-R^{11}OC(=S)N(R^9)R^4-$ 、 $-R^{11}N(R^9)C(=S)N(R^9)R^4-$ 、 $-R^{11}C(=O)SR^4-$ 、 $-R^{11}SC(=O)R^4-$ 、 $-R^{11}OC(=O)SR^4-$ 、 $-R^{11}N(R^9)C(=O)SR^4-$ 、 $-R^{11}SC(=O)N(R^9)R^4-$ 、 $-R^{11}C(=S)SR^4-$ 、 $-R^{11}SC(=S)R^4-$ 、 $-R^{11}SC(=S)OR^4-$ 、 $-R^{11}N(R^9)C(=S)SR^4-$ 、 $-R^{11}SC(=S)N(R^9)R^4-$ 、 $-R^{11}C(=S)SR^4-$ 、 $-R^{11}SC(=S)R^4-$ 、 $-R^{11}SC(=O)SR^4-$ 、 $-R^{11}SC(=S)SR^4-$ 、 $-R^{11}N(R^9)C(=S)SR^4-$ 、 $-R^{11}SC(=S)N(R^9)R^4-$ 、 $-R^{11}O-N=CR^4-$ 、 $-R^{11}C(R^{10})=N-OR^4-$ 、 $-R^{11}OR^4-$ 、 $-R^{11}SR^4-$ 、 $-C_1 \sim C_{10}$ アルキレン- $O-$ 、 $-C_1 \sim C_{10}$ アルキレン- $C(=O)O-$ 、 $-C_1 \sim C_{10}$ アルキレン- $OC(=O)-$ 、または結合であり、アルキレンが置換されるかまたは非置換であり；

R^4 の各々が独立に置換もしくは非置換の $C_1 \sim C_{16}$ アルキル、または非置換 $C_1 \sim C_{16}$ ヘテロアルキルであるか、または存在せず；

R^5 は、水素または置換もしくは非置換の $C_1 \sim C_{16}$ アルキルであり；

R^6 の各々が独立に水素、 $C_3 \sim C_{30}$ アルキル、 $C_3 \sim C_{30}$ アルケニル、 $C_3 \sim C_{30}$ アルキニル、 $Cy-C_3 \sim C_{30}$ アルキル、 $Cy-C_3 \sim C_{30}$ アルケニル、または $Cy-C_3 \sim C_{30}$ アルキニルであり、アルキル、アルケニルおよびアルキニルがそれぞれ独立に、置換されているか、または非置換である。

【0091】

R^7 の各々が独立に置換もしくは非置換の $C_1 \sim C_{16}$ アルキル、置換もしくは非置換の $C_1 \sim C_{16}$ ヘテロアルキルであるか、または存在せず；

R^9 の各々が独立に水素または置換もしくは非置換の $C_1 \sim C_{16}$ アルキル、または非置換 $C_1 \sim C_{16}$ ヘテロアルキルであり；

R^{10} の各々が独立に水素または置換もしくは非置換の $C_1 \sim C_{16}$ アルキル、または非置換 $C_1 \sim C_{16}$ ヘテロアルキルであり；

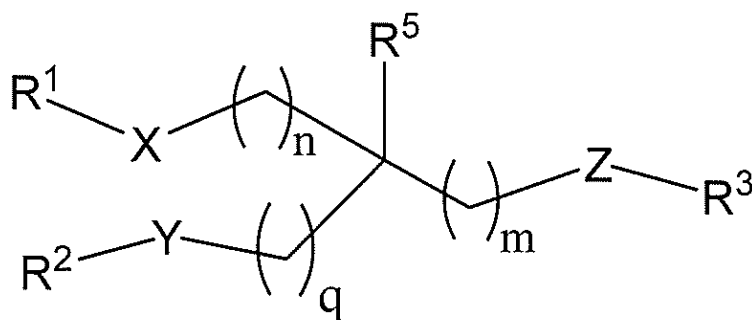
R^{11} の各々が独立に置換もしくは非置換の $C_1 \sim C_{16}$ アルキル、または非置換 $C_1 \sim C_{16}$ ヘテロアルキルである。

【0092】

[0102]一態様では、本明細書には、式 (I*) の構造

【0093】

【化10】



式(I*)

【0094】

を有するアミノ脂質、またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物が開示され、式中、

R^1 は、水素、 $C_3 \sim C_{30}$ アルキル、 $C_3 \sim C_{30}$ アルケニル、 $C_3 \sim C_{30}$ アルキニル、 $C_3 \sim C_{30}$ ヘテロアルキル、 $C_3 \sim C_{30}$ ヘテロアルキニル、 $C_3 \sim C_{30}$ ヘテロアルキニル、 $C_3 \sim C_{10}$ シクロアルキル、 $-C_0 \sim C_{10}$ アルキレン- $L-R^6$ 、または $-C_2 \sim C_{10}$ アルケニレン- $L-R^6$ であり、アルキル、アルキレン、アルケニル、アルケニレン、アルキニル、ヘテロアルキル、ヘテロアルケニル、ヘテロアルキニル、ヘテロアルキニル、およびシクロアルキルの各々が独立に置換されているか、または非置換であり；

R^2 は、水素、 $C_3 \sim C_{30}$ アルキル、 $C_3 \sim C_{30}$ アルケニル、 $C_3 \sim C_{30}$ アルキニル、 $C_3 \sim C_{30}$ ヘテロアルキル、 $C_3 \sim C_{30}$ ヘテロアルケニル、 $C_3 \sim C_{30}$ ヘテロアルキニル、 $C_3 \sim C_{10}$ シクロアルキル、 $-C_0 \sim C_{10}$ アルキレン- $L-R^6$ 、または $-C_2 \sim C_{10}$ アルケニレン- $L-R^6$ であり、アルキル、アルキレン、アルケニル、アルケニレン、アルキニル、ヘテロアルキル、ヘテロアルケニル、ヘテロアルキニル、ヘテロアルキニル、およびシクロアルキルの各々が独立に置換されているか、または非置換であり；

X、Y、Z の各々が独立に $-C(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=O)-$ 、 $-C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)-$ 、 $-OC(=O)O-$ 、 $-NR^4C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=NR^4)NR^4-$ 、 $-C($

$=S) NR^4-$ 、 $-NR^4 C(=S)-$ 、 $-C(=S) O-$ 、 $-OC(=S)-$ 、 $OC(=S) O-$ 、 $-NR^4 C(=S) O-$ 、 $-OC(=S) NR^4-$ 、 $-NR^4 C(=S) NR^4-$ 、 $-C(=O) S-$ 、 $-SC(=O)-$ 、 $-OC(=O) S-$ 、 $-NR^4 C(=O) S-$ 、 $-SC(=O) NR^4-$ 、 $-C(=S) S-$ 、 $-SC(=S)-$ 、 $-SC(=S) O-$ 、 $-NR^4 C(=S) S-$ 、 $-SC(=S) NR^4-$ 、 $-C(=S) S-$ 、 $-SC(=S)-$ 、 $-SC(=O) S-$ 、 $-SC(=S) S-$ 、 $-NR^4 C(=S) S-$ 、 $-SC(=S) NR^4-$ 、 $-R^{11} C(=O) N(R^4) R^9-$ 、 $-NR^7 C(=O) R^9-$ 、 $-C(=O) O-$ 、 $-OC(=O)-$ 、 $-R^{11} C(=O) OR^9-$ 、 $-R^{11} OC(=O) R^9-$ 、 $-R^{11} OC(=O) OR^9-$ 、 $-R^{11} N(R^4) C(=O) OR^9-$ 、 $-R^{11} OC(=O) N(R^4) R^9-$ 、 $-R^{11} (NR^4) C(=O) N(R^4) R^9-$ 、 $-R^{11} N(R^4) C(=NR^4) R^9-$ 、 $-R^{11} C(=S) N(R^4) R^9-$ 、 $-R^{11} N(R^4) C(=S) R^9-$ 、 $-R^{11} C(=S) OR^9-$ 、 $-R^{11} OC(=S) R^9-$ 、 $-R^{11} OC(=S) OR^9-$ 、 $-R^{11} N(R^4) C(=S) OR^9-$ 、 $-R^{11} OC(=S) N(R^4) R^9-$ 、 $-R^{11} N(R^4) C(=S) N(R^4) R^9-$ 、 $-R^{11} C(=O) SR^9-$ 、 $-R^{11} SC(=O) R^9-$ 、 $-R^{11} OC(=O) SR^9-$ 、 $-R^{11} N(R^4) C(=O) SR^9-$ 、 $-R^{11} SC(=O) N(R^4) R^9-$ 、 $-R^{11} C(=S) SR^9-$ 、 $-R^{11} SC(=S) R^9-$ 、 $-R^{11} SC(=S) OR^9-$ 、 $-R^{11} N(R^4) C(=S) SR^9-$ 、 $-R^{11} SC(=S) N(R^4) R^9-$ 、 $-R^{11} C(=S) SR^9-$ 、 $-R^{11} SC(=S) R^9-$ 、 $-R^{11} SC(=O) SR^9-$ 、 $-R^{11} SC(=S) SR^9-$ 、 $-R^{11} N(R^4) C(=S) SR^9-$ 、 $-R^{11} SC(=S) N(R^4) R^9-$ 、 $-R^{11} OR^9-$ 、 $-R^{11} SR^9-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、または結合であり；

Lの各々が独立に、 $-C(=O) NR^4-$ 、 $-NR^4 C(=O)-$ 、 $-C(=O) O-$ 、 $-OC(=O)-$ 、 $-C(=O)-$ 、 $-OC(=O) O-$ 、 $-NR^4 C(=O) O-$ 、 $-OC(=O) NR^4-$ 、 $-NR^4 C(=O) NR^4-$ 、 $-NR^4 C(=NR^4) NR^4-$ 、 $-C(=S) NR^4-$ 、 $-NR^4 C(=S)-$ 、 $-C(=S) O-$ 、 $-OC(=S)-$ 、 $OC(=S) O-$ 、 $-NR^4 C(=S) O-$ 、 $-OC(=S) NR^4-$ 、 $-NR^4 C(=S) NR^4-$ 、 $-C(=O) S-$ 、 $-SC(=O)-$ 、 $-OC(=O) S-$ 、 $-NR^4 C(=O) S-$ 、 $-SC(=O) NR^4-$ 、 $-C(=S) S-$ 、 $-SC(=S)-$ 、 $-SC(=S) O-$ 、 $-NR^4 C(=S) S-$ 、 $-SC(=S) NR^4-$ 、 $-C(=S) S-$ 、 $-SC(=S)-$ 、 $-SC(=O) S-$ 、 $-SC(=S) S-$ 、 $-NR^4 C(=S) S-$ 、 $-SC(=S) NR^4-$ 、 $-O-N=CR^4-$ 、 $-CR^4=N-O-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-R^{11} C(=O) N(R^4) R^9-$ 、 $-R^{11} N(R^4) C(=O) R^9-$ 、 $-R^{11} C(=O) OR^9-$ 、 $-R^{11} OC(=O) R^9-$ 、 $-R^{11} OC(=O) OR^9-$ 、 $-R^{11} N(R^4) C(=O) OR^9-$ 、 $-R^{11} OC(=O) N(R^4) R^9-$ 、 $-R^{11} N(R^4) C(=O) N(R^4) R^9-$ 、 $-R^{11} N(R^4) C(=NR^4) N(R^4) R^9-$ 、 $-R^{11} C(=S) N(R^4) R^9-$ 、 $-R^{11} N(R^4) C(=S) R^9-$ 、 $-R^{11} C(=S) OR^9-$ 、 $-R^{11} OC(=S) R^9-$ 、 $-R^{11} OC(=S) OR^9-$ 、 $-R^{11} N(R^4) C(=S) OR^9-$ 、 $-R^{11} OC(=S) N(R^4) R^9-$ 、 $-R^{11} N(R^4) C(=S) N(R^4) R^9-$ 、 $-R^{11} C(=O) SR^9-$ 、 $-R^{11} SC(=O) R^9-$ 、 $-R^{11} OC(=O) SR^9-$ 、 $-R^{11} N(R^4) C(=O) SR^9-$ 、 $-R^{11} SC(=O) N(R^4) R^9-$ 、 $-R^{11} C(=S) SR^9-$ 、 $-R^{11} SC(=S) R^9-$ 、 $-R^{11} SC(=S) OR^9-$ 、 $-R^{11} N(R^4) C(=S) SR^9-$ 、 $-R^{11} SC(=S) N(R^4) R^9-$ 、 $-R^{11} C(=S) SR^9-$ 、 $-R^{11} SC(=S) R^9-$ 、 $-R^{11} SC(=O) SR^9-$ 、 $-R^{11} SC(=S) SR^9-$ 、 $-R^{11} N(R^4) C(=S) SR^9-$ 、 $-R^{11} SC(=S) N(R^4) R^9-$ 、 $-R^{11} O-N=CR^9-$ 、 $-R^{11} C(R^{10})=N-OR^9-$ 、 $-R^{11} OR^9-$ 、 $-R^{11} SR^9-$ 、 $-C_1 \sim C_{10}$ アルキレン- $C(=O) O-$ 、 $-C_1 \sim C_{10}$ アルキレン- $OC(=O)-$ 、 $-C_1 \sim C_{10}$ アルキレン- $O-$ 、 $-C_1 \sim C_{10}$ アルキレン- $C(=O) O-$ 、 $-C_1 \sim C_{10}$ アルキレン- $OC(=O)-$ 、または結合であり、アルキレンは置換されて

いるか、または非置換であり；

R^3 は、 $-C_0 \sim C_{10}$ アルキレン- NR^7R^8 、 $-C_0 \sim C_{10}$ アルキレン-ヘテロシクロアルキル、または $-C_0 \sim C_{10}$ アルキレン-ヘテロシクロアリールであり、アルキレン、ヘテロシクロアルキルおよびヘテロシクロアリールは独立に置換されているか、または非置換であり；

R^4 の各々が独立に水素、置換もしくは非置換の $C_1 \sim C_{16}$ アルキル、または置換もしくは非置換の $C_1 \sim C_{16}$ ヘテロアルキルであり；

R^5 は、水素または置換もしくは非置換の $-C_0 \sim C_{10}$ アルキレン- $L-R^4$ であり；

R^6 の各々が独立に水素、 $C_3 \sim C_{30}$ アルキル、 $C_3 \sim C_{30}$ アルケニル、 $C_3 \sim C_{30}$ アルキニル、 $Cy-C_3 \sim C_{30}$ アルキル、 $Cy-C_3 \sim C_{30}$ アルケニル、または $Cy-C_3 \sim C_{30}$ アルキニルであり、アルキル、アルケニルおよびアルキニルがそれぞれ独立に、置換されているか、または非置換であり；

Cy の各々は、置換または非置換のシクロアルキル、置換または非置換のヘテロシクロアルキル、置換または非置換のアリール、置換または非置換のヘテロアリールであり；

R^7 および R^8 の各々が独立に水素または置換もしくは非置換の $C_1 \sim C_{16}$ アルキル、置換もしくは非置換の $C_1 \sim C_{16}$ ヘテロアルキルであり、または R^7 および R^8 は、それらが結合している窒素と一緒にあって、置換もしくは非置換の $C_2 \sim C_6$ ヘテロシクリルを形成し；

R^9 の各々が独立に水素または置換もしくは非置換の $C_1 \sim C_{16}$ アルキレン、または非置換 $C_1 \sim C_{16}$ ヘテロアルキレンであり；

R^{10} の各々が独立に水素または置換もしくは非置換の $C_1 \sim C_{16}$ アルキレンであり、または非置換 $C_1 \sim C_{16}$ ヘテロアルキレンであり；

R^{11} の各々が独立に置換もしくは非置換の $C_1 \sim C_{16}$ アルキレンまたは非置換 $C_1 \sim C_{16}$ ヘテロアルキレンであり；

n 、 m 、および q の各々が独立に 0、1、2、3、4、または 5 である。

【0095】

【0103】いくつかの実施形態では、式 (I*) の R^5 は、水素または置換もしくは非置換の $C_1 \sim C_{16}$ アルキルである。いくつかの実施形態では、式 (I*) の R^5 は、置換または非置換の $C_1 \sim C_{16}$ アルキルである。

【0096】

【0104】式 (I) または (I*) のいくつかの実施形態では、構造が 1 を超える不斉 C 原子を有する場合、各不斉 C 原子は、独立してラセミ体、キラル的に純粋な R 異性体および／またはキラル的に純粋な S 異性体、またはこれらの組合せを表す。

【0097】

【0105】いくつかの実施形態では、式 (I) または (I*) における n 、 m および q の各々が独立に 0、1、2 または 3 である。いくつかの実施形態では、式 (I) または (I*) における n および m の各々は 1 である。いくつかの実施形態では、 n は 0 である。いくつかの実施形態では、 n は 1 である。いくつかの実施形態では、 n は 2 である。いくつかの実施形態では、 n は 3 である。いくつかの実施形態では、 m は 0 である。いくつかの実施形態では、 m は 1 である。いくつかの実施形態では、 m は 2 である。いくつかの実施形態では、 m は 3 である。いくつかの実施形態では、 q は 0 である。いくつかの実施形態では、 q は 1 である。いくつかの実施形態では、 q は 2 である。いくつかの実施形態では、 q は 3 である。

【0098】

【0106】いくつかの実施形態では、式 (I) または (I*) の化合物は、式 (Ia) の構造：

【0099】

10

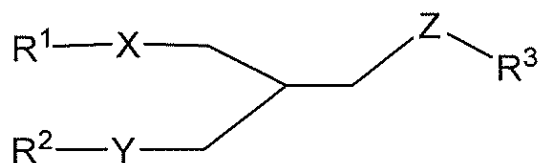
20

30

40

50

【化 1 1】



式(1a)

10

【0100】

を有し、またはその薬学的に許容される塩もしくはその薬学的に許容される溶媒和物であり、式中、

R^1 および R^2 の各々が独立に $C_3 \sim C_{30}$ アルキル、 $C_3 \sim C_{30}$ アルケニル、 $C_3 \sim C_{30}$ アルキニル、 $C_3 \sim C_{10}$ シクロアルキル、 $C_3 \sim C_{30}$ ヘテロアルキル、 $C_3 \sim C_{30}$ ヘテロアルケニル、 $C_3 \sim C_{30}$ ヘテロアルキニル、 $-C_0 \sim C_{10}$ アルキレン-L- R^6 、または $-C_2 \sim C_{10}$ アルケニレン-L- R^6 であり、アルキル、アルキレン、アルケニル、アルケニレン、アルキニル、ヘテロアルキル、ヘテロアルケニル、ヘテロアルキニル、およびシクロアルキルの各々が独立に置換されているか、または非置換であり；

X、Y、Zの各々が独立に $C(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=O)-$ 、 $-C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)-$ 、 $-OC(=O)O-$ 、 $-NR^4C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=NR^4)NR^4-$ 、 $-C(=S)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=S)-$ 、 $-C(=S)O-$ 、 $-OC(=S)-$ 、 $OC(=S)O-$ 、 $-NR^4C(=S)O-$ 、 $-OC(=S)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=S)NR^4-$ 、 $-C(=O)S-$ 、 $-SC(=O)-$ 、 $-OC(=O)S-$ 、 $-NR^4C(=O)S-$ 、 $-SC(=O)NR^4-$ 、 $-C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)-$ 、 $-SC(=S)O-$ 、 $-NR^4C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)NR^4-$ 、 $-C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)-$ 、 $-SC(=O)S-$ 、 $-SC(=S)S-$ 、 $-NR^4C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)NR^4-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-C_1 \sim C_{10}$ アルキレン-O-、または結合であり、アルキレンは置換されているか、または非置換であり；

30

Lの各々が独立に $-C(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=O)-$ 、 $-C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)-$ 、 $-OC(=O)O-$ 、 $-NR^4C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=NR^4)NR^4-$ 、 $-C(=S)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=S)-$ 、 $-C(=S)O-$ 、 $-OC(=S)-$ 、 $OC(=S)O-$ 、 $-NR^4C(=S)O-$ 、 $-OC(=S)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=S)NR^4-$ 、 $-C(=O)S-$ 、 $-SC(=O)-$ 、 $-OC(=O)S-$ 、 $-NR^4C(=O)S-$ 、 $-SC(=O)NR^4-$ 、 $-C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)-$ 、 $-SC(=S)O-$ 、 $-NR^4C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)NR^4-$ 、 $-C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)-$ 、 $-SC(=O)S-$ 、 $-SC(=S)S-$ 、 $-NR^4C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)NR^4-$ 、 $-O-N=CR^4-$ 、 $-CR^4=N-O-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-C_1 \sim C_{10}$ アルキレン-O-、 $-C_1 \sim C_{10}$ アルキレン-C(=O)O-、 $-C_1 \sim C_{10}$ アルキレン-OC(=O)-、または結合であり、アルキレンは置換されているか、または非置換であり；

40

R^3 は、 $-C_0 \sim C_{10}$ アルキレン- NR^7R^8 、または $-C_0 \sim C_{10}$ アルキレン-ヘテロシクロアルキルであり、アルキレンおよびヘテロシクロアルキルがそれぞれ独立に、置換されているか、または非置換であり；

R^4 の各々が独立に水素または置換もしくは非置換の $C_1 \sim C_6$ アルキルであり；

R^6 の各々が独立に $C_3 \sim C_{30}$ アルキル、 $C_3 \sim C_{30}$ アルケニル、 $C_3 \sim C_{30}$ アルキニル、 $C_y-C_3 \sim C_{30}$ アルキル、 $C_y-C_3 \sim C_{30}$ アルケニル、または $C_y-C_3 \sim C_{30}$ アルキニルであり、アルキル、アルケニル、およびアルキニルがそれぞれ独立に、置換

50

されているか、または非置換であり；

C_yの各々は、置換または非置換のシクロアルキル、置換または非置換のヘテロシクロアルキル、置換または非置換のアリール、置換または非置換のヘテロアリールであり；

R⁷およびR⁸の各々が独立に水素または置換もしくは非置換のC₁～C₆アルキルであり、またはR⁷およびR⁸は、それらが結合している窒素と一緒にあって、置換もしくは非置換のC₂～C₆ヘテロシクリルを形成する。

【0101】

【0107】式(I a)のいくつかの実施形態では、構造が1を超える不斉C原子を有する場合、各不斉C原子は、独立してラセミ体、キラル的に純粋なR異性体および／もしくはキラル的に純粋なS異性体、またはこれらの組合せを表す。

10

【0102】

【0108】いくつかの実施形態では、式(I)、式(I*)、式(I a)または式(I b)の化合物は、R¹および／またはR²上の非対称ヘテロ原子を含む。

【0109】いくつかの実施形態では、式(I)、式(I*)または式(I a)における各R¹およびR²は、独立してC₅～C₃₀アルキル、C₅～C₃₀アルケニル、C₅～C₃₀アルキニル、C₃～C₁₀シクロアルキル、-C₀～C₁₀アルキレン-L-R⁶または-C₂～C₁₀アルケニレン-L-R⁶であり、アルキル、アルキレン、アルケニル、アルケニレン、アルキニル、およびシクロアルキルの各々が独立に置換されているか、または非置換である。いくつかの実施形態では、式(I)、式(I*)、式(I a)、または式(I b)における各R¹およびR²は、独立してC₇～C₂₈アルキル、C₇～C₂₈アルケニル、C₇～C₂₈アルキニル、C₃～C₁₀シクロアルキル、-C₀～C₁₀アルキレン-L-R⁶、または-C₂～C₁₀アルケニレン-L-R⁶であり、アルキル、アルキレン、アルケニル、アルケニレン、アルキニル、およびシクロアルキルの各々が独立に置換されているか、または非置換である。いくつかの実施形態では、式(I)、式(I*)、式(I a)、または式(I b)における各R¹およびR²は、独立してC₇～C₂₅アルキル、C₇～C₂₅アルケニル、C₇～C₂₅アルキニル、C₃～C₁₀シクロアルキル、-C₀～C₁₀アルキレン-L-R⁶、または-C₂～C₁₀アルケニレン-L-R⁶であり、アルキル、アルキレン、アルケニル、アルケニレン、アルキニル、およびシクロアルキルの各々が独立に置換されているか、または非置換である。いくつかの実施形態では、式(I)、式(I*)、式(I a)、または式(I b)における各R¹およびR²は、独立してC₇～C₂₂アルキル、C₇～C₂₂アルケニル、C₇～C₂₂アルキニル、C₃～C₁₀シクロアルキル、-C₀～C₁₀アルキレン-L-R⁶、または-C₂～C₁₀アルケニレン-L-R⁶であり、アルキル、アルキレン、アルケニル、アルケニレン、アルキニル、およびシクロアルキルの各々が独立に置換されているか、または非置換である。いくつかの実施形態では、式(I)、式(I*)、式(I a)、または式(I b)における各R¹およびR²は、独立してC₁₀～C₂₀アルキル、C₁₀～C₂₀アルケニル、-C₄～C₈アルキレン-L-R⁶、または-C₄～C₈アルケニレン-L-R⁶であり、アルキル、アルキレン、アルケニル、およびシクロアルキルの各々が独立に置換されているか、または非置換である。いくつかの実施形態では、式(I)、式(I*)、式(I a)または式(I b)における各R¹およびR²は、-C₀～C₁₀アルキレン-L-R⁶である。いくつかの実施形態では、式(I)、式(I*)、式(I a)または式(I b)における各R¹およびR²は、C₇～C₃₀アルケニルである。いくつかの実施形態では、式(I)、式(I*)、式(I a)または式(I b)における各R¹およびR²は、C₇～C₂₈アルケニルである。いくつかの実施形態では、式(I)、式(I*)、式(I a)または式(I b)における各R¹およびR²は、C₇～C₂₅アルケニルである。いくつかの実施形態では、式(I)、式(I*)、式(I a)または式(I b)における各R¹およびR²は、C₇～C₂₂アルケニルである。

20

30

40

【0103】

【0110】いくつかの実施形態では、式(I)、式(I*)、式(I a)、または式(I b)における各R¹およびR²は、独立して置換もしくは非置換の直鎖状もしくは分岐状

50

の $C_3 \sim C_{30}$ アルキル、または置換もしくは非置換の直鎖状もしくは分岐状の $C_3 \sim C_{30}$ アルケニルである。いくつかの実施形態では、式 (I)、式 (I*)、式 (Ia)、または式 (Ib) における各 R^1 および R^2 は、独立して置換もしくは非置換の直鎖状もしくは分岐状の $C_3 \sim C_{28}$ アルキル、または置換もしくは非置換の直鎖状もしくは分岐状の $C_3 \sim C_{28}$ アルケニルである。いくつかの実施形態では、式 (I)、式 (I*)、式 (Ia)、または式 (Ib) における各 R^1 および R^2 は、独立して置換もしくは非置換の $C_3 \sim C_{25}$ アルキル、または置換もしくは非置換の $C_3 \sim C_{25}$ アルケニルである。いくつかの実施形態では、式 (I)、式 (I*)、式 (Ia)、または式 (Ib) における各 R^1 および R^2 は、独立して置換または非置換の $C_3 \sim C_{25}$ アルキルである。いくつかの実施形態では、式 (I)、式 (I*)、式 (Ia)、または式 (Ib) における各 R^1 および R^2 は、独立して C_3 アルキル、 C_4 アルキル、 C_5 アルキル、 C_6 アルキル、 C_7 アルキル、 C_8 アルキル、 C_9 アルキル、 C_{10} アルキル、 C_{11} アルキル、 C_{12} アルキル、 C_{13} アルキル、 C_{14} アルキル、 C_{15} アルキル、 C_{16} アルキル、 C_{17} アルキル、 C_{18} アルキル、 C_{19} アルキル、 C_{20} アルキル、 C_{21} アルキル、 C_{22} アルキル、 C_{23} アルキル、 C_{24} アルキル、または C_{25} アルキルである。いくつかの実施形態では、式 (I)、式 (I*)、式 (Ia)、または式 (Ib) 各 R^1 および R^2 は、独立して少なくとも C_3 アルキル、少なくとも C_4 アルキル、少なくとも C_5 アルキル、少なくとも C_6 アルキル、少なくとも C_7 アルキル、少なくとも C_8 アルキル、少なくとも C_9 アルキル、少なくとも C_{10} アルキル、少なくとも C_{11} アルキル、少なくとも C_{12} アルキル、少なくとも C_{13} アルキル、少なくとも C_{14} アルキル、少なくとも C_{15} アルキル、少なくとも C_{16} アルキル、少なくとも C_{17} アルキル、少なくとも C_{18} アルキル、少なくとも C_{19} アルキル、少なくとも C_{20} アルキル、少なくとも C_{21} アルキル、少なくとも C_{22} アルキル、少なくとも C_{23} アルキル、少なくとも C_{24} アルキル、または少なくとも C_{25} アルキルである。いくつかの実施形態では、式 (I)、式 (I*)、式 (Ia)、または式 (Ib) における各 R^1 および R^2 は、独立して多くとも C_3 アルキル、多くとも C_4 アルキル、多くとも C_5 アルキル、多くとも C_6 アルキル、多くとも C_7 アルキル、多くとも C_8 アルキル、多くとも C_9 アルキル、多くとも C_{10} アルキル、多くとも C_{11} アルキル、多くとも C_{12} アルキル、多くとも C_{13} アルキル、多くとも C_{14} アルキル、多くとも C_{15} アルキル、多くとも C_{16} アルキル、多くとも C_{17} アルキル、多くとも C_{18} アルキル、多くとも C_{19} アルキル、多くとも C_{20} アルキル、多くとも C_{21} アルキル、多くとも C_{22} アルキル、多くとも C_{23} アルキル、多くとも C_{24} アルキル、または多くとも C_{25} アルキルである。いくつかの実施形態では、式 (I)、式 (I*)、式 (Ia) または式 (Ib) における各 R^1 および R^2 は、独立して $C_8 \sim C_{24}$ アルキルである。いくつかの実施形態では、式 (I)、式 (I*)、式 (Ia) または式 (Ib) における各 R^1 および R^2 は、独立して $C_{12} \sim C_{24}$ アルキルである。いくつかの実施形態では、式 (I)、式 (I*)、式 (Ia) または式 (Ib) における各 R^1 および R^2 は、独立して $C_6 \sim C_{15}$ アルキルである。いくつかの実施形態では、式 (I)、式 (I*)、式 (Ia) または式 (Ib) における各 R^1 および R^2 は、独立して置換または非置換の $C_3 \sim C_{25}$ アルケニルである。いくつかの実施形態では、式 (I)、式 (I*)、式 (Ia)、または式 (Ib) における各 R^1 および R^2 は、独立して C_3 アルケニル、 C_4 アルケニル、 C_5 アルケニル、 C_6 アルケニル、 C_7 アルケニル、 C_8 アルケニル、 C_9 アルケニル、 C_{10} アルケニル、 C_{11} アルケニル、 C_{12} アルケニル、 C_{13} アルケニル、 C_{14} アルケニル、 C_{15} アルケニル、 C_{16} アルケニル、 C_{17} アルケニル、 C_{18} アルケニル、 C_{19} アルケニル、 C_{20} アルケニル、 C_{21} アルケニル、 C_{22} アルケニル、 C_{23} アルケニル、 C_{24} アルケニルまたは C_{25} アルケニルである。いくつかの実施形態では、式 (I)、式 (I*)、式 (Ia)、または式 (Ib) における各 R^1 および R^2 は、独立して少なくとも C_3 アルケニル、少なくとも C_4 アルケニル、少なくとも C_5 アルケニル、少なくとも C_6 アルケニル、少なくとも C_7 アルケニル、少なくとも C_8 アルケニル、少なくとも C_9 アルケニル、少なくとも C_{10} アルケニル、少なくとも C_{11} アルケニル、少

10

20

30

40

50

なくとも C_{13} アルケニル、少なくとも C_{14} アルケニル、少なくとも C_{15} アルケニル、少なくとも C_{16} アルケニル、少なくとも C_{17} アルケニル、少なくとも C_{18} アルケニル、少なくとも C_{19} アルケニル、少なくとも C_{20} アルケニル、少なくとも C_{21} アルケニル、少なくとも C_{22} アルケニル、少なくとも C_{23} アルケニル、少なくとも C_{24} アルケニル、または少なくとも C_{25} アルケニルである。いくつかの実施形態では、式 (I)、式 (I^{*})、式 (I a)、または式 (I b) における各 R^1 および R^2 は、独立して C_3 アルケニル、多くとも C_4 アルケニル、多くとも C_5 アルケニル、多くとも C_6 アルケニル、多くとも C_7 アルケニル、多くとも C_8 アルケニル、多くとも C_9 アルケニル、多くとも C_{10} アルケニル、多くとも C_{11} アルケニル、多くとも C_{12} アルケニル、多くとも C_{13} アルケニル、多くとも C_{14} アルケニル、多くとも C_{15} アルケニル、多くとも C_{16} アルケニル、多くとも C_{17} アルケニル、多くとも C_{18} アルケニル、多くとも C_{19} アルケニル、多くとも C_{20} アルケニル、多くとも C_{21} アルケニル、多くとも C_{22} アルケニル、多くとも C_{23} アルケニル、多くとも C_{24} アルケニル、または多くとも C_{25} アルケニルである。

10

【0104】

[0111] 式 (I)、式 (I^{*})、式 (I a) または式 (I b) の化合物のいくつかの実施形態では、 R^1 および R^2 がそれぞれ独立に、置換されているか、または非置換である $C_y - C_{3 \sim 30}$ アルキルである。いくつかの実施形態では、 C_y は二環式である。いくつかの実施形態では、 C_y は単環式である。いくつかの実施形態では、 C_y は、0～2個の窒素と0～1個の酸素を有する二環式ヘテロアリールである。いくつかの実施形態では、 C_y は、0～2個の窒素と0～1個の酸素を有する二環式ヘテロアルキルである。

20

【0105】

[0112] いくつかの実施形態では、式 (I)、式 (I^{*})、式 (I a) または式 (I b) における R^1 および／または R^2 は、独立して

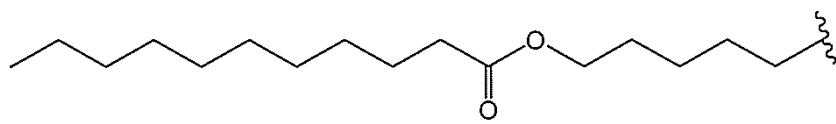
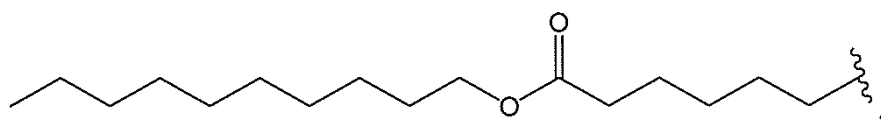
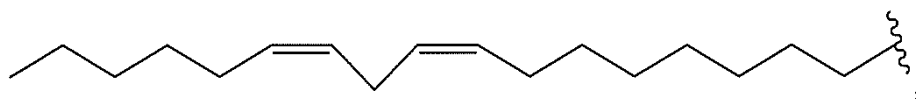
【0106】

30

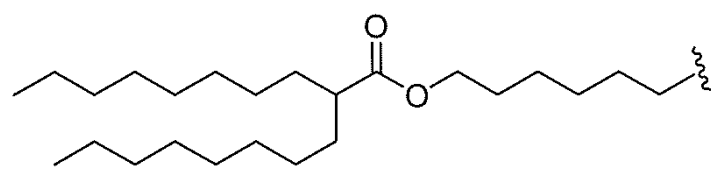
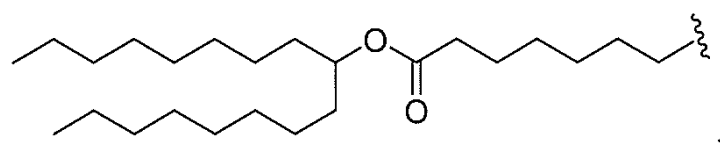
40

50

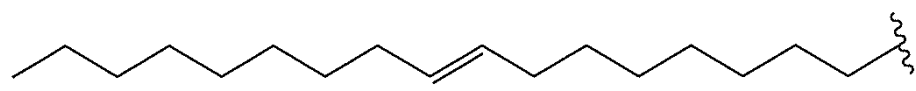
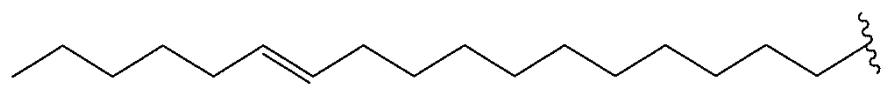
【化 1 2】



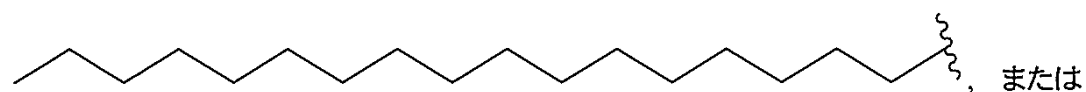
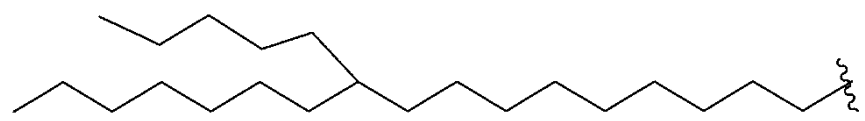
10



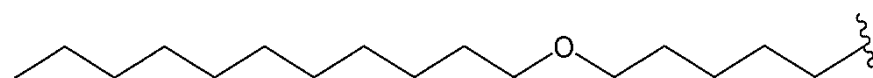
20



30



または



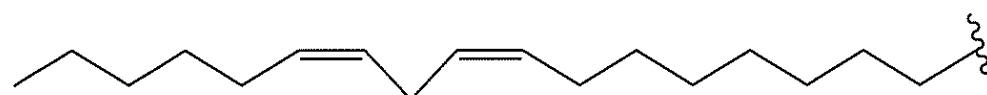
40

【0107】

である。いくつかの実施形態では、式 (I)、式 (I*)、式 (I a) または式 (I b) における R^1 および／または R^2 は、

【0108】

【化 1 3】



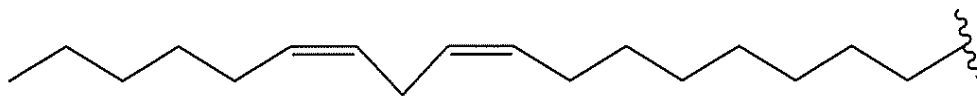
50

【0109】

である。いくつかの実施形態では、式（I）、式（I*）、式（I a）または式（I b）における R^1 および／または R^2 は、

【0110】

【化14】

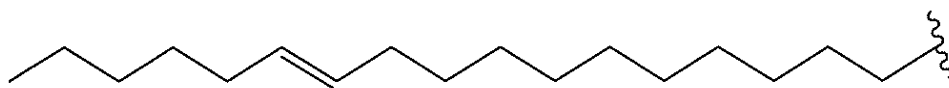


【0111】

である。いくつかの実施形態では、式（I）、式（I*）、式（I a）または式（I b）における R^1 および／または R^2 は、

【0112】

【化15】

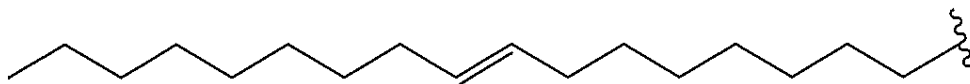


【0113】

である。いくつかの実施形態では、式（I）、式（I*）、式（I a）または式（I b）における R^1 および／または R^2 は、

【0114】

【化16】

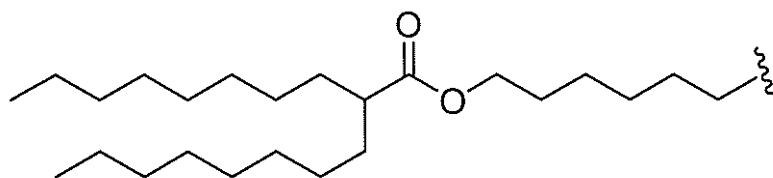


【0115】

である。いくつかの実施形態では、式（I）、式（I*）、式（I a）または式（I b）における R^1 および／または R^2 は、

【0116】

【化17】

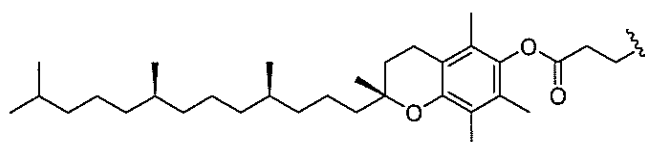


【0117】

である。いくつかの実施形態では、式（I）、式（I*）、式（I a）または式（I b）における R^1 および／または R^2 は、

【0118】

【化18】



【0119】

である。いくつかの実施形態では、式（I）、式（I*）、式（I a）または式（I b）

10

20

30

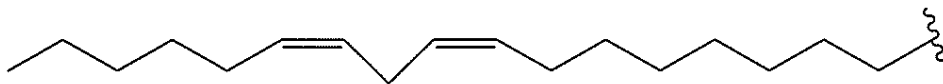
40

50

における R^1 および／または R^2 は、

【0120】

【化19】



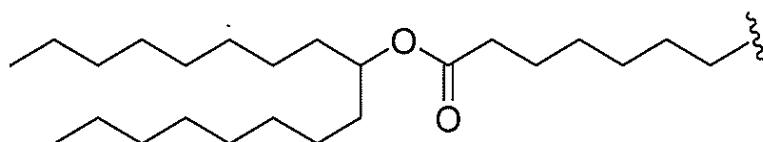
【0121】

である。いくつかの実施形態では、式 (I)、式 (I*)、式 (Ia) または式 (Ib)

における R^1 および／または R^2 は、

【0122】

【化20】



【0123】

である。

【0113】いくつかの実施形態では、式 (I)、式 (I*)、式 (Ia)、または式 (Ib) における L は、独立して $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-C_1 \sim C_{10}$ アルキレン $-O-$ 、 $-C_1 \sim C_{10}$ アルキレン $-C(=O)O-$ 、 $-C_1 \sim C_{10}$ アルキレン $-OC(=O)-$ 、 $-C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)-$ 、 $-C(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=O)-$ または結合であり、アルキレンは置換されるかまたは置換されない。いくつかの実施形態では、式 (I)、式 (I*)、式 (Ia)、または式 (Ib) における少なくとも1つの L は、独立して $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-C_1 \sim C_3$ アルキレン $-O-$ 、 $-C_1 \sim C_3$ アルキレン $-C(=O)O-$ 、 $-C_1 \sim C_3$ アルキレン $-OC(=O)-$ 、 $-C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)-$ 、 $-C(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=O)-$ または結合であり、アルキレンは置換されるかまたは置換されない。いくつかの実施形態では、式 (I)、式 (I*)、式 (Ia)、または式 (Ib) における少なくとも1つの L は、独立して $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-C_1 \sim C_3$ アルキレン $-O-$ 、 $-C_1 \sim C_3$ アルキレン $-C(=O)O-$ 、 $-C_1 \sim C_3$ アルキレン $-OC(=O)-$ 、または結合であり、アルキレンは直鎖状または分岐状の非置換アルキレンである。いくつかの実施形態では、式 (I)、式 (I*)、式 (Ia) または式 (Ib) における少なくとも1つの L は、 $-C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)-$ 、 $-C(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=O)-$ である。いくつかの実施形態では、式 (I)、式 (I*)、式 (Ia)、または式 (Ib) における少なくとも1つの L は、 $-C(=O)O-$ である。いくつかの実施形態では、式 (I)、式 (I*)、式 (Ia) または式 (Ib) における少なくとも1つの L は、 $-OC(=O)-$ である。いくつかの実施形態では、式 (I)、式 (I*)、式 (Ia)、または式 (Ib) における少なくとも1つの L は、 $-C(=O)NR^4-$ である。いくつかの実施形態では、式 (I)、式 (I*)、式 (Ia)、または式 (Ib) における少なくとも1つの L は、 $-C(=O)NH-$ である。いくつかの実施形態では、式 (I)、式 (I*)、式 (Ia)、または式 (Ib) における少なくとも1つの L は、 $-C(=O)N(CH_3)-$ である。いくつかの実施形態では、式 (I)、式 (I*)、式 (Ia)、または式 (Ib) における少なくとも1つの L は、 $-NR^4C(=O)-$ である。いくつかの実施形態では、式 (I)、式 (I*)、式 (Ia)、または式 (Ib) における少なくとも1つの L は、 $-NHC(=O)-$ である。いくつかの実施形態では、式 (I)、式 (I*)、式 (Ia)、または式 (Ib) における少なくとも1つの L は、 $-N(CH_3)C(=O)-$ である。いくつかの実施形態では、式 (I)、式 (I*)、式 (Ia)、または式 (Ib) における少なくとも1つの L は、 $-O-N=CR^4-$ または $-CR^4=N-O-$ である。いくつかの実施

10

20

30

40

50

形態では、式 (I)、式 (I^{*})、式 (I a)、または式 (I b) 式 (I)、式 (I^{*})、式 (I a)、または式 (I b) における少なくとも1つの L、R¹ および R² は同一である。いくつかの実施形態では、式 (I)、式 (I^{*})、式 (I a)、または式 (I b) 式 (I)、式 (I^{*})、式 (I a)、または式 (I b) における少なくとも1つの L、R¹ および R² は異なる。

【0124】

[0114] 式 (I)、式 (I^{*})、式 (I a)、または式 (I b) のいくつかの実施形態では、R¹ は -C₀ ~ C₁₀ アルキレン - L - R⁶ である。式 (I)、式 (I^{*})、式 (I a) または式 (I b) のいくつかの実施形態では、R² は -C₀ ~ C₁₀ アルキレン - L - R⁶ である。式 (I)、式 (I^{*})、式 (I a) または式 (I b) のいくつかの実施形態では、X は -C (=O) O- である。式 (I)、式 (I^{*})、式 (I a)、または式 (I b) のいくつかの実施形態では、X は -OC (=O) - である。式 (I)、式 (I^{*})、式 (I a)、または式 (I b) のいくつかの実施形態では、X は -OC (=O) NR⁴ - である。式 (I)、式 (I^{*})、式 (I a) または式 (I b) のいくつかの実施形態では、Y は -C (=O) O- である。式 (I)、式 (I^{*})、式 (I a)、または式 (I b) のいくつかの実施形態では、Y は -OC (=O) - である。式 (I)、式 (I^{*})、式 (I a)、または式 (I b) のいくつかの実施形態では、Y は -OC (=O) NR⁴ - である。式 (I)、式 (I^{*})、式 (I a)、または式 (I b) のいくつかの実施形態では、L は -OC (=O) - である。式 (I)、式 (I^{*})、式 (I a)、または式 (I b) のいくつかの実施形態では、L は -C (=O) - である。式 (I)、式 (I^{*})、式 (I a)、または式 (I b) のいくつかの実施形態では、R¹ は -C₄ ~ C₈ アルキレン - L - R⁶ である。式 (I)、式 (I^{*})、式 (I a)、または式 (I b) のいくつかの実施形態では、R² は -C₄ ~ C₈ アルキレン - L - R⁶ である。

【0125】

[0115] 式 (I)、式 (I^{*})、式 (I a)、または式 (I b) のいくつかの実施形態では、R¹ は、任意選択でオキソで置換される。式 (I)、式 (I^{*})、式 (I a) または式 (I b) のいくつかの実施形態では、R¹ または R² は、いずれのヒドリル化可能な結合を含有しない。式 (I)、式 (I^{*})、式 (I a) または式 (I b) のいくつかの実施形態では、R¹ または R² は、いずれの C = C 結合を含有しない。式 (I)、式 (I^{*})、式 (I a) または式 (I b) のいくつかの実施形態では、R¹ または R² は、いずれの炭素 - 炭素三重結合を含有しない。

【0126】

[0116] いくつかの実施形態では、式 (I b) における p は 1 ~ 6 である。いくつかの実施形態では、式 (I b) における p は、1 ~ 2、1 ~ 3、1 ~ 4、1 ~ 5、1 ~ 6、2 ~ 3、2 ~ 4、2 ~ 5、2 ~ 6、3 ~ 4、3 ~ 5、3 ~ 6、4 ~ 5、4 ~ 6、または 5 ~ 6 である。いくつかの実施形態では、式 (I b) における p は、1、2、3、4、5 または 6 である。いくつかの実施形態では、式 (I b) における p は、少なくとも 1、2、3、4 または 5 である。いくつかの実施形態では、式 (I b) における p は、多くとも 2、3、4、5 または 6 である。いくつかの実施形態では、式 (I b) における p は 1 ~ 3 である。いくつかの実施形態では、式 (I b) におけ p は 1 である。いくつかの実施形態では、式 (I b) における p は 2 である。いくつかの実施形態では、式 (I b) における p は 3 である。いくつかの実施形態では、式 (I b) における p は 4 である。いくつかの実施形態では、式 (I b) における p は 5 である。いくつかの実施形態では、式 (I b) における p は 6 である。

【0127】

[0117] いくつかの実施形態では、式 (I)、式 (I^{*})、式 (I a)、または式 (I b) における少なくとも1つの R⁶ は、独立して置換もしくは非置換の直鎖状もしくは分岐状の C₃ ~ C₃₀ アルキル、または置換もしくは非置換の直鎖状もしくは分岐状の C₃ ~ C₃₀ アルケニルである。いくつかの実施形態では、式 (I)、式 (I^{*})、式 (I a)、または式 (I b) における少なくとも1つの R⁶ は、独立して置換もしくは非置換の

50

ル、多くとも C_8 アルケニル、多くとも C_9 アルケニル、多くとも C_{10} アルケニル、多くとも C_{11} アルケニル、多くとも C_{12} アルケニル、多くとも C_{13} アルケニル、多くとも C_{14} アルケニル、多くとも C_{15} アルケニル、多くとも C_{16} アルケニル、多くとも C_{17} アルケニル、多くとも C_{18} アルケニル、多くとも C_{19} アルケニル、多くとも C_{20} アルケニル、多くとも C_{21} アルケニル、多くとも C_{22} アルケニル、多くとも C_{23} アルケニル、多くとも C_{24} アルケニル、または多くとも C_{25} アルケニルである。いくつかの実施形態では、式 (I)、式 (I*)、式 (Ia) または式 (Ib) における少なくとも 1 つの R^6 は、独立して置換または非置換の $C_3 \sim C_{30}$ アルキニルである。いくつかの実施形態では、式 (I)、式 (I*)、式 (Ia)、または式 (Ib) における少なくとも 1 つの R^6 は、独立して $C_y - C_3 \sim C_{30}$ アルキル、 $C_y - C_3 \sim C_{30}$ アルケニル、または $C_y - C_3 \sim C_{30}$ アルキニルであり、アルキル、アルケニルおよびアルキニルがそれぞれ独立に、置換されているか、または非置換である。いくつかの実施形態では、 C_y が、置換または非置換のシクロアルキル、置換または非置換のヘテロシクロアルキル、置換または非置換のアリール、置換または非置換のヘテロアリールである、 $C_y - C_3 \sim C_{30}$ アルキルにおける R^6 である。いくつかの実施形態では、 C_y は二環式である。いくつかの実施形態では、 C_y は単環式である。いくつかの実施形態では、 C_y は、0 ～ 2 個の窒素および 0 ～ 1 個の酸素を有する二環式ヘテロアリールである。いくつかの実施形態では、 C_y は、0 ～ 2 個の窒素および 0 ～ 1 個の酸素を有する二環式ヘテロアルキルである。

10

20

【0128】

[0118]いくつかの実施形態では、式 (I)、式 (I*)、式 (Ia) または式 (Ib) における R^6 は、独立して

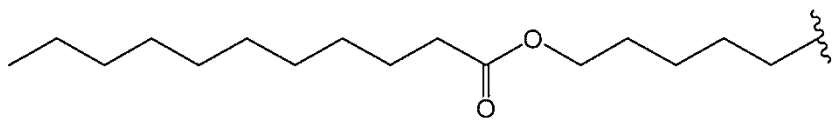
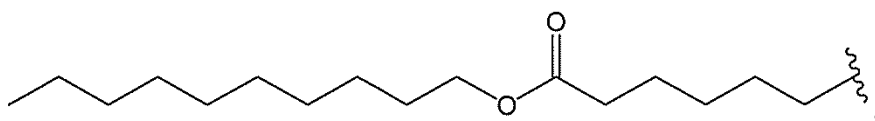
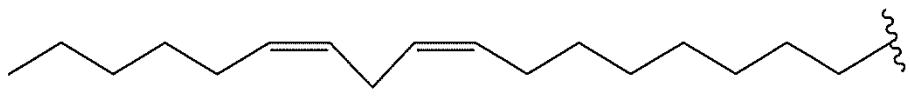
【0129】

30

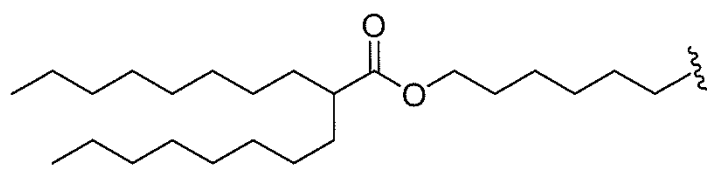
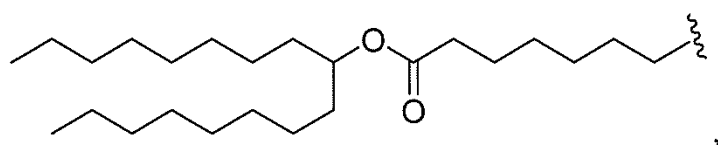
40

50

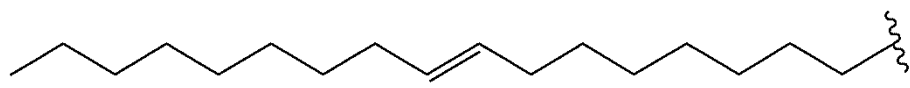
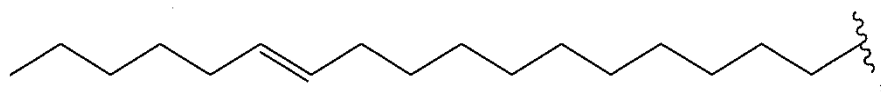
【化 2 1】



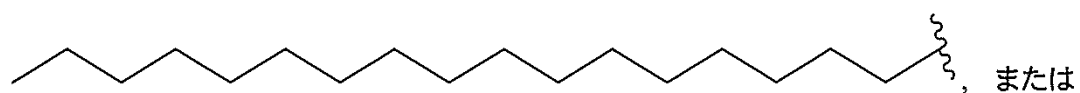
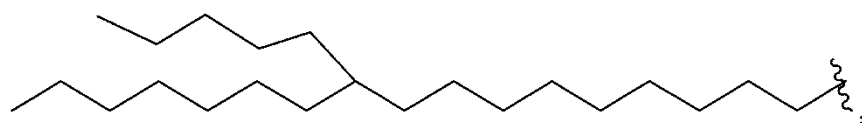
10



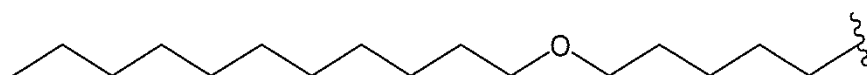
20



30



または



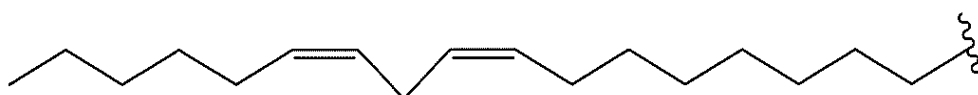
40

【0 1 3 0】

である。いくつかの実施形態では、式 (I)、式 (I*)、式 (I a) または式 (I b) における少なくとも1つの R^6 は、

【0 1 3 1】

【化 2 2】



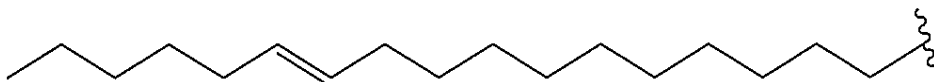
50

【0132】

である。いくつかの実施形態では、式 (I)、式 (I*)、式 (Ia) または式 (Ib) における少なくとも1つの R^6 は、

【0133】

【化23】

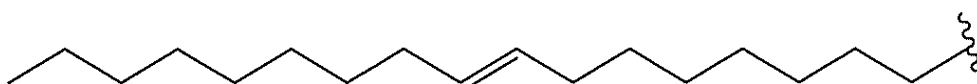


【0134】

である。いくつかの実施形態では、式 (I)、式 (I*)、式 (Ia) または式 (Ib) における少なくとも1つの R^6 は、

【0135】

【化24】

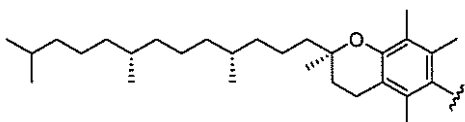


【0136】

である。いくつかの実施形態では、式 (I)、式 (I*)、式 (Ia) または式 (Ib) における少なくとも1つの R^6 は、

【0137】

【化25】

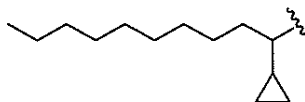


【0138】

である。いくつかの実施形態では、式 (I)、式 (I*)、式 (Ia) または式 (Ib) における少なくとも1つの R^6 は、

【0139】

【化26】

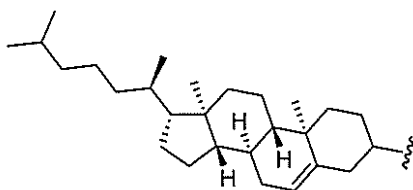


【0140】

である。いくつかの実施形態では、式 (I)、式 (I*)、式 (Ia) または式 (Ib) における少なくとも1つの R^6 は、

【0141】

【化27】



【0142】

である。

10

20

30

40

50

[0119]いくつかの実施形態では、式 (I)、式 (I*)、式 (Ia) または式 (Ib) における R^4 は、独立して H または置換もしくは非置換の $C_1 \sim C_4$ アルキルである。いくつかの実施形態では、式 (I)、式 (I*)、式 (Ia)、または式 (Ib) における少なくとも 1 つの R^4 は、独立して置換もしくは非置換の直鎖状または分枝状の $C_1 \sim C_4$ アルキルである。いくつかの実施形態では、式 (I)、式 (I*)、式 (Ia)、または式 (Ib) における少なくとも 1 つの R^4 は H である。いくつかの実施形態では、式 (I)、式 (I*)、式 (Ia)、または式 (Ib) における少なくとも 1 つの R^4 は、独立して H、 $-CH_3$ 、 $-CH_2CH_3$ 、 $-CH_2CH_2CH_3$ 、または $-CH(CH_3)_2$ である。いくつかの実施形態では、式 (I)、式 (I*)、式 (Ia)、または式 (Ib) における少なくとも 1 つの R^4 は、独立して H または $-CH_3$ である。いくつかの実施形態では、式 (I)、式 (I*)、式 (Ia)、または式 (Ib) における少なくとも 1 つの R^4 は $-CH_3$ である。

10

[0143]

[0120]いくつかの実施形態では、式 (I)、式 (I*)、式 (Ia) または式 (Ib) における W、X および Y は、独立して $-C(=O)$ または $-OC(=O)-$ である。いくつかの実施形態では、式 (I)、式 (I*)、式 (Ia) または式 (Ib) における少なくとも 1 つの W、X および Y は、 $-C(=O)O-$ である。いくつかの実施形態では、式 (I)、式 (I*)、式 (Ia) または式 (Ib) における少なくとも 1 つの W、X および Y は、 $-OC(=O)-$ である。いくつかの実施形態では、式 (I)、式 (I*)、式 (Ia)、または式 (Ib) における少なくとも 1 つの W、X、および Y は、独立して $-C(=O)NR^4$ または $-NR^4C(=O)-$ である。いくつかの実施形態では、式 (I)、式 (I*)、式 (Ia)、または式 (Ib) における少なくとも 1 つの W、X および Y は、独立して $-C(=O)N(CH_3)-$ 、 $-N(CH_3)C(=O)-$ 、 $-C(=O)NH-$ 、または $-NHC(=O)-$ である。いくつかの実施形態では、式 (I)、式 (I*)、式 (Ia)、または式 (Ib) における少なくとも 1 つの W、X、および Y は、独立して $-C(=O)NH$ 、 $-C(=O)N(CH_3)-$ 、 $-OC(=O)-$ 、 $-NHC(=O)-$ 、 $-N(CH_3)C(=O)-$ 、 $-C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)O-$ 、 $-NHC(=O)O-$ 、 $-N(CH_3)C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)NH-$ 、 $-OC(=O)N(CH_3)-$ 、 $-NHC(=O)NH-$ 、 $-N(CH_3)C(=O)NH-$ 、 $-NHC(=O)N(CH_3)-$ 、 $-N(CH_3)C(=O)N(CH_3)-$ 、 $NHC(=NH)NH-$ 、 $-N(CH_3)C(=NH)NH-$ 、 $-NHC(=NH)N(CH_3)-$ 、 $-N(CH_3)C(=NH)N(CH_3)-$ 、 $NHC(=NMe)NH-$ 、 $-N(CH_3)C(=NMe)NH-$ 、 $-NHC(=NMe)N(CH_3)-$ 、または $-N(CH_3)C(=NMe)N(CH_3)-$ である。いくつかの実施形態では、式 (I)、式 (I*)、式 (Ia)、または式 (Ib) における少なくとも 1 つの W、X および Y は、独立して $-OC(=O)O-$ 、 $-NR^4C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)NR^4-$ 、または $-NR^4C(=O)NR^4-$ である。いくつかの実施形態では、式 (I)、式 (I*)、式 (Ia)、または式 (Ib) における少なくとも 1 つの W、X および Y は、独立して $-OC(=O)O-$ 、 $-NHC(=O)O-$ 、 $-OC(=O)NH-$ 、 $-NHC(=O)NH-$ 、 $-N(CH_3)C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)N(CH_3)-$ 、 $-N(CH_3)C(=O)N(CH_3)-$ または $-N(CH_3)C(=O)NH-$ である。いくつかの実施形態では、式 (I)、式 (I*)、式 (Ia)、または式 (Ib) における少なくとも 1 つの W、X および Y は、独立して $-OC(=O)O-$ 、 $-NHC(=O)O-$ 、 $-OC(=O)NH-$ 、または $-NHC(=O)NH-$ である。

20

30

40

[0144]

[0121]いくつかの実施形態では、式 (I)、式 (I*)、式 (Ia)、または式 (Ib) における R^3 は、 $-C_0 \sim C_{10}$ アルキレン- NR^7R^8 または $-C_0 \sim C_{10}$ アルキレン-ヘテロシクロアルキルであり、アルキレンおよびヘテロシクロアルキルは、独立して置換されるかまたは置換されない。いくつかの実施形態では、式 (I)、式 (I*)、式 (Ia) または式 (Ib) における R^3 は、 $-C_0 \sim C_{10}$ アルキレン- NR^7R^8 で

50

ある。いくつかの実施形態では、式 (I)、式 (I^{*})、式 (I a)、または式 (I b) における R³ は、-C₁~C₆ アルキレン-NR⁷R⁸ である。いくつかの実施形態では、式 (I)、式 (I^{*})、式 (I a)、または式 (I b) における R³ は、-C₁~C₄ アルキレン-NR⁷R⁸ である。いくつかの実施形態では、式 (I)、式 (I^{*})、式 (I a) または式 (I b) における R³ は、-C₁-アルキレン-NR⁷R⁸ である。いくつかの実施形態では、式 (I)、式 (I^{*})、式 (I a) または式 (I b) における R³ は、-C₂-アルキレン-NR⁷R⁸ である。いくつかの実施形態では、式 (I)、式 (I^{*})、式 (I a) または式 (I b) における R³ は、-C₃-アルキレン-NR⁷R⁸ である。いくつかの実施形態では、式 (I)、式 (I^{*})、式 (I a) または式 (I b) における R³ は、-C₄-アルキレン-NR⁷R⁸ である。いくつかの実施形態では、式 (I)、式 (I^{*})、式 (I a) または式 (I b) における R³ は、-C₅-アルキレン-NR⁷R⁸ である。いくつかの実施形態では、式 (I)、式 (I^{*})、式 (I a) または式 (I b) における R³ は、-C₀~C₁₀ アルキレン-ヘテロシクロアルキルである。いくつかの実施形態では、式 (I)、式 (I^{*})、式 (I a)、または式 (I b) における R³ は、-C₁~C₆ アルキレン-ヘテロシクロアルキルであり、ヘテロシクロアルキルは、1~3 個の窒素および 0~2 個の酸素を含む。いくつかの実施形態では、式 (I)、式 (I^{*})、式 (I a) または式 (I b) における R³ は、四元化される。

10

【0145】

[0122]いくつかの実施形態では、式 (I)、式 (I^{*})、式 (I a) または式 (I b) における R⁷ および R⁸ は、独立して水素または置換もしくは非置換の C₁~C₆ アルキルである。いくつかの実施形態では、式 (I)、式 (I^{*})、式 (I a) または式 (I b) における R⁷ および R⁸ は、独立して置換または非置換の C₁~C₆ アルキルである。いくつかの実施形態では、R⁷ および R⁸ は、独立して水素または置換もしくは非置換の C₁~C₃ アルキルである。いくつかの実施形態では、少なくとも 1 つの R⁷ および R⁸ は、独立して置換または非置換の C₁~C₃ アルキルである。いくつかの実施形態では、少なくとも 1 つの R⁷ および R⁸ は、独立して -CH₃、-CH₂CH₃、-CH₂CH₂CH₃ または -CH(CH₃)₂ である。いくつかの実施形態では、少なくとも 1 つの R⁷ および R⁸ は CH₃ である。いくつかの実施形態では、少なくとも 1 つの R⁷ および R⁸ は -CH₂CH₃ である。

20

【0146】

[0123]いくつかの実施形態では、式 (I)、式 (I^{*})、式 (I a)、または式 (I b) における R⁷ および R⁸ は、それらが結合している窒素と一緒にあって、置換または非置換の C₂~C₆ ヘテロシクリルを形成する。いくつかの実施形態では、R⁷ および R⁸ は、それらが結合している窒素と一緒にあって、置換または非置換の C₂~C₆ ヘテロシクロアルキルを形成する。いくつかの実施形態では、R⁷ および R⁸ は、それらが結合している窒素と一緒にあって、置換または非置換の 3~7 員のヘテロシクロアルキルを形成する。

30

【0147】

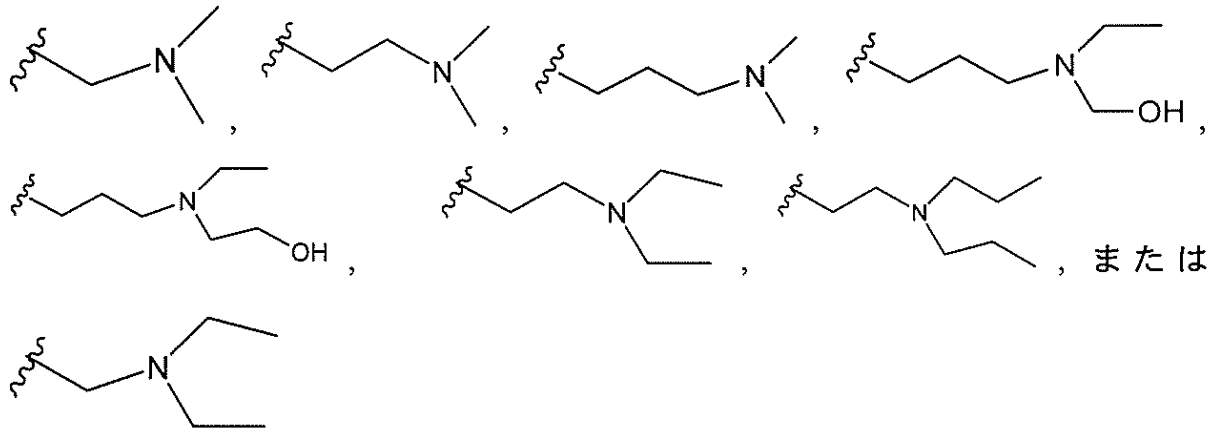
[0124]いくつかの実施形態では、式 (I)、式 (I^{*})、式 (I a) または式 (I b) における R³ は、

40

【0148】

50

【化 2 8】



10

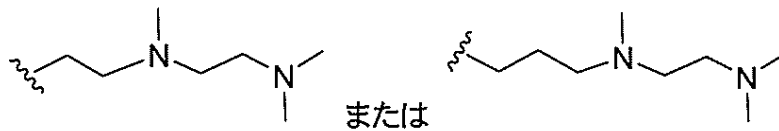
【0 1 4 9】

である。

【0125】いくつかの実施形態では、式 (I)、式 (I*)、式 (I a) または式 (I b) における R^3 は、

【0 1 5 0】

【化 2 9】



20

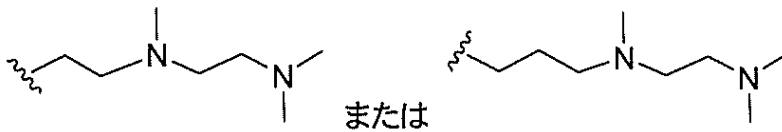
【0 1 5 1】

である。

【0126】いくつかの実施形態では、式 (I)、式 (I*)、式 (I a) または式 (I b) における R^3 は、

【0 1 5 2】

【化 3 0】



30

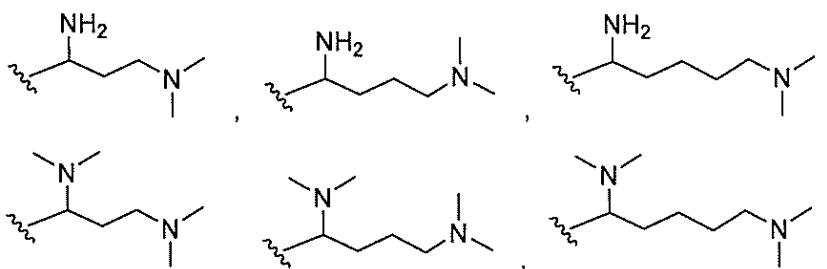
【0 1 5 3】

である。

【0127】いくつかの実施形態では、式 (I)、式 (I*)、式 (I a) または式 (I b) における R^3 は、

【0 1 5 4】

【化 3 1】



40

【0 1 5 5】

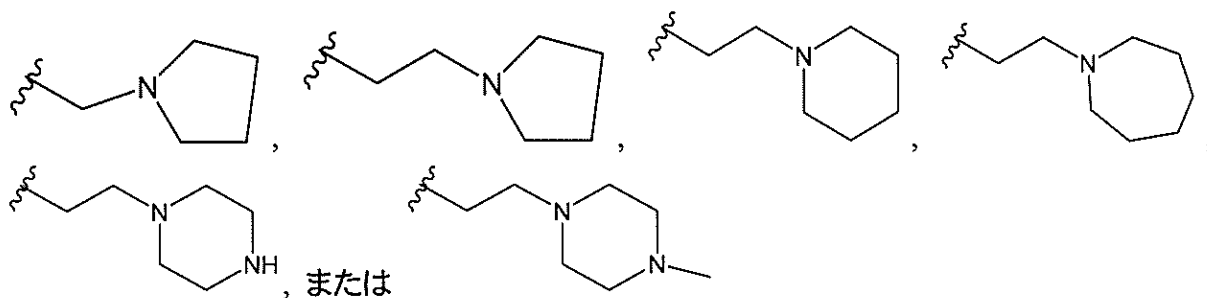
50

である。

【0128】いくつかの実施形態では、式（I）、式（I*）、式（I a）または式（I b）におけるR³は、

【0156】

【化32】



10

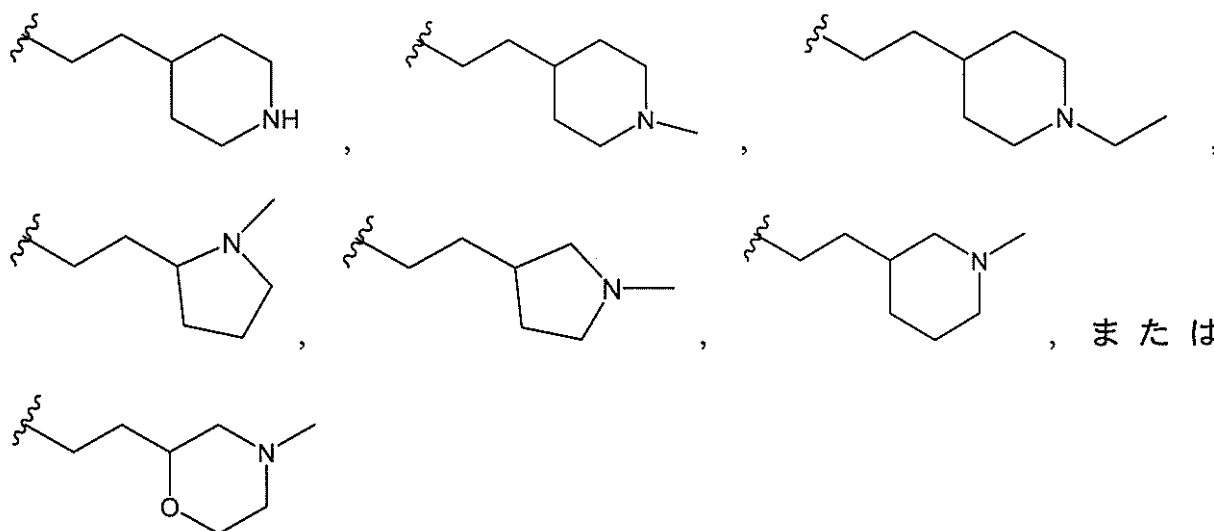
【0157】

である。

【0129】いくつかの実施形態では、式（I）、式（I*）、式（I a）または式（I b）におけるR³は、

【0158】

【化33】



30

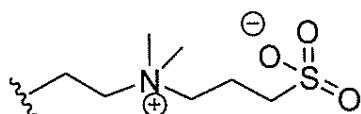
【0159】

である。

【0130】いくつかの実施形態では、式（I）、式（I*）、式（I a）または式（I b）におけるR³は、

【0160】

【化34】



【0161】

である。

【0131】いくつかの実施形態では、式（I）、式（I*）、式（I a）または式（I b）

50

)におけるZは、 $-C(=O)O-$ または $-OC(=O)-$ である。いくつかの実施形態では、式(I)、式(I*)、式(Ia)または式(Ib)におけるZは、 $-C(=O)O-$ である。いくつかの実施形態では、式(I)、式(I*)、式(Ia)または式(Ib)におけるZは、 $-OC(=O)-$ である。いくつかの実施形態では、式(I)、式(I*)、式(Ia)または式(Ib)におけるZは、 $-C(=O)NR^4-$ または $-NR^4C(=O)-$ である。いくつかの実施形態では、式(I)、式(I*)、式(Ia)または式(Ib)におけるZは、 $-C(=O)NR^4-$ である。いくつかの実施形態では、式(I)、式(I*)、式(Ia)または式(Ib)におけるZは、 $-NR^4C(=O)-$ である。いくつかの実施形態では、Z中の R^4 は、水素または $C_1 \sim C_4$ アルキルである。いくつかの実施形態では、Z中の R^4 は、水素である。いくつかの実施形態では、Z中の R^4 は、 $C_1 \sim C_4$ アルキルである。いくつかの実施形態では、式(I)、式(I*)、式(Ia)、または式(Ib)におけるZは、 $-C(=O)N(CH_3)-$ 、 $-N(CH_3)C(=O)-$ 、 $-C(=O)NH-$ 、または $-NHC(=O)-$ である。いくつかの実施形態では、式(I)、式(I*)、式(Ia)または式(Ib)におけるZは、 $-OC(=O)O-$ 、 $-NR^4C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)NR^4-$ 、または $-NR^4C(=O)NR^4-$ である。いくつかの実施形態では、式(I)、式(Ia)、または式(Ib)におけるZは、 $-OC(=O)O-$ 、 $-NHC(=O)O-$ 、 $-OC(=O)NH-$ 、 $-NHC(=O)NH-$ 、 $-N(CH_3)C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)N(CH_3)-$ 、 $-N(CH_3)C(=O)N(CH_3)-$ 、 $-NHC(=O)N(CH_3)-$ または $-N(CH_3)C(=O)NH-$ である。いくつかの実施形態では、式(I)、式(I*)、式(Ia)、または式(Ib)におけるZは、 $-OC(=O)O-$ 、 $-NHC(=O)O-$ 、 $-OC(=O)NH-$ 、または $-NHC(=O)NH-$ である。いくつかの実施形態では、式(I)、式(I*)、式(Ia)または式(Ib)におけるZは結合である。

10

20

30

40

50

【0162】

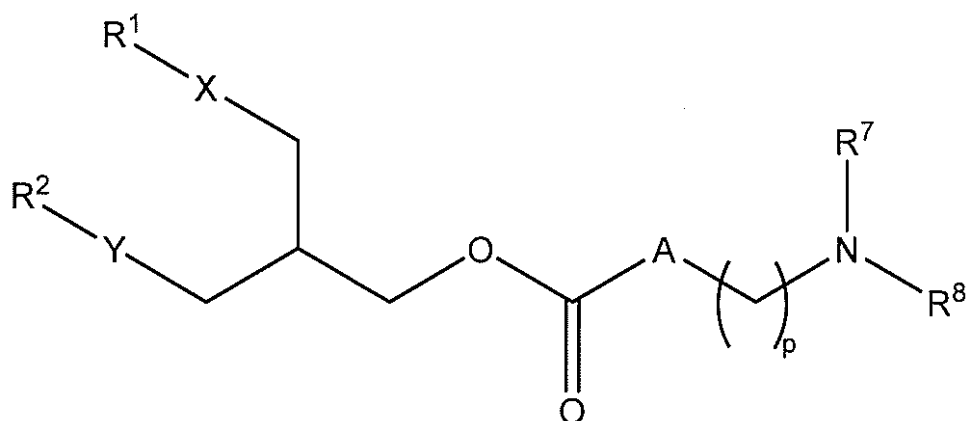
[0132]いくつかの実施形態では、式(I)、式(I*)、式(Ia)または式(Ib)における R^5 は、水素または置換もしくは非置換の $C_1 \sim C_3$ アルキルである。いくつかの実施形態では、式(I)、式(I*)、式(Ia)、または式(Ib)における R^5 は、H、 $-CH_3$ 、 $-CH_2CH_3$ 、 $-CH_2CH_2CH_3$ 、または $-CH(CH_3)_2$ である。いくつかの実施形態では、式(I)、式(I*)、式(Ia)または式(Ib)における R^5 はHである。いくつかの実施形態では、 R^5 は、置換または非置換の $-C_0 \sim C_{10}$ アルキレン- $L-R^4$ である。いくつかの実施形態では、 R^5 は、置換または非置換の $C_1 \sim C_{16}$ アルキルである。

【0163】

[0133]別の態様では、本明細書には、式(Ib)の構造

【0164】

【化 3 5】



式(Ib)

10

【0165】

を有するアミノ脂質、またはその薬学的に許容される塩が開示され、式中、

XおよびYの各々は、式(I)、(I*)および(Ia)と同じであり、 $-\text{OC}(=\text{O})-$ 、 $-\text{OC}(=\text{O})\text{O}-$ 、 $-\text{OC}(=\text{O})\text{NR}^4-$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{O}-$ 、 $-\text{OC}(=\text{S})-$ 、 $\text{OC}(=\text{S})\text{O}-$ 、 $-\text{NR}^4\text{C}(=\text{S})\text{O}-$ 、 $-\text{OC}(=\text{S})\text{NR}^4-$ 、 $\text{SC}(=\text{O})-$ 、 $-\text{OC}(=\text{O})\text{S}-$ 、 $-\text{SC}(=\text{S})\text{O}-$ 、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{C}_1\sim\text{C}_{10}$ アルキレン $-\text{O}-$ 、および結合からなる群から選択され、アルキレンは置換されているか、または非置換であり；

20

R^1 および R^2 は、式(I)、(I*)および(Ia)と同じであり、水素、 $\text{C}_1\sim\text{C}_{30}$ アルキル、 $\text{C}_1\sim\text{C}_{30}$ ヘテロアルキル、および $\text{C}_y\sim\text{C}_{30}$ アルキルからなる群から選択され、アルキルおよびヘテロアルキルがそれぞれ独立に、置換されているか、または非置換であり；

R^4 の各々が独立に水素または置換もしくは非置換の $\text{C}_1\sim\text{C}_6$ アルキルであり；

R^6 の各々が独立に $\text{C}_3\sim\text{C}_{30}$ アルキル、 $\text{C}_3\sim\text{C}_{30}$ アルケニル、 $\text{C}_3\sim\text{C}_{30}$ アルキニル、 $\text{C}_y\sim\text{C}_{30}$ アルキル、 $\text{C}_y\sim\text{C}_{30}$ アルケニル、または $\text{C}_y\sim\text{C}_{30}$ アルキニルであり、アルキル、アルケニル、およびアルキニルがそれぞれ独立に、置換されているか、または非置換であり；

30

C_y の各々は、置換または非置換のシクロアルキル、置換または非置換のヘテロシクロアルキル、置換または非置換のアリール、置換または非置換のヘテロアリールであり；

R^7 および R^8 の各々が独立に水素または置換もしくは非置換の $\text{C}_1\sim\text{C}_6$ アルキルであり、または R^7 および R^8 は、それらが結合している窒素と一緒に、置換もしくは非置換の $\text{C}_2\sim\text{C}_6$ ヘテロシクリルを形成し；

Aは、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{S}-$ 、または $-\text{NR}^{12}-$ であり；

R^{12} は、水素、 $\text{C}_1\sim\text{C}_{10}$ アルキル、または $\text{C}_1\sim\text{C}_{10}$ のヘテロアルキルであり、アルキルおよびヘテロアルキルがそれぞれ独立に、置換されているか、または非置換であり；

40

C_y は、置換もしくは非置換のシクロアルキル、置換もしくは非置換のヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換のアリール、または置換もしくは非置換のヘテロアリールであり；

pは、1、2、3、4、5または6である。

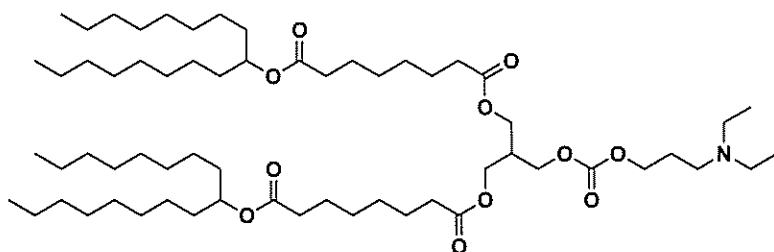
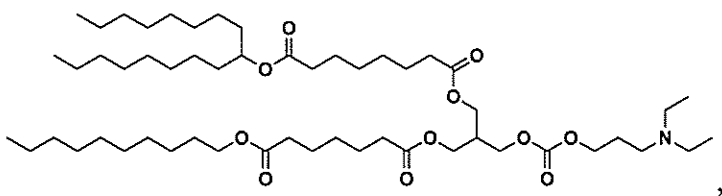
【0166】

【0134】いくつかの実施形態では、式(I)、式(I*)、式(Ia)または式(Ib)のアミノ脂質は、

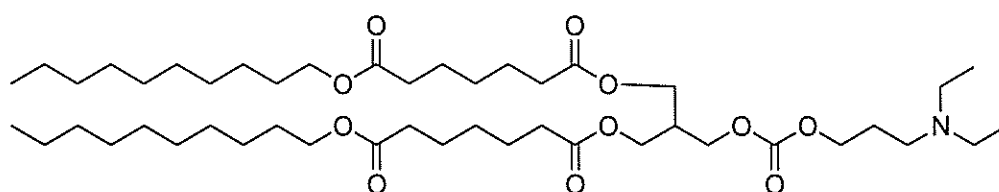
【0167】

50

【化 3 6】



, または



10

20

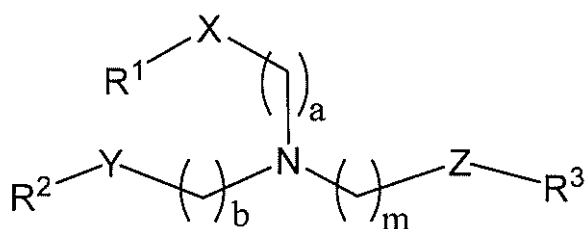
【 0 1 6 8】

である。

【0135】別の態様では、本明細書には、式 (I I) の構造

【 0 1 6 9】

【化 3 7】



式(II)

30

【 0 1 7 0】

を有するアミノ脂質、またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物が開示され、式中、

R^1 および R^2 の各々が独立に $C_3 \sim C_{30}$ アルキル、 $C_3 \sim C_{30}$ アルケニル、 $C_3 \sim C_{30}$ アルキニル、 $C_3 \sim C_{10}$ シクロアルキル、 $-C_0 \sim C_{10}$ アルキレン- $L-R^6$ 、または $-C_1 \sim C_{10}$ アルケニレン- $L-R^6$ であり、アルキル、アルキレン、アルケニル、アルケニレン、アルキニル、およびシクロアルキルの各々が独立に置換されているか、または非置換であり；

40

X 、 Y 、および Z の各々が独立に $-C(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=O)-$ 、 $-C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)-$ 、 $-OC(=O)O-$ 、 $-NR^4C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=NR^4)NR^4-$ 、 $-C(=S)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=S)-$ 、 $-C(=S)O-$ 、 $-OC(=S)-$ 、 $OC(=S)O-$ 、 $-NR^4C(=S)O-$ 、 $-OC(=S)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=S)NR^4-$ 、 $-C(=O)S-$ 、 $-SC(=O)-$ 、 $-OC(=O)S-$ 、 $-NR^4C$

50

(=O) S-、-SC(=O)NR⁴-、-C(=S)S-、-SC(=S)-、-SC(=S)O-、-NR⁴C(=S)S-、-SC(=S)NR⁴-、-C(=S)S-、-SC(=S)-、-SC(=O)S-、-SC(=S)S-、-NR⁴C(=S)S-、-SC(=S)NR⁴-、-O-、-S-、または結合であり、

Lの各々が独立に、-C(=O)NR⁴-、-NR⁴C(=O)-、-C(=O)O-、-OC(=O)-、-OC(=O)O-、-NR⁴C(=O)O-、-OC(=O)NR⁴-、-NR⁴C(=O)NR⁴-、-NR⁴C(=NR⁴)NR⁴-、-C(=S)NR⁴-、-NR⁴C(=S)-、-C(=S)O-、-OC(=S)-、OC(=S)O-、-NR⁴C(=S)O-、-OC(=S)NR⁴-、-NR⁴C(=S)NR⁴-、-C(=O)S-、-SC(=O)-、-OC(=O)S-、-NR⁴C(=O)S-、-SC(=O)NR⁴-、-C(=S)S-、-SC(=S)-、-SC(=S)O-、-NR⁴C(=S)S-、-SC(=S)NR⁴-、-C(=S)S-、-SC(=S)-、-SC(=O)S-、-SC(=S)S-、-NR⁴C(=S)S-、-SC(=S)NR⁴-、-O-N=CR⁴-、-CR⁴=N-O-、-O-、-S-、-C₁~C₁₀アルキレン-O-、-C₁~C₁₀アルキレン-C(=O)O-、-C₁~C₁₀アルキレン-OC(=O)-、または結合であり、アルキレンは置換されているか、または非置換であり；

10

R³は、-C₀~C₁₀アルキレン-NR⁷R⁸、-C₀~C₁₀アルキレン-ヘテロシクロアルキル、または-C₀~C₁₀アルキレン-ヘテロシクロアリールであり、アルキレン、ヘテロシクロアルキルおよびヘテロシクロアリールは独立に置換されているか、または非置換であり；

20

R⁴の各々が独立に水素または置換もしくは非置換のC₁~C₆アルキルであり；

R⁶の各々が独立にC₃~C₃₀アルキル、C₃~C₃₀アルケニル、C₃~C₃₀アルキニル、Cy-C₃~C₃₀アルキル、Cy-C₃~C₃₀アルケニル、またはCy-C₃~C₃₀アルキニルであり、アルキル、アルケニル、およびアルキニルがそれぞれ独立に、置換されているか、または非置換であり；

Cyの各々は、置換または非置換のシクロアルキル、置換または非置換のヘテロシクロアルキル、置換または非置換のアリール、置換または非置換のヘテロアリールであり；

R⁷およびR⁸の各々が独立に水素または置換もしくは非置換のC₁~C₆アルキルであり、またはR⁷およびR⁸は、それらが結合している窒素と一緒にあって、置換もしくは非置換のC₂~C₆ヘテロシクリルを形成し；

30

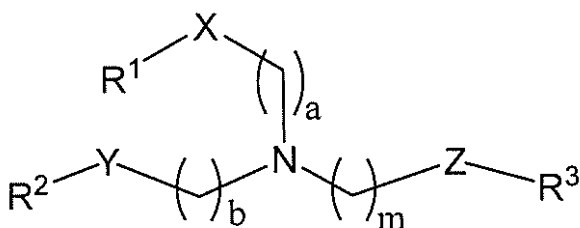
aおよびbの各々が独立に1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10であり；
mは0、1、2、3、4、5である。

【0171】

【0136】一態様では、本明細書には、式(II*)の構造

【0172】

【化38】



40

式(II*)

【0173】

を有するアミノ脂質、またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物が開示され、式中、

50

R^1 および R^2 の各々が独立に水素、 $C_3 \sim C_{30}$ アルキル、 $C_3 \sim C_{30}$ アルケニル、 $C_3 \sim C_{30}$ アルキニル、 $C_3 \sim C_{30}$ ヘテロアルキル、 $C_3 \sim C_{30}$ ヘテロアルケニル、 $C_3 \sim C_{30}$ ヘテロアルキニル、 $C_3 \sim C_{10}$ シクロアルキル、 $-C_0 \sim C_{10}$ アルキレン- $L-R^6$ 、または $-C_1 \sim C_{10}$ アルケニレン- $L-R^6$ であり、アルキル、アルキレン、アルケニル、アルケニレン、アルキニル、ヘテロアルキル、ヘテロアルケニル、ヘテロアルキニル、およびシクロアルキルの各々が独立に置換されているか、または非置換であり；

X 、 Y 、および Z の各々が独立に $-C(=O)NR^4-$ 、 $-C(=O)-$ 、 $-NR^4C(=O)-$ 、 $-C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)-$ 、 $-OC(=O)O-$ 、 $-NR^4C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=NR^4)NR^4-$ 、 $-C(=S)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=S)-$ 、 $-C(=S)O-$ 、 $-OC(=S)-$ 、 $OC(=S)O-$ 、 $-NR^4C(=S)O-$ 、 $-OC(=S)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=S)NR^4-$ 、 $-C(=O)S-$ 、 $-SC(=O)-$ 、 $-OC(=O)S-$ 、 $-NR^4C(=O)S-$ 、 $-SC(=O)NR^4-$ 、 $-C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)O-$ 、 $-NR^4C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)NR^4-$ 、 $-C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)-$ 、 $-SC(=O)S-$ 、 $-SC(=S)S-$ 、 $-NR^4C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)NR^4-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、または結合であり；

L の各々が独立に $-C(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=O)-$ 、 $-C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)-$ 、 $-OC(=O)O-$ 、 $-NR^4C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=NR^4)NR^4-$ 、 $-C(=S)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=S)-$ 、 $-C(=S)O-$ 、 $-OC(=S)-$ 、 $OC(=S)O-$ 、 $-NR^4C(=S)O-$ 、 $-OC(=S)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=S)NR^4-$ 、 $-C(=O)S-$ 、 $-SC(=O)-$ 、 $-OC(=O)S-$ 、 $-NR^4C(=O)S-$ 、 $-SC(=O)NR^4-$ 、 $-C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)-$ 、 $-SC(=S)O-$ 、 $-NR^4C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)NR^4-$ 、 $-C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)-$ 、 $-SC(=O)S-$ 、 $-SC(=S)S-$ 、 $-NR^4C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)NR^4-$ 、 $-O-N=CR^4-$ 、 $-CR^4=N-O-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-C_1 \sim C_{10}$ アルキレン- $O-$ 、 $-C_1 \sim C_{10}$ アルキレン- $C(=O)O-$ 、 $-C_1 \sim C_{10}$ アルキレン- $OC(=O)-$ 、または結合であり、アルキレンは置換されているか、または非置換であり；

R^3 は、水素、 $-C_1 \sim C_6$ アルキル、 $-C_0 \sim C_{10}$ アルキレン- NR^7R^8 、 $-C_0 \sim C_{10}$ アルキレン-ヘテロシクロアルキル、または $-C_0 \sim C_{10}$ アルキレン-ヘテロシクロアリールであり、アルキル、アルキレン、ヘテロシクロアルキルおよびヘテロシクロアリールは独立に置換されているか、または非置換であり；

R^4 の各々が独立に水素または置換もしくは非置換の $C_1 \sim C_6$ アルキルであり；

R^6 の各々が独立に $C_3 \sim C_{30}$ アルキル、 $C_3 \sim C_{30}$ アルケニル、 $C_3 \sim C_{30}$ アルキニル、 $C_y-C_3 \sim C_{30}$ アルキル、 $C_y-C_3 \sim C_{30}$ アルケニル、または $C_y-C_3 \sim C_{30}$ アルキニルであり、アルキル、アルケニルおよびアルキニルがそれぞれ独立に、置換されているか、または非置換であり；

C_y の各々は、置換または非置換のシクロアルキル、置換または非置換のヘテロシクロアルキル、置換または非置換のアリール、置換または非置換のヘテロアリールであり；

R^7 および R^8 の各々が独立に水素または置換もしくは非置換の $C_1 \sim C_6$ アルキルであり、または R^7 および R^8 は、それらが結合している窒素と一緒にあって、置換もしくは非置換の $C_2 \sim C_6$ ヘテロシクリルを形成し；

a および b の各々が独立に 1、2、3、4、5、6、7、8、9、または 10 であり；
 m は 0、1、2、3、4、または 5 である。

[0174]

[0137] 式 (II) または (II*) のいくつかの実施形態では、構造が 1 を超える不斉 C 原子を有する場合、各不斉 C 原子は、独立してラセミ体、キラル的に純粋な R 異性体および／もしくはキラル的に純粋な S 異性体、またはこれらの組合せを表す。

【0175】

[0138]いくつかの実施形態では、式 (II) または (II*) における a および b の各々が独立に 3、4、5、6、7、8、9 または 10 である。いくつかの実施形態では、a は 1 である。いくつかの実施形態では、a は 2 である。いくつかの実施形態では、a は 3 である。いくつかの実施形態では、a は 4 である。いくつかの実施形態では、a は 5 である。いくつかの実施形態では、b は 1 である。いくつかの実施形態では、b は 2 である。いくつかの実施形態では、b は 3 である。いくつかの実施形態では、b は 4 である。いくつかの実施形態では、b は 5 である。

【0176】

[0139]いくつかの実施形態では、式 (II) または (II*) における m は、1、2、3、4 または 5 である。いくつかの実施形態では、m は 1 である。いくつかの実施形態では、m は 2 である。いくつかの実施形態では、m は 3 である。いくつかの実施形態では、m は 4 である。いくつかの実施形態では、m は 5 である。

【0177】

[0140]いくつかの実施形態では、式 (II) または (II*) における各 R^1 および R^2 は、独立して $C_5 \sim C_{28}$ アルキル、 $C_5 \sim C_{28}$ アルケニル、 $C_5 \sim C_{28}$ アルキニル、 $C_3 \sim C_{10}$ シクロアルキル、 $-C_1 \sim C_{10}$ アルキレン- $L-R^6$ 、または $-C_1 \sim C_{10}$ アルケニレン- $L-R^6$ であり、アルキル、アルキレン、アルケニル、アルケニレン、アルキニル、およびシクロアルキルの各々が独立に置換されているか、または非置換である。いくつかの実施形態では、式 (II) または (II*) における各 R^1 および R^2 は、独立して $C_7 \sim C_{25}$ アルキル、 $C_7 \sim C_{25}$ アルケニル、 $C_7 \sim C_{25}$ アルキニル、 $C_3 \sim C_{10}$ シクロアルキル、 $-C_1 \sim C_{10}$ アルキレン- $L-R^6$ 、または $-C_1 \sim C_{10}$ アルケニレン- $L-R^6$ であり、アルキル、アルキレン、アルケニル、アルケニレン、アルキニル、およびシクロアルキルの各々が独立に置換されているか、または非置換である。いくつかの実施形態では、式 (II) または (II*) における各 R^1 および R^2 は、独立して $C_7 \sim C_{22}$ アルキル、 $C_7 \sim C_{22}$ アルケニル、 $C_7 \sim C_{22}$ アルキニル、 $C_3 \sim C_{10}$ シクロアルキル、 $-C_1 \sim C_{10}$ アルキレン- $L-R^6$ 、または $-C_1 \sim C_{10}$ アルケニレン- $L-R^6$ であり、アルキル、アルキレン、アルケニル、アルケニレン、アルキニル、およびシクロアルキルの各々が独立に置換されているか、または非置換である。いくつかの実施形態では、式 (II) または (II*) における各 R^1 および R^2 は、独立して $C_{10} \sim C_{20}$ アルキル、 $C_{10} \sim C_{20}$ アルケニル、 $-C_4 \sim C_8$ アルキレン- $L-R^6$ 、または $-C_4 \sim C_8$ アルケニレン- $L-R^6$ であり、アルキル、アルキレン、アルケニル、およびシクロアルキルの各々が独立に置換されているか、または非置換である。いくつかの実施形態では、式 (II) または (II*) における各 R^1 および R^2 は、 $-C_1 \sim C_{10}$ アルキレン- $L-R^6$ である。いくつかの実施形態では、式 (II) または (II*) における各 R^1 および R^2 は、 $C_7 \sim C_{30}$ アルケニルである。いくつかの実施形態では、式 (II) または (II*) における各 R^1 および R^2 は、 $C_7 \sim C_{28}$ アルケニルである。いくつかの実施形態では、式 (II) または (II*) における各 R^1 および R^2 は、 $C_7 \sim C_{25}$ アルケニルである。いくつかの実施形態では、式 (II) または (II*) における各 R^1 および R^2 は、 $C_7 \sim C_{22}$ アルケニルである。

【0178】

[0141]いくつかの実施形態では、式 (II) または (II*) における各 R^1 および R^2 は、独立して置換もしくは非置換の直鎖状もしくは分枝状の $C_3 \sim C_{30}$ アルキル、または置換もしくは非置換の直鎖状もしくは分枝状の $C_3 \sim C_{30}$ アルケニルである。いくつかの実施形態では、式 (II) または (II*) における各 R^1 および R^2 は、独立して置換もしくは非置換の直鎖状もしくは分枝状の $C_3 \sim C_{28}$ アルキル、または置換もしくは非置換の直鎖状もしくは分枝状の鎖状 $C_3 \sim C_{28}$ アルケニルである。いくつかの実施形態では、式 (II) または (II*) における各 R^1 および R^2 は、独立して置換もしくは非置換の $C_3 \sim C_{25}$ アルキル、または置換もしくは非置換の $C_3 \sim C_{25}$ アルケニルである。いくつかの実施形態では、式 (II) または (II*) における各 R^1 お

10

20

30

40

50

よび R^2 は、独立して置換もしくは非置換の $C_3 \sim C_{22}$ アルキル、または置換もしくは非置換の $C_3 \sim C_{22}$ アルケニルである。いくつかの実施形態では、式 (I I) または (I I*) における各 R^1 および R^2 は、独立して置換もしくは非置換の $C_3 \sim C_{25}$ アルキルである。いくつかの実施形態では、式 (I I) または (I I*) における各 R^1 および R^2 は、独立して C_3 アルキル、 C_4 アルキル、 C_5 アルキル、 C_6 アルキル、 C_7 アルキル、 C_8 アルキル、 C_9 アルキル、 C_{10} アルキル、 C_{11} アルキル、 C_{12} アルキル、 C_{13} アルキル、 C_{14} アルキル、 C_{15} アルキル、 C_{16} アルキル、 C_{17} アルキル、 C_{18} アルキル、 C_{19} アルキル、 C_{20} アルキル、 C_{21} アルキル、 C_{22} アルキル、 C_{23} アルキル、 C_{24} アルキル、または C_{25} アルキルである。いくつかの実施形態では、式 (I I) または (I I*) における各 R^1 および R^2 は、独立して少なくとも C_3 アルキル、少なくとも C_4 アルキル、少なくとも C_5 アルキル、少なくとも C_6 アルキル、少なくとも C_7 アルキル、少なくとも C_8 アルキル、少なくとも C_9 アルキル、少なくとも C_{10} アルキル、少なくとも C_{11} アルキル、少なくとも C_{12} アルキル、少なくとも C_{13} アルキル、少なくとも C_{14} アルキル、少なくとも C_{15} アルキル、少なくとも C_{16} アルキル、少なくとも C_{17} アルキル、少なくとも C_{18} アルキル、少なくとも C_{19} アルキル、少なくとも C_{20} アルキル、少なくとも C_{21} アルキル、少なくとも C_{22} アルキル、少なくとも C_{23} アルキル、少なくとも C_{24} アルキル、または少なくとも C_{25} アルキルである。いくつかの実施形態では、式 (I I) または (I I*) における各 R^1 および R^2 は、独立して多くとも C_3 アルキル、多くとも C_4 アルキル、多くとも C_5 アルキル、多くとも C_6 アルキル、多くとも C_7 アルキル、多くとも C_8 アルキル、多くとも C_9 アルキル、多くとも C_{10} アルキル、多くとも C_{11} アルキル、多くとも C_{12} アルキル、多くとも C_{13} アルキル、多くとも C_{14} アルキル、多くとも C_{15} アルキル、多くとも C_{16} アルキル、多くとも C_{17} アルキル、多くとも C_{18} アルキル、多くとも C_{19} アルキル、多くとも C_{20} アルキル、多くとも C_{21} アルキル、多くとも C_{22} アルキル、多くとも C_{23} アルキル、多くとも C_{24} アルキル、または多くとも C_{25} アルキルである。いくつかの実施形態では、式 (I I) または (I I*) における R^1 および R^2 はそれぞれ独立に、置換または非置換の $C_3 \sim C_{25}$ アルケニルである。いくつかの実施形態では、式 (I I) または (I I*) における各 R^1 および R^2 は、独立して C_3 アルケニル、 C_4 アルケニル、 C_5 アルケニル、 C_6 アルケニル、 C_7 アルケニル、 C_8 アルケニル、 C_9 アルケニル、 C_{10} アルケニル、 C_{11} アルケニル、 C_{12} アルケニル、 C_{13} アルケニル、 C_{14} アルケニル、 C_{15} アルケニル、 C_{16} アルケニル、 C_{17} アルケニル、 C_{18} アルケニル、 C_{19} アルケニル、 C_{20} アルケニル、 C_{21} アルケニル、 C_{22} アルケニル、 C_{23} アルケニル、 C_{24} アルケニル、または C_{25} アルケニルである。いくつかの実施形態では、式 (I I) または (I I*) における各 R^1 および R^2 は、少なくとも C_3 アルケニル、少なくとも C_4 アルケニル、少なくとも C_5 アルケニル、少なくとも C_6 アルケニル、少なくとも C_7 アルケニル、少なくとも C_8 アルケニル、少なくとも C_9 アルケニル、少なくとも C_{10} アルケニル、少なくとも C_{11} アルケニル、少なくとも C_{12} アルケニル、少なくとも C_{13} アルケニル、少なくとも C_{14} アルケニル、少なくとも C_{15} アルケニル、少なくとも C_{16} アルケニル、少なくとも C_{17} アルケニル、少なくとも C_{18} アルケニル、少なくとも C_{19} アルケニル、少なくとも C_{20} アルケニル、少なくとも C_{21} アルケニル、少なくとも C_{22} アルケニル、少なくとも C_{23} アルケニル、少なくとも C_{24} アルケニル、または少なくとも C_{25} アルケニルである。いくつかの実施形態では、式 (I I) または (I I*) における各 R^1 および R^2 は、多くとも C_3 アルケニル、多くとも C_4 アルケニル、多くとも C_5 アルケニル、多くとも C_6 アルケニル、多くとも C_7 アルケニル、多くとも C_8 アルケニル、多くとも C_9 アルケニル、多くとも C_{10} アルケニル、多くとも C_{11} アルケニル、多くとも C_{12} アルケニル、多くとも C_{13} アルケニル、多くとも C_{14} アルケニル、多くとも C_{15} アルケニル、多くとも C_{16} アルケニル、多くとも C_{17} アルケニル、多くとも C_{18} アルケニル、多くとも C_{19} アルケニル、多くとも C_{20} アルケニル、多くとも C_{21} アルケニル、多くとも C_{22} アルケニル、多くとも C_{23} アルケニル、多くとも C_{24} アルケニル、ま

10

20

30

40

50

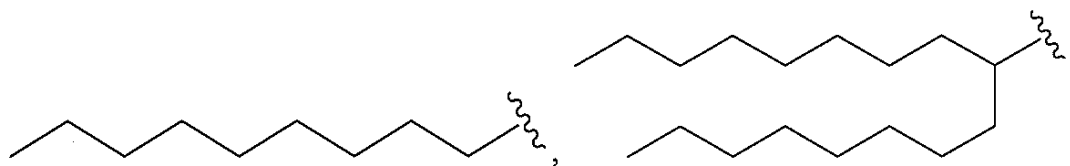
た C_{25} アルケニルである。

【0179】

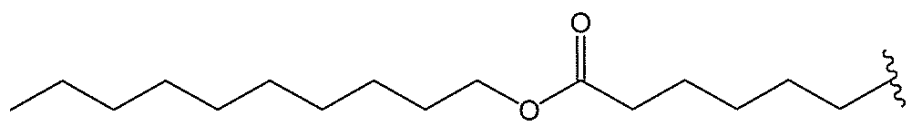
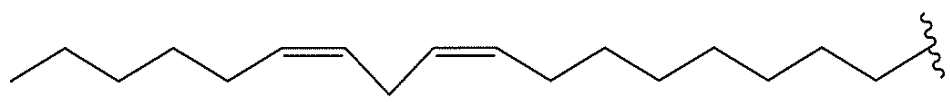
【0142】いくつかの実施形態では、式 (II) または (II*) における R^1 および／または R^2 は、独立して

【0180】

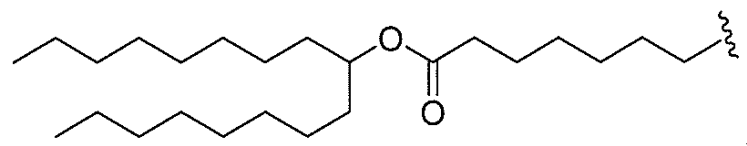
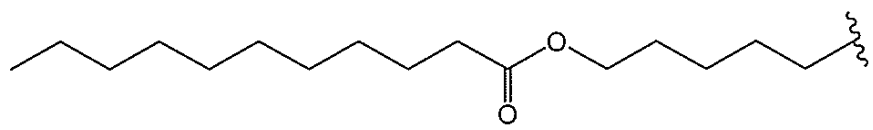
【化39-1】



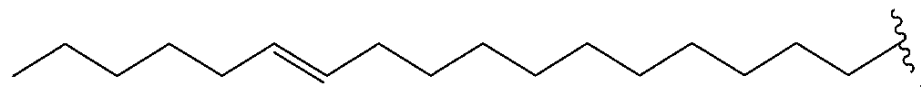
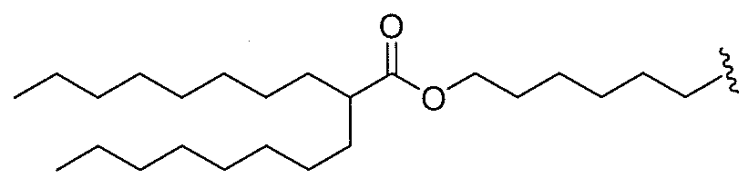
10



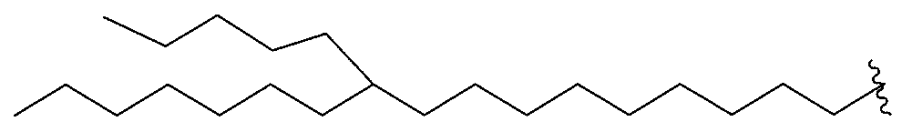
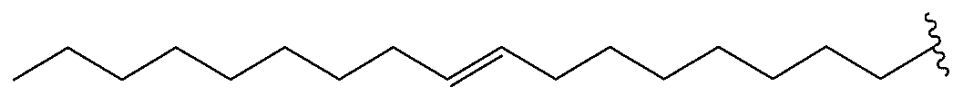
20



30



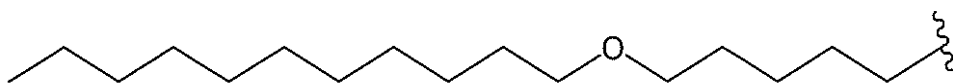
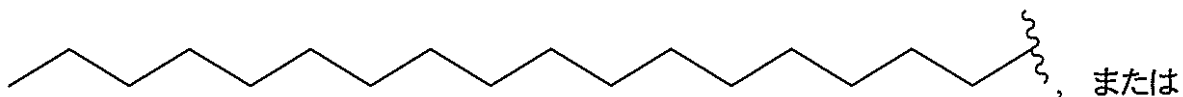
40



【0181】

50

【化 3 9 - 2】

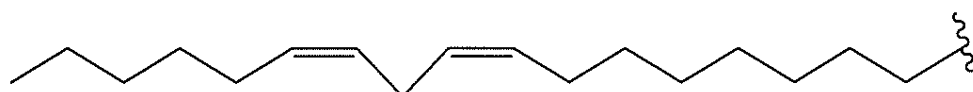


【0 1 8 2】

である。いくつかの実施形態では、式 (I I) または (I I*) における R^1 および / または R^2 は、

【0 1 8 3】

【化 4 0】

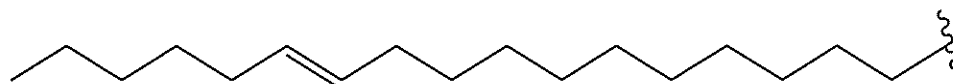


【0 1 8 4】

である。いくつかの実施形態では、式 (I I) または (I I*) における R^1 および / または R^2 は、

【0 1 8 5】

【化 4 1】

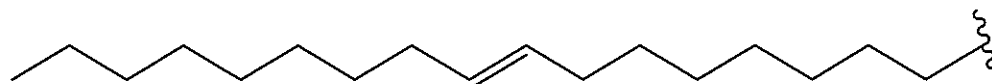


【0 1 8 6】

である。いくつかの実施形態では、式 (I I) または (I I*) における R^1 および / または R^2 は、

【0 1 8 7】

【化 4 2】

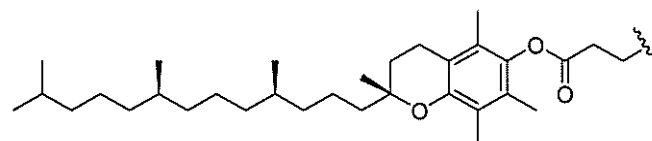


【0 1 8 8】

である。いくつかの実施形態では、式 (I I) または (I I*) における R^1 および / または R^2 は、

【0 1 8 9】

【化 4 3】



【0 1 9 0】

である。いくつかの実施形態では、式 (I I) または (I I*) における R^1 は、

【0 1 9 1】

10

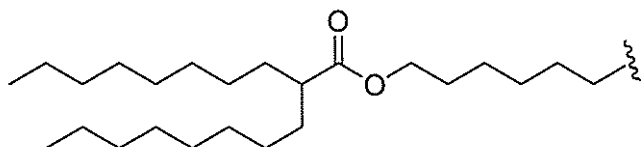
20

30

40

50

【化 4 4】

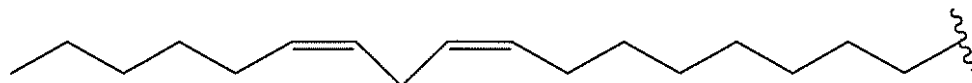


【0 1 9 2】

である。いくつかの実施形態では、式 (I I) または (I I *) における R^2 は、

【0 1 9 3】

【化 4 5】

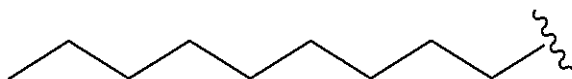


【0 1 9 4】

である。いくつかの実施形態では、式 (I I) または (I I *) における R^1 は、

【0 1 9 5】

【化 4 6】

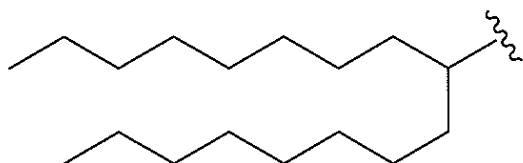


【0 1 9 6】

である。いくつかの実施形態では、式 (I I) または (I I *) における R^2 は、

【0 1 9 7】

【化 4 7】



【0 1 9 8】

である。

[0143]いくつかの実施形態では、式 (I I) または (I I *) における L の各々が独立に $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-C_1 \sim C_{10}$ アルキレン $-O-$ 、 $-C_1 \sim C_{10}$ アルキレン $-C(=O)O-$ 、 $-C_1 \sim C_{10}$ アルキレン $-OC(=O)-$ 、 $-C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)-$ 、 $-C(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=O)-$ 、または結合であり、アルキレンは置換されるかまたは置換されない。いくつかの実施形態では、式 (I I) または (I I *) における少なくとも 1 つの L は、独立して $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-C_1 \sim C_3$ アルキレン $-O-$ 、 $-C_1 \sim C_3$ アルキレン $-C(=O)O-$ 、 $-C_1 \sim C_3$ アルキレン $-OC(=O)-$ 、 $-C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)-$ 、 $-C(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=O)-$ 、または結合であり、アルキレンは置換されるかまたは置換されない。いくつかの実施形態では、式 (I I) または (I I *) における少なくとも 1 つの L は、独立して $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-C_1 \sim C_3$ アルキレン $-O-$ 、 $-C_1 \sim C_3$ アルキレン $-C(=O)O-$ 、 $-C_1 \sim C_3$ アルキレン $-OC(=O)-$ 、または結合であり、アルキレンは直鎖状もしくは分岐状の非置換アルキレンである。いくつかの実施形態では、式 (I I) または (I I *) における少なくとも 1 つの L は、 $-C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)-$ 、 $-C(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=O)-$ である。いくつかの実施形態では、式 (I

10

20

30

40

50

I) または (I I*) における少なくとも1つのLは-C(=O)O-である。いくつかの実施形態では、式(I I)または(I I*)における少なくとも1つのLは-OC(=O)-である。いくつかの実施形態では、式(I I)または(I I*)における少なくとも1つのLは-C(=O)NR⁴-である。いくつかの実施形態では、式(I I)または(I I*)における少なくとも1つのLは-C(=O)NH-である。いくつかの実施形態では、式(I I)または(I I*)における少なくとも1つのLは-C(=O)N(CH₃)-である。いくつかの実施形態では、式(I I)または(I I*)における少なくとも1つのLは-NR⁴C(=O)-である。いくつかの実施形態では、式(I I)または(I I*)における少なくとも1つのLは-NHC(=O)-である。いくつかの実施形態では、式(I I)または(I I*)における少なくとも1つのLは-N(CH₃)C(=O)-である。

10

[0199]

[0144]いくつかの実施形態では、式(I I)または(I I*)における少なくとも1つのR⁶は、独立して置換もしくは非置換の直鎖状もしくは分岐状のC₃~C₃₀アルキル、または置換もしくは非置換の直鎖状もしくは分岐状のC₃~C₃₀アルケニルである。いくつかの実施形態では、式(I I)または(I I*)のけるR⁶の各々が独立に置換もしくは非置換の直鎖状もしくは分岐状のC₃~C₂₈アルキル、または置換もしくは非置換の直鎖状もしくは分岐状のC₃~C₂₈アルケニルである。いくつかの実施形態では、式(I I)または(I I*)におけるR⁶の各々が独立に置換もしくは非置換のC₃~C₂₅アルキル、または置換もしくは非置換のC₃~C₂₅アルケニルである。いくつかの実施形態では、式(I I)または(I I*)における少なくとも1つのR⁶は、独立して置換または非置換のC₃~C₂₅アルキルである。いくつかの実施形態では、式(I I)または(I I*)における少なくとも1つのR⁶は、独立してC₃アルキル、C₄アルキル、C₅アルキル、C₆アルキル、C₇アルキル、C₈アルキル、C₉アルキル、C₁₀アルキル、C₁₁アルキル、C₁₂アルキル、C₁₃アルキル、C₁₄アルキル、C₁₅アルキル、C₁₆アルキル、C₁₇アルキル、C₁₈アルキル、C₁₉アルキル、C₂₀アルキル、C₂₁アルキル、C₂₂アルキル、C₂₃アルキル、C₂₄アルキル、またはC₂₅アルキルである。いくつかの実施形態では、式(I I)または(I I*)における少なくとも1つのR⁶は、少なくともC₃アルキル、少なくともC₄アルキル、少なくともC₅アルキル、少なくともC₆アルキル、少なくともC₇アルキル、少なくともC₈アルキル、少なくともC₉アルキル、少なくともC₁₀アルキル、少なくともC₁₁アルキル、少なくともC₁₂アルキル、少なくともC₁₃アルキル、少なくともC₁₄アルキル、少なくともC₁₅アルキル、少なくともC₁₆アルキル、少なくともC₁₇アルキル、少なくともC₁₈アルキル、少なくともC₁₉アルキル、少なくともC₂₀アルキル、少なくともC₂₁アルキル、少なくともC₂₂アルキル、少なくともC₂₃アルキルである。少なくともC₂₄アルキル、または少なくともC₂₅アルキルである。いくつかの実施形態では、式(I I)または(I I*)における少なくとも1つのR⁶は、独立して多くともC₃アルキル、多くともC₄アルキル、多くともC₅アルキル、多くともC₆アルキル、多くともC₇アルキル、多くともC₈アルキル、多くともC₉アルキル、多くともC₁₀アルキル、多くともC₁₁アルキル、多くともC₁₂アルキル、多くともC₁₃アルキル、多くともC₁₄アルキル、多くともC₁₅アルキル、多くともC₁₆アルキル、多くともC₁₇アルキル、多くともC₁₈アルキル、多くともC₁₉アルキル、多くともC₂₀アルキル、多くともC₂₁アルキル、多くともC₂₂アルキル、多くともC₂₃アルキル、多くともC₂₄アルキル、または多くともC₂₅アルキルである。いくつかの実施形態では、式(I I)または(I I*)における少なくとも1つのR⁶は、独立して置換または非置換のC₃~C₂₅アルケニルである。いくつかの実施形態では、式(I I)または(I I*)における少なくとも1つのR⁶は、独立してC₃アルケニル、C₄アルケニル、C₅アルケニル、C₆アルケニル、C₇アルケニル、C₈アルケニル、C₉アルケニル、C₁₀アルケニル、C₁₁アルケニル、C₁₂アルケニル、C₁₃アルケニル、C₁₄アルケニル、C₁₅アルケニル、C₁₆アルケニル、C₁₇アルケニル、C₁₈アルケニル、C₁

20

30

40

50

9 アルケニル、C₂₀アルケニル、C₂₁アルケニル、C₂₂アルケニル、C₂₃アルケニル、C₂₄アルケニルまたはC₂₅アルケニルである。いくつかの実施形態では、式(I I)または(I I*)における少なくとも1つのR⁶は、少なくともC₃アルケニル、少なくともC₄アルケニル、少なくともC₅アルケニル、少なくともC₆アルケニル、少なくともC₇アルケニル、少なくともC₈アルケニル、少なくともC₉アルケニル、少なくともC₁₀アルケニル、少なくともC₁₁アルケニル、少なくともC₁₂アルケニル、少なくともC₁₃アルケニル、少なくともC₁₄アルケニル、少なくともC₁₅アルケニル、少なくともC₁₆アルケニル、少なくともC₁₇アルケニル、少なくともC₁₈アルケニル、少なくともC₁₉アルケニル、少なくともC₂₀アルケニル、少なくともC₂₁アルケニル、少なくともC₂₂アルケニル、少なくともC₂₃アルケニルである。少なくともC₂₄アルケニル、または少なくともC₂₅アルケニルである。いくつかの実施形態では、式(I I)または(I I*)における少なくとも1つのR⁶は、多くともC₃アルケニル、多くともC₄アルケニル、多くともC₅アルケニル、多くともC₆アルケニル、多くともC₇アルケニル、多くともC₈アルケニル、多くともC₉アルケニル、多くともC₁₀アルケニル、多くともC₁₁アルケニル、多くともC₁₂アルケニル、多くともC₁₃アルケニル、多くともC₁₄アルケニル、多くともC₁₅アルケニル、多くともC₁₆アルケニル、多くともC₁₇アルケニル、多くともC₁₈アルケニル、多くともC₁₉アルケニル、多くともC₂₀アルケニル、多くともC₂₁アルケニル、多くともC₂₂アルケニル、多くともC₂₃アルケニル、多くともC₂₄アルケニル、またはC₂₅アルケニルである。

10

20

【0200】

[0145]いくつかの実施形態では、式(I I)または(I I*)における各R⁶は、独立して

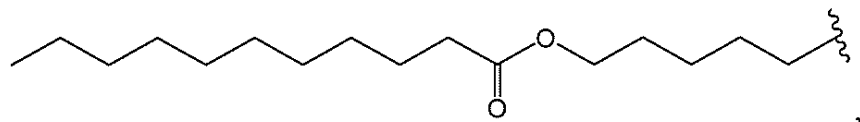
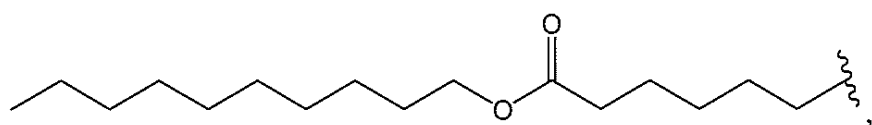
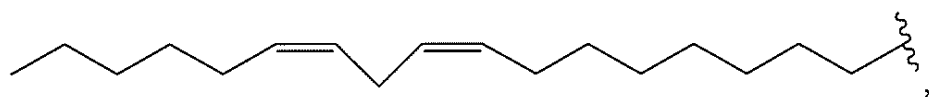
【0201】

30

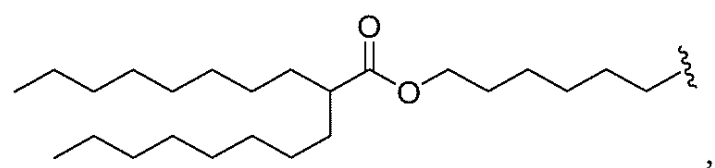
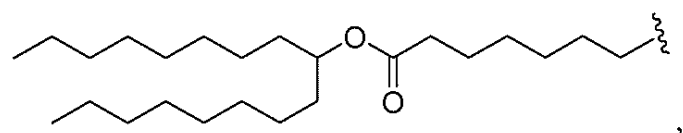
40

50

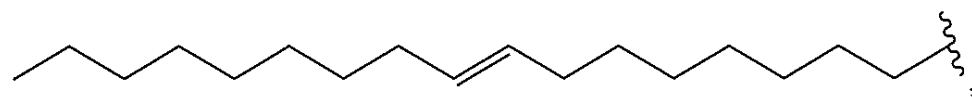
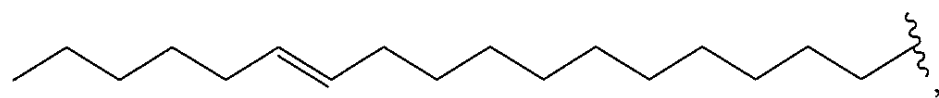
【化 4 8】



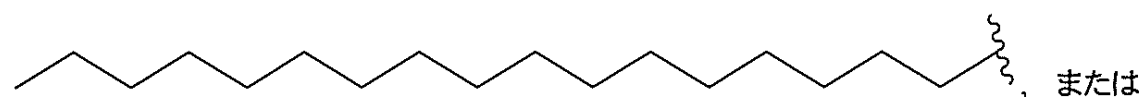
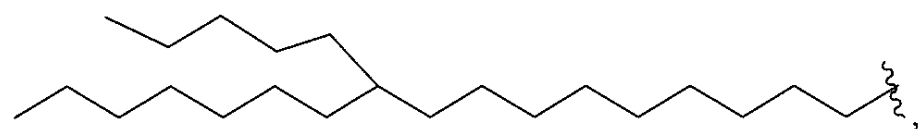
10



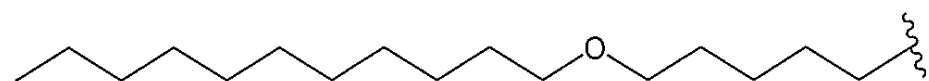
20



30



または



40

【0202】

である。いくつかの実施形態では、式 (I I) または (I I*) における各 R⁶ は、

【0203】

【化 4 9】



【0204】

50

CCCCC/C=C\CCCCCCCC
CCCCCCCC=CCCCCCCCC

[0209]

[0147]いくつかの実施形態では、式(II)または(II*)における各XおよびYは、独立して $-C(=O)O$ または $-OC(=O)-$ である。いくつかの実施形態では、式(II)または(II*)における各XおよびYは $-C(=O)O-$ である。いくつかの実施形態では、式(II)または(II*)における各XおよびYは $-OC(=O)-$ である。いくつかの実施形態では、式(II)または(II*)におけるYは $-C(=O)O-$ である。いくつかの実施形態では、式(II)または(II*)におけるYは $-OC(=O)-$ である。いくつかの実施形態では、式(II)または(II*)における各XおよびYは、独立して $-C(=O)NR^4-$ または $-NR^4C(=O)-$ である。いくつかの実施形態では、式(II)または(II*)におけるXは、 $-C(=O)NR^4-$ または $-NR^4C(=O)-$ である。いくつかの実施形態では、式(II)または(II*)におけるXは $-C(=O)NR^4-$ である。いくつかの実施形態では、式(II)または(II*)におけるXは $-NR^4C(=O)-$ である。いくつかの実施形態では、式(II)または(II*)における各XおよびYは、独立して $-C(=O)N(CH_3)-$ 、 $-N(CH_3)C(=O)-$ 、 $-C(=O)NH-$ 、または $-NHC(=O)-$ である。いくつかの実施形態では、式(II)または(II*)における各XおよびYは、独立して $-C(=O)NH-$ 、 $-C(=O)N(CH_3)-$ 、 $-OC(=O)-$ 、 $-NHC(=O)-$ 、 $-N(CH_3)C(=O)-$ 、 $-C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)O-$ 、 $-NHC(=O)O-$ 、 $-N(CH_3)C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)NH-$ 、 $-OC(=O)N(CH_3)-$ 、 $-NHC(=O)NH-$ 、 $-N(CH_3)C(=O)NH-$ 、 $-NHC(=O)N(CH_3)-$ 、 $-N(CH_3)C(=O)N(CH_3)-$ 、 $NHC(=NH)NH-$ 、 $-N(CH_3)C(=NH)NH-$ 、 $-NHC(=NH)N(CH_3)-$ 、 $-N(CH_3)C(=NH)N(CH_3)-$ 、 $NHC(=NMe)NH-$ 、 $-N(C$

50

H₃) C (=NMe) NH-, -NHC (=NMe) N (CH₃) -, または -N (CH₃) C (=NMe) N (CH₃) - である。いくつかの実施形態では、式 (II) または (II*) における各 X および Y は、独立して -OC (=O) O-, -NR⁴ C (=O) O-, -OC (=O) NR⁴ -, または -NR⁴ C (=O) NR⁴ - である。いくつかの実施形態では、式 (II) または (II*) における各 X および Y は、独立して -OC (=O) O-, -NHC (=O) O-, -OC (=O) NH-, -NHC (=O) NH-, -N (CH₃) C (=O) O-, -OC (=O) N (CH₃) -, -N (CH₃) C (=O) N (CH₃) - または -N (CH₃) C (=O) NH- である。いくつかの実施形態では、式 (II) または (II*) における各 X および Y は、独立して -OC (=O) O-, -NHC (=O) O-, -OC (=O) NH-, または -NHC (=O) NH- である。

10

【0210】

[0148] いくつかの実施形態では、式 (II) または (II*) における R³ は、-C₀ ~ C₁₀ アルキレン-NR⁷ R⁸ または -C₀ ~ C₁₀ アルキレン-ヘテロシクロアルキルであり、アルキレンおよびヘテロシクロアルキルは、独立して置換されるかまたは置換されない。いくつかの実施形態では、式 (II) または (II*) における R³ は、-C₀ ~ C₁₀ アルキレン-NR⁷ R⁸ である。いくつかの実施形態では、式 (II) または (II*) における R³ は、-C₁ ~ C₆ アルキレン-NR⁷ R⁸ である。いくつかの実施形態では、式 (II) または (II*) における R³ は、-C₁ ~ C₄ アルキレン-NR⁷ R⁸ である。いくつかの実施形態では、式 (II) または (II*) における R³ は、-C₁-アルキレン-NR⁷ R⁸ である。いくつかの実施形態では、式 (II) または (II*) における R³ は、-C₂-アルキレン-NR⁷ R⁸ である。いくつかの実施形態では、式 (II) または (II*) における R³ は、-C₃-アルキレン-NR⁷ R⁸ である。いくつかの実施形態では、式 (II) または (II*) における R³ は、-C₄-アルキレン-NR⁷ R⁸ である。いくつかの実施形態では、式 (II) または (II*) における R³ は、-C₅-アルキレン-NR⁷ R⁸ である。いくつかの実施形態では、式 (II) または (II*) における R³ は、-C₀ ~ C₁₀ アルキレン-ヘテロシクロアルキルである。いくつかの実施形態では、式 (II) または (II*) における R³ は、-C₁ ~ C₆ アルキレン-ヘテロシクロアルキルであり、ヘテロシクロアルキルは、1 ~ 3 個の窒素および 0 ~ 2 個の酸素を含む。いくつかの実施形態では、式 (II) または (II*) における R³ は、四級化される。

20

30

【0211】

[0149] いくつかの実施形態では、式 (II) または (II*) における R⁷ および R⁸ は、独立して水素または置換もしくは非置換の C₁ ~ C₆ アルキルである。いくつかの実施形態では、式 (II) または (II*) における少なくとも 1 つの R⁷ および R⁸ は、独立して置換または非置換の C₁ ~ C₆ アルキルである。いくつかの実施形態では、少なくとも 1 つの R⁷ および R⁸ は、独立して水素または置換もしくは非置換の C₁ ~ C₃ アルキルである。いくつかの実施形態では、少なくとも 1 つの R⁷ および R⁸ は、独立して置換または非置換の C₁ ~ C₃ アルキルである。いくつかの実施形態では、少なくとも 1 つの R⁷ および R⁸ は、独立して -CH₃、-CH₂CH₃、-CH₂CH₂CH₃ または -CH (CH₃)₂ である。いくつかの実施形態では、少なくとも 1 つの R⁷ および R⁸ は CH₃ である。いくつかの実施形態では、少なくとも 1 つの R⁷ および R⁸ は -CH₂CH₃ である。

40

【0212】

[0150] いくつかの実施形態では、式 (II) または (II*) における R⁷ および R⁸ は、それらが結合している窒素と一緒に、置換または非置換の C₂ ~ C₆ ヘテロシクリルを形成する。いくつかの実施形態では、R⁷ および R⁸ は、それらが結合している窒素と一緒に、置換または非置換の C₂ ~ C₆ ヘテロシクロアルキルを形成する。いくつかの実施形態では、R⁷ および R⁸ は、それらが結合している窒素と一緒に、R⁷ および R⁸ は、置換または非置換の 3 ~ 7 員のヘテロシクロアルキルを形成する

50

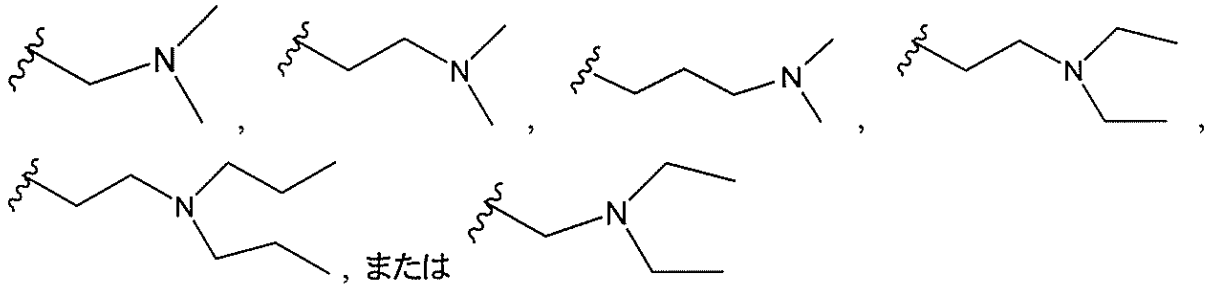
。

【0213】

【0151】いくつかの実施形態では、式 (II) または (II*) における R^3 は、

【0214】

【化52】



10

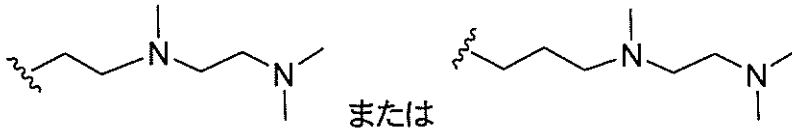
【0215】

である。

【0152】いくつかの実施形態では、式 (II) または (II*) における R^3 は、

【0216】

【化53】



20

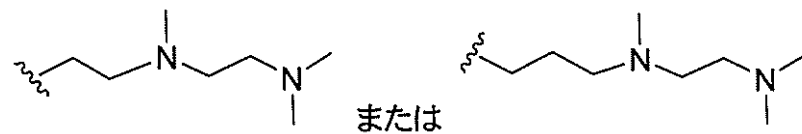
【0217】

である。

【0153】いくつかの実施形態では、式 (II) または (II*) における R^3 は、

【0218】

【化54】



30

【0219】

である。

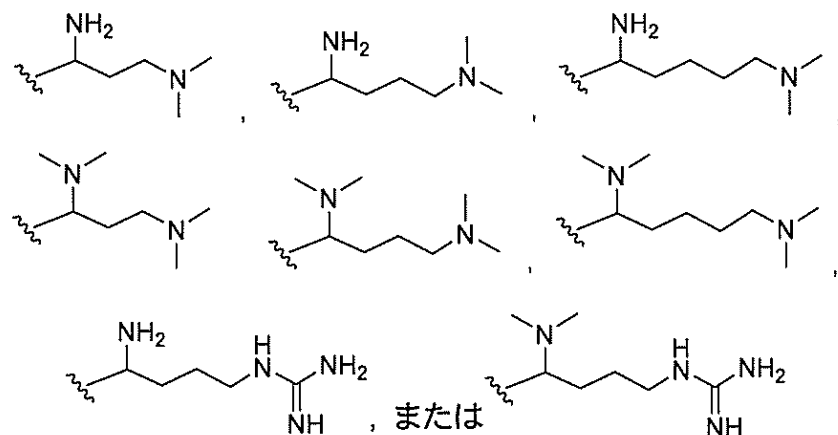
【0154】いくつかの実施形態では、式 (II) または (II*) における R^3 は、

【0220】

40

50

【化 5 5】



10

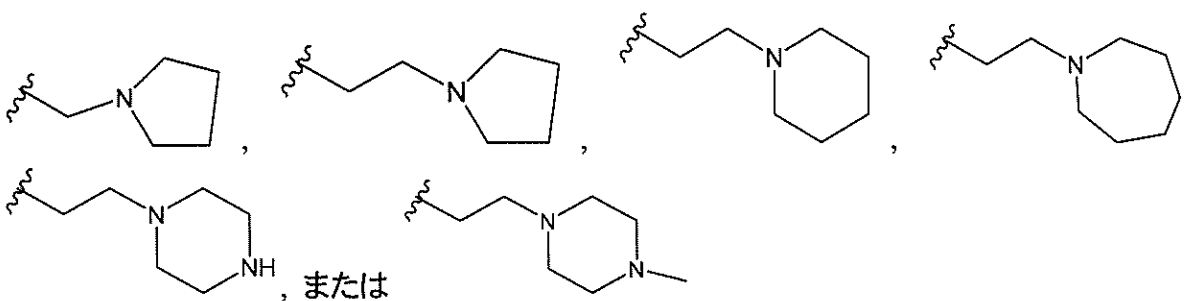
【0 2 2 1】

である。

【0155】いくつかの実施形態では、式 (I I) または (I I*) における R^3 は、

【0 2 2 2】

【化 5 6】



20

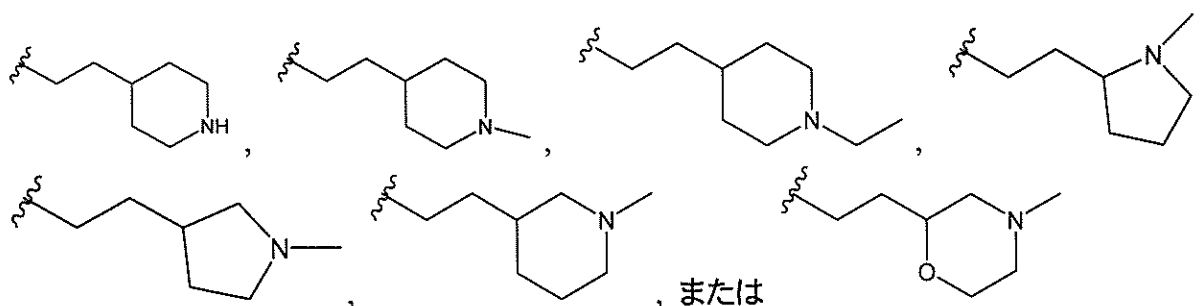
【0 2 2 3】

である。

【0156】いくつかの実施形態では、式 (I I) または (I I*) における R^3 は、

【0 2 2 4】

【化 5 7】



40

【0 2 2 5】

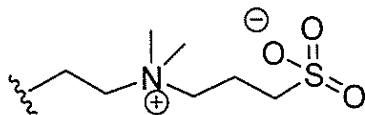
である。

【0157】いくつかの実施形態では、式 (I I) または (I I*) における R^3 は、

【0 2 2 6】

50

【化 5 8】



【0227】

である。

【0158】いくつかの実施形態では、式 (I I) または (I I*) における Z は、 $-C(=O)O$ または $-OC(=O)-$ である。いくつかの実施形態では、式 (I I) または (I I*) における Z は、 $-C(=O)O-$ である。いくつかの実施形態では、式 (I I) または (I I*) における Z は、 $-OC(=O)-$ である。いくつかの実施形態では、式 (I I) または (I I*) における Z は、 $-C(=O)NR^4$ または $-NR^4C(=O)-$ である。いくつかの実施形態では、式 (I I) または (I I*) における Z は、 $-C(=O)NR^4$ である。いくつかの実施形態では、式 (I I) または (I I*) における Z は、 $-NR^4C(=O)-$ である。いくつかの実施形態では、Z 中の R^4 は、水素または $C_1 \sim C_4$ アルキルである。いくつかの実施形態では、Z 中の R^4 は、水素である。いくつかの実施形態では、Z 中の R^4 は、 $C_1 \sim C_4$ アルキルである。いくつかの実施形態では、式 (I I) または (I I*) における Z は、 $-C(=O)N(CH_3)-$ 、 $-N(CH_3)C(=O)-$ 、 $-C(=O)NH-$ または $-NHC(=O)-$ である。いくつかの実施形態では、式 (I I) または (I I*) における Z は、 $-OC(=O)O-$ 、 $-NR^4C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)NR^4$ または $-NR^4C(=O)NR^4$ である。いくつかの実施形態では、式 (I I) または (I I*) における Z は、 $-OC(=O)O-$ 、 $-NHC(=O)O-$ 、 $-OC(=O)NH-$ 、 $-NHC(=O)NH-$ 、 $-N(CH_3)C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)N(CH_3)-$ 、 $-N(CH_3)C(=O)N(CH_3)-$ 、 $-NHC(=O)N(CH_3)-$ または $-N(CH_3)C(=O)NH-$ である。いくつかの実施形態では、式 (I I) または (I I*) における Z は、 $-OC(=O)O-$ 、 $-NHC(=O)O-$ 、 $-OC(=O)NH-$ 、または $-NHC(=O)NH-$ である。

【0228】

【0159】一態様では、本明細書には、表 1 A のアミノ脂質、またはその塩もしくは溶媒和物が開示される。

【0229】

10

20

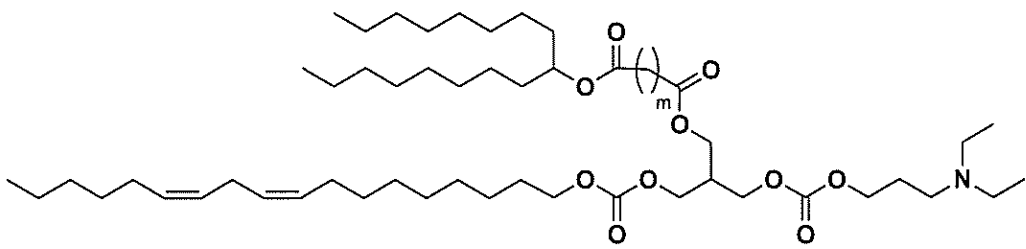
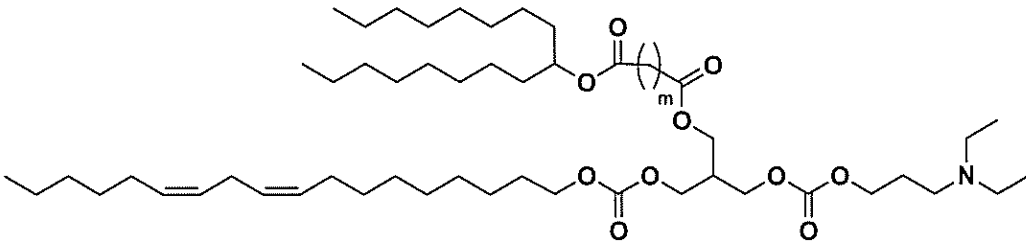
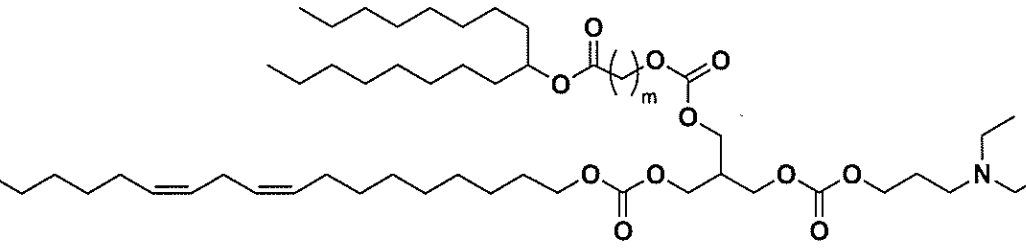
30

40

50

【表 1 - 1】

表 1A. 脂質ナノ粒子を構成するためのアミノ脂質。いずれかの構造中のキラル炭素原子は、ラセミ体、ならびに/またはキラル的に純粋な R 立体異性体および S 立体異性体を示す。

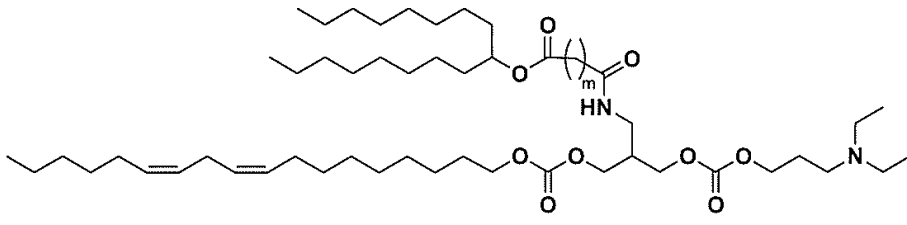
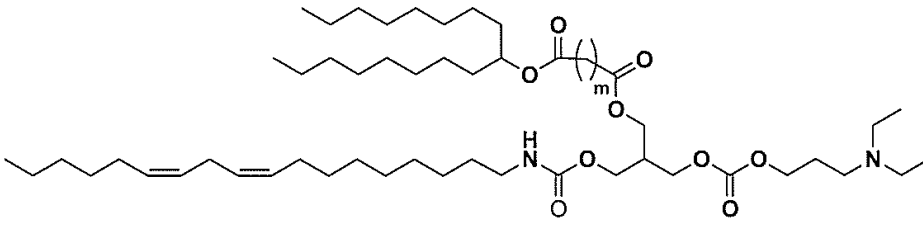
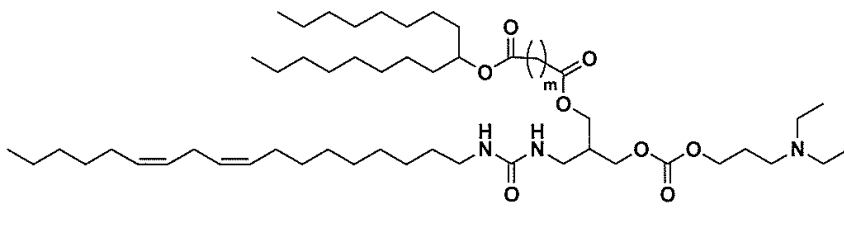
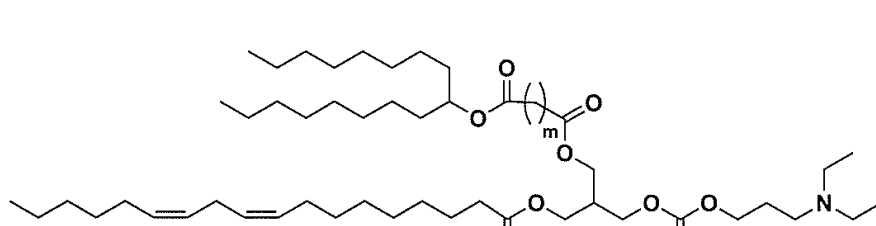
 m = 1-10 VL011-VL020	10
 m = 1-10 VL021-VL030	20
 m = 1-10 VL031-VL040	30

40

【 0 2 3 0 】

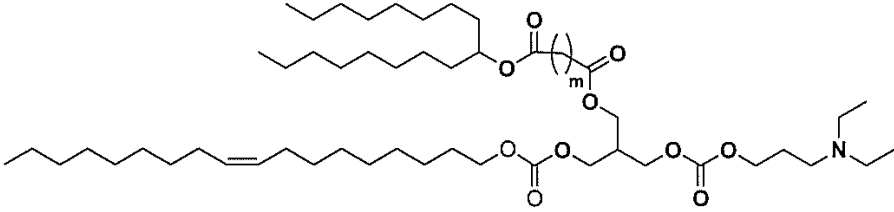
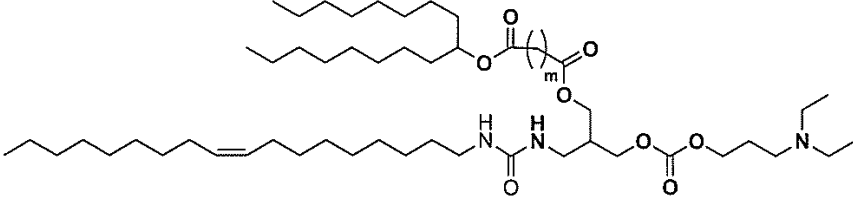
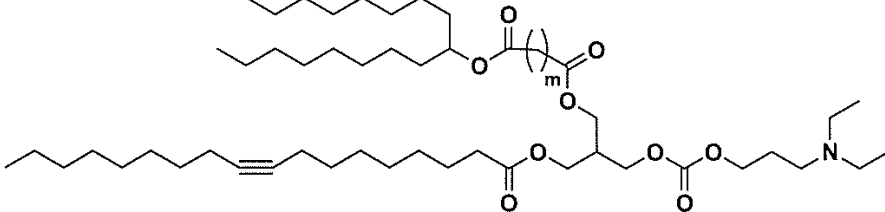
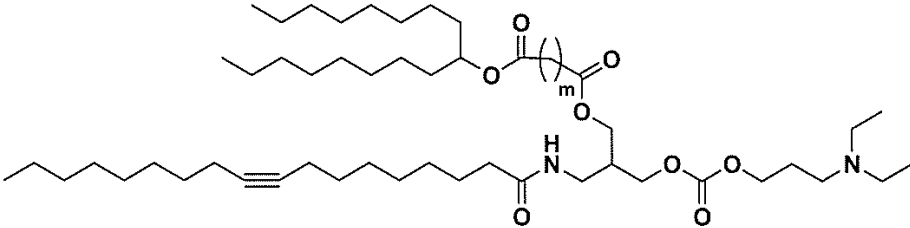
50

【表 1 - 2】

 $m = 1-10$ VL041-VL050	10
 $m = 1-10$ VL051-VL060	20
 $m = 1-10$ VL061-VL070	30
 $m = 1-10$ VL071-VL080	40

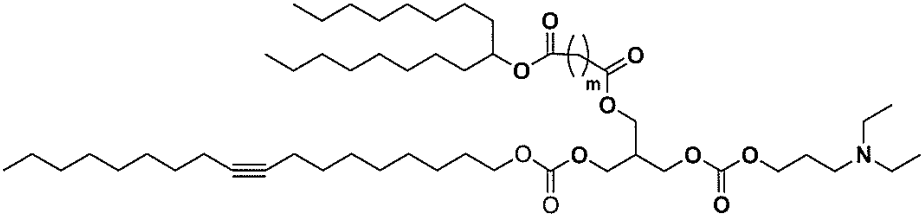
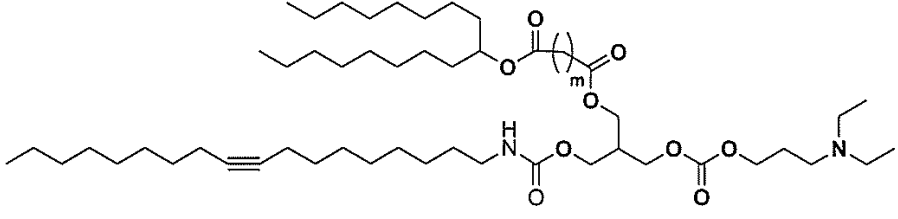
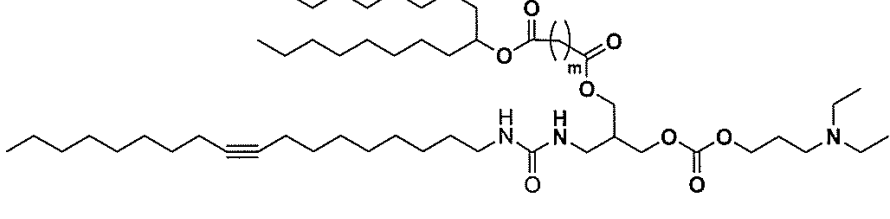
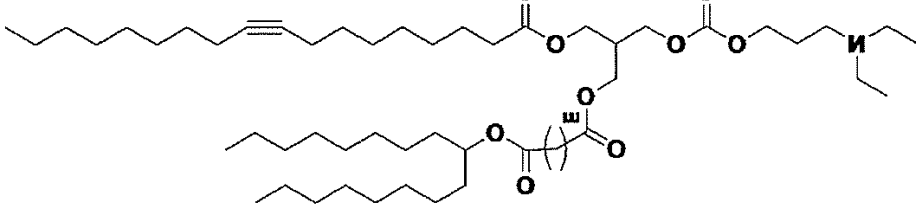
【 0 2 3 1】

【表 1 - 4】

 $m = 1-10$ VL121-VL130	10
 $m = 1-10$ VL131-VL140	20
 $m = 1-10$ VL141-VL150	30
 $m = 1-10$ VL151-VL160	40

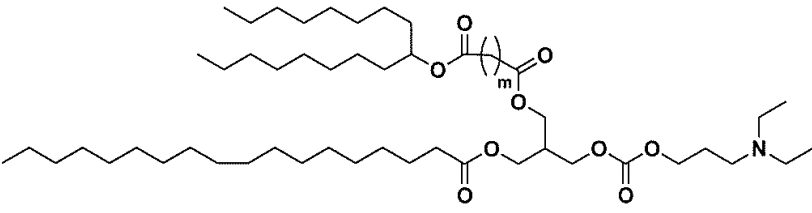
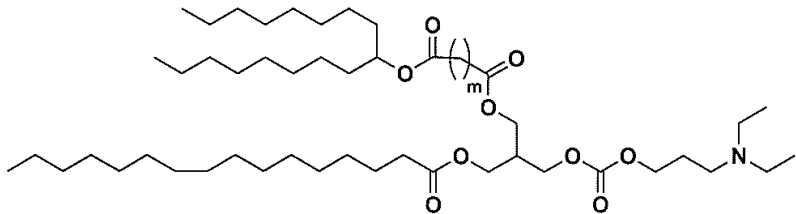
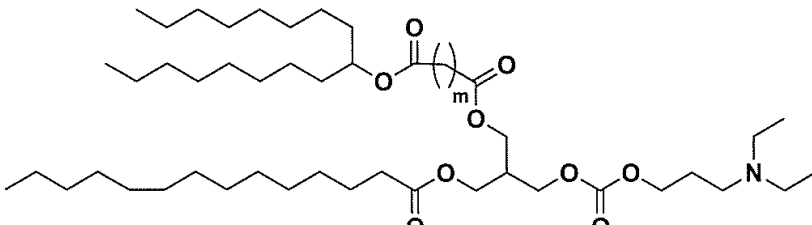
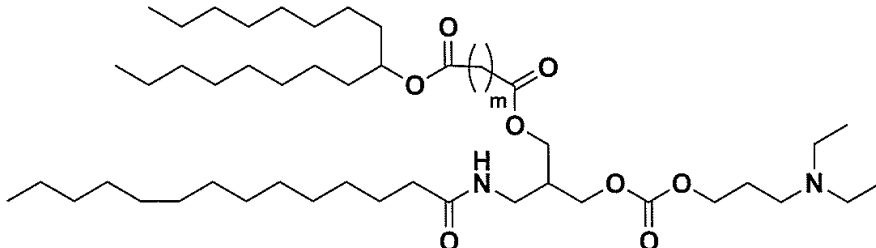
【 0 2 3 3 】

【表 1 - 5】

 $m = 1-10$ VL161-VL170	10
 $m = 1-10$ VL171-VL180	20
 $m = 1-10$ VL181-VL190	30
 $m = 1-10$ VL191-VL200	40

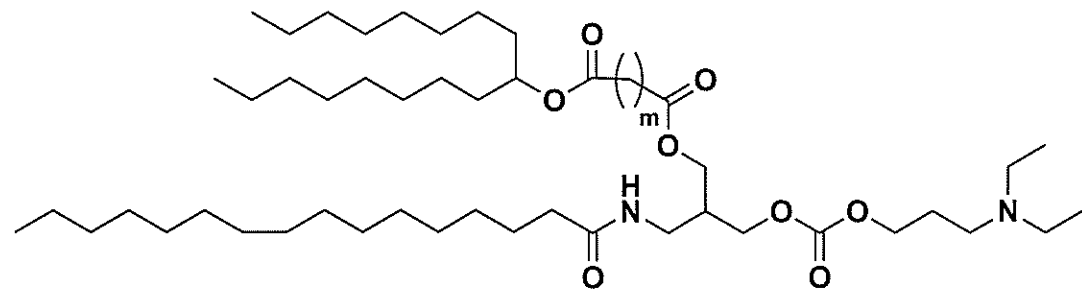
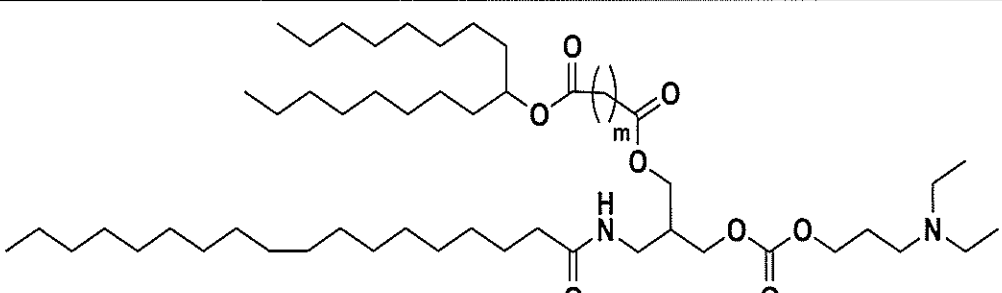
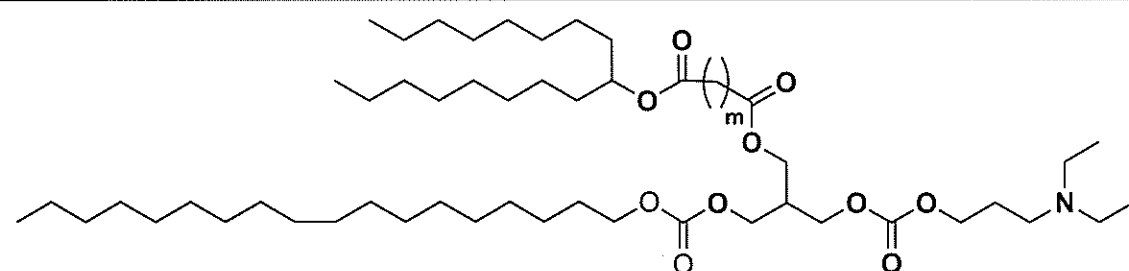
【 0 2 3 4 】

【表 1 - 6】

 $m = 1-10$ VL201-VL210	10
 $m = 1-10$ VL211-VL220	20
 $m = 1-10$ VL221-VL230	30
 $m = 1-10$ VL251-VL260	40

【 0 2 3 5】

【表 1 - 7】

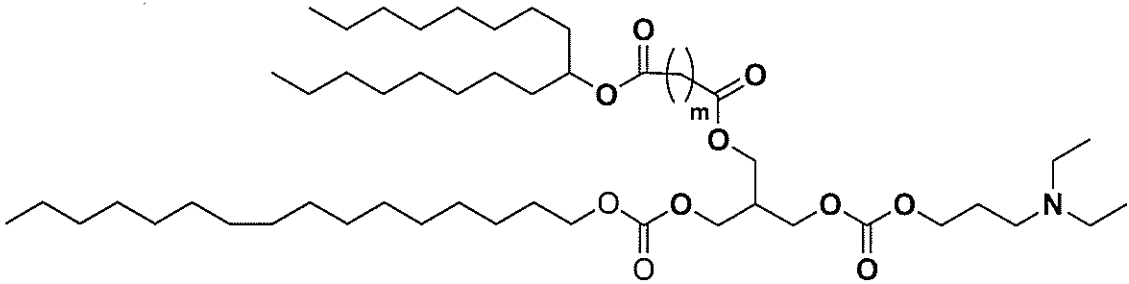
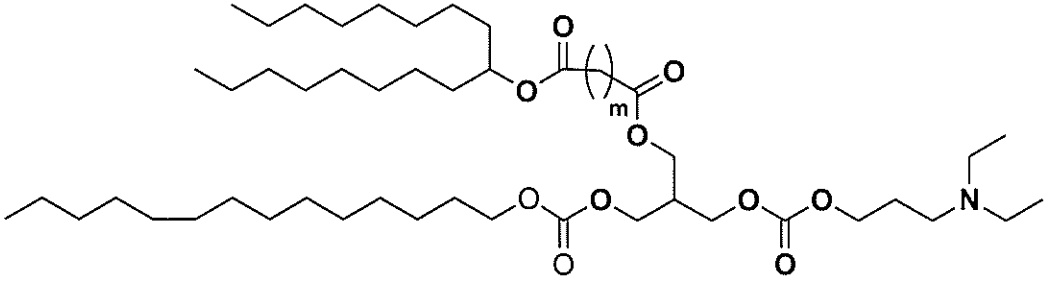
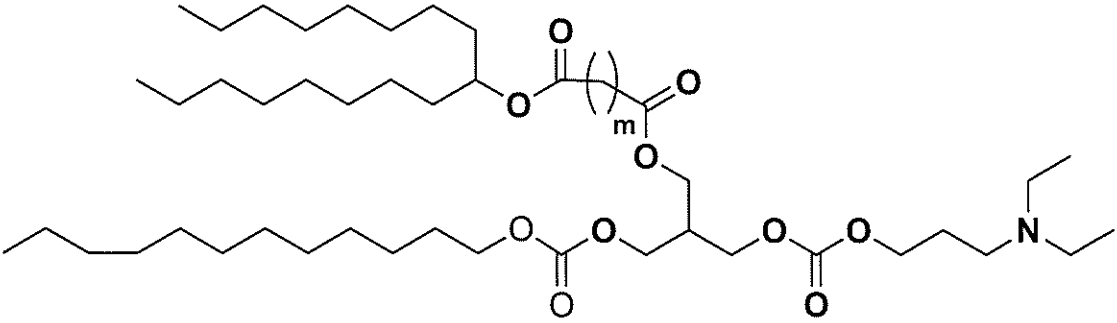
 $m = 1-10$ VL261-270	10
 $m = 1-10$ VL271-280	20
 $m = 1-10$ VL281-290	30

【 0 2 3 6 】

40

50

【表 1 - 8】

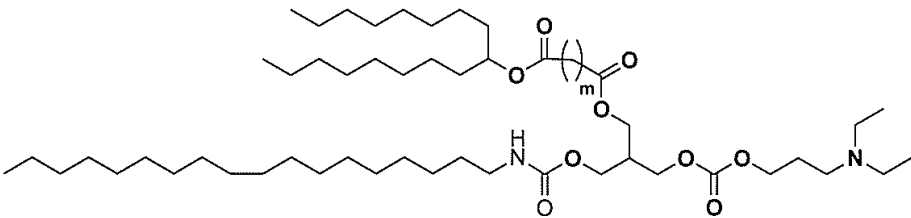
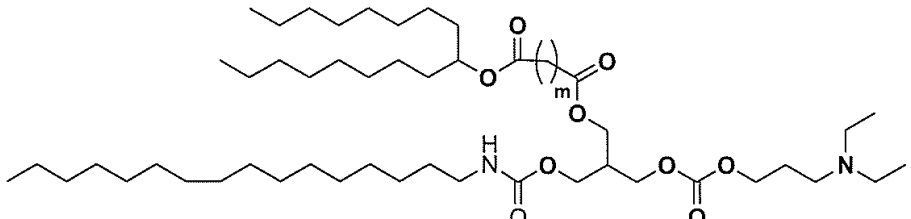
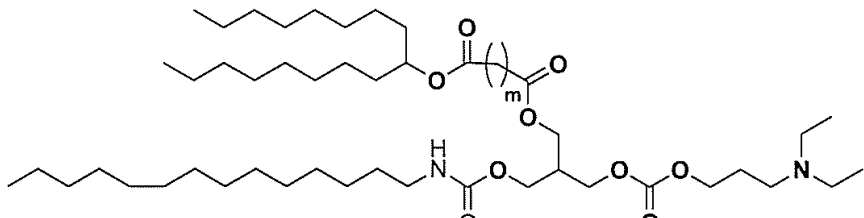
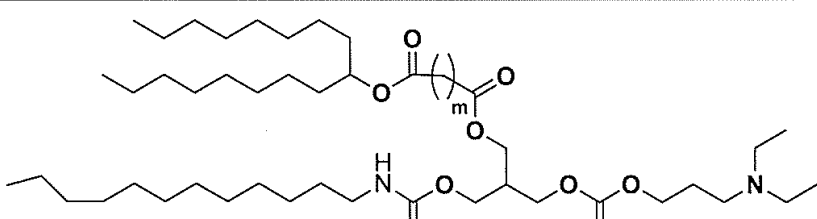
 $m = 1-10$ VL291-VL300	10
 $m = 1-10$ VL301-VL310	20
 $m = 1-10$ VL311-VL320	30

【 0 2 3 7】

40

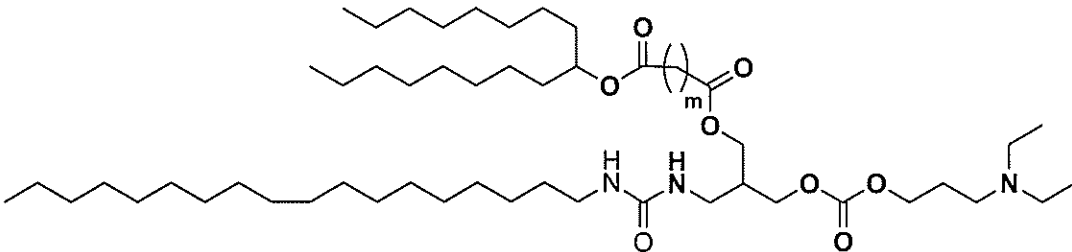
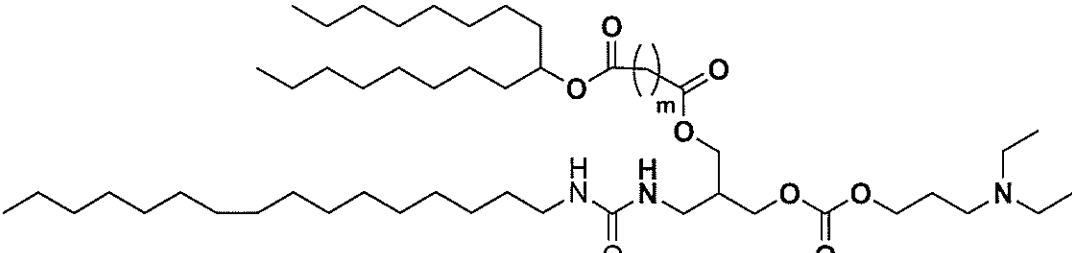
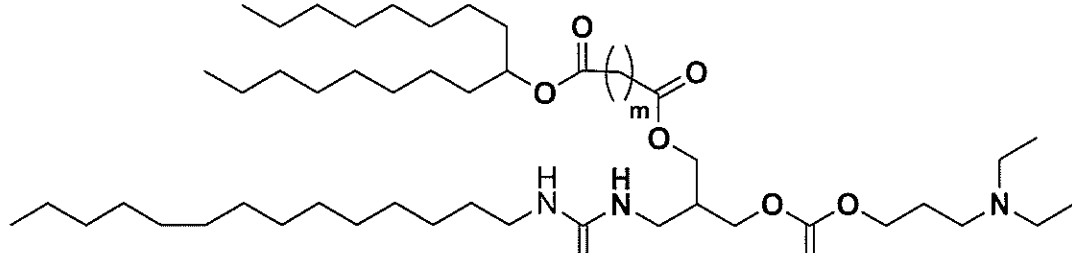
50

【表 1 - 9】

 m = 1-10 VL321-VL330	10
 m = 1-10 VL331-VL340	20
 m = 1-10 VL341-VL350	30
 m = 1-10 VL351-VL360	40

【 0 2 3 8 】

【表 1 - 1 0】

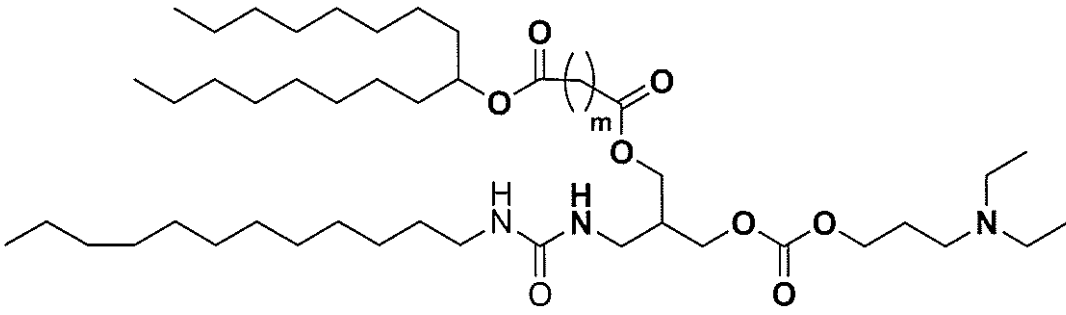
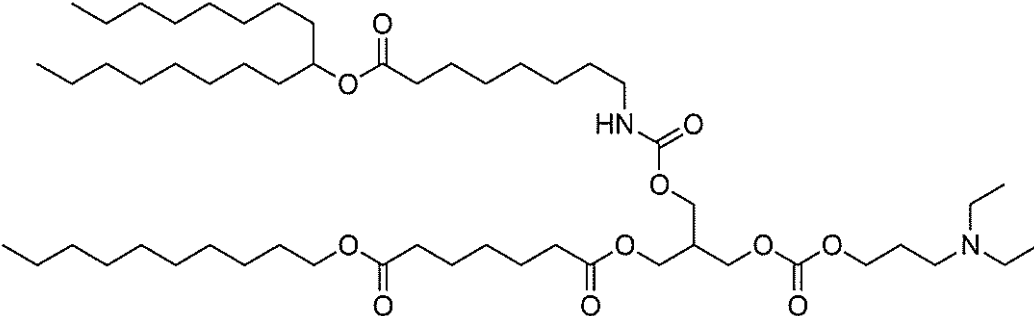
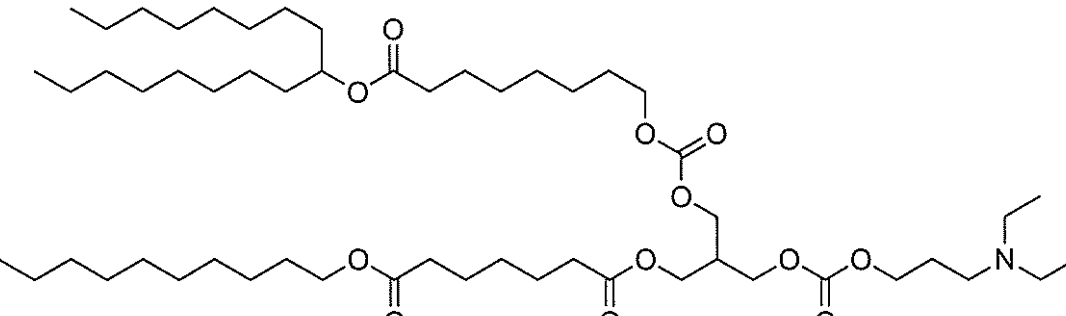
 $m = 1-10$ VL361-VL370	10
 $m = 1-10$ VL371-VL380	20
 $m = 1-10$ VL381-VL390	30

40

【 0 2 3 9】

50

【表 1 - 1 1】

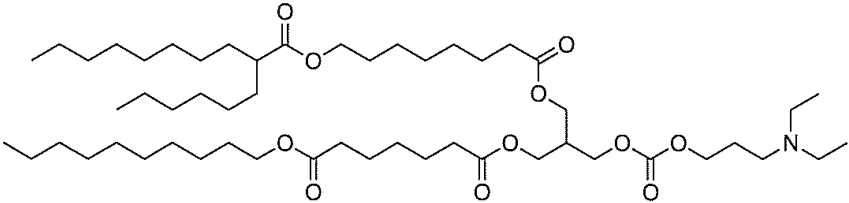
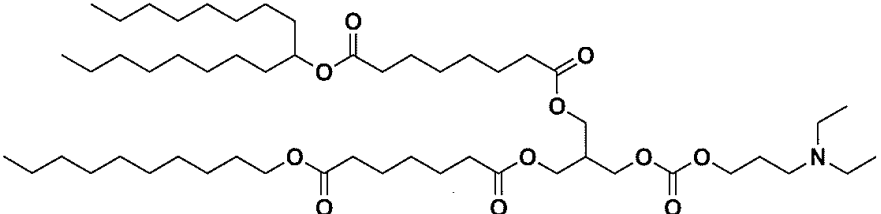
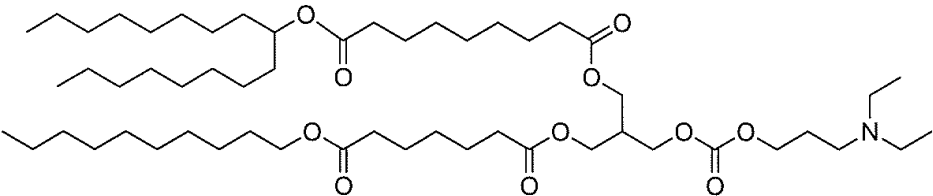
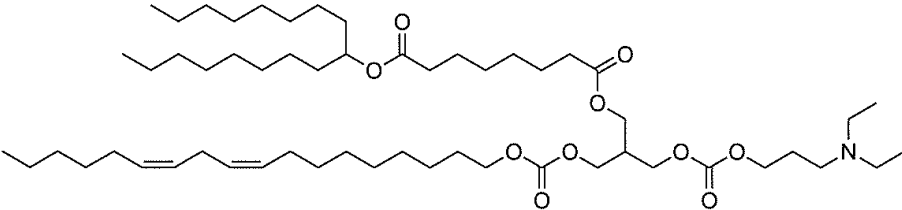
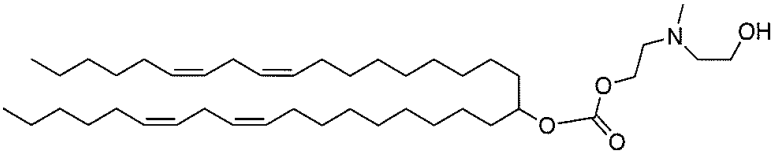
 $m = 1-10$ VL391-VL400	10
 VL401	20
 VL402	30

【 0 2 4 0 】

40

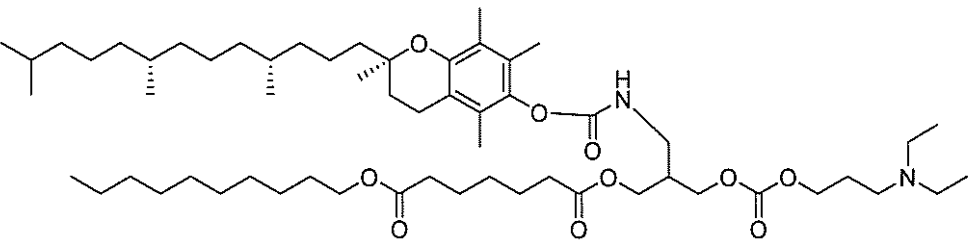
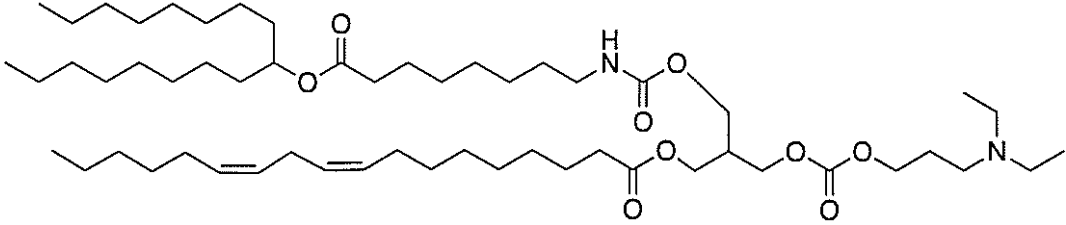
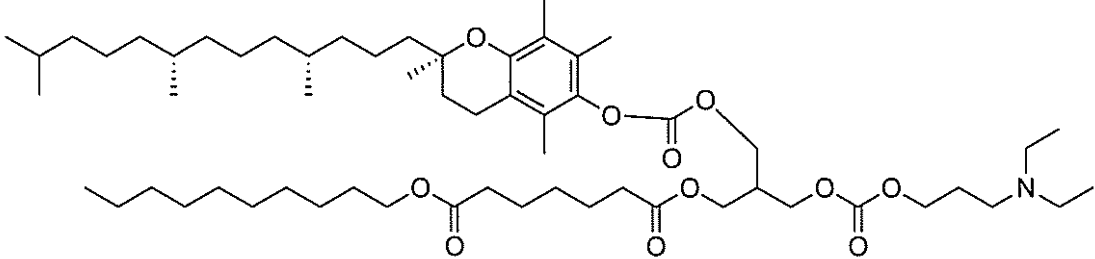
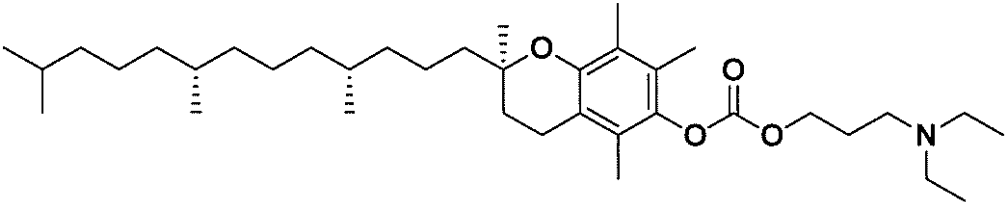
50

【表 1 - 1 2】

 VL403	
 VL404	10
 VL405	20
 VL406	30
 VL407	40

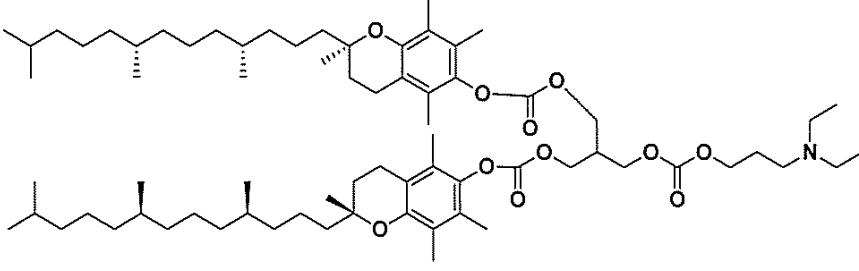
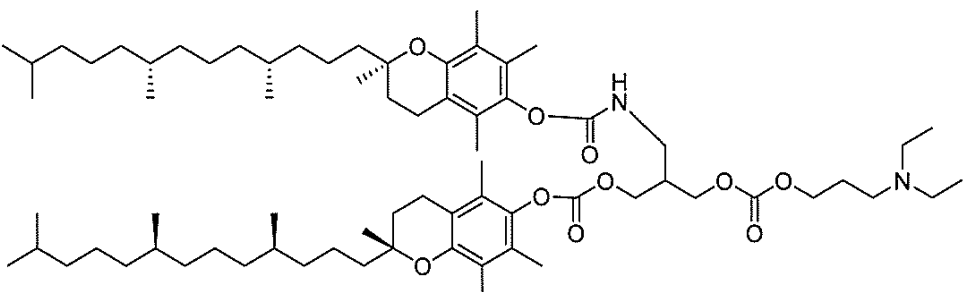
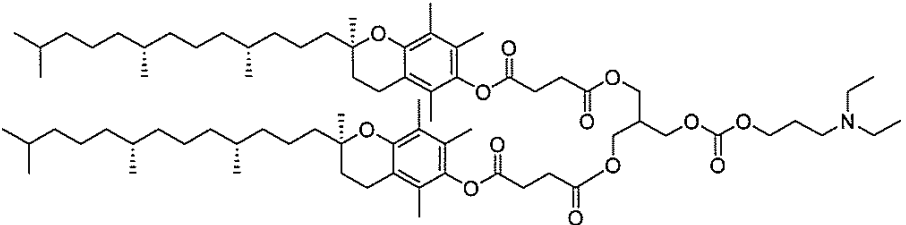
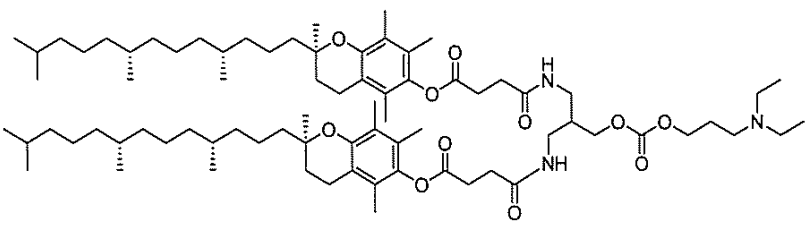
【 0 2 4 1 】

【表 1 - 1 3】

 VL408	10
 VL409	20
 VL410	30
 VL411	40

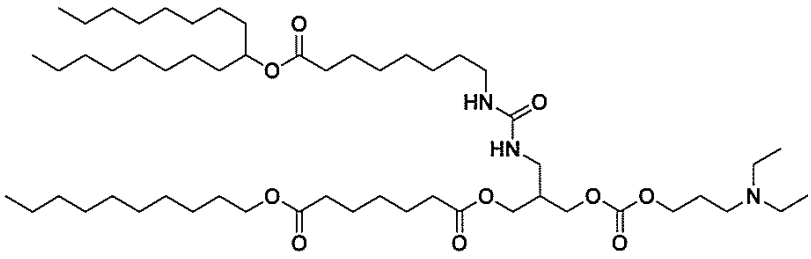
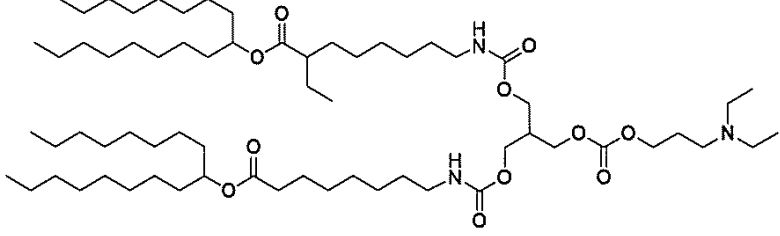
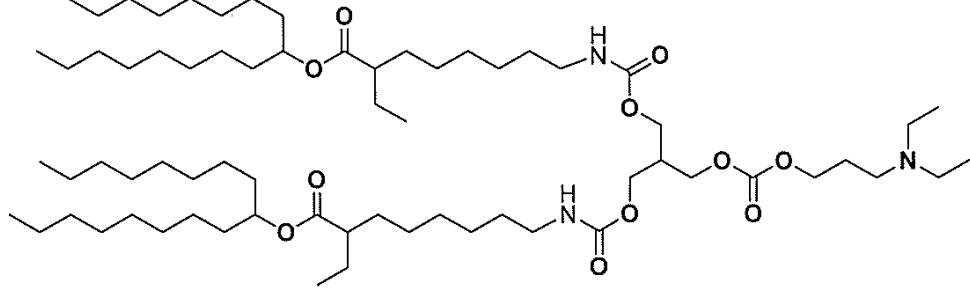
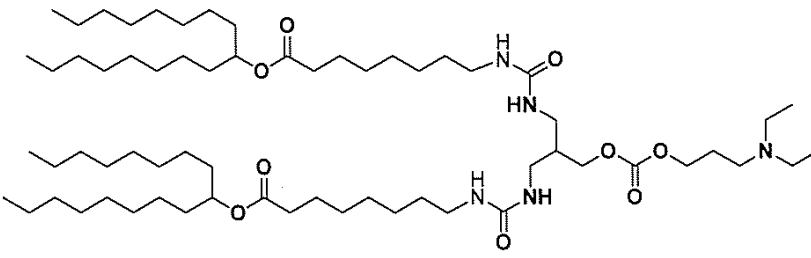
【 0 2 4 2 】

【表 1 - 1 4】

 VL412	10
 VL413	20
 VL414	30
 VL415	40

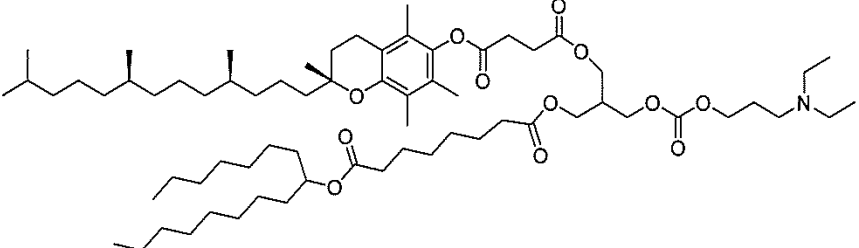
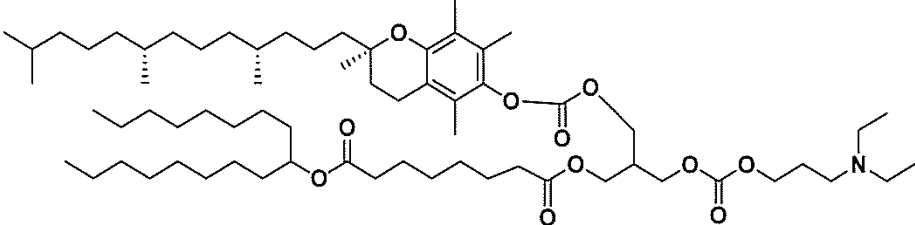
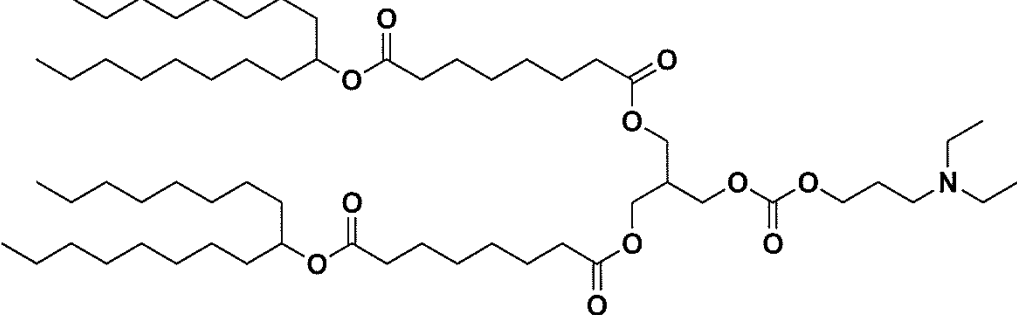
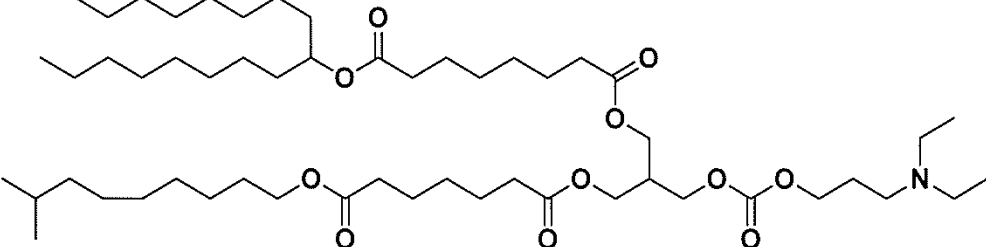
【 0 2 4 3 】

【表 1 - 1 5】

 VL416	10
 VL417	20
 VL418	30
 VL419	40

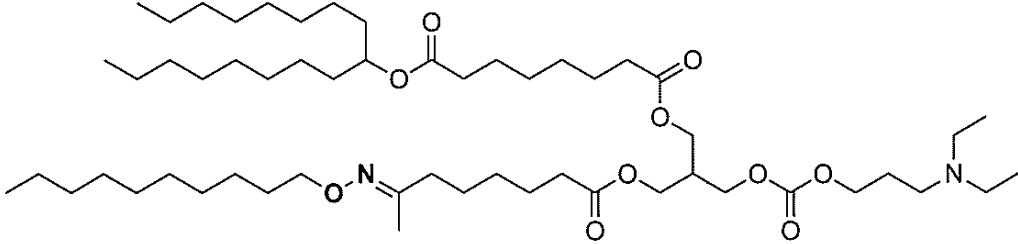
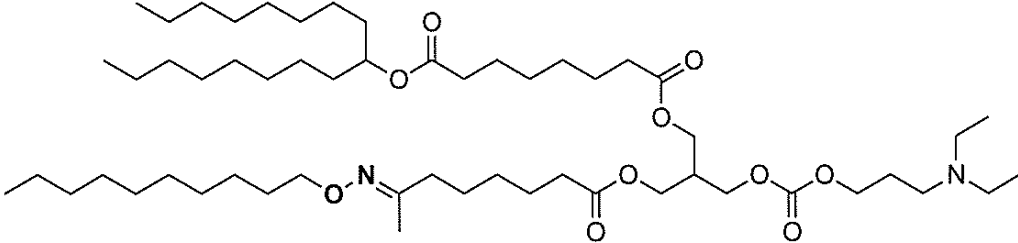
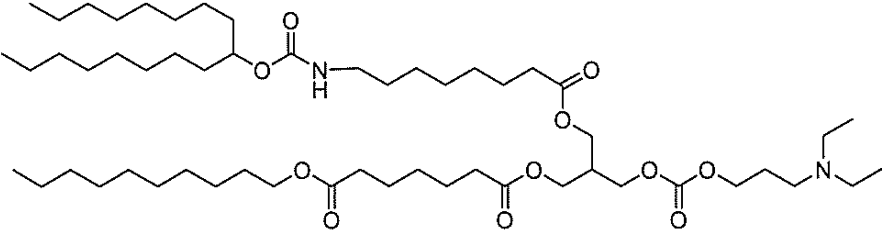
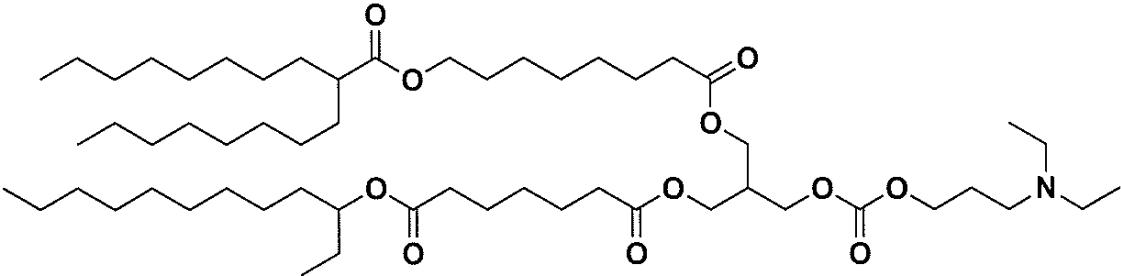
【 0 2 4 4 】

【表 1 - 1 6】

 VL420	10
 VL421	20
 VL422	30
 VL423	40

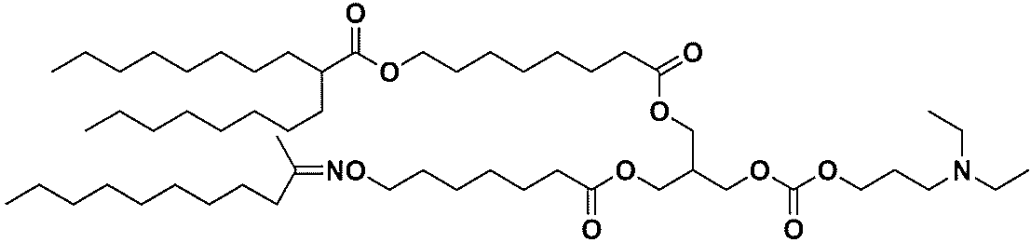
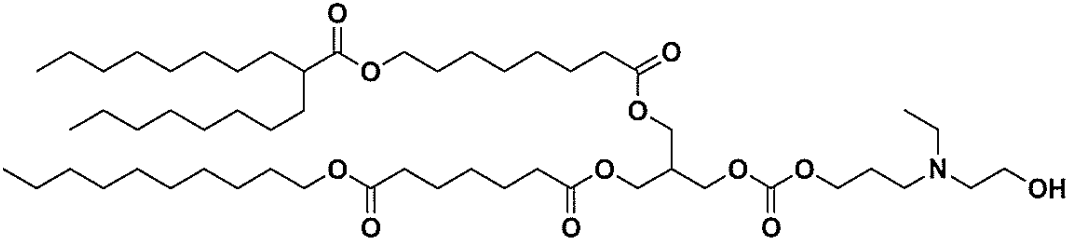
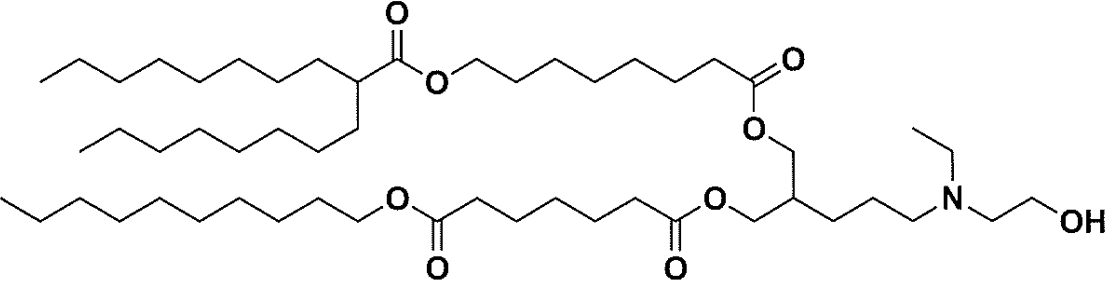
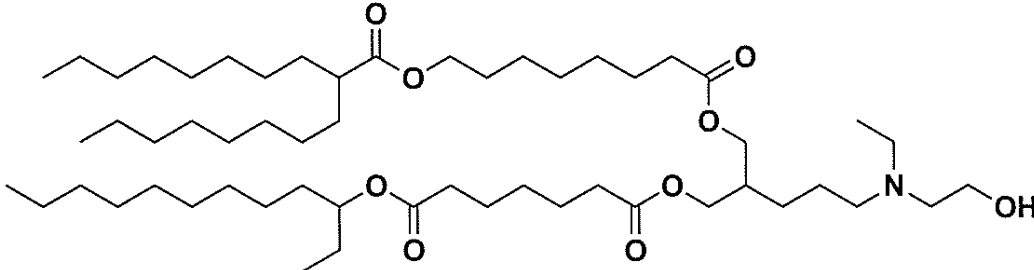
【 0 2 4 5 】

【表 1 - 1 7】

 VL424	10
 VL424	20
 VL425	30
 VL426	40

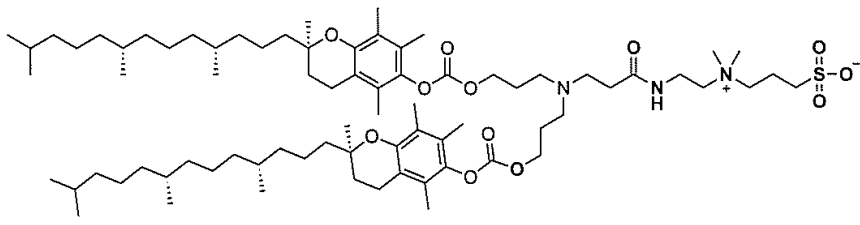
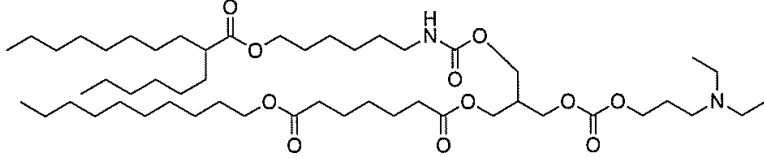
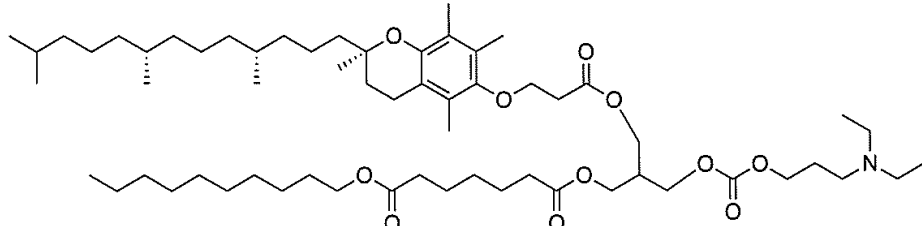
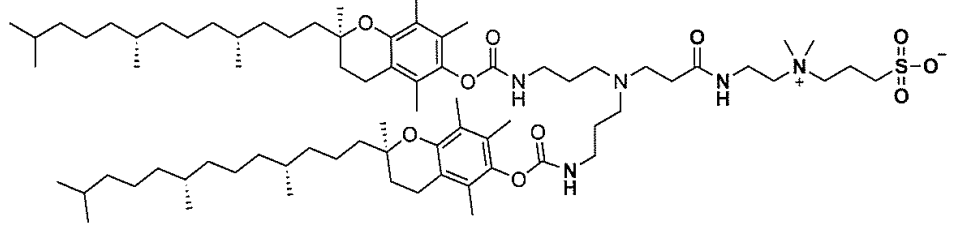
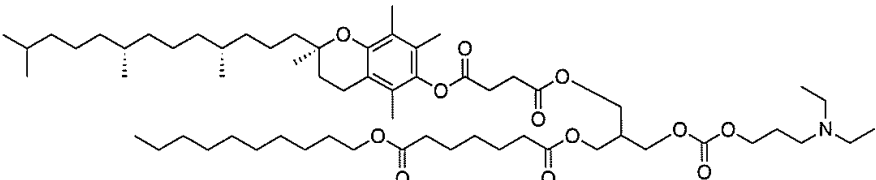
【 0 2 4 6 】

【表 1 - 1 8】

 VL427	10
 VL428	20
 VL429	30
 VL430	40

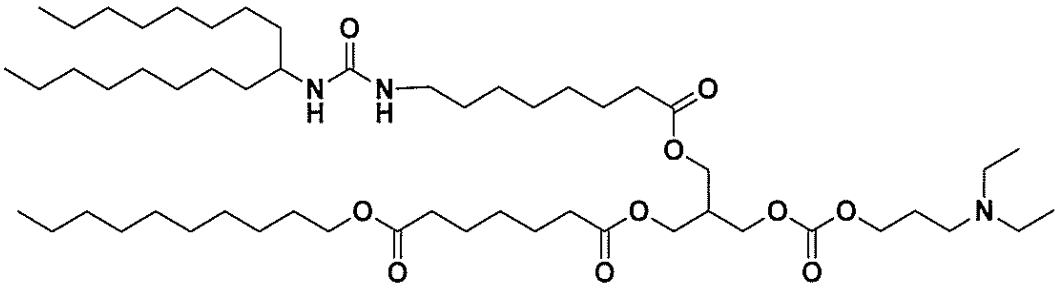
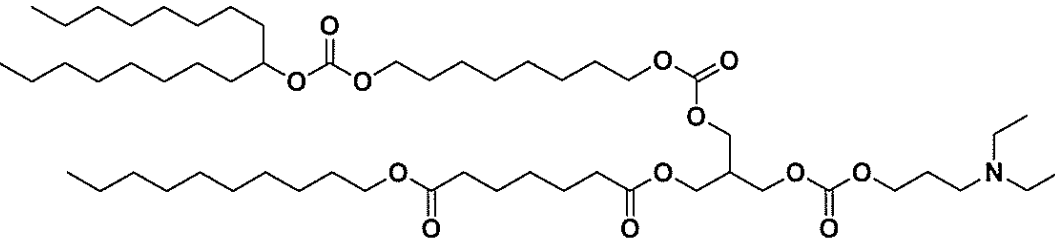
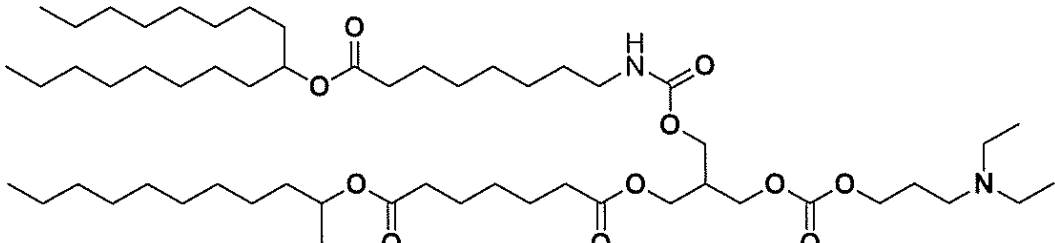
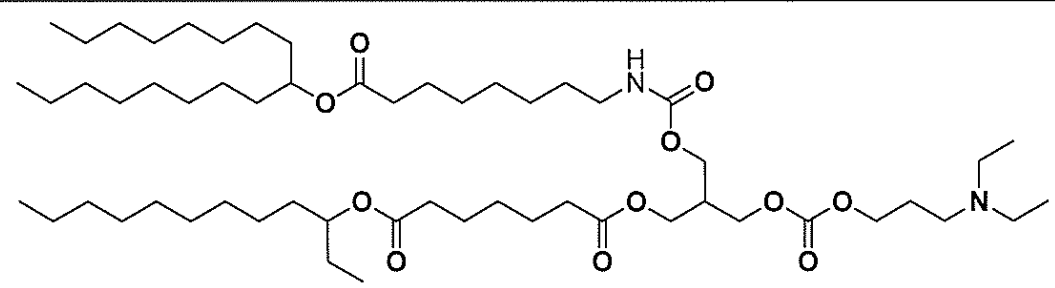
【 0 2 4 7 】

【表 1 - 1 9】

 VL431	
 VL432	10
 VL433	20
 VL434	30
 VL435	40

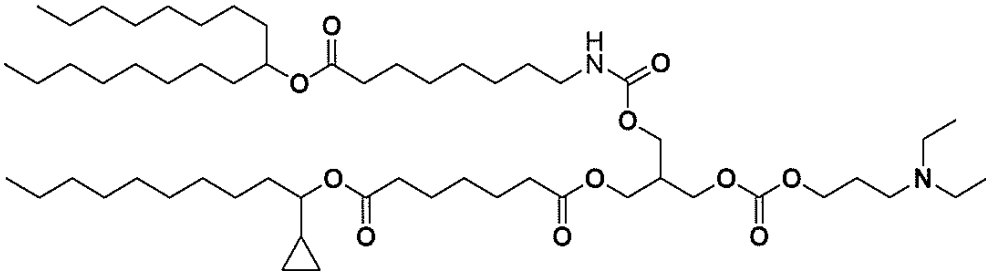
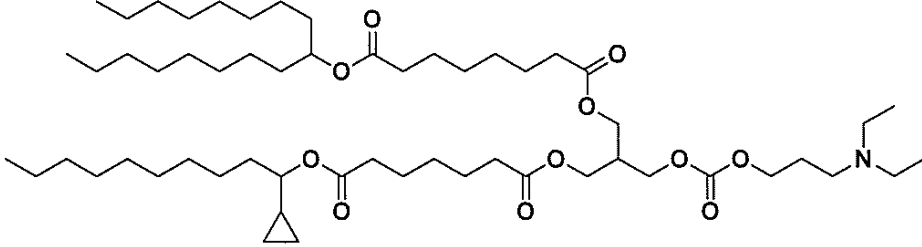
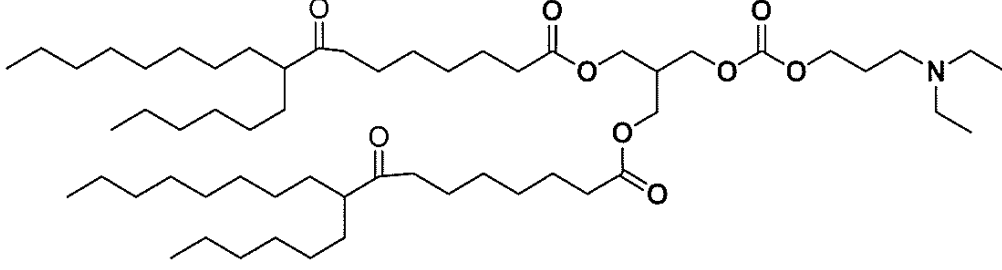
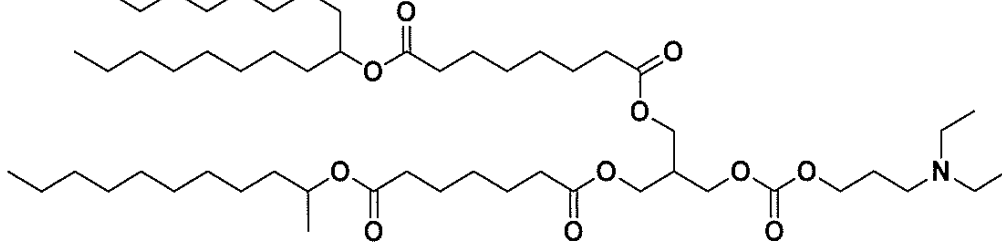
【 0 2 4 8 】

【表 1 - 2 0】

 VL436	10
 VL437	20
 VL438	30
 VL439	40

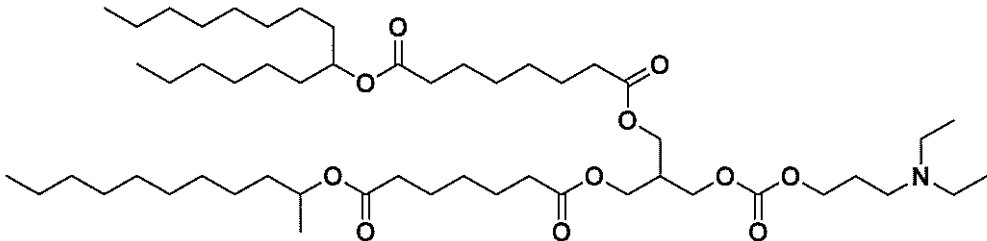
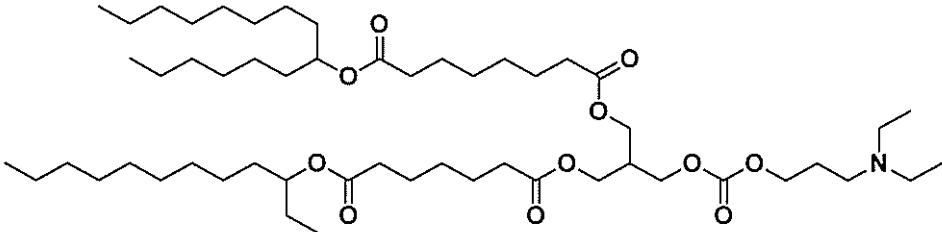
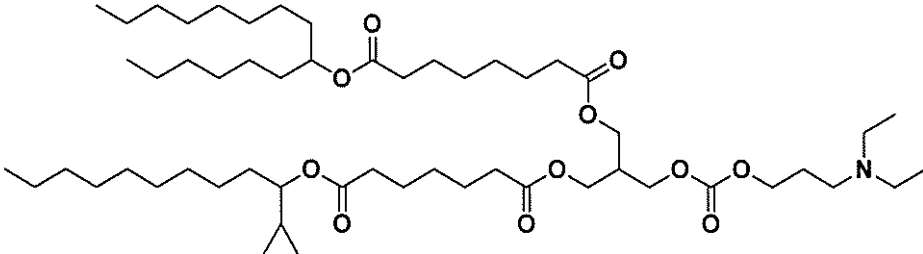
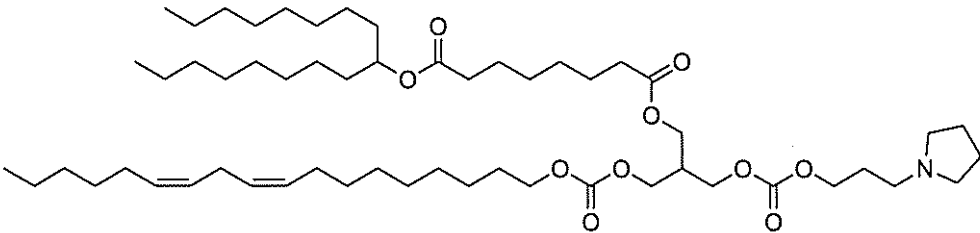
【 0 2 4 9 】

【表 1 - 2 1】

 VL440	10
 VL441	20
 VL442	30
 VL443	40

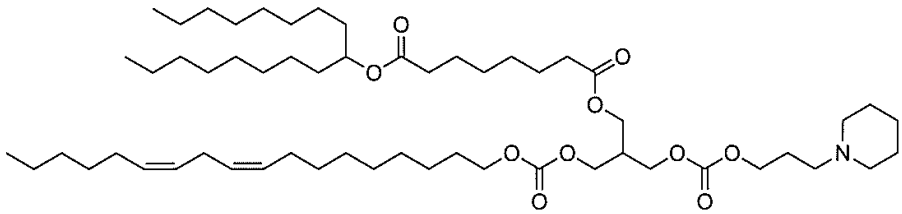
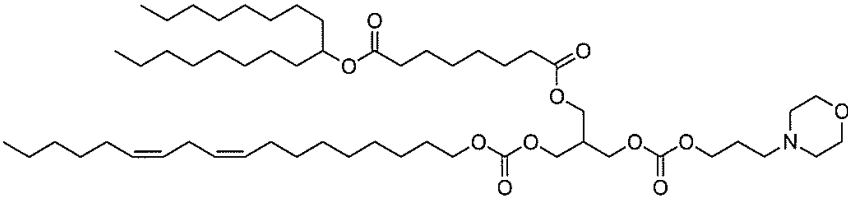
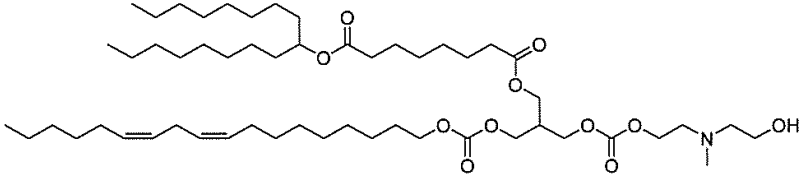
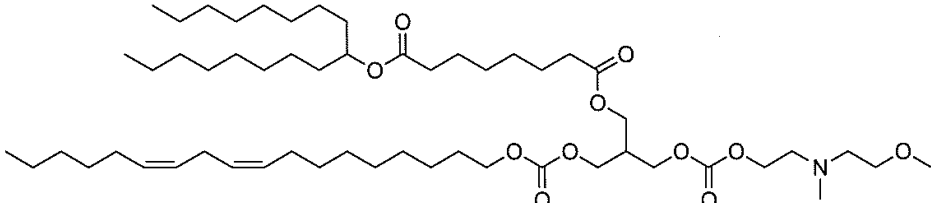
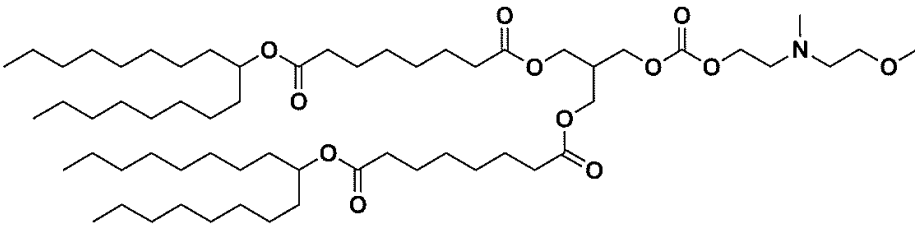
【 0 2 5 0 】

【表 1 - 2 2】

 VL444	10
 VL445	20
 VL446	30
 VL447	40

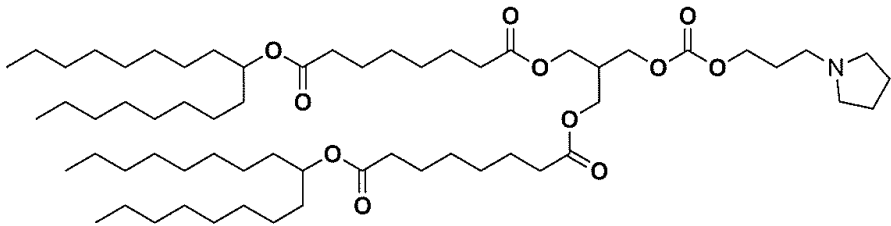
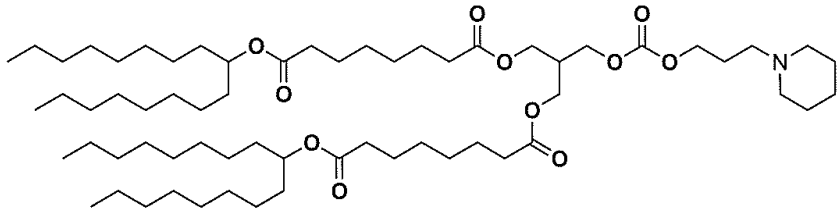
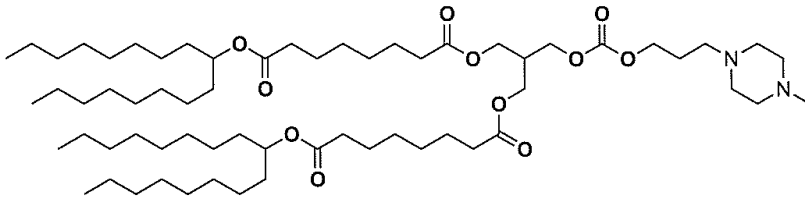
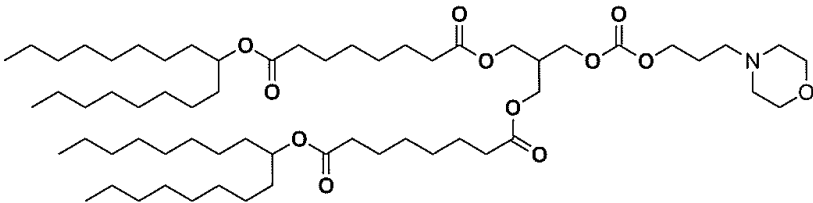
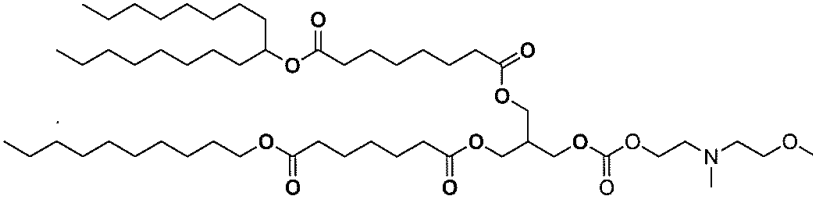
【 0 2 5 1】

【表 1 - 2 3】

 VL448	10
 VL449	20
 VL450	30
 VL451	40
 VL452	

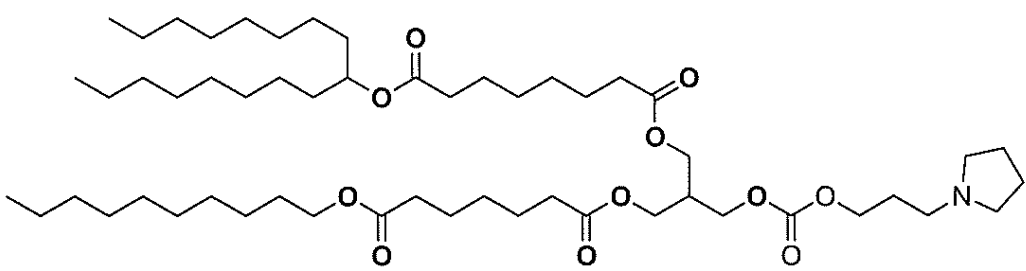
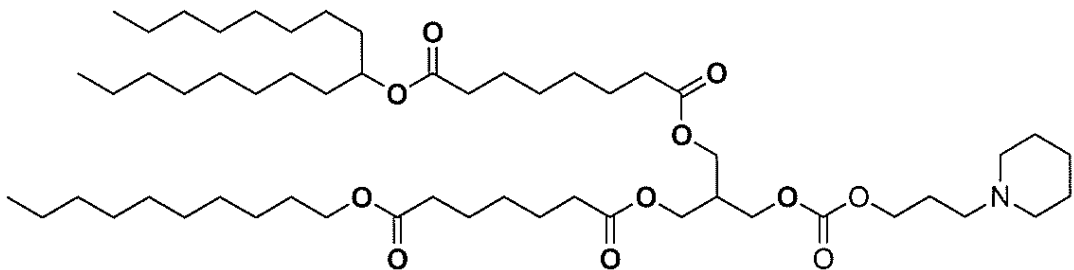
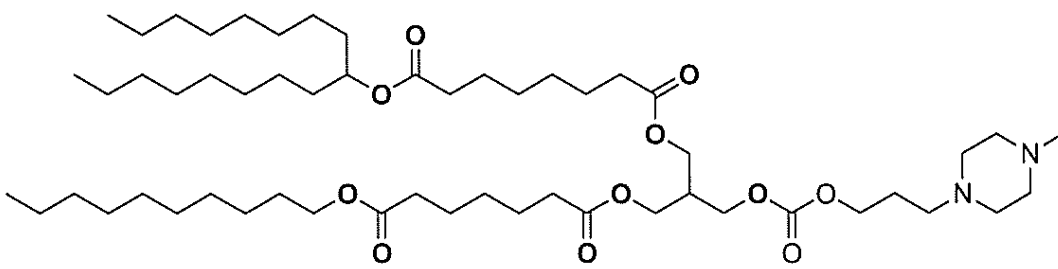
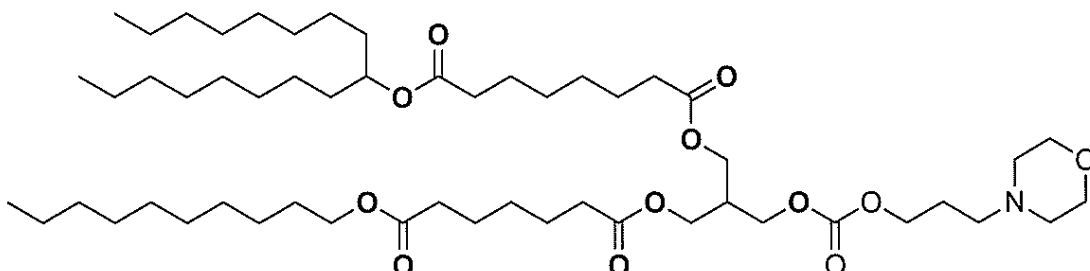
【 0 2 5 2 】

【表 1 - 2 4】

 VL453	10
 VL454	20
 VL455	30
 VL456	40
 VL457	

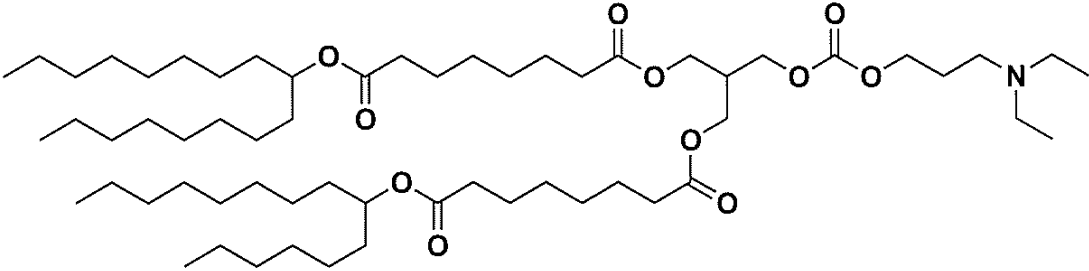
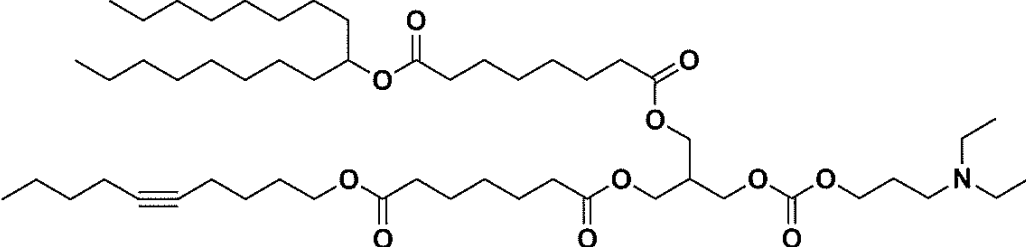
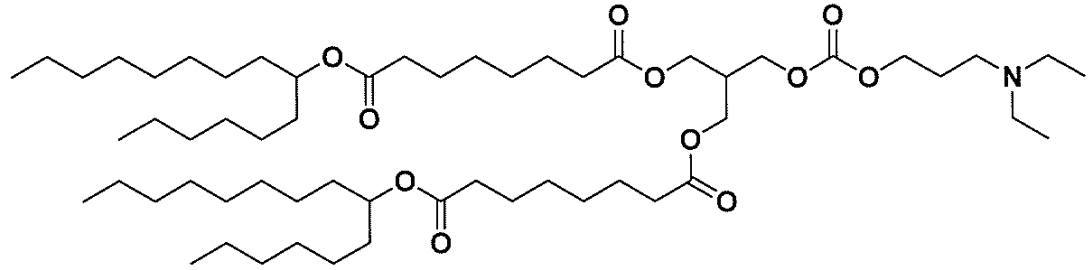
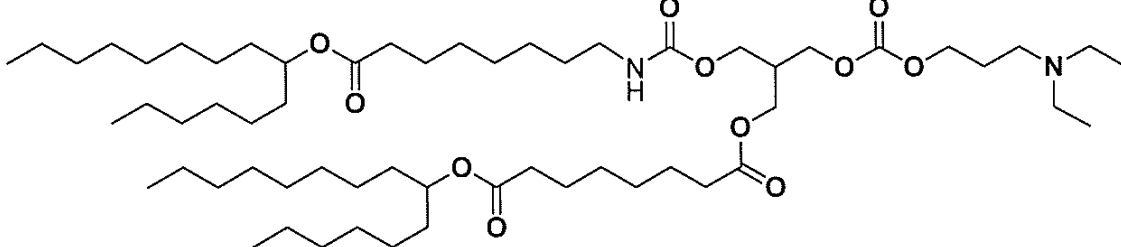
【 0 2 5 3 】

【表 1 - 2 5】

 VL458	10
 VL459	20
 VL460	30
 VL461	40

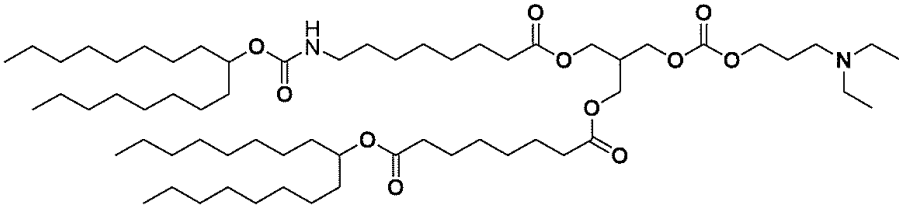
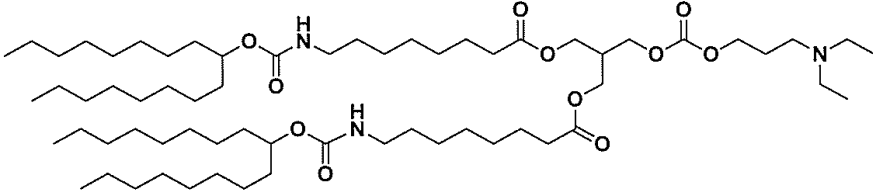
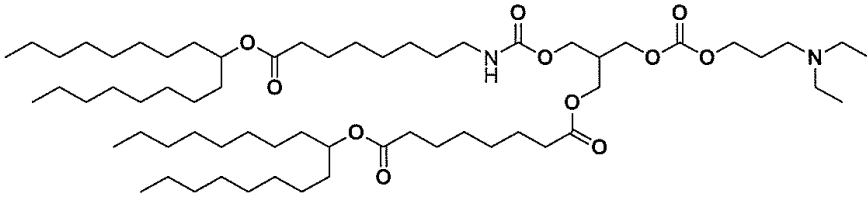
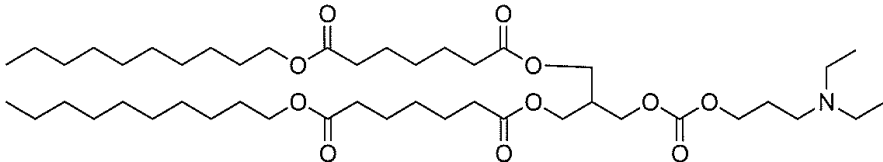
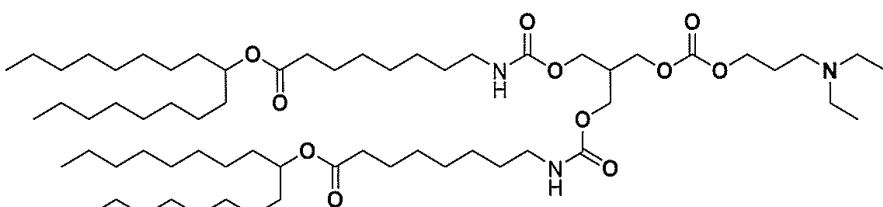
【 0 2 5 4】

【表 1 - 2 6】

 VL462	10
 VL463	20
 VL464	30
 VL465	40

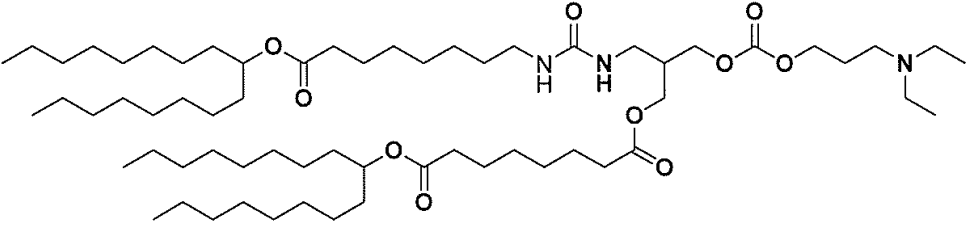
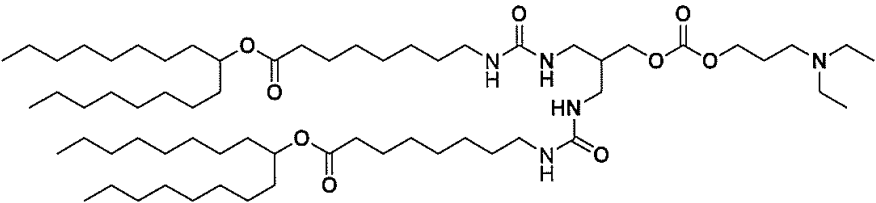
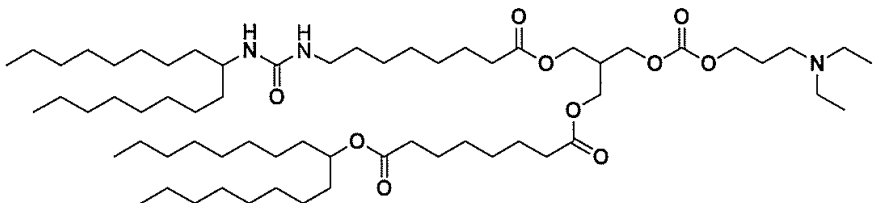
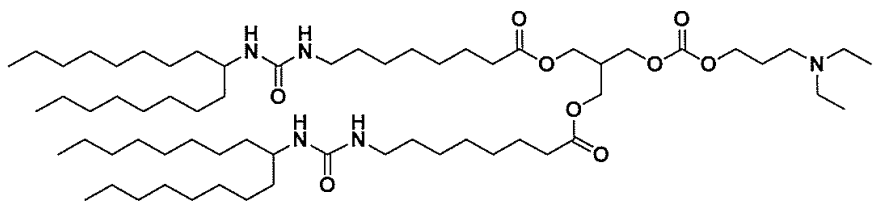
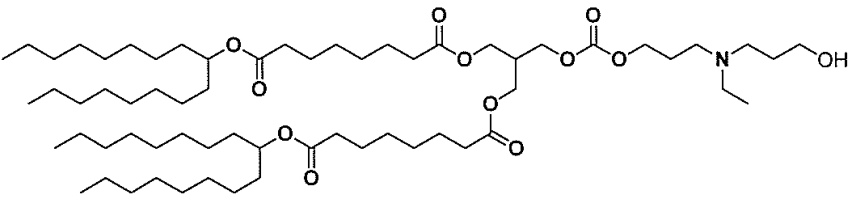
【 0 2 5 5 】

【表 1 - 2 7】

 VL466	
 VL467	10
 VL468	20
 VL469	30
 VL470	40

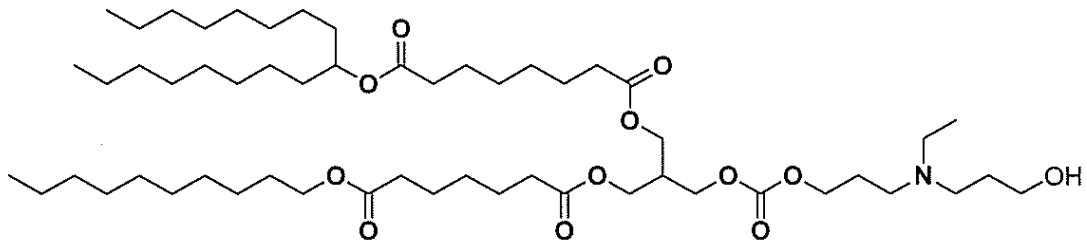
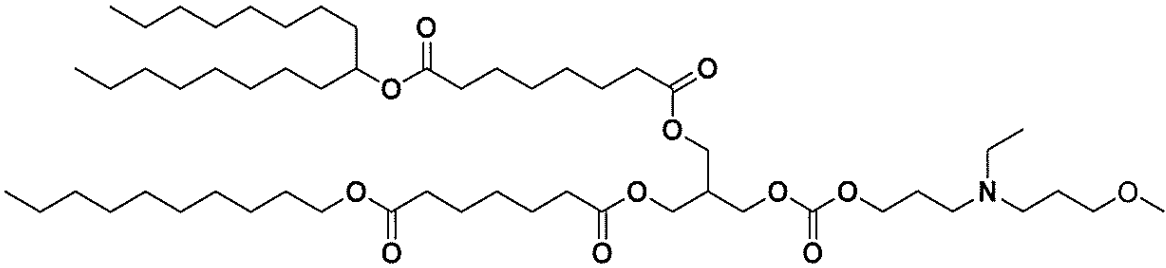
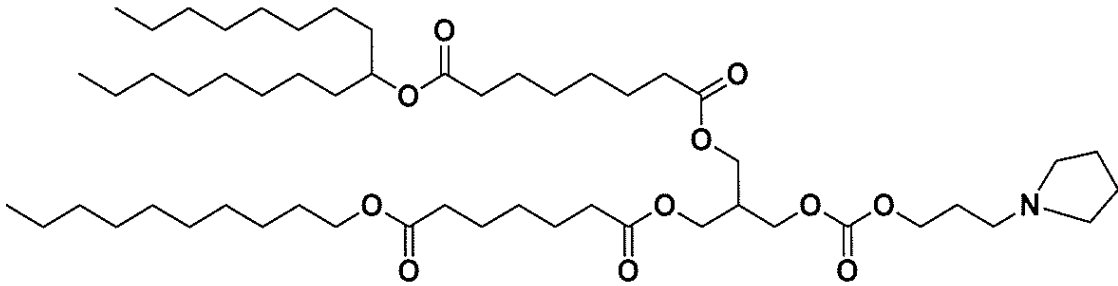
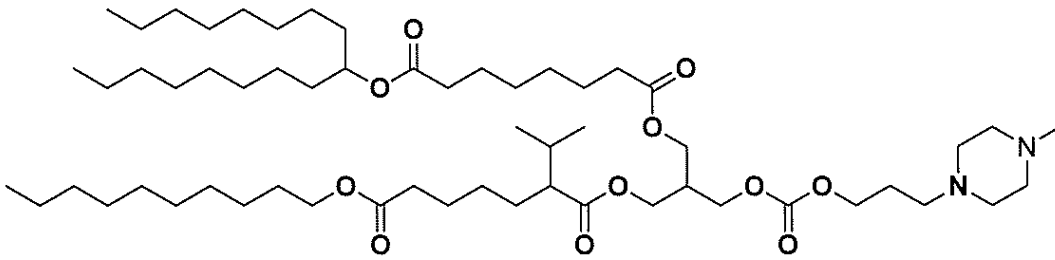
【 0 2 5 6 】

【表 1 - 2 8】

 VL471	10
 VL472	
 VL473	20
 VL474	30
 VL475	40

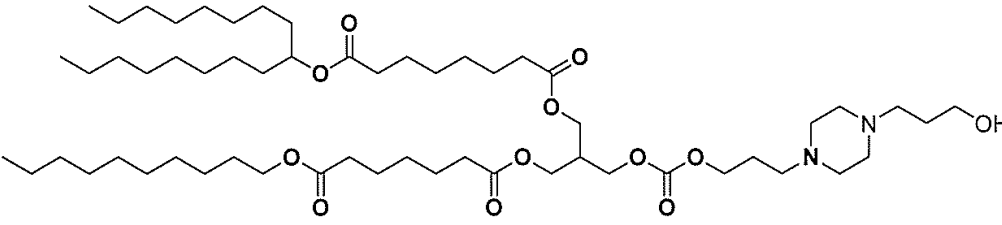
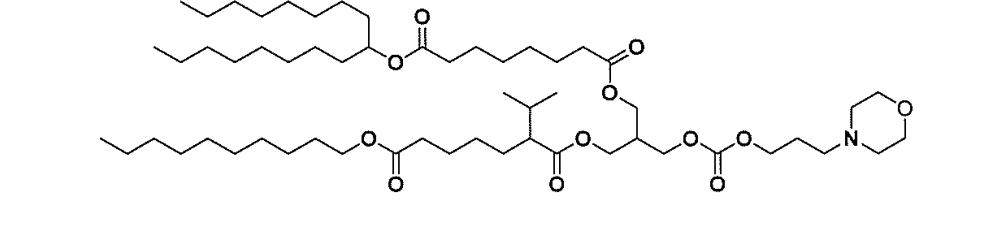
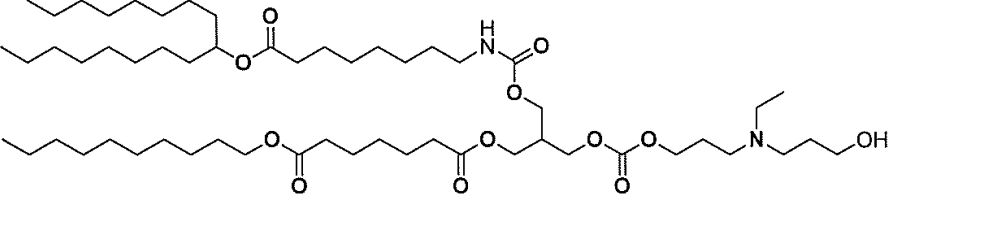
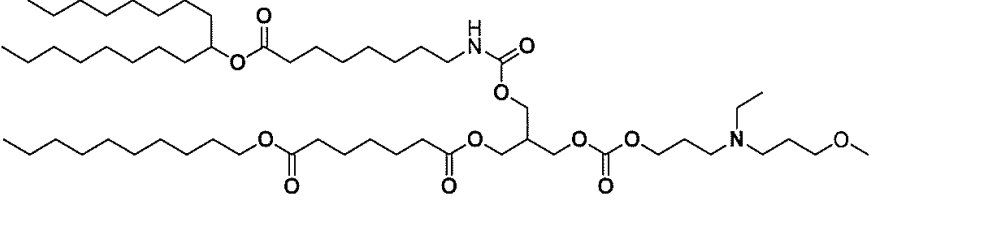
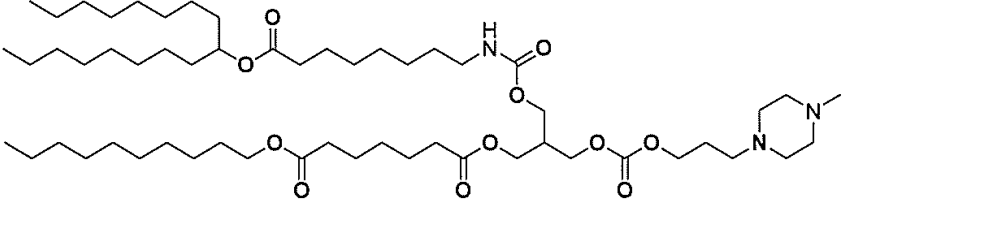
【 0 2 5 7】

【表 1 - 2 9】

 VL476	10
 VL477	20
 VL478	30
 VL479	40

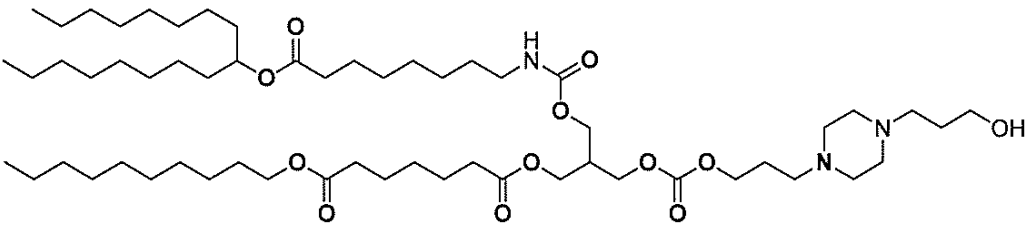
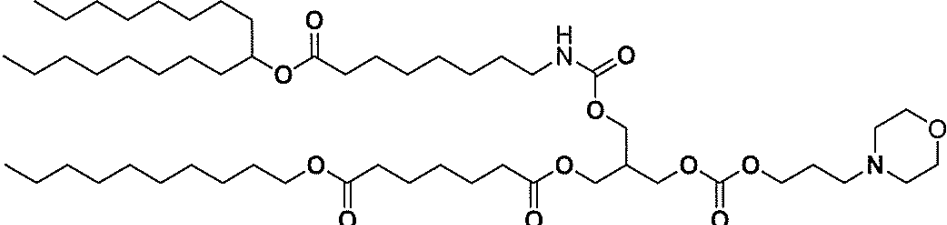
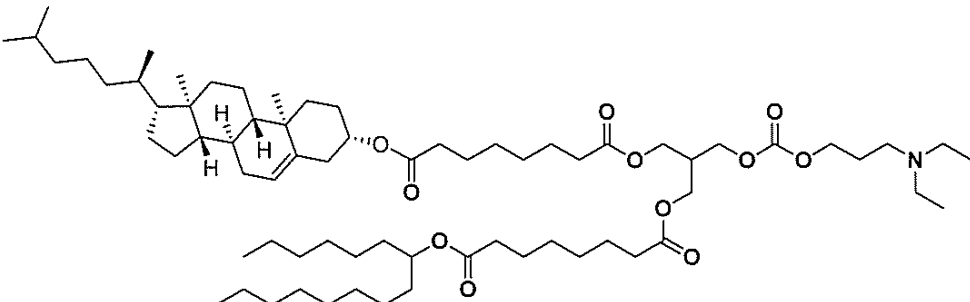
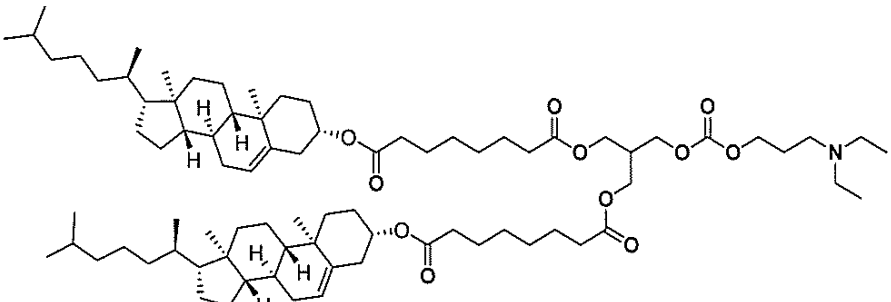
【 0 2 5 8 】

【表 1 - 3 0】

 VL480	10
 VL481	
 VL482	20
 VL483	30
 VL484	40

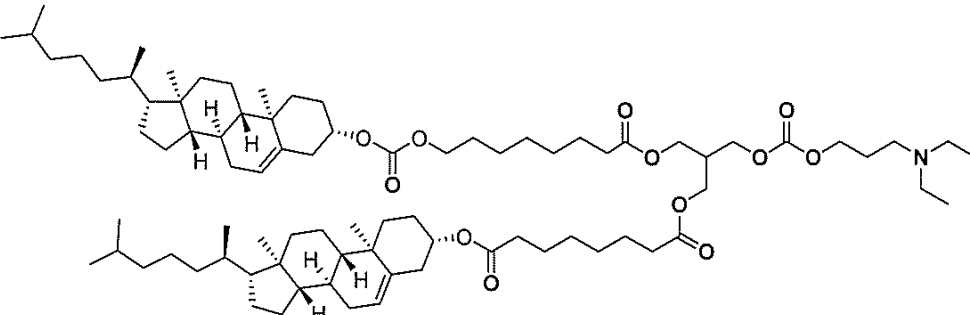
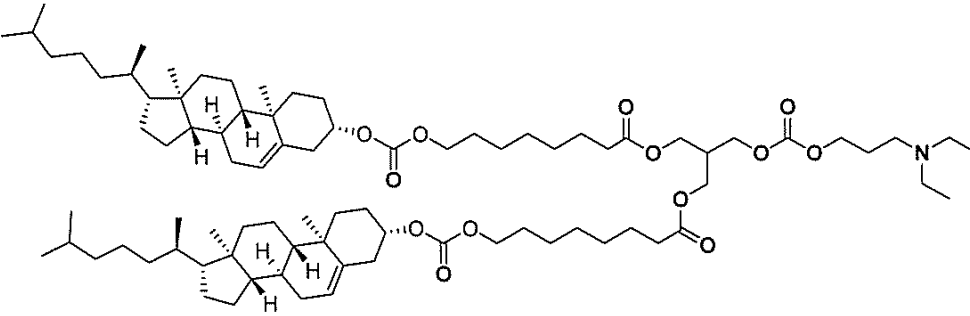
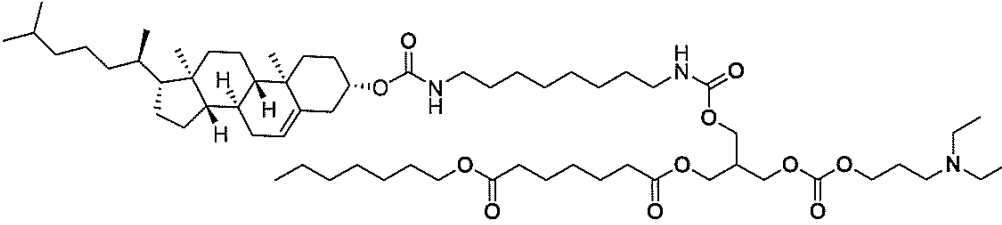
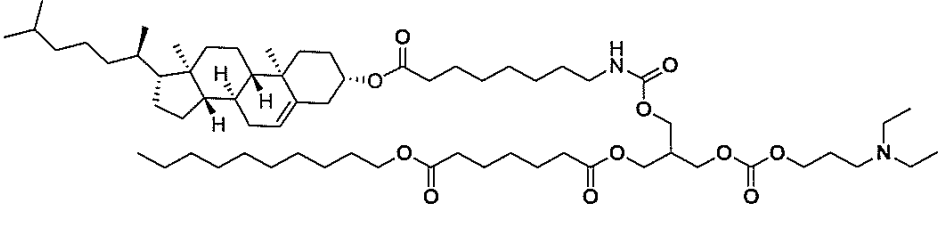
【 0 2 5 9 】

【表 1 - 3 1】

 VL485	10
 VL486	20
 VL487	30
 VL488	40

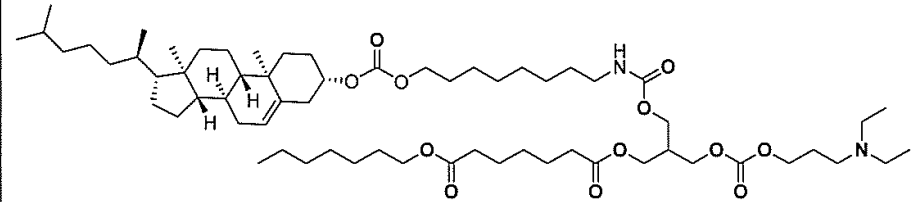
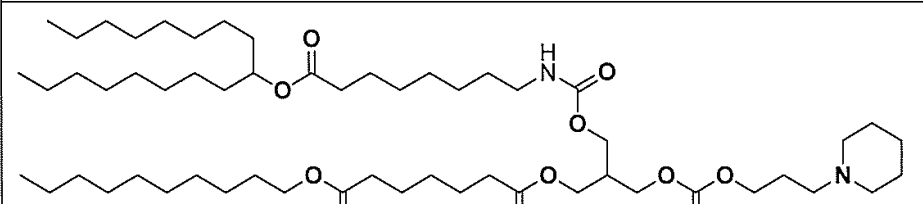
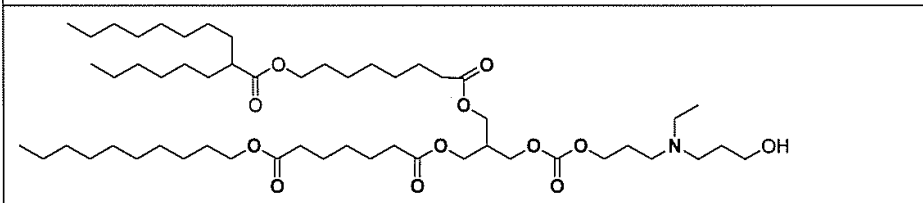
【 0 2 6 0 】

【表 1 - 3 2】

 VL489	10
 VL490	20
 VL491	30
 VL492	40

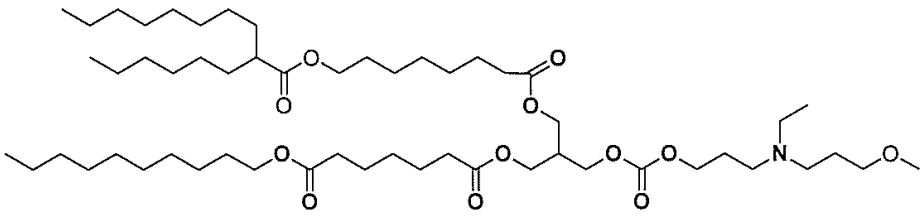
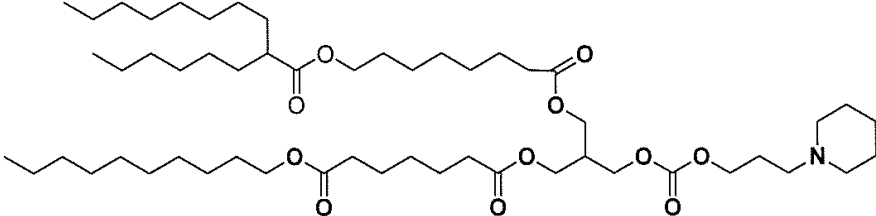
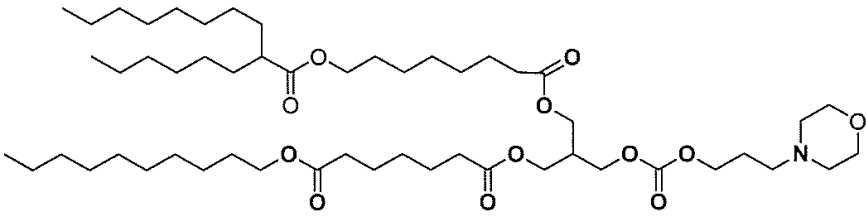
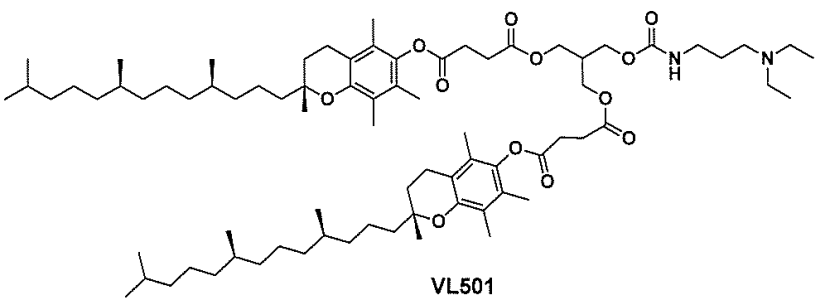
【 0 2 6 1 】

【表 1 - 3 3】

 VL493	
 VL494	10
 VL495	20
 VL496	30
VL497	40

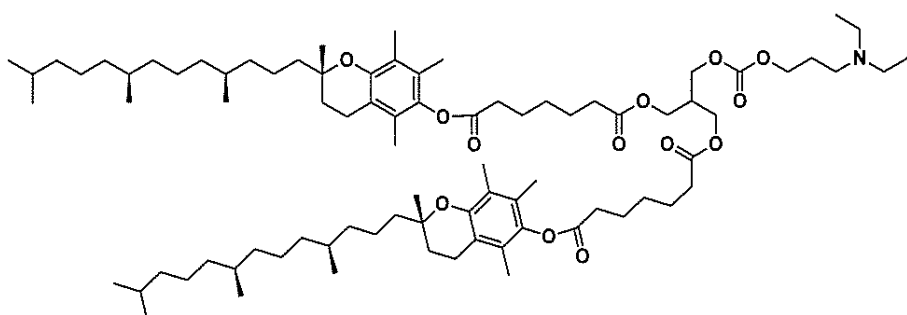
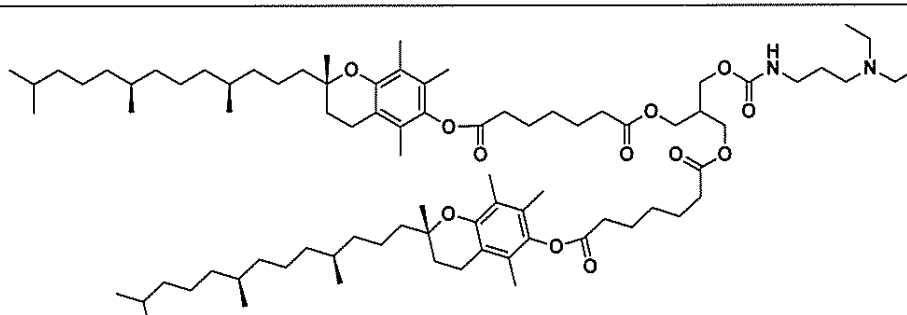
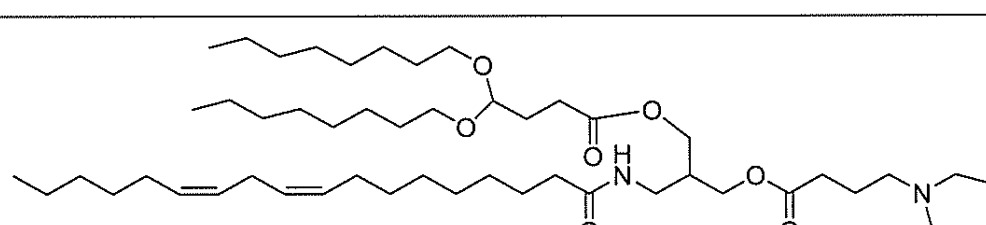
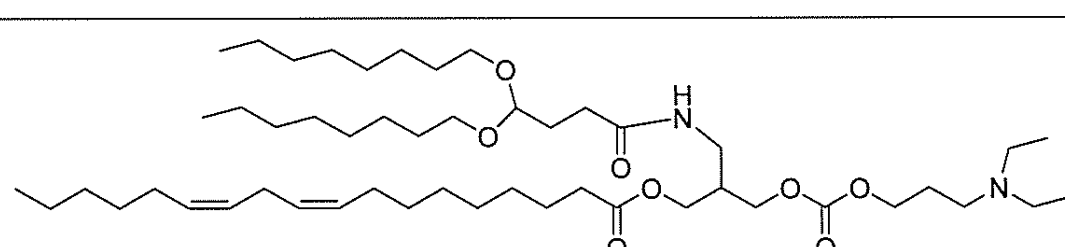
【 0 2 6 2 】

【表 1 - 3 4】

 VL498	10
 VL499	20
 VL500	30
 VL501	40

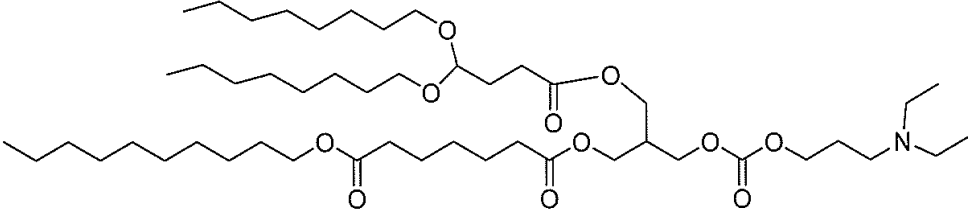
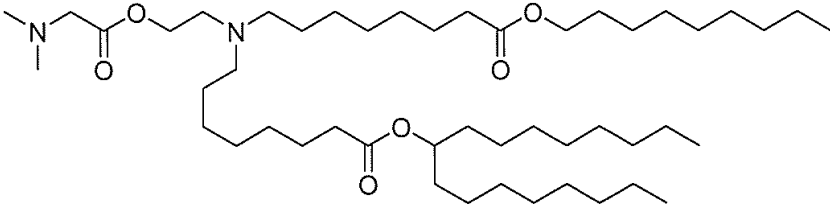
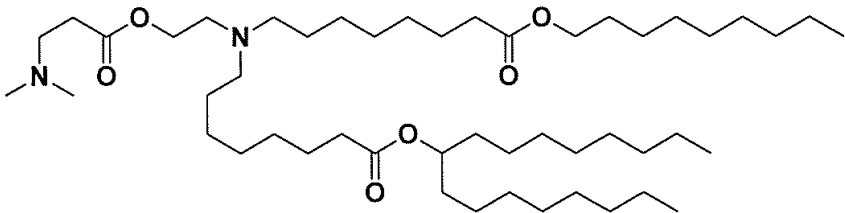
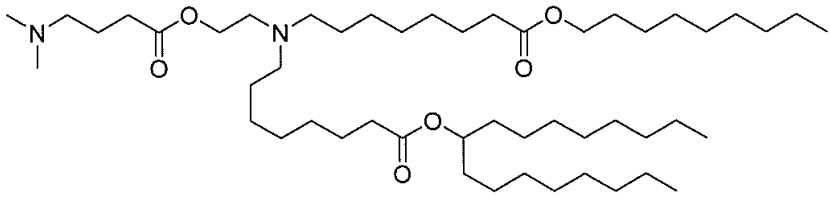
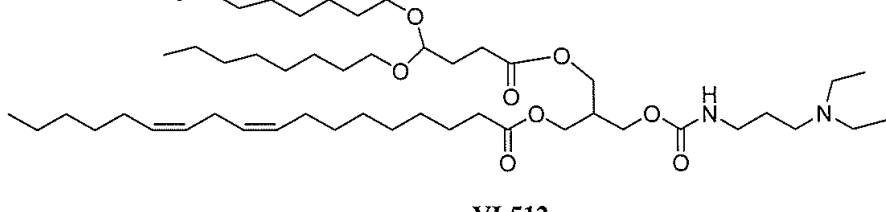
【 0 2 6 3 】

【表 1 - 3 5】

 VL502	10
 VL503	20
 VL506	30
 VL507	40

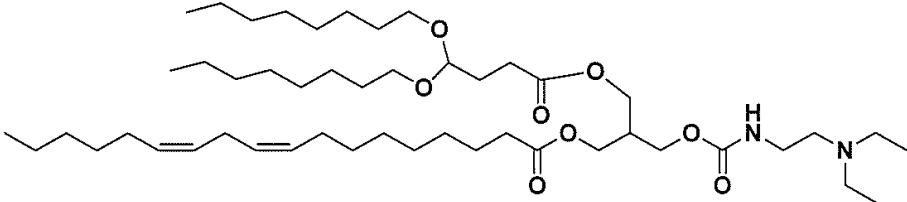
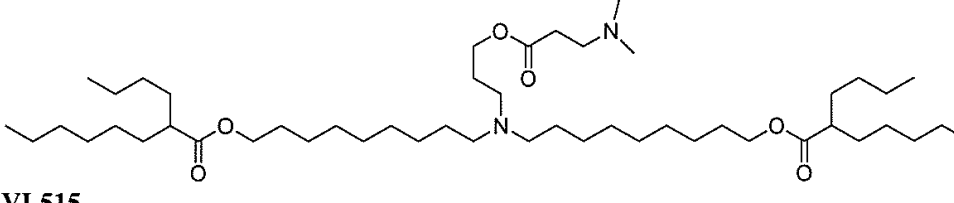
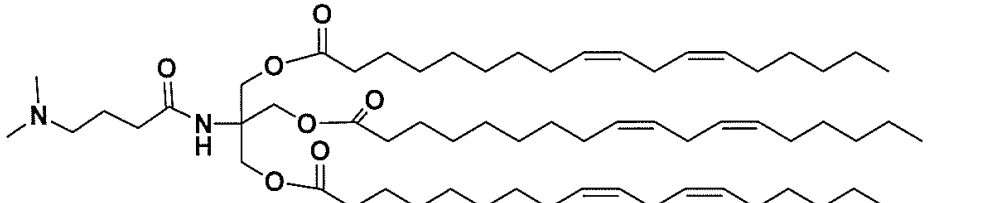
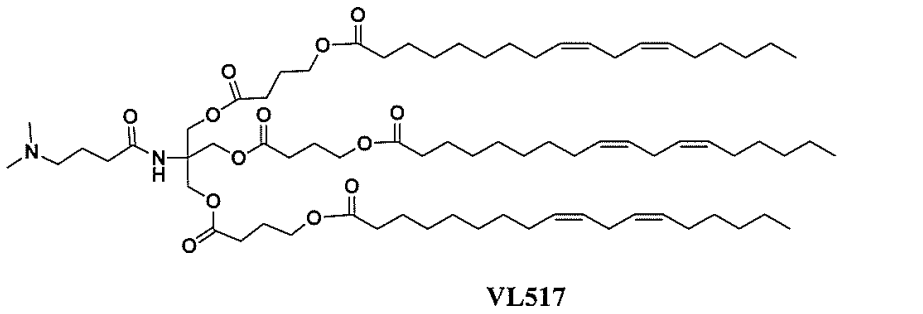
【 0 2 6 4 】

【表 1 - 3 6】

 VL508	10
 VL509	
 VL510	20
 VL511	30
 VL512	40

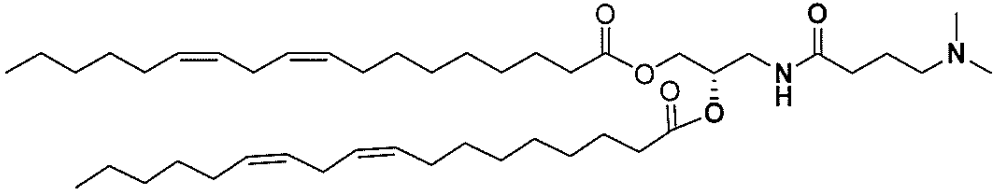
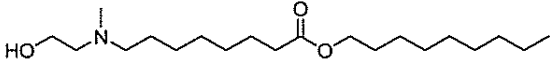
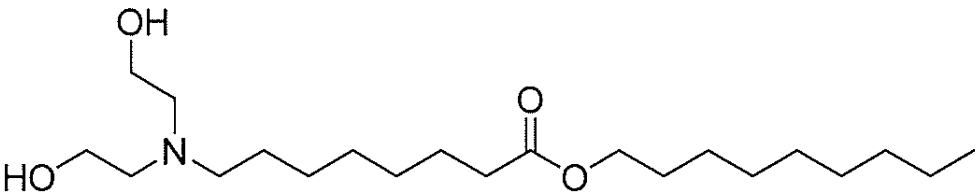
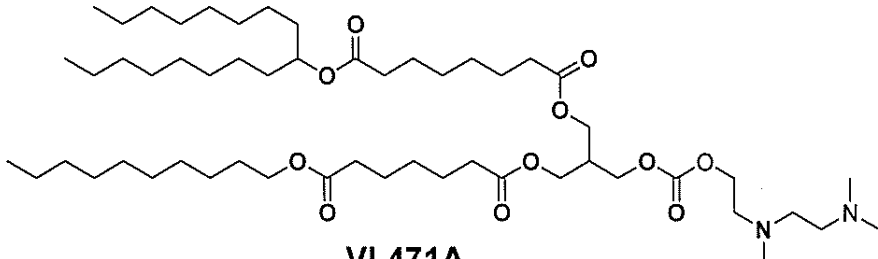
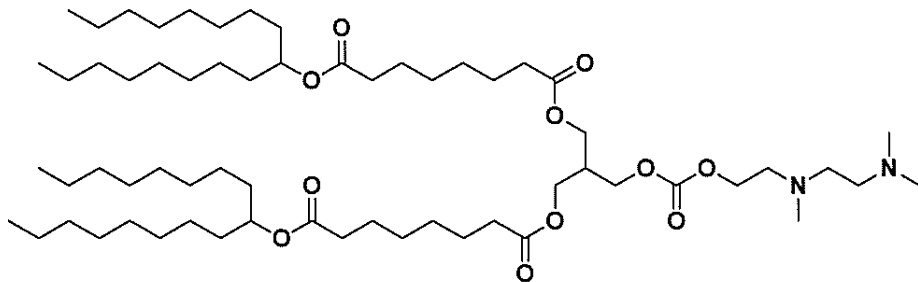
【 0 2 6 5】

【表 1 - 3 7】

 VL513	
 VL514	10
 VL515	20
 VL516	30
 VL517	40

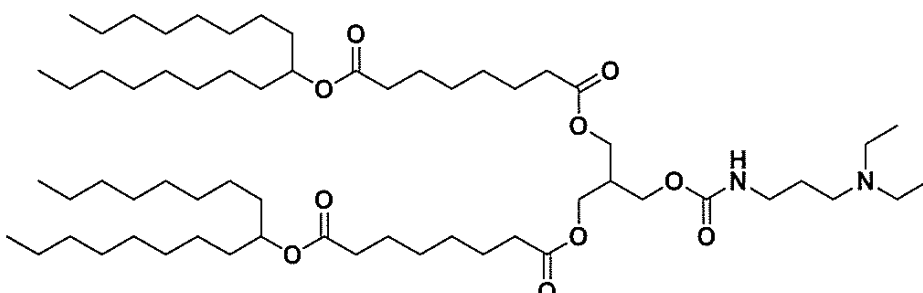
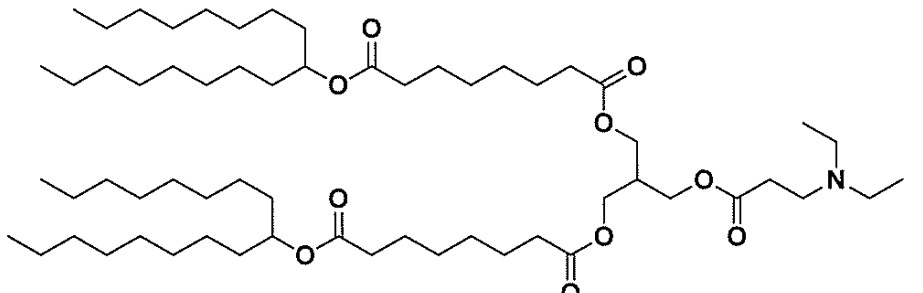
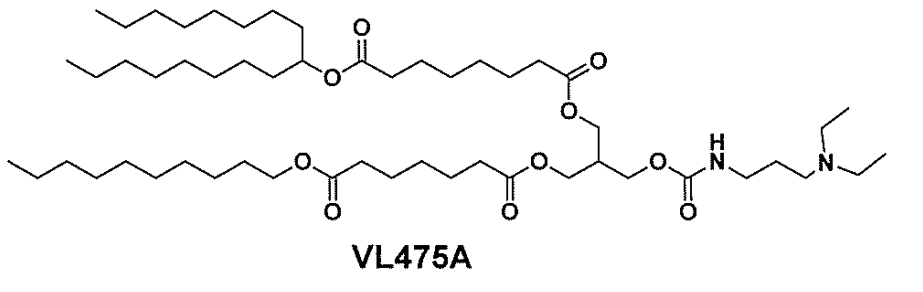
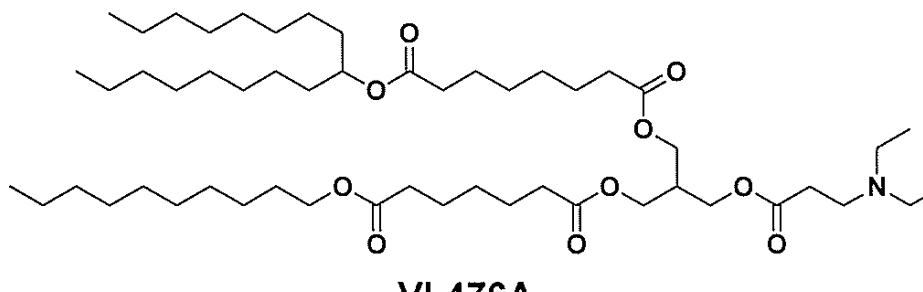
【 0 2 6 6 】

【表 1 - 3 8】

 VL518	
 VL519	10
 VL520	20
 VL471A	30
 VL472A	40

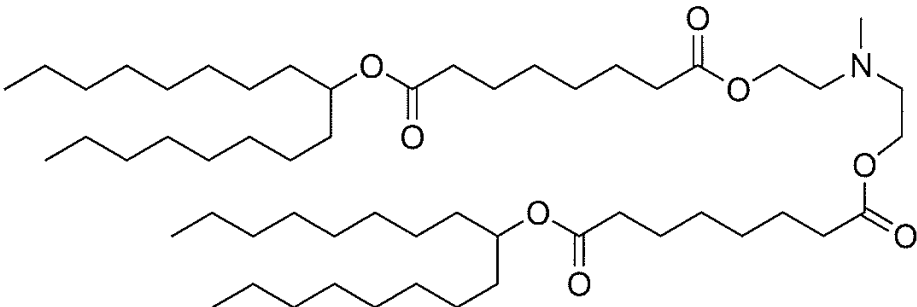
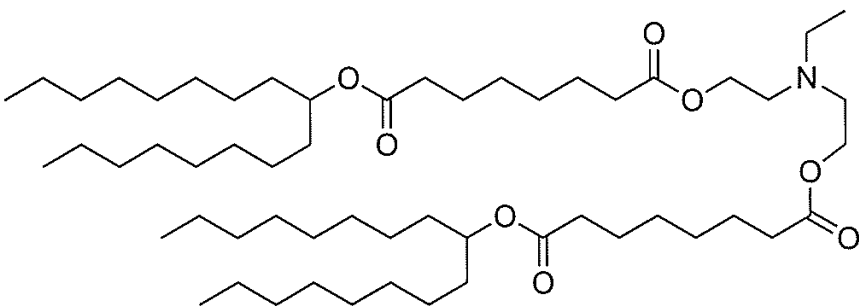
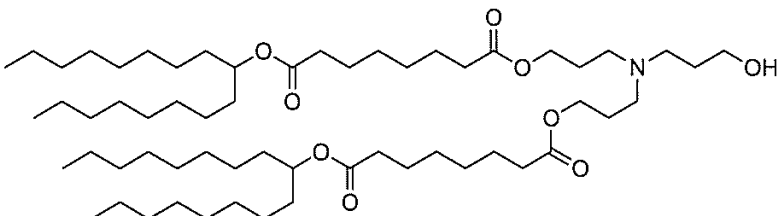
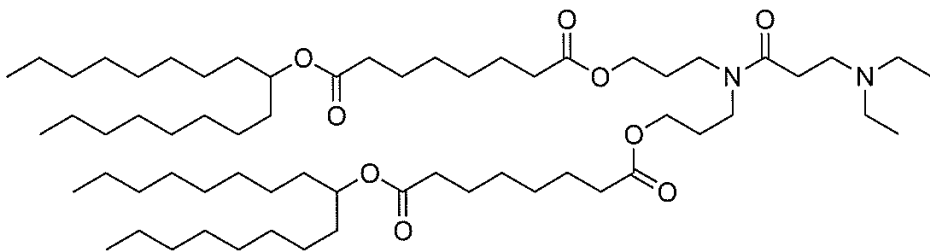
【 0 2 6 7 】

【表 1 - 3 9】

 VL473A	10
 VL474A	20
 VL475A	30
 VL476A	40

【 0 2 6 8 】

【表 1 - 4 0】

 VL529	10
 VL530	20
 VL522	30
 VL531	40

【0269】

【0160】表 1 A の化合物のいくつかの実施形態では、m は 1 ～ 10 である。いくつかの実施形態では、m は 1 である。いくつかの実施形態では、m は 2 である。いくつかの実施形態では、m は 3 である。いくつかの実施形態では、m は 4 である。いくつかの実施形態では、m は 5 である。いくつかの実施形態では、m は 6 である。いくつかの実施形態では、m は 7 である。いくつかの実施形態では、m は 8 である。いくつかの実施形態では、m は 9 である。いくつかの実施形態では、m は 10 である。

【0270】

【0161】いくつかの実施形態では、表 1 A における不斉炭素原子は、ラセミ体、キラル

的に純粋なRまたはキラル的なSを表す。いくつかの実施形態では、表1Aの化合物が2つ以上のキラル中心を含有する場合、キラル中心の各々の立体化学の全ての組合せは、本開示により包含される。

【0271】

【0162】いくつかの実施形態では、開示されるアミノ脂質は、N-酸化物に変換することができる。いくつかの実施形態では、N-オキシドは、酸化剤（例えば、3-クロロペルオキシ安息香酸および／または過酸化水素）による処理によって形成される。したがって、本明細書には、 $N \rightarrow O$ または $N^+ - O^-$ として指定することができる原子価および構造によって許容される場合、記載されるアミノ脂質のN-オキシド化合物が開示される。いくつかの実施形態では、本開示の化合物中の窒素は、N-ヒドロキシまたはN-アルコキシに変換することができる。例えば、N-ヒドロキシ化合物は、 $ra-CPBA$ などの酸化剤による親アミンの酸化によって調製することができる。示され、請求される全ての窒素含有化合物はまた考慮される。したがって、本明細書にはまた、記載されるアミノ脂質のN-ヒドロキシおよびN-アルコキシ（例えば、Rが置換または非置換の $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_2 \sim C_6$ アルケニル、 $C_2 \sim C_6$ アルキニル、3～14員の炭素環、または3～14員の複素環であるN-OR）誘導体が開示される。

10

【0272】

【0163】いくつかの実施形態では、本明細書に記載のアミノ脂質は、薬学的に許容される塩などの塩の形態をとり得る。アミノ脂質の薬学的に許容される塩は全て、本開示に包含される。本明細書で使用される「アミノ脂質」という用語はまた、その薬学的に許容される塩、ならびにそのジアステレオマー、エナンチオマー、およびエピマーの形態も含む。

20

【0273】

【0164】いくつかの実施形態では、本明細書に記載のアミノ脂質は、1つまたは複数の立体中心を有し、各立体中心は、R配置またはS配置のいずれかで独立して存在する。本明細書に提示される脂質としては、全てのジアステレオマー、エナンチオマー、およびエピマー形態、ならびにそれらの適切な混合物が挙げられる。本明細書で提供される脂質としては、全てのシス、トランス、シン、アンチ、エントゲゲン（E）、およびツザメン（Z）異性体、ならびにそれらの適切な混合物が含まれる。特定の実施形態では、本明細書に記載される脂質は、化合物のラセミ混合物を光学活性な分割剤と反応させて一対のジアステレオ異性体化合物／塩を形成し、ジアステレオマーを分離し、光学的に純粋なエナンチオマーを回収することによって、それらの個々の立体異性体として調製される。いくつかの実施形態では、エナンチオマーの分離は、本明細書に記載される化合物の共有結合ジアステレオマー誘導体を用いて行われる。別の実施形態では、ジアステレオマーは、溶解度の差に基づく分離／分割技術によって分離される。他の実施形態では、立体異性体の分離は、クロマトグラフィーによって、またはジアステレオマー塩の形成および分離によって、再結晶化、もしくはクロマトグラフィー、またはこれらの任意の組合せによって行われる。Jean Jacques, Andre Collet, Samuel H. Wilen, 「Enantiomers, Racemates and Resolutions」、John Wiley And Sons, Inc., 1981年。一態様では、立体選択的合成によって立体異性体が得られる。

30

40

【0274】

【0165】いくつかの実施形態では、アミノ脂質などの脂質は、本明細書に開示される構造に基づいて置換される。いくつかの実施形態では、アミノ脂質は、1つまたは複数の置換基を有する表1Aの脂質である。いくつかの実施形態では、アミノ脂質などの脂質は、置換されない。別の実施形態では、本明細書に記載される脂質は、同位体的に（例えば、放射性同位元素で）、または別の他の手段によって、限定されないが、例えば、発色団または蛍光部分、生物発光標識、もしくは化学発光標識の使用によって標識される。

【0275】

【0166】本明細書に記載される脂質には、本明細書に提示される種々の式および構造に

50

記載されるものと同一である同位体標識化合物が含まれるが、1つまたは複数の原子は、通常天然に見られる原子量または質量番号とは異なる原子量または質量番号を有する原子によって置き換えられるという事実のためである。本脂質に取り込まれ得る同位体の例としては、水素、炭素、窒素、酸素、硫黄、フッ素および塩素の同位体、例えば、 ^2H 、 ^3H 、 ^{13}C 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{18}O 、 ^{17}O 、 ^{35}S 、 ^{18}F 、 ^{36}Cl などが挙げられる。一態様では、本明細書に記載される同位体標識脂質、例えば、 ^3H および ^{14}C などの放射性同位体を取り込まれたものは、薬物および／または基質組織分配アッセイにおいて有用である。一態様では、重水素などの同位体での置換は、より大きな代謝安定性、例えば、インビボ半減期の増加または投薬量の必要性の減少に起因するある種の治療上の利点を与える。

10

【0276】

[0167]いくつかの実施形態では、アミノ脂質の不斉炭素原子は、鏡像異性的に富化された形態で存在する。特定の実施形態では、アミノ脂質の不斉炭素原子は、(S)－または(R)－立体配置において、少なくとも50%の鏡像異性的過剰、少なくとも60%の鏡像異性的過剰、少なくとも70%の鏡像異性的過剰、少なくとも80%の鏡像異性的過剰、少なくとも90%の鏡像異性的過剰、少なくとも95%の鏡像異性的過剰、または少なくとも99%の鏡像異性的過剰である。

【0277】

[0168]本明細書にはまた、表1Bの脂質、またはその塩もしくは溶媒和物が開示される。

20

【0278】

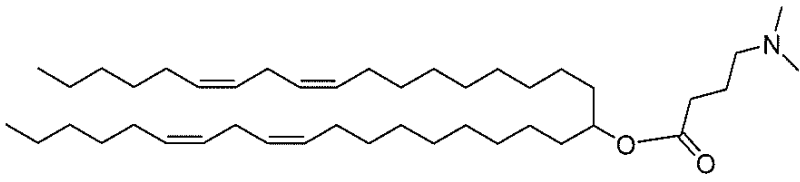
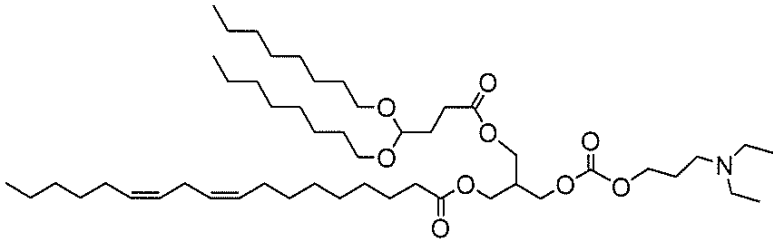
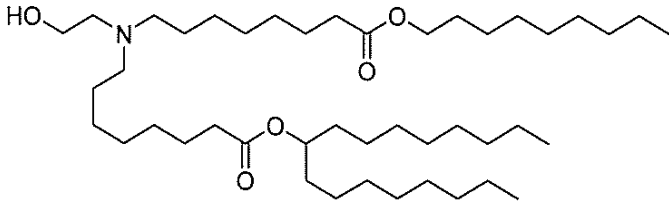
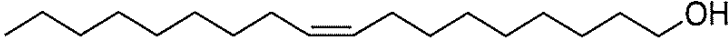
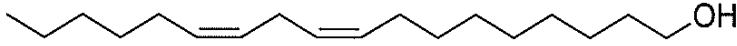
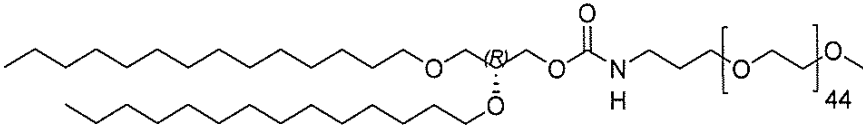
30

40

50

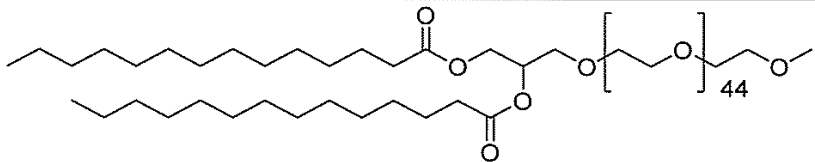
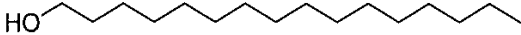
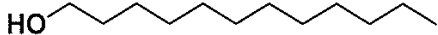
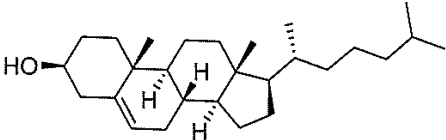
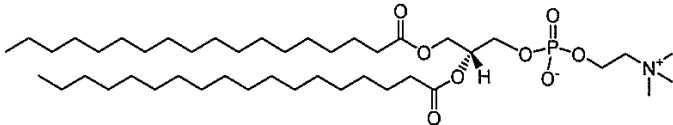
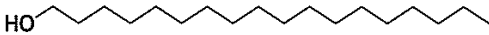
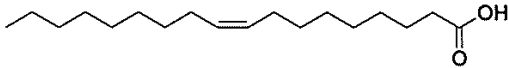
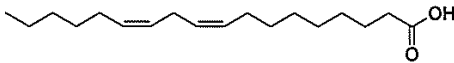
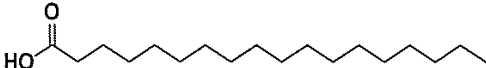
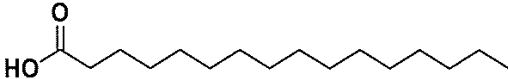
【表 2 - 1】

表 1B. 脂質ナノ粒子を構成するためのアミノ脂質および賦形剤

 501	10
 502	20
 503	30
 504	30
 505	30
 506	40

【 0 2 7 9 】

【表 2 - 2】

 507	
 508	
 509	
 510	
 511	
 512	
 513	
 514	
 515	
 516	
 517	

10

20

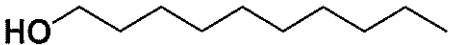
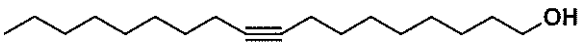
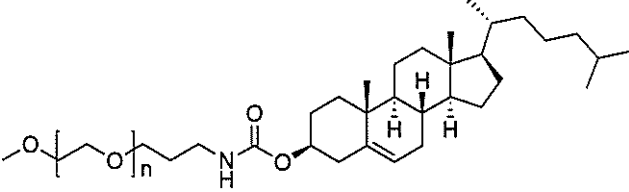
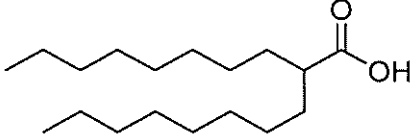
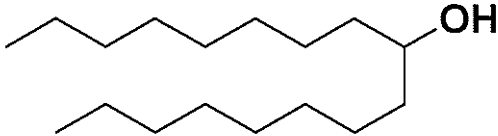
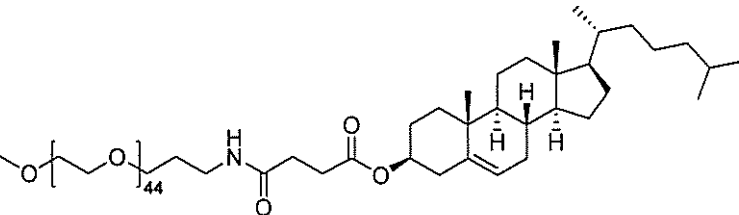
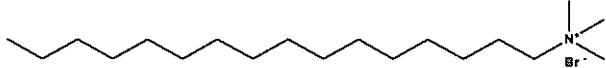
30

40

【 0 2 8 0 】

50

【表 2 - 3】

 518	
 519	
 520	10
 522	20
 521	
 523	30
 524	

【0281】

[0169]いくつかの実施形態では、本明細書に提供されるアミノ脂質（または他の脂質）は、本開示の異なる部分において1を超える化合物ID番号によって指定することができる。

【0282】

PEG-脂質

[0170]いくつかの実施形態では、記載されるLNP組成物はPEG-脂質を含む。いくつかの実施形態では、記載されたLNP組成物は、2つ以上のPEG-脂質を含む。例示的なPEG-脂質としては、限定するものではないが、表2の脂質が挙げられる。例示的なPEG-脂質としてはまた、限定するものではないが、PEG修飾ホスファチジルエタノールアミン、PEG修飾ホスファチジン酸、PEG修飾セラミド、PEG修飾ジアルキルアミン、PEG修飾ジアシルグリセロール、PEG修飾ジアルキルグリセロール、およびそれらの混合物が挙げられる。例えば、1つまたは複数のPEG-脂質は、PEG-

10

20

30

40

50

c-DOMG、PEG-DMG、PEG-DLPE、PEG-DMPE、PEG-DPPC、PEG-DSPE 脂質、またはそれらの組合せを含んでもよい。いくつかの実施形態では、PEG 部分は、エチレングリコールまたはエチレンオキシドの任意選択で置換された直鎖状または分枝状ポリマーである。いくつかの実施形態では、PEG 部分は、例えば、1つまたは複数のアルキル、アルコキシ、アシル、ヒドロキシ、またはアリール基によって置換される。いくつかの実施形態では、PEG 部分は、PEG-ポリウレタンまたは PEG-ポリプロピレンなどの PEG コポリマーを含む（例えば、j. Milton Harris, Poly(ethylene glycol) chemistry: biotechnical and biomedical applications (1992) を参照のこと）。いくつかの実施形態では、PEG 部分は、PEG コポリマーを含まず、例えば、PEG モノポリマーであってもよい。例示的な PEG-脂質としては、限定するものではないが、PEG-ジラウロイルグリセロール、PEG-ジミリスチルグリセロール (PEG-DMG)、PEG-ジパルミトイルグリセロール、PEG-ジステアロイルグリセロール (PEG-DSPE)、PEG-ジパルミトイルグリセロール、PEG-ジステリルグリセロール、PEG-ジラウリルグリカミド、PEG-ジミリスチルグリカミド、PEG-ジパルミトイルグリカミド、PEG-ジステリルグリカミド、PEG-コレステロール、および PEG-DMB (3, 4-ジテトラデコキシルベンジル- [オメガ]-メチル-ポリ(エチレングリコール) エーテル)、1, 2-ジミリスチル- sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[メトキシ(ポリエチレングリコール)-2000]) が挙げられる。

10

20

【0283】

【0171】いくつかの実施形態では、PEG-脂質は、PEG-脂質コンジュゲートであり、例えば、ジアルキルオキシプロピルに結合された PEG (例えば、PEG-DAA コンジュゲート)、ジアシルグリセロールに結合された PEG (例えば、PEG-DAG コンジュゲート)、コレステロールに結合された PEG、ホスファチジルエタノールアミンに結合された PEG、およびセラミドに結合された PEG (例えば、米国特許第 5, 885, 613 号を参照されたい)、カチオン性 PEG-脂質、ポリオキサゾリン (POZ)-脂質コンジュゲート (例えば、POZ-DAA コンジュゲート；例えば、国際公開第 2010/006282 号を参照されたい)、ポリアミドオリゴマー (例えば、ATTA-脂質コンジュゲート)、およびそれらの混合物である。

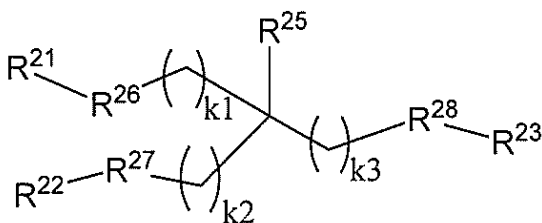
30

【0284】

【0172】一態様において、本明細書には、式 (III) の構造

【0285】

【化59】



40

式(III)

【0286】

を有する PEG-脂質、またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物が開示され、式中、

R²¹ および R²² の各々が独立に置換もしくは非置換の C₃~C₃₀ アルキル、置換もしくは非置換の C₃~C₃₀ アルケニル、または置換もしくは非置換の C₃~C₃₀ ア

50

ルキニルであり；

R^{26} 、 R^{27} および R^{28} の各々が独立に $-C(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=O)-$ 、 $-C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)-$ 、 $-OC(=O)O-$ 、 $-NR^4C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=NR^4)NR^4-$ 、 $-C(=S)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=S)-$ 、 $-C(=S)O-$ 、 $-OC(=S)-$ 、 $OC(=S)O-$ 、 $-NR^4C(=S)O-$ 、 $-OC(=S)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=S)NR^4-$ 、 $-C(=O)S-$ 、 $-SC(=O)-$ 、 $-OC(=O)S-$ 、 $-NR^4C(=O)S-$ 、 $-SC(=O)NR^4-$ 、 $-C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)-$ 、 $-SC(=S)O-$ 、 $-NR^4C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)NR^4-$ 、 $-C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)-$ 、 $-SC(=O)S-$ 、 $-SC(=S)S-$ 、 $-NR^4C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)NR^4-$ 、 $-O(CH_2)_2C(O)O-$ 、 $-O(CH_2)_2C(O)NH-$ 、 $-OC(O)(CH_2)_2O-$ 、 $-OC(O)(CH_2)_2NH-$ 、 $-O(CH_2)_2C(O)N(CH_3)-$ 、 $-O(CH_2)_2C(NH)O-$ 、 $-O(CH_2)_2C(NAc)NH-$ 、 $-O(CH_2)_2C(NH)N(CH_3)-$ 、 $-O(CH_2)_2C(NH)NH-$ 、 $-O(CH_2)_2C(NH)N(CH_3)-$ 、 $-NH(CH_2)_2C(O)O-$ 、 $-NH(CH_2)_2C(O)NH-$ 、 $NH(CH_2)_2C(O)N(CH_3)-$ 、 $-NH(CH_2)_2C(NH)O-$ 、 $-NH(CH_2)_2C(NAc)NH-$ 、 $-NH(CH_2)_2C(NH)N(CH_3)-$ 、 $-NH(CH_2)_2C(NH)NH-$ 、 $-NH(CH_2)_2C(NH)N(CH_3)-$ 、 $-OC(O)(CH_2)_2N(CH_3)-$ 、 $-OC(NH)(CH_2)_2O-$ 、 $-OC(NMe)(CH_2)_2NH-$ 、 $-O_2C(NH)(CH_2)N(CH_3)-$ 、 $-O(CH_2)_2C(NH)NH-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、または結合であり；

10

20

R^4 の各々が独立に水素または置換もしくは非置換の $C_1 \sim C_6$ アルキルであり；

R^{23} は、 $-C_0 \sim C_{10}$ アルキレン $-(CH_2-CH_2-O)_{k4}-R^{24}$ または $-C_1 \sim C_{10}$ ヘテロアルキレン $-(CH_2-CH_2-O)_{k4}-R^{24}$ でありアルキレンおよびヘテロアルキレンがそれぞれ独立に、置換されているか、または非置換であり；

R^{24} は、独立して水素または置換もしくは非置換の $C_1 \sim C_3$ アルキルであり；

R^{25} は、水素または置換もしくは非置換の $C_1 \sim C_6$ アルキルであり；

k_1 、 k_2 、 k_3 の各々が独立に0、1、2、3、4、5であり；

k_4 は、1～100から選択される整数である。

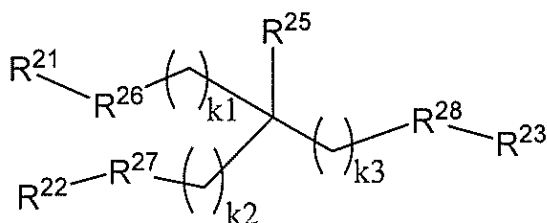
30

【0287】

【0173】一態様では、本明細書には、式(III*)の構造

【0288】

【化60】



40

式(III*)

【0289】

を有するPEG-脂質、またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物が開示され、式中、

R^{21} は、水素、置換もしくは非置換の $C_1 \sim C_{30}$ アルキル、置換もしくは非置換の $C_3 \sim C_{30}$ アルケニル、または置換もしくは非置換の $C_3 \sim C_{30}$ アルキニルであり；

R^{22} とは、水素、置換もしくは非置換の $C_1 \sim C_{30}$ アルキル、置換もしくは非置換

50

の $C_3 \sim C_{30}$ アルケニル、または置換もしくは非置換の $C_3 \sim C_{30}$ アルキニルであり；

R^{26} 、 R^{27} および R^{28} の各々が独立に $-C(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=O)-$ 、 $-C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)-$ 、 $-OC(=O)O-$ 、 $-NR^4C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=NR^4)NR^4-$ 、 $-C(=S)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=S)-$ 、 $-C(=S)O-$ 、 $-OC(=S)-$ 、 $OC(=S)O-$ 、 $-NR^4C(=S)O-$ 、 $-OC(=S)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=S)NR^4-$ 、 $-C(=O)S-$ 、 $-SC(=O)-$ 、 $-OC(=O)S-$ 、 $-NR^4C(=O)S-$ 、 $-N(Ac)-$ 、 $-OC(O)OCH_2C(O)O-$ 、 $-OC(O)OCH_2C(O)NH-$ 、 $-OC(O)NHCH_2C(O)O-$ 、 $-OC(O)NHCH_2C(O)NH-$ 、 $-OC(O)O(CH_2)_2C(O)O-$ 、 $-OC(O)O(CH_2)_2C(O)NH-$ 、 $-OC(O)NH(CH_2)_2C(O)O-$ 、 $-OC(O)NH(CH_2)_2C(O)NH-$ 、 $-OC(O)O(CH_2)_3C(O)O-$ 、 $-OC(O)O(CH_2)_3C(O)NH-$ 、 $-OC(O)NH(CH_2)_3C(O)O-$ 、 $-OC(O)NH(CH_2)_3C(O)NH-$ 、 $-C(O)OCH_2C(O)NH-$ 、 $-C(O)NHCH_2C(O)O-$ 、 $-C(O)NHCH_2C(O)NH-$ 、 $-C(O)O(CH_2)_2C(O)O-$ 、 $-C(O)O(CH_2)_2C(O)NH-$ 、 $-C(O)NH(CH_2)_2C(O)O-$ 、 $-C(O)NH(CH_2)_2C(O)NH-$ 、 $-C(O)O(CH_2)_3C(O)O-$ 、 $-C(O)O(CH_2)_3C(O)NH-$ 、 $-C(O)NH(CH_2)_3C(O)O-$ 、 $-C(O)NH(CH_2)_3C(O)NH-$ 、 $-OC(=O)NR^4(CH_2)_{1\sim3}C(=O)NH-$ 、 $-OC(=O)NR^4(CH_2)_{1\sim3}C(=O)O-$ 、 $-C(=O)NR^4(CH_2)_{1\sim3}C(=O)NH-$ 、 $-SC(=O)NR^4-$ 、 $-C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)-$ 、 $-SC(=S)O-$ 、 $-NR^4C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)NR^4-$ 、 $-C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)-$ 、 $-SC(=O)S-$ 、 $-SC(=S)S-$ 、 $-NR^4C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)NR^4-$ 、 $-O(CH_2)_2C(O)O-$ 、 $-O(CH_2)_2C(O)NH-$ 、 $-OC(O)(CH_2)_2O-$ 、 $-OC(O)(CH_2)_2NH-$ 、 $-O(CH_2)_2C(O)N(CH_3)-$ 、 $-O(CH_2)_2C(NH)O-$ 、 $-O(CH_2)_2C(NAc)NH-$ 、 $-O(CH_2)_2C(NH)N(CH_3)-$ 、 $-O(CH_2)_2C(NH)NH-$ 、 $-O(CH_2)_2C(NH)N(CH_3)-$ 、 $-NH(CH_2)_2C(O)O-$ 、 $-NH(CH_2)_2C(O)NH-$ 、 $NH(CH_2)_2C(O)N(CH_3)-$ 、 $-NH(CH_2)_2C(NH)O-$ 、 $-NH(CH_2)_2C(NAc)NH-$ 、 $-NH(CH_2)_2C(NH)N(CH_3)-$ 、 $-NH(CH_2)_2C(NH)NH-$ 、 $-NH(CH_2)_2C(NH)N(CH_3)-$ 、 $-OC(O)(CH_2)_2N(CH_3)-$ 、 $-OC(NH)(CH_2)_2O-$ 、 $-OC(NMe)(CH_2)_2NH-$ 、 $-O_2C(NH)(CH_2)N(CH_3)-$ 、 $-O(CH_2)_2C(NH)NH-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、または結合であり；

R^4 の各々が独立に水素または置換もしくは非置換の $C_1 \sim C_6$ アルキルであり；

R^{23} は、 $-C_0 \sim C_{10}$ アルキレン $-(CH_2-CH_2-O)_{k4}-R^{24}$ 、 $-C_1 \sim C_{10}$ ヘテロアルキレン $-(CH_2-CH_2-O)_{k4}-R^{24}$ 、 $-C_0 \sim C_{10}$ アルキレン $-(O-CH_2-CH_2)_{k4}-R^{24}$ または $-C_1 \sim C_{10}$ ヘテロアルキレン $-(O-CH_2-CH_2)_{k4}-R^{24}$ であり、アルキレンおよびヘテロアルキレンがそれぞれ独立に、置換されているか、または非置換であり；

R^{24} は、独立して水素、置換もしくは非置換の $C_1 \sim C_3$ アルキル、 $-O-R^4$ 、 $-C(=O)OH$ 、または $-C(=O)R^4$ であり；

R^{25} は、水素または置換もしくは非置換の $C_1 \sim C_{22}$ アルキルであり；

k_1 、 k_2 、 k_3 の各々が独立に 0、1、2、3、4、または 5 であり；

k_4 は、1～100 から選択される整数である。

[0290]

[0174]いくつかの実施形態では、式 (III) もしくは (III*) の PEG-脂質、または薬学的に許容されるその塩もしくは溶媒和物であって、

R^{21} は、置換もしくは非置換の $C_3 \sim C_{30}$ アルキル、置換もしくは非置換の $C_3 \sim$

C_{30} アルケニル、または置換もしくは非置換の $C_3 \sim C_{30}$ アルキニルであり；

R^{22} は、水素、置換もしくは非置換の $C_3 \sim C_{30}$ アルキル、置換もしくは非置換の $C_3 \sim C_{30}$ アルケニル、または置換もしくは非置換の $C_3 \sim C_{30}$ アルキニルであり；

R^{26} 、 R^{27} および R^{28} の各々が独立に $-C(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=O)-$ 、 $-C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)-$ 、 $-OC(=O)O-$ 、 $-NR^4C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=NR^4)NR^4-$ 、 $-C(=S)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=S)-$ 、 $-C(=S)O-$ 、 $-OC(=S)-$ 、 $OC(=S)O-$ 、 $-NR^4C(=S)O-$ 、 $-OC(=S)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=S)NR^4-$ 、 $-C(=O)S-$ 、 $-SC(=O)-$ 、 $-OC(=O)S-$ 、 $-NR^4C(=O)S-$ 、 $-OC(=O)NR^4C(=O)NH-$ 、 $-OC(=O)NR^4C(=O)O-$ 、 $-C(=O)NR^4C(=O)NH-$ 、 $-SC(=O)NR^4-$ 、 $-C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)-$ 、 $-SC(=S)O-$ 、 $-NR^4C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)NR^4-$ 、 $-C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)-$ 、 $-SC(=O)S-$ 、 $-SC(=S)S-$ 、 $-NR^4C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)NR^4-$ 、 $-O(CH_2)_2C(O)O-$ 、 $-O(CH_2)_2C(O)NH-$ 、 $-OC(O)(CH_2)_2O-$ 、 $-OC(O)(CH_2)_2NH-$ 、 $-O(CH_2)_2C(O)N(CH_3)-$ 、 $-O(CH_2)_2C(NH)O-$ 、 $-O(CH_2)_2C(NAc)NH-$ 、 $-O(CH_2)_2C(NH)N(CH_3)-$ 、 $-O(CH_2)_2C(NH)NH-$ 、 $-O(CH_2)_2C(NH)N(CH_3)-$ 、 $-NH(CH_2)_2C(O)O-$ 、 $-NH(CH_2)_2C(O)NH-$ 、 $NH(CH_2)_2C(O)N(CH_3)-$ 、 $-NH(CH_2)_2C(NH)O-$ 、 $-NH(CH_2)_2C(NAc)NH-$ 、 $-NH(CH_2)_2C(NH)N(CH_3)-$ 、 $-NH(CH_2)_2C(NH)NH-$ 、 $-NH(CH_2)_2C(NH)N(CH_3)-$ 、 $-OC(O)(CH_2)_2N(CH_3)-$ 、 $-OC(NH)(CH_2)_2O-$ 、 $-OC(NMe)(CH_2)_2NH-$ 、 $-O_2C(NH)(CH_2)N(CH_3)-$ 、 $-O(CH_2)_2C(NH)NH-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、または結合であり；

R^4 の各々が独立に水素または置換もしくは非置換の $C_1 \sim C_6$ アルキルであり；

R^{23} は、 $-C_0 \sim C_{10}$ アルキレン $-(CH_2-CH_2-O)_{k4}-R^{24}$ または $-C_1 \sim C_{10}$ ヘテロアルキレン $-(CH_2-CH_2-O)_{k4}-R^{24}$ であり、アルキレンおよびヘテロアルキレンがそれぞれ独立に、置換されているか、または非置換であり；

R^{24} は、独立して水素、置換もしくは非置換の $C_1 \sim C_3$ アルキル、 $-O-R^4$ 、 $-C(=O)OR^4$ 、または $-C(=O)R^4$ であり；

R^{25} は、水素または置換もしくは非置換の $C_1 \sim C_6$ アルキルであり；

k_1 、 k_2 、 k_3 の各々が独立に 0、1、2、3、4、または 5 であり；

k_4 は、1～100 から選択される整数である。

【0291】

【0175】式 (III) もしくは (III*) の化合物またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物のいくつかの実施形態では、 R^{21} および R^{22} の各々が独立に非置換もしくは置換の直鎖状または分枝状の $C_{12} \sim C_{30}$ アルキルである。いくつかの実施形態では、 R^{21} および R^{22} の各々が独立に非置換の直鎖状 $C_{12} \sim C_{25}$ アルキルである。式 (III) の化合物またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物のいくつかの実施形態では、 R^{21} および R^{22} の各々が独立に非置換もしくは置換の直鎖状または分枝状の $C_{12} \sim C_{30}$ アルケニルである。いくつかの実施形態では、 R^{21} および R^{22} の各々が独立に非置換の直鎖状 $C_{12} \sim C_{25}$ アルケニルである。

【0292】

【0176】式 (III) もしくは (III*) の化合物またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物のいくつかの実施形態では、 R^{26} および R^{27} の各々は、 $-O-$ 、 $-C(=O)O-$ 、または $-OC(=O)-$ である。いくつかの実施形態では、 R^{26} および R^{27} の各々は $-O-$ である。いくつかの実施形態では、 R^{26} と R^{27} の各々は結合である。

【0293】

10

20

30

40

50

[0177]式 (I I I) もしくは (I I I*) の化合物またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物のいくつかの実施形態では、 R^{28} は、 $-O-$ 、 $-C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)-$ 、または $-OC(=O)NR^4$ である。式 (I I I*) の化合物のいくつかの実施形態では、 R^{28} は、 $-OC(=O)NR^4$ である。式 (I I I) または (I I I*) の化合物またはその薬学的に許容されるその塩もしくは溶媒和物のいくつかの実施形態では、 R^{28} は、 $-C(=O)-$ または $-OC(=O)-$ である。

[0294]

[0178]式 (I I I*) の化合物または薬学的に許容されるその塩もしくは溶媒和物のいくつかの実施形態では、 R^{26} は、 $-O(CH_2)_2C(O)O-$ 、 $-O(CH_2)_2C(O)NH-$ 、 $-OC(O)(CH_2)_2O-$ 、 $-OC(O)(CH_2)_2NH-$ 、 $-O(CH_2)_2C(O)N(CH_3)-$ 、 $-O(CH_2)_2C(NH)O-$ 、 $-O(CH_2)_2C(NAc)NH-$ 、 $-O(CH_2)_2C(NH)N(CH_3)-$ 、 $-O(CH_2)_2C(NH)NH-$ 、 $-O(CH_2)_2C(NH)N(CH_3)-$ 、 $-NH(CH_2)_2C(O)O-$ 、 $-NH(CH_2)_2C(O)NH-$ 、 $NH(CH_2)_2C(O)N(CH_3)-$ 、 $-NH(CH_2)_2C(NH)O-$ 、 $-NH(CH_2)_2C(NAc)NH-$ 、 $-NH(CH_2)_2C(NH)N(CH_3)-$ 、 $-NH(CH_2)_2C(NH)NH-$ 、 $-NH(CH_2)_2C(NH)N(CH_3)-$ 、 $-OC(O)(CH_2)_2N(CH_3)-$ 、 $-OC(NH)(CH_2)_2O-$ 、 $-OC(NMe)(CH_2)_2NH-$ 、 $-O_2C(NH)(CH_2)N(CH_3)-$ 、 $-O(CH_2)_2C(NH)NH-$ 、 $-N(Ac)-$ 、 $-OC(O)O(CH_2)C(O)O-$ 、 $-OC(O)O(CH_2)C(O)(NH)-$ 、 $-OC(O)(NH)(CH_2)C(O)O-$ 、 $-OC(O)(NH)(CH_2)C(O)(NH)-$ 、 $-OC(O)O(CH_2)_2C(O)O-$ 、 $-OC(O)O(CH_2)_2C(O)(NH)-$ 、 $-OC(O)(NH)(CH_2)_2C(O)O-$ 、 $-OC(O)(NH)(CH_2)_2C(O)(NH)-$ 、 $-OC(O)O(CH_2)_3C(O)O-$ 、 $-OC(O)O(CH_2)_3C(O)(NH)-$ 、 $-OC(O)(NH)(CH_2)_3C(O)O-$ 、 $-OC(O)(NH)(CH_2)_3C(O)(NH)-$ 、 $-C(O)O(CH_2)C(O)(NH)-$ 、 $-C(O)(NH)(CH_2)C(O)O-$ 、 $-C(O)(NH)(CH_2)C(O)(NH)-$ 、 $-C(O)O(CH_2)_2C(O)O-$ 、 $-C(O)O(CH_2)_2C(O)(NH)-$ 、 $-C(O)(NH)(CH_2)_2C(O)O-$ 、 $-C(O)(NH)(CH_2)_2C(O)(NH)-$ 、 $-C(O)O(CH_2)_3C(O)O-$ 、 $-C(O)O(CH_2)_3C(O)(NH)-$ 、 $-C(O)(NH)(CH_2)_3C(O)O-$ 、 $-C(O)(NH)(CH_2)_3C(O)(NH)-$ または結合である。

[0295]

[0179]式 (I I I) もしくは (I I I*) の化合物またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物のいくつかの実施形態では、 R^{26} は、 $-O(CH_2)_2C(O)O-$ 、 $-O(CH_2)_2C(O)NH-$ 、 $-OC(O)(CH_2)_2O-$ 、 $-OC(O)(CH_2)_2NH-$ 、 $-O(CH_2)_2C(O)N(CH_3)-$ 、 $-O(CH_2)_2C(NH)O-$ 、 $-O(CH_2)_2C(NAc)NH-$ 、 $-O(CH_2)_2C(NH)N(CH_3)-$ 、 $-O(CH_2)_2C(NH)NH-$ 、 $-O(CH_2)_2C(NH)N(CH_3)-$ 、 $-NH(CH_2)_2C(O)O-$ 、 $-NH(CH_2)_2C(O)NH-$ 、 $NH(CH_2)_2C(O)N(CH_3)-$ 、 $-NH(CH_2)_2C(NH)O-$ 、 $-NH(CH_2)_2C(NAc)NH-$ 、 $-NH(CH_2)_2C(NH)N(CH_3)-$ 、 $-NH(CH_2)_2C(NH)NH-$ 、 $-NH(CH_2)_2C(NH)N(CH_3)-$ 、 $-OC(O)(CH_2)_2N(CH_3)-$ 、 $-C(O)NH(CH_2)_2O-$ 、 $-C(O)N(Me)(CH_2)_2NH-$ 、 $-O_2C(NH)(CH_2)N(CH_3)-$ または $-O(CH_2)_2C(NH)NH-$ である。

[0296]

[0180]式 (I I I*) の化合物または薬学的に許容されるその塩もしくは溶媒和物のいくつかの実施形態では、 R^{27} は、 $-O(CH_2)_2C(O)O-$ 、 $-O(CH_2)_2$

20

30

40

50

C (NH) (CH₂) N (CH₃) -, -O (CH₂)₂ C (NH) NH-, -N (Ac)
) -, -OC (O) O (CH₂) C (O) O-, -OC (O) O (CH₂) C (O) (N
 H) -, -OC (O) (NH) (CH₂) C (O) O-, -OC (O) (NH) (CH₂
) C (O) (NH) -, -OC (O) O (CH₂)₂ C (O) O-, -OC (O) O (C
 H₂)₂ C (O) (NH) -, -OC (O) (NH) (CH₂)₂ C (O) O-, -OC
 (O) (NH) (CH₂)₂ C (O) (NH) -, -OC (O) O (CH₂)₃ C (O)
 O-, -OC (O) O (CH₂)₃ C (O) (NH) -, -OC (O) (NH) (CH₂
)₃ C (O) O-, -OC (O) (NH) (CH₂)₃ C (O) (NH) -, -C (O)
 O (CH₂) C (O) (NH) -, -C (O) (NH) (CH₂) C (O) O-, -C (O)
 (NH) (CH₂) C (O) (NH) -, -C (O) O (CH₂)₂ C (O) O-,
 -C (O) O (CH₂)₂ C (O) (NH) -, -C (O) (NH) (CH₂)₂ C (O)
) O-, -C (O) (NH) (CH₂)₂ C (O) (NH) -, -C (O) O (CH₂)
)₃ C (O) O-, -C (O) O (CH₂)₃ C (O) (NH) -, -C (O) (NH) (CH₂)
)₃ C (O) O-または-C (O) (NH) (CH₂)₃ C (O) (NH) -である。

10

【0299】

【0183】式 (I I I) もしくは (I I I*) の化合物またはその薬学的に許容される塩
 もしくは溶媒和物のいくつかの実施形態では、R²⁸ は、-O (CH₂)₂ C (O) O-
 、-O (CH₂)₂ C (O) NH-, -OC (O) (CH₂)₂ O-, -OC (O) (C
 H₂)₂ NH-, -O (CH₂)₂ C (O) N (CH₃) -, -O (CH₂)₂ C (NH
) O-, -O (CH₂)₂ C (NAc) NH-, -O (CH₂)₂ C (NH) N (CH₃)
) -, -O (CH₂)₂ C (NH) NH-, -O (CH₂)₂ C (NH) N (CH₃) -,
 -NH (CH₂)₂ C (O) O-, -NH (CH₂)₂ C (O) NH-, NH (CH₂)
)₂ C (O) N (CH₃) -, -NH (CH₂)₂ C (NH) O-, -NH (CH₂)₂
 C (NAc) NH-, -NH (CH₂)₂ C (NH) N (CH₃) -, -NH (CH₂)
)₂ C (NH) NH-, -NH (CH₂)₂ C (NH) N (CH₃) -, -OC (O) (C
 H₂)₂ N (CH₃) -, -OC (NH) (CH₂)₂ O-, -OC (NMe) (CH₂)
)₂ NH-, -O₂ C (NH) (CH₂) N (CH₃) -または-O (CH₂)₂ C (N
 H) NH-である。

20

【0300】

【0184】式 (I I I) もしくは (I I I*) の化合物またはその薬学的に許容される塩
 もしくは溶媒和物のいくつかの実施形態では、k₁ は、0、1または2である。いくつか
 の実施形態では、k₁ は0である。いくつかの実施形態では、k₁ は1である。いくつか
 の実施形態では、k₁ は2である。

30

【0301】

【0185】式 (I I I) もしくは (I I I*) の化合物またはその薬学的に許容される塩
 もしくは溶媒和物のいくつかの実施形態では、k₂ は、0、1または2である。いくつか
 の実施形態では、k₂ は0である。いくつかの実施形態では、k₂ は1である。いくつか
 の実施形態では、k₂ は2である。

【0302】

【0186】式 (I I I) もしくは (I I I*) の化合物またはその薬学的に許容される塩
 もしくは溶媒和物のいくつかの実施形態では、k₃ は、0、1または2である。いくつか
 の実施形態では、k₃ は0である。いくつかの実施形態では、k₃ は1である。いくつか
 の実施形態では、k₃ は2である。

40

【0303】

【0187】式 (I I I) もしくは (I I I*) の化合物またはその薬学的に許容される塩
 もしくは溶媒和物のいくつかの実施形態では、R²³ は、-C₀~C₃アルキレン- (C
 H₂-CH₂-O)_{k4}-R²⁴であり、R²⁴ は、H、エチルまたはメチルである。式 (I
 I I) もしくは (I I I*) の化合物またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和
 物のいくつかの実施形態では、R²³ は、-C₁~C₅ヘテロアルキレン- (CH₂-C

50

10

20

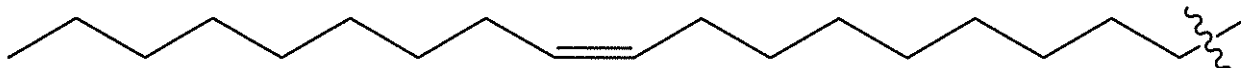
30

40

50

50

50



50

50

50

50

[0191]式(III*)の化合物またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物のいくつかの実施形態では、R²⁵は、C₁₀~22置換または非置換のアルキルであり、R²⁸は、-O(CH₂)₂C(O)O-、-O(CH₂)₂C(O)NH-、-OC(O)(CH₂)₂O-、-OC(O)(CH₂)₂NH-、-O(CH₂)₂C(O)N(CH₃)-、-O(CH₂)₂C(NH)O-、-O(CH₂)₂C(NAc)NH-、-O(CH₂)₂C(NH)N(CH₃)-、-O(CH₂)₂C(NH)NH-、-O

20

30

50

ある。

【0310】

[0193]式 (I I I*) の化合物またはその薬学的に許容される塩または溶媒和物のいくつかの実施形態では、 R^{21} は、 $C_{14} \sim 18$ 置換または非置換のアルキルであり； R^{22} は、 $C_{14} \sim 18$ 置換または非置換のアルキルであり； R^{25} は H であり； R^{26} は $-O-$ であり； R^{27} は $-O-$ であり； R^{28} は、 $-O(CH_2)_2C(O)O-$ 、 $-O(CH_2)_2C(O)NH-$ 、 $-OC(O)(CH_2)_2O-$ 、 $-OC(O)(CH_2)_2NH-$ 、 $-O(CH_2)_2C(O)N(CH_3)-$ 、 $-O(CH_2)_2C(NH)O-$ 、 $-O(CH_2)_2C(NAc)NH-$ 、 $-O(CH_2)_2C(NH)N(CH_3)-$ 、 $-O(CH_2)_2C(NH)NH-$ 、 $-O(CH_2)_2C(NH)N(CH_3)-$ 、 $-NH(CH_2)_2C(O)O-$ 、 $-NH(CH_2)_2C(O)NH-$ 、 $NH(CH_2)_2C(O)N(CH_3)-$ 、 $-NH(CH_2)_2C(NH)O-$ 、 $-NH(CH_2)_2C(NAc)NH-$ 、 $-NH(CH_2)_2C(NH)N(CH_3)-$ 、 $-NH(CH_2)_2C(NH)NH-$ 、 $-NH(CH_2)_2C(NH)N(CH_3)-$ 、 $-OC(O)(CH_2)_2N(CH_3)-$ 、 $-OC(NH)(CH_2)_2O-$ 、 $-OC(NMe)(CH_2)_2NH-$ 、 $-O_2C(NH)(CH_2)N(CH_3)-$ 、 $-O(CH_2)_2C(NH)NH-$ 、 $-N(Ac)-$ 、 $-OC(O)O(CH_2)C(O)O-$ 、 $-OC(O)O(CH_2)C(O)(NH)-$ 、 $-OC(O)(NH)(CH_2)C(O)(NH)-$ 、 $-OC(O)O(CH_2)_2C(O)O-$ 、 $-OC(O)O(CH_2)_2C(O)(NH)-$ 、 $-OC(O)(NH)(CH_2)_2C(O)O-$ 、 $-OC(O)(NH)(CH_2)_2C(O)(NH)-$ 、 $-OC(O)O(CH_2)_3C(O)O-$ 、 $-OC(O)O(CH_2)_3C(O)(NH)-$ 、 $-OC(O)(NH)(CH_2)_3C(O)O-$ 、 $-OC(O)(NH)(CH_2)_3C(O)(NH)-$ 、 $-C(O)O(CH_2)C(O)(NH)-$ 、 $-C(O)(NH)(CH_2)C(O)O-$ 、 $-C(O)(NH)(CH_2)C(O)(NH)-$ 、 $-C(O)O(CH_2)_2C(O)O-$ 、 $-C(O)O(CH_2)_2C(O)(NH)-$ 、 $-C(O)(NH)(CH_2)_2C(O)O-$ 、 $-C(O)(NH)(CH_2)_2C(O)(NH)-$ 、 $-C(O)O(CH_2)_3C(O)O-$ 、 $-C(O)O(CH_2)_3C(O)(NH)-$ 、 $-C(O)(NH)(CH_2)_3C(O)O-$ または $-C(O)(NH)(CH_2)_3C(O)(NH)-$ であり； k_1 は 1 であり、 k_2 は 0 であり、 k_3 は 1 である。

【0311】

[0194]式 (I I I*) の化合物またはその薬学的に許容される塩または溶媒和物のいくつかの実施形態では、 R^{21} は、 C_{14} 置換または非置換のアルキルであり； R^{22} は、 C_{14} 置換または非置換のアルキルであり； R^{25} は H であり； R^{26} は $-O-$ であり； R^{27} は $-O-$ であり； R^{28} は、 $-O(CH_2)_2C(O)O-$ 、 $-O(CH_2)_2C(O)NH-$ 、 $-OC(O)(CH_2)_2O-$ 、 $-OC(O)(CH_2)_2NH-$ 、 $-O(CH_2)_2C(O)N(CH_3)-$ 、 $-O(CH_2)_2C(NH)O-$ 、 $-O(CH_2)_2C(NAc)NH-$ 、 $-O(CH_2)_2C(NH)N(CH_3)-$ 、 $-O(CH_2)_2C(NH)NH-$ 、 $-O(CH_2)_2C(NH)N(CH_3)-$ 、 $-NH(CH_2)_2C(O)O-$ 、 $-NH(CH_2)_2C(O)NH-$ 、 $NH(CH_2)_2C(O)N(CH_3)-$ 、 $-NH(CH_2)_2C(NH)O-$ 、 $-NH(CH_2)_2C(NAc)NH-$ 、 $-NH(CH_2)_2C(NH)N(CH_3)-$ 、 $-NH(CH_2)_2C(NH)NH-$ 、 $-NH(CH_2)_2C(NH)N(CH_3)-$ 、 $-OC(O)(CH_2)_2N(CH_3)-$ 、 $-OC(NH)(CH_2)_2O-$ 、 $-OC(NMe)(CH_2)_2NH-$ 、 $-O_2C(NH)(CH_2)N(CH_3)-$ 、 $-O(CH_2)_2C(NH)NH-$ 、 $-N(Ac)-$ 、 $-OC(O)O(CH_2)C(O)O-$ 、 $-OC(O)O(CH_2)C(O)(NH)-$ 、 $-OC(O)(NH)(CH_2)C(O)(NH)-$ 、 $-OC(O)O(CH_2)_2C(O)O-$ 、 $-OC(O)O(CH_2)_2C(O)(NH)-$ 、 $-OC(O)(NH)(CH_2)_2C(O)O-$ 、 $-OC(O)(NH)(CH_2)_2C(O)(NH)-$ 、 $-OC(O)O(CH_2)_3C(O)O-$ 、 $-OC(O)O(CH_2)_3C(O)(NH)-$ 、 $-C(O)O(CH_2)C(O)(NH)-$ 、 $-C(O)(NH)(CH_2)C(O)O-$ 、 $-C(O)(NH)(CH_2)C(O)(NH)-$ 、 $-C(O)O(CH_2)_2C(O)O-$ 、 $-C(O)O(CH_2)_2C(O)(NH)-$ 、 $-C(O)(NH)(CH_2)_2C(O)O-$ 、 $-C(O)(NH)(CH_2)_2C(O)(NH)-$ 、 $-C(O)O(CH_2)_3C(O)O-$ 、 $-C(O)O(CH_2)_3C(O)(NH)-$ 、 $-C(O)(NH)(CH_2)_3C(O)O-$ または $-C(O)(NH)(CH_2)_3C(O)(NH)-$ であり； k_1 は 1 であり、 k_2 は 0 であり、 k_3 は 1 である。

—、—OC(O)O(CH₂)₃C(O)(NH)—、—OC(O)(NH)(CH₂)₃C(O)(NH)—、—C(O)O(CH₂)C(O)(NH)—、—C(O)(NH)(CH₂)C(O)O—、—C(O)(NH)(CH₂)C(O)(NH)—、—C(O)O(CH₂)₂C(O)O—、—C(O)O(CH₂)₂C(O)(NH)—、—C(O)(NH)(CH₂)₂C(O)O—、—C(O)(NH)(CH₂)₂C(O)(NH)—、—C(O)O(CH₂)₃C(O)O—、—C(O)O(CH₂)₃C(O)(NH)—、—C(O)(NH)(CH₂)₃C(O)O—、または—C(O)(NH)(CH₂)₃C(O)(NH)—であり；k₁は1であり、k₂は0であり、k₃は1である。

【0312】

10

[0195]いくつかの実施形態では、本明細書には、—O(CH₂)₂C(O)O—または—O(CH₂)₂C(O)NH—の構造を含むPEG-脂質が開示される。

[0196]一態様では、本明細書には、表2のPEG-脂質が開示される。

【0313】

20

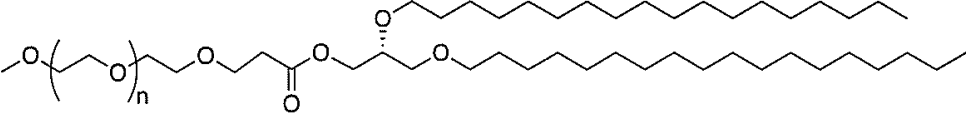
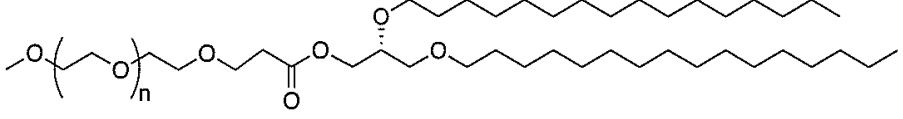
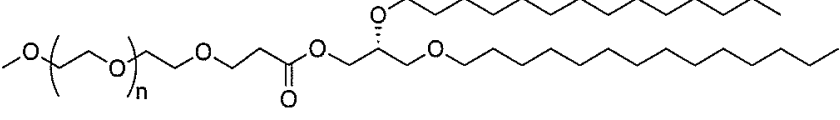
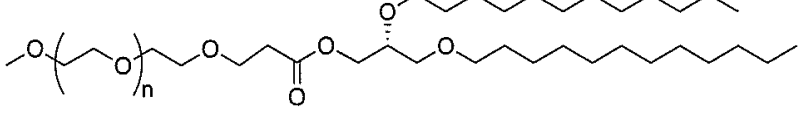
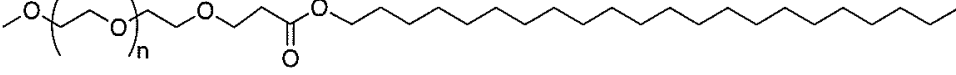
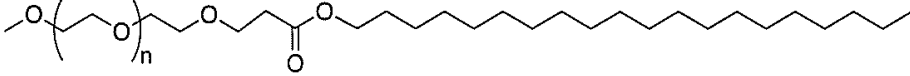
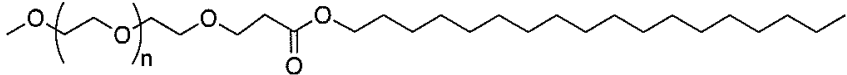
30

40

50

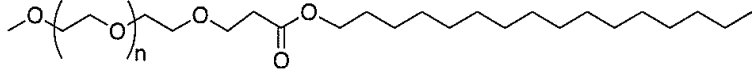
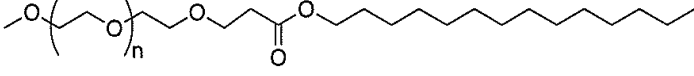
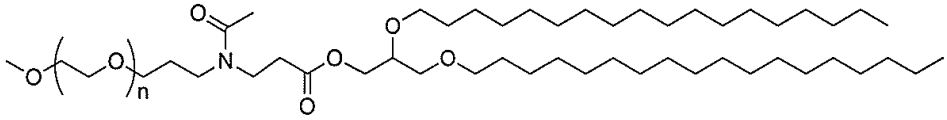
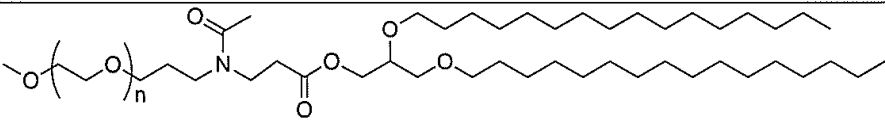
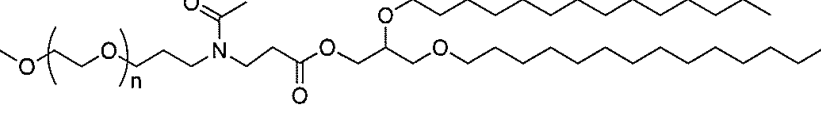
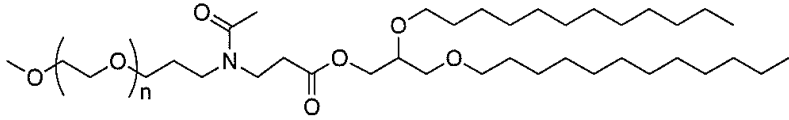
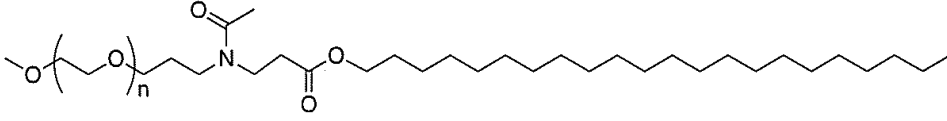
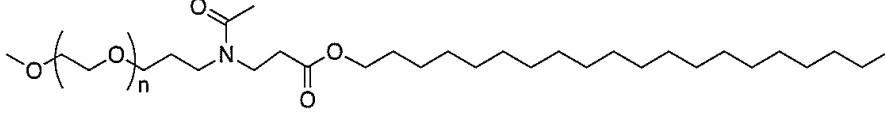
【表 3 - 1】

表 2. LNP を構成する例示的な PEG-脂質

 VP101	10
 VP102	20
 VP103	30
 VP104	40
 VP105	
 VP107	
 VP108	

【 0 3 1 4 】

【表 3 - 2】


VP109

VP110

VP111

VP112

VP113

VP114

VP115

VP116

10

20

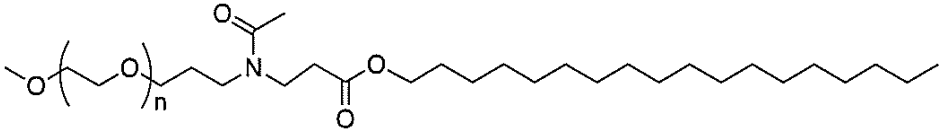
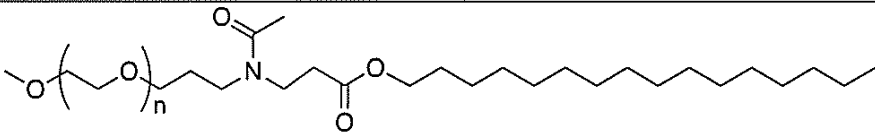
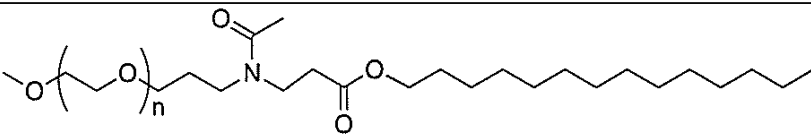
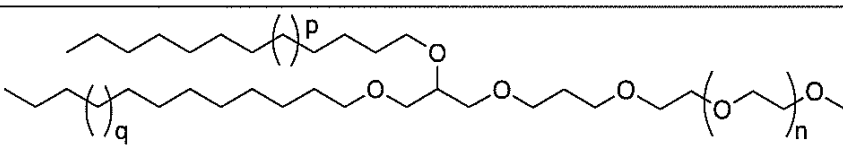
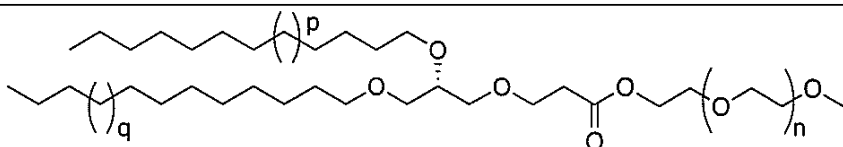
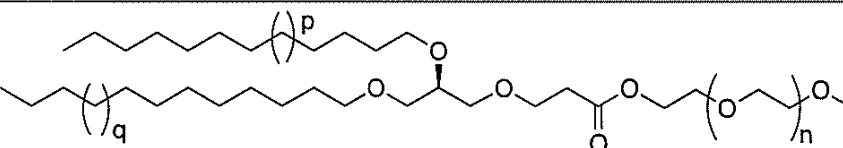
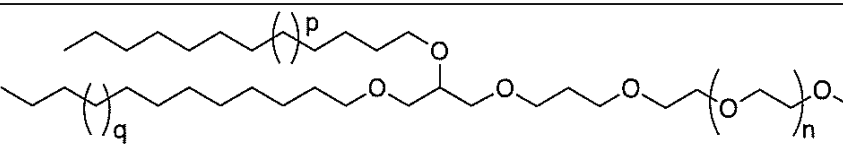
30

40

【 0 3 1 5 】

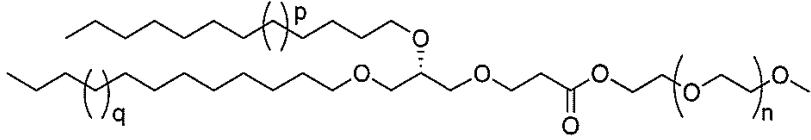
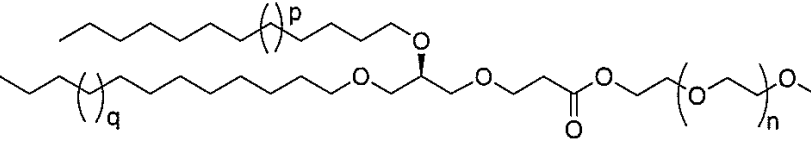
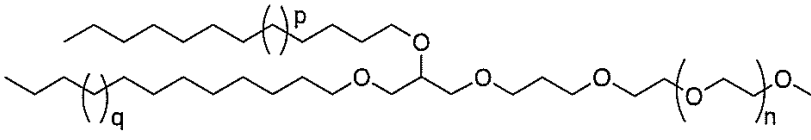
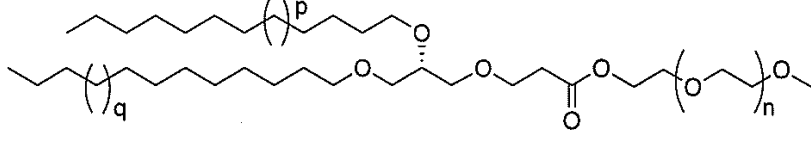
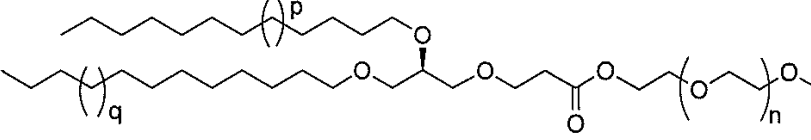
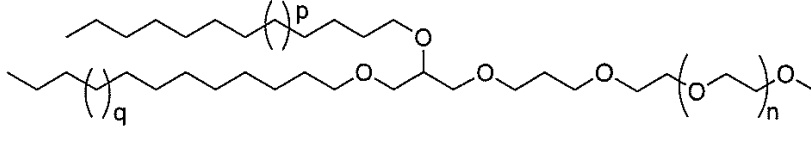
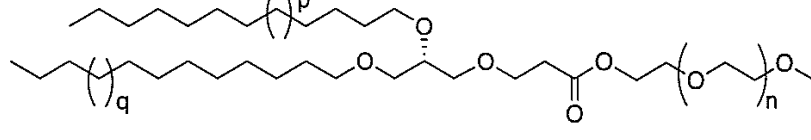
50

【表 3 - 3】

 VP117	
 VP118	10
 VP119	
 VP120 (p, q = 7)	20
 VP121 (p, q = 7)	
 VP122 (p, q = 7)	30
 VP123 (p, q = 5)	40

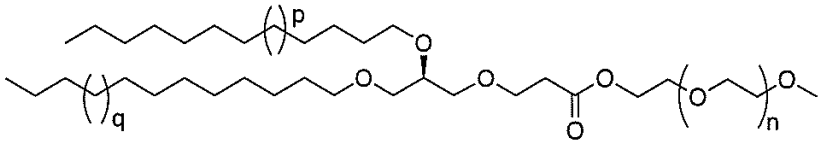
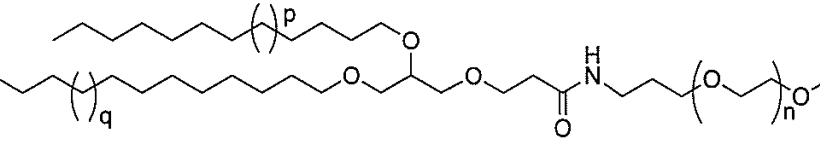
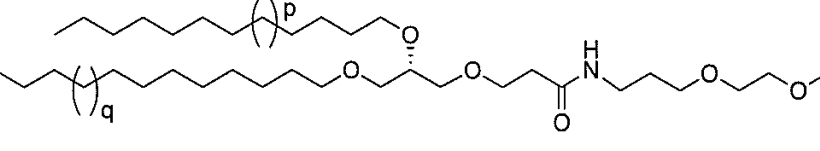
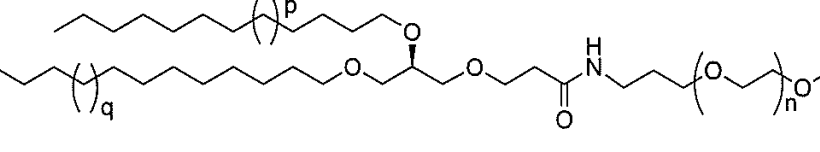
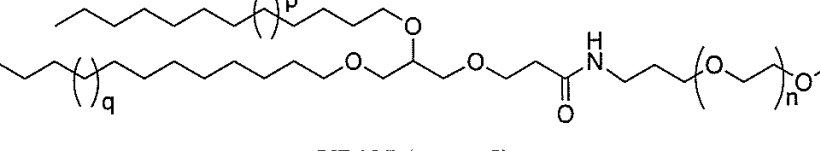
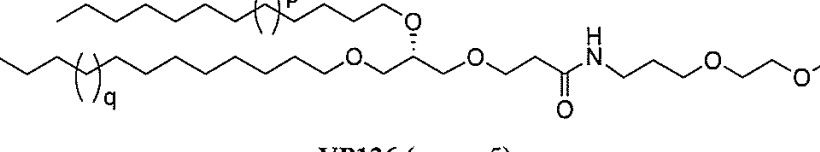
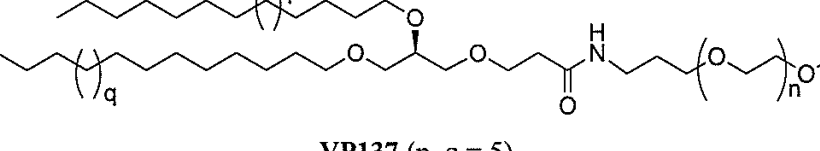
【 0 3 1 6 】

【表 3 - 4】

 VP124 (p, q = 5)	
 VP125 (p, q = 5)	10
 VP126 (p, q = 3)	
 VP127 (p, q = 3)	20
 VP128 (p, q = 3)	
 VP129 (p, q = 1)	30
 VP130 (p, q = 1)	40

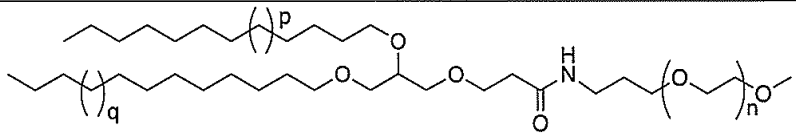
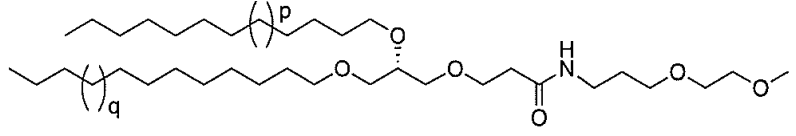
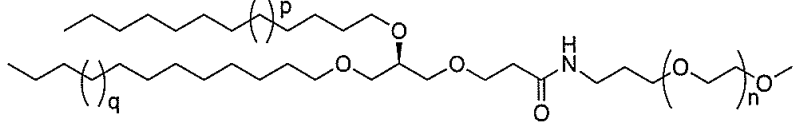
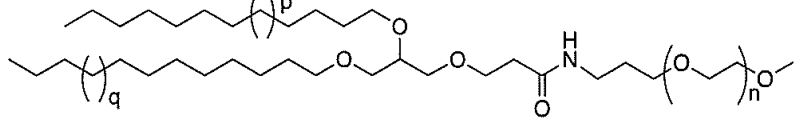
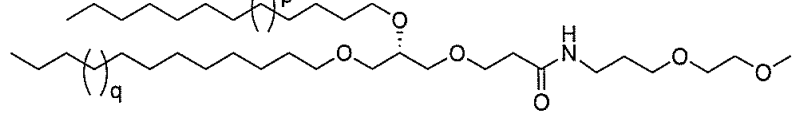
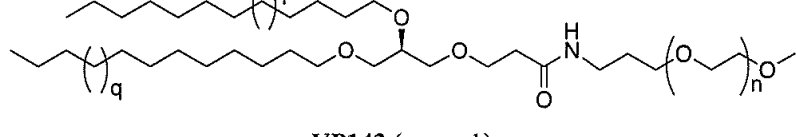
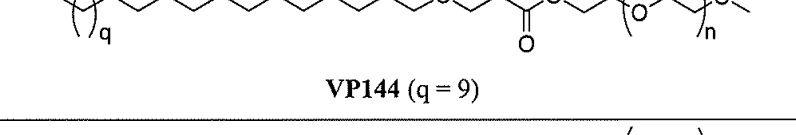
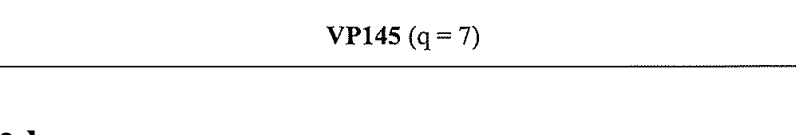
【 0 3 1 7 】

【表 3 - 5】

 VP131 (p, q = 1)	
 VP132 (p, q = 7)	10
 VP133 (p, q = 7)	
 VP134 (p, q = 7)	20
 VP135 (p, q = 5)	
 VP136 (p, q = 5)	30
 VP137 (p, q = 5)	40

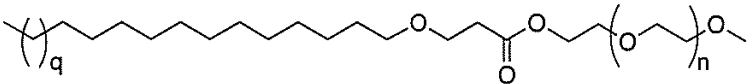
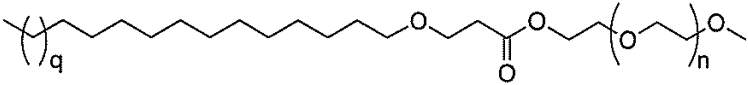
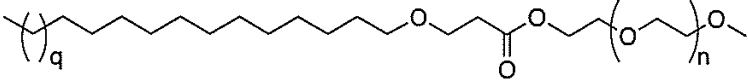
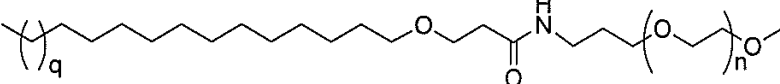
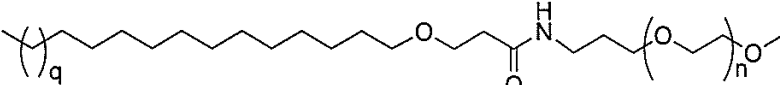
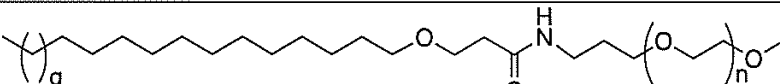
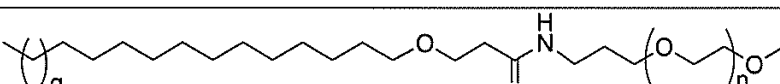
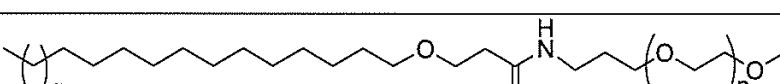
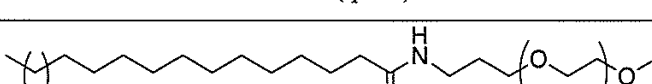
【 0 3 1 8 】

【表 3 - 6】

 VP138 (p, q = 3)	
 VP139 (p, q = 3)	10
 VP140 (p, q = 3)	
 VP141 (p, q = 1)	20
 VP142 (p, q = 1)	
 VP143 (p, q = 1)	30
 VP144 (q = 9)	
 VP145 (q = 7)	40

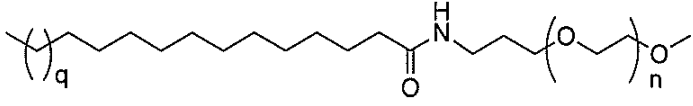
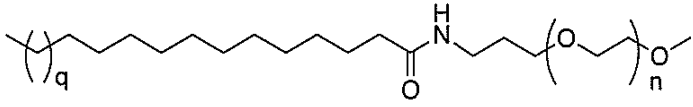
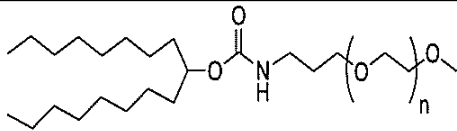
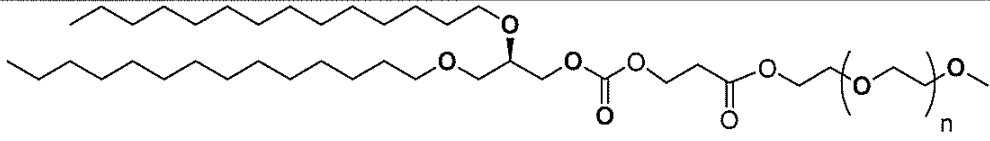
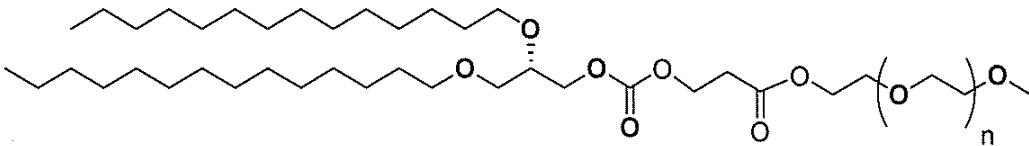
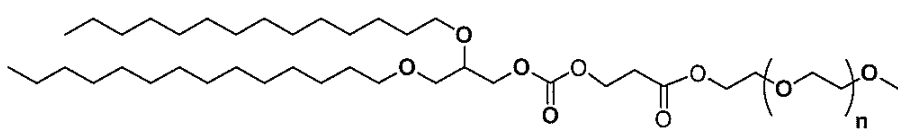
【 0 3 1 9 】

【表 3 - 7】

 VP146 (q = 5)	
 VP147 (q = 3)	
 VP148 (q = 1)	10
 VP149 (q = 9)	
 VP150 (q = 7)	20
 VP151 (q = 5)	
 VP152 (q = 3)	30
 VP153 (q = 1)	
 VP154 (q = 5)	40

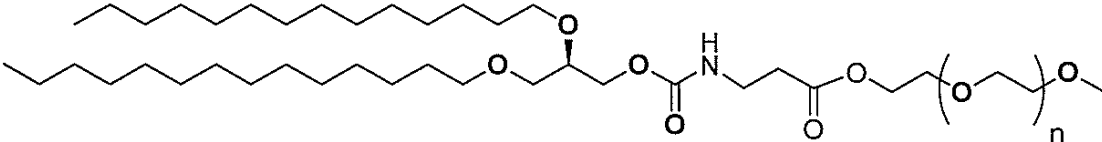
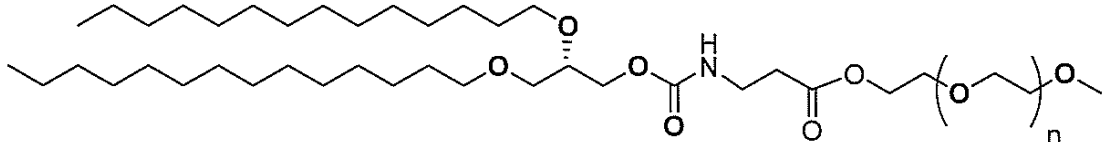
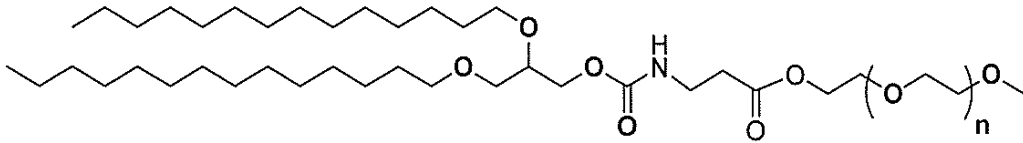
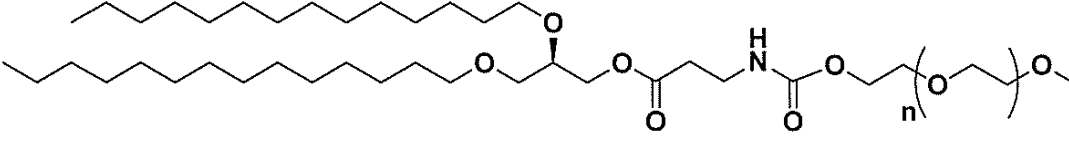
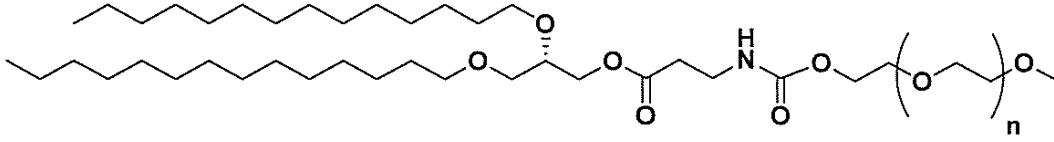
【 0 3 2 0 】

【表 3 - 8】

 VP155 (q = 3)	
 VP156 (q = 1)	10
 VP157	
 VP158, n=36-48	20
 VP158A, n = 36-48	30
 VP158B, n = 36-48	40

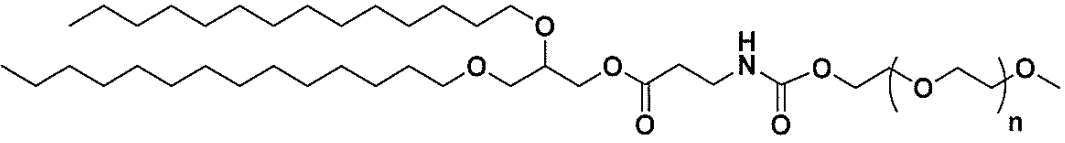
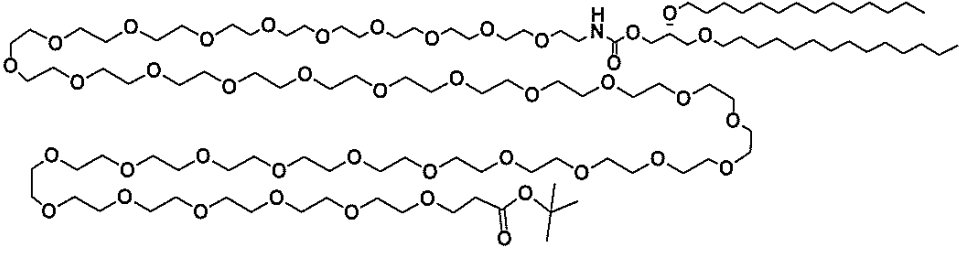
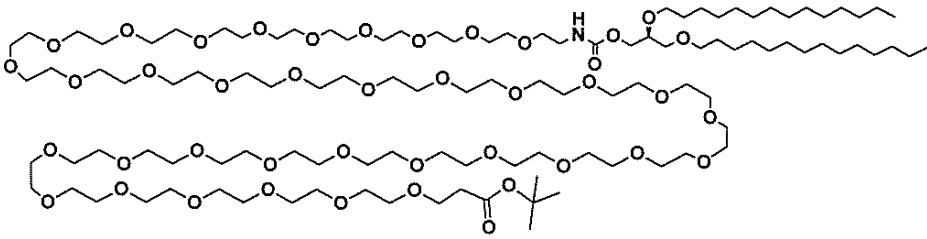
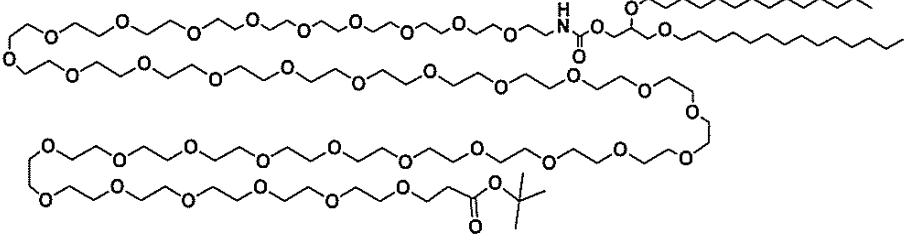
【 0 3 2 1 】

【表 3 - 9】

	10
VP159, n=36-48	
	20
VP159A, n=36-48	
	30
VP159B, n=36-48	
	40
VP160, n=36-48	
	50
VP160A, n = 36-48	

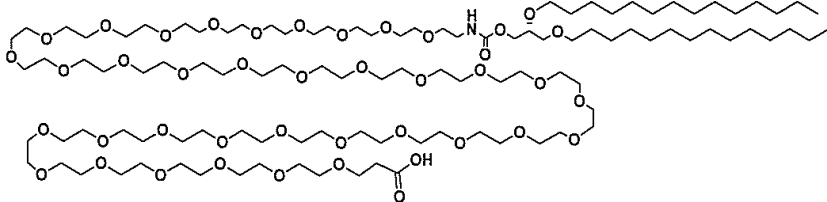
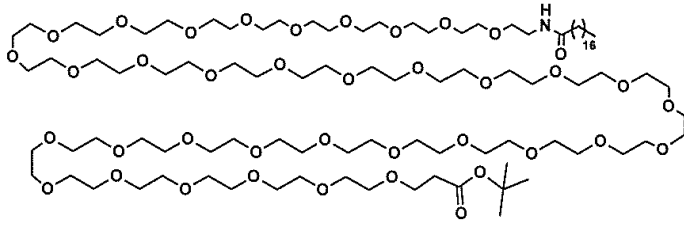
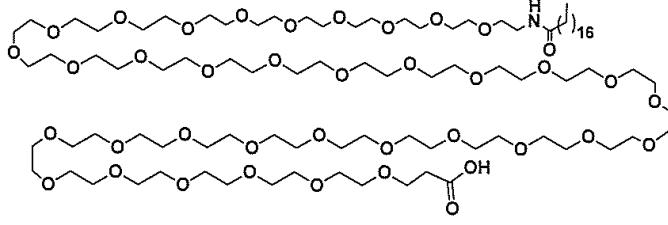
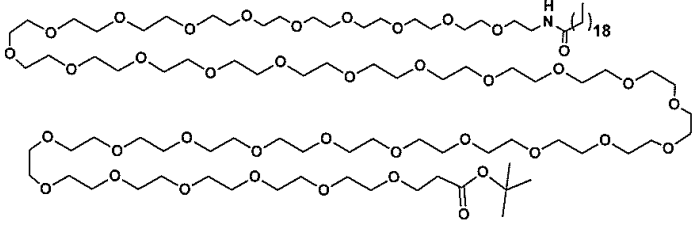
【 0 3 2 2 】

【表 3 - 1 0】

 VP160B, n = 36-48	
 VP161	10
 VP161A	20
 VP161B	30
	40

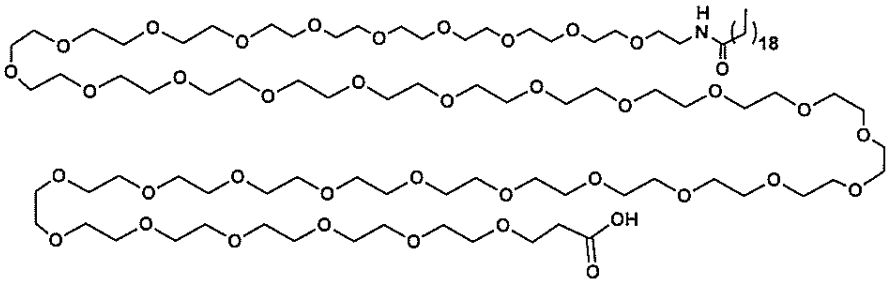
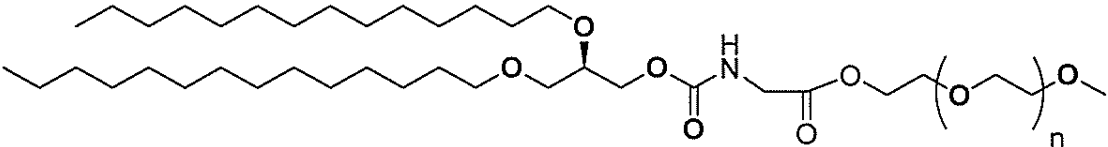
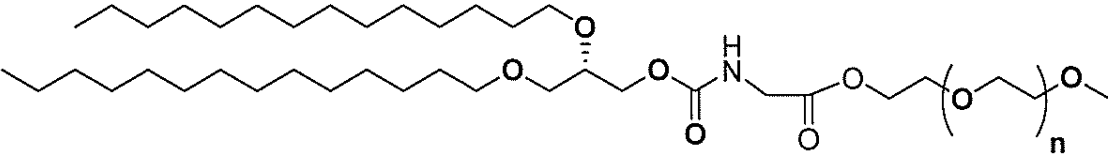
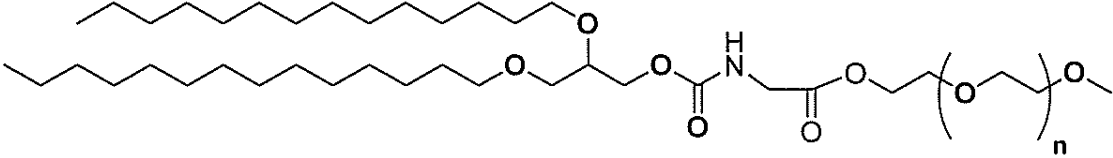
【 0 3 2 3 】

【表 3 - 1 1】

 VP162	10
 VP163	20
 VP164	30
 VP165	40

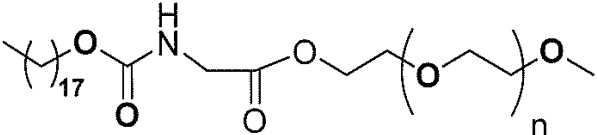
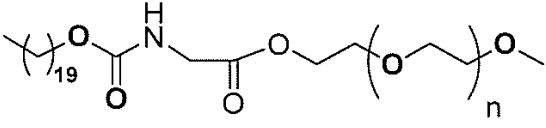
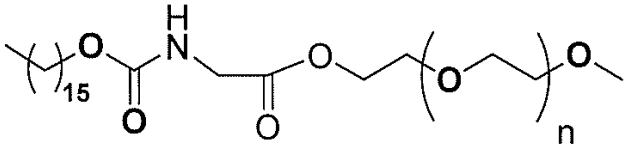
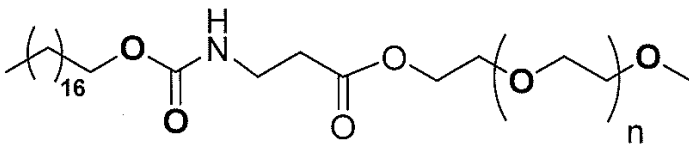
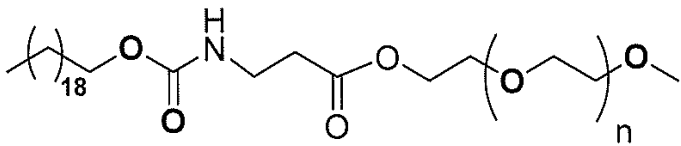
【 0 3 2 4 】

【表 3 - 1 2】

 VP166	10
 VP177, n= 36-48	20
 VP177A, n = 36-48	30
 VP177B, n = 36-48	40

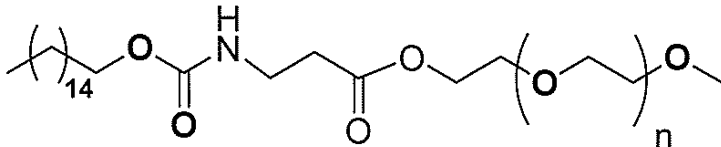
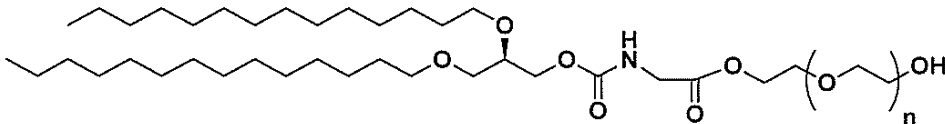
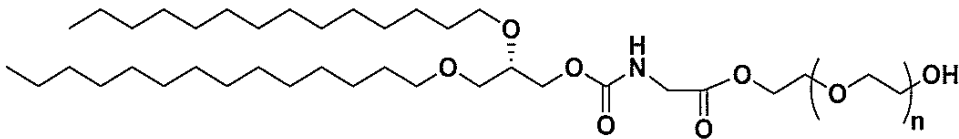
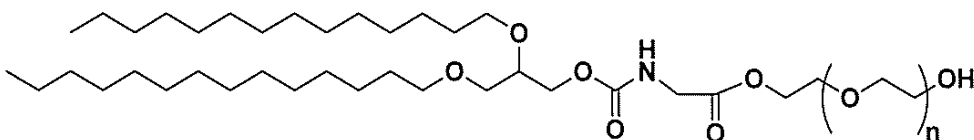
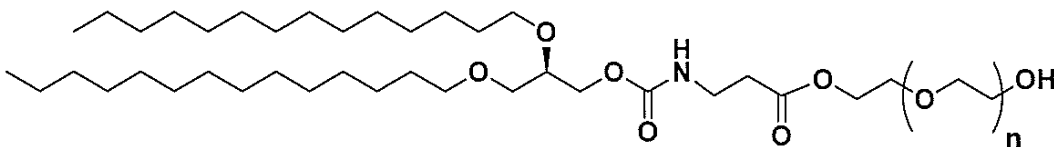
【 0 3 2 5 】

【表 3 - 1 3】

 VP178, n = 36-48	10
 VP179, n = 36-48	20
 VP180, n = 36-48	30
 VP181, n = 36-48	40
 VP182, n = 36-48	

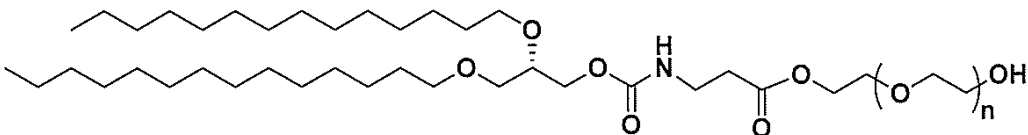
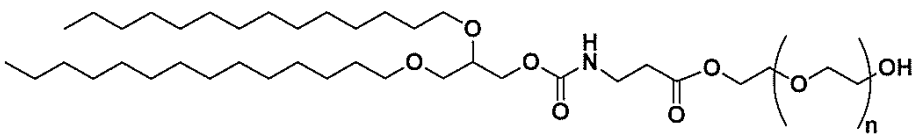
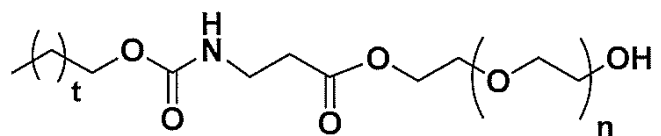
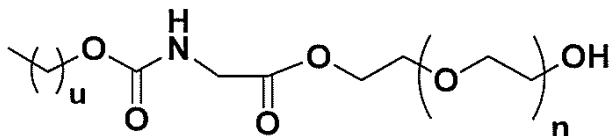
【 0 3 2 6 】

【表 3 - 1 4】

	10
VP183, n = 32-48	
	
VP184, n = 36-48	
	
VP184A, n = 36-48	
	30
VP184B, n = 36-48	
	40
VP185, n = 32-48	

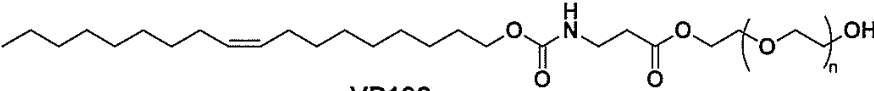
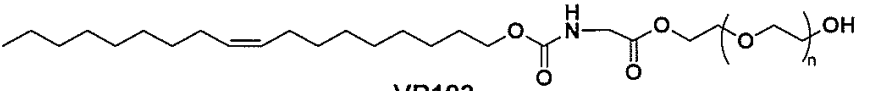
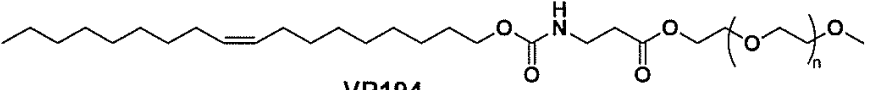
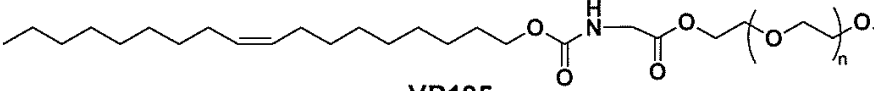
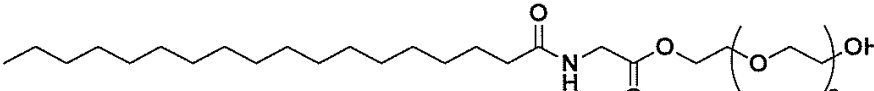
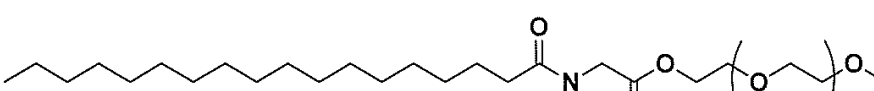
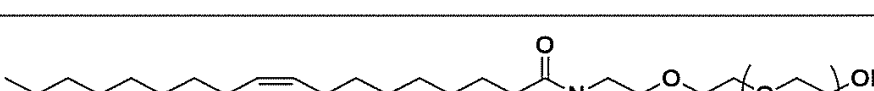
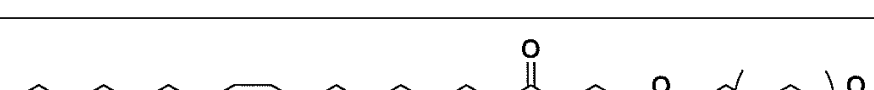
【 0 3 2 7 】

【表 3 - 1 5】

 VP185A, n = 36-48	10
 VP185B, n = 36-48	
 t = 14, VP 186 t = 16, VP187 t = 18, VP188	20
 u = 15, VP189 u = 17, VP190 u = 19, VP191	30
	40

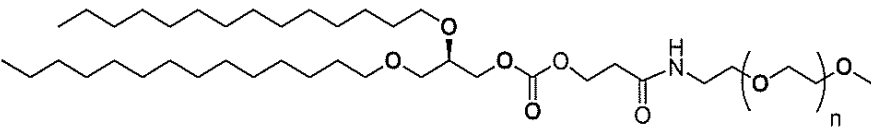
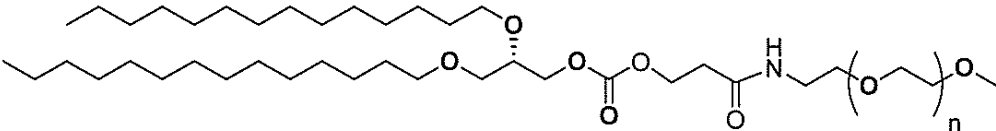
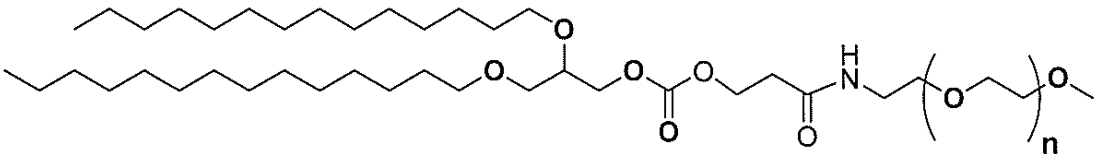
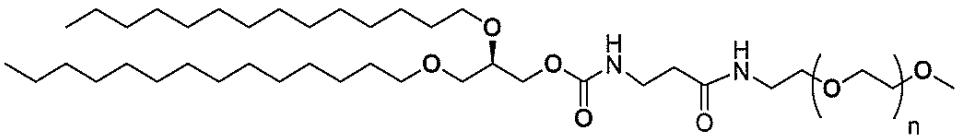
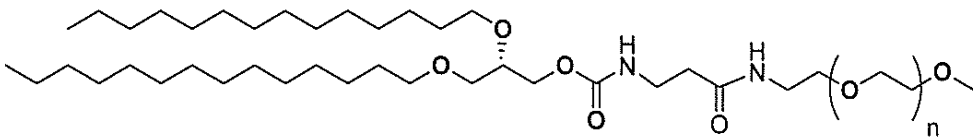
【 0 3 2 8 】

【表 3 - 1 6】

 VP192	
 VP193	10
 VP194	
 VP195	20
 VP196	
 VP197	30
 VP198	
 VP199	40

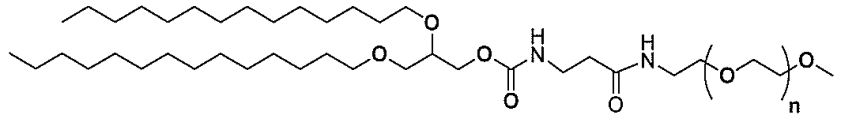
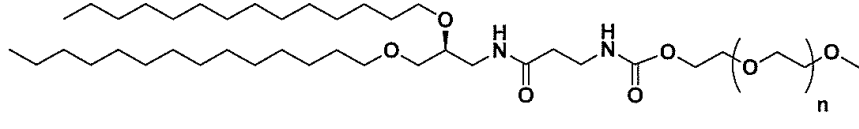
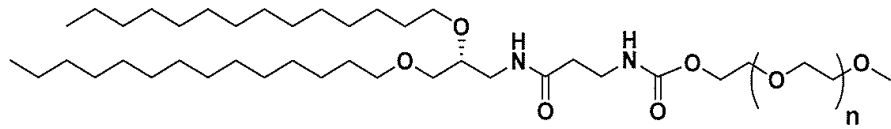
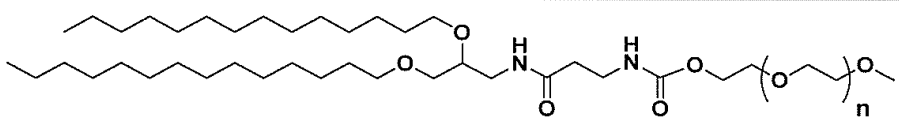
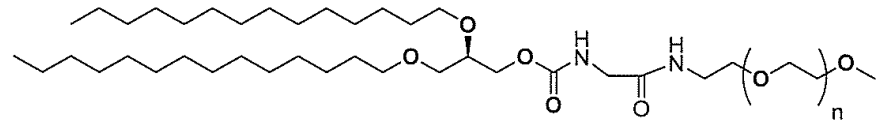
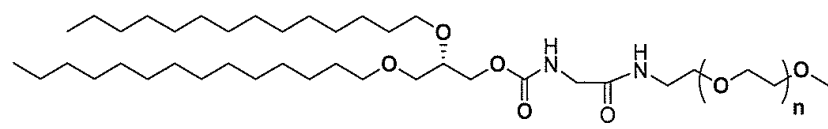
【 0 3 2 9 】

【表 3 - 1 7】

 VP200, n = 36-48	10
 VP200A, n = 36-48	20
 VP200B, n = 36-48	30
 VP201, n = 36-48	40
 VP201A, n = 36-48	

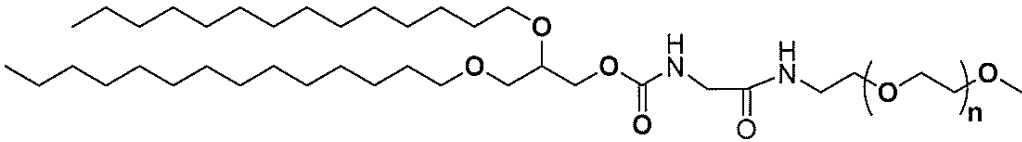
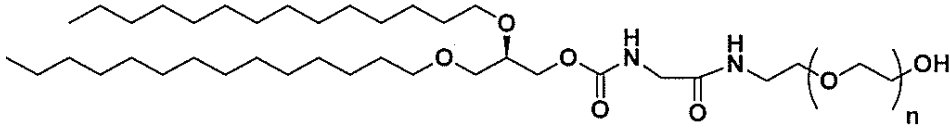
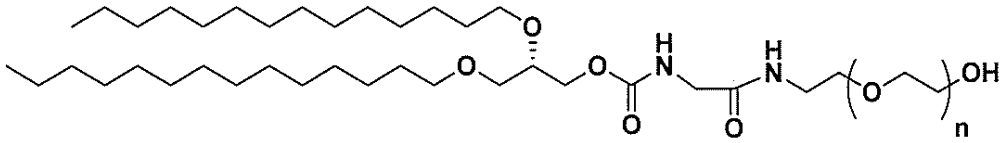
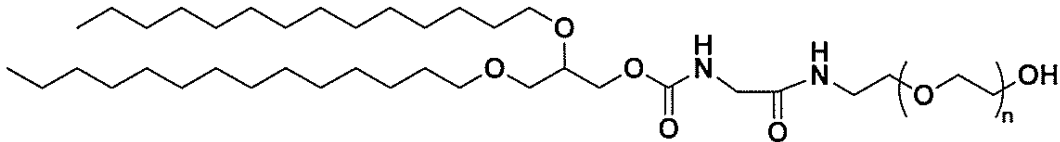
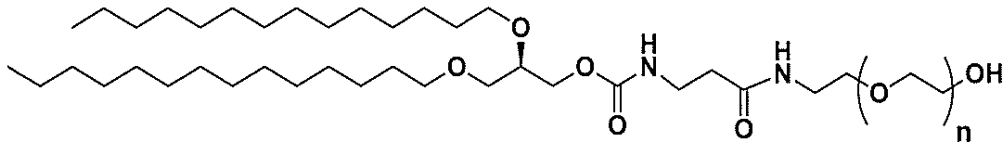
【 0 3 3 0 】

【表 3 - 1 8】

 VP201B, n = 36-48	
 VP202, n = 36-48	10
 VP202A, n = 36-48	20
 VP202B, n = 36-48	
 VP203, n = 36-48	30
 VP203A, 36-48	40

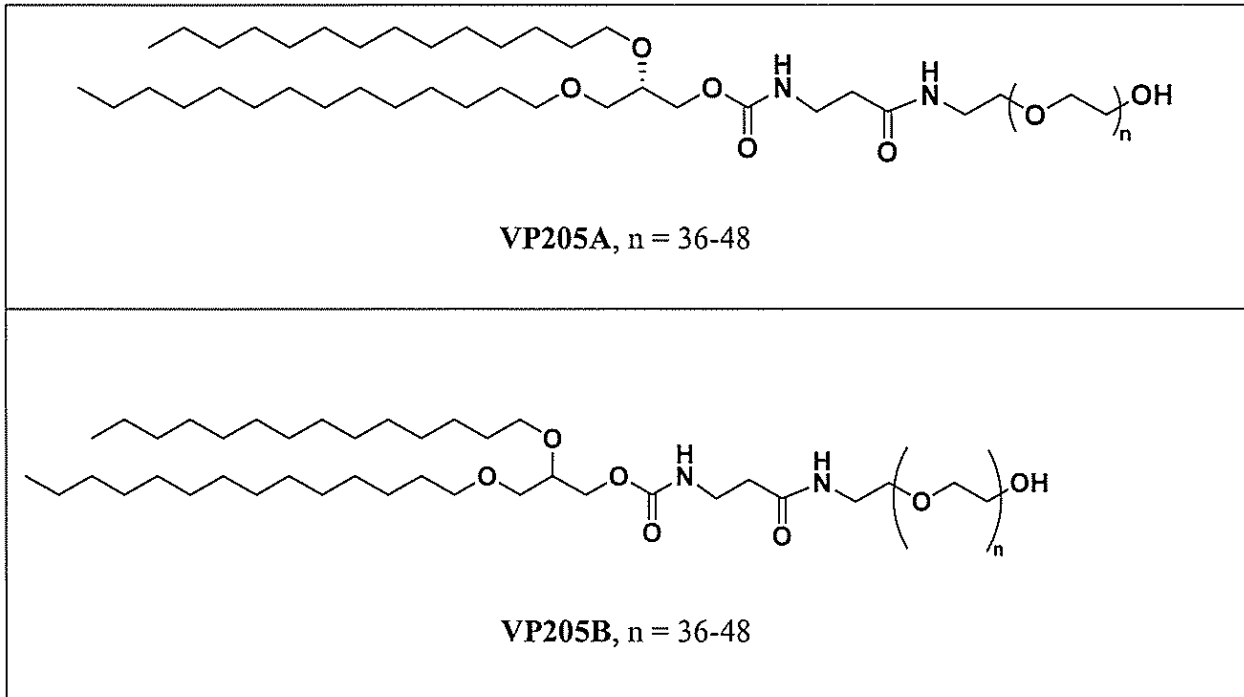
【 0 3 3 1 】

【表 3 - 1 9】

 VP203B, n = 36-48	
 VP204, n = 36-48	10
 VP204A, n = 36-48	20
 VP204B, n = 36-48	30
 VP205, n = 36-48	40

【 0 3 3 2 】

【表 3 - 2 0】



【0333】

【0197】いくつかの実施形態では、表2中のnは、2～200、10～100、25～50、または42～48の整数である。いくつかの実施形態では、表2中のnは、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、またはそれ以上である。

【0334】

【0198】PEG-脂質は、1つまたは複数のエチレングリコール単位、例えば、少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも5つ、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100、少なくとも120、または少なくとも150のエチレングリコール単位を含んでもよい。いくつかの実施形態では、PEG-脂質の数平均分子量は、約200Da～約5000Daである。いくつかの実施形態では、PEG-脂質の数平均分子量は、約500Da～約3000Daである。いくつかの実施形態では、PEG-脂質の数平均分子量は、約750Da～約2500Daである。いくつかの実施形態では、PEG-脂質の数平均分子量は、約750Da～約2500Daである。いくつかの実施形態では、PEG-脂質の数平均分子量は、約500Da、約750Da、約1000Da、約1250Da、約1500Da、約1750Da、または約2000Daである。いくつかの実施形態では、1つまたは複数のPEG-脂質の多分散性指数(PDI)は2未満である。いくつかの実施形態では、1つまたは複数のPEG-脂質のPDIは、最大で1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、または3.0である。いくつかの実施形態では、1つまたは複数のPEG-脂質のPDIは、少なくとも1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、または3.0である。

【0335】

【0199】いくつかの実施形態では、PEG-脂質は、粒子中に存在する総脂質の約0.1mol%～約10mol%を構成する。いくつかの実施形態では、PEG-脂質は、粒

10

20

30

40

50

子中に存在する総脂質の約0.1mol%～約6mol%を構成する。いくつかの実施形態では、PEG-脂質は、粒子中に存在する総脂質の約0.5mol%～約5mol%を構成する。いくつかの実施形態では、PEG-脂質は、粒子中に存在する総脂質の約1mol%～約3mol%を構成する。いくつかの実施形態では、PEG-脂質は、粒子中に存在する総脂質の約2.0mol%～約2.5mol%を構成する。いくつかの実施形態では、PEG-脂質は、粒子中に存在する約1mol%、約1.1mol%、約1.2mol%、約1.3mol%、約1.4mol%、約1.5mol%、約1.6mol%、約1.7mol%、約1.8mol%、約1.9mol%、約2.0mol%、約2.1mol%、約2.2mol%、約2.3mol%、約2.4mol%、約2.5mol%、約2.6mol%、約2.7mol%、約2.8mol%、約2.9mol%または約3.0mol%を構成する。

10

【0336】

【0200】いくつかの実施形態では、LNP組成物は、複数のPEG-脂質、例えば、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれ以上の異なるPEG-脂質を含む。いくつかの実施形態では、複数のPEG-脂質のうちの少なくとも1つは、表2から選択される。

【0337】

リン脂質

【0201】いくつかの実施形態では、記載されるLNP組成物はリン脂質を含む。いくつかの実施形態では、リン脂質は、ホスファチジルコリン(PC)、ホスファチジルエタノールアミン、グリセロリン脂質、スフィンゴリン脂質、グリセロスホノ、スフィンゴ脂質、ホスホノ脂質、天然レシチン、および水素化リン脂質からなる群より選択される脂質を含む。いくつかの実施形態では、リン脂質は、ホスファチジルコリンを含む。ホスファチジルコリンの例としては、限定されないが、大豆ホスファチジルコリン、卵黄ホスファチジルコリン(EPC)、ジステアロイルホスファチジルコリン、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DSPC)、ジパルミトイルホスファチジルコリン、ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DPPC)、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン(POPC)、ジミリストイルホスファチジルコリン(DMPC)、およびジオレオイルホスファチジルコリン(DOPE)が挙げられる。ある種

20

30

【0338】

【0202】いくつかの実施形態では、リン脂質は、ホスファチジルエタノールアミンを含む。いくつかの実施形態では、ホスファチジルエタノールアミンは、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン(DSPE)、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン(DPPE)、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン(DOPE)、ジミリストイルホスホエタノールアミン(DMPE)、16-0-Monomer LEPE、16-0-ジメチルPE、18-1-トランスPE、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)、または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)である。いくつかの実施形態では、リン脂質はグリセロリン脂質を含む。いくつかの実施形態では、グリセロリン脂質は、プラズマロゲン(plasmalogen)、ホスファチデート、またはホスファチジルコリンである。いくつかの実施形態では、グリセロリン脂質は、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、ホスファチジルイノシトール、パルミトイルオレオイルホスファチジルグリセロール(POPG)、またはリゾホスファチジルコリンである。いくつかの実施形態では、リン脂質は、スフィンゴリン脂質を含む。いくつかの実施形態では、スフィンゴリン脂質は、スフィンゴミエリン、セラミドホスホエタノールアミン、セラミドホスホグリセロール、またはセラミドホスホグリセロリン酸である。いくつかの実施形態では、リン脂質は天然レシチンを含む。いくつかの実施形態では、天然レシチンは卵黄レシチンまたは大豆レシチンである。いくつかの実施形態では、リン脂質は水素化リン脂質を含む。いくつかの実施形態では、水素化リン脂質は、水素化大豆ホ

40

50

スファチジルコリンである。いくつかの実施形態では、リン脂質は、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジリンノシトール、ホスファチジン酸、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン、リゾホスファチジルコリン、リゾホスファチジルエタノールアミン、ジパルミトイルホスファチジルコリン、ジオレオイルホスファチジルコリン、ジステアロイルホスファチジルコリンおよびジリノレオイルホスファチジルコリンからなる群から選択される。

【0339】

【0203】いくつかの実施形態では、リン脂質は、1, 2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (DSPC)、1, 2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン (DOPE)、1, 2-ジリノレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (DLP C)、1, 2-ジミリスチル-sn-グリセロ-ホスホコリン (DMPC)、1, 2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (DOPC)、1, 2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (DPPC)、1, 2-ジウンデカノイル-sn-グリセロ-ホスホコリン (DUPC)、1-パルミトイル-2-オレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (POPC)、1, 2-ジオ-オクタデセニル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (18:0 ジエテルPC)、1-オレオイル-2-コレステリルヘミスクシノイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (OChemSPC)、1-ヘキサデシル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (C₁₆ LysoPC)、1, 2-ジリノレノイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン、1, 2-ジアラキドノイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン、1, 2-ジドコサヘキサエノイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン、1, 2-ジフィタノイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン (ME16.0PE)、1, 2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン、1, 2-ジリノレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン、1, 2-ジアラキドノイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン、1, 2-ジドコサヘキサエノイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン、1, 2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホ-rac-(1-グリセロール) ナトリウム塩 (DOPG)、およびスフィンゴミエリンから選択される脂質を含む。

【0340】

【0204】リン脂質は、リン脂質部分および1つまたは複数の脂肪酸部分を含んでもよい。リン脂質部分は、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルセリン、ホスファチジン酸、2-リゾホスファチジルコリン、またはスフィンゴミエリンを含んでもよい。脂肪酸部分は、ラウリン酸、ミリスチン酸、ミリストレイン酸、パルミチン酸、パルミトレイン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、アルファ-リノレン酸、エルカ酸、フィタン酸、アラキジン酸、アラキドン酸、エイコサペンタエン酸、ベヘン酸、ドコサペンタエン酸、またはドコサヘキサエン酸を含んでもよい。いくつかの特定の実施形態では、リン脂質は、アジドへの曝露時に銅触媒付加環化を受けることができる1つまたは複数のアルキンで官能化または架橋されてもよい。

【0341】

【0205】いくつかの実施形態では、LNP組成物は、複数のリン脂質、例えば、少なくとも2、3、4、5またはそれ以上の異なるリン脂質を含む。いくつかの実施形態では、リン脂質は、粒子中に存在する総脂質の1mol%~20mol%を構成する。いくつかの実施形態では、リン脂質は、粒子中に存在する総脂質の約5mol%~約15mol%を構成する。いくつかの実施形態では、リン脂質は、粒子中に存在する総脂質の約8mol%~約12mol%を構成する。いくつかの実施形態では、リン脂質は、粒子中に存在する総脂質の約9mol%、10mol%または11mol%を構成する。

【0342】

コレステロール

【0206】いくつかの実施形態では、LNP組成物は、コレステロールまたはその誘導体

を含む。いくつかの実施形態では、LNP組成物は構造脂質を含む。この構造脂質は、ステロイド、ステロール、アルキルレゾレイノール、コレステロールまたはその誘導体、フェコステロール、シトステロール、エルゴステロール、カンペステロール、スチグマステロール、ブラシカステロール、トマチジン、トマチン、ウルソール酸、アルファートコフェロール、およびそれらの組合せから選択され得る。いくつかの実施形態では、構造脂質は、プレドニゾロン、デキサメタゾン、プレドニゾン、およびヒドロコルチゾンなどのコルチコステロイドである。いくつかの実施形態では、コレステロールまたはその誘導体は、コレステロール、5-ヘプタデシルレゾルシノール、またはコレステロールヘミスクシネートである。いくつかの実施形態では、コレステロールまたはその誘導体は、コレステロールである。

10

【0343】

【0207】いくつかの実施形態では、コレステロールまたはその誘導体は、コレステロール誘導体である。いくつかの実施形態では、コレステロール誘導体は、極性コレステロール類似体である。いくつかの実施形態では、極性コレステロール類似体は、5 α -コレスタノール、5 β -コプロスタノール、コレステリル-(2'-ヒドロキシ)-エチルエーテル、コレステリル-(4'-ヒドロキシ)-ブチルエーテル、または6-ケトコレスタノールである。いくつかの実施形態では、極性コレステロール類似体は、コレステリル-(4'-ヒドロキシ)-ブチルエーテルである。いくつかの実施形態では、コレステロール誘導体は、非極性コレステロール類似体である。いくつかの実施形態では、非極性コレステロール類似体は、5 α -コレスタン、コレステノン、5 α -コレスタノン、5 β -コレスタノン、またはデカン酸コレステリルである。

20

【0344】

【0208】いくつかの実施形態では、コレステロールまたはその誘導体は、粒子中に存在する総脂質の20mol%~50mol%を構成する。いくつかの実施形態では、コレステロールまたはその誘導体は、粒子中に存在する総脂質の約20mol%、約21mol%、約22mol%、約23mol%、約24mol%、約25mol%、約26mol%、約27mol%、約28mol%、約29mol%、約30mol%、約31mol%、約32mol%、約33mol%、約34mol%、約35mol%、約36mol%、約37mol%、約38mol%、約39mol%、約40mol%、約41mol%、約42mol%、約43mol%、約44mol%、約45mol%、約46mol%、約47mol%、約48mol%、または約50mol%を構成する。

30

【0345】

抗酸化剤

【0209】いくつかの実施形態では、本明細書に記載のLNPは、1つまたは複数の抗酸化剤を含む。いくつかの実施形態では、1つまたは複数の抗酸化剤は、カチオン性脂質、ペイロード、またはその両方の分解を減少させるように機能する。いくつかの実施形態では、1つまたは複数の抗酸化剤は、親水性抗酸化剤を含む。いくつかの実施形態では、1つまたは複数の抗酸化剤は、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)およびクエン酸塩などのキレート剤である。いくつかの実施形態では、1つまたは複数の抗酸化剤はEDTAである。いくつかの実施形態では、1つまたは複数の抗酸化剤は親油性抗酸化剤を含む。いくつかの実施形態では、親油性抗酸化剤は、ビタミンE異性体またはポリフェノールを含む。いくつかの実施形態では、1つまたは複数の抗酸化剤は、少なくとも1mM、少なくとも10mM、少なくとも20mM、少なくとも50mM、または少なくとも100mMの濃度でLNP組成物中に存在する。いくつかの実施形態では、1つまたは複数の酸化防止剤は、約20mMの濃度で粒子中に存在する。

40

【0346】

ペイロード

【0210】本明細書に記載のLNPは、治療剤または目的の標的などのペイロードを送達するように設計され得る。例示的な治療剤としては、限定するものではないが、抗体(例えば、モノクローナル、キメラ、ヒト化、ナノボディ、およびそれらのフラグメントなど

50

）、コレステロール、ホルモン、ペプチド、タンパク質、化学療法剤および他の種類の抗腫瘍剤、低分子量薬物、ビタミン、補因子、ヌクレオシド、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、酵素核酸、アンチセンス核酸、三重鎖形成オリゴヌクレオチド、アンチセンスDNAまたはRNA組成物、キメラDNA：RNA組成物、アロザイム、アプタマー、リボザイム、デコイおよびそれらの類似体、プラスミドおよび他の種類の発現ベクター、および低分子核酸分子、RNAi剤、短鎖干渉核酸（siRNA）、メッセンジャーリボ核酸（メッセンジャーRNA、mRNA）、短鎖干渉RNA（siRNA）、二本鎖RNA（dsRNA）、マイクロRNA（miRNA）、およびショートヘアピンRNA（shRNA）分子、ペプチド核酸（PNA）、ロックド核酸リボヌクレオチド（LNA）、モルホリノヌクレオチド、トレース核酸（TNA）、グリコール核酸（GNA）、siRNA（小型内部セグメント化干渉RNA）、aiRNA（非対称干渉RNA）、ならびに細胞培養、対象または生物体などにおいて、関連する細胞および／または組織に対するセンス鎖とアンチセンス鎖との間に1つ、2つ、またはそれ以上のミスマッチを有するsiRNAが挙げられる。治療剤は、精製されても、または部分的に精製されてもよく、天然に存在してももしくは合成されても、または化学修飾されてもよい。いくつかの実施形態では、治療剤は、RNAi剤、短鎖干渉核酸（siRNA）、短鎖干渉RNA（siRNA）、二本鎖RNA（dsRNA）、マイクロRNA（miRNA）、または短鎖ヘアピンRNA（shRNA）分子である。いくつかの実施形態では、治療剤はmRNAである。

【0347】

【0211】いくつかの実施形態では、ペイロードは、1つまたは複数の核酸（すなわち、1つまたは複数の核酸分子実体）を含む。いくつかの実施形態では、この核酸は一本鎖核酸である。いくつかの実施形態では、一本鎖核酸はDNAである。いくつかの実施形態では、一本鎖核酸はRNAである。いくつかの実施形態では、この核酸は二本鎖核酸である。いくつかの実施形態では、この二本鎖核酸はDNAである。いくつかの実施形態では、この二本鎖核酸はRNAである。いくつかの実施形態では、この二本鎖核酸はDNA-RNAハイブリッドである。いくつかの実施形態では、核酸は、メッセンジャーRNA（mRNA）、マイクロRNA、非対称干渉RNA（aiRNA）、小型ヘアピンRNA（shRNA）、またはダイサー基質dsRNAである。

【0348】

【0212】いくつかの実施形態では、ペイロードは、mRNAを含む。いくつかの実施形態では、ペイロードは、CasヌクレアーゼをコードするmRNA分子、すなわちCasヌクレアーゼmRNAを含む。いくつかの実施形態では、ペイロードは、1つまたは複数のガイドRNAまたはガイドRNAをコードする核酸を含む。いくつかの実施形態では、ペイロードは、修復または組換えのためのテンプレート核酸を含む。いくつかの実施形態では、ペイロードは、遺伝子編集因子ヌクレアーゼをコードするmRNAを含む。いくつかの実施形態では、ペイロードは、塩基編集因子ヌクレアーゼをコードするmRNAを含む。いくつかの実施形態では、ペイロードは、制限酵素をコードするmRNAを含む。いくつかの実施形態では、ペイロードはジンクフィンガーヌクレアーゼまたはTALENヌクレアーゼを含む。

【0349】

【0213】いくつかの実施形態では、CasヌクレアーゼmRNAなどのmRNAペイロードを、安定性および／または免疫原性特性の改善のために修飾してもよい。修飾は、mRNA内の1つまたは複数のヌクレオシドに対して行ってもよい。mRNA核酸塩基に対する化学修飾の例としては、シュドウリジン、1-メチルシュドウリジン、および5-メチルシチジンが挙げられる。安定性、発現、および免疫原性を改善するための追加の修飾も行ってもよい。CasヌクレアーゼをコードするmRNAは、真核細胞、哺乳動物細胞、またはより具体的にはヒト細胞などの特定の細胞型における発現のためにコドン最適化してもよい。いくつかの実施形態では、mRNAは、Casヌクレアーゼとして、ヒトコドン最適化Cas9ヌクレアーゼまたはヒトコドン最適化Cpfヌクレアーゼをコードする。いくつかの実施形態では、mRNAは、遺伝子編集因子（すなわち、ゲノム

編集因子)ヌクレアーゼをコードし、遺伝子編集因子mRNAと呼ばれる。いくつかの実施形態では、遺伝子編集因子は、本明細書に記載のタンパク質などのCasタンパク質である。いくつかの実施形態では、遺伝子編集因子は、操作されたヌクレアーゼである。いくつかの実施形態では、遺伝子編集因子は、目的の遺伝子に二本鎖切断を導入する。いくつかの実施形態では、遺伝子編集因子は、目的の遺伝子内の標的点到二本鎖切断を導入する。いくつかの実施形態では、遺伝子編集因子は、目的の遺伝子に一本鎖切断を導入する。いくつかの実施形態では、遺伝子編集因子は、塩基編集因子である。いくつかの実施形態では、遺伝子編集因子は、核酸配列を目的の遺伝子に挿入する。いくつかの実施形態では、遺伝子編集因子は、目的の遺伝子から標的配列を欠失させる。いくつかの実施形態では、遺伝子編集因子mRNAは、Cas9ヌクレアーゼをコードする。いくつかの実施形態では、遺伝子編集因子mRNAは、塩基編集因子ヌクレアーゼをコードする。いくつかの実施形態では、遺伝子編集因子mRNAは制限酵素をコードする。いくつかの実施形態では、遺伝子編集因子mRNAはジンクフィンガーヌクレアーゼをコードする。いくつかの実施形態では、遺伝子編集因子mRNAは、転写活性化因子様エフェクターベースのヌクレアーゼ(TALEN)をコードする。いくつかの実施形態では、遺伝子編集因子mRNAは、メガヌクレアーゼをコードする。いくつかの実施形態では、遺伝子編集因子mRNAは、アルゴノートタンパク質をコードする。いくつかの実施形態では、mRNAは精製される。いくつかの実施形態では、mRNAは、沈殿法(例えば、LiCl沈殿、アルコール沈殿、または同等の方法、例えば、本明細書に記載の方法)またはクロマトグラフィーに基づく方法(例えば、HPLCに基づく方法または同等の方法)を使用して精製される。

10

20

【0350】

【0214】いくつかの実施形態では、CasヌクレアーゼmRNAは、3'または5'非翻訳領域(UTR)を含む。いくつかの実施形態では、3'または5'UTRは、ヒト遺伝子配列に由来し得る。例示的な3'および5'UTRには、 α -および β -グロビン、アルブミン、HSD17B4、および真核伸長因子1aが含まれる。さらに、ウイルス由来の5'および3'UTRも使用してもよく、オルソボックスウイルスおよびサイトメガロウイルスのUTR配列が含まれる。特定の実施形態では、mRNAは、m7G(5')ppp(5')Nなどの5'キャップを含む。特定の実施形態において、このキャップは、ヌクレオチドNが2'OMeを含まないキャップ-0、またはヌクレオチドNが2'OMeを含むキャップ-1、またはヌクレオチドNおよびN+1が2'OMeを含むキャップ-2であってもよい。いくつかの実施形態では、5'キャップは、核輸出を調節し；エキソヌクレアーゼによる分解を防ぎ；翻訳を促進し；および5'近位イントロンの切除を促進し得る。さらに、キャップは、真核生物の翻訳開始因子4E、eIF4Eの結合エレメントとして機能する非核酸実体も含んでもよい。特定の実施形態では、mRNAはポリ(A)テールを含む。このテールは、約40~約300ヌクレオチド長であり得る。いくつかの実施形態では、このテールは、約40~約100ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、このテールは約100~約300ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、このテールは約100~約300ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、このテールは約50~約200ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、このテールは、約50~約250ヌクレオチド長である。特定の実施形態では、このテールは、約100、150、または200ヌクレオチド長である。ポリ(A)テールは、ホスホロチオエート結合および核酸塩基の修飾など、エキソヌクレアーゼの分解を防ぐための修飾も含んでもよい。いくつかの実施形態では、ポリ(A)テールは、修飾されたまたは非天然核酸塩基または他の合成部分を含んでもよい3'「キャップ」を含む。いくつかの実施形態では、mRNAは、RNAの細胞内半減期を改変し得る少なくとも1つのエレメントを含む。RNAの半減期は増減し得る。いくつかの実施形態では、このエレメントは、RNAの安定性を増加させるか、または減少させ得る。いくつかの実施形態では、このエレメントはRNA分解(decay)を促進し得る。いくつかの実施形態では、このエレメントは翻訳を活性化し得る。いくつかの実施形態では、このエレメントは、RNAの3'UT

30

40

50

R内であってもよい。例えば、このエレメントは、mRNA分解シグナルであってもよいし、またはポリアデニル化シグナル(PA)を含んでもよい。

【0351】

【0215】いくつかの実施形態では、CasヌクレアーゼmRNAは、CRISPR/Cas系からのCasタンパク質をコードする。いくつかの実施形態では、Casタンパク質は、ガイドRNA(「gRNA」)と相互作用する少なくとも1つのドメインを含む。いくつかの実施形態では、Casタンパク質は、ガイドRNAによって標的配列に導かれる。ガイドRNAは、標的配列への結合を指示し得るように、Casタンパク質および標的配列と相互作用し得る。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、標的切断に対する特異性を提供し、Casタンパク質は普遍的であり、異なるガイドRNAと対になって、異なる標的配列を切断し得る。特定の実施形態では、Casタンパク質は、一本鎖または二本鎖DNAを切断し得る。特定の実施形態では、Casタンパク質は、RNAを切断し得る。特定の実施形態では、Casタンパク質はRNAにニックを入れる場合がある。いくつかの実施形態では、Casタンパク質は、少なくとも1つのDNA結合ドメインおよび少なくとも1つのヌクレアーゼドメインを含む。いくつかの実施形態では、ヌクレアーゼドメインは、DNA結合ドメインに対して異種であってもよい。特定の実施形態において、Casタンパク質は、ヌクレアーゼ活性を低減または排除するために改変されてもよい。Casタンパク質は、DNA配列に結合し、その発現または活性を調節するために使用され得る。

【0352】

【0216】いくつかの実施形態では、CRISPR/Cas系は、リボ核酸タンパク質複合体を含む、クラス1またはクラス2の系の構成要素を含む。タンパク質のクラス2Casヌクレアーゼファミリーは、DNAエンドヌクレアーゼ活性を有する酵素であり、本明細書でさらに説明するように、適切なガイドRNAを設計することにより、所望の核酸標的を切断するように指示し得る。クラス2 CRISPR/Casシステム構成要素は、IIA型、IIB型、IIC型、V型、またはVI型システムに由来し得る。クラス2Casヌクレアーゼとしては、例えば、Cas9、Cpf1、C2c1、C2c2、およびC2c3タンパク質が挙げられる。いくつかの実施形態では、Casタンパク質は、II型CRISPR/Cas系由来、すなわち、CRISPR/Cas9系由来のCas9タンパク質、またはV型CRISPR/Cas系由来、例えば、Cpf1タンパク質である。いくつかの実施形態では、Casタンパク質は、クラス2 CRISPR/Cas系、すなわち、Cas9タンパク質またはCpf1タンパク質などの単一タンパク質Casヌクレアーゼに由来する。

【0353】

【0217】Cas9タンパク質または他の構成要素が由来し得る例示的な種としては、限定するものではないが、*Streptococcus pyogenes*、*Streptococcus thermophilus*、*Streptococcus sp.*、*Staphylococcus aureus*、*Listeria innocua*、*Lactobacillus gasserii*、*Francisella novicida*、*Wolinella succinogenes*、*Sutterella wadsworthensis*、*Gamma proteobacterium*、*Neisseria meningitidis*、*Campylobacter jejuni*、*Pasteurella multocida*、*Fibrobacter succinogenes*、*Rhodospirillum rubrum*、*Nocardiaopsis dassonvillei*、*Streptomyces pristinaespiralis*、*Streptomyces viridochromogenes*、*Streptomyces viridochromogenes*、*Streptosporangium roseum*、*Alicyclobacillus acidocaldarius*、*Bacillus pseudomycooides*、*Bacillus selenitireducens*、*Exiguobacterium sibiricum*、*Lacto*

bacillus delbrueckii, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus buchneri*, *Treponema denticola*, *Microscilla marina*, *Burkholderia*
les bacterium, *Polaromonas naphthalenivorans*, *Polaromonas* sp., *Crocospaera watsonii*, *Cyanothece* sp., *Microcystis aeruginosa*, *Synechococcus* sp., *Acetohalobium arabaticum*, *Ammonifex degensii*, *Caldicelulosiruptor beccarii*, *Candidatus Desulforudis*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium difficile*,
Finergoldia magna, *Natranaerobius thermophilus*, *Pelotomaculum thermopropionium*, *Acidithiobacillus caldus*, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Allochrochromatium vinosum*, *Marinobacter* sp., *Nitrosococcus halophilus*, *Nitrosococcus watsoni*, *Pseudoalteromonas haloplanktis*, *Ktedonobacter racemifer*, *Methanohalobium evestigatum*, *Anabaena variabilis*, *Nodularia spumigena*, *Nostoc* sp., *Arthrospira maxima*, *Arthrospira platensis*, *Arthrospira* sp., *Lyngbya* sp., *Microcoleus chthonoplastes*, *Oscillatoria* sp., *Petrogobacter mobilis*, *Thermosiphon africanus*, *Streptococcus pasteurianus*, *Neisseria cinerea*, *Campylobacter lari*, *Parvibaculum lavamentivorans*, *Corynebacterium diphtheriae*, および *Acaryochloris marina* が挙げられる。いくつかの実施形態では、Cas9 タンパク質は、*Streptococcus pyogenes* 由来である。いくつかの実施形態では、Cas9 タンパク質は、*Streptococcus thermophilus* 由来であってもよい。いくつかの実施形態では、Cas9 タンパク質は、*Staphylococcus aureus* 由来である。

【0354】

【0218】いくつかの実施形態では、ペイロードは、少なくとも1つのガイドRNAを含む。ガイドRNAは、クラス2 Casヌクレアーゼを、標的核酸分子上の標的配列に誘導し得、そこでガイドRNAがハイブリダイズして、Casヌクレアーゼは標的配列を切断または調節する。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、クラス2ヌクレアーゼと結合し、それによる切断の特異性を提供する。いくつかの実施形態では、ガイドRNAおよびCasタンパク質は、リボ核タンパク質(RNP)、例えば、CRISPR/Cas複合体を形成し得る。いくつかの実施形態では、CRISPR複合体は、II型CRISPR/Cas9複合体であり得る。いくつかの実施形態では、CRISPR/Cas複合体は、Cpf1/ガイドRNA複合体などのV型CRISPR/Cas複合体であり得る。いくつかの実施形態では、Casヌクレアーゼは、単一タンパク質Casヌクレアーゼ、例えば、Cas9タンパク質またはCpf1タンパク質であり得る。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、Cas9タンパク質による切断を標的とする。いくつかの実施形態では、ペイロードは、2つ以上のガイドRNA分子を含む。いくつかの実施形態では、2つ以上のガイドRNA分子は、同じ病原遺伝子を標的とする。いくつかの実施形態では、2つ以上のガイドRNA分子は、異なる遺伝子を標的とする。いくつかの実施形態では、2つのガイドRNA分子は、目的の2つの別個の病原遺伝子を標的とする。

【0355】

【0219】CRISPR/Cas9ヌクレアーゼ系のガイドRNAは、CRISPR R

NA (crRNA) および tracrRNA (tracr) を含む。いくつかの実施形態では、crRNA は、標的核酸分子上の標的配列に相補的で、かつハイブリダイズするターゲティング配列を含んでもよい。crRNA は、tracrRNA の一部に相補的でかつハイブリダイズするフラッグポール (flagpole) も含み得る。いくつかの実施形態では、crRNA は、細菌の CRISPR 遺伝子座から転写された天然に存在する crRNA の構造と平行し得、ターゲティング配列は CRISPR/Cas9 系のスペーサーとして作用し、フラッグポールは、CRISPR 遺伝子座のスペーサーに隣接する反復配列の一部に対応する。ガイドRNA は、crRNA のターゲティング配列を介して、目的の任意の配列を標的し得る。いくつかの実施形態では、ガイドRNA のターゲティング配列と標的核酸分子上の標的配列との間の相補性の程度は、少なくとも約 60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、または 100% である。いくつかの実施形態では、ガイドRNA のターゲティング配列および標的核酸分子上の標的配列は、100% 相補的であり得る。他の実施形態では、ガイドRNA のターゲティング配列および標的核酸分子上の標的配列は、少なくとも 1 つのミスマッチを含んでもよい。例えば、ガイドRNA のターゲティング配列および標的核酸分子上の標的配列は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または 10 個のミスマッチを含んでもよい。いくつかの実施形態では、ガイドRNA のターゲティング配列および標的核酸分子上の標的配列は、1~6 個のミスマッチを含んでもよい。

10

【0356】

【0220】いくつかの実施形態では、ターゲティング配列の長さは、使用される CRISPR/Cas 系および構成要素に依存する。例えば、異なる細菌種由来の異なる Cas タンパク質は、様々な最適なターゲティング配列の長さを有する。したがって、ターゲティング配列は、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、または 50 を超えるヌクレオチド長を含んでもよい。いくつかの実施形態では、ターゲティング配列は、18~24 ヌクレオチド長を含んでいた。いくつかの実施形態では、ターゲティング配列は、19~21 ヌクレオチド長を含む。いくつかの実施形態では、ターゲティング配列は、20 ヌクレオチド長を含む。

20

【0357】

【0221】いくつかの実施形態では、ガイドRNA は「デュアルガイドRNA」または「dgRNA」である。いくつかの実施形態では、dgRNA は、crRNA を含む第 1 の RNA 分子と、tracrRNA を含む第 2 の RNA 分子とを含む。第 1 および第 2 の RNA 分子は、crRNA 上のフラッグポールと tracrRNA との間の塩基対合を介して RNA 二重鎖を形成し得る。いくつかの実施形態では、ガイドRNA は「シングルガイドRNA」または「sgRNA」である。いくつかの実施形態では、sgRNA は、tracrRNA に共有結合された crRNA を含んでもよい。いくつかの実施形態では、crRNA および tracrRNA は、リンカーを介して共有結合され得る。いくつかの実施形態では、単一分子 (single-molecule) ガイドRNA は、crRNA 上のフラッグポールと tracrRNA との間の塩基対合を介してステムループ構造を含んでもよい。いくつかの実施形態では、sgRNA は、Cas9 タンパク質による RNA 誘導型 DNA 切断を媒介し得る「Cas9 sgRNA」である。特定の実施形態では、ガイドRNA は、Cas9 タンパク質との活性複合体を形成し、RNA 誘導型 DNA 切断を媒介するのに十分な crRNA および tracrRNA を含む。いくつかの実施形態では、ペイロードは、複数のガイドRNA を含む。CRISPR/Cas 系が複数の標的配列を切断するように、各ガイドRNA には異なる標的配列が含まれている。いくつかの実施形態では、1 つまたは複数のガイドRNA は、CRISPR/Cas 複合体内部での活性または安定性など、同じまたは異なる特性を有し得る。複数のガイドRNA を使用する場合、各ガイドRNA を同じ発現カセットまたは異なる発現カセットにコードしてもよい。2 つ以上のガイドRNA の発現を駆動するために使用されるプロモーターは、同じであっても異なってもよい。

30

40

50

【0358】

[0222]いくつかの実施形態では、RNAなどの核酸ペイロードが修飾される。修飾ヌクレオシドまたはヌクレオチドは、ガイドRNAに存在しても、またはmRNAに存在してもよい。1つまたは複数の修飾ヌクレオシドまたはヌクレオチドを含むmRNAをコードするガイドRNAまたはCasヌクレアーゼは、「修飾」RNAと呼ばれ、標準のA、G、C、およびU残基の代わりに、またはそれに加えて使用される、1つまたは複数の非天然および／または天然に存在する構成要素または構成の存在を表す。いくつかの実施形態では、修飾RNAは、非標準ヌクレオシドまたはヌクレオチドで合成される。修飾ヌクレオシドおよび修飾ヌクレオチドは、以下の1つまたは複数を含んでもよい：(i)リン酸ジエステル骨格結合中の非連結リン酸酸素の一方もしくは両方および／または連結リン酸酸素の1つもしくは複数の変更、例えば置き換え（例示的な骨格修飾）；(ii)リボース糖の構成要素、例えばリボース糖の2'ヒドロキシルの変更、例えば置き換え（例示的な糖修飾）；(iii)リン酸部分の「脱ホスホ」リンカーでの大規模に置き換え（例示的な骨格修飾）；(iv)非標準核酸塩基を含む、天然に存在する核酸塩基の修飾または置き換え（例示的な塩基修飾）；(v)リボースーリン酸骨格の置き換えまたは修飾（例示的な骨格修飾）；(vi)オリゴヌクレオチドの3'末端または5'末端の修飾、例えば、末端リン酸基の除去、修飾もしくは置き換え、または部分、キャップもしくはリンカーのコンジュゲーション（このような3'または5'キャップ修飾は、糖および／または骨格の修飾を含み得る）；ならびに(vii)糖の修飾または置き換え（例示的な糖修飾）。

10

20

【0359】

[0223]いくつかの実施形態では、ペイロードはテンプレート核酸を含んでもよい。テンプレートを使用して、Casヌクレアーゼの標的部位またはその近くで核酸配列を変更または挿入し得る。いくつかの実施形態では、テンプレートは相同組換えに使用される。いくつかの実施形態において、相同組換えは、テンプレート配列またはテンプレート配列の一部の標的核酸分子への組み込みをもたらし得る。いくつかの実施形態では、単一のテンプレートが提供される。他の実施形態では、相同組換えが2つ以上の標的部位で起こり得るように、2つ以上のテンプレートが提供される。

【0360】

[0224]いくつかの実施形態では、1つまたは複数のRNAなどのペイロードは、粒子の脂質部分内に完全にカプセル化され、それによりRNAをヌクレアーゼ分解から保護する。完全にカプセル化されているということは、遊離のDNAまたはRNAを有意に分解する血清またはヌクレアーゼアッセイへの曝露後に、核酸脂質粒子内のRNAが有意に分解されていないことを示し得る。いくつかの実施形態では、核酸-脂質粒子組成物は、粒子の脂質部分内に完全にカプセル化されるRNA分子を含み、その結果、その粒子のうち、約30%～約100%、約40%～約100%、約50%～約100%、約60%～約100%、約70%～約100%、約80%～約100%、約90%～約100%、約30%～約95%、約40%～約95%、約50%～約95%、約60%～約95%、約70%～約95%、約80%～約95%、約85%～約95%、約90%～約95%、約30%～約90%、約40%～約90%、約50%～約90%、約60%～約90%、約70%～約90%、約80%～約90%、または少なくとも約30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%（またはその任意の割合またはその中の範囲）が粒子の内にカプセル化されたRNAを有する。

30

40

【0361】

[0225]いくつかの実施形態では、ペイロードは、mRNAおよび1つまたは複数のガイドRNAを含む。いくつかの実施形態では、mRNAは、遺伝子編集因子ヌクレアーゼをコードし、遺伝子編集因子mRNAと呼ばれる。いくつかの実施形態では、遺伝子編集因子mRNAは、Cas9ヌクレアーゼをコードする。いくつかの実施形態では、mRNAは、塩基編集ヌクレアーゼをコードする。いくつかの実施形態では、遺伝子編集因子m

50

R N A は、ジンクフィンガーヌクレアーゼをコードする。いくつかの実施形態では、遺伝子編集因子 m R N A は、T A L E N ヌクレアーゼをコードする。

【0362】

界面活性剤および他の成分

[0226] 本明細書に記載されるナノ粒子は、1つまたは複数の界面活性剤を含むことができる。いくつかの実施形態では、1つまたは複数の界面活性剤は、1つまたは複数のアニオン性界面活性剤を含む。アニオン性界面活性剤の例としては、限定されないが、2-アクリルアミド-2-メチルプロパンスルホン酸、ラウリル硫酸アンモニウム、パーフルオロノナン酸アンモニウム、ドキュセート、ココアンホジ酢酸二ナトリウム、ラウレス硫酸マグネシウム、パーフルオロブタンスルホン酸、パーフルオロノナン酸、パーフルオロオクタンスルホン酸、パーフルオロオクタン酸、ラウリル硫酸カリウム、アルキル硫酸ナトリウム、ドデシル硫酸ナトリウム、ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム、ラウリン酸ナトリウム、ラウレス硫酸ナトリウム、ラウロイルサルコシン酸ナトリウム、ミレス硫酸ナトリウム、ノナノイルオキシベンゼンスルホン酸ナトリウム、パレス硫酸ナトリウム、ステアリン酸ナトリウム、およびスルホ脂質が挙げられる。いくつかの実施形態では、1つまたは複数の界面活性剤は、1つまたは複数のカチオン性界面活性剤を含む。例示的なカチオン性界面活性剤としては、限定されないが、塩化ベヘントリモニウム、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、臭化ベンゾドデシニウム、ブロニドックス、臭化カルベトペンデシニウム、塩化セタルコニウム、臭化セトリモニウム、塩化セトリモニウム、塩化セチルピリジニウム、塩化ジデシルジメチルアンモニウム、臭化ジメチルジオクタデシルアンモニウム、塩化ジメチルジオクタデシルアンモニウム、臭化ドミフェン、塩化ラウリルメチルグルセス-10ヒドロキシプロピルジモニウム、オクテニジン二塩酸塩、O l a f l u r、n-オレイル-1, 3-プロパンジアミン、パウトキシニ、塩化ステアラルコニウム、水酸化テトラメチルアンモニウム、および臭化トンゾニウムが挙げられる。いくつかの実施形態では、1つまたは複数の界面活性剤は、1つまたは複数の両性イオン界面活性剤を含む。例示的な両性イオン界面活性剤としては、限定されないが、コカミドプロピルベタイン、コカミドプロピルヒドロキシスルタイン、ジパルミトイルホスファチジルコリン、卵レシチン、ヒドロキシスルタイン、レシチン、ミリスタミンオキシド、ペプチテルゲンツ (p e p t i t e r g e n t s)、およびラウロアンホ酢酸ナトリウムが挙げられる。

【0363】

[0227] いくつかの実施形態では、1つまたは複数の界面活性剤は、1つまたは複数の非イオン性界面活性剤を含む。例示的な非イオン性界面活性剤としては、限定されないが、アルキルポリグリコシド、セトマクロゴール1000、セトステアリルアルコール、セチルアルコール、コカミド D E A、コカミド M E A、デシルグルコシド、デシルポリグルコース、グリセロールモノステアレート、イゲパール C A-630、イソセテス-20、ラウリルグルコシド、マルトシド、モノラウリン、マイコスブチリン、狭域エトキシレート、ノニデット (登録商標) p-40、ノノキシノール-9、ノノキシノール、n p-40、オクタエチレングリコールモノドデシルエーテル、n-オクチルベーター-d-チオグルコピラノシド、オクチルグルコシド、オレイルアルコール、ペグ-10ヒマワリグリセリド、ペンタエチレングリコールモノドデシルエーテル、ポリドカノール、ポロキサマー (例えば、ポロキサマー188およびdポロキサマー407)、ポリエトキシシル化タローアミン、ポリグリセロール、ポリリシノレート、ポリソルベート (例えば、ポリソルベート20、ポリソルベート40、ポリソルベート60、またはポリソルベート80)、ソルビタン、ソルビタンモノラウレート、ソルビタンモノステアレート、ソルビタントリスステアレート、ステアリルアルコール、サーファクチン、T r i t o n X100が挙げられる。

【0364】

[0228] いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるナノ粒子は、1つまたは複数の非イオン性界面活性剤を含む。いくつかの実施形態では、1つまたは複数の非イオン性

界面活性剤は、脂肪アルコール、脂肪酸、またはその両方を含む。いくつかの実施形態では、脂肪アルコールは、 $C_{12} \sim C_{24}$ 脂肪アルコールである。いくつかの実施形態では、脂肪アルコールは、ラウリルアルコール、トリデシルアルコール、ミリスチルアルコール、ペンタデシルアルコール、セチルアルコール、パルミトレイルアルコール、ヘプタデシルアルコール、ステアリルアルコール、オレイルアルコール、ノナデシルアルコール、アラキジルアルコール、またはこれらの組合せである。いくつかの実施形態では、 $C_{12} \sim C_{24}$ 脂肪酸アルコールは、オレイルアルコール、ステアリルアルコール、またはそれらの混合物である。いくつかの実施形態では、ナノ粒子はオレイルアルコールを含む。いくつかの実施形態では、ナノ粒子はステアリルアルコールを含む。

【0365】

[0229]いくつかの実施形態では、1つまたは複数の界面活性剤（脂肪アルコールなど）は、ナノ粒子組成物中に存在する総脂質含有量の約0.5mol%～約20mol%の量で、またはその間の任意の範囲で、本明細書に記載されるナノ粒子組成物中に存在する。いくつかの実施形態では、1つまたは複数の界面活性剤（脂肪アルコールなど）は、ナノ粒子組成物中に存在する総脂質含有量の約1mol%～約10mol%の量でナノ粒子組成物中に存在する。いくつかの実施形態では、1つまたは複数の界面活性剤（脂肪アルコールなど）は、ナノ粒子組成物中に存在する総脂質含有量の約3mol%～約8mol%の量でナノ粒子組成物中に存在する。いくつかの実施形態では、1つまたは複数の界面活性剤（脂肪アルコールなど）は、ナノ粒子組成物中に存在する総脂質含有量の約3mol%、約4mol%、約5mol%、約6mol%、約7mol%、約8mol%、約9mol%、または約10mol%でナノ粒子組成物中に存在する。いくつかの実施形態では、1つまたは複数の界面活性剤（脂肪アルコールなど）は、ナノ粒子組成物中に存在する総脂質含有量の約0.5mol%、1mol%、1.5mol%、2mol%、2.5mol%、3mol%、3.5mol%～約4mol%、4.5mol%、5mol%、5.5mol%、6mol%、7mol%、8mol%、9mol%、または10mol%の範囲でナノ粒子組成物中に存在する。いくつかの実施形態では、1つまたは複数の界面活性剤（脂肪アルコールなど）は、ナノ粒子組成物中に存在する総脂質含有量の約1mol%、2mol%、3mol%、4mol%、5mol%、6mol%、7mol%、約8mol%、9mol%、10mol%、11mol%、12mol%、13mol%、14mol%、15mol%、または20mol%の範囲でナノ粒子組成物中に存在する。

【0366】

[0230]本明細書に記載されるナノ粒子組成物は、1つまたは複数の透過性増強分子、炭水化物、ポリマー、または他の成分を含むことができる。透過性増強剤分子は、例えば、米国特許出願公開第2005/0222064号に記載される分子であり得る。炭水化物は、単糖（例えば、グルコース）および多糖（例えば、グリコーゲンおよびその誘導体および類似体）であり得る。

【0367】

[0231]いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるナノ粒子組成物は、ポリマーを含む。ポリマーは、生分解性および／または生体適合性であり得る。例示的なポリマーには、限定されないが、ポリアミン、ポリエーテル、ポリアミド、ポリエステル、ポリカルバメート、ポリウレア、ポリカーボネート、ポリスチレン、ポリイミド、ポリスルホン、ポリウレタン、ポリアセチレン、ポリエチレン、ポリエチレンイミン、ポリイソシアネート、ポリアクリレート、ポリメタクリレート、ポリアクリロニトリル、およびポリアリレートが挙げられる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるナノ粒子組成物は、ポリ（カプロラクトン）（PCL）、エチレン酢酸ビニルポリマー（EVA）、ポリ（乳酸）（PLA）、ポリ（L-乳酸）（PLLA）、ポリ（グリコール酸）（PGA）、ポリ（乳酸-co-グリコール酸）（PLGA）、ポリ（L-乳酸-co-グリコール酸）（PLPGA）、ポリ（D，L-ラクチド）（PDLA）、ポリ（L-ラクチド）（PLLA）、ポリ（D，L-ラクチド-co-カプロラクトン）、ポリ（D，L-ラクチド

ー c o o - カプロラクトン - c o o - グリコリド)、ポリ(D, L-ラクチド - c o o - P E O - c o o - D, L-ラクチド)、ポリ(D, L-ラクチド - c o o - P P O - c o o - D, L-ラクチド)、ポリアルキルシアノアクリレート、ポリウレタン、ポリ-L-リジン(P L L)、ヒドロキシプロピルメタクリレート(H P M A)、ポリエチレングリコール、ポリ-L-グルタミン酸、ポリ(ヒドロキシ酸)、ポリ無水物、ポリオルトエステル、ポリ(エステルアミド)、ポリアミド、ポリ(エステルエーテル)、ポリカーボネート、ポリアルキレン、例えば、ポリエチレンおよびポリプロピレン、ポリアルキレングリコール、例えば、ポリ(エチレングリコール)(P E G)、ポリアルキレンオキシド(P E O)、ポリアルキレンテレフタレート、例えば、ポリ(エチレンテレフタレート)、ポリビニルアルコール(P V A)、ポリビニルエーテル、ポリビニルエステル、例えば、ポリ(酢酸ビニル)、ポリビニルハロゲン化物、例えば、ポリ(塩化ビニル)(P V C)、ポリビニルピロリドン(P V P)、ポリシロキサン、ポリスチレン、ポリウレタン、誘導体化セルロース、例えば、アルキルセルロース、ヒドロキシアルキルセルロース、セルロースエーテル、セルロースエステル、ニトロセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、カルボキシメチルセルロース、アクリル酸のポリマー、例えば、ポリ(メチル(メタ)アクリレート)(P M M A)、ポリ(エチル(メタ)アクリレート)、ポリ(ブチル(メタ)アクリレート)、ポリ(イソブチル(メタ)アクリレート)、ポリ(ヘキシル(メタ)アクリレート)、ポリ(イソデシル(メタ)アクリレート)、ポリ(ラウリル(メタ)アクリレート)、ポリ(フェニル(メタ)アクリレート)、ポリ(メチルアクリレート)、ポリ(イソプロピルアクリレート)、ポリ(イソブチルアクリレート)、ポリ(オクタデシルアクリレート)ならびにそれらの共重合体および混合物、ポリジオキサノンおよびその共重合体、ポリヒドロキシアルカノエート、ポリプロピレンフマレート、ポリオキシメチレン、ポロキサマー、ポロキサミン、ポリ(オルト)エステル、ポリ(酪酸)、ポリ(吉草酸)、ポリ(ラクチド - c o o - カプロラクトン)、トリメチレンカーボネート、ポリ(N-アクリロイルモルホリン)(P A c M)、ポリ(2-メチル-2-オキサゾリン)(P M O X)、ポリ(2-エチル-2-オキサゾリン)(P E O Z)、ポリグリセロール、またはこれらの組合せを含む。

10

20

【0368】

核酸安定化剤

[0232]いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるナノ粒子組成物は、核酸ペイロード(例えば、核酸治療薬)を捕捉する脂質ナノ粒子を安定化する賦形剤を含む。例えば、核酸治療薬は、疾患を引き起こすタンパク質を調節するためのmRNA;目的とする治療遺伝子を編集するためのmRNAおよびガイドRNA;RNA編集核酸ペイロード;s iRNA;アンチセンスオリゴヌクレオチド、例えば、RNAse H媒介遺伝子サイレンシングを誘発するためのもの;マイクロRNAおよび抗マイクロRNA;RNA活性化因子;アプタマーなどであり得る。

30

【0369】

[0233]脂質ナノ粒子(LNP)は、核酸治療のための有効な非ウイルス送達システムを表す。LNP処理の有効性は、カプセル化RNAカーゴの安定性および機能性を含む多数の変数によって決定することができる。RNAカーゴが長期保存または凍結/解凍中にニッキング、分解、または構造変化を経験した場合、治療効力の部分的または完全な喪失が起こる可能性がある。このように、本明細書に開示されるナノ粒子組成物は、核酸ペイロードの送達において有利であり、少なくとも部分的には、例えば、核酸治療薬を含むナノ粒子組成物および/またはカプセル化組成物の増大した安定性に起因する。いくつかの実施形態では、増大した安定性は、貯蔵寿命を延長し、ナノ粒子を含む医薬組成物の凍結-解凍抵抗性を改善することができる。いくつかの実施形態では、増大した安定性は、核酸ペイロードを可溶化するために使用される緩衝液のタイプ、pH、浸透モル濃度、および対イオンの選択によって、少なくとも部分的に達成される。いくつかの実施形態では、増強された安定性は、核酸安定化剤の添加によって、少なくとも部分的に達成される。核酸安定化剤は、一般に安全であると認められている(GRAS)ものとして、FDAによ

40

50

って指定される賦形剤から選択することができる。したがって、一態様では、本開示は、LNPによるRNA安定性および送達を改善するための一般的に使用されるGRAS賦形剤の革新的な使用を記載する。

【0370】

【0234】本明細書に記載されるナノ粒子組成物は、核酸安定化剤を含むことができる。いくつかの実施形態では、核酸安定化剤は、ポリエチレングリコールである。いくつかの実施形態では、核酸安定化剤は、臭化セトリモニウムおよび塩化セトリモニウムなどのカチオン性界面活性剤である。いくつかの実施形態では、核酸安定化剤は、臭化セトリモニウム（すなわち、臭化セチルトリメチルアンモニウムまたはCTAB）である。いくつかの実施形態では、核酸安定化剤は、多糖またはオリゴ糖、例えば、低分子量キトサンである。例示的な低分子量キトサンは、50,000～190,000Da、または50,000Da未満の分子量を有することができる。いくつかの実施形態では、核酸安定化剤は、凍結保護剤である。例示的な凍結保護剤としては、限定されないが、ポリオール（例えば、ジオールまたはトリオール、例えばプロピレングリコール（すなわち、1,2-プロパンジオール）、1,3-プロパンジオール、グリセロール、2-メチル-2,4-ペンタンジオール、1,6-ヘキサジオール、1,2-ブタンジオール、2,3-ブタンジオール、エチレングリコール、またはジエチレングリコール）、非洗浄性スルホベタイン（例えば、NDSB-201（3-（1-ピリジノ）-1-プロパンスルホネート）、オスモライト（例えば、L-プロリンまたはトリメチルアミンN-オキシド二水和物）、水溶性ポリマー（例えば、ポリエチレングリコール、ポリエチレングリコールモノメチルエーテル（mPEG）、例えば、mPEG550、mPEG600、mPEG2000、mPEG3350、mPEG4000、およびmPEG5000、ポリビニルピロリドン、ペンタエリスリトールプロポキシレート、ポリエチレングリコールとポリプロピレングリコールのブロックポリマー）、有機溶媒（例えば、ジメチルスルホキシド（DMSO）またはエタノール）、糖（D-（+）-スクロース、D-ソルビトール、トレハロース、D-（+）-マルトース一水和物、メソ-エリスリトール、キシリトール、ミオイノシトール、D-（+）-ラフィノース五水和物、D-（+）-トレハロース二水和物、またはD-（+）-グルコース一水和物）、塩（例えば、酢酸リチウム、塩化リチウム、ギ酸リチウム、硝酸リチウム、硫酸リチウム、酢酸マグネシウム、塩化ナトリウム、ギ酸ナトリウム、マロン酸ナトリウム、硝酸ナトリウム、硫酸ナトリウム、またはそれらの任意の水和物）、またはこれらの任意の組合せが挙げられる。いくつかの実施形態では、ナノ粒子組成物は、2またはそれ以上の核酸安定化剤を含む。

【0371】

【0235】いくつかの実施形態では、核酸安定化剤は、ポリエチレングリコール（PEG）である。いくつかの実施形態では、ポリエチレングリコールは、PEG200、PEG400、PEG600、PEG1000、PEG3350、PEG4000、PEG8000、PEG10000、PEG20000またはこれらの組合せである。いくつかの実施形態では、ポリエチレングリコールは、PEG200、PEG400、PEG600またはこれらの組合せである。いくつかの実施形態では、ポリエチレングリコールは、約120～約5000Daの数平均分子量（Mn）、またはそれらの間の任意の数または範囲を有する。いくつかの実施形態では、ポリエチレングリコールは、約120～約200Da、約200～約800Da、約200～約600Da、約120～約1000Da、または約40～約1200DaのMnを有する。いくつかの実施形態では、ポリエチレングリコールは、約120、約160、または約200～約300、約400、約500、約600、約700、または約800Daの数平均分子量を有する。いくつかの実施形態では、核酸安定化剤はPEG400を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるナノ粒子組成物は、ポリエチレングリコール（例えば、PEG400）および核酸ペイロード（例えば、mRNA、ガイドRNA、および／またはsiRNA）を含む。

【0372】

【0236】一態様では、本明細書には、核酸安定化剤を含むナノ粒子組成物を作製する方

法が開示される。核酸安定化剤（例えば、ポリエチレングリコール）は、核酸ペイロードの添加の前、同時、または後にナノ粒子組成物中に添加することができる。いくつかの実施形態では、核酸安定化剤は、核酸と同時にナノ粒子組成物に添加される。いくつかの実施形態では、核酸安定化剤は、核酸ペイロードと予め混合される。いくつかの実施形態では、核酸安定化剤は、緩衝溶液中で核酸ペイロードと組み合わせられる。いくつかの実施形態では、核酸安定化剤（PEG 400 など）は、緩衝溶液中の核酸ペイロード（mRNA、ガイドRNA、および／または siRNA など）と組み合わせられる。いくつかの実施形態では、核酸安定化剤（例えば、PEG 400）は、緩衝溶液中で核酸ペイロードと混合される。いくつかの実施形態では、核酸安定化剤（例えば、PEG 400）は、核酸ペイロードを含む緩衝液中に添加される。いくつかの実施形態では、PEG-400 などの核酸安定化剤を、脂質混合前にRNAカーゴとともに原薬緩衝液に添加することにより、LNPのコアに取り込むことができ、1）RNAコアにクッションを提供することによって、2～8℃と凍結温度、例えば-20、-40および-80℃の両方での長期安定性を増加させ、2）RNAカプセル化（「捕捉」として当業者にも公知である）効率を改善し、および3）RNA効力を保存し、ニッキング／分解を防止するといういくつかの利点を付与することが期待される。いくつかの実施形態では、核酸安定化剤（例えば、PEG 400）は、脂質および核酸ペイロードの添加後にナノ粒子組成物に添加される。いくつかの実施形態では、核酸安定化剤（例えば、PEG 400）は、製剤化後および凍結前にナノ粒子組成物に添加される。いくつかの実施形態では、ナノ粒子組成物を作製する方法は、標的量の核酸安定化剤、例えば、PEG 400 を含有する薬物製造物または凍結緩衝溶液中にLNPを収集または緩衝液交換することを含む。いくつかの実施形態では、凍結緩衝溶液および原薬緩衝液中にPEG 400 などの核酸安定化剤を添加することは、RNAコアにクッションを提供することによって2～8℃と凍結温度、例えば、-20、-40および-80℃の両方で長期安定性を増加させ、RNA効力を保存し、ニッキング／分解を防止することができる。

10

20

30

40

50

【0373】

【0237】いくつかの実施形態では、核酸安定化剤（PEG 400 など）は、記載されるナノ粒子組成物中に全重量で約0.001%～約50%の量で存在する。いくつかの実施形態では、核酸安定化剤（PEG 400 など）は、ナノ粒子組成物中に全重量で約0.01%～約20%の量で存在する。いくつかの実施形態では、核酸安定化剤（PEG 400 など）は、ナノ粒子組成物中に全重量で約0.01%～約5%の量で存在する。いくつかの実施形態では、核酸安定化剤（PEG 400 など）は、ナノ粒子組成物中に全重量で最大約15%の量で存在する。いくつかの実施形態では、核酸安定化剤は、ナノ粒子組成物中に全重量で約0.01%、約0.05%、約0.1%、約0.15%または約0.2%～約0.3%、約0.4%、約0.5%、約0.6%、約0.7%、約0.8%、約0.9%、約1.0%または約2.0%で存在する。いくつかの実施形態では、核酸安定化剤は、ナノ粒子組成物中に全重量で約0.01%、0.25%、約0.5%、約0.75%、約1%、または約5%～約7.5%、約10%、約15%、または約20%の範囲内で存在する。いくつかの実施形態では、核酸安定化剤は、ナノ粒子組成物中に全重量で約0.01%～約0.5%、0.01%～約2%、0.01%～約3%、約0.2%～約0.8%、約0.4%～約0.6%、約0.6%～約0.8%、約0.5%～約1.0%、約0.5%～約2.0%、約1%～約2%、約1%～約5%、約5%～約10%、約10%～約15%、約15%～約20%、約2.5%～約7.5%、約7.5%～約12.5%、約12.5%～約17.5%、または約15%～約25%の量で存在する。いくつかの実施形態では、核酸安定化剤は、ナノ粒子組成物中に全重量で少なくとも0.1%、少なくとも0.2%、少なくとも0.25%、少なくとも0.5%、少なくとも0.75%、少なくとも1%、少なくとも2%、少なくとも5%、少なくとも10%、または少なくとも15%の量で存在する。いくつかの実施形態では、核酸安定化剤は、ナノ粒子組成物中に全重量で多くとも0.25%、多くとも0.5%、多くとも0.75%、多くとも1%、多くとも2%、多くとも5%、多くとも7.5%、多くとも10%、多くとも15%、

多くとも20%、多くとも25%、または多くとも30%の量で存在する。いくつかの実施形態では、核酸安定化剤は、ナノ粒子組成物中に全重量で約0.25%、約0.5%、約0.75%、約5%、約10%、または約15%の量で存在する。

【0374】

【0238】いくつかの実施形態では、核酸ペイロードの前にまたは核酸ペイロードと同時に混合される原薬緩衝液に核酸安定化剤（例えばPEG-400）を加えると、非RNA含有原薬緩衝液中のw/w%は、最終RNA含有原薬緩衝液中の標的w/w%より高くなり、その結果、RNAによる最終希釈は、核酸安定化剤%を標的w/w%に希釈する。いくつかの実施形態では、核酸安定化剤（例えば、PEG-400）は、原薬緩衝液中のその重量パーセントに比例する量で粒子のコア内にトラップされる。

10

【0375】

他の脂質

【0239】いくつかの実施形態では、開示されるLNP組成物はヘルパー脂質を含む。いくつかの実施形態では、開示されるLNP組成物は中性脂質を含む。いくつかの実施形態では、開示されるLNP組成物はステルス脂質を含む。いくつかの実施形態では、開示されるLNP組成物は、さらなる脂質を含む。

【0376】

【0240】本明細書で使用する場合、本開示の脂質組成物における使用に適した「中性脂質」には、例えば、種々の中性、非荷電または双性イオン性脂質が含まれる。本開示における使用に適した中性リン脂質の例は、限定されないが、5-ヘプタデシルベンゼン-1,3-ジオール（レゾルシノール）、ジパルミトイルホスファチジルコリン（DPPC）、ジステアロイルホスファチジルコリン（DSPC）、ホスホコリン（DOPC）、ジミリストイルホスファチジルコリン（DMPC）、ホスファチジルコリン（PLPC）、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン（DAPC）、ホスファチジルエタノールアミン（PE）、卵ホスファチジルコリン（EPC）、ジラウリロイルホスファチジルコリン（DLPC）、ジミリストイルホスファチジルコリン（DMPC）、1-ミリストイル-2-パルミトイルホスファチジルコリン（MPPC）、1-パルミトイル-2-ミリストイルホスファチジルコリン（PMP）、1-パルミトイル-2-ステアロイルホスファチジルコリン（PSPC）、1,2-ジアラキドイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン（DBPC）、1-ステアロイル-2-パルミトイルホスファチジルコリン（SPPC）、1,2-ジェイコセノイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン（DEPC）、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン（POPC）、リゾホスファチジルコリン、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン（DOPE）、ジリノレオイルホスファチジルコリン、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン（DSPE）、ジミリストイルホスファチジルエタノールアミン（DMPE）、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン（DPPE）、パルミトイルオレオイルホスファチジルエタノールアミン（POPE）、リゾホスファチジルエタノールアミン、およびこれらの組合せを含む。いくつかの実施形態では、中性リン脂質は、SPCおよびジミリストイルホスファチジルエタノールアミン（DMPE）からなる群より選択され得る。いくつかの実施形態では、中性リン脂質はDSPCである。中性脂質は、LNPのプロセッシングを安定化および改善するために機能することができる。

20

30

40

【0377】

【0241】「ヘルパー脂質」とは、トランスフェクションを増強する脂質（例えば、生物学的活性剤を含むナノ粒子のトランスフェクション）を指すことができる。ヘルパー脂質がトランスフェクションを増強するメカニズムには、粒子の安定性を増強することが含まれる。いくつかの実施形態では、ヘルパー脂質は、膜融合性を増強する。いくつかの実施形態では、ヘルパー脂質は、中性脂質である。

【0378】

【0242】「ステルス脂質」とは、ナノ粒子がインビボ（例えば、血液中）で存在し得る時間の長さを変化させる脂質を指すことができる。ステルス脂質は、例えば、粒子凝集を

50

減少させ、粒子サイズを制御することによって、製剤プロセスを支援し得る。本明細書で使用されるステルス脂質は、LNPの薬物動態学的特性を調節し得る。本開示の脂質組成物における使用に適したステルス脂質としては、脂質部分に結合した親水性頭部基を有するステルス脂質が含まれ得るが、これらに限定されない。本開示の脂質組成物に使用するのに適したステルス脂質およびこのような脂質の生化学に関する情報は、Romborgら、Pharmaceutical Research、Vol. 25、No. 1、2008年、pg. 55～71、およびHoekstraら、Biochimica et Biophysica Acta 1660巻（2004年）41～52頁に記載される。さらなる適切なPEG-脂質が、例えば、国際公開第2006/007712号に開示されている。

10

【0379】

【0243】いくつかの実施形態では、ステルス脂質はPEG-脂質である。一実施形態では、ステルス脂質の親水性頭部基は、PEG（ポリ（エチレンオキシド）と呼ばれることもある）、ポリ（オキサゾリン）、ポリ（ビニルアルコール）、ポリ（グリセロール）、ポリ（N-ビニルピロリドン）、ポリアミノ酸およびポリN-（2-ヒドロキシプロピル）メタクリルアミドに基づくポリマーから選択されるポリマー部分を含む。ステルス脂質は、脂質部分を含んでもよい。いくつかの実施形態では、ステルス脂質の脂質部分は、約C4～約C40の飽和または不飽和炭素原子を独立して含むアルキル鎖長を有するジアルキルグリセロールまたはジアルキルグリカミド基を含むものを含む、ジアシルグリセロールまたはジアシルグリカミドに由来し得、この鎖は、例えば、アミドまたはエステルなどの1つまたは複数の官能基を含んでもよい。ジアルキルグリセロールまたはジアルキルグリカミド基は、1つまたは複数の置換アルキル基をさらに含んでもよい。

20

【0380】

【0244】ヘルパー脂質、中性脂質、ステルス脂質、および／または他の脂質の構造および特性は、国際公開第2017173054A1号、国際公開第2019067999A1号、米国特許出願公開第20180290965A1号、米国特許出願公開第20180147298A1号、米国特許出願公開第20160375134A1号、米国特許第8236770号、米国特許第8021686号、米国特許第8236770B2号、米国特許第7371404B2号、米国特許第7780983B2号、米国特許第7858117B2号、米国特許出願公開第20180200186A1号、米国特許出願公開第20070087045A1、国際公開第2018119514A1号、および国際公開第2019067992A1においてさらに記載され、これらは全て参照により本明細書に組み込まれる。

30

【0381】

LNP製剤

【0245】本明細書に記載されるLNPは、1つまたは複数の特定の用途または標的のために設計することができる。ナノ粒子組成物のエレメントは、特定の用途もしくは標的に基づいて、ならびに／または有効性、毒性、費用、使用の容易さ、および利用可能性に基づいて選択することができる。同様に、ナノ粒子組成物の特定の製剤は、特定の用途または標的のために選択することができる。例示的なLNP製剤には、限定されないが、表4～6、8～15および17に記載される製剤を含む。例示的なLNP製剤はまた、式（I）、（I*）、（Ia）（Ib）、（II）、（II*）のアミノ脂質、ならびに式（III）および（III*）のPEG脂質を含む組成物を含む。

40

【0382】

【0246】記載されたLNP製剤は、1つまたは複数の特定の用途または標的に設計することができる。例えば、ナノ粒子組成物は、哺乳動物の体内の特定の細胞、組織、臓器、もしくは系またはそれらの群にRNAなどの治療剤を送達するように設計することができる。ナノ粒子組成物の物理化学的特性は、特定の身体標的に対する選択性を増加させるために変化させることができる。例えば、粒子サイズは、異なる臓器の開窓サイズに基づいて調整することができる。ナノ粒子組成物に含まれる治療剤はまた、所望の送達標的ま

50

たは複数の標的に基づいて選択され得る。例えば、治療剤は、特定の適応、状態、疾患、もしくは障害について、および／または特定の細胞、組織、臓器、もしくは系またはそれらの群に送達する（例えば、局所送達または特異的送達）ために選択され得る。特定の実施形態では、ナノ粒子組成物は、目的のポリペプチドを生成するために細胞内で翻訳され得る目的のポリペプチドをコードする mRNA を含み得る。このような組成物は、特定の臓器に特異的に送達されるように設計することができる。

【0383】

[0247] LNP 組成物中の治療剤の量は、ナノ粒子組成物のサイズ、組成、所望の標的および／もしくは適用、または他の特性に依存し得る。例えば、ナノ粒子組成物中に含まれる RNA の量は、RNA のサイズ、配列、および他の特徴に依存し得る。ナノ粒子組成物中の治療剤および他のエレメント（例えば、脂質）の相対量もまた変化し得る。いくつかの実施形態では、ナノ粒子組成物中の治療剤に対する脂質成分の wt / wt 比は、約 5 : 1 ~ 約 60 : 1、例えば、約 5 : 1、6 : 1、7 : 1、8 : 1、9 : 1、10 : 1、11 : 1、12 : 1、13 : 1、14 : 1、15 : 1、16 : 1、17 : 1、18 : 1、19 : 1、20 : 1、25 : 1、30 : 1、35 : 1、40 : 1、45 : 1、50 : 1、および 60 : 1 であり得る。例えば、治療剤に対する脂質成分の wt / wt 比は、約 10 : 1 ~ 約 40 : 1 であり得る。特定の実施形態では、wt / wt 比は約 20 : 1 である。ナノ粒子組成物中の治療剤の量は、吸収分光法（例えば、紫外可視分光法）を用いて測定することができる。

【0384】

[0248] いくつかの実施形態では、LNP 組成物は、RNA などの 1 つまたは複数の核酸を含む。いくつかの実施形態では、1 つまたは複数の RNA、脂質、およびそれらの量は、特定の N / P 比を提供するように選択され得る。N / P 比は、約 1 ~ 約 30 の範囲で選択することができる。N / P 比は、約 2 ~ 約 10 の範囲で選択することができる。いくつかの実施形態では、N / P 比は、約 0.1 ~ 約 50 である。いくつかの実施形態では、N / P 比は、約 2 ~ 約 8 である。いくつかの実施形態では、N / P 比は、約 2 ~ 約 15、約 2 ~ 約 10、約 2 ~ 約 8、約 2 ~ 約 6、約 3 ~ 約 15、約 3 ~ 約 10、約 3 ~ 約 8、約 3 ~ 約 6、約 4 ~ 約 15、約 4 ~ 約 10、約 4 ~ 約 8、または約 4 ~ 約 6 である。いくつかの実施形態では、N / P 比は、約 2 ~ 約 8 である。いくつかの実施形態では、N / P 比は、約 2、約 2.5、約 3、約 3.5、約 4、約 4.5、約 5、約 5.5、約 6、または約 6.5 である。いくつかの実施形態では、N / P 比は、約 4 ~ 約 6 である。いくつかの実施形態では、N / P 比は、約 4、約 4.5、約 5、約 5.5 または約 6 である。

【0385】

[0249] いくつかの実施形態では、LNP は、約 50 % ~ 約 70 %、約 70 % ~ 約 90 %、または約 90 % ~ 約 100 % の範囲の平均カプセル化効率で形成される。いくつかの実施形態では、LNP は、約 75 % ~ 約 95 % の範囲の平均カプセル化効率で形成される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるナノ粒子の核酸（例えば、RNA）捕捉効率は、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 % である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるナノ粒子の核酸捕捉効率は、約 80 % ~ 約 100 %、約 85 % ~ 約 100 %、約 90 % ~ 約 100 %、約 95 % ~ 約 100 %、約 90 % ~ 約 99 %、または約 95 % ~ 約 99 % である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるナノ粒子の核酸捕捉効率は、約 90 % ~ 約 99 % である。

【0386】

[0250] いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるナノ粒子は、約 10 nm ~ 約 500 nm のメディアン径を有する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるナノ粒子のメディアン径は、約 50 nm ~ 約 150 nm、約 60 nm ~ 約 140 nm、約 70 nm ~ 約 130 nm、約 80 nm ~ 約 120 nm、または約 90 nm ~ 約 110 nm である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるナノ粒子のメディアン径は、約 6

0 nm、約 65 nm、約 70 nm、約 75 nm、約 80 nm、約 85 nm、約 90 nm、約 95 nm、約 100 nm、約 105 nm、約 110 nm、約 115 nm、または約 120 nm である。ナノ粒子の粒子サイズおよび粒子サイズ分布は、例えば、Zetasizer Ultra ZSU 5700 (Malvern, USA) を用いた光散乱によって測定することができる。いくつかの実施形態では、粒子サイズ分布は、単峰性である。

【0387】

LNP 製剤の調製

【0251】一態様では、本開示に記載されるのは、LNP 組成物を作製するためのプロセスである。

【0388】

【0252】脂質ナノ粒子を作製するためのプロセスは、以下のいくつかの一般的なステップ：(i) 第 1 のリザーバーに 1 つまたは複数の核酸分子実体を含む、クエン酸塩またはリン酸塩緩衝液などの第 1 の溶液を用意するステップと；(ii) 1 つまたは複数の脂質およびアルコール（例えば、エタノール）などの有機溶媒を含む第 2 の溶液を第 2 のリザーバーに用意するステップと；(iii) 第 1 の溶液を第 2 の溶液と混合するステップとを含んでもよい。第 1 のリザーバーは、任意選択で、第 2 のリザーバーと流体連通している。

【0389】

【0253】いくつかの実施形態では、本明細書には、脂質ナノ粒子を含む製剤を調製する方法が開示され、ナノ粒子は、(i) 1 つまたは複数の核酸分子実体、(ii) アミノ脂質、および (iii) 構造脂質、中性脂質、および PEG-脂質から選択される 1 つまたは複数の脂質を含む。いくつかの実施形態では、本方法は、(a) アミノ脂質の第 1 の画分を、0.1 mol% ~ 99 mol% の総アミノ脂質を含む第 1 の溶液中の 1 つまたは複数の核酸分子実体と組み合わせること；(a) アミノ脂質の残りを、第 2 の溶液中の構造脂質、中性脂質、および PEG-脂質から選択される 1 つまたは複数の脂質と組み合わせること；(c) 第 1 の溶液と第 2 の溶液を混合し、それにより、脂質ナノ粒子を生成することを含む。いくつかの実施形態では、アミノ脂質の第 1 の画分は、1 つまたは複数の核酸分子実体において 0.1 ~ 99% のリン酸塩 (N:P に基づく)、またはそれらの間の任意の数もしくは範囲を中和するように構成される。いくつかの実施形態では、アミノ脂質の第 1 の画分は、1 つまたは複数の核酸分子実体において (N:P ベースで) リン酸の 0.5 ~ 90% を中和するように構成される。いくつかの実施形態では、アミノ脂質の第 1 の画分は、1 つまたは複数の核酸分子実体において約 5 ~ 90%、10 ~ 75%、25 ~ 50%、25 ~ 75%、50 ~ 75%、または 50 ~ 90% のリン酸 (N:P に基づく) を中和するように構成される。いくつかの実施形態では、アミノ脂質の第 1 の画分は、1 つまたは複数の核酸分子実体において約 10%、15%、25%、50%、または 75% のリン酸 (N:P に基づく) を中和するように構成される。いくつかの実施形態では、第 1 の溶液は、水性緩衝溶液、例えば、クエン酸緩衝液である。いくつかの実施形態では、第 1 の溶液は、核酸安定化剤、例えば、PEG 400 をさらに含む。いくつかの実施形態では、第 1 の溶液および第 2 の溶液は、インラインミキサーで混合される。

【0390】

【0254】このプロセスは、1 つまたは複数の希釈ステップ、1 つまたは複数のインキュベーションステップ、1 つまたは複数の緩衝液交換ステップ、1 つまたは複数の濃縮ステップ、および／または 1 つまたは複数の濾過ステップを任意選択で含んでもよい。いくつかの実施形態では、希釈ステップは、希釈緩衝液を添加するステップによる希釈を含む。いくつかの実施形態では、希釈ステップは、例えば、ポンピング装置（例えば、蠕動ポンプ）を使用して、水性緩衝液（例えば、クエン酸緩衝液または純水）での希釈を含む。いくつかの実施形態では、希釈緩衝液はアルコールなどの有機溶液である。希釈ステップは、初期容積の 1 ~ 20 倍、またはその間の任意の数もしくは範囲である希釈を含んでもよい。いくつかの実施形態では、希釈ステップは、初期容量の 1 ~ 10 倍の希釈を含む。いくつかの実施形態では、希釈ステップの後に、緩衝液交換ステップまたはインキュベシ

10

20

30

40

50

ョンステップが続く。

【0391】

【0255】インキュベーションステップは、混合ステップ由来の溶液を容器内でほぼ室温で、任意選択で光から保護して約0～約100時間静置させるステップを含む。いくつかの実施形態では、インキュベーションステップは、0～24時間、1分～2時間、または1分～60分にわたって実行される。いくつかの実施形態では、インキュベーションステップは、1分～120分まで実行される。いくつかの実施形態では、インキュベーションステップの後に緩衝液交換ステップが続く。いくつかの実施形態では、インキュベーションステップが緩衝液交換ステップに続く。

【0392】

【0256】いくつかの実施形態では、緩衝液交換ステップは、より高濃度のリン酸緩衝生理食塩水（PBS）緩衝液をもたらす溶媒交換を含む。いくつかの実施形態では、緩衝液交換ステップは、有機溶媒の全部または一部を除去するステップを含む。いくつかの実施形態では、緩衝液交換ステップは、適切な膜（例えば、10,000mw cの蛇皮膜）を通した透析を含む。いくつかの実施形態では、緩衝液交換ステップは、接線流濾過（TFF）などの濾過を含む。いくつかの実施形態では、緩衝液交換ステップは、例えばPD10カラムなどの脱塩カラムを使用するクロマトグラフィーを含む。いくつかの実施形態では、緩衝液交換ステップは限外濾過を含む。限外濾過は、希釈溶液の濃縮とそれに続くダイアフィルトレーションを含み、これには、例えば、適切な限外濾過膜（例えば、GE中空繊維カートリッジまたは同等物）と組み合わせて、適切なポンピングシステム（例えば、蠕動ポンプまたはその同等物などのポンピング装置）を使用する。

【0393】

【0257】いくつかの実施形態において、混合ステップは透明な単相を提供する。いくつかの実施形態では、混合ステップの後、有機溶媒を除去して粒子の懸濁液を提供し、ここでは1つまたは複数の核酸分子実体が脂質によってカプセル化される。有機溶媒の選択には、溶媒の極性と、粒子形成の後の段階で溶媒を容易に除去できることを考慮し得る。可溶化剤として役立ち得る有機溶媒は、1つまたは複数の核酸分子実体および脂質の透明な単相混合物を提供するのに十分な量であり得る。有機溶媒は、クロロホルム、ジクロロメタン、ジエチルエーテル、シクロヘキサン、シクロペンタン、ベンゼン、トルエン、メタノール、および他の脂肪族アルコール（例えば、C₁～C₈）、例えば、エタノール、プロパノール、イソプロパノール、ブタノール、tert-ブタノール、イソ-ブタノール、ペンタノール、およびヘキサノールのうち1つまたは複数（例えば、2つ）から選択され得る。有機溶媒を除去するために使用される方法は、減圧下でのダイアフィルトレーションもしくは透析もしくはエバポレーション、または混合物全体への不活性ガス流（例えば、窒素またはアルゴン）の吹き込みを含んでもよい。

【0394】

【0258】いくつかの実施形態では、方法は、本組成物を使用して細胞の形質転換を達成するのに有用な非脂質ポリカチオンを添加するステップをさらに含む。適切な非脂質ポリカチオンの例としては、限定するものではないが、ヘキサジメトリンブロマイド（Aldrich Chemical Co.、Milwaukee、Wis.、USAから商品名POLYBRENE（登録商標）で販売）またはヘキサジメトリンの他の塩が挙げられる。他の適切なポリカチオンとしては、例えば、ポリ-L-オルニチン、ポリ-L-アルギニン、ポリ-L-リジン、ポリ-D-リジン、ポリアリルアミンおよびポリエチレンジアミンの塩が挙げられる。特定の実施形態では、脂質ナノ粒子の形成は、単相系（例えば、ブライ・ダイア単相または水性溶媒と有機溶媒との同様の混合物）または適切に混合した二相系のいずれで行ってもよい。

【0395】

【0259】脂質ナノ粒子は、単相系で形成しても、または二相系で形成してもよい。いくつかの実施形態では、単相系において、アミノ脂質および1つまたは複数の核酸分子実体は、ある容積の単相混合物にそれぞれ溶解される。2つの溶液を組み合わせると、複合体

10

20

30

40

50

が形成される単一の混合物が得られる。いくつかの実施形態では、二相系において、アミノ脂質は、（水相に存在する）１つまたは複数の核酸分子実体に結合し、したがって有機相への溶解度を増加させる。

【０３９６】

【０２６０】いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子は、水溶液を保持するための第１のリザーバーおよび有機脂質溶液を保持するための第２のリザーバーを含む装置で調製される。いくつかの実施形態では、装置は、水溶液（１つまたは複数の核酸分子実体の一部など）および／または有機溶液を保持するための追加のリザーバーを備える。この装置は、水性および有機脂質溶液を混合領域または混合チャンバに実質的に等しい流速でポンピングするように構成されたポンプ機構を備えてもよい。いくつかの実施形態では、混合領域または混合チャンバは、Ｔカップリングまたはその等価物を備え、これによって、水性および有機流体の流れが、Ｔコネクタへの入力として結合し、得られた結合された水性および有機溶液がＴコネクタから出て、収集リザーバーまたはその等価物に入ることを可能にする。

10

【０３９７】

【０２６１】いくつかの実施形態では、第１の溶液は水性緩衝液を含む。いくつかの実施形態では、第１の溶液は、有機溶媒と混合された水性緩衝液の混合物を含む。いくつかの実施形態では、水性緩衝液中に存在する有機溶媒は、エタノールである。いくつかの実施形態では、第２の溶液は、有機溶媒と混合された水性緩衝液の混合物を含む。いくつかの実施形態では、第２の溶液はエタノールを含む。いくつかの実施形態では、第２の溶液はエタノールおよび水を含む。いくつかの実施形態では、水性緩衝液中のエタノールパーセントは、０．１％～５０％の範囲、またはそれらの間の任意の数もしくは範囲である。いくつかの実施形態では、希釈緩衝液は水性緩衝液を含む。いくつかの実施形態では、希釈緩衝液は有機溶媒を含む。いくつかの実施形態では、希釈緩衝液はエタノールおよび水を含む。いくつかの実施形態では、希釈緩衝液は、ＰＢＳ緩衝液中に１０％～２０％のエタノールを含む。

20

【０３９８】

【０２６２】いくつかの実施形態では、混合は、層流混合、ボルテックス混合、乱流混合、またはそれらの組合せを含む。いくつかの実施形態では、混合は交差混合を含む。いくつかの実施形態では、混合はインライン混合を含む。いくつかの実施形態では、混合は、第１の溶液の少なくとも一部を第１の入口チャンネルを通して導入し、第２の溶液の少なくとも一部を第２の入口チャンネルを通して導入するステップを含み、第１の入口チャンネルと第２の入口チャンネルとの間の角度は、約０～１８０度である。いくつかの実施形態では、第１の入口チャンネルと第２の入口チャンネルとの間の角度は、約１５～１８０度、約３０～１８０度、約４５～１８０度、約６０～１８０度、約９０～１８０度またはその間の任意の数値もしくは範囲である。いくつかの実施形態では、混合は、第３の入口チャンネルを通して第１の溶液の一部を導入するステップを含む。この混合ステップは、例えばボルテックスミキサーなどの機械的手段など、任意のいくつかの方法で行ってもよい。いくつかの実施形態では、混合ステップはインライン混合を含む。

30

【０３９９】

【０２６３】いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるナノ粒子を含む製剤を作製する方法は、濾過工程を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のナノ粒子を含む製剤を作製する方法は、緩衝液交換を含む。いくつかの実施形態では、緩衝液交換は、透析、クロマトグラフィー、または接線流濾過（ＴＦＦ）を含む。

40

【０４００】

ＩＩＩ．薬学的組成物

【０２６４】一態様では、本明細書に開示されるのは、１つまたは複数の記載された粒子組成物を含む薬学的組成物である。例えば、薬学的組成物は、１つまたは複数の異なるペイロードを含む１つまたは複数のＬＮＰ組成物を含んでもよい。薬学的組成物は、本明細書に記載のものなどの１つまたは複数の薬学的に許容される賦形剤、担体、または補助成分

50

をさらに含んでもよい。薬学的組成物および薬剤の製剤化および製造に関する一般的なガイドラインは、例えば、Remington's The Science and Practice of Pharmacy、第21版、A. R. Gennaro; Lippincott, Williams & Wilkins、Baltimore、Md.、2006から入手可能である。賦形剤または担体は、本開示の化合物、他の脂質成分およびペイロード以外の任意の成分を含んでもよい。賦形剤は、製剤に機能的（例えば、薬物放出速度制御）および／または非機能的（例えば、加工助剤または希釈剤）の特性のいずれかを付与し得る。賦形剤および担体の選択は、特定の投与様式、溶解性および安定性に対する賦形剤の効果、ならびに剤形の性質などの要因に依存し得る。非経口製剤は、典型的には、水性または油性の溶液または懸濁液である。糖（グルコース、マンニトール、ソルビトールなどを含むがこれらに限定されない）、塩、炭水化物、および緩衝剤（好ましくはpH 3～9まで）などの賦形剤または担体を使用してもよい。いくつかの実施形態では、LNP組成物は、無菌非水溶液と、または無菌パイロジェンフリー水（WFI）などの適切なビヒクルと組み合わせて使用される乾燥形態として製剤化されてもよい。

10

【0401】

[0265]いくつかの実施形態では、賦形剤または担体は、ナノ粒子組成物を含む薬学的組成物の総質量または容積の50%超を構成し得る。例えば、賦形剤または担体は、薬学的組成物の50%、60%、70%、80%、90%、またはそれ以上を構成し得る。いくつかの実施形態では、薬学的に許容される賦形剤または担体は、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%純粋である。いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、0.1%～100%（重量／重量）の間の1つまたは複数のナノ粒子組成物を含んでもよい。特定の実施形態では、このナノ粒子組成物および／または薬学的組成物は、保管および／または輸送のために冷蔵または冷凍される（例えば、約-150℃～約0℃、または約-80℃～約-20℃の温度など、4℃以下の温度で保管される）。いくつかの実施形態では、ナノ粒子組成物および／または薬学的組成物は、約-5℃、-10℃、-15℃、-20℃、-25℃、-30℃、-40℃、-50℃、-60℃、-70℃、-80℃、-90℃、-130℃、または-150℃で冷蔵または冷凍される。

20

【0402】

[0266]記載されたLNP組成物および／または薬学的組成物は、1つまたは複数の特定の細胞、組織、器官もしくは系またはそれらの群へのペイロードの送達によって提供される治療効果から利益を得る可能性のある患者または対象を含む、任意の患者または対象に投与され得る。いくつかの実施形態では、対象は、ヒトなどの哺乳動物である。いくつかの実施形態では、対象は、ウシ、ブタ、ウマ、ヒツジ、ネコ、イヌ、マウス、および／またはラットなどの商業的に関連する哺乳動物を含む、ヒト以外の霊長類または哺乳動物である。

30

【0403】

[0267]1つまたは複数のナノ粒子組成物を含む薬学的組成物は、薬理学の分野で公知であるか、または今後開発される任意の方法によって調製され得る。一般に、そのような調製方法としては、有効成分を賦形剤および／または1つまたは複数の他の補助成分と組み合わせ、その後、所望または必要に応じて、その生成物を所望の単一またはマルチ剤形に分割、成形、および／または包装するステップを含む。

40

【0404】

[0268]本開示による薬学的組成物は、単一単位用量として、および／または複数の単一単位用量として、バルクで調製、包装、および／または販売してもよい。本明細書で使用される場合、「単位用量」とは、所定量の有効成分（例えば、ナノ粒子組成物）を含む薬学的組成物の個別の量である。有効成分の量は、一般に、対象に投与される有効成分の投与量および／またはそのような投与量の都合のよい割合、例えば、そのような投与量の半分または3分の1に等しい。薬学的組成物は、様々な投与経路および方法に適した様々な形態で調製され得る。例えば、薬学的組成物は、液体剤形（例えば、エマルジョン、マ

50

イクロエマルジョン、ナノエマルジョン、溶液、懸濁液、シロップ、およびエリキシル)、注射可能な剤形、固体剤形(例えば、カプセル、錠剤、丸剤、散剤、および顆粒剤)、局所および/または経皮投与のための剤形(例えば、軟膏、ペースト、クリーム、ローション、ゲル、粉末、溶液、スプレー、吸入剤、およびパッチ)、懸濁液、粉末、および他の形態で調製され得る。

【0405】

[0269]いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10またはそれ以上のペイロードを含む。いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、ガイドRNAおよびmRNAなどの2つの別個のペイロードを含む。ガイドRNAおよびmRNAは、同じLNP組成物に配置されてもよく、別々のLNP組成物に配置されてもよい。例えば、薬学的組成物は、一方がガイドRNAペイロードを含み、他方がmRNAペイロードを含む、2つの別個のLNP組成物を含んでもよい。別の例では、薬学的組成物は、一方はガイドRNA(またはmRNA)ペイロードを含み、他方はmRNAペイロードおよびガイドRNAペイロードの両方を含む、2つの別個のLNP組成物を含んでもよい。さらに別の例では、薬学的組成物は、mRNAペイロードおよびガイドRNAペイロードを含む1つのLNP組成物を含んでもよい。いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、2つ以上の別個のLNP組成物を含む。いくつかの実施形態では、2つ以上の別個のLNP組成物は、mRNA分子およびガイドRNA分子が本明細書に記載のモルまたは重量比になるように薬学的組成物中に存在する。

【0406】

[0270]gRNAおよびmRNAペイロードは、様々なモル比または重量比で薬学的組成物中に存在し得る。例えば、薬学的組成物中のgRNAとmRNAの比は、重量で0.01~100、および/またはその間の任意の値であり得る。例えば、薬学的組成物中のgRNAとmRNAの比は、モルで0.01~100、および/またはその間の任意の値であり得る。いくつかの実施形態では、薬学的組成物中のgRNAとmRNAの比は、重量またはモルで約1~約50、および/またはその間の任意の値である。いくつかの実施形態では、薬学的組成物中のgRNAとmRNAの比は、重量またはモルで約0.1~約10、および/またはその間の任意の値である。いくつかの実施形態では、薬学的組成物中のgRNAとmRNAの比は、重量で約0.2~約5、約0.25~約4、約0.3~約3、または約0.5~約2である。いくつかの実施形態では、薬学的組成物中のgRNAとmRNAの比は、モルで約0.2~約5、約0.25~約4、約0.3~約3、または約0.5~約2である。いくつかの実施形態では、薬学的組成物中のgRNAとmRNAの比は、重量で約1:1、約1:2、約1:3、約1:4、約1:5、約1:6、約1:7、約1:8、約1:9、または約1:10である。いくつかの実施形態では、薬学的組成物中のgRNAとmRNAの比は、モルで、約1:1、約1:2、約1:3、約1:4、約1:5、約1:6、約1:7、約1:8、約1:9、または約1:10である。いくつかの実施形態では、薬学的組成物中のmRNAとgRNAの比は、重量で約1:1、約1:2、約1:3、約1:4、約1:5、約1:6、約1:7、約1:8、約1:9、または約1:10である。いくつかの実施形態では、薬学的組成物中のmRNAとgRNAの比は、モルで、約1:1、約1:2、約1:3、約1:4、約1:5、約1:6、約1:7、約1:8、約1:9、または約1:10である。いくつかの実施形態では、薬学的組成物中のgRNA対とmRNAの比は、重量で約1:1である。いくつかの実施形態では、薬学的組成物中のgRNAとmRNAの比は、モルで約1:1である。

【0407】

[0271]いくつかの実施形態では、薬学的組成物中のgRNAは、肝細胞で生じた病原遺伝子を標的とする。いくつかの実施形態では、開示される組成物の標的細胞は、肝細胞、上皮細胞、造血細胞、上皮細胞、内皮細胞、肺細胞、骨細胞、幹細胞、間葉細胞、神経細胞、心臓細胞、脂肪細胞、血管平滑筋細胞、心筋細胞、骨格筋細胞、ベータ細胞、下垂体細胞、滑膜上皮細胞、卵巣細胞、精巣細胞、線維芽細胞、B細胞、T細胞、細網細胞、白血球、顆粒球、および腫瘍細胞から選択される。いくつかの実施形態では、薬学的組成

物は、2つ以上のガイドRNAを含む。例えば、薬学的組成物は、2つ、3つ、4つ、5つ、またはそれ以上の別個のガイドRNAを含んでもよい。いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、2つのガイドRNA分子を含む。いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、1つのmRNAおよび2つ以上のガイドRNA分子を含む。いくつかの実施形態では、2つ以上のガイドRNA分子は、同じ病原遺伝子を標的とする。いくつかの実施形態では、2つ以上のガイドRNA分子は、異なる遺伝子を標的とする。いくつかの特定の実施形態では、2つ以上のガイドRNA分子は、肝細胞で生じた目的の2つの別個の病原遺伝子を標的とする。いくつかの実施形態では、gRNAはsgRNAである。いくつかの実施形態では、gRNAはdgRNAである。

【0408】

IV. 使用方法

【0272】本明細書に開示されるLNP組成物および薬学的組成物は、インビボおよびインビトロの両方で、遺伝子編集のための方法で使用され得る。いくつかの実施形態では、この方法は、細胞を本明細書に記載のLNP組成物または薬学的組成物と接触させるステップを含む。いくつかの実施形態では、細胞は哺乳動物細胞である。いくつかの実施形態では、細胞はげっ歯類細胞である。いくつかの実施形態では、細胞はヒト細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は肝臓細胞である。特定の実施形態では、細胞はヒト肝臓細胞である。いくつかの実施形態では、肝臓細胞は肝細胞である。いくつかの実施形態では、肝細胞はヒト肝細胞である。いくつかの実施形態では、肝臓細胞は幹細胞である。いくつかの実施形態では、ヒト肝臓細胞は肝臓洞内皮細胞（LSEC）である。いくつかの実施形態では、ヒト肝臓細胞はクッパー細胞である。いくつかの実施形態では、ヒト肝臓細胞は肝星細胞である。いくつかの実施形態では、ヒト肝臓細胞は腫瘍細胞である。いくつかの実施形態では、ヒト肝臓細胞は、肝幹細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、Apoe結合受容体を含む。いくつかの実施形態では、操作された細胞が提供され、例えば、操作された細胞は、本明細書に記載の細胞型のいずれか1つに由来し得る。このような操作された細胞は、本明細書に記載の方法に従って作製され得る。いくつかの実施形態では、操作された細胞は、組織または器官、例えば対象内の肝臓内に存在する。

【0409】

【0273】いくつかの実施形態では、細胞は、修飾、例えば、標的配列におけるヌクレオチドの挿入もしくは欠失（「インデル」）または置換を含む。いくつかの実施形態では、修飾は、標的配列中の1、2、3、4もしくは5つまたはそれ以上のヌクレオチドの挿入を含む。いくつかの実施形態では、修飾は、標的配列中の1または2つのいずれかのヌクレオチドの挿入を含む。他の実施形態では、修飾は、標的配列中の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20もしくは25個またはそれ以上のヌクレオチドの欠失を含む。いくつかの実施形態では、修飾は、標的配列中の1または2つのいずれかのヌクレオチドの欠失を含む。いくつかの実施形態では、修飾は、標的配列におけるフレームシフト突然変異をもたらすインデルを含む。いくつかの実施形態では、修飾は、標的配列中の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20もしくは25個またはそれ以上のヌクレオチドの置換を含む。いくつかの実施形態では、修飾は、標的配列中の1または2つのいずれかのヌクレオチドの置換を含む。いくつかの実施形態では、修飾は、鋳型核酸、例えば本明細書に記載されるいずれかの鋳型核酸の取込みから生じるヌクレオチドの挿入、欠失、または置換のうちの1つまたは複数を含む。

【0410】

【0274】いくつかの実施形態では、本方法は、操作された細胞集団などの細胞集団を接触させることを含む。いくつかの実施形態では、細胞集団は、インビトロで培養された操作された細胞を含む。いくつかの実施形態では、集団は、組織または臓器内、例えば、対象内の肝臓内に存在する。いくつかの実施形態では、集団内の細胞の少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくと

10

20

30

40

50

も75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%または少なくとも95%またはそれ以上が操作される。特定の実施形態では、本明細書に開示される方法は、インデルの検出によって定義される、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも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%または少なくとも95%の編集効率（または「編集パーセント」）をもたらす。他の実施形態において、本明細書に開示される方法は、挿入、欠失、置換または他のいずれかによる配列の変化を検出することによって定義される、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも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%、または少なくとも95%のDNA修飾効率をもたらす。特定の実施形態では、本明細書に開示される方法は、約5%～約100%、約10%～約50%、約20%～約100%、約20%～約80%、約40%～約100%、または約40%～約80%の編集効率レベルまたはDNA修飾効率レベルをもたらす。

10

【0411】

[0275]いくつかの実施形態では、集団内の細胞は、修飾を含む。いくつかの実施形態では、修飾は、標的配列中の1、2、3、4もしくは5個またはそれ以上のヌクレオチドの挿入を含む。いくつかの実施形態では、修飾は、標的配列中の1または2つのいずれかのヌクレオチドの挿入を含む。他の実施形態では、修飾は、標的配列中の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20もしくは25個またはそれ以上のヌクレオチドの欠失を含む。いくつかの実施形態では、修飾は、標的配列中の1または2つのヌクレオチドのいずれかの欠失を含む。いくつかの実施形態では、修飾は、標的配列におけるフレームシフト突然変異をもたらすインデルを含む。いくつかの実施形態では、集団中の操作された細胞の少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%もしくは少なくとも99%、またはそれ以上はフレームシフト突然変異を含む。

20

30

【0412】

[0276]いくつかの実施形態では、LNP組成物は、遺伝子ノックアウトをもたらす遺伝子を編集するために使用することができる。いくつかの実施形態では、LNP組成物は、遺伝子補正をもたらす遺伝子を編集するために使用することができる。いくつかの実施形態では、LNP組成物は、遺伝子挿入をもたらす細胞を編集するために使用することができる。いくつかの実施形態では、細胞中の標的遺伝子の発現をサイレンスする方法が開示される。いくつかの実施形態では、本方法は、発現された標的遺伝子を含む細胞を、gRNAが細胞に入り、細胞内で標的遺伝子の発現をサイレンスする条件下で、本明細書に記載されるLNP組成物または医薬組成物と接触させることを含む。特定の実施形態では、細胞は、ヒトなどの哺乳動物中にある。いくつかの実施形態では、標的遺伝子の発現をサイレンスする方法は、本明細書に記載される1つまたは複数のgRNAを含むLNP組成物または医薬組成物の治療上有効な量を哺乳動物に投与することを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される1つまたは複数のgRNAを含むLNP組成物または医薬組成物の投与は、gRNAの非存在下で検出されるRNAレベル（例えば、緩衝液対照または無関係なgRNA対照）に対して、標的RNAレベルを少なくとも約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、89%、90%、91%、93%、94%、95%、97%、98%、99%、または100%（またはその任意の範囲）減少させる。いくつかの実施形態では、1つまたは複数のgRNAを含むLNP組成物または医薬組成物の投与は、例えば、緩衝液対照または関連し

40

50

ない非標的 gRNA 対照などの陰性対照に対して、少なくとも約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95 または 100 日間（またはその中の任意の範囲）、標的 RNA レベルを減少させる。

【0413】

【0277】いくつかの実施形態では、LNP 組成物または医薬組成物の投与は、持続的応答をもたらす遺伝子編集をもたらすことができる。例えば、投与は、1 日、1 か月、1 年、またはそれ以上の応答の持続期間をもたらすことができる。本明細書で使用される場合、「応答の持続時間」とは、細胞が、本明細書に開示される LNP 組成物または医薬組成物を使用して編集された後も、得られた修飾は、投与後のある種の期間、依然として存在することを意味する。修飾は、標的タンパク質レベルを測定することによって検出することができる。修飾は、標的 DNA を検出することによって検出することができる。いくつかの実施形態では、応答の持続期間は、少なくとも 1 週間、少なくとも 2 週間、少なくとも 1 か月、少なくとも 2 か月、少なくとも 4 か月、少なくとも 6 か月、または少なくとも 1 年であり得る。特定の実施形態では、応答の持続期間は、約 26 週間であり得る。いくつかの実施形態では、応答の持続期間は、少なくとも 5 年または少なくとも 10 年であり得る。持続的応答は、標的タンパク質レベルを測定するかまたは標的 DNA を検出することによって、少なくとも 6 か月後に検出可能である。

【0414】

【0278】一態様では、対象において、免疫原に対する免疫応答を引き起こすことを含む、疾患または状態を治療するための方法が本明細書に開示される。一実施形態では、疾患または状態は、ペイロードを投与することによって治療可能である。いくつかの実施形態では、疾患または状態は、タンパク質またはポリペプチド活性の欠如または異常によって特徴付けられる。例えば、欠損または異常なポリペプチドをコードする mRNA を含む LNP 組成物を、細胞に投与または送達してもよい。その後の mRNA の翻訳は、ポリペプチドを生成し、それにより、ポリペプチドによって引き起こされる活性の欠如または異常によって引き起こされる問題を軽減または排除し得る。LNP 組成物に含まれるペイロードはまた、所与の種の転写速度を変更し得、それにより遺伝子発現に影響を与え得る。

【0415】

【0279】機能障害または異常なタンパク質またはポリペプチド活性によって特徴付けられる疾患および／または状態としては、限定するものではないが、希少疾患、感染症（ワクチンおよび治療の両方として）、がんおよび増殖性疾患、遺伝性疾患（例えば、嚢胞性線維症）、自己免疫疾患、糖尿病、神経変性疾患、心血管疾患、腎血管疾患、および代謝性疾患が挙げられる。複数の疾患および／または状態は、タンパク質活性の欠落（または適切なタンパク質機能が起こらないように実質的に低下）によって特徴付けられ得る。そのようなタンパク質は存在しない場合もあるし、または本質的に非機能的である場合もある。機能不全タンパク質の特定の例は、嚢胞性線維症膜コンダクタンス制御因子（CFTR）遺伝子のミスセンス変異バリエーションである。いくつかの実施形態では、本開示は、RNA ペイロードを含む LNP 組成物または薬学的組成物を投与することによって、対象におけるそのような疾患および／または状態を治療するための方法を提供し、ここで、この RNA は、対象の細胞に存在する異常なタンパク質活性に拮抗するか、そうでなければ克服するポリペプチドをコードする mRNA であってもよい。

【0416】

【0280】本発明およびその利点を詳細に説明したが、添付の特許請求の範囲において定義される本発明の精神および範囲から逸脱することなく、種々の変化、置換および変更を本明細書において行うことができることを理解されたい。

【0417】

【0281】本開示のさらなる実施形態、例えば、LNP 組成物（LNP 組成物の種々の成分を含む）、医薬組成物、組成物を調製する方法、遺伝子編集方法、処置方法、および組

成物を使用する他の方法は、種々の国際公開および米国特許／特許出願公開、例えば、米国特許第9868692B2号、米国特許出願公開第20180353434A1号、米国特許第8492359B2号、米国特許第9878042B2号、米国特許出願公開第20180148719号、米国特許第9687448B2号、米国特許第9415109B2号、米国特許第7858117B2号、米国特許第9404127B2号、米国特許第9504651号、米国特許出願公開第20070087045A1号、米国特許出願公開第20180092848A1号、米国特許出願公開第20170273907A1号、米国特許出願公開第20180147298A1号、国際公開第2019067992A1号、国際公開第2019067999A1号、国際公開第2018185241号、国際公開第2018170306A1号、国際公開第2019046809A1号、国際公開第2017173054A1号、国際公開第2015095340号、国際公開第2016197133A1号、および国際公開第2018191750号に見出すことができ、これらは全て、参照により本明細書に組み込まれる。LNP組成物、医薬組成物、および方法に関するさらなる説明は、国際公開第2016153012A1号、国際公開第2018062413A1号、国際公開第2019027055A1号、国際公開第2017／173054A1号、国際公開第2015／095340A1号、国際公開第2013063468A1号、国際公開第2010054401A1号、および国際公開第2018／170306号に記載され、これらは全て、参照により本明細書に組み込まれる。

10

20

【0418】

[0282]本発明は、以下の実施例においてさらに例示され、例示目的のためにのみ示されており、本発明をいかなる方法でも限定することを意図したものではない。

【実施例】

【0419】

[0283]実施例1．VL401およびVL469の合成：

[0284]

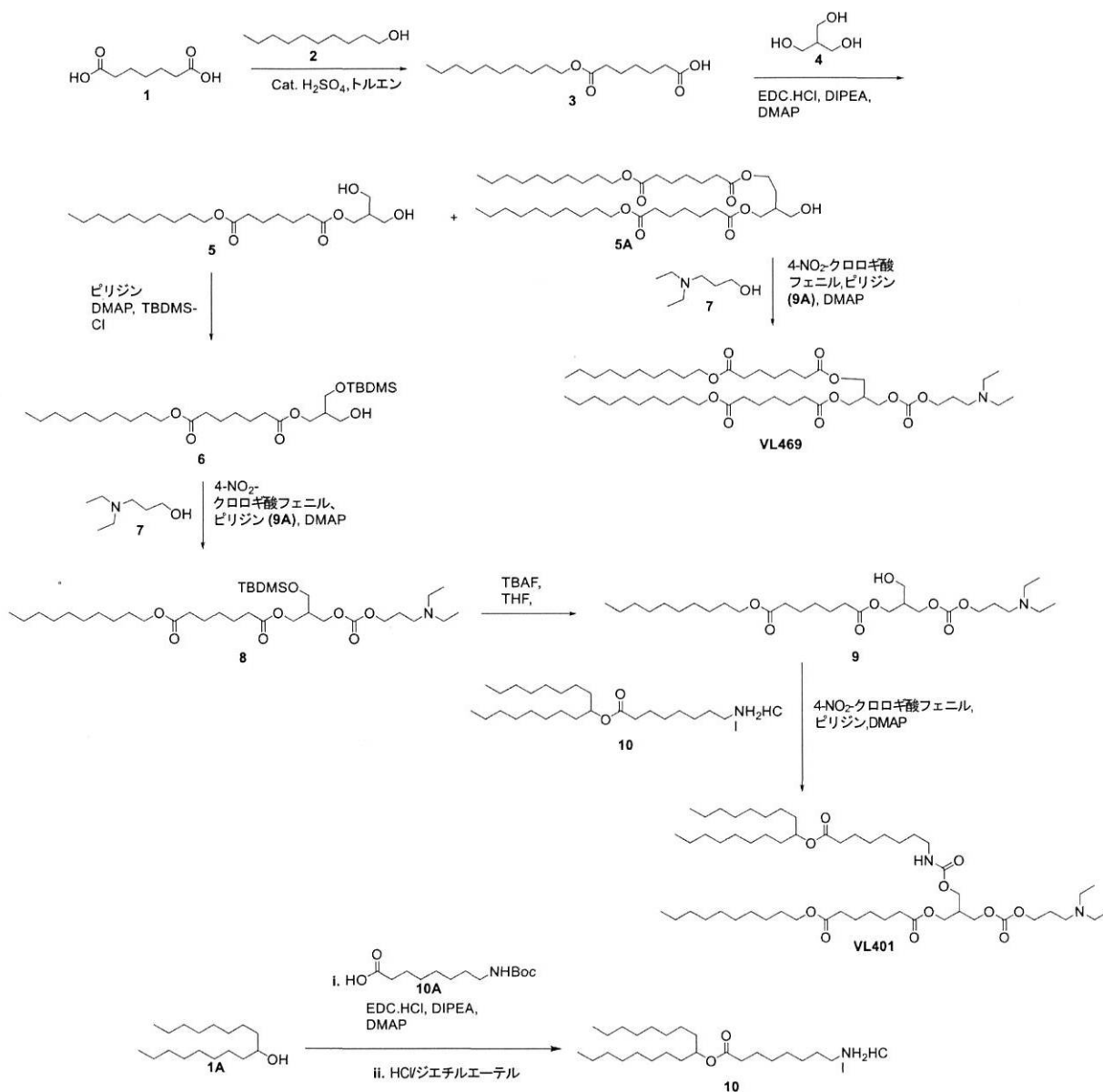
【0420】

30

40

50

スキーム1.



[0285] トルエン (90 mL) 中の化合物 1 (16.0 g、100 mmol) の溶液に、触媒量として化合物 2 (4 mL、100 mmol)、続いて H_2SO_4 (0.1 mL) を添加し、6 時間還流した。6 時間後、TLC は化合物 1 の完了を示し、反応混合物を Na_2CO_3 (100 mL) 溶液でクエンチし、生成物を EtOAc (3×200 mL) 中に抽出した。有機層を分離し、蒸発させて粗生成物を得た。次に、粗生成物塊を *pet* エーテル中の 20% EtOAc を用いて溶出するシリカゲル (60~120 メッシュ) カラムクロマトグラフィーにより精製して、白色固体として化合物 3 (8.0 g、27%) を得た。 ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ ppm 11.97 (s, 1H), 3.98 (t, J =6.4 Hz, 2H), 2.26 (t, J =7.6 Hz, 2H), 2.18 (t, J =7.6 Hz, 2H), 1.70-1.50 (m, 6H), 1.40-1.20 (m, 16H), 0.88 (t, J =6.4 Hz, 3H).

[0286] CH₂Cl₂ (60 mL) 中の化合物 3 (6.0 g、20 mmol) の溶液に 2-(ヒドロキシメチル)プロパン-1,3-ジオール (2.11 g、20 mmol)、続いて EDC・HCl (5.75 g、30 mmol)、DMAP (488 mg、4 mmol)

l) および DIPEA (4.83 mL、30 mmol) を添加した。反応混合物を室温 (RT) で 24 時間攪拌した。反応混合物を水で希釈し、生成物を DCM (2×200 mL) で抽出した。有機層を分離し、蒸発させて粗生成物を得た。次に、粗生成物塊を ペーエーテル中の 50% EtOAc を用いて溶出するシリカゲル (60~120 メッシュ) カラムクロマトグラフィーにより精製して、化合物 5 (3.5 g、45%) を得た。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ ppm 4.45 (t, J=5.2 Hz, 2H), 4.10-4.00 (m, 4H), 3.50-3.35 (m, 4H), 2.26 (m, t, J=7.2 Hz, 4H), 1.90-1.75 (m, 1H), 1.60-1.45 (m, 6H), 1.40-1.20 (m, 16H), 0.85 (t, J=6.4 Hz, 3H).

【0423】

[0287] ピリジン溶液 (10 mL) 中の化合物 5 (2.0 g、5.15 mmol)、DMAP (188 mg、1.54 mmol)、および TBDMSCl (850 mg、5.67 mmol) を RT で 3 時間攪拌した。反応混合物を水 (20 mL) で希釈し、生成物を DCM (2×100 mL) で抽出した。有機層を分離し、蒸発させて粗生成物を得た。次に、粗生成物塊を ペーエーテル中の 30% EtOAc を用いて溶出するシリカゲル (60~120 メッシュ) クロマトグラフィーにより精製して、無色油状物として化合物 6 (1.2 g、46%) を得た。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ ppm 4.51 (t, J=5.2 Hz, 1H), 4.10-3.90 (m, 4H), 3.65-3.50 (m, 2H), 3.45-3.30 (m, 2H), 2.35-2.20 (m, 4H), 1.90-1.80 (m, 1H), 1.60-1.45 (m, 6H), 1.30-1.10 (m, 16H), 0.90-0.75 (m, 12H), 0.10 (s, 6H).

【0424】

[0288] CH₂Cl₂ (13 mL) 中の化合物 7 (375 mg、3.10 mmol) の溶液に 4-ニトロフェニルクロロホルメート (965 mg、5.16 mmol)、次にピリジン (0.38 mL、5.16 mmol) および DMAP (87 mg、0.77 mmol) を添加し、反応を 2 時間継続した。6 (1.3 g、2.58 mmol) を添加し、反応混合物を 45℃ で 16 時間攪拌した。反応混合物を水 (50 mL) で希釈し、生成物を CH₂Cl₂ (2×50 mL) で抽出し、有機層を分離し、蒸発させて粗生成物塊を得た。粗生成物塊を 50% EtOAc / ペーエーテルを用いて溶出するシリカゲルカラムで精製して、8 (700 mg、43%) を黄色油状物で得た。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ ppm 4.20-3.98 (m, 8H), 3.61 (d, J=5.6 Hz, 2H), 2.50-2.35 (m, 6H), 2.35-2.10 (m, 6H), 1.80-1.70 (m, 2H), 1.60-1.45 (m, 6H), 1.60-1.45 (m, 5H), 1.40-1.20 (m, 16H), 1.00-0.89 (m, 14H), 0.10 (s, 6H).

【0425】

[0289] THF (4 mL) 中の 8 (700 mg、1.06 mmol) の攪拌溶液に、氷温で TBAF (0.46 mL、1.593 mmol) を添加し、反応混合物を RT で 4 時間攪拌した。反応混合物を水 (10 mL) で希釈し、生成物を CH₂Cl₂ (2×50 mL) で抽出し、有機層を分離し、蒸発させて粗生成物を得た。粗生成物質を ペーエーテル中の 50% EtOAc を用いて溶出するシリカゲルカラムにより精製して、無色のガム状液体として 9 (300 mg、52%) を得た。

【0426】

[0290] 化合物 VL401。CH₂Cl₂ (2 mL) 中の 9 (200 mg、0.366 mmol) の攪拌溶液に、4-ニトロフェニルクロロホルメート (965 mg、5.16 mmol)、続いてピリジン (0.38 mL、5.16 mmol) および DMAP (87 mg、0.77 mmol) を添加し、反応混合物を 2 時間攪拌し、化合物 10 (159 mg、0.402 mmol) を添加し、反応混合物を 90℃ で 16 時間攪拌した。反応混合物を水 (50 mL) で希釈し、生成物を CH₂Cl₂ (2×50 mL) を用いて抽出し、有機層を分離し、蒸発させて粗生成物を得た。粗生成物物質を CH₂Cl₂ 中の 6% MeOH を用いて溶出するシリカゲルカラムにより精製して、VL401 (80 mg、22%) をガム状液体として得た。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ ppm 7.20-7.10 (m, 1H), 4.85-4.75 (m, 1H), 4.30-4.00 (m, 10H), 3.60-3.30 (m, 5H), 3.00-2.90 (m, 2H), 2.40-2.20 (m, 10H), 1.80-0.80 (m, 75H). 質量 [M+H]⁺

、計算値 969.7；実測値 969.6。

【0427】

【0291】化合物 VL469。化合物 5A を、ピリジンおよび DMAP の存在下、ジクロロメタン中の 4-ニトロフェニル (nitrophenyl) クロロホルメートと反応させる。次に、このようにして形成された 4-ニトロフェニルカーボネートを化合物 7 と反応させて化合物 VL469 を得る。

【0428】

【0292】実施例 2. VL403 の合成

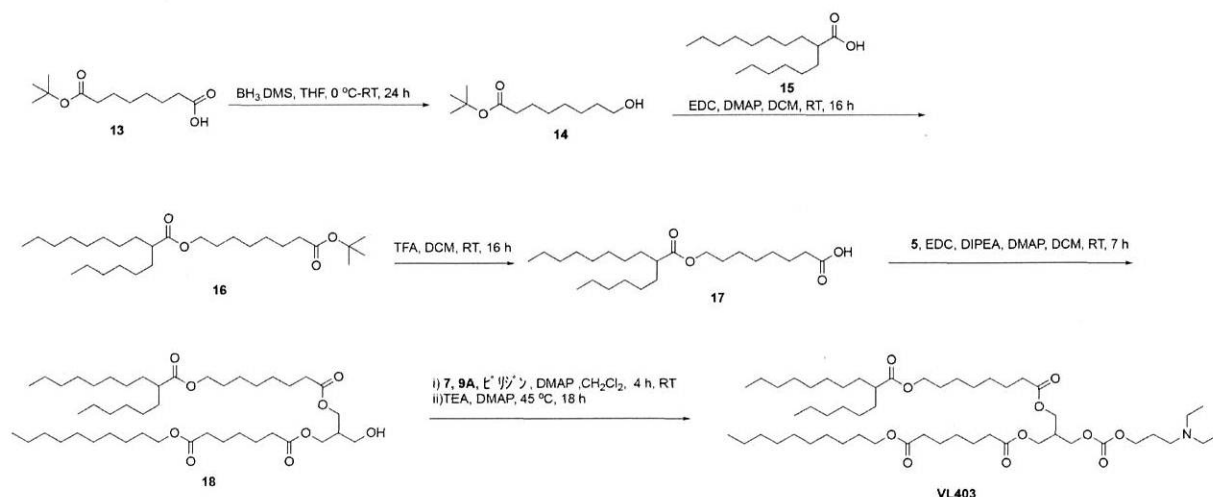
【0293】

【0429】

10

【化63】

スキーム2.



20

【0430】

【0294】THF (50 mL) 中の市販化合物 13 (11.5 g、50 mmol) の溶液に、0 °C で BH₃・DMS (THF 中 2 M、30 mL) を添加した。反応混合物を RT で 24 時間攪拌した。反応混合物を MeOH でクエンチし、有機層を減圧下で濃縮して化合物 14 (10 g、92.5%) を得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ ppm 3.63 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 2.20 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 1.70-1.50 (m, 4H), 1.44 (s, 9H), 1.40-1.30 (m, 7H).

30

【0431】

【0295】CH₂Cl₂ (70 mL) 中の化合物 14 (4.8 g、22.2 mmol) の攪拌溶液に、化合物 15 (6.3 g、24.4 mmol)、続いて EDC・HCl (5.5 g、28.8 mmol)、DMAP (1.4 g、11.1 mmol) を添加し、反応混合物を 16 時間攪拌した。反応混合物を水 (50 mL) で希釈し、生成物を CH₂Cl₂ (2 × 100 mL) で抽出し、有機層を分離し、蒸発させて粗生成物を得た。粗生成物を pet-エーテル中の 10% EtOAc を用いて溶出するシリカゲルカラムにより精製して、ゴム状液体として化合物 16 (5 g、50%) を得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ ppm 4.08 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 2.40-2.20 (m, 3H), 1.70-1.60 (m, 4H), 1.46 (s, 9H), 1.40-1.20 (m, 30H), 0.95-0.85 (m, 6H).

40

【0432】

【0296】化合物 17。CH₂Cl₂ (20 mL) 中の化合物 16 (1.9 g、4.18 mmol) の攪拌溶液に、0 °C で TFA (2 mL、12.5 mmol) を添加し、反応混合物を 16 時間攪拌した。反応混合物を減圧下で濃縮して、ゴム状液体として化合物 17 (1.8 g、99%) を得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ ppm 4.06 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 2.40-2.25 (m, 3H), 1.80-1.50 (m, 4H), 1.50-1.20 (m, 30H), 1.

50

0.0-0.85 (m, 6H).

【0433】

[0297] CH_2Cl_2 (20 mL) 中の化合物 17 (1.5 g、3.76 mmol) の攪拌溶液に、化合物 5 (2.1 g、5.65 mmol)、続いて EDC·HCl (1.1 g、5.65 mmol)、DIPEA (1 mL、5.65 mmol) および DMAP (138 mg、1.13 mmol) を添加し、反応混合物を 7 時間攪拌した。反応混合物を水 (50 mL) で希釈し、生成物を CH_2Cl_2 (2 × 25 mL) で抽出し、有機層を分離し、蒸発させて粗生成物を得た。粗生成物塊を *pet*-エーテル中の 20% EtOAc を用いて溶出するシリカゲルカラムにより精製して、黄色油状物として化合物 18 (0.6 g、21%) を得た。 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ ppm 4.25-4.10 (m, 4H), 4.10-4.00 (m, 4H), 3.70-3.60 (m, 2H), 2.60-2.50 (m, 7H), 2.40-2.30 (m, 7H), 1.80-1.50 (m, 10H), 1.50-1.20 (m, 41H), 0.95-0.85 (m, 9H).

10

【0434】

[0298] CH_2Cl_2 (6 mL) 中の化合物 7 (204 mg、1.56 mmol) の溶液に、4-ニトロフェニルクロロホルメート (470 mg、2.34 mmol)、続いてピリジン (0.1 mL、1.17 mmol) および DMAP (14 mg、0.11 mmol) を添加し、反応物を 4 時間攪拌し、化合物 18 (300 mg、0.39 mmol) を添加し、反応混合物を 45 °C で 18 時間攪拌した。反応混合物を水 (20 mL) で希釈し、生成物を CH_2Cl_2 (2 × 50 mL) で抽出し、有機層を分離し、蒸発させて粗生成物を得た。粗生成物塊を *pet*-エーテル中の 50% EtOAc を用いて溶出するシリカゲルカラムにより精製して、黄色油状物として VL403 (130 mg、35%) を得た。 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ ppm 4.25-4.10 (m, 8H), 4.10-4.00 (m, 4H), 2.60-2.50 (m, 7H), 2.40-2.25 (m, 7H), 1.85-1.75 (m, 2H), 1.70-1.60 (m, 10H), 1.50-1.20 (m, 46H), 1.10-0.95 (m, 6H), 0.95-0.85 (m, 9H). m/z: $[\text{M} + \text{H}]^+$ 、計算値 926.7; 実測値 926.6.

20

【0435】

[0299] 実施例 3. VL404 の合成

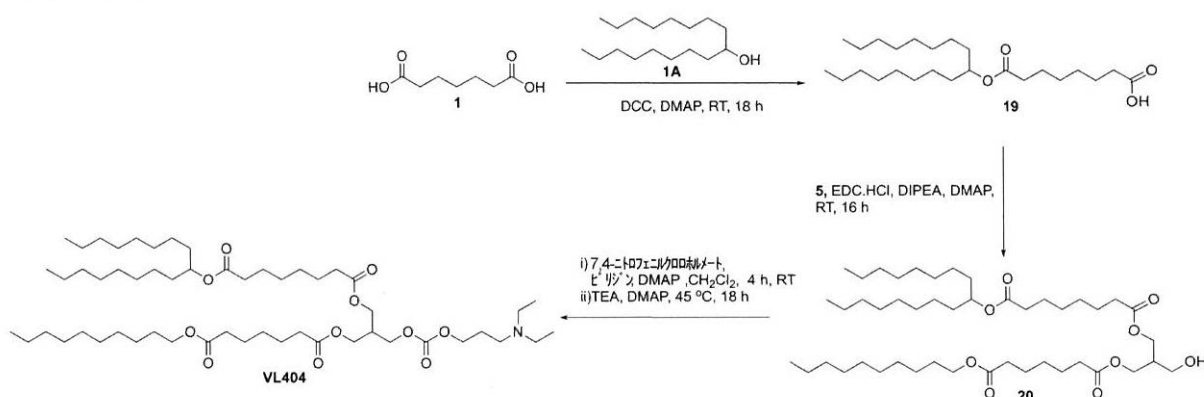
【0300】

【0436】

【化64】

30

スキーム3.



40

【0437】

[0301] CH_2Cl_2 (100 mL) 中の化合物 1 (9.6 g、54.68 mmol) の攪拌溶液に化合物 1A (10 g、39.06 mmol)、続いて DCC (8.85 g、42.96 mmol) および DMAP (2.38 g、19.52 mmol) を添加した。反応混合物を RT で 18 時間攪拌した。TLC により化合物 1 が完全に消失した後、反応混合物を水 (100 mL) で希釈し、生成物を CH_2Cl_2 (2 × 100 mL) に抽出した。有機層を分離し、真空中で蒸発させ、得られた粗生成物をシリカゲルカラムで精製し

50

、*p* e t -エーテル中の50% E t O A cで溶出して、ゴム状固体として化合物19 (6 g、26%)を得た。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ ppm 4.90-4.80 (m, 1 H), 2.35 (t, *J*=5.2 Hz, 2H), 2.26 (t, *J*=5.2 Hz, 2H), 1.80-1.20 (m, 36H), 0.95-0.85 (m, 6H).

【0438】

[0302] CH₂Cl₂ (20 mL) 中の化合物19 (4.99 g、9.99 mmol) の攪拌溶液に、化合物5 (2.0 g、6.666 mmol)、続いてEDC・HCl (1.916 g、9.99 mmol)、DIPEA (3.48 mL、19.99 mmol)、DMAP (244 mg、1.99 mmol) を添加し、反応混合物を16時間攪拌した。TLCにより化合物6が完全に消失した後、反応混合物を水 (50 mL) で希釈し、生成物をCH₂Cl₂ (2×50 mL) で抽出し、有機層を分離し、蒸発させて粗生成物を得た。粗生成物塊を*p* e t -エーテル中の50% E t O A cを用いて溶出するシリカゲルカラムにより精製して、ゴム状液体として化合物20 (2.1 g、52%)を得た。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ ppm 4.90-4.70 (m, 2H), 4.20-3.95 (m, 6H), 3.42 (t, *J*=5.6 Hz, 2H), 2.40-2.20 (m, 8H), 2.10-2.00 (m, 1H), 1.60-1.40 (m, 14H), 1.40-1.10 (m, 44H), 0.85 (t, *J*=6.4 Hz, 9H).

10

【0439】

[0303] 化合物VL404。CH₂Cl₂ (20 mL) 中の化合物7 (672 mg、5.12 mmol) の溶液に、4-ニトロフェニルクロロホルメート (1.53 g、7.62 mmol)、続いてピリジン (0.5 mL、6.38 mmol) およびDMAP (50 mg、0.384 mmol) を添加し、反応物を5時間攪拌した。5時間後、化合物20 (1.0 g、1.28 mmol) を添加し、反応混合物を45℃で18時間攪拌した。反応混合物を水 (20 mL) で希釈し、生成物をCH₂Cl₂ (2×50 mL) で抽出し、有機層を分離し、蒸発させて粗生成物を得た。粗生成物塊を*p* e t -エーテル中の50% E t O A cで溶出するシリカゲルカラムにより精製して、ゴム状液体としてVL404 (510 mg、42%)を得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ ppm 4.90-4.80 (m, 1H), 4.25-4.00 (m, 10H), 2.60-2.50 (m, 7H), 2.40-2.25 (m, 8H), 1.85-1.75 (m, 2H), 1.70-1.60 (m, 8H) (1.60-1.45 (m, 4H), 1.40-1.15 (m, 46H), 1.00 (t, *J*=6.8 Hz, 6H), 0.95-0.85 (m, 9H). E L S D - M S m/z、理論値 939.74 ; 実測値 940.6。

20

30

【0440】

[0304] 実施例4。VL406およびVL422の合成

[0305]

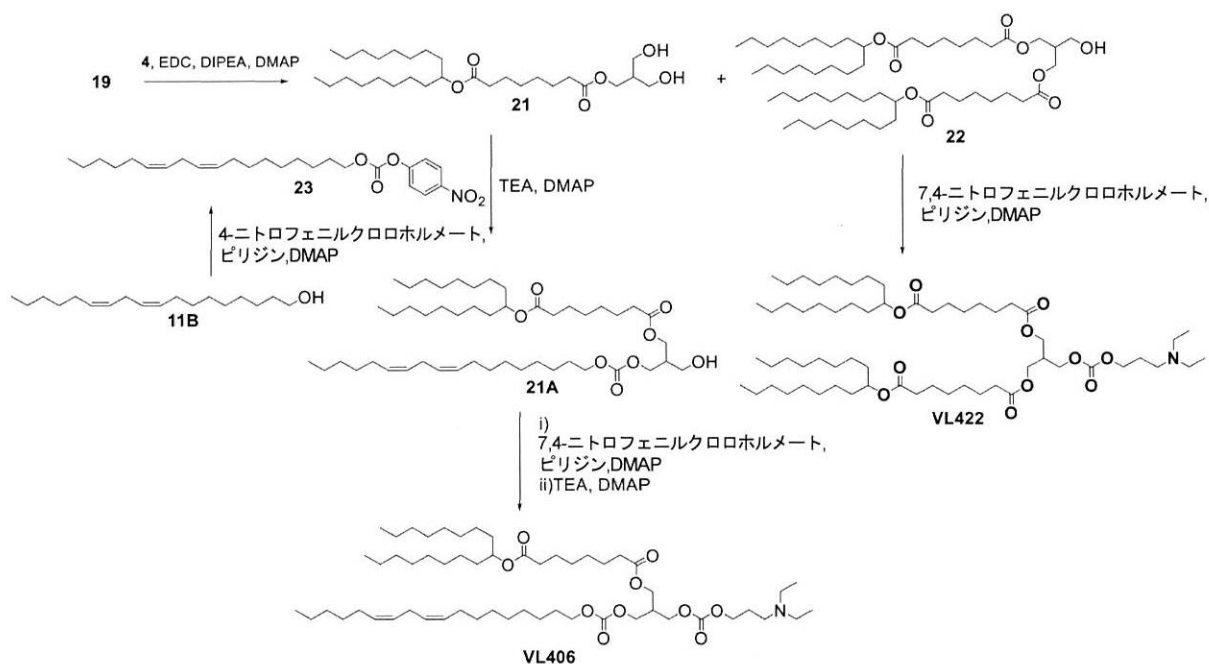
【0441】

40

50

【化 6 5】

スキーム4.



10

20

【0 4 4 2】

[0306] CH_2Cl_2 (50 mL) 中の化合物 11B (5 g、18.76 mmol) の溶液に、4-ニトロフェニルクロロホルメート (11.37 mg、56.29 mmol)、続いてピリジン (4.53 mL、56.29 mmol) および DMAP (687 mg、5.62 mmol) を添加し、反応物を 16 時間攪拌した。次に、反応混合物を濾過し、白色固体を廃棄した。濾液を蒸発させ、pet-エーテルで粉砕して、ゴム状液体として 23 (6 g、74%) を得た。 $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ ppm 8.27 (d, $J=7.2$ Hz, 2H), 7.37 (d, $J=7.2$ Hz, 2H), 5.50-5.30 (m, 4H), 4.28 (t, $J=6.4$ Hz, 2H), 2.77 (t, $J=6.4$ Hz, 2H), 2.10-2.00 (m, 4H), 1.85-1.70 (m, 2H), 1.50-1.20 (m, 18H), 0.89 (t, $J=7.2$ Hz, 3H).

30

【0 4 4 3】

[0307] CH_2Cl_2 (30 mL) 中の 19 (3.0 g、7.28 mmol) の溶液に、化合物 4 (772 mg、7.28 mmol)、続いて EDC·HCl (2.0 g、10.9 mmol)、DMAP (173 mg、1.45 mmol) および DIPEA (3.8 mL、21.8 mmol) を添加した。反応混合物を RT で 5 時間攪拌した。反応混合物を水で希釈し、生成物を CH_2Cl_2 (2×50 mL) で抽出した。有機層を分離し、蒸発させて粗生成物を得た。粗生成物塊を、pet-エーテル中の EtOAc で溶出するシリカゲル (60~120 メッシュ) カラムクロマトグラフィーで精製して、純粋な化合物 21 および 22 を得た。 $^1\text{H NMR}$ (21, 400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ ppm 4.90-4.80 (m, 1H), 4.46 (t, $J=5.2$ Hz, 2H), 4.00 (d, $J=6.4$ Hz, 2H), 3.50-3.30 (m, 4H), 2.30-2.20 (m, 4H), 1.90-1.80 (m, 1H), 1.60-1.40 (m, 8H), 1.40-1.20 (m, 29H), 0.85 (t, $J=6.4$ Hz, 6H). 22 の $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ ppm 4.90-4.80 (m, 2H), 4.20-4.10 (m, 4H), 3.70-3.60 (m, 2H), 2.50-2.20 (m, 10H), 1.80-1.20 (m, 70H), 1.10-1.00 (m, 2H), 1.00-0.90 (m, 12H).

40

【0 4 4 4】

[0308] 化合物 21A。 CH_2Cl_2 (10 mL) 中の化合物 21 (1.0 g、1.99 mmol) の溶液に、化合物 23 (517.4 mg、1.19 mmol)、続いて TEA (2.8 mL、19.98 mmol) および DMAP (244 mg、1.98 mmol) を添加し、反応混合物を RT で 18 時間攪拌した。完了後、反応混合物を水 (20 mL

50

）で希釈し、生成物を CH_2Cl_2 (2 × 50 mL) で抽出し、ブライン (20 mL) で洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥させた。粗生成物を、pet-エーテル中の 50% EtOAc で溶出するシリカカラムで精製して、ゴム状液体として 21A (220 mg、14%) を得た。

【0445】

[0309] CH_2Cl_2 (3 mL) 中の化合物 7 (99.15 mg、0.756 mmol) の溶液に、4-ニトロフェニルクロロホルメート (229 mg、1.13 mmol)、続いてピリジン (0.1 mL、1.13 mmol) および DMAP (7 mg、0.05 mmol) を添加し、反応物を 4 時間撹拌した。21A を添加し (150 mg、0.18 mmol)、反応混合物を 45 °C で 18 時間撹拌した。反応混合物を水 (10 mL) で希釈し、生成物を CH_2Cl_2 (2 × 50 mL) で抽出し、有機層を分離し、蒸発させて粗生成物塊を得た。粗生成物塊を pet-エーテル中の 50% EtOAc で溶出するシリカゲルカラムにより精製して、ゴム状液体として VL406 (122 mg、68%) を得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ ppm 5.45-5.30 (m, 4H), 4.90-4.80 (m, 1H), 4.25-4.10 (m, 10H), 2.77 (t, J=6.4 Hz, 2H), 2.60-2.40 (m, 6H), 2.35-2.25 (m, 4H), 2.10-2.00 (m, 4H), 1.90-1.80 (m, 2H), 1.70-1.40 (m, 8H), 1.40-1.20 (m, 47H), 1.01 (t, J=7.2 Hz, 6H), 0.95-0.80 (m, 9H). m/z: [M+H]⁺、理論値 950.7; 実測値 950.6。

10

【0446】

[0310] CH_2Cl_2 (20 mL) 中の化合物 7 (1.7 g、13.2 mmol) の溶液に、4-ニトロフェニルクロロホルメート (898 mg、4.46 mmol)、続いてピリジン (0.4 mL、2.23 mmol) および DMAP (54 mg、0.44 mmol) を添加し、反応物を 30 分間撹拌した。22 (2.0 g、2.2 mmol) を添加し、反応混合物を室温で 16 時間撹拌した。反応混合物を水 (10 mL) で希釈し、 CH_2Cl_2 (2 × 50 mL) で抽出し、次に有機層を分離し、蒸発させて粗生成物塊とした。粗生成物塊を pet-エーテル中の 50% EtOAc で溶出するシリカゲルカラムにより精製して、ゴム状液体として VL422 (770 mg、33%) を得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ ppm 4.90-4.80 (m, 2H), 4.20-4.10 (m, 8H), 2.60-2.50 (m, 5H), 2.50-2.40 (m, 1H), 2.35-2.25 (m, 8H), 1.90-1.75 (m, 2H), 1.70-1.55 (m, 8H), 1.55-1.45 (m, 8H), 1.40-1.20 (m, 58H), 1.01 (t, J=7.2 Hz, 6H), 0.87 (t, J=7.2 Hz, 12H). 質量: [M+H]⁺、理論値 1052.8; 実測値 1052.6。

20

30

【0447】

[0311] 実施例 5. VL447、VL448、VL449 および VL451 の合成

[0312]

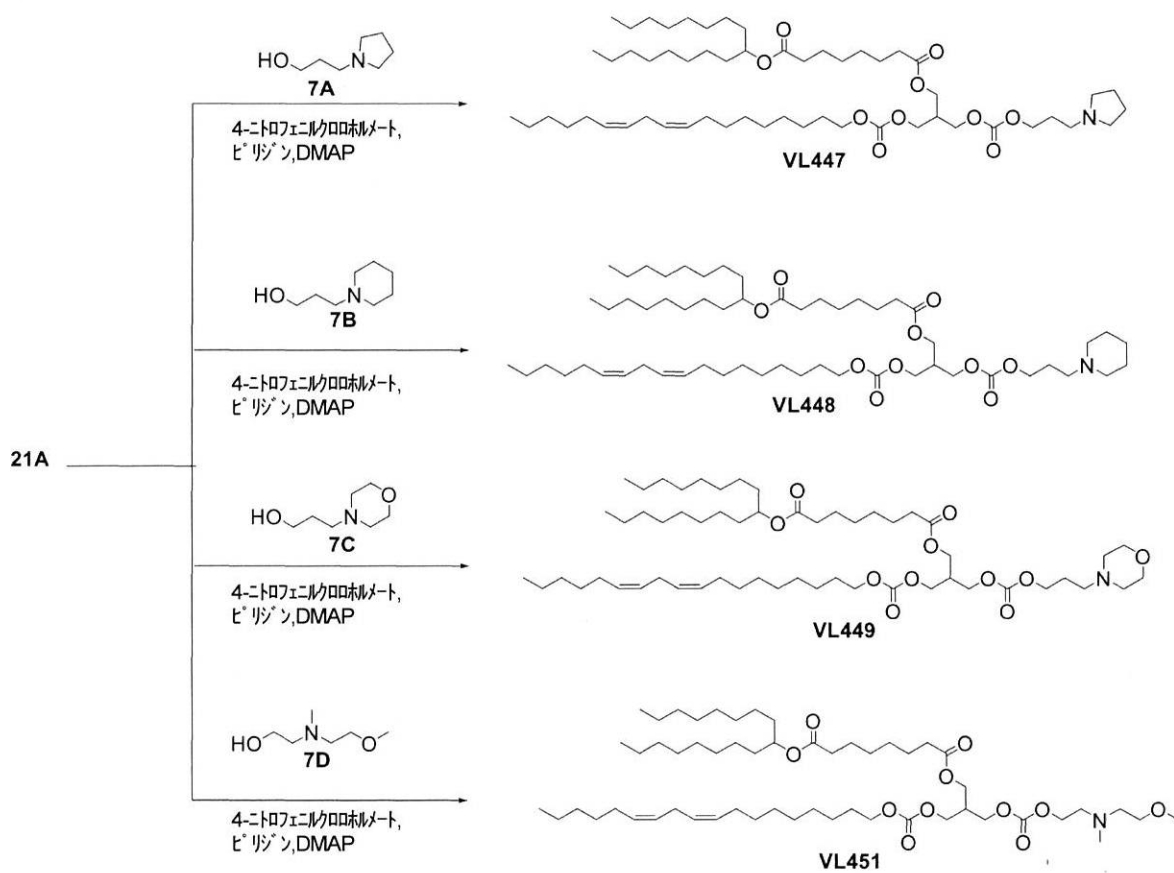
【0448】

40

50

【化 6 6】

スキーム5.



10

20

30

40

50

【0449】

[0313] CH₂Cl₂ (6 mL) 中の化合物 7A (195.2 mg、1.512 mmol) の溶液に、4-ニトロフェニルクロロホルメート (458 mg、2.268 mmol)、続いてピリジン (0.18 mL、2.268 mmol) および DMAP (14 mg、0.1134 mmol) を添加し、反応物を 4 時間攪拌した。化合物 21A (300 mg、0.378 mmol)、次に TEA (0.51 mg、3.78 mmol) および DMAP (13.91 mg、0.1134 mmol)；反応混合物を 45℃で 18 時間攪拌した。反応混合物を水 (10 mL) で希釈し、生成物を CH₂Cl₂ (2×50 mL) で抽出し、有機層を分離し、蒸発させて粗生成物塊とした。粗生成物塊を *pet*-エーテル中の 50% EtOAc で溶出するシリカゲルカラムにより精製して、VL447 (41 mg、11%) をゴム状液体として得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ ppm 5.45-5.30 (m, 4H), 4.90-4.80 (m, 1H), 4.30-4.10 (m, 10H), 2.77 (t, J=6.4 Hz, 2H), 2.60-2.40 (m, 7H), 2.40-2.25 (m, 4H), 2.10-2.00 (m, 4H), 1.95-1.85 (m, 2H), 1.80-1.70 (m, 4H), 1.70-1.40 (m, 8H), 1.40-1.20 (m, 46H), 0.95-0.85 (m, 9H). [M+H]⁺、理論値 948.74；実測値 948.78。

【0450】

[0314] VL447 と同じ手順を用いて、ゴム状液体として化合物 VL448 (102 mg、56%) を得た。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ ppm 5.40-5.30 (m, 4H), 4.85-4.75 (m, 1H), 4.20-4.00 (m, 10H), 2.80-2.70 (m, 2H), 2.40-2.20 (m, 11H), 2.10-1.95 (m, 4H), 1.80-1.70 (m, 2H), 1.65-1.40 (m, 14H), 1.40-1.10 (m, 46H), 0.90-0.80 (m, 9H). m/z: [M+H]⁺、理論値 962.76；実測値 962.9。

【0451】

[0315] VL447 と同じ手順を用いて、化合物 VL449 をゴム状液体として得た (

110 mg、60%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ ppm 5.40-5.30 (m, 4H), 4.85-4.75 (m, 1H), 4.20-4.00 (m, 10H), 3.60-3.50 (m, 4H), 2.80-2.70 (m, 2H), 2.40-2.20 (m, 11H), 2.10-1.95 (m, 4H), 1.80-1.70 (m, 2H), 1.65-1.40 (m, 10H), 1.40-1.10 (m, 44H), 0.90-0.80 (m, 9H). m/z: [M + H]⁺、理論値 964.74; 実測値 962.9。

【0452】

【0316】VL447と同じ手順を用いて、ゴム状液体として化合物VL451 (118 mg、39%)を得た。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ ppm 5.40-5.30 (m, 4H), 4.85-4.75 (m, 1H), 4.20-4.00 (m, 10H), 2.80-2.70 (m, 2H), 2.40-2.20 (m, 11H), 2.10-1.95 (m, 4H), 1.80-1.70 (m, 2H), 1.65-1.40 (m, 14H), 1.40-1.10 (m, 46H), 0.90-0.80 (m, 9H). m/z: [M + H]⁺、理論値 952.74; 実測値 952.6。

10

【0453】

【0317】実施例6. VL410、VL411、VL421およびVL435の合成

【0318】VL410の合成。DCM (30 mL) 中の4E (3 g、6.97 mmol) の溶液に、4-ニトロフェニルクロロホルメート (4.17 g、20.91 mmol)、ピリジン (1.68 mL、20.91 mmol) およびDMAP (255 mg、2.09 mmol) を添加し、反応物を16時間攪拌した。反応混合物を完全に蒸発させて、ゴム状液体として24 (3.8 g、92%) 得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ ppm 8.33 (d, J=7.2 Hz, 2H), 7.50 (d, J=7.2 Hz, 2H), 2.75-2.65 (m, 2H), 2.18 (s, 3H), 2.14 (s, 6H), 1.90-1.80 (m, 2H), 1.50-1.00 (m, 21H), 1.00-0.80 (m, 15H)。

20

【0454】

【0319】CH₂Cl₂ (10 mL) 中の5 (500 mg、1.28 mmol) の攪拌溶液に、24 (536 mg、0.90 mmol)、続いてピリジン (0.13 mL、1.67 mmol) およびDMAP (48 mg、0.3860 mmol) を添加し、反応物を室温で16時間攪拌した。反応混合物を水 (20 mL) で希釈し、DCM (2×50 mL) で抽出し、ブライン溶液 (20 mL) で洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥させた。粗生成物をpet-エーテル中の25% EtOAcで溶出するシリカカラムにより精製して、ゴム状液体として25 (320 mg、97%) を得た。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ ppm 4.79 (d, J=5.2 Hz, 1H), 4.40-4.20 (m, 2H), 4.20-3.90 (m, 4H), 3.55-3.45 (m, 2H), 2.60-2.50 (m, 2H), 2.40-2.20 (m, 5H), 2.10-1.90 (m, 8H), 1.90-1.70 (m, 2H), 1.70-1.00 (m, 45H), 1.00-0.89 (t, J=7.2 Hz, 12H)。

30

【0455】

【0320】CH₂Cl₂ (3 mL) 中の7 (248 mg、1.89 mmol) に4-ニトロフェニルクロロホルメート (814 mg、2.83 mmol)、続いてピリジン (0.2 mL、2.83 mmol) およびDMAP (17 mg、0.05 mmol) を添加し、反応物を4時間攪拌した。25を添加し (400 mg、0.4732 mmol)、反応混合物を45℃で18時間攪拌した。反応混合物を水 (10 mL) で希釈し、CH₂Cl₂ (2×50 mL) で抽出し、次に有機層を分離し、蒸発させて粗生成物を得た。粗生成物をpet-エーテル中の50% EtOAcで溶出するシリカゲルカラムにより精製して、ゴム状液体としてVL-410 (122 mg、26%) を得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ ppm 4.33 (d, J=6.0 Hz, 2H), 4.26 (d, J=6.0 Hz, 2H), 4.25-4.15 (m, 4H), 4.05 (t, J=5.6 Hz, 2H), 2.65-2.45 (m, 8H), 2.40-2.25 (m, 4H), 2.08 (s, 3H), 2.05 (s, 3H), 2.02 (s, 3H), 1.80-1.40 (m, 10H), 1.50-1.20 (m, 32H), 1.20-1.00 (m, 12H), 0.90-0.80 (m, 18H). HRMS m/z: [M + H]⁺、理論値 1002.75; 実測値 1002.83。

40

【0456】

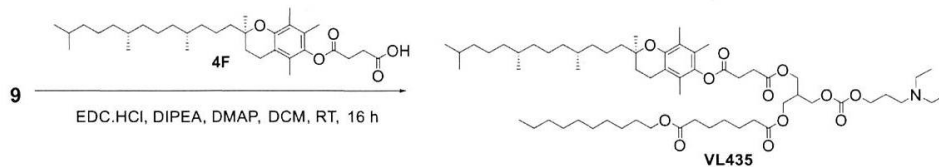
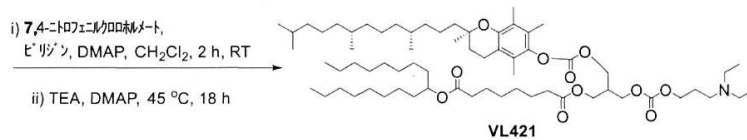
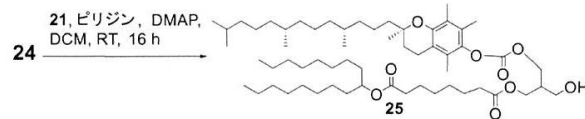
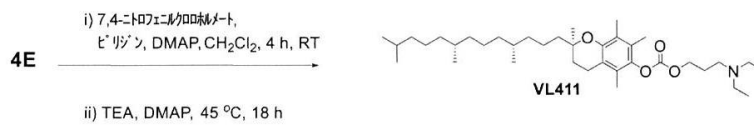
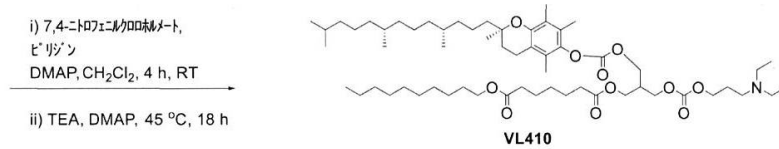
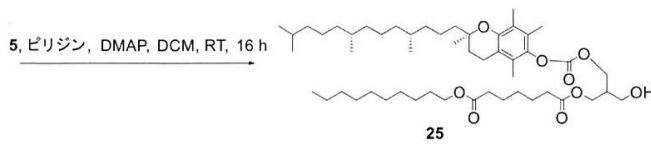
【0321】

【0457】

50

【化 6 7】

スキーム6.



【 0 4 5 8】

[0322] VL411の合成。CH₂Cl₂ (15 mL) 中の化合物 4E (1.3 g、3.02 mmol) の溶液に、4-ニトロフェニルクロロホルメート (1.21 g、6.04 mmol)、続いてピリジン (0.5 mL、6.04 mmol) および DMAP (110 mg、0.9 mmol) を添加し、反応物を1時間攪拌した。1時間後、化合物 7 (2.37 g、18.1 mmol) を添加し、反応混合物を RT で17時間攪拌した。反応混合物を水 (50 mL) で希釈し、生成物を CH₂Cl₂ (2 × 50 mL) で抽出し、有機層を分離し、蒸発させて粗生成物塊を得た。粗生成物塊を 50% EtOAc および pet-エーテルで溶出するシリカゲルカラムにより精製して、ゴム状液体として VL411 (

10

20

30

40

50

420 mg、24%)を得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ ppm 4.30 (t, J=6.4 Hz, 2H), 2.70-2.50 (m, 8H), 2.08 (s, 3H), 2.07 (s, 3H), 2.03 (s, 3H), 1.95-1.70 (m, 4H), 1.62-0.95 (m, 30H), 0.90-0.80 (m, 12H).

【0459】

[0323] VL421の合成。CH₂Cl₂ (10 mL) 中の化合物21 (1.0 g、1.83 mmol) の攪拌溶液に、化合物24 (1.09 g、1.83 mmol)、続いてピリジン (0.37 mL、3.54 mmol) およびDMAP (67 mg、0.55 mmol) を添加し、反応物をRTで1時間攪拌した。反応混合物を水 (20 mL) で希釈し、DCM (2×50 mL) で抽出し、ブライン溶液 (20 mL) で洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥させた。粗生成物をpet-エーテル中の30% EtOAcで溶出するシリカカラムにより精製して、ゴム状液体として25 (480 mg、30%) を得た。

10

【0460】

[0324] CH₂Cl₂ (4 mL) 中の化合物7 (219 mg、0.167 mmol) の溶液に、4-ニトロフェニルクロロホルメート (506 mg、2.50 mmol)、続いてピリジン (0.26 mL、2.50 mmol) およびDMAP (16 mg、0.12 mmol) を添加し、反応物を4時間攪拌した。4時間後、化合物25 (400 mg、0.41 mmol) を添加し、反応混合物を45℃で16時間攪拌した。反応混合物を水 (10 mL) で希釈し、生成物をCH₂Cl₂ (2×50 mL) で抽出し、次に有機層を分離し、蒸発させて粗生成物塊を得た。粗生成物塊をpet-エーテル中の55% EtOAcで溶出するシリカゲルカラムにより精製して、ゴム状液体としてVL-421 (110 mg、24%) を得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ ppm 4.40-4.20 (m, 8H), 2.65-2.40 (m, 9H), 2.40-2.25 (m, 4H), 2.08 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 2.02 (s, 3H), 1.40-1.20 (m, 4H), 1.70-1.50 (m, 10H), 1.50-1.00 (m, 56H), 0.90-0.80 (m, 18H). 質量m/z: [M+H]⁺、理論値1114.88; 実測値1114.93。

20

【0461】

[0325] VL435の合成。CH₂Cl₂ (2 mL) 中の化合物9 (220 mg、0.403 mmol) の溶液に、化合物4F (214 mg、0.403 mmol)、続いてEDC·HCl (115 mg、0.604 mmol)、DMAP (14 mg、0.12 mmol) およびDIPEA (0.2 mL、1.21 mmol) を添加した。反応混合物を室温で16時間攪拌した。TLCにより化合物9が完全に消失した後、反応混合物を水で希釈し、生成物をCH₂Cl₂ (2×20 mL) に抽出した。有機層を分離し、蒸発させて粗生成物塊を得た。粗生成物塊をpet-エーテル中の50% EtOAcで溶出するシリカゲル (60~120メッシュ) カラムクロマトグラフィーにより精製し、続いて調製用HPLC精製により、ギ酸塩としてVL435を得た。得られた生成物を10% NaHCO₃ 溶液で洗浄し、次に凍結乾燥させて純粋なVL435 (60 mg、14%) を得た。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ ppm 4.20-4.12 (m, 8H), 4.00-3.90 (m, 2H), 2.95-2.85 (m, 2H), 2.70-2.60 (m, 2H), 2.45-2.20 (m, 8H), 2.00 (s, 3H), 1.90 (s, 3H), 1.88 (s, 3H), 1.80-1.60 (m, 5H), 1.60-1.00 (m, 50H), 1.00-0.80 (m, 21H). 質量m/z: [M+H]⁺、理論値1058.78; 実測値1058.6。

30

40

【0462】

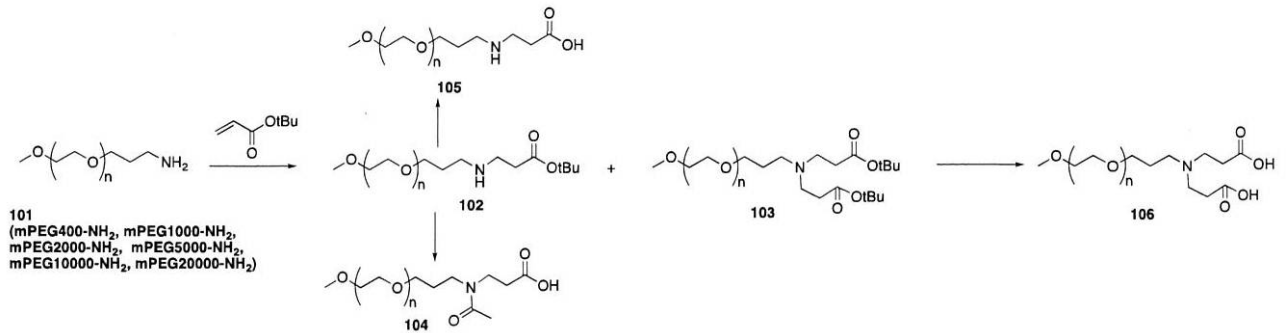
[0326] 実施例7. PEG-脂質合成

[0327]

【0463】

【化 6 8】

スキーム 7A.



10

【0 4 6 4】

[0328] 化合物 102 は、PEG-アミンのtert-ブチルアクリレートへのMichael付加により所望のmPEG-アミン101から調製される。モノ付加物102およびジ付加物103をカラムクロマトグラフィーにより分離する。102を酸処理して、酸105を得る。102を無水酢酸でアセチル化し、続いて酸処理してカルボン酸104を得る。103を酸で処理すると、ジカルボン酸106が得られる。

【0 4 6 5】

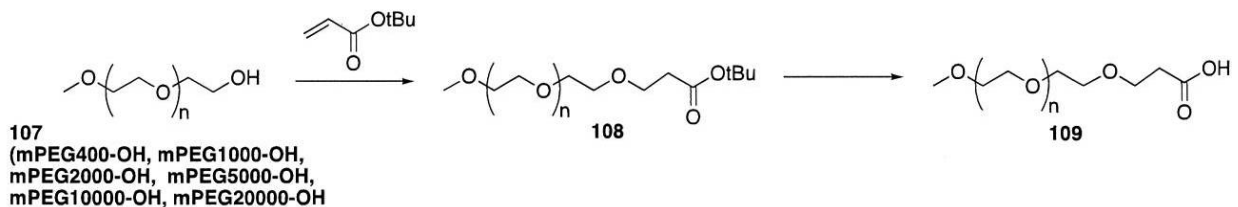
20

[0329]

【0 4 6 6】

【化 6 9】

スキーム 7B.



30

【0 4 6 7】

[0330] 化合物 108 は、mPEG-OHのtert-ブチルアクリレートへのMichaelの付加により所望のmPEG-OH107から調製される。化合物 108 を酸で処理すると、カルボン酸 109 が得られる。

【0 4 6 8】

[0331]

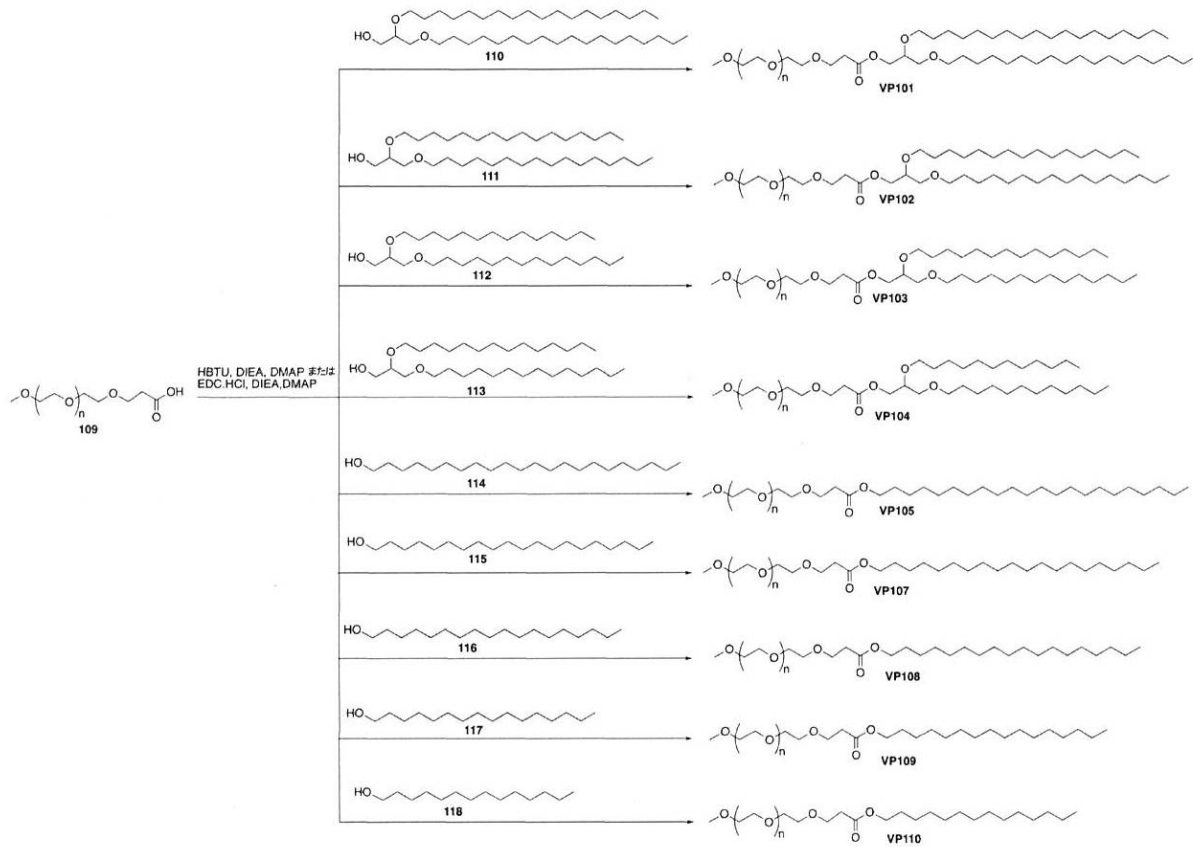
【0 4 6 9】

40

50

【化 7 0】

スキーム7C.



10

20

【 0 4 7 0】

【0332】D I E A NおよびD A M Pの存在下でペプチドカップリング剤H B T Uを用いてカルボン酸 1 0 9を活性化し、続いてアルコール 1 1 0を添加すると、P E G-脂質 V P 1 0 1が得られる。同様に、アルコール 1 1 1～1 1 8を活性化カルボン酸に添加すると、P E G-脂質 V P 1 0 1～V P 1 1 0が得られる。

30

【 0 4 7 1】

【0333】

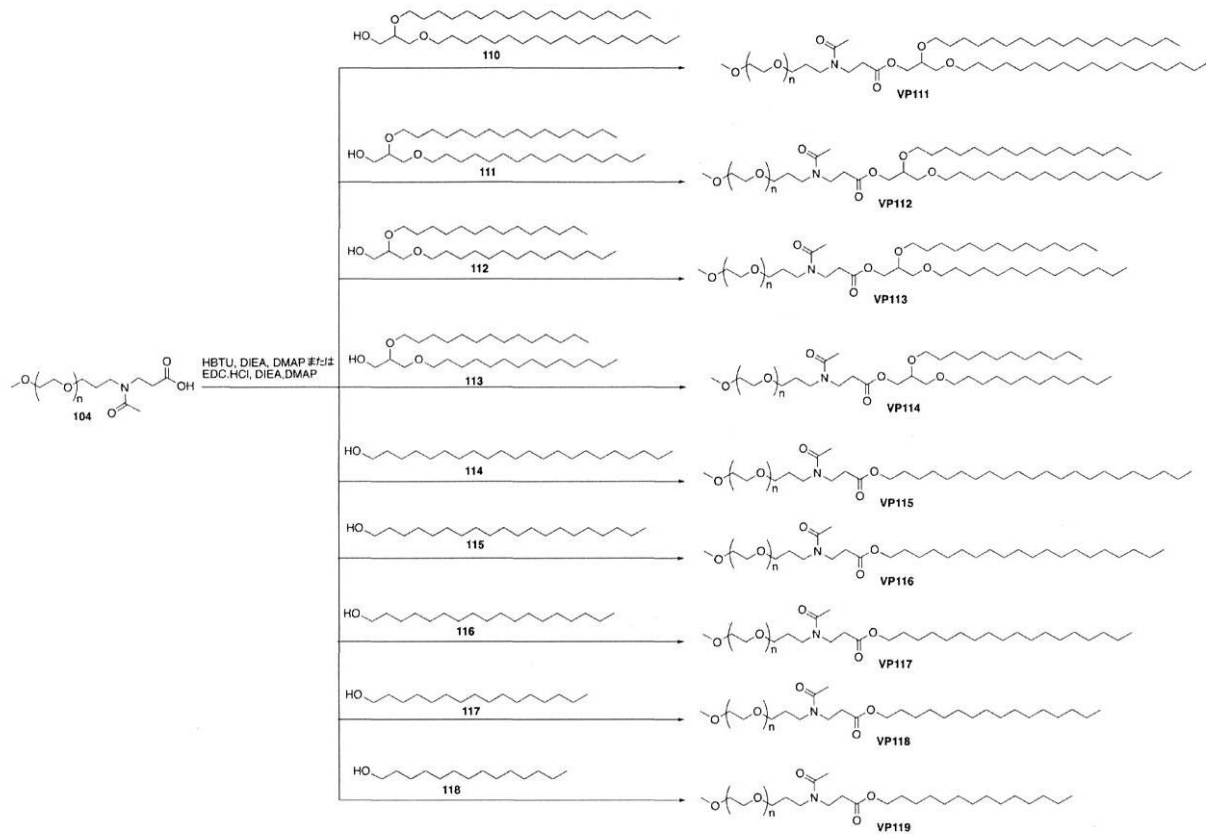
【 0 4 7 2】

40

50

【化 7 1】

スキーム7D.



10

20

【0 4 7 3】

[0334] D I E A N および D A M P の存在下でペプチドカップリング剤 H B T U を用いてカルボン酸 1 0 4 を活性化し、続いてアルコール 1 1 0 を添加すると、P E G - 脂質 V P 1 1 1 が得られる。同様に、アルコール 1 1 1 ~ 1 1 8 を活性化カルボン酸に添加すると、P E G - 脂質 V P 1 1 2 ~ V P 1 1 9 が得られる。

30

【0 4 7 4】

【0335】

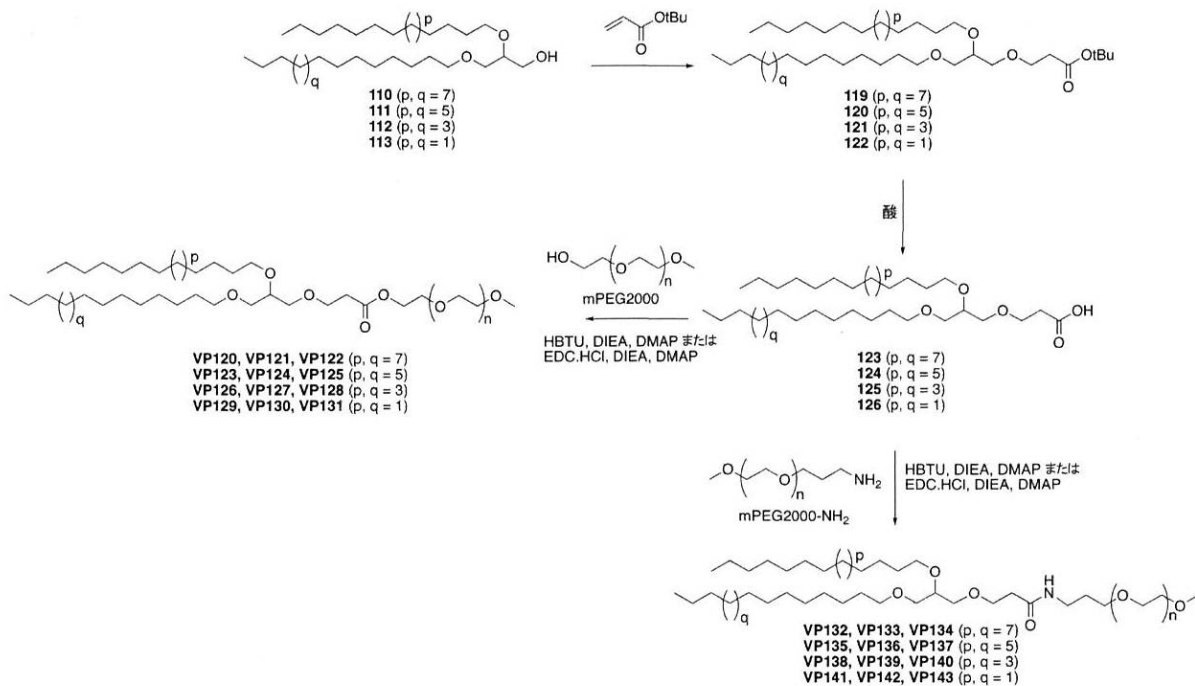
【0 4 7 5】

40

50

【化 7 2】

スキーム7E.



10

20

30

40

50

【0 4 7 6】

[0336] アルコール 110 を *tert*-ブチルアクリレートに Michael 付加すると、エステル 119 が得られる。エステル 119 を酸で処理すると 123 が得られる。カルボン酸 123 をペプチドカップリング剤で活性化し、続いて mPEG2000 を添加すると、ラセミ化合物である VP120 が得られる。同様に、キラル的に純粋な 110 から出発して、エナンチオマー VP121 および VP122 を得る。PEG-脂質 VP123 ~ VP131 は、同様に、対応するラセミまたはキラル的に純粋なアルコール 111 ~ 113 から出発して調製される。カルボン酸 123 をペプチドカップリング剤で活性化し、続いて mPEG2000-NH₂ を添加すると、ラセミ化合物である VP132 が得られる。同様に、キラル的に純粋な 110 から出発して、エナンチオマー VP133 および VP134 を得る。PEG-脂質 VP135 ~ VP143 は、同様に、対応するラセミまたはキラル的に純粋なアルコール 111 ~ 113 から出発して調製される。

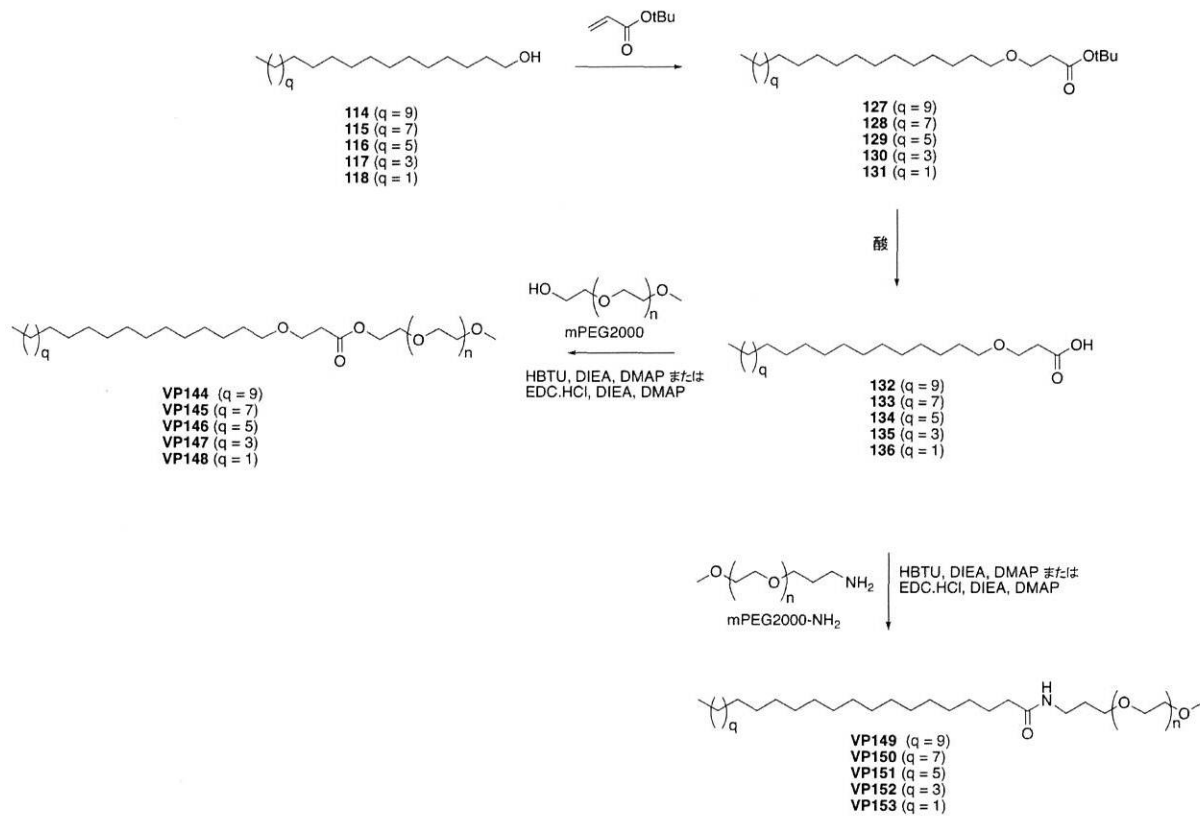
【0 4 7 7】

[0337]

【0 4 7 8】

【化 7 3】

スキーム7F.



10

20

【0 4 7 9】

[0338] アルコール 114 を *tert*-ブチルアクリレートに Michael 付加すると、エステル 127 が得られる。エステル 127 を酸で処理すると、カルボン酸 132 が得られる。カルボン酸 132 をペプチドカップリング剤で活性化し、続いて mPEG2000 を添加すると、VP144 が得られる。PEG-脂質 VP145 ~ VP148 は、同様に、対応するアルコール 115 ~ 118 から出発して調製される。

30

【0 4 8 0】

[0339] カルボン酸 132 をペプチドカップリング剤で活性化し、続いて mPEG2000-NH₂ を添加すると、VP149 が得られる。PEG-脂質 VP150 ~ VP153 は、同様に、対応するラセミまたはキラル的に純粋なアルコール 115 ~ 118 から出発して調製される。

【0 4 8 1】

【0340】

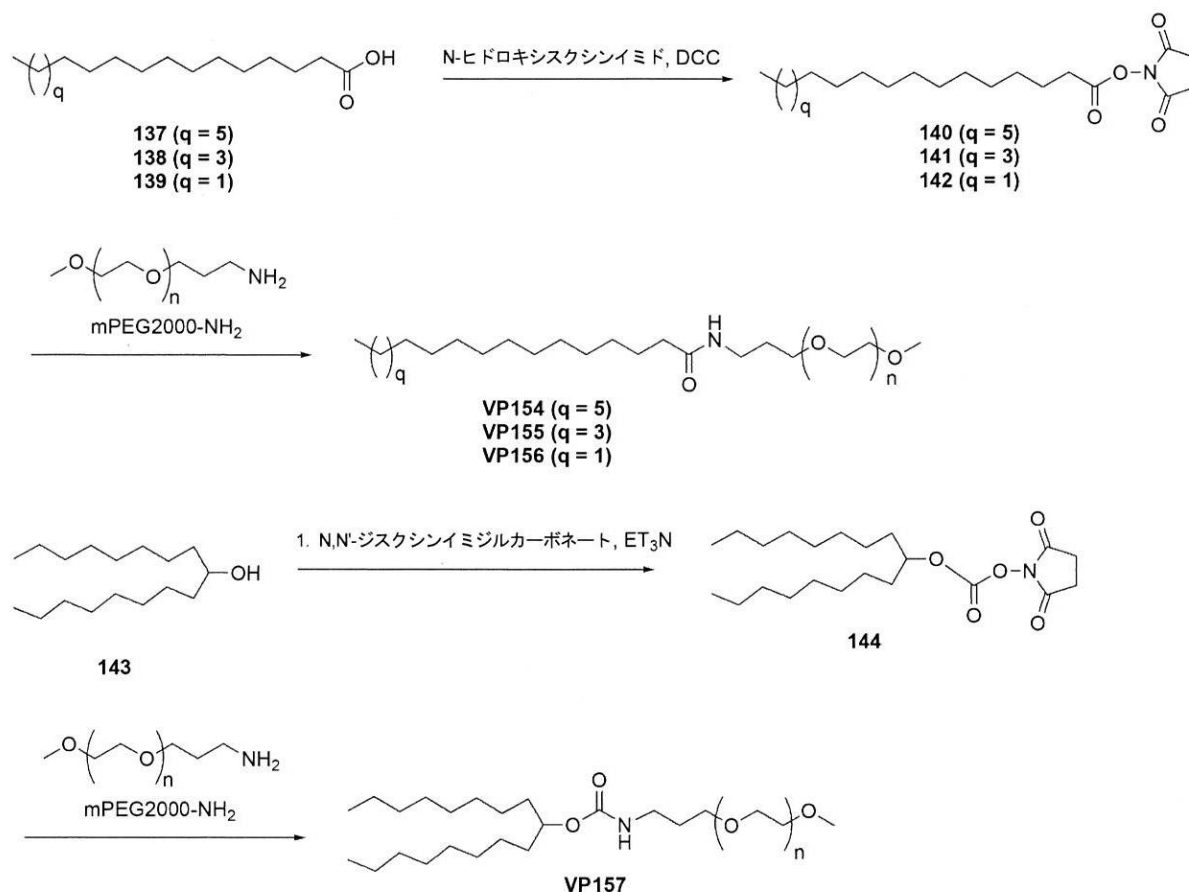
【0 4 8 2】

40

50

【化 7 4】

スキーム7G.



10

20

【0483】

[0341] THF (10 mL) 中の酸 137 (1 g、3.52 mmol) の攪拌溶液に、N-ヒドロキシスクシンイミド (567 mg、4.92 mmol)、続いて DCC (870 mg、4.22 mmol) を 0℃ で添加し、反応混合物を室温で一晩攪拌した。完了後、固体を濾過し、濾液を減圧下で蒸発させて粗生成物物質を得た。これをイソプロピルアルコール中で再結晶し、固体を濾過し、乾燥させて、白色固体として化合物 140 (1 g、収率 74%) を得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 2.83 (s, 4H), 2.61 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 1.76-1.72 (m, 2H), 1.40-1.38 (m, 2H), 1.29-1.25 (m, 26H), 0.89 (t, J = 6.4 Hz, 3H).

30

【0484】

[0342] CH₂Cl₂ (5 mL) 中の化合物 140 (113 mg、0.296 mmol) の溶液に mPEG2000-NH₂ (500 mg、0.24 mmol)、続いて 0℃ で DIPEA (0.1 mL、0.73 mmol) を添加し、反応混合物を室温で一晩攪拌した。ジクロロメタン (10 mL) で希釈した後の反応混合物を氷冷水で 15 分間攪拌した。有機層を分離し、氷冷水で洗浄し、無水 Na₂SO₄ で乾燥させて、減圧下で濃縮して粗生成物を得た。シリカゲルカラムクロマトグラフィー精製 (溶離剤として DCM 中の 10% MeOH) により、オフホワイト固体として化合物 VP154 (160 mg) を得た。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 7.70 (t, 1H), 3.68-3.31 (m, 195 H), 3.23 (s, 3H), 3.06 (t, J = 6.0 Hz, 2H), 2.03 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 1.61-1.44 (m, 4H), 1.27-1.23 (m, 28 H), 0.87 (t, J = 6.8 Hz, 3H). HRMS m/z: [M+H]⁺、理論値 2293.3; 実測値 2294.26。

40

【0485】

[0343] THF (10 mL) 中の化合物 138 (1 g、3.90 mmol) の攪拌溶液

50

に、N-ヒドロキシスクシンイミド（628 mg、5.4 mmol）、続いてDCC（964 mg、4.68 mmol）を0℃で添加し、反応混合物をRTで一晩攪拌した。反応混合物を濾過し、濾液を減圧下で蒸発させて粗生成物物質を得た。これをイソプロピルアルコール中で再結晶し、固体を濾過し、乾燥させて、白色固体として141（1 g、収率72%）を得た。¹H NMR（400 MHz, CDCl₃）: δ 2.83 (s, 4H), 2.61 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 1.76-1.70 (m, 2H), 1.42-1.25 (m, 24 H), 0.89 (t, J = 6.8 Hz, 3H). 【0486】

【0344】CH₂Cl₂（5 mL）中の化合物141（113 mg、0.29 mmol）の溶液にmPEG2000-NH₂（500 mg、0.24 mmol）、続いて0℃でDIPEA（0.1 mL、0.73 mmol）を添加し、反応混合物を室温で一晩攪拌した。反応の進行をTLCによりモニタリングした。反応完了後、混合物をCH₂Cl₂（10 mL）で希釈し、氷冷水で15分間攪拌した。有機層を分離し、氷冷水で洗浄し、無水Na₂SO₄で乾燥させて、減圧下で濃縮して粗生成物を得た。溶離剤としてCH₂Cl₂中の10% MeOHを用いるシリカゲルカラムクロマトグラフィー精製により、オフホワイト固体としてVP155（0.44 g、78.5%）を得た。¹H NMR（400 MHz, DMSO-d₆）: δ 7.70 (t, 1H), 3.50-3.36 (m, 185 H), 3.23 (s, 3H), 3.06 (t, J = 6.8 Hz, 1H), 2.03-1.99 (m, 2H), 1.61-1.46 (m, 4H), 1.27-1.23 (m, 24 H), 0.87 (t, J = 6.8 Hz, 3H). HRMS m/z: [M+H]⁺、理論値2266.8; 実測値2266.89。

10

20

【0487】

【0345】THF（16 mL）中の化合物139（1.6 g、7.0 mmol）の攪拌溶液に、N-ヒドロキシスクシンイミド（1.12 g、9.80 mmol）、続いてDCC（1.7 g、8.40 mmol）を0℃で添加し、反応混合物をRTで一晩攪拌した。反応混合物を濾過し、濾液を減圧下で蒸発させて粗生成物物質を得た。粗生成物をイソプロピルアルコール（10 mL）中に取り、80℃で45分間加熱し、次に0℃まで冷却し、沈殿した固形物を濾過し、乾燥させて、白色固形として化合物142（1.6 g、収率74%）を得た。¹H NMR（400 MHz, CDCl₃）: δ 2.83 (s, 4H), 2.61 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 1.76-1.72 (m, 2H), 1.40-1.25 (m, 20 H), 0.89 (t, J = 6.4 Hz, 3H). 【0488】

【0346】ジクロロメタン（5 mL）中の化合物142（96 mg、0.296 mmol）の溶液に、mPEG2000-NH₂（500 mg、0.24 mmol）、続いて0℃でDIPEA（0.1 mL、0.73 mmol）を添加し、反応混合物を室温で一晩攪拌した。反応混合物をジクロロメタン（10 mL）で希釈し、氷冷水で15分間攪拌した。有機層を分離し、氷冷水で洗浄し、無水Na₂SO₄で乾燥させて、減圧下で濃縮して粗生成物を得た。溶離剤としてDCM中の10% MeOHを用いるシリカゲルカラムクロマトグラフィー精製により、オフホワイト固体として化合物VP156（0.18 g、21%）を得た。¹H NMR（400 MHz, DMSO-d₆）: δ 7.70 (t, 1H), 3.68-3.34 (m, 189 H), 3.23 (s, 3H), 3.06 (q, 2H), 2.03 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 1.61-1.59 (m, 2H), 1.47-1.46 (m, 2H), 1.46-1.23 (m, 20 H), 0.87 (t, J = 6.4 Hz, 3H). HRMS m/z: [M+H]⁺、理論値2238.9; 実測値2238.89。

30

40

【0489】

【0347】0℃でのCH₂Cl₂（10 mL）中の化合物143（1.0 g、3.89 mmol）の攪拌溶液に、N,N'-ジスクシンイミジルカーボネート（1.5 g、5.84 mmol）、続いてトリエチルアミン（1.6 mL、11.69 mmol）を添加し、反応混合物を室温で一晩攪拌した。上記反応混合物に、N,N'-ジスクシンイミジルカーボネート（1.5 g、5.84 mmol）、続いてトリエチルアミン（1.6 mL、11.69 mmol）をRTで添加し、40℃に3日間加熱した。反応混合物を氷冷水（20 mL）で希釈し、有機層を分離した。有機層をブライン（10 mL）で洗浄し、無水Na₂SO₄で乾燥させて、減圧下で濃縮した。粗生成物をフラッシュカラムクロマトグラフィー（100~200メッシュシリカゲル; pet-エーテル中の20% ジエチルエー

50

テルで溶出)により精製して、淡黄色ゴムとして化合物144(0.75 g、1.88 mmol、収率48%)を得た。¹H NMR(400 MHz, CDCl₃): δ 4.82-4.78 (m, 1 H), 2.82 (s, 4H), 1.71-1.57 (m, 4H), 1.43-1.22 (m, 24H), 0.91-0.87 (m, 6H).
【0490】

[0348] 0℃での化合物mPEG200-NH₂(950 mg、0.46 mmol)の10 mLのCH₂Cl₂中の攪拌溶液に、ピリジン(0.1 mL、1.40 mmol)、続いて化合物144(279 mg、0.70 mmol)を添加し、RTで16時間攪拌した。反応物を減圧混合物下で完全に濃縮した。残渣をCH₂Cl₂(10 mL)で希釈し、氷冷水で20分間攪拌した。有機層を分離し、氷冷水(10 mL)で洗浄し、無水Na₂SO₄で乾燥させて、減圧下で濃縮して粗生成物を得た。これを、溶離剤としてCH₂Cl₂中の10% MeOHを使用するシリカゲルカラムにより精製して、オフホワイト固体としてVP157(0.76 g、76%)を得た。¹H NMR(400 MHz, DMSO-d₆): δ 6.92 (br t, J = 5.6 Hz, 1H), 4.61-4.57 (m, 1H), 3.69-3.67 (m, 1H), 3.59-3.49 (m, 188H), 3.48-3.41 (m, 3H), 3.38-3.333 (m, 2H), 3.24 (s, 3H), 3.02-2.97 (m, 2H), 1.62-1.58 (m, 2H), 1.48-1.39 (m, 4H), 1.31-1.30 (m, 24H), 0.86-0.83 (m, 6H). HRMS m/z: [M+H]⁺、理論値2222.1; 実測値2222.4。

10

【0491】

[0349] 実施例8. LNP評価のためのガイドRNA(gRNA)およびmRNA

[0350] 表3に示されるガイドRNA(gRNA)は、固相オリゴヌクレオチド合成および脱保護条件下で、制御された細孔ガラス支持体ならびに市販のホスホルアミダイトモノマーおよびオリゴヌクレオチド合成試薬下で合成した(Methods in Molecular Biology、1993、20、81-114; ACS Chem. Biol. 2015、10、1181-1187(参照によりその全体が本明細書に組み込まれる))。脱保護されたガイドRNAを、HPLCで精製し、各ガイドRNAの完全性を質量分析で確認した。各ガイドRNAの観測された質量は、計算された質量に一致した。

20

【0492】

30

40

50

【表 4 - 1】

表 3. 実施例 9～23 に記載される研究において使用されるシングルガイド RNA(gRNA)

標的*	gRNA	プロトスペーサー (5'-3')	gRNA 配列 (5'-3')#
PCSK9	GA055	CAGGTTCCATGG GATGCTCT	csasgsGUUCCAUGGGAUGCUCUgUUUUAGagcuagaaaag caaGUUaAaAuAaggcuaGUccGUUAucAAcuugaaaaagugGca ccgagucggugcusususu
PCSK9	GA010	GGCTGATGAGGC CGCACATG	gsgscsUGAUGAGGCCGCACAUGGUUUUAGagcuagaaa gcAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAacuugaaaa aguggcaccgagucggugcusususu
PCSK9	GA255	CCCATACCTTGG AGCAACGG	cscscsAUACCUUGGAGCAACGGgUUUUAGagcuaGaaa gcaaGUUaAaAuAaggCUaGUCcGUUAucAAcuGaaaaagugG gcaccgAgUCggugcusususu
PCSK9	GA256	CCCATACCTTGG AGCAACGG	cscscsAUACCUUGGAGCAACGGgUUUUAGagcuagaaa caaGUUaAaAuAaggcuaGUccGUUAucAAcuugaaaaagugGca ccgagucggugcusususu
PCSK9	GA257	CCCATACCTTGG AGCAACGG	cscscsAUACCUUGGAGCAACGGgUUUUAGagcuaGaaa gcaaGUUaAaAuAaggcuaGUccGUUAucAAcuGaaaaagugGc accgagucggugcusususu
PCSK9	GA292	CCCATACCTTGG AGCAACGG	cscscsAUACCUUGGAGCAACGGGUUUUAGAGCUAGAA AUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAAC UUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUsususu
PCSK9	GA097	CCCGCACCTTGG CGCAGCGG	cscscsGCACCUUGGCGCAGCGGgUUUUAGagcuagaaa caaGUUaAaAuAaggcuaGUccGUUAucAAcuugaaaaagugGca ccgagucggugcusususu
ANGPT L3	GA258	GAGATACCTGAG TAACTTTC	gsasgsAUACCUGAGUAACUUUCgUUUUAGagcuaGaaa gcaaGUUaAaAuAaggCUaGUCcGUUAucAAcuGaaaaagugG gcaccgAgUCggugcusususu
ANGPT L3	GA259	GAGATACCTGAG TAACTTTC	gsasgsAUACCUGAGUAACUUUCgUUUUAGagcuagaaa caaGUUaAaAuAaggcuaGUccGUUAucAAcuugaaaaagugGca ccgagucggugcusususu
ANGPT L3	GA260	GAGATACCTGAG TAACTTTC	gsasgsAUACCUGAGUAACUUUCgUUUUAGagcuaGaaa gcaaGUUaAaAuAaggcuaGUccGUUAucAAcuGaaaaagugGc accgagucggugcusususu
ANGPT L3	GA067	AAGATACCTGAA TAACTCTC	asasgsAUACCUGAAUAACUCUCGUUUUAGagcuagaaa gcAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAacuugaaaa aguggcaccgagucggugcusususu

10

20

30

40

【 0 4 9 3 】

【表 4 - 2】

ANGPT L3	GA347	AAGATACCTGAA TAACTCTC	asasgsAUACCUGAAUAACUCUCgUUUUAGagcuaGaaaua gcuaGUUaAaAuAaggcuaGUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGc accgagucggugcusususu

[0351]*gRNA は、マウス、ラット、サルおよびヒト PCSK9 および ANGPTL3 遺伝子を標的とするように設計された。# ガイド RNA 配列中の大文字および小文字は、それぞれ、2'-リボ(2'-OH)および 2'-O-メチル(2'-OMe)リボ糖部分を担持するヌクレオチドを示し、文字「s」は、ホスホロチオエート(PS)結合を示す。

10

【0494】

[0352]本明細書で使用される用語「プロトスペーサー」または「標的配列」およびこれらの文法的同等物は、標的遺伝子の DNA 配列を指すことができる。自然状態では、プロトスペーサーは PAM（プロトスペーサー隣接モチーフ）に隣接している。用語「スペーサー」は、プロトスペーサーの相補鎖に結合するプロトスペーサーの RNA バージョンであり得る。スペーサーは、ガイド RNA（gRNA）内にあり得る。RNA ガイドヌクレアーゼによる切断部位はプロトスペーサー配列内にある。例証のために図 1A を参照されたい。

【0495】

SpCas9、CBE、および ABE タンパク質をコードする mRNA

20

[0353]SpCas9、CBE、および ABE の mRNA は、当該技術分野で周知の異なる方法によって生成された。本明細書で使用されるそのような方法の 1 つは、T7 ポリメラーゼまたは追加の RNA ポリメラーゼバリエーションを使用するインビトロ転写（IVT）であった。通常、mRNA の IVT は、T7 ポリメラーゼプロモーター、mRNA コード配列（CDS）、3' および 5' 非翻訳領域（UTR）、ポリA テール、ならびに追加の複製および転写調節エレメントを含む線形化された DNA テンプレートを使用する。IVT の前は、DNA テンプレートは、プラスミド、PCR 産物、または追加の二本鎖 DNA 構築物の形であった。典型的な IVT 反応には、T7 ポリメラーゼ、DNA テンプレート、RNase 阻害剤、キャップアナログ、無機ピロホスファターゼ、ならびに天然に存在するリボヌクレオチド（rNTP）、例えば、GTP、ATP、CTP、UTP、または修飾 rNTP による天然の rNTP の置換、例えば、シュドウリジン、N1-メチルシュドウリジン、5-メチルシチジン、5-メトキシウリジン、N6-メチルアデノシン、および N4-アセチルシチジンが挙げられる。キャップ類似体は、最初の開始ヌクレオチドが標準の 2'-ヒドロキシル基、2'-O-メチル基、または追加の 2' 化学修飾を含む、ジヌクレオチドまたはトリヌクレオチドキャップ構造であった。ワクシニアキャッピング酵素を使用して、IVT 反応後にキャップ類似体も添加した。IVT の後、場合によっては、DNase を転写混合物に添加して DNA テンプレートを除去する。あるいは、残留 DNA を、イオン交換クロマトグラフィーによって除去した。mRNA の精製および濃縮は、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、沈殿、イオン対逆相クロマトグラフィー、酵素反応、サイズ排除クロマトグラフィー、および／または接線流濾過を用いて行った。同様の IVT および精製プロセスを使用して、SpCas9、CBE、および ABE をコードする mRNA を生成した。全ての場合において、DNA テンプレート、反応条件、および精製パラメーターは、目的の特定の遺伝子に対して最適化された。いくつかの実施例では、キャップされ、ポリアデニル化された SpCas9 mRNA MS002 は、商業的供給源（例えば、Trilink）から入手した。SpCas9 mRNA MS002 およびアデノシン塩基編集因子（ABE）mRNA MA002 および MA004 は、Verve の研究室で調製された。

30

40

【0496】

[0354]アデノシンヌクレオ塩基編集因子 mRNA MA002 は、以下

ATGAGCGAGGTCGAGTTCTCTCACGAATATTGGATGAGAC

50

ACGCTCTCACCCCTGGCTAAGAGAGGCCAGGGACGAAAGAGAG
GGTGCCAGTTGGCGCTGTCCTGGTGTTGAACAATCGCGTCTC
ATCGGAGAAAGGATGGAATCGCGCCATTGGCCTGCACGATCTC
CAACCGCACATGCCGAAATTATGGCTCTGCGGGCAAGGCGGG
CCTCGTGATGCAAAATTACAGACTGATCGATGCTACCCCTCTC
TACGTCACCTTTCGAGCCCTGTGTGTCATGTGTGCTGGGGGCAA
TGATTTCACTCCC GGATTGGCCGCGGTGGTGTTTGGAGTGC
GAATGCCAAGACTGGCGCCGCTGGATCTCTGTATGGACGTC
CTGCACc a t CCTGGGGATGAACCACCGGGTTCGAGATCACAG
AGGGAAATTTCTGGCTGACGAGTGC GCTGCCCTGTGTGc a g
gTTCTTTTAGAATGCCt AGAa g gGTGTTCAACGCCCCAGAAA
AAAGCTCAGAGCAGCACCCGATTTCCGGCGGGAAGCAGCGGAG
GATCTTCTGGAAGCGAAACC CAGGCAC CAGCGAGTCTGC
CACACCAGAATCATCTGGCGGGTAGCTCCGGCGGGCAGCGAC
AAGAAGTATTTCTATCGGACTGGCCATCGGCACCCAACCTCTG
TTGGATGGGGCCGTGATCACCGACGAGTACAAGGTGCC CAG
CAAGAAATTTCAAGGTGCTGGGGCAACACCCGACAGGCACAGC
ATCAAGAAAGAACCTGATCGGGCGCACTGCTGTTTCGACTCTG
GCGAAACAGCCCGAGGGCCACCAGACTGAAGAGAAACAGCCCG
CAGACGGGTACACCAGAAAGAAAGAACCGGATCTGCTACCTCTC
CAAGAGATCTTTCAGCAACGAGATGGCCAAGGTGGACGACA
GCTTCTTCCACAGACTGGAAGAGTCTCTTCTGGTGGAAGA
GGACAAGAAAGCACGAGAGACACCCCATCTTTCGGGCAACATC
GTGGACGAGGTGGCCCTACCACGAGAAAGTACCC CACCATCT
ACCACCTGAGAAAGAAACTGGTGGAACAGCACCCGACAAAGGC
CGACCTGAGACTGATCTATCTGGCCCTGGCTCACATGATCTC
AAGTTCCGGGGGCCACTTCTCTGATCGAGGGCGACCTGAATCT
CTGACAACAGCGACGCTGGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGGT
GCAGACCTACAAACCAGCTGTTTCGAGGAAAAACCCCATCAAC
GCCAGCGGAGGTGGATGCCAAGGCCCATCTCTGTCTGCCAGAC
TGAGCAAGAGCAGACGGCTGGAAAAATCTGATCGCC CAGCT
GCCCTGGCGAGAAAGAAAGAAATGGCCCTGTTTCGGCAACCTGATT
GCCCTGAGCCTGGGGCCTGACACCTAACTTTCAGAGCAACT
TCGACCTGGGCCGAGGACGCCCAAACCTGCAGCTGAGCAAGGA
CACCTACGACGACGACCTGGACAATCTGCTGGGCC CAGATCTC
GGCGATCAGTACGCCCGACTTGTCTTCTGGCCCGCCAAGAAATCT
TGAGCGACGCCATCTCTGCTGTCCGACATCTCTGAGAGTGAA
CACCGAGATCACCAAGGCACCTCTGAGCGCCCTCTATGATCTC
AAGAGATACGACGAGCACCCACCCAGGATCTGACCCCTGCTGA
AGGCCCTCTGTTAGACAGCAGCTGCCAGAGAAAGTACAAGAA
GATTTTCTTTCGACCAGAGCAAGAAACGGCTACGCCCGGCTAC
ATTGATGGCGGAGGCCAGCCAAAGAGGAATTTCTACAAGTTTCA
TCAAGCCCATCTCTCGAGAAAGATGGACGGGCACCCGAGGAACT
GCTGGTCAAGCTGAACAGAGAGGACCTGCTGAGAAAGCAG
AGAACCTTTCGACAACGGGCAGCATCCCTCACCCAGATCCACC
TGGGAGAACTGCACGCCATTTCTGCGGAGACAAGAGGACTT
TTACCCATTTCTGAAGGACAACCCGGGAAAGATCGAGAA
ATCCTGACCTTTCAGGATCC CCTACTACGTGGGACCACTGG
CCAGAGGCAATAGCAGATTCGCCCTGGATGACCAGAAAGAG
CGAGGA AACCATCACTCCCTGGAACTTTCGAGGAAGTGGTG

10

20

30

40

50

G A C A A G G G C G C C A G C G C T C A G T C C T T C A T C G A G C G G A T G A
C C A A C T T C G A T A A G A A C C T G C C T A A C G A G A A G G T G C T G C C
C A A G C A C A G C C T G C T G T A C G A G T A C T T C A C C G T G T A C A A C
G A G C T G A C C A A A G T G A A A T A C G T G A C C G A G G G A A T G A G A A
A G C C C G C C T T T C T G A G C G G C G A G C A G A A A A A G G C C A T C G T
G G A T C T G C T G T T C A A G A C C A A C C G G A A A G T G A C C G T G A A G
C A G C T G A A A G A G G A C T A C T T C A A G A A A A T C G A G T G C T T C G
A C A G C G T C G A G A T C T C C G G C G T G G A A G A T C G G T T C A A T G C
C A G C C T G G G C A C A T A C C A C G A T C T G C T G A A A A T T A T C A A G
G A C A A G G A C T T C C T G G A C A A C G A A G A G A A C G A G G A C A T C C
T T G A G G A C A T C G T G C T G A C A C T G A C C C T G T T T G A G G A C A G
A G A G A T G A T C G A G G A A C G G C T G A A A A C A T A C G C C C A C C T G
T T C G A C G A C A A A G T G A T G A A G C A A C T G A A G C G G C G G A G A T
A C A C C G G C T G G G G C A G A C T G T C T C G G A A G C T G A T C A A C G G
C A T C C G G G A T A A G C A G T C C G G C A A G A C C A T C C T G G A C T T T
C T G A A G T C C G A C G G C T T C G C C A A C A G A A A C T T C A T G C A G C
T G A T T C A C G A C G A C A G C C T C A C C T T C A A A G A G G A T A T C C A
G A A A G C C C A G G T G T C C G G C C A G G G C G A T T C T C T G C A T G A G
C A C A T T G C C A A C C T G G C C G G C T C T C C C G C C A T T A A G A A A G
G C A T C C T G C A G A C A G T G A A G G T G G T G G A C G A G C T T G T G A A
A G T G A T G G G C A G A C A C A A G C C C G A G A A C A T C G T G A T C G A A
A T G G C C A G A G A G A A C C A G A C C A C A C A G A A G G G A C A G A A G A
A C A G C C G C G A G A G A A T G A A G C G G A T C G A A G A G G G C A T C A A
A G A G C T G G G C A G C C A G A T C C T G A A A G A A C A C C C C G T G G A A
A A C A C C C A G C T G C A G A A C G A G A A G C T G T A C C T G T A C T A C C
T G C A G A A T G G A C G G G A T A T G T A C G T G G A C C A A G A G C T G G A
C A T C A A C A G A C T G T C C G A C T A C G A T G T G G A C C A T A T C G T G
C C C C A G T C T T T T C T G A A G G A C G A C T C C A T C G A C A A C A A G G
T C C T G A C C A G A T C C G A C A A G A A T C G G G G C A A G A G C G A C A A
C G T G C C C T C C G A A G A G G T G G T C A A G A A G A T G A A G A A C T A C
T G G C G A C A G C T G C T G A A C G C C A A G C T G A T T A C C C A G C G G A
A G T T C G A C A A T C T G A C C A A G G C C G A A A G A G G C G G C C T G A G
C G A A C T G G A T A A G G C C G G C T T C A T C A A G A G A C A G C T G G T G
G A A A C C C G G C A G A T C A C A A A G C A C G T G G C A C A G A T T C T G G
A C T C T C G G A T G A A C A C T A A G T A C G A C G A G A A C G A C A A A C T
G A T C C G C G A A G T G A A A G T C A T C A C C C T G A A G T C C A A G C T G
G T G T C C G A T T T T C C G G A A G G A T T T C C A G T T C T A C A A A G T G C
G C G A G A T C A A C A A C T A C C A T C A C G C C C A C G A C G C C T A C C T
G A A T G C C G T T G T T G G A A C A G C C C T G A T C A A A A A G T A C C C T
A A G C T G G A A A G C G A G T T C G T G T A C G G C G A C T A C A A G G T G T
A C G A C G T G C G G A A G A T G A T C G C C A A G A G C G A G C A A G A G A T
T G G C A A G G C A A C C G C C A A G T A C T T C T T C T A C A G C A A C A T C
A T G A A C T T T T T C A A G A C A G A G A T C A C C C T C G C C A A C G G C G
A G A T C A G A A A G C G G C C T C T G A T C G A G A C A A A C G G C G A A A C
C G G C G A G A T T G T G T G G G A T A A G G G C A G A G A C T T T G C C A C A
G T G C G G A A A G T G C T G A G C A T G C C C C A A G T G A A T A T C G T G A
A G A A A A C C G A G G T G C A G A C A G G C G G C T T C A G C A A A G A G T C
T A T C C T G C C T A A G C G G A A C T C C G A C A A A G C T G A T C G C C A G A
A A G A A G G A C T G G G A C C C C A A G A A G T A C G G C G G C T T C G A T T
C T C C T A C C G T G G C C T A T A G C G T G C T G G T G G T G G C C A A A G T

10

20

30

40

50

GGAAAAGGGCAAGTCCAAGAAACTCAAGAGCGTGAAAAGAG
CTGCTGGGGATCACCATCATGGAAAGAAGCAGCTTTCGAGA
AGAATCCGATCGATTTCCTCGAGGGCCAAGGGCTACAAAGA
AGTGAAAAAAGGACCTGATCATCAAGCTCCCCAAGTACTCC
CTGTTTCGAGCTGGAAAACGGCCGGGAAGAGAAATGCTGGCCT
CTGCTGGCGAAACTGCGAGAAAGGGAAACGAACCTGGGCCCTGCC
TAGCAAATATGTGAACCTTCCTGTACCTGGGCCAGCCACTAT
GAGAAGCTGAAGGGGCAGCCCCGAGGACAATGAGCAAAAAGC
AGCTGTTTGTGGAAACAGCACAAAGCACTACCTGGACGAGAT
CATCGAGCAGATCAGCGAGTTTATGCAAGAGAGTGATTCTG
GCCGACGCCCAATCTGGACAAAAGTGCTGTCCGCCCTACAAACA
AGCACCCGGGACAAAGCCCTATCAGAGAGCGAGGCCGAGAAATAT
CATCCACCTGTTTTACCCTGACCAACCTGGGGAGCCCCCTGCC
GCCTTCAAGTACTTTGACACCACCATCGACCCGGAAAGCGGT
ACACCTCCACCAAAAGAGGTGCTGGACGCCCACTCTGATCCA
CCAGTCTATCACCGGGCCTGTACGAGACACGGGATCGACCTG
TCTCAACTCGGAGGGCGACGAAGGGCGCCGATAAGAGAAACCG
CCGATGGCTCTGAGTTTCGAGAGCCCCAAGAAAAAGCGCAA
AGTGATGAGCGAGGGTCGAGTTCTCTCACGAATATTGGATG
AGACACGCTCTCACCCCTGGCTAAGAGAGGCCAGGGGACGAAA
GAGAGGTGCCAGTTGGCGCTGTCTCTGGTGTTGAACAATCG
CGTCATCGGAGAAAGGATGGAATCGCGCCATTGGCCTGCAC
GATCCAACCGCACATGCCGAAATTATGGCTCTGCGGGCAAG
GCGGCCCTCGTGATGCAAAAATTACAGACTGATCGATGCTAC
CCTCTACGTCACCTTCGAGCCCTGTGTGTATGTGTGCTGGG
GCAATGATTCACTCCC GGATTGGCCCGCGTGGTGTTTGGAG
TGCGGAATGCCAAGACTGGCGCCCGCTGGATCTCTGATGGA
CGTCCCTGCACc a t CCTGGGGATGAACCACCGGGTTCGAGATC
ACAGAGGGGAATTTCTGGCTGACGAGTGCGCTGCCCTGCTGT
GCa g g TTTCTTTAGAAATGCCt AGAa g g GTGTTCAACGCCCA
GAAAAAAGCTCAGAGCAGCACCCGATTC CGGGCGGAAGCAGC
GGAGGATCTTCTGGAAAGCGAAACCC CAGGCACCAGCGAGT
CTGCCACACCAGAAATCATCTGGCGGGTAGCTCCGGGCGGCAG
CGACAAGAAGTATTTCTATCGGACTGGCCATCGGCCACCAAC
TCTGTTGGATGGGGCCGTGATCACCGACGAGTACAAAGGTGC
CCAGCAAGAATAATTCAAGGTGCTGGGGCAACACCGACAGGCA
CAGCATCAAGAAGAAACCTGATCGGC GCACTGCTGTTTCGAC
TCTGGCGAAACAGCCGAGGCCAC CAGACTGAAGAGAAACAG
CCCGCAGACGGTACACCAGAAAGAAAGAAACCGGATCTGCTA
CCTCCAAGAGATCTT CAGCAACGAGATGGCCCAAGGTGGAC
GACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAGAGGTCTTTCTGGTG
AAGAGGACAAGAAGCACGAGAGACACCCCATCTTCGGGCAA
CATCGTGGACGAGGGTGGCCTACCAACGAGAAAGTACCCCAAC
ATCTACCACCTGAGAAAGAAAACTGGTGAGACAGCACCGACA
AGGCCGACCTGAGACTGATCTATCTGGCCCTGGCTCACAT
GATCAAGTTTC CGGGGCCACTTCCTGATCGAGGGCGACCTG
AATCCTGACAACAGCGACGTGGACAAGCTGTTTCATCCAGC
TGGTGACAGACCTACAAC CAGCTGTTTCGAGGAAAAACCCCAT
CAACGCCAGCGGAGTGAGATGCCAAGGCCATCCTGTCTGCC
AGACTGAGCAAGAGCAGACGGCTGGAAAAATCTGATCGCCC

A G C T G C C T G G C G A G A A G A A G A A T G G C C T G T T C G G C A A C C T
G A T T G C C C T G A G C C T G G G C C T G A C A C C T A A C T T C A A G A G C
A A C T T C G A C C T G G C C G A G G A C G C C A A A C T G C A G C T G A G C A
A G G A C A C C T A C G A C G A C G A C C T G G A C A A T C T G C T G G C C C A
G A T C G G C G A T C A G T A C G C C G A C T T G T T T C T G G C C G C C A A G
A A T C T G A G C G A C G C C A T C C T G C T G T C C G A C A T C C T G A G A G
T G A A C A C C G A G A T C A C C A A G G C A C C T C T G A G C G C C T C T A T
G A T C A A G A G A T A C G A C G A G C A C C A C C A G G A T C T G A C C C T G
C T G A A G G C C C T C G T T A G A C A G C A G C T G C C A G A G A A G T A C A
A A G A G A T T T T C T T C G A C C A G A G C A A G A A C G G C T A C G C C G G
C T A C A T T G A T G G C G G A G C C A G C C A A G A G G A A T T C T A C A A G
T T C A T C A A G C C C A T C C T C G A G A A G A T G G A C G G C A C C G A G G
A A C T G C T G G T C A A G C T G A A C A G A G A G G A C C T G C T G A G A A A
G C A G A G A A C C T T C G A C A A C G G C A G C A T C C C T C A C C A G A T C
C A C C T G G G A G A A C T G C A C G C C A T T C T G C G G A G A C A A G A G G
A C T T T T A C C C A T T C C T G A A G G A C A A C C G G G A A A A G A T C G A
G A A A A T C C T G A C C T T C A G G A T C C C C T A C T A C G T G G G A C C A
C T G G C C A G A G G C A A T A G C A G A T T C G C C T G G A T G A C C A G A A
A G A G C G A G G A A A C C A T C A C T C C C T G G A A C T T C G A G G A A G T
G G T G G A C A A G G G C G C C A G C G C T C A G T C C T T C A T C G A G C G G
A T G A C C A A C T T C G A T A A G A A C C T G C C T A A C G A G A A G G T G C
T G C C C A A G C A C A G C C T G C T G T A C G A G T A C T T C A C C G T G T A
C A A C G A G C T G A C C A A A G T G A A A T A C G T G A C C G A G G G A A T G
A G A A A G C C C G C C T T T C T G A G C G G C G A G C A G A A A A A G G C C A
T C G T G G A T C T G C T G T T C A A G A C C A A C C G G A A A G T G A C C G T
G A A G C A G C T G A A A G A G G A C T A C T T C A A G A A A A T C G A G T G C
T T C G A C A G C G T C G A G A T C T C C G G C G T G G A A G A T C G G T T C A
A T G C C A G C C T G G G C A C A T A C C A C G A T C T G C T G A A A A T T A T
C A A G G A C A A G G A C T T C C T G G A C A A C G A A G A G A A C G A G G A C
A T C C T T G A G G A C A T C G T G C T G A C A C T G A C C C T G T T T G A G G
A C A G A G A G A T G A T C G A G G A A C G G C T G A A A A C A T A C G C C C A
C C T G T T C G A C G A C A A A G T G A T G A A G C A A C T G A A G C G G C G G
A G A T A C A C C G G C T G G G G C A G A C T G T C T C G G A A G C T G A T C A
A C G G C A T C C G G G A T A A G C A G T C C G G C A A G A C C A T C C T G G A
C T T T C T G A A G T C C G A C G G C T T C G C C A A C A G A A A C T T C A T G
C A G C T G A T T C A C G A C G A C A G C C T C A C C T T C A A A G A G G A T A
T C C A G A A A G C C C A G G T G T C C G G C C A G G G C G A T T C T C T G C A
T G A G C A C A T T G C C A A C C T G G C C G G C T C T C C C G C C A T T A A G
A A A G G C A T C C T G C A G A C A G T G A A G G T G G T G G A C G A G C T T G
T G A A A G T G A T G G G C A G A C A C A A G C C C G A G A A C A T C G T G A T
C G A A A T G G C C A G A G A G A A C C A G A C C A C A C A G A A G G G A C A G
A A G A A C A G C C G C G A G A G A A T G A A G C G G A T C G A A G A G G G C A
T C A A A G A G C T G G G C A G C C A G A T C C T G A A A G A A C A C C C C G T
G G A A A A C A C C C A G C T G C A G A A C G A G A A G C T G T A C C T G T A C
T A C C T G C A G A A T G G A C G G G A T A T G T A C G T G G A C C A A G A G C
T G G A C A T C A A C A G A C T G T C C G A C T A C G A T G T G G A C C A T A T
C G T G C C C C A G T C T T T T C T G A A G G A C G A C T C C A T C G A C A A C
A A G G T C C T G A C C A G A T C C G A C A A G A A T C G G G G C A A G A G C G
A C A A C G T G C C C T C C G A A G A G G T G G T C A A G A A G A T G A A G A A
C T A C T G G C G A C A G C T G C T G A A C G C C A A G C T G A T T A C C C A G

10

20

30

40

50

C G G A A G T T C G A C A A T C T G A C C A A G G C C G A A A G A G G C G G C C
 T G A G C G A A C T G G A T A A G G C C G G C T T C A T C A A G A G A C A G C T
 G G T G G A A A C C C G G C A G A T C A C A A A G C A C G T G G C A C A G A T T
 C T G G A C T C T C G G A T G A A C A C T A A G T A C G A C G A G A A C G A C A
 A A C T G A T C C G C G A A G T G A A A G T C A T C A C C C T G A A G T C C A A
 G C T G G T G T C C G A T T T C C G G A A G G A T T T C C A G T T C T A C A A A
 G T G C G C G A G A T C A A C A A C T A C C A T C A C G C C C A C G A C G C C T
 A C C T G A A T G C C G T T G T T G G A A C A G C C C T G A T C A A A A A G T A
 C C C T A A G C T G G A A A G C G A G T T C G T G T A C G G C G A C T A C A A G
 G T G T A C G A C G T G C G G A A G A T G A T C G C C A A G A G C G A G C A A G
 A G A T T G G C A A G G C A A C C G C C A A G T A C T T C T T C T A C A G C A A
 C A T C A T G A A C T T T T T C A A G A C A G A G A T C A C C C T C G C C A A C
 G G C G A G A T C A G A A A G C G G C C T C T G A T C G A G A C A A A C G G C G
 A A A C C G G C G A G A T T G T G T G G G A T A A G G G C A G A G A C T T T G C
 C A C A G T G C G G A A A G T G C T G A G C A T G C C C C A A G T G A A T A T C
 G T G A A G A A A A C C G A G G T G C A G A C A G G C G G C T T C A G C A A A G
 A G T C T A T C C T G C C T A A G C G G A A C T C C G A C A A G C T G A T C G C
 C A G A A A G A A G G A C T G G G A C C C C A A G A A G T A C G G C G G C T T C
 G A T T C T C C T A C C G T G G C C T A T A G C G T G C T G G T G G T G G C C A
 A A G T G G A A A A G G G C A A G T C C A A G A A A C T C A A G A G C G T G A A
 A G A G C T G C T G G G G A T C A C C A T C A T G G A A A G A A G C A G C T T C
 G A G A A G A A T C C G A T C G A T T T C C T C G A G G C C A A G G G C T A C A
 A A G A A G T G A A A A A G G A C C T G A T C A T C A A G C T C C C C A A G T A
 C T C C C T G T T C G A G C T G G A A A A C G G C C G G A A G A G A A T G C T G
 G C C T C T G C T G G C G A A C T G C A G A A G G G A A A C G A A C T G G C C C
 T G C C T A G C A A A T A T G T G A A C T T C C T G T A C C T G G C C A G C C A
 C T A T G A G A A G C T G A A G G G C A G C C C C G A G G A C A A T G A G C A A
 A A G C A G C T G T T T G T G G A A C A G C A C A A G C A C T A C C T G G A C G
 A G A T C A T C G A G C A G A T C A G C G A G T T T A G C A A G A G A G T G A T
 T C T G G C C G A C G C C A A T C T G G A C A A A G T G C T G T C C G C C T A C
 A A C A A G C A C C G G G A C A A G C C T A T C A G A G A G C A G G C C G A G A
 A T A T C A T C C A C C T G T T T A C C C T G A C C A A C C T G G G A G C C C C
 T G C C G C C T T C A A G T A C T T T G A C A C C A C C A T C G A C C G G A A G
 C G G T A C A C C T C C A C C A A A G A G G T G C T G G A C G C C A C T C T G A
 T C C A C C A G T C T A T C A C C G G C C T G T A C G A G A C A C G G A T C G A
 C C T G T C T C A A C T C G G A G G C G A C G A A G G C G C C G A T A A G A G A
 A C C G C C G A T G G C T C T G A G T T C G A G A G C C C C A A G A A A A A G C
 G C A A A G T G に提供されるポリヌクレオチド配列によりコードされるポリペプチドを
 含む融合タンパク質を含む。

【 0 4 9 7 】

[0355] アデノシンヌクレオ塩基編集因子 mRNA MA004 は、以下

A G G A A A u ' A A G A G A G A A A A G A A G A G u ' A A G A A G A A A u ' A u ' A
 A G A G C C A C C A u ' G A G C G A G G u ' G G A G u ' u ' C A G C C A C G A G u ' A
 C u ' G G A u ' G C G G C A C G C C C u ' G A C C C u ' G G C C A A G C G G G C C C
 G G G A C G A G C G G G A G G u ' G C C C G u ' G G G C G C C G u ' G C u ' G G u ' G
 C u ' G A A C A A C C G G G u ' G A u ' C G G C G A G G G C u ' G G A A C C G G G C
 C A u ' C G G C C u ' G C A C G A C C C C A C C G C C C A C G C C G A G A u ' C A
 u ' G G C C C u ' G C G G C A G G G C G G C C u ' G G u ' G A u ' G C A G A A C u ' A
 C C G G C u ' G A u ' C G A C G C C A C C C u ' G u ' A C G u ' G A C C u ' u ' C G A G
 C C C u ' G C G u ' G A u ' G u ' G C G C C G G C G C C A u ' G A u ' C C A C A G C C

G G A u ' C G G C C G G G u ' G G u ' G u ' u ' C G G C G u ' G C G G A A C G C C A A
 G A C C G G C G C C G C C G G C A G C C u ' G A u ' G G A C G u ' G C u ' G C A C C
 A C C C C G G C A u ' G A A C C A C C G G G u ' G G A G A u ' C A C C G A G G G C
 A u ' C C u ' G G C C G A C G A G u ' G C G C C G C C C u ' G C u ' G u ' G C C G G u ' 10
 u ' C u ' u ' C C G G A u ' G C C C C G G C G G G u ' G u ' u ' C A A C G C C C A G A A
 G A A G G C C C A G A G C A G C A C C G A C A G C G G C G G C A G C A G C G G C
 G G C A G C A G C G G C A G C G A G A C A C C C G G C A C C A G C G A G A G C G
 C C A C C C C C G A G A G C A G C G G C G G C A G C A G C G G C G G C A G C G A
 C A A G A A G u ' A C A G C A u ' C G G C C u ' G G C C A u ' C G G C A C C A A C A
 G C G u ' G G G C u ' G G G C C G u ' G A u ' C A C C G A C G A G u ' A C A A G G u 10
 G C C C A G C A A G A A G u ' u ' C A A G G u ' G C u ' G G G C A A C A C C G A C C
 G G C A C A G C A u ' C A A G A A G A A C C u ' G A u ' C G G C G C C C u ' G C u ' G
 u ' u ' C G A C A G C G G C G A G A C A G C C G A G G C C A C C C G G C u ' G A A
 G C G G A C C G C C C G G C G G C G G u ' A C A C C C G G C G G A A G A A C C G
 G A u ' C u ' G C u ' A C C u ' G C A G G A G A u ' C u ' u ' C A G C A A C G A G A u ' 10
 G G C C A A G G u ' G G A C G A C A G C u ' u ' C u ' u ' C C A C C G G C u ' G G A G
 G A G A G C u ' u ' C C u ' G G u ' G G A G G A G G A C A A G A A G C A C G A G C G
 G C A C C C C A u ' C u ' u ' C G G C A A C A u ' C G u ' G G A C G A G G u ' G G C C
 u ' A C C A C G A G A A G u ' A C C C C A C C A u ' C u ' A C C A C C u ' G C G G A A
 G A A G C u ' G G u ' G G A C A G C A C C G A C A A G G C C G A C C u ' G C G G C 20
 u ' G A u ' C u ' A C C u ' G G C C C u ' G G C C C A C A u ' G A u ' C A A G u ' u ' C C
 G G G G C C A C u ' u ' C C u ' G A u ' C G A G G G C G A C C u ' G A A C C C C G A C
 A A C A G C G A C G u ' G G A C A A G C u ' G u ' u ' C A u ' C C A G C u ' G G u ' G C
 A G A C C u ' A C A A C C A G C u ' G u ' u ' C G A G G A G A A C C C C A u ' C A A C
 G C C A G C G G C G u ' G G A C G C C A A G G C C A u ' C C u ' G A G C G C C C G
 G C u ' G A G C A A G A G C C G G C G G C u ' G G A G A A C C u ' G A u ' C G C C C
 A G C u ' G C C C G G C G A G A A G A A G A A C G G C C u ' G u ' u ' C G G C A A C
 C u ' G A u ' C G C C C u ' G A G C C u ' G G G C C u ' G A C C C C C A A C u ' u ' C A
 A G A G C A A C u ' u ' C G A C C u ' G G C C G A G G A C G C C A A G C u ' G C A G
 C u ' G A G C A A G G A C A C C u ' A C G A C G A C G A C C u ' G G A C A A C C u ' 30
 G C u ' G G C C C A G A u ' C G G C G A C C A G u ' A C G C C G A C C u ' G u ' u ' C
 C u ' G G C C G C C A A G A A C C u ' G A G C G A C G C C A u ' C C u ' G C u ' G A G
 C G A C A u ' C C u ' G C G G G u ' G A A C A C C G A G A u ' C A C C A A G G C C C
 C C C u ' G A G C G C C A G C A u ' G A u ' C A A G C G G u ' A C G A C G A G C A C
 C A C C A G G A C C u ' G A C C C u ' G C u ' G A A G G C C C u ' G G u ' G C G G C A
 G C A G C u ' G C C C G A G A A G u ' A C A A G G A G A u ' C u ' u ' C u ' u ' C G A C
 C A G A G C A A G A A C G G C u ' A C G C C G G C u ' A C A u ' C G A C G G C G G
 C G C C A G C C A G G A G G A G u ' u ' C u ' A C A A G u ' u ' C A u ' C A A G C C C
 A u ' C C u ' G G A G A A G A u ' G G A C G G C A C C G A G G A G C u ' G C u ' G G u
 ' G A A G C u ' G A A C C G G G A G G A C C u ' G C u ' G C G G A A G C A G C G G A 40
 C C u ' u ' C G A C A A C G G C A G C A u ' C C C C C A C C A G A u ' C C A C C u ' G
 G G C G A G C u ' G C A C G C C A u ' C C u ' G C G G C G G C A G G A G G A C u ' u '
 C u ' A C C C C u ' u ' C C u ' G A A G G A C A A C C G G G A G A A G A u ' C G A G A
 A G A u ' C C u ' G A C C u ' u ' C C G G A u ' C C C C u ' A C u ' A C G u ' G G G C C
 C C C u ' G G C C C G G G G C A A C A G C C G G u ' u ' C G C C u ' G G A u ' G A C C
 C G C A A G A G C G A G G A G A C A A u ' C A C C C C C u ' G G A A C u ' u ' C G A
 G G A G G u ' G G u ' G G A C A A G G G C G C C A G C G C C C A G A G C u ' u ' C A
 u ' C G A G C G G A u ' G A C C A A C u ' u ' C G A C A A G A A C C u ' G C C C A A C
 G A G A A G G u ' G C u ' G C C C A A G C A C A G C C u ' G C u ' G u ' A C G A G u '
 A C u ' u ' C A C C G u ' G u ' A C A A C G A G C u ' G A C C A A G G u ' G A A G 50 A

C G u ' G A C C G A G G G C A u ' G C G G A A G C C C G C C u ' u ' C C u ' G A G C G
 G C G A G C A G A A G A A G G C C A u ' C G u ' G G A C C u ' G C u ' G u ' u ' C A A
 G A C C A A C C G G A A G G u ' G A C C G u ' G A A G C A G C u ' G A A G G A G G
 A C u ' A C u ' u ' C A A G A A G A u ' C G A G u ' G C u ' u ' C G A C A G C G u ' G G
 A G A u ' C A G C G G C G u ' G G A G G A C C G G u ' u ' C A A C G C C A G C C u ' G
 G G C A C C u ' A C C A C G A C C u ' G C u ' G A A G A u ' C A u ' C A A G G A C A A
 G G A C u ' u ' C C u ' G G A C A A C G A G G A G A A C G A G G A C A u ' C C u ' G G
 A G G A C A u ' C G u ' G C u ' G A C C C u ' G A C C C u ' G u ' u ' C G A G G A C C G
 G G A G A u ' G A u ' C G A G G A G C G G C u ' G A A G A C C u ' A C G C C C A C C
 u ' G u ' u ' C G A C G A C A A G G u ' G A u ' G A A G C A G C u ' G A A G C G G C G
 G C G G u ' A C A C C G G C u ' G G G G C C G G C u ' G A G C C G G A A G C u ' G A
 u ' C A A C G G C A u ' C C G G G A C A A G C A G A G C G G C A A G A C C A u ' C
 C u ' G G A C u ' u ' C C u ' C A A G A G C G A C G G C u ' u ' C G C C A A C C G G A
 A C u ' u ' C A u ' G C A G C u ' G A u ' C C A C G A C G A C A G C C u ' G A C C u ' u
 ' C A A G G A G G A C A u ' C C A G A A G G C C C A G G u ' G A G C G G C C A G G
 G C G A C A G C C u ' G C A C G A G C A C A u ' C G C C A A C C u ' G G C C G G C
 A G C C C C G C C A u ' C A A G A A G G G C A u ' C C u ' G C A G A C C G u ' G A A
 G G u ' G G u ' G G A C G A G C u ' G G u ' G A A G G u ' G A u ' G G G C C G G C A C
 A A G C C C G A G A A C A u ' C G u ' G A u ' C G A G A u ' G G C C C G G G A G A A
 C C A G A C C A C C C A G A A G G G C C A G A A G A A C A G C C G G G A G C G G 20
 A u ' G A A G C G G A u ' C G A G G A G G G C A u ' C A A G G A G C u ' G G G C A G
 C C A G A u ' C C u ' G A A G G A G C A C C C C G u ' G G A G A A C A C C C A G C
 u ' G C A G A A C G A G A A G C u ' G u ' A C C u ' G u ' A C u ' A C C u ' G C A G A A
 C G G C C G G G A C A u ' G u ' A C G u ' G G A C C A G G A G C u ' G G A C A u ' C A
 A C C G G C u ' G A G C G A C u ' A C G A C G u ' G G A C C A C A u ' C G u ' G C C C
 C A G A G C u ' u ' C C u ' G A A G G A C G A C A G C A u ' C G A C A A C A A G G u '
 G C u ' G A C C C G G A G C G A C A A G A A C C G G G G C A A G A G C G A C A A
 C G u ' G C C C A G C G A G G A G G u ' G G u ' G A A G A A G A u ' G A A G A A C u '
 A C u ' G G C G G C A G C u ' G C u ' G A A C G C C A A G C u ' G A u ' C A C C C A G
 C G G A A G u ' u ' C G A C A A C C u ' G A C C A A G G C C G A G C G G G G C G G 30
 C C u ' G A G C G A G C u ' G G A C A A G G C C G G C u ' u ' C A u ' C A A G C G G C
 A G C u ' G G u ' G G A G A C A C G G C A G A u ' C A C C A A G C A C G u ' G G C C
 C A G A u ' C C u ' G G A C A G C C G G A u ' G A A C A C C A A G u ' A C G A C G A
 G A A C G A C A A G C u ' G A u ' C C G G G A G G u ' G A A G G u ' G A u ' C A C C C
 u ' C A A G A G C A A G C u ' G G u ' G A G C G A C u ' u ' C C G G A A G G A C u ' u '
 C C A G u ' u ' C u ' A C A A G G u ' G C G G G A G A u ' C A A C A A C u ' A C C A C
 C A C G C C C A C G A C G C C u ' A C C u ' G A A C G C C G u ' G G u ' G G G C A C
 C G C C C u ' G A u ' C A A G A A G u ' A C C C C A A G C u ' G G A G A G C G A G u '
 u ' C G u ' G u ' A C G G C G A C u ' A C A A G G u ' G u ' A C G A C G u ' G C G G A A
 G A u ' G A u ' C G C C A A G A G C G A G C A G G A G A u ' C G G C A A G G C C A 40
 C C G C C A A G u ' A C u ' u ' C u ' u ' C u ' A C A G C A A C A u ' C A u ' G A A C u '
 u ' C u ' u ' C A A G A C C G A G A u ' C A C C C u ' G G C C A A C G G C G A G A u '
 C C G G A A G C G G C C C C u ' G A u ' C G A G A C A A A C G G C G A G A C A G G
 C G A G A u ' C G u ' G u ' G G G A C A A G G G C C G G G A C u ' u ' C G C C A C C G
 u ' G C G G A A G G u ' G C u ' G A G C A u ' G C C C C A G G u ' G A A C A u ' C G u '
 G A A G A A G A C C G A G G u ' G C A G A C C G G C G G C u ' u ' C A G C A A G G
 A G A G C A u ' C C u ' G C C C A A G C G G A A C A G C G A C A A G C u ' G A u ' C
 G C C C G G A A G A A G G A C u ' G G G A C C C C A A G A A G u ' A C G G C G G C
 u ' u ' C G A C A G C C C C A C C G u ' G G C C u ' A C A G C G u ' G C u ' G G u ' G G
 u ' G G C C A A G G u ' G G A G A A G G G C A A G A G C A A G A A G C u ' C A A G 50

A G C G u ' G A A G G A G C u ' G C u ' G G G C A u ' C A C C A u ' C A u ' G G A G C
 G G A G C A G C u ' u ' C G A G A A G A A C C C C A u ' C G A C u ' u ' C C u ' G G A
 G G C C A A G G G C u ' A C A A G G A G G u ' G A A G A A G G A C C u ' G A u ' C A
 u ' C A A G C u ' G C C C A A G u ' A C A G C C u ' G u ' u ' C G A G C u ' G G A G A A
 C G G C C G G A A G C G G A u ' G C u ' G G C C A G C G C C G G C G A G C u ' G C
 A G A A G G G C A A C G A G C u ' G G C C C u ' G C C C A G C A A G u ' A C G u ' G
 A A C u ' u ' C C u ' G u ' A C C u ' G G C C A G C C A C u ' A C G A G A A G C u ' G A
 A G G G C A G C C C C G A G G A C A A C G A G C A G A A G C A G C u ' G u ' u ' C
 G u ' G G A G C A G C A C A A G C A C u ' A C C u ' G G A C G A G A u ' C A u ' C G A
 G C A G A u ' C A G C G A G u ' u ' C A G C A A G C G G G u ' G A u ' C C u ' G G C C
 G A C G C C A A C C u ' G G A C A A G G u ' G C u ' G A G C G C C u ' A C A A C A A
 G C A C C G G G A C A A G C C C
 A u ' C C G G G A G C A G G C C G A G A A C A u ' C A u ' C C A C C u ' G u ' u ' C A
 C C C u ' G A C C A A C C u ' G G G C G C C C C C G C C G C C u ' u ' C A A G u ' A C
 u ' u ' C G A C A C C A C C A u ' C G A C C G G A A G C G G u ' A C A C C A G C A C
 C A A G G A G G u ' G C u ' G G A C G C C A C C C u ' G A u ' C C A C C A G A G C A
 u ' C A C C G G C C u ' G u ' A C G A G A C A C G G A u ' C G A C C u ' G A G C C A G
 C u ' G G G C G G C G A C G A G G G C G C C G A C A A G C G G A C C G C C G A C
 G G C A G C G A G u ' u ' C G A G A G C C C C A A G A A G A A G C G G A A G G u '
 G u ' G A G C G G C C G C u ' u ' A A u ' u ' A A G C u ' G C C u ' u ' C u ' G C G G G
 C u ' u ' G C C u ' u ' C u ' G G C C A u ' G C C C u ' u ' C u ' u ' C u ' C u ' C C C u
 G C A C C u ' G u ' A C C u ' C u ' u ' G G u ' C u ' u ' u ' G A A u ' A A A G C C u ' G
 G u ' A G G A A G u ' C u ' A G A に提供されるポリヌクレオチド配列によってコードさ
 れるポリペプチドを含む融合タンパク質を含み、u ' は N¹ -メチルシュードウリジンで
 ある。

【0498】

[0356] S p C a s 9 mRNA MS004 は、以下

A G G A A A u ' A A G A G A G A A A A G A A G A G u ' A A G A A G A A A u ' A u ' A
 A G A G C C A C C A u ' G G C C C C C A A G A A G A A G C G G A A G G u ' G G G C
 A u ' C C A C G G C G u ' G C C C G C C G C C G A C A A G A A G u ' A C A G C A u ' 30
 C G G C C u ' G G A C A u ' C G G C A C C A A C A G C G u ' G G G C u ' G G G C C G
 u ' G A u ' C A C C G A C G A G u ' A C A A G G u ' G C C C A G C A A G A A G u ' u '
 C A A G G u ' G C u ' G G G C A A C A C C G A C C G G C A C A G C A u ' C A A G A
 A G A A C C u ' G A u ' C G G C G C C C u ' G C u ' G u ' u ' C G A C A G C G G C G A
 G A C G G C C G A G G C C A C C C G G C u ' G A A G C G G A C C G C C C G G C G
 G C G G u ' A C A C C C G G C G G A A G A A C C G G A u ' C u ' G C u ' A C C u ' G C
 A G G A G A u ' C u ' u ' C A G C A A C G A G A u ' G G C C A A G G u ' G G A C G A C
 A G C u ' u ' C u ' u ' C C A C C G G C u ' G G A G G A G A G C u ' u ' C C u ' G G u ' G
 G A G G A G G A C A A G A A G C A C G A G C G G C A C C C C A u ' C u ' u ' C G G
 C A A C A u ' C G u ' G G A C G A G G u ' G G C C u ' A C C A C G A G A A G u ' A 40
 C C A C C A u ' C u ' A C C A C C u ' G C G G A A G A A G C u ' G G u ' G G A C A G C
 A C C G A C A A G G C C G A C C u ' G C G G C u ' G A u ' C u ' A C C u ' G G C C C u
 ' G G C C C A C A u ' G A u ' C A A G u ' u ' C C G G G G C C A C u ' u ' C C u ' G A u '
 C G A G G G C G A C C u ' G A A C C C C G A C A A C A G C G A C G u ' G G A C A A
 G C u ' G u ' u ' C A u ' C C A G C u ' G G u ' G C A G A C C u ' A C A A C C A G C u '
 G u ' u ' C G A G G A G A A C C C C A u ' C A A C G C C A G C G G C G u ' G G A C G
 C C A A G G C C A u ' C C u ' G A G C G C C C G G C u ' G A G C A A G A G C C G G
 C G G C u ' G G A G A A C C u ' G A u ' C G C C C A G C u ' G C C C G G C G A G A A
 G A A G A A C G G C C u ' G u ' u ' C G G C A A C C u ' G A u ' C G C C C u ' G A G C
 C u ' G G G C C u ' G A C C C C C A A C u ' u ' C A A G A G C A A C u ' u ' C G A 50

u'GGCCGAGGACGCCAAGCu'GCAGCu'GAGCAAGGACACC
 u'ACGACGACGACCCu'GGACAACCu'GCu'GGCCCCAGAu'CGG
 CGACCAGu'ACGCCGACCCu'Gu'u'CCu'GGCCGCCAAGAACC
 u'GAGCGACGCCAu'CCu'GCu'GAGCGACAu'CCu'GCGGGGu'
 GAACACCCGAGAu'CACCAAGGCCCCCCCu'GAGCGCCAGCAu
 'GAu'CAAGCGGGu'ACGACGAGCACCAACCAGGACCCu'GACCC
 u'GCu'GAAGGCCCCu'GGu'GCGGCGAGCAGCu'GCCCGAGAGAG
 u'ACAAGGAGAu'Cu'u'Cu'u'CGACCAGAGCAAGAACGGCu'
 ACGCCGGCu'ACAu'CGACGGCGGGCGCCAGCCAGGAGGAGu
 'u'Cu'ACAAGu'u'CAu'CAAGCCCCAu'CCu'GGAGAGAGAu¹⁰GG
 ACGGCACCCGAGGAGCu'GCu'GGu'GAAGCu'GAACCCGGGAG
 GACCCu'GCu'GCGGAAGCAGCGGACCCu'u'CGACAACGGCAG
 CAu'CCCCCACCAGAu'CCACCu'GGGCGAGCu'GCACGCCCA
 u'CCu'GCGGCGGGCAGGAGGACu'u'Cu'ACCCCu'u'CCu'GA
 AGGACAACCCGGGAGAGAGAu'CGAGAGAGAu'CCu'GACCCu'u'C
 CGGAu'CCCCu'ACu'ACGu'GGGCCCCCCCu'GGCCCGGGGGCAA
 CAGCCGGGu'u'CGCCu'GGAu'GACCCCGCAAGAGCGAGGAGA
 CGAu'CACCCCCu'GGAACu'u'CGAGGAGGu'GGu'GGACAA
 GGGCGGCCAGCGGCCCAGAGCu'u'CAu'CGAGCGGAu'GACCA
 ACu'u'CGACAAGAACCu'GCCCAACGAGAGAGGu'GCu'GCC²⁰
 AAGCACAGCCu'GCu'Gu'ACGAGu'ACu'u'CACCGu'Gu'AC
 AACGAGCu'GACCAAGGu'GAAGu'ACGu'GACCGAGGGCAu'
 GCGGAAGCCCGCCu'u'CCu'GAGCGGCGAGCAGAGAGAGG
 CCAu'CGu'GGACCCu'GCu'Gu'u'CAAGACCACAACCCGGAGAGGu'
 GACCGu'GAAGCAGCu'GAAGGAGGACu'ACu'u'CAAGAGAG
 u'CGAGu'GCu'u'CGACAGCGu'GGAGAu'CAGCGGCGu'GGA
 GGACC GGGu'u'CAACGCCAGCCu'GGGCACCu'ACCACGACC
 u'GCu'GAAGAu'CAu'CAAGGACAAAGGACu'u'CCu'GGACAA
 CGAGGAGAGAACGAGGACAu'CCu'GGAGGACAu'CGu'GCu'GA
 CCCu'GACCCu'Gu'u'CGAGGACC GGAGAGAu'GAu'CGAGG³⁰
 GCGGCu'GAAGACCu'ACGCCCACCCu'Gu'u'CGACGACAAAGG
 u'GAu'GAAGCAGCu'GAAGCGGCGGCGGu'ACACC GGGu'GG
 GGCCGGCu'GAGCCGGAGAGCu'GAu'CAACGGCAu'CCGGGA
 CAAGCAGAGCGGCAAGACC Au'CCu'GGACu'u'CCu'CAAGA
 GCGACGGCu'u'CGCCAACCGGAACu'u'CAu'GCAGCu'GAu'
 CCACGACGACAGCCu'GACCCu'u'CAAGGAGGACAu'CCAGA
 AGGCCCAGGu'GAGCGGCGCAGGGCGACAGCCu'GCACGAGC
 ACAu'CGCCAACC u'GGCCGGCAGCCCCCGCCAu'CAAGAG
 GGCAu'CCu'GCAGACCGu'GAAGGu'GGu'GGACGAGCu'GG
 u'GAAGGu'GAu'GGGCCGGGCACAAAGCCCCGAGAGACAu'CGu'⁴⁰
 Au'CGAGAu'GGCCCCGGGAGAGAACCAAGACCACCCAGAGAGGGC
 CAGAGAGAACAGCCGGGAGCGGAu'GAAGCGGAu'CGAGGAG
 GGCAu'CAAGGAGCu'GGGCAGCCAGAu'CCu'GAAGGAGCA
 CCCCGu'GGAGAACACCAGCu'GCAGAACGAGAGAGCu'Gu'
 ACCu'Gu'ACu'ACCu'GCAGAACGGCCGGGACAu'Gu'ACGu'
 GGACCAGGAGCu'GGACAu'CAACCGGGCu'GAGCGACu'ACG
 ACGu'GGACCACAu'CGu'GCCCCAGAGCu'u'CCu'GAAGGA
 CGACAGCAu'CGACAACAAGGu'GCu'GACCCGGAGCGACA
 AGAACCGGGGGCAAGAGCGACAACGu'GCCCAGCGAGGAGG
 u'GGu'GAAGAGAGAu'GAAGAACu'ACu'GGCGGCGAGCu'G⁵⁰

G A A C G C C A A G C u ' G A u ' C A C C C A G C G G A A G u ' u ' C G A C A A C C
 u ' G A C C A A A G G C C G A G C G G G G C G G C C u ' G A G C G A G C u ' G G A C
 A A G G C C G G C u ' u ' C A u ' C A A G C G G C A G C u ' G G u ' G G A G A C G C G
 G C A G A u ' C A C C A A A G C A C G u ' G G C C C A G A u ' C C u ' G G A C A G C C
 G G A u ' G A A C A C C A A G u ' A C G A C G A G A A C G A C A A G C u ' G A u ' C
 C G G G A G G u ' G A A G G u ' G A u ' C A C C C u ' C A A G A G C A A G C u ' G G u
 ' G A G C G A C u ' u ' C C G G A A G G A C u ' u ' C C A G u ' u ' C u ' A C A A G G u ' ,
 G C G G G A G A u ' C A A C A A C u ' A C C A C C A C G C C C A C G A C G C C u ' ,
 A C C u ' G A A C G C C G u ' G G u ' G G G C A C C G C C C u ' G A u ' C A A G A A G
 u ' A C C C C A A G C u ' G G A G A G C G A G u ' u ' C G u ' G u ' A C G G C G A C u ' ,
 A C A A G G u ' G u ' A C G A C G u ' G C G G A A G A u ' G A u ' C G C C A A G A G C
 G A G C A G G A G A u ' C G G C A A G G C C A C C G C C A A G u ' A C u ' u ' C u ' u
 ' C u ' A C A G C A A C A u ' C A u ' G A A C u ' u ' C u ' u ' C A A G A C C G A G A u ' ,
 C A C C C u ' G G C C A A C G G C G A G A u ' C C G G A A G C G G C C C C u ' G A
 u ' C G A G A C G A A C G G C G A G A C G G G C G A G A u ' C G u ' G u ' G G G A C
 A A G G G C C G G G A C u ' u ' C G C C A C C G u ' G C G G A A G G u ' G C u ' G A G
 C A u ' G C C C C A G G u ' G A A C A u ' C G u ' G A A G A A G A C C G A G G u ' G C
 A G A C C G G C G G C u ' u ' C A G C A A G G A G A G C A u ' C C u ' G C C C A A G
 C G G A A C A G C G A C A A G C u ' G A u ' C G C C C G G A A G A A G G A C u ' G
 G G A C C C C A A G A A G u ' A C G G C G G C u ' u ' C G A C A G C C C C A C C G 20
 u ' G G C C u ' A C A G C G u ' G C u ' G G u ' G G u ' G G C C A A G G u ' G G A G A A
 G G G C A A G A G C A A G A A G C u ' C A A G A G C G u ' G A A G G A G C u ' G C
 u ' G G G C A u ' C A C C A u ' C A u ' G G A G C G G A G C A G C u ' u ' C G A G A A
 G A A C C C C A u ' C G A C u ' u ' C C u ' G G A G G C C A A G G G C u ' A C A A G G
 A G G u ' G A A G A A G G A C C u ' G A u ' C A u ' C A A G C u ' G C C C A A G u ' A
 C A G C C u ' G u ' u ' C G A G C u ' G G A G A A C G G C C G G A A G C G G A u ' G C
 u ' G G C C A G C G C C G G C G A G C u ' G C A G A A G G G C A A C G A G C u ' G
 G C C C u ' G C C C A G C A A G u ' A C G u ' G A A C u ' u ' C C u ' G u ' A C C u ' G
 G C C A G C C A C u ' A C G A G A A G C u ' G A A G G G C A G C C C C G A G G A C
 A A C G A G C A G A A G C A G C u ' G u ' u ' C G u ' G G A G C A G C A C A A G C A 30
 C u ' A C C u ' G G A C G A G A u ' C A u ' C G A G C A G A u ' C A G C G A G u ' u ' C
 A G C A A G C G G G u ' G A u ' C C u ' G G C C G A C G C C A A C C u ' G G A C A A
 G G u ' G C u ' G A G C G C C u ' A C A A C A A G C A C C G G G A C A A G C C C A
 u ' C C G G G A G C A G G C C G A G A A C A u ' C A u ' C C A C C u ' G u ' u ' C A C
 C C u ' G A C C A A C C u ' G G G C G C C C C C G C C G C C u ' u ' C A A G u ' A C u
 ' u ' C G A C A C C A C C A u ' C G A C C G G A A G C G G u ' A C A C C A G C A C C
 A A G G A G G u ' G C u ' G G A C G C C A C C C u ' G A u ' C C A C C A G A G C A u ' ,
 C A C C G G C C u ' G u ' A C G A G A C G C G G A u ' C G A C C u ' G A G C C A G C
 u ' G G G C G G C G A C A G C G G C G G C A A G C G G C C C G C C G C C A C C A
 A G A A G G C C G G C C A G G C C A A G A A G A A G A A G u ' A A u ' G A u ' A G 40
 G C G G C C G C u ' u ' A A u ' u ' A A G C u ' G C C u ' u ' C u ' G C G G G G C u ' u ' ,
 C C u ' u ' C u ' G G C C A u ' G C C C u ' u ' C u ' u ' C u ' C u ' C C C u ' u ' G C A
 u ' G u ' A C C u ' C u ' u ' G G u ' C u ' u ' u ' G A A u ' A A A G C C u ' G A G u ' A
 A A G u ' C u ' A G A に提供されるポリヌクレオチド配列によってコードされるポリペ
 チドを含む融合タンパク質を含み、u ' が N¹-メチルシュードウリジンである。

【0499】

【0357】実施例9．脂質ナノ粒子（LNP）の調製

【0358】これらの研究で参照として使用されるLNPは、公開された手順に従って調製
 され、公開されたLNP賦形剤およびゲノム編集因子mRNAから構成される（M i l l
 e r ら、Angew. Chem. Int. Ed. 2017、56、1059-1063；

Yinら、Nature Biotechnology 2016、34、328-333) およびガイドRNA (Chadwickら、Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2017、37、1741-1747; Rossidisら、Nat. Med. 2018、24、1513-1518. doi:10.1038/s41591-018-0184-6; Dingら、Circ Res. 2014、115、488-492)。gRNAペイロードは表3から選択され、これらのLNPを構成するために使用されるmRNAペイロードMA002、MA004およびMS004は、実施例8に記載されるように調製され、SPcas9 mRNA MS002は、TriLink BioTechnologiesから購入した。参照LNP A1 (表4)は、文献 (Angew. Chem. Int. Ed. 2012、51、8529-8533) に記載のように、公開された脂質501 (表1B)、コレステロール (511)、DSPC (512) および表1BのPEG-脂質 (507または506) から構成される。同様に、ベンチマークのLNP B1およびC1は、脂質502 (WO2015/095340A1) および503 (Molecular Therapy 2018、26、1509-1519) のそれぞれから、コレステロール、DSPC、およびPEG-DMG (506 および507、表1B) と組み合わせて、表5に要約されているように構成される。報告されているゲノム編集因子ヌクレアーゼmRNAおよびガイドRNAは、参照LNPを構成するためのペイロードとして使用される。1つのアプローチにおいて、LNP製剤A1、B1およびC1は、mRNAおよびガイドRNAを共製剤化することによって作製される。この共製剤法では、mRNAとガイドRNAの比は、10:1~1:10まで変化し、インビトロおよびインビボ遺伝子編集評価用の一連のLNPが得られる。2番目のアプローチでは：ガイドRNAおよびmRNAは、表6と同じ脂質比を使用して別々に製剤化され、その後、ガイドおよびmRNAを含む事前に製剤化されたLNPを様々な比で一緒に混合して、遺伝子編集評価用の新しい一連のLNPを取得する。

10

20

【0500】

【表5】

表4. LNP A1、B1、およびC1の例示的な脂質組成

LNP 製剤	脂質	賦形剤、mol%			
		脂質	コレステ ロール	DSPC	PEG-DMG
A1	501	50	38.5	10	1.5
B1	502	45	44	9	2
C1	503	50	38.5	9	1.5

30

【0501】

【0359】実施例10. LNP F1~F25の調製

40

【0360】対照／ベンチマークLNP F1は、Molecular Therapy 2018年、26巻、1509~1519頁に記載されるように、公開された手順に従って調製された。LNPを製剤化するために、重量で1:1のガイドRNAに対するmRNA比を使用した。全LNPのサイズおよび多分散指数 (PDI) をZeta Sizer Ultra ZSU5700 (Malvern Panalytical Inc. で測定した。サイズおよびPDIは、測定に使用されるアッセイの精度およびその標準偏差に左右されることは、当業者には理解されるべきである。したがって、例えば、ここで測定されたPDIは、平均値に対して+/-10%の測定精度に供され、LNP平均径 (サイズ) は、平均値に対して+/-10%の測定精度に供される。場合によっては、例えば、測定値の変動は>10%であり得る。RNA捕捉パーセンテージは、RiboGreen

50

アッセイキット (Quant-iT (商標) RiboGreen (商標)、Invitrogen) によって測定した。当業者は、RNA 捕捉パーセンテージが、測定に採用されるアッセイの精度およびその標準偏差に左右されることを理解すべきである。したがって、例えば、各例における測定された RNA 捕捉パーセンテージは、平均値に対して + / - 10 % の測定精度に供される。場合によっては、例えば、測定値の変動において、測定精度は > 10 % であり得る。用語「RNA 捕捉パーセンテージ」、「総 RNA 捕捉パーセンテージ」、「RNA カプセル化パーセンテージ」および「総 RNA カプセル化パーセンテージ」は、各製剤化後、LNP 内にカプセル化された総 RNA の尺度として交換可能に使用される。

【0502】

504 および 513 を含む LNP F2 ~ F5 の一般的な調製方法

【0361】脂質およびアルコールを、表 5 に記載されるモル比でエタノールに溶解した。N : P 比を 3 対 12 に保持した。脂質混合物を、精密ナノシステムからの Ignite などのマイクロ流体ミキサーを用いて、Cas9 mRNA および PCSK9 gRNA (1 : 1) を含有する 50 mM クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.8) と、水 / エタノール比 3 : 1 で組み合わせた。LNP を最終 16.5 % エタノール体積で収集し、少なくとも 18 時間、透析カセットにおいて、PBS (pH 7.4) に対して透析する前の 1 時間保持した。製剤を Amicon 超遠心フィルターを用いて濃縮し、0.2 μm フィルターに通して LNP F2 ~ F5 を得た (表 5)。LNP のサイズおよび RNA 捕捉効率を上記のように決定した。場合によっては、ミキサーは T ミキサーである。場合によっては、それはクロスミキサーである。場合によっては、水 / エタノール比は 2 : 1 である。

【0503】

【0362】LNP 製剤 F6 および F7 は、F2 および F3 において 504 を置き換える表 5 に記載されるように 505 を用いて調製した。

【0363】LNP 製剤 F8 および F9 は、F2 および F3 中の 504 を置き換えることにより、表 5 に記載されるように 519 を用いて調製した。

【0504】

【0364】LNP 製剤 F10 および F11 は、F2 および F3 中の 504 を置き換えることにより、表 5 に記載されるように 508 を用いて調製した。

【0365】LNP 製剤 F12 および F13 は、F2 および F3 中の 504 を置き換えることにより、表 5 に記載されるように 509 を用いて調製した。

【0505】

【0366】LNP 製剤 F14 および F15 は、F2 および F3 中の 504 を置き換えることにより、表 5 に記載されるように 510 を用いて調製した。

【0367】LNP 製剤 F16 および F17 は、F2 および F3 中の 504 を置き換えることにより、表 5 に記載されるように 514 を用いて調製した。

【0506】

【0368】LNP 製剤 F18 および F19 は、F2 および F3 中の 504 を置き換えることにより、表 5 に記載されるように 515 を用いて調製した。

【0369】LNP 製剤 F20 および F21 は、F2 および F3 中の 504 を置き換えることにより、表 5 に記載されるように 516 を用いて調製した。

【0507】

【0370】LNP 製剤 F22 および F23 は、F2 および F3 中の 504 を置き換えることにより、表 5 に記載されるように 517 を用いて調製した。

【0371】LNP 製剤 F24 および F25 は、F2 および F3 中の 504 を置き換えることにより、表 5 に記載されるように 518 を用いて調製した。

【0508】

【0372】LNP F1 ~ F5 のインビボ PCSK9 遺伝子編集を野生型 C57BL / 6 マウスで評価し、その結果を表 5 および図 1 に要約する。

【0509】

10

20

30

40

50

【表 6】

表 5. 追加の賦形剤としての脂肪アルコールの存在下および非存在下でアミノ脂質 501 で構成された LNP F1～F5 によるマウス肝細胞における遺伝子編集

LNP ID	アミノ脂質 501 (mol %)	コレステロール/ DSPC/PEG-DMG (mol %)	アルコール (mol %)		平均径 (nm)	RNA 捕捉%	個々の動物における編集%
			504	513			
F1	50	38.5/10/1.5			104	98	0.29, 0.14, 0.27, 0.26, 0.28
F2	50	34.65/10/1.5	3.85		68.7	98	1.6, 2.1, 1.6, 0.8, 5
F3	50	30.8/10/1.5	7.7		73.6	98	5.5, 4.8, 2.9*, 9, 7.8
F4	50	34.65/10/1.5		3.85	72	98	3.4, 7.1, 1.5, 3.1, 4.2
F5	50	30.8/10/1.5		7.7	78.5	98	11, 14, 8.8, 16, 4.8*

*投薬エラーを示す

【0510】

【0373】Cas9 mRNA および PCSK9 gRNA を保有する表 5 の LNP を、野生型 C57BL/6 雌性マウス (n=5) に、LNP F1 (0.75 mg/kg) を除く 0.5 mg/kg の総 RNA 用量で静脈内 (尾静脈) 投与した。

【0511】

【0374】実施例 11. LNP F27～F43 の一般的な調製方法

【0375】LNP 賦形剤を、表 5 に記載されるモル比でエタノールに溶解した。N:P 比を 3 対 12 に保持した。脂質混合物を、Cas9 mRNA および PCSK9 gRNA GA010 (1:1) を含有する緩衝液 (pH 3.0～5.8) と、マイクロ流体ミキサー (Precision Nano Systems から入手可能なものなど) を用いて組み合わせた。場合によっては、ミキサーは T ミキサーである。場合によっては、それはクロスミキサーである。場合によっては、水/エタノール比は 2:1 である。場合によっては、水/エタノール比は 3:1 である。PEG 400 を、脂質と混合する前に RNA 含有原薬緩衝液に、PEG 400 の重量を、添加する原薬緩衝液の重量で割って計算されるある種の % で添加した。核酸カーゴに先立って PEG 400 を原薬緩衝液に添加するか、核酸カーゴとともに混合した場合、RNA を含有しない原薬緩衝液中の w/w % は、RNA を含有する原薬緩衝液中の最終的な標的 w/w % より高くなり、最終的に RNA で PEG 400 % を標的 w/w % に希釈する。LNP を収集し、透析カセット中の緩衝液 (pH 6.5～8.0) に対して少なくとも 18 時間透析し、または PD-10 カラムを介して緩衝液を交換した。製剤を濃縮し、0.2 μm フィルターに通して、LNP F27～F43 (表 6) を得た。全 LNP のサイズおよび多分散指数を Zeta Sizer Ultra ZSU5700 (Malvern Panalytical Inc.) により測定した。Invitrogen のキット Quant-iT (商標) RiboGreen (商標) を用いた RiboGreen アッセイにより、RNA の取り込み率を測定した。このデータは、以下の表 6 に示される。

【0512】

10

20

30

40

50

【表 7 - 1】

表 6. PEG400 で構成された LNP F27～F40 の投与後の C57BL/6 マウス肝臓における LNP F27

～F43 の組成、物理化学的特性および PCSK9 遺伝子編集%の概要

LNP ID	アミノ脂質, 502 (mol %)	コレステロール/ DSPC/PEG-DMG (mol %)	PEG400 (w/w) %	平均径 (nm)	RNA 捕捉%	個々の動物における編集%
F27	30-60%	40 - 70%	0	98	95.9	22.8, 23.8, 30.7, 21.5, 23.9
F28	30-60%	40 - 70%	0.25	96.2	95.8	23.7, 23.3, 24.0, 29.2, 34.0
F29	30-60%	40 - 70%	0.50	94.8	96.2	1.8*, 24, 2*, 30, 32.8
F30	30-60%	40 - 70%	0.75	95.5	95.2	31, 29.0 22.0, 27.0, 23.0
F31	30-60%	40 - 70%	0	97.6	96.29	49.7, 50.5, 12.3, 51.5, 4.6*
F32	30-60%	40 - 70%	0.5	97.3	95.1	56.0, 39.2, 57.1, 40.4 3.0*
F33	30-60%	40 - 70%	5	98.4	95.92	58.1, 39.8 51.2, 46.0, 52.7
F34	30-60%	40 - 70%	10	97.2	96.1	46.3, 45.8, 57.7, 4.3* 54.1
F35	30-60%	40 - 70%	15	101	95.2	54.3, 53.6 56.1, 53.0, 57.2
F36	30-60%	40 - 70%	0	93.1	92.45	44.7, 48.6 47.3, 3.2* 49.2
F37	30-60%	40 - 70%	0.5	87.8	94.09	39.3, 18.2 53.9, 40.2, 33.5
F38	30-60%	40 - 70%	5	92.4	93.68	50.4, 49.4, 50.2, 48.8, 48.7
F39	30-60%	40 - 70%	10	88.2	94.29	7.1*, 44.7, 2.9*, 58.5, 50.1
F40	30-60%	40 - 70%	15	87.1	97.05	48.4, 44.0, 38.3, 49.2, 48.8
F41	30-60%	40 - 70%	0	86.9	82.7	N/A
F42	30-60%	40 - 70%	0.5	85.7	85.4	N/A

【 0 5 1 3 】

10

20

30

40

50

【表 7 - 2】

F43	30-60%	40 - 70%	0.5(薬物製造物 (「DP」) 緩衝液中)	95.6	88.3	N/A

[0376]*注入を怠った/不完全な用量を示す。表 6 の全 LNP を野生型 C57BL/6 雌性マウス (n=5)に投与し、肝臓における編集%を一覧にする。総 RNA 用量:0.5 または 2mg/kg。

10

【 0 5 1 4 】

【表 8】

表 7: 表 6 から選択された LNP を構成するために使用された PEG400 の量に関する、LNP 中に捕捉された PEG400%

試料	製剤に添加された PEG400(mg)	製剤化後の捕捉された PEG400 の測定%
F27	0	0
F28	0.25	20
F29	0.5	30
F30	0.75	33
F31	0	0
F32	0.5	24
F33	5	8.9
F34	10	16.4
F35	15	25.2
F36	0	0
F37	0.5	14
F38	5	30
F39	10	26
F40	15	13.3

20

30

【 0 5 1 5 】

[0377]表 7 の P E G 4 0 0 のカプセル化%を H P L C を用いて測定した。予め製剤化され捕捉された P E G 4 0 0 の H P L C ピーク面積を用いて、カプセル化%を計算した。

40

[0378] P E G 4 0 0 で調製した L N P の安定性、特に 2 ~ 8 °C または - 8 0 °C での保存後の安定性。ペイロードへの P E G 4 0 0 の添加は、カプセル化効率を増加させ、凍結 - 解凍サイクルおよび / または保存後の L N P 安定性を改善する。凍結緩衝液は、p H が 6 . 5 ~ 8 . 5 の範囲で、濃度が 1 0 ~ 1 0 0 m M の緩衝液である。場合によっては、P E G 4 0 0 を 0 ~ 5 0 (w / w) % 含有する。0 ~ 1 0 0 凍結融解サイクルを行い、以下の命名法を用いて説明する: T₀ は凍結前のサンプルを示し、T_x は凍結融解サイクルの X 回数に続くサンプルである。場合によっては、凍結融解サイクル数は 3 であり、記号 T₃ で示される。

【 0 5 1 6 】

50

【表 9】

表 8: 0 および 3 回の凍結/解凍サイクル後の表 6 および図 3 に記載された LNP の特徴
付け結果。LNP を-80℃で保存した。

LNP	凍結前			3 回の凍結融解サイクル後		
	平均径 (nm)	PDI*	RNA 捕捉%	平均径 (nm)	PDI*	RNA 捕捉%
F41	86.9	0.0029	82.7	85	0.09	81.1
F42	85.7	0.04	85.4	88.3	0.05	82.5
F43	95.6	0.09	88.3	95.8	0.11	82.9

*PDI:多分散指数

【0517】

【0379】原薬緩衝液の重量に対して 0～50 w/w % の範囲の PEG 400 を、LNP を構成するエタノール中の脂質賦形剤と混合する前に、水性緩衝液中の原薬 (mRNA + gRNA) と混合し、生成した LNP を 2 つの半分に分割した。第 1 の半分は冷室条件 (2～8℃) で保存し、第 2 の半分は凍結し、-80℃で保存した。凍結 LNP を 0～50 サイクルの範囲で解凍した。Z 平均サイズ、mRNA カプセル化パーセンテージ、ゲル電気泳動による RNA 分解、および HPLC 法による RNA 安定性を測定した。使用した HPLC 法は、蒸発光散乱検出 (IP-RPLC-HPLC-ELSD) を用いたイオン対逆相高速液体クロマトグラフィーであり、入力量に関して各サンプル中の PEG 400 % を定量した。-80℃で凍結保存した LNP を解凍し、野生型 C57BL/6 雌性マウスに静脈内投与し、遺伝子編集を評価した。冷室で保存した対応する LNP を、各冷凍 LNP 製剤の参照として使用した。対応する PEG 400 不含 LNP を -80℃と冷室貯蔵の両方の対照として使用する。

【0518】

【0380】実施例 12. -80℃で保存した LNP のインビトロ評価

【0381】解凍後 -80℃で保存した PEG 400 で構成された LNP の効率のインビトロ編集を、インキュベーション培地中の ApoE の存在下および非存在下で、マウス、ラット、非ヒト霊長類およびヒト由来の不死化細胞株と初代細胞の両方とインキュベートして、編集効率を評価する。対応するコールドルームに保存された LNP は、研究の参照として使用される。編集率は、実施例 13 に記載されるように、次世代シーケンシング (NGS) および編集効率の分析を用いて決定された。

【0519】

【0382】場合によっては、同一の脂質組成の複数の溶液が、所望の LNP を得るために製剤化される。場合によっては、カーゴは eGFP をコードする mRNA である。他の場合では、カーゴは Cas9 mRNA であり、遺伝子編集のためのガイド RNA である。LNP の中には、原薬緩衝液中に 0.001～50 (w/w) % の PEG 400 を含むものもあるが、少なくとも 1 つの他の LNP は PEG 400 を含まない。PEG 400 を含有する LNP を少なくとも 2 つの画分に分割し、次に、緩衝液を凍結緩衝液、0.05～50 w/w % の PEG 400 を含有する凍結緩衝液、または PBS に交換する。PEG 400 を含まない LNP を少なくとも 3 つの画分に分割し、次に、緩衝液を凍結緩衝液、0.05～50 w/w % の PEG 400 を含有する凍結緩衝液、または PBS に交換する。各 LNP および緩衝液の組合せは、少なくとも 2 つのサンプルに分割され、一方のサンプルは 2～8℃ (T₀) に保持され、他方は -80℃で凍結される。-80℃のサンプルを解凍し、合計 1～50 回凍結する (T_x)。次に、細胞を 96 ウェルプレート中のウェル

あたり適切な密度でプレーティングし、各 L N P 中にカプセル化された所定量の m R N A を細胞に送達する（3 ウェル以上の N）。G F P 発現は、細胞に L N P を投与した 2 4 ～ 7 2 時間後にプレートリーダーを用いて測定する。場合によっては、全てのサンプルが凍結緩衝液中にあったが、原薬緩衝液または凍結緩衝液中の P E G 4 0 0 を含まない L N P は、非凍結 T₀ サンプルと凍結／解凍サイクル T₃ サンプルの間の G F P 発現において統計的に有意な減少を示した。P E G 4 0 0 は、3 回の凍結／解凍サイクルの間に有効性の損失を被らなかったため、凍結または原薬緩衝液に含めることによって R N A の安定性および機能性を改善した。

【0520】

インビトロでのトランスフェクション

[0383] 初代肝細胞：B i o I V T 由来の初代ヒト肝細胞（P H H）、初代カニクイザル肝細胞（P C H）、または初代マウス肝細胞（P M H）を製造業者のプロトコールに従って培養した。簡単に述べると、細胞を解凍し、肝細胞解凍培地に再懸濁した後、1 0 0 g で 1 0 分間、4 °C で遠心分離し、上清を捨て、ペレット化した細胞を肝細胞プレーティング培地に再懸濁した。各バイアルには約 5 0 0 万個の細胞が含まれており、これを用いて 2 4 ウェルプレート 1 個にプレーティングした。プレーティングした細胞を 5 % C O₂ 雰囲気下で 3 7 °C の組織培養インキュベーター中で 4 ～ 6 時間沈殿させ、付着させた。インキュベーション後、細胞を単層形成について調べた。次に、インキュベーション培地を新鮮な肝細胞維持培地（細胞株の提供者である B i o I V T から得られた完全な I N V I T R O G R O 培地）に置き換えた。こうして細胞はトランスフェクションの準備ができた。T h e r m o F i s h e r の M e s s e n g e r M A X をトランスフェクションに用いる。溶液 A：所望量のガイド R N A を、O p t i M E M 中の m R N A の 1：1 重量比で混合する。溶液 B：O p t i M E M における M e s s e n g e r M A X。溶液 A および B を混合した後、混合物を室温で 2 0 分間インキュベートした。インキュベートした溶液の 6 0 μ L を各細胞ウェルに滴下した。次に、細胞を 3 7 °C で 3 日間放置した。細胞を回収し、T h e r m o K i n g f i s h e r を用いてゲノム D N A 抽出のために調製した。抽出したゲノム D N A を P C R で処理し、遺伝子編集を分析した。次に、増幅された P C R 産物を N G S（M i S e q）に供した。

【0521】

g D N A の単離

[0384] ゲノム D N A は、K i n g F i s h e r F l e x 自動抽出装置（T h e r m o - F i s h e r S c i e n t i f i c）上のビーズベース抽出キット、M a g M A X - 9 6 D N A M u l t i - S a m p l e K i t（T h e r m o - F i s h e r S c i e n t i f i c）を用いて、製造業者のプロトコールに従って、約 2 0 m L のサル肝溶解物から単離された。サル肝臓は、製造業者のプロトコールに従って F a s t P r e p - 2 4 システム（M P B i o）を用いて溶解した。0 . 5 m L の P B S を用いて、肝臓を 2 m L の溶解マトリックスチューブ（M P B i o）に装填した。抽出したゲノム D N A は、さらに使用するまで 4 °C で、または長期保存のために - 8 0 °C で保存した。

【0522】

実施例 1 3：P E G 4 0 0 の存在下および非存在下、- 8 0 °C で保存した L N P のインビボ評価

[0385] 低温 - 室温で P E G 4 0 0 の存在下および非存在下で構成された L N P のインビボ編集効率、ならびに - 8 0 °C で保存された対応する L N P を、表 6 に記載されるように決定した。

【0523】

[0386] 場合によっては、C 5 7 B L 6 および L D L r - / - マウスが使用され、処置群あたり少なくとも 3 匹の動物が使用される。動物は、0 . 0 5 m g / k g から 2 m g / k g までの範囲の用量で、静脈内または後眼窩投与によって注射される。次に、マウスを 0 ～ 1 4 日後に殺し、組織を回収し、処理し、次世代シーケンシングにより肝臓を分析して、標的遺伝子における編集を行う。場合によっては、L N P は商業的または内部生

10

20

30

40

50

成された Cas9 mRNA および 関連ガイド RNA を含有する。ほとんどの場合、実験のエンドポイントは、標的遺伝子における肝臓編集パーセンテージである。

【0524】

【0387】同一の脂質組成 LNP は、0～50 (w/w) % の PEG400 で製剤化される。次に、それらを PBS 中または凍結緩衝液中に緩衝液交換し、次に 2～8℃ または -80℃ で保存する。次に、上記のように LNP をマウスに注射し、肝臓を回収し、肝臓編集パーセンテージについて分析する。

【0525】

【0388】0～50 (w/w) % の PEG400 で製剤化した LNP を 0～50 回の凍結／解凍サイクルに供する。次に、それらをマウスに注射し、肝臓の肝臓編集パーセンテージを分析する。0～50 (w/w) % の PEG400 で製剤化した LNP の安定性を、2～8℃ または -80℃ で製剤化後、0分～52週間で RNA 分解および構造完全性についてモニタリングした。

【0526】

【0389】実施例 10～23 のいくつかの製剤化された LNP の遺伝子編集活性を、野生型げっ歯類モデルおよび非ヒト霊長類において評価した。

【0390】マウスは、動物の世話、取り扱い、および終了に関する施設の倫理ガイドラインに従って処理した。マウスは病原体のない施設で飼育し、標準的な餌および水を自由に摂取できるようにした。マウスには、体重に応じて後眼窩経路により、試験物質または媒体としての PBS を投与した。投与後 5 日目または 6 日目に関連組織を採取した。ゲノム DNA を抽出し、標的配列のパーセント編集を、次世代シーケンシングによって評価して編集効率を決定し、結果を図 4～18 に示す。

【0527】

ゲノム DNA 単離

【0391】製造業者のプロトコールに従って、KingFisher Flex 自動抽出装置 (ThermoFisher Scientific) で、ビーズベースの抽出キット、MagMAX-96 DNA マルチサンプルキット (ThermoFisher Scientific) を使用して、約 20 μL の全マウス肝臓溶解物からゲノム DNA を単離した。製造業者のプロトコールに従って、FastPrep-24 システム (MP Bio) を使用して、マウスの肝臓全体を溶解した。0.5 mL の PBS を含む 2 mL の溶解マトリックスチューブ (MP Bio) に肝臓をロードした。抽出したゲノム DNA は、さらに使用するまで 4℃ で保存するか、長期保存のために -80℃ で保存した。

【0528】

次世代シーケンシング (NGS) および編集効率の解析

【0392】次世代シーケンシング、すなわち、ディープシーケンシングを目的の領域で行い、遺伝子編集の程度を決定した。サンプルは、製造業者のプロトコールに従って、Nextera XT DNA ライブラリー調製キット (Illumina) を用いて調製した。簡単に述べると、最初に、2 ラウンドの PCR を行って、目的の領域を増幅し、次に、ディープシーケンシングおよびサンプル同定に必要な DNA 配列を最初の生成物に加えた。最終アンプリコンを、Illumina MiSeq 装置上で、製造業者のプロトコールに従って配列決定した。

【0529】

【0393】CRISPResso2 パイプライン (<https://www.nature.com/articles/s41587-019-0032-3>) を用いて対になった末端読み取りを分析した。簡単に述べると、低品質の読み取りをフィルターにかけ、読み取りからアダプター配列をトリミングし、対になった末端読み取りをマージし、アンプリコン配列に整列させた。編集パーセンテージは、整列された読み取りの総数に対して、挿入または欠失をサポートする読み取りの数として計算された。Cas9 の場合、編集パーセンテージは、整列された読み取りの総数に対して、挿入または欠失をサポートする読み取り数として計算された。ABE の場合、編集ウィンドウ上の A から G への変更から

10

20

30

40

50

編集パーセンテージを推定した。

【0530】

CRISPResso2パイプラインを用いて対になった末端読み取りを分析した
[0394] (<https://www.nature.com/articles/s41587-019-0032-3>)。簡単に述べると、低品質の読み取りをフィルターにかけ、読み取りからアダプター配列をトリミングし、対になった末端読み取りをマージし、アンプリコン配列に整列させた。編集パーセンテージは、整列された読み取りの総数に対して、挿入または欠失をサポートする読み取りの数として計算された。Cas9の場合、編集パーセンテージは、整列された読み取りの総数に対して、挿入または欠失をサポートする読み取りの数として計算された。ABEの場合、編集ウィンドウ上のAからGへの変更から編集パーセンテージを推定した。

10

【0531】

次世代シーケンシング (NGS) と編集効率の分析

[0395] 遺伝子編集の程度を決定するために、次世代シーケンシング (NGS) またはディープシーケンシングを目的の領域に対して実施した。製造業者のプロトコールに従って、Nextera XT DNAライブラリー調製キット (Illumina) を使用してサンプルを調製した。簡単に言えば、最初に目的の領域を増幅するために、2ラウンドのPCRを実行し、次にディープシーケンシングおよびサンプル識別に必要なDNA配列を最初の製品に追加した。最終的なアンプリコンは、製造業者のプロトコールに従ってIllumina MiSeq装置で配列決定した。ペアエンド読み取りは、CRISPResso2パイプラインで分析した (Clement, K., Rees, H., Canver, M. C. ら, CRISPResso2 provides accurate and rapid genome editing sequence analysis. Nat Biotechnol 37, 224–226 (2019) を参照のこと)。要するに、低品質の読み取りを除外し、アダプター配列を読み取りからトリミングして、ペアエンド読み取りをマージして、アンプリコン配列に整列させた。編集の割合は、整列された読み取りの総数に対する、挿入または削除をサポートする読み取りの数として計算した。Cas9の場合、編集の割合は、整列された読み取りの総数に対する、挿入または削除をサポートする読み取りの数として計算した。

20

【0532】

[0396] 実施例 14. LNP F45~F91、F94~F96、F110、F123~F125、およびF143~F150の調製

30

[0397] LNP F45~F91、F94~F96、F110、F123~F125、およびF143~F150の一般的な調製方法。

【0533】

[0398] 脂質をエタノールに溶解した。イオン化可能な脂質は最終モル比40%~70%でLNPに含まれた。構造脂質は最終モル比30%~60%でLNPに含まれた。ヘルパー脂質は最終モル比2%~25%でLNPに含まれた。ステルス脂質は最終モル比0.5%~5%でLNPに含まれた。N:P比を3対12に保持した。

【0534】

40

[0399] 脂質混合物を、SpCas9 mRNAおよびgRNA (1:1) を含有する50mMクエン酸ナトリウム緩衝液 (pH4.0~6.0)、またはABE mRNAおよびガイドRNA (比2:1、3:1、6:1、1:1、1:2、1:3、または1:6) 中の0.5%のPEG400 (Millipore Sigma) と、マイクロ流体ミキサーを用いて水/エタノール比3:1で組み合わせた。場合によっては、ミキサーは、ナノアSEMBラー (Precision Nanosystems) である。場合によっては、ミキサーはTミキサーである。場合によっては、それはクロスミキサーである。場合によっては、水/エタノール比は2:1である。

【0535】

[0400] LNPを8.25%または16.5%の最終エタノール体積で収集し、PD-

50

10 カラム (GE Healthcare)、透析、または接線流濾過 (TFF) プロセスを用いて、緩衝液を PBS または Tris 緩衝液に交換する前に 1 時間保持した。場合によっては、LNP を 16.5% エタノールで収集し、次に、緩衝液交換前に、製剤化直後または 1 時間保持時間後のいずれかで、8.25% エタノールに希釈した。場合によっては、製剤を Amicon 超遠心フィルター (100 kDa) を用いて濃縮し、0.2 μm フィルターに通して LNP を得た。LNP のサイズおよび RNA 捕捉効率は、実施例 D 11 に記載されるように行われた。

【0536】

[0401] LNP の例は、表 9 および表 10 に詳述される。F66 ~ F68、F94、F95、および F123 製剤は、交差混合または T 混合を用いて作製された。F52 ~ F58 は、比 2 : 1、3 : 1、6 : 1、1 : 1、1 : 2、1 : 3、または 1 : 6 で RNA をガイドするための ABE mRNA を構成する。F65 は F64 と同様に製剤化されたが、ステルス脂質として 506 を用いた。F69 ~ F83 および F147 ~ F150 は、製剤 mol% 空間を探索する実験計画 (DOE) を構成する。DOE は JMP ソフトウェアを用いて設計された。

10

【0537】

[0402] LNP 肝臓編集を図 4 ~ 10 および図 17 にグラフ化する。

【0538】

20

30

40

50

【表 10 - 1】

表 9. 評価のために調製された LNP 組成

LNP	mRNA	gRNA	用量 (mg/kg)	アミノ 脂質 502 mol %	構造脂質 (コレステ ロール) mol %	ヘルバ ー脂質 (DSPC) mol %	ステルス脂 質* Mol %	N:P	PEG400 w/w%
F45	MS004	GA055	0.25	47.1	47.45	4.7	0.75	4.5	0.5
F46	MS004	GA055	0.25	47.1	46.95	4.7	1.25	4.5	0.5
F47	MS004	GA055	0.25	40	53.2	4.7	2.1	8	0.5
F48	MS004	GA055	0.25	55	37.2	4.7	2.1	8	0.5
F49	MS004	GA055	0.25	47	46.2	4.7	2.1	8	0.5
F50	MS004	GA055	0.25	40	53.2	4.7	2.1	4.5	0.5
F51	MS004	GA055	0.25	55	37.2	4.7	2.1	4.5	0.5
F52	MA002	GA256	0.05	47.1	46.1	4.7	2.1	4.5	0.5
F53	MA002	GA256	0.05	47.1	46.1	4.7	2.1	4.5	0.5
F54	MA002	GA256	0.05	47.1	46.1	4.7	2.1	4.5	0.5
F55	MA002	GA256	0.05	47.1	46.1	4.7	2.1	4.5	0.5
F56	MA002	GA256	0.05	47.1	46.1	4.7	2.1	4.5	0.5
F57	MA002	GA256	0.05	47.1	46.1	4.7	2.1	4.5	0.5
F58	MA002	GA256	0.05	47.1	46.1	4.7	2.1	4.5	0.5
F59	MA002	GA255	0.05	47.1	46.1	4.7	2.1	4.5	0.5
F60	MA002	GA257	0.05	47.1	46.1	4.7	2.1	4.5	0.5
F32	MS004	GA055	0.25	47.1	46.1	4.7	2.1	4.5	0.5
F61	MS004	GA055	0.25	55	38.2	4.7	2.1	8	0.5
F62	MS004	GA055	0.25	55	38.2	4.7	2.1	6	0.5
F63	MS004	GA055	0.25	47.1	46.1	4.7	2.1	6	0.5
F64	MS004	GA055	0.5	47.1	46.1	4.7	2.1	4.5	0.5
F65	MS004	GA055	0.5	47.1	46.1	4.7	2.1	4.5	0.5
F66	MS002	GA010	2	47.1	46.1	4.7	2.1	4.5	0.5
F67	MS002	GA010	2	47.1	46.1	4.7	2.1	4.5	0.5
F68	MS002	GA010	2	47.1	46.1	4.7	2.1	4.5	0.5
F69	MS004	GA055	0.25	62.9	30.3	4.7	2.1	8	0.5
F70	MS004	GA055	0.25	47.1	46.1	4.7	2.1	8	0.5
F71	MS004	GA055	0.25	47.1	30.3	20.5	2.1	8	0.5
F72	MS004	GA055	0.25	55	30.3	12.6	2.1	8	0.5
F73	MS004	GA055	0.25	55	38.2	4.7	2.1	8	0.5
F74	MS004	GA055	0.25	47.1	38.2	12.6	2.1	8	0.5
F75	MS004	GA055	0.25	52.37	35.57	9.96	2.1	8	0.5
F76	MS004	GA055	0.25	55	30.3	12.6	2.1	6	0.5
F77	MS004	GA055	0.25	55	38.2	4.7	2.1	6	0.5
F78	MS004	GA055	0.25	47.1	38.2	12.6	2.1	6	0.5
F79	MS004	GA055	0.25	52.37	35.57	9.96	2.1	6	0.5
F80	MS004	GA055	0.25	55	37.3	4.7	3	8	0.5
F81	MS004	GA055	0.25	55	37.3	4.7	3	6	
F82	MS004	GA055	0.25	55	38.2	4.7	2.1	8	0.5
F83	MS004	GA055	0.25	47.1	46.1	4.7	2.1	8	0.5
F84	MA004	GA256	0.05	55	38.2	4.7	2.1	8	0.5

【 0 5 3 9 】

10

20

30

40

50

【表 10 - 2】

F85	MA004	GA256	0.05	55	38.2	4.7	2.1	8	0.5
F86	MA004	GA256	0.05	55	38.2	4.7	2.1	8	0.5
F87	MA004	GA256	0.05	55	38.2	4.7	2.1	8	0.5
F88	MA004	GA256	0.05	55	37.8	4.7	2.5	8	0.5
F89	MA004	GA256	0.05	55	37.3	4.7	3	8	0.5
F90	MA004	GA256	0.05	55	36.8	4.7	3.5	8	0.5
F91	MA004	GA256	0.05	55	36.3	4.7	4	8	0.5
F94	MS002	GA055	0.5	47.1	46.1	4.7	2.1	4.5	0.5
F95	MS002	GA055	0.5	47.1	46.1	4.7	2.1	4.5	0.5
F96	MA004	GA256	0.05	55	38.2	4.7	2.1	8	0.5
F110	MS004	GA055	0.5	47.1	46.1	4.7	2.1	4.5	0.5
F123	MS004	GA055	0.5	55	38.2	4.7	2.1	8	0
F124	MS002	GA010	2	47.1	46.1	4.7	2.1	4.5	0.5
F125	MA004	GA256	0.05	55	38.2	4.7	2.1	8	0.5
F143	MS002	GA010	2	47.1	43.95	6.85	2.1	4.5	0.5
F144	MS002	GA010	2	47.1	48.45	2.35	2.1	4.5	0.5
F145	MS002	GA010	2	47.1	46.1	4.7	2.1	6	0.5
F146	MS002	GA010	2	47.1	46.1	4.7	2.1	8	0.5
F147	MS004	GA055	0.25	52.37	34.67	9.96	3	8	0.5
F148	MS004	GA055	0.25	49	39.5	9.4	2.1	8	0.5
F149	MS004	GA055	0.25	52	38.9	7	2.1	8	0.5
F150	MS004	GA055	0.25	50	36.9	11	2.1	8	0.5

10

20

【0540】

【0403】表9の選択されたLNPを、野生型C57BL/6雌性マウス（n=5）に静脈内投与した（尾静脈またはRO）。総RNA用量は、表に示されている通りであり、mRNAおよびガイドRNAも併せて記載される。N:P比は3.5～10.0の範囲である。各LNPの肝臓編集パーセントデータを図4～10および図17にグラフ化した。

【0541】

30

40

50

【表 1 1 - 1】

表 10. 滅菌濾過前後の表 9 に記載された LNP5 の特徴付け

LNP	緩衝液交換 プロセス	濃縮プ ロセス	DP 緩 衝液	平均径 (nm)	滅菌濾過後の 平均径 (nm)	製剤化後の PDI	PDI 滅菌 濾過	RNA カプ セル化%
F45	PD-10	Amicon	PBS	100	146	0.0724	0.0332	98.62
F46	PD-10	Amicon	PBS	98.2	126	0.0669	0.0521	97.77
F47	PD-10	Amicon	PBS	70	73.8	0.122	0.05	97.42
F48	PD-10	Amicon	PBS	93.8	122	0.0252	0.0382	94.63
F49	PD-10	Amicon	PBS	80.7	92.6	0.0482	0.0237	97.7
F50	PD-10	Amicon	PBS	66.9	86.2	0.123	0.0436	97.81
F51	PD-10	Amicon	PBS	89.4	148	0.0489	0.0797	86.33
F52	PD-10	Amicon	PBS	81.3	95.6	0.0682	0.1	96.82
F53	PD-10		PBS	77.4	94.3	0.03	0.0595	95.95
F54	PD-10		PBS	82.6	94	0.0749	0.0561	96.38
F55	PD-10		PBS	81.7	94.3	0.0774	0.0385	95.769
F56	PD-10		PBS	80.3	89	0.0548	0.0648	97.61
F57	PD-10		PBS	80.2	87.3	0.0878	0.0143	97.78
F58	PD-10		PBS	70.8	83.2	0.0525	0.0585	98.67
F59	PD-10	Amicon	PBS	79.1	92.2	0.0781	0.0683	97.82
F60	PD-10	Amicon	PBS	99.2	91.1	0.125	0.07	97.56
F32	PD-10	Amicon	PBS	87.47	101.8	0.08111	0.04155	96.54463
F61	PD-10	Amicon	PBS	106.3	139.5	0.05689	0.04	91.4516
F62	PD-10	Amicon	PBS	105.7	135.1	0.0374	0.0727	90.32308
F63	PD-10	Amicon	PBS	88.687	106.1	0.09242	0.06402	97.01425
F64	PD-10	Amicon	Tris	76.3	86.5	0.0516	0.0633	89.28
F65	PD-10	Amicon	Tris	79.9	95.6	0.06	0.0461	86.82
F66	PD-10	Amicon	Tris	89.2	94.8	0.11	0.0995	91.75
F67	TFF (再生セ ルロース)	TFF	Tris	90.3	87.8	0.0605	0.00292	95.5
F68	TFF (再生セ ルロース)	TFF	Tris	87.5	87.2	0.0731	0.0195	97.56
F69	PD-10		Tris	111	141.6907	0.065	0.07	78.4
F70	PD-10		Tris	86.4	83.29661	0.0916	0.0836	88.62
F71	PD-10		Tris	72.7	80.61017	0.11	0.0186	92.09
F72	PD-10		Tris	95.5	100.0551	0.07	0.087	88.97
F73	PD-10		Tris	93.5	108.3305	0.07	0.0526	84.67
F74	PD-10		Tris	79.4	80.716	0.144	0.0533	91.3
F75	PD-10		Tris	86.8	96.402	0.057	0.0221	85.7
F76	PD-10		Tris	101	100.9025	0.05	0.046	87.7
F77	PD-10		Tris	94.2	97.62712	0.0435	0.059667	88.5
F78	PD-10		Tris	81.6	97.91102	0.078	0.0553	87.25
F79	PD-10		Tris	96.2	97.1822	0.0872	0.0536	87.39
F80	PD-10		Tris	84.9	91.69068	0.07	0.022333	84.72
F81	PD-10		Tris	83.6	89.73305	0.07	0.038667	80.82
F82	PD-10		Tris	53.5	72.08	0.10	0.0325	91.08
F83	PD-10		Tris		76.95		0.05	90.81

【0 5 4 2】

10

20

30

40

50

【表 1 1 - 2】

F84	透析		Tris	107	115	0.14	0.0414	91.99
F85	透析		Tris	102	116	0.0365	0.0283	93.8
F86	透析		Tris	98.4	106	0.0595	0.0277	93.93
F87	透析		Tris	62.1	86.9	0.156	0.0117	92.88
F88	透析		Tris	101	96.2	0.144	0.067	92.88
F89	透析		Tris	92.5	108	0.0809	0.047	93.17
F90	透析		Tris	83	96.1	0.0267	0.0225	88.39
F91	透析		Tris	79.8	88.5	0.0342	0.0156	90.6
F94	PD-10		Tris	89	92	0.05	0.07	83.94
F95	PD-10		Tris	83	83	0.09	0.07	85.97
F96	透析		Tris	94.8	111	0.00586	0.00686	94.89
F110	TFF (再生セルコース)	TFF	Tris		84.28		0.06117	
F123	TFF (再生セルコース)	TFF	Tris	109	116	0.105	0.00776	92.3
F124	TFF (再生セルコース)	TFF	Tris	87.6	85.4	0.05	0.04	94.9
F125	透析			97.1	87.2	0.0576	0.006	97.29
F143	PD-10		PBS	71	97.3	0.0676	0.00411	95.92129
F144	PD-10	Amicon	PBS	68.9	98.2	0.0219	0.0284	96.17695
F145	PD-10	Amicon	PBS	70.9	91.9	0.0151	0.0118	98.22026
F146	PD-10	Amicon	PBS	73.8	89.6	0.0273	0.0141	98.50496
F147	PD-10		Tris	83.7	102.58	0.108	0.036	91.24
F148	PD-10		Tris	85.2	119.07	0.0789	0.017	95.16
F149	PD-10		Tris	93.9	137.11	0.0759	0.067	93.95
F150	PD-10		Tris	88.3	117.96	0.0728	0.01	94.69

【0543】

【0404】表 10 の選択された LNP を、野生型 C57BL/6 雌性マウス (n = 5) に静脈内投与した (尾静脈または RO)。LNP は、pH 4.0 ~ 6 の原薬緩衝液で製剤化した。総 RNA 用量は、表に示されている通りであり、mRNA およびガイド RNA も併せて記載される。各 LNP の肝臓編集パーセントデータを図 4 ~ 10 および図 17 にグラフ化した。

【0544】

【0405】実施例 15. lipid N:P 比を介した LNP F92 および F97 ~ F100 の一般的な調製方法

【0406】脂質をエタノールに溶解した。mRNA およびガイド RNA (ABE mRNA およびガイド RNA (1:1)) または SpCas9 mRNA および gRNA (1:1) を、0.67 wt% の PEG400 を含有する 67 mM クエン酸緩衝液に添加して、0.5% の PEG400 を含有する 50 mM クエン酸緩衝液を作製した。イオン化可能な脂質を、ある量でクエン酸緩衝液を含有する RNA に添加して、RNA の「P」(N:P に基づく) の 0.1 ~ 99% の間で中和する。得られた溶液を室温で少なくとも 15 分間インキュベートした。

【0545】

【0407】残りの脂質 (残りの lipid + ヘルパー脂質 + 構造脂質 + ステルス脂質) をエタノールに溶解した。イオン化可能な脂質は最終モル比 40% ~ 70% で LNP に含まれた。構造脂質は最終モル比 30% ~ 60% で LNP に含まれた。ヘルパー脂質は最終モル比 2% ~ 25% で LNP に含まれた。ステルス脂質は最終モル比 0.5% ~ 5% で LNP に含まれた。N:P 比を 3 対 12 に保持した。

【0546】

【0408】脂質混合物を、上記のRNA含有クエン酸緩衝液と、マイクロ流体ミキサーを用いて3：1の水／エタノール比で組み合わせた。場合によっては、ミキサーは、ナノアセンブラー（Precision Nanosystems）である。場合によっては、ミキサーはTミキサーである。場合によっては、それはクロスミキサーである。場合によっては、水／エタノール比は2：1である。

【0547】

【0409】LNPを最終16.5％エタノール体積で収集し、PD-10カラム（GE Healthcare）、透析、または接線流濾過（TFF）プロセスを用いて、緩衝液をPBSまたはTris緩衝液に交換する前に1時間保持した。場合によっては、LNPは、16.5％エタノールで収集され、次に、製剤化後直ちにまたは1時間の保持時間後に、緩衝液交換される前に、8.25％エタノールに希釈される。場合によっては、製剤をAmicon超遠心フィルター（100kDa）を用いて濃縮し、0.2μmフィルターに通してLNPを得る。LNPのサイズおよびRNA捕捉効率は、実施例11に記載されるように行われた。

【0548】

【0410】場合によっては、クエン酸緩衝液は一方の流れを構成し、N：Pベースで0.1～90％を中和するのに十分なアミノ脂質の一部、全てのmRNA、および全てのガイドRNAは他方の流れにある。それらはミキサー（マイクロ流体、Tミキサー、クロスミキサーなど）を用いて混合される。次に、得られた溶液は、次の混合事象における水性流であり、残りの脂質は脂質流を構成する。2つの流れは、ミキサーを使用して混合される。次に、得られたLNPを1時間保持し、透析、PD-10、またはTFFを介してTrisまたはPBSに緩衝液交換し、次にマウスに注射する。

【0549】

【0411】LNPの例を表11に記載する。LNP肝臓編集を図11にグラフ化する。F92、F97、F98、F99、およびF100は、N：Pベースでそれぞれ10％、15％、25％、50％、および75％の中和を示した。

【0550】

【表12】

表 11. 野生型 C57BL/6 マウスにおける LNP F92 および F97～F100 の LNP 組成および特徴付け

LNP	mol %				N:P	平均径 (nm)		PDI		カプセル化%
	アミノ脂質 502	構造脂質 (コレステロール)	ヘルパー脂質 (DSPC)	ステルス脂質 (表 1B からの PEG-脂質)		a	b	a	b	
F92	55	38.2	4.7	2.1	8	95.7	103	0.04	0.00622	93.1
F97	55	38.2	4.7	2.1	8	88.1	114	0.00695	0.023	87.53
F98	55	38.2	4.7	2.1	8	87.5	113	0.0423	0.032	83.07
F99	55	38.2	4.7	2.1	8	86.3	114	0.0602	0.002	70.33
F100	55	38.2	4.7	2.1	8	83.5	124	0.102	0.0583	48.25

a: 製剤化後、b:滅菌後濾過後。ステルス脂質: 507

【0551】

【0412】表 11 の全ての LNP を、野生型 C57BL/6 雌性マウス（n = 5）に、用

量 0.5 mg / kg (総 RNA) ; mRNA : MA004 および gRNA : GA256 で静脈内投与した (RO)。総 RNA 用量は、表に示されている通りであり、mRNA およびガイド RNA も併せて記載される。アミノ脂質 502 を、RNA 含有クエン酸緩衝液 (残りの脂質成分と混合する前) に、それぞれ RNA の「P」の 10%、15%、25%、50%、および 75% (N : P に基づく) を中和し、F92、F97、F98、F99、F100 を生成するのに十分な量で添加した。全ての製剤は PEG400、0.5 w / w % を含有する。各 LNP の N : P 比範囲 3.5 ~ 10.0 の肝臓編集パーセントデータを図 11 にグラフ化する。

【0552】

[0413] 実施例 16. 低分子量キトサンを含む LNP F93、F101 ~ F103、および F155 の一般的な調製方法

[0414] 脂質をエタノールに溶解した。低分子量キトサン (Sigma Aldrich) を、0.1 ~ 5 mg / mL の濃度で 0.67 wt % の PEG400 を含有する 67 mM クエン酸緩衝液に懸濁した。1N HCl を、キトサンが溶液に溶解するまで滴下した。mRNA およびガイド RNA (ABE mRNA およびガイド RNA (1 : 1) または SpCas9 mRNA および gRNA (1 : 1)) を、0.67 % の PEG400 を含有する 67 mM クエン酸緩衝液に添加して、0.5 % の PEG400 (pH 4.0 ~ 6.0) を含有する 50 mM クエン酸緩衝液を作製した。キトサン溶液を、キトサン対 RNA 重量比 0.01 % ~ 80 % でクエン酸緩衝液を含有する RNA に添加する。

【0553】

[0415] イオン化可能な脂質は最終モル比 40 % ~ 70 % で LNP に含まれた。構造脂質は最終モル比 30 % ~ 60 % で LNP に含まれた。ヘルパー脂質は最終モル比 2 % ~ 25 % で LNP に含まれた。ステルス脂質は最終モル比 0.5 % ~ 5 % で LNP に含まれた。N : P 比を 3 対 12 に保持した。脂質混合物を、マイクロ流体ミキサーを用いて、3 : 1 の水性対エタノール比で、RNA / キトサン含有クエン酸緩衝液と組み合わせた。場合によっては、ミキサーは、ナノアセンブラー (Precision Nanosystems) である。場合によっては、ミキサーは T ミキサーである。場合によっては、それはクロスミキサーである。場合によっては、水 / エタノール比は 2 : 1 である。

【0554】

[0416] LNP を最終 16.5 % エタノール体積で収集し、PD-10 カラム (GE Healthcare)、透析、または接線流濾過 (TFF) プロセスを用いて、緩衝液を PBS または Tris 緩衝液に交換する前に 1 時間保持した。場合によっては、LNP は、16.5 % エタノールで収集され、次に、製剤化後直ちにまたは 1 時間の保持時間後に、緩衝液交換される前に、8.25 % エタノールに希釈される。場合によっては、製剤を Amicon 超遠心フィルター (100 kDa) を用いて濃縮し、0.2 μm フィルターに通して LNP を得た。LNP のサイズおよび RNA 捕捉効率は、実施例 11 に記載されるよう行われた。

【0555】

[0417] LNP の例を表 12 に記載する。LNP 肝臓編集を図 12 にグラフ化する。F93、F101、F102、F103 および F155 は、原薬緩衝液中に RNA 重量比ベースでそれぞれ 1%、0.1%、0.5%、5% および 10% のキトサンを含んでいた。

【0556】

10

20

30

40

50

【表 13】

表 12. 野生型 C57BL/6 マウスにおける LNP F93、F01～F103、および F155 組成および特徴付け

LNP	mol %				N:P	Z 平均 (nm)		PDI		カプセル化%
	アミノ脂質 502	構造脂質	ヘルパー脂質	ステルス脂質		a	b	a	b	
F93	55	38.2	4.7	2.1	8	97.7	105	0.0165	0.00976	96.7
F101	55	38.2	4.7	2.1	8	94.4	114	0.0193	0.0315	94.4
F102	55	38.2	4.7	2.1	8	93	115	0.0285	0.00843	94.4
F103	55	38.2	4.7	2.1	8	93.7	114	0.041	0.0786	89.0
F155	53.5	39.5	4.9	2.2	8	89.1	108.7	0.0168	0.03483	96.2

a: 製剤化後; b: 滅菌後濾過

【0557】

【0418】表 12 の全 LNP を、野生型 C57BL/6 雌性マウス (n=5) に; 用量: 0.05 mg/kg (総 RNA); mRNA: MA004 および gRNA: GA256 で静脈内投与した (RO)。F155 は GA257 であった。キトサンクエン酸塩溶液を RNA 含有クエン酸緩衝液に RNA と比較して 1%、0.1%、0.5%、5% および 1% 重量比ベースで添加して、それぞれ F93、F101、F102、F103 および F155 を生成した。全ての製剤は PEG400、0.5 w/w% を含む。N:P 比は 3.5 ~ 10.0 の範囲である。各 LNP の肝臓編集パーセントデータを図 12 にグラフ化する。

【0558】

【0419】実施例 17. LNP F104 の一般的な調製方法

【0420】脂質をエタノールに溶解した。低分子量キトサン (Sigma Aldrich) を、0.1 ~ 5 mg/mL の濃度で 0.67 wt% の PEG400 を含有する 67 mM クエン酸緩衝液 (pH 4.0 ~ 6.0) に懸濁した。1N HCl を、キトサンが溶液に溶解するまで滴下した。mRNA およびガイド RNA (ABE mRNA およびガイド RNA (1:1) または SpCas9 mRNA および gRNA (1:1)) を、0.67% の PEG400 を含有する 67 mM クエン酸緩衝液に添加して、0.5% の PEG400 (pH 4.0 ~ 6.0) を含有する 50 mM クエン酸緩衝液を作製した。キトサン溶液を、キトサン対 RNA 重量比 0.01% ~ 80% で RNA 含有クエン酸緩衝液に添加する。また、イオン化可能な脂質を、RNA の「P」(N:P に基づく) の 0.5 ~ 90% の間で中和する量で、RNA 含有クエン酸緩衝液に添加する。

【0559】

【0421】イオン化可能な脂質は最終モル比 40% ~ 70% で LNP に含まれた。構造脂質は最終モル比 30% ~ 60% で LNP に含まれた。ヘルパー脂質は最終モル比 2% ~ 25% で LNP に含まれた。ステルス脂質は最終モル比 0.5% ~ 5% で LNP に含まれた。N:P 比を 3 対 12 に保持した。

【0560】

【0422】脂質混合物を、マイクロ流体ミキサーを用いて、3:1 の水性対エタノール比で、RNA 含有クエン酸緩衝液と組み合わせた。場合によっては、ミキサーは、ナノアセンブラー (Precision Nanosystems) である。場合によっては、ミキサーは T ミキサーである。場合によっては、それはクロスミキサーである。場合によっては、水/エタノール比は 2:1 である。

【0561】

【0423】LNP を最終 16.5% エタノール体積で収集し、PD-10 カラム (GE Healthcare)、透析、または接線流濾過 (TFF) プロセスを用いて、緩衝液

をPBSまたはTris緩衝液に交換する前に1時間保持した。場合によっては、LNPは、16.5%エタノールで収集され、次に、調合後直ちにまたは1時間の保持時間後に、緩衝液交換される前に、8.25%エタノールに希釈される。場合によっては、製剤をAmicon超遠心フィルター(100kDa)を用いて濃縮し、0.2μmフィルターに通してLNPを得た。LNPのサイズおよびRNA捕捉効率は、実施例D11に記載されるように行われた。

【0562】

【0424】LNPの例を表13に記載する。肝臓編集%を図16に示す。

【0563】

【表14】

表13. 野生型 C57BL/6 マウスにおける LNP 104 組成および特徴付け

LNP	mol %				N:P	Z 平均 (nm)		PDI		RNA カプセル化%
	アミノ脂質 502	構造脂質	ヘルパー脂質	ステルス脂質		a	b	a	b	
F104	55	38.2	4.7	2.1	8	89.5	109.0	0.03	0.02	88.6

a: 製剤化後; b: 滅菌後濾過

【0564】

【0425】表13のLNPを、野生型C57BL/6雌性マウス(n=5)に、用量: 0.05mg/kg(総RNA); mRNA: MA004およびgRNA: GA256で静脈内投与した(RO)。RNAに対して重量ベースで1%のキトサンがLNP 104に含まれる。LNP 104中の残りの脂質と混合する前に、N:Pの10%中和を行った。LNP 104は、PEG400、0.5%w/wで製剤化された。N:P比は3.5~10.0の範囲である。LNP 104の肝臓編集%を図16に示す。

【0565】

【0426】実施例18. LNP F105、F151、F152の一般的な調製方法

【0427】脂質をエタノールに溶解した。イオン化可能な脂質は最終モル比40%~70%でLNPに含まれた。構造脂質は最終モル比30%~60%でLNPに含まれた。ヘルパー脂質は最終モル比2%~25%でLNPに含まれた。ステルス脂質は最終モル比0.5%~5%でLNPに含まれた。N:P比を3対12に保持した。

【0566】

【0428】場合によっては、LNPはSpCas9ガイドRNAのみを含む。他の例では、LNPはABEガイドRNAのみを含む。脂質混合物を、ABEまたはSpCas9ガイドRNAを含有する50mMクエン酸ナトリウム緩衝液(pH4.0~6.0)中の0.5%のPEG400(Millipore Sigma)と、マイクロ流体ミキサーを用いて、水/エタノール比3:1で組み合わせる。場合によっては、ミキサーは、ナノアセンブラー(Precision Nanosystems)である。場合によっては、ミキサーはTミキサーである。場合によっては、それはクロスミキサーである。場合によっては、水/エタノール比は2:1である。

【0567】

【0429】他の例では、LNPはSpCas9 mRNAまたはABE mRNAのいずれかを含む。脂質混合物を、ABEまたはSpCas9 mRNAを含有する50mMクエン酸ナトリウム緩衝液(pH4.0~6.0)中の0.5%のPEG400(Millipore Sigma)と、マイクロ流体ミキサーを用いて、水/エタノール比3:1で組み合わせる。場合によっては、ミキサーは、ナノアセンブラー(Precision Nanosystems)である。場合によっては、ミキサーはTミキサーである。場合によっては、それはクロスミキサーである。

【0568】

【0430】ガイドRNA LNPは、mRNA含有するLNPとは別に製剤化され、2つのLNPは、場合によっては1時間の保持時間後、場合によっては緩衝液交換後、または他の例では滅菌濾過後に組み合わせられる。

【0569】

【0431】LNPを最終16.5%エタノール体積で収集し、PD-10カラム（GE Healthcare）、透析、または接線流濾過（TFF）プロセスを用いて、緩衝液をPBSまたはTris緩衝液に交換する前に1時間保持した。場合によっては、LNPは、16.5%エタノールで収集され、次に、製剤化後直ちにまたは1時間の保持時間後に、緩衝液交換される前に、8.25%エタノールに希釈される。場合によっては、製剤をAmicon超遠心フィルター（100kDa）を用いて濃縮し、0.2μmフィルターに通してLNPを得た。LNPのサイズおよびRNA捕捉効率は、実施例D11に記載されるように行われた。

【0570】

【0432】LNPの例を表14に記載する。肝臓編集%を図16に示す。

【0571】

【表15】

表14. LNP 105、151、152の組成および特徴付け、ならびに野生型C57BL/6マウスにおける評価

LNP	Mol %				N:P 比	平均径 (nm)		PDI		RNA カプセル化%
	502	構造脂質	ヘルパー 脂質	ステルス 脂質		a	b	a	b	
F105	55	38.2	4.7	2.1	8	93.6	109	0.00879	0.0441	95.1
F151	55	38.2	4.7	2.1	8	65.9		0.101		
F152	55	38.2	4.7	2.1	8	90.5		0.0514		

a: 製剤化後; b: 滅菌後濾過

【0572】

【0433】表14の全てのLNPを、野生型C57BL/6雌性マウス（n=5）に、用量：0.05mg/kg（総RNA、mRNA：MA004、gRNA：GA256）で静脈内投与した（RO）。F151の場合、脂質混合物を、ABEガイドRNAを含む50mMクエン酸ナトリウム緩衝液（pH4.2～5.8）中の0.5%のPEG400と、マイクロ流体ミキサーを用いて3：1の水性対エタノール比で組み合わせた。F152の場合、脂質混合物を、ABE mRNAを含有する50mMクエン酸ナトリウム緩衝液中の0.5%のPEG400と、マイクロ流体ミキサーを用いて水／エタノール比3：1で組み合わせた。LNPを最終16.5%エタノール体積で収集し、組み合わせる前に1時間保持した。このF151とF152の組合せにより、F105が生成された。F105のLNPを透析によりTris緩衝液に透析した。F105のN：P比範囲3.5～10.0 LNP編集%を図16に示す。

【0573】

【0434】実施例19. F106～F109の一般的な調製方法

【0435】F106～F109を実施例10に記載のように調製した。mRNA：gRNA比を水溶液中で1：1に保持し、脂質組成を表15に記載する。平均径および%RNA

捕捉率を表 16 に記載する。

【0574】

[0436] 実施例 20 . F 1 1 1 ~ F 1 2 2 の一般的な調製方法

[0437] F 1 1 1 ~ 1 2 2 は実施例 10 に記載されるように調製した。mRNA : gRNA 比を水溶液中で 1 : 1 に保持し、脂質組成を表 15 に記載する。平均径および % RNA 捕捉率を表 16 に記載する。肝臓編集を図 15 に示す。

【0575】

[0438] 実施例 21 . F 1 2 6 ~ F 1 4 2 の一般的な調製方法

[0439] F 1 2 1 ~ F 1 4 2 を実施例 19 に記載されるように調製した。mRNA : gRNA 比を水溶液中で 1 : 1 に保持し、脂質組成を表 15 に記載する。平均径および % RNA 捕捉率を表 16 に記載する。

【0576】

10

20

30

40

50

【表 16】

表 15. LNP F106～F142 の組成。N:P 比は 3.5～10.0 の範囲である。

LNP	mRNA	gRNA	用量 (mg/kg)	アミノ 脂質	アミノ mol %	N:P 比	コレステ ロール (511) mol %	DSPC (512) mol %	PEG-脂 質 (507) (mol %)
F106	MS004	GA055	1	VL411	50	5.5	38.5	10	1.5
F107	MS004	GA055	1	VL404	47.1	4.5	46.1	4.7	2.1
F108	MS004	GA055	1	VL404	47.1	8	46.1	4.7	2.1
F109	MS004	GA055	1	VL404	40	8	53.2	4.7	2.1
F111	MS004	GA055	0.5	VL404	47.1	6	46.1	4.7	2.1
F112	MS004	GA055	0.5	VL404	47.1	8	46.1	4.7	2.1
F113	MS004	GA055	0.5	VL406	47.1	6	46.1	4.7	2.1
F114	MS004	GA055	0.5	VL406	47.1	8	46.1	4.7	2.1
F115	MS004	GA055	0.5	VL401	47.1	6	46.1	4.7	2.1
F116	MS004	GA055	0.5	VL401	47.1	8	46.1	4.7	2.1
F117	MS004	GA055	0.5	VL422	47.1	6	46.1	4.7	2.1
F118	MS004	GA055	0.5	VL422	47.1	8	46.1	4.7	2.1
F110	MS004	GA055	0.5	VL001	47.1	4.5	46.1	4.7	2.1
F111	MS004	GA055	0.5	VL404	47.1	6	46.1	4.7	2.1
F119	MS004	GA055	0.5	VL404	55	6	38.2	4.7	2.1
F120	MS004	GA055	0.5	VL404	55	6	38.2	4.7	2.1
F121	MS004	GA055	0.5	VL422	47.1	8	46.1	4.7	2.1
F122	MS004	GA055	0.5	VL422	55	8	38.2	4.7	2.1
F126	MA004	GA256	0.05	VL410	55	6	38.2	4.7	2.1
F127	MA004	GA256	0.05	VL410	55	8	38.2	4.7	2.1
F128	MA004	GA256	0.05	VL421	55	6	38.2	4.7	2.1
F129	MA004	GA256	0.05	VL421	55	8	38.2	4.7	2.1
F130	MA004	GA256	0.05	VL435	55	6	38.2	4.7	2.1
F131	MA004	GA256	0.05	VL435	55	8	38.2	4.7	2.1
F132	MA004	GA256	0.05	VL404	55	6	38.2	4.7	2.1
F133	MA004	GA256	0.05	VL404	55	6	33.9	9	2.1
F134	MA004	GA256	0.05	VL404	52.37	6	35.57	9.96	2.1
F135	MS004	GA055	0.25	VL447	55	6	38.2	4.7	2.1
F136	MS004	GA055	0.25	VL447	55	8	38.2	4.7	2.1
F137	MS004	GA055	0.25	VL448	55	6	38.2	4.7	2.1
F138	MS004	GA055	0.25	VL448	55	8	38.2	4.7	2.1
F139	MS004	GA055	0.25	VL449	55	6	38.2	4.7	2.1
F140	MS004	GA055	0.25	VL449	55	8	38.2	4.7	2.1
F141	MS004	GA055	0.25	VL451	55	6	38.2	4.7	2.1
F142	MS004	GA055	0.25	VL451	55	8	38.2	4.7	2.1

【0577】

10

20

30

40

50

【表 17】

表 16. LNP F106～F142 の特徴付けデータ

LNP ID	緩衝液交換プロセス	平均径 (nm)	PDI	RNA カプセル化%
F106	透析	112	0.002	91
F107	透析	75	0.15	90
F108	PD-10	98.6	0.13	95
F109	PD-10	107.8	0.26	91
F111	透析	108.5	0.00387	95.8
F112	透析	92.37	0.06089	96.3
F113	透析	74.52	0.07232	94.3
F114	透析	67.19	0.1093	97.7
F115	透析	122.7	0.03755	93.6
F116	透析	115.1	0.175	96.0
F117	透析	64.64	0.1397	96.9
F118	透析	67.38	0.1451	97.0
F111	透析	122	0.0419	95.8
F119	透析	107	0.00888	96.7
F120	TFF	131	0.002	91.3
F121	透析	70.2	0.107	91.3
F122	透析	81	0.0156	95.8
F126	透析	85.9	0.0584	96.18
F127	透析	98.5	0.066	97.14
F128	透析	92.9	0.137	97.04
F129	透析	82	0.0388	97.22
F130	透析	102	0.00398	96.81
F131	透析	72.2	0.15	95.76
F132	透析	86.5	0.13	94.33
F133	透析	118	0.0242	95.73
F134	透析	124	0.0138	96.22
F135	透析	76.7	0.0714	96.77
F136	透析	79.5	0.0417	97.5
F137	透析	66.2	0.135	93.21
F138	透析	73.2	0.0825	97.97
F139	透析	116	0.145	25.79
F140	透析	114	0.13	25.2
F141	透析	123	0.138	93.51
F142	透析	113	0.125	94.98

10

20

30

40

【0578】

【0440】表 16 の全ての LNP は、T r i s に交換された F 1 2 0 を除き、P B S 中に緩衝液交換された。全ての LNP は、p H 4 . 0 ～ 6 . 0 の原薬緩衝液で製剤化された。

【0579】

【0441】実施例 22 . 臭化セチルトリメチルアンモニウム (C T A B または表 1 B の 5 2 4) を含む F 1 5 1 - F 1 5 4 の一般的調製法

【0442】脂質をエタノールに溶解した。C T A B (S i g m a A l d r i c h) を、0 . 6 7 w t % の P E G 4 0 0 を含有する 6 7 m M クエン酸緩衝液と混合して、0 . 0 1 ～ 5 m g / m L の濃度で溶液を形成した。m R N A およびガイド R N A (A B E m R N

50

A およびガイドRNA (1:1) または SpCas9 mRNA および gRNA (1:1) を、0.67% の PEG400 を含有する 67mM クエン酸緩衝液に添加して、0.5% の PEG400 (pH 4.0~6.0) を含有する 50mM クエン酸緩衝液を作製した。524 溶液を、524 対 RNA 重量比 0.01%~80% で RNA を含有するクエン酸緩衝液に添加する。

【0580】

[0443] イオン化可能な脂質は最終モル比 40%~70% で LNP に含まれた。構造脂質は最終モル比 30%~60% で LNP に含まれた。ヘルパー脂質は最終モル比 2%~25% で LNP に含まれた。ステルス脂質は最終モル比 0.5%~5% で LNP に含まれた。N:P 比を 3 対 12 に保持した。脂質混合物を、マイクロ流体ミキサーを用いて、3:1 の水性対エタノール比で、クエン酸緩衝液を含有する RNA/524 と組み合わせた。場合によっては、ミキサーは、ナノアセンブラー (Precision Nanosystems) である。場合によっては、ミキサーは Tミキサーである。場合によっては、それはクロスミキサーである。場合によっては、水/エタノール比は 2:1 である。

10

【0581】

[0444] LNP を最終 16.5% エタノール体積で収集し、PD-10 カラム (GE Healthcare)、透析、または接線流濾過 (TFF) プロセスを用いて、緩衝液を PBS または Tris 緩衝液に交換する前に 1 時間保持した。場合によっては、LNP は、16.5% エタノールで収集され、次に、製剤化後直ちにまたは 1 時間の保持時間後に、緩衝液交換される前に、8.25% エタノールに希釈される。場合によっては、製剤を Amicon 超遠心フィルター (100kDa) を用いて濃縮し、0.2 μm フィルターに通して LNP を得た。LNP のサイズおよび RNA 捕捉効率は、実施例 11 に記載されるように行われた。

20

【0582】

[0445] LNP の例を表 17 に記載する。F151、F152、F153 および F154 は、それぞれ原薬緩衝液中の RNA 重量比ベースで 0.1%、0.3%、0.6%、および 1% の 524 (CTAB) を含んだ。

【0583】

30

40

50

【表 18】

表 17. LNP F151～F154 の組成および特徴付け、ならびに野生型 C57BL/6 マウスにおける評価

LNP	Mol %				N:P 比	Z 平均		PDI		RNA カプセル化%
	アミノ脂質 502	構造脂質 (コレステロール)	ヘルパー脂質 (DSPC)	ステルス脂質 (表 1B からの PEG-脂質)		a	b	a	b	
F151	55	38.2	4.7	2.1	8	94.95	118.6	0.03107	0.005914	96.31
F152	55	38.2	4.7	2.1	8	95.23	117.2	0.004556	0.0234	94.28
F153	55	38.2	4.7	2.1	8	97.66	116.1	0.008244	0.02514	96.06
F154	55	38.2	4.7	2.1	8	94.22	112.8	0.02049	0.01147	97.29

a: 製剤化後; b: 滅菌後濾過

【0584】

【0446】表 17 の全 LNP を、野生型 C57BL/6 雌性マウス (n=5) に; 投与量: 0.05 mg/kg (総 RNA); mRNA: MA004 および gRNA: GA257 で静脈内投与した (RO)。クエン酸溶液中の 524 を RNA と比較して 0.1、0.3、0.6 および 1 重量% 比ベースで RNA を含有するクエン酸緩衝液に添加して、それぞれ F151、F152、F153 および F154 を生成した。全ての製剤は PEG400、0.5 w/w% を含む。N:P 比は 3.5～10.0 の範囲である。

【0585】

実施例 23.

【0447】LNP 製剤 F159 および F156 は、それぞれ F2 および F3 中の 504 を置き換えることにより、表 5 に記載されるように 521 を用いて調製した。

【0586】

【0448】LNP 製剤 F157 および F158 は、それぞれ F2 および F3 中の 504 を置き換えることにより、表 5 に記載されるように 522 を用いて調製した。

【0587】

【0449】実施例 24: 脂質賦形剤を、表 18 に記載されるモル比でエタノールに溶解した。mRNA および gRNA を 50 mM クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.5～6) に (1:1 重量比で) 溶解することにより、総 RNA 水性混合物を調製した。次に、マイクロ流体ミキサーを用いて 3:1 の比率で水流をエタノール流と迅速に混合することにより、LNP F151A および F160～F171 を製剤化した。N/P 比を 3～12 の間に保持した。LNP を最終エタノール濃度が 10～25 体積% の水性緩衝液中に収集し、透析カセット (10 kDa カットオフ膜) を用いて DPBS に対する膜透析を行う前に、少なくとも 18 時間、4～6℃ で 1 分～120 分間保持した。得られたナノ粒子を、Ribogreen 定量アッセイを用いて捕捉 RNA% について分析し、平均径 (Z 平均) を動的光散乱 (DLS) により測定した。LNP F151A および F160～F171 の捕捉パーセントおよび平均粒径 (Z 平均) を表 18 に一覧にする。特性決定後、LNP

F151AおよびF160～F165を、野生型C57BL/6雌性マウス（n=5）に0.125mg/kgの総RNA用量で後眼窩注射により投与し、マウス肝臓におけるPCSK9遺伝子編集%を投与4日後に評価し、編集データを図20に示す。F151Aは、参照LNPと同じ用量で投与された。実施例13に記載されるように、インビボ研究および編集分析を行った。

【0588】

[0450]

【0589】

【表19】

表 18: LNP F151A および F160～F171 の脂質組成および物理化学的特性

LNP	mRNA	gRNA	アミノ 脂質	アミノ脂質/コレ ステロール (511)/DSPC (512)/PEG-脂質 (507) mol %	N: P	Z 平均 (nm)	PDI	RNA 捕捉%
F151A	MA004	GA256	502	55/38.2/4.7/2.1	8	107.1	0.04	95.6
F160	MA004	GA256	VL454	55/38.2/4.7/2.1	6	72.4	0.09	91.6
F161	MA004	GA256	VL454	55/38.2/4.7/2.1	8	72.3	0.002	90.4
F162	MA004	GA256	VL459	55/38.2/4.7/2.1	6	100.6	0.009	91.7
F163	MA004	GA256	VL459	55/38.2/4.7/2.1	8	105.5	0.05	92.4
F164	MA004	GA256	VL455	55/38.2/4.7/2.1	6	110.4	0.13	93.9
F165	MA004	GA256	VL455	55/38.2/4.7/2.1	8	105.7	0.05	94.1
F166	MA004	GA256	VL460	55/38.2/4.7/2.1	6	151	0.1	91.1
F167	MA004	GA256	VL460	55/38.2/4.7/2.1	8	90	0.12	91.9
F168	MA004	GA256	VL471A	55/38.2/4.7/2.1	6	86.3	0.2	94.9
F169	MA004	GA256	VL471A	55/38.2/4.7/2.1	8	65.3	0.02	96.0
F170	MA004	GA256	VL472A	55/38.2/4.7/2.1	6	82.2	0.1	95.3
F171	MA004	GA256	VL472A	55/38.2/4.7/2.1	8	80	0.12	96.5

【0590】

【0451】表19に示されるマウスPCSK9 gRNA GA256およびABE mRNA MA004をカプセル化したLNP製剤F172～F177を、上述のように製剤化し（表18）、pH7.5で50mM Trisに対して透析した。特性決定後、LNP F172～F177を、野生型C57BL/6雌性マウス（n=5）に、0.1mg/kgの総RNA用量およびPCSK9遺伝子%で眼窩後方注射により投与した。マウス肝臓における編集を投与4日後に評価し、編集データを図21に示す。実施例13に記載されるように、インビボ研究および編集分析を行った。

【0591】

[0452]

【0592】

10

20

30

40

50

【表 20】

表 19: LNP F172～F177 の脂質組成および物理化学的特性

LNP	mRNA	gRNA	アミノ 脂質	アミノ脂質/コレス テロール (511)/DSPC (512)/PEG-脂質 (507) mol %	N:P	Z 平 均 (nm)	PDI	RNA 捕捉%
F172	MA004	GA256	VL422	52.4/34.6/9/3	6	68	0.02	91.5
F173	MA004	GA256	VL422	52.4/34.6/9/3	8	75	0.02	92.9
F174	MA004	GA256	VL422	50/38/9/3	6	77	0.006	92.8
F175	MA004	GA256	VL422	50/38/9/3	8	71	0.04	90.4
F176	MA004	GA256	VL422	47/41/9/3	6	57	0.01	90.7
F177	MA004	GA256	VL422	47/41/9/3	8	73	0.05	89.4

【0593】

[0453]表 20 に示されるマウス PCSK9 gRNA GA256 および ABE mRNA MA004 をカプセル化した LNP 製剤 F151A および F178～181 を上記のように調製し (表 18)、pH7.5 で 50mM Tris に対して透析した。LNP F179 を X-ミキサーを用いて作製し、水性対エタノール性ストリームの混合比を 3:1 の比で保持した。TFF を用いて、LNP F172 の緩衝液 (pH7.5 で 50mM Tris) を交換した。表 20 に示されるマウス PCSK9 gRNA GA257 および ABE mRNA MA004 をカプセル化した LNP 製剤 F151B および F193A～F193C を上記のように調製し (表 18)、pH7.5 で 50mM Tris に対して透析した。LNP F151B は、PEG-脂質 507 を含み、LNP F193A では、PEG-脂質 507 は PEG-脂質 VP177 に置き換えられ、F193B の PEG-脂質 507 は LNP F193C で VP177 に置き換えられた。LNP F193B および F193C をアミノ脂質 VL422 に製剤化した。特性決定後、F151A、F151B、F172、F178～F181 および F193A～F193C LNP を、野生型 C57BL/6 雌性マウス (n=5) に 0.1mg/kg の総 RNA 用量で後眼窩注射により投与し、マウス肝臓における PCSK9 編集%を投与 4 日後に評価した；編集データを図 22A および図 22B に示す。実施例 13 に記載されるように、インビボ研究および編集分析を行った。PEG-脂質 VP159 を含む LNP がマウスの編集に及ぼす影響を、表 20 に示されるように、類似の賦形剤組成およびアミノ脂質を有する PEG-脂質 507 を構成する対応する LNP と比較した。

【0594】

[0454]

【0595】

10

20

30

40

50

【表 2 1】

表 20: LNP F151A、F172 および F178～F181 の脂質組成および物理化学的特性

LNP	mRNA	gRNA	アミノ 脂質	PEG-脂 質	アミノ脂質/コレ ステロール (511)/DSPC (512)/PEG-脂質 mol %	N:P	Z 平均 (nm)	PDI	RNA 捕 捉%
F151A	MA004	GA256	502	507	55/38.2/4.7/2.1	8	107.1	0.04	95.6
F178	MA004	GA256	502	VP159	55/38.2/4.7/2.1	8	111.6	0.04	94.3
F179	MA004	GA256	VL422	507	50/38/9/3	6	67.1	0.01	93.3
F172	MA004	GA256	VL422	507	52.4/34.6/10/3	6	64.3	0.02	94.3
F180	MA004	GA256	VL422	VP159	50/38/9/3	6	68.1	0.01	93.1
F181	MA004	GA256	VL422	VP159	52.4/34.6/10/3	6	65.8	0.01	93.3
F151B	MA004	GA257	502	507	55/38.2/4.7/2.1	8	108.3	0.02	91.3
F193A	MA004	GA257	502	VP177	55 / 38.2 / 4.7 / 2.1	8	113.7	0.002	89.8
F193B	MA004	GA257	VL422	507	50 / 38 / 9 / 3	6	74.34	0.006	88.69
F193C	MA004	GA257	VL422	VP177	50 / 38 / 9 / 3	6	66.8	0.02	88.2

【0596】

【0455】表 2 1 に示されるマウス PCSK9 gRNA GA256 および ABE mRNA MA004 をカプセル化した LNP 製剤 F182～186 を、上記のアミノ脂質 VL473A (表 18) を用いて調製し、pH 7.5 で 50mM Tris に対して透析した。特性決定後、LNP F82～F186 を、野生型 C57BL/6 雌性マウス (n = 5) に 0.1mg/kg の総 RNA 用量で後眼窩注射により投与し、マウス肝臓における PCSK9 編集%を投与 4 日後に評価し、実施例 13 に記載されるように、インビボ研究および編集分析を行った。個々の動物の肝臓における PCSK9 遺伝子編集を表 2 1 に一覧にする。

【0597】

【0456】

【0598】

10

20

30

40

50

【表 2 2】

表 21: LNP F182～F186 の脂質組成および物理化学的特性

LNP	mRNA	gRNA	アミノ 脂質	アミノ脂質 /コレステ ロール (511)/DSPC (512)/PEG- 脂質 (507) mol %	N:P	Z 平 均 (nm)	PDI	RNA 捕捉%	個々の動物 における PCSK9 編 集%
F182	MA004	GA256	VL473A	55/38.2/4.7/ 2.1	8	65.5	0.06	90.6	0.6, 0.9, 0.4, , 0.6, 0.6
F183	MA004	GA256		52.4/34.6/10/3	6	69.9	0.14	88.6	0.6, 0.6, 0.3, 0.3, 0.4
F184	MA004	GA256		52.4/34.6/10/3	8	88.4	0.06	90.1	0.3, 0.3, 0.4, 0.4, 0.4
F185	MA004	GA256		50/38/9/3	6	60.8	0.12	97.9	0.3, 0.2, 0.3, 0.3, 0.3
F186	MA004	GA256		50/38/9/3	8	81.9	0.003	97.3	0.2, 0.2, 0.2, 0.3, 0.3

【0599】

【0457】マウスガイドRNA GA256、GA257およびGA010、ならびにmRNA MA004をカプセル化した表22に示されるLNP製剤F194～F220、F220A、F220B、およびF220Cを、上記のようにアミノ脂質502、VL422、VL454、VL455およびVL472A、ならびにPEG-脂質507およびVP154を用いて調製した。特性決定後、LNP F209～F220を、野生型C57BL/6雌性マウス(n=5)に0.1mg/kgの総RNA用量で後眼窩注射により投与し、マウス肝臓におけるPCSK9編集%を投与4日後に評価し、個々の動物の遺伝子編集を表22に一覧にする。実施例13に記載されるように、インビボ研究および編集分析を行った。

【0600】

【0458】

【0601】

10

20

30

40

50

【表 2 3 - 1】

表 22. LNP F151 および F194～F220 の脂質組成および物理化学的特性

LNP	mRNA	gRNA	アミノ脂質/ コレステロール/DSPC /PEG-脂質 mol %	アミノ 脂質	PEG-脂 質	N:P	Z 平 均 (nm)	PDI	RNA 捕 捉%	個々の動 物におけ る PCSK9 編集%
F194	MS002	GA010	47/42.5/9/1.5	502	VP154	6	101.4	0.05	89.8	*
F195	MS002	GA010	47/41/9/3	502	VP154	6	67.0	0.03	87.9	*
F196	MS002	GA010	47/39/9/5	502	VP154	6	63.26	0.10	87.5	*
F197	MS002	GA010	47/42.5/9/1.5	502	VP154	8	84.84	0.05	89.4	*
F198	MS002	GA010	47/41/9/3	502	VP154	8	63.5	0.03	91.7	*
F199	MS002	GA010	47/39/9/5	502	VP154	8	58.97	0.07	90.9	*
F201	MS002	GA010	50/39.5/9/1.5	502	VP154	6	89.23	0.06	87.6	*
F201	MS002	GA010	50/38/9/3	502	VP154	6	68.95	0.04	81.5	*
F202	MS002	GA010	50/36/9/5	502	VP154	6	69.38	0.19	85.8	*
F203	MS002	GA010	50/39.5/9/1.5	502	VP154	8	89.23	0.06	87.6	*
F204	MS002	GA010	50/38/9/3	502	VP154	8	68.95	0.04	81.5	*
F205	MS002	GA010	50/36/9/5	502	VP154	8	69.38	0.19	85.8	*
F206	MS002	GA010	52.4/33.1/9/1.5	502	VP154	8	76.51	0.01	90.8	*
F207	MS002	GA010	52.4/34.6/9/3	502	VP154	8	63.92	0.14	90.8	*
F208	MS002	GA010	52.4/36.4/9/5	502	VP154	8	62.02	0.13	88.5	*
F209	MA004	G256	50/38/9/3	VL422	VP154	6	65.36	0.07	91.5	5.9, 12.75, 7.4, 11.6, 5.9
F210	MA004	G256	47/41/9/3	VL422	VP154	6	61.16	0.07	92.2	12.6, 7.3, 7.8, 19, 14.0
F211	MA004	GA256	50 / 38 / 9 / 3	VL454	507	6	70.79	0.05	90.7	13.7, 15.7, 11.9, 21.5 16.3
F212	MA004	GA256	52.4 / 35.6 / 9 / 3	VL454	507	8	76.07	0.06	91.2	26.5, 31.2, 31.9, 29.7. 31.0

【 0 6 0 2 】

10

20

30

40

50

【表 2 3 - 2】

F213	MA004	GA256	47 / 41 / 9 / 3	VL455	507	5	86.42	0.01	93.6	1.5, 9.6, 8.8, 2.4, 4.6
F214	MA004	GA256	47 / 41 / 9 / 3	VL455	507	8	83.45	0.01	94.8	0.6, 5.3, 4.7, 5.0, 7.0
F215	MA004	GA256	50 / 38 / 9 / 3	VL455	507	5	90.65	0.004	93.1	0.7, 8.3, 6.7, 9.9, 11.2
F216	MA004	GA256	50 / 38 / 9 / 3	VL455	507	8	83.36	0.05	94.1	12.2, 5.7, 10.4, 6.9, 4.85
F217	MA004	GA256	47 / 41 / 9 / 3	VL472 A	507	5	77.26	0.11	95.2	3.4, 4.0, 3.9, 6.9, 6.0
F218	MA004	GA256	47 / 41 / 9 / 3	VL472 A	507	8	71	0.09	96.8	0.1, 0.33, 0.09, 0.08, 0.1
F219	MA004	GA256	50 / 38 / 9 / 3	VL472 A	507	5	77.77	0.10	95.6	0.09, 0.1, 0.1, 0.1, 0.09
F220	MA004	GA256	50 / 38 / 9 / 3	VL472 A	507	8	70.88	0.07	96.8	0.2, 0.2, 0.1, 0.2, 0.1
F220A	MA004	GA257	52.4 / 35.6 / 9 / 3	VL454	507	8	63.88	0.11	90.3	43.7, 42.7, 36.8, 45.9, 36.6
F220B	MA004	GA257	52.4 / 35.6 / 9 / 3	VL454	507	6	68.59	0.11	90.4	36.7, 40.9, 45.8, 42.0, 38.1
F220C	MA004	GA257	52.4 / 36.6 / 9 / 2	VL454	507	6	70.3	0.009	94.8	34.9, 42.5, 47.7, 35.3, 36.8
* 評価せず										

【0603】

[0459]実施例 25 : LNP F188 および F190 ~ F193 を X-ミキサーを用いて製剤化した。TFF を用いて緩衝液 (pH 7.5 で 50mM Tris) を交換した。PEG400 は、LNP F188 および F192 製剤に導入された。LNP 製剤 F188 および F190 ~ F193 をカニクイザル (n=3) に 1 時間かけて静脈内注入により投与した。カニクイザルにおける ANGPTL3 遺伝子の編集を、ガイド RNA GA067 および mRNA MA004 を用いて、LNP の投与を介して評価するために、2 週間の研究を行った (図 23A)。MA004 / GA067 LNP を、肝臓における ANGPTL3 遺伝子の標的アデニン塩基編集を生成する目的で、カニクイザルに静脈内注

入により投与した。被験物質の投与2週間後、肝臓サンプルを採取するために動物を剖検し、サンプルを $-86 \sim -60^{\circ}\text{C}$ で保存した。次世代シーケンシングによりスプライス部位の編集を分析し、塩基変化が生じたことを確認した。LNP製剤F188およびF192を $1.5\text{mg}/\text{kg}$ ($n=3$)で投与し、NHP中のPEG-脂質507およびVP159の3mol%の影響を評価し、比較した(図23A)。それぞれアミノ脂質VL422を含むLNP製剤F190およびF191は、 $2\text{mg}/\text{kg}$ 用量で約45%のアデニン塩基編集を示した($n=3$)。それぞれのLNPは添加剤組成が異なる。

【0604】

【0460】

【0605】

【表24】

表 23. F188、190～F193、F190A および F190B の脂質組成および物理化学的特性

LNP	mRNA	gRNA	アミノ脂質/ コレステロール (511)/DSPC (512)/PEG-脂質 mol %	アミノ 脂質	PEG- 脂質	N:P	Z 平 均 (nm)	PDI	RNA 捕 捉%	ANGPTL3 編集%
F188	MA004	GA067	50/38/9/3	502	507	6	63.7	0.06	93.1	図 23A 参 照
F190	MA004	GA067	50/38/9/3	VL422	507	6	68.4	0.01	94.1	
F191	MA004	GA067	52.4/34.6/10/3	VL422	507	8	74.0	0.04	93.1	
F192	MA004	GA067	50/38/9/3	502	VP159	6	77.9	0.005	93.8	
F193	MA004	GA067	47/41/9/3	VL422	507	6	66.8	0.05	95.4	
F190A	MA004	GA347	50/38/9/3	VL422	507	6	74.7	0.03	94.0	図 23B 参 照
F190B	MA004	GA347	50/38/9/3	VL422	VP159	6	72.7	0.04	94.1	

【0606】

【0461】LNP製剤190AおよびF190B(表23)を、アミノ脂質VL422、mRNA MA004およびgRNA GA347からX-ミキサーを用いて調製した。TFFを用いて緩衝液(pH7.5で50mM Tris)を交換した。F190AおよびF190Bは、それぞれPEG-脂質507およびVP159を含む。カニクイザルにおけるANGPTL3遺伝子の編集を、上記のようにLNP(図23B)の投与を介してガイドRNA GA347およびmRNA MA004を用いて評価するために、2週間の研究を行った。

【0607】

【0462】実施例26. 表24に示されるマウスPCSK9 gRNA GA055およびspCAS9 mRNA MS004をカプセル化したLNP製剤F122A、F221～F226およびF226A～F226Cを、それぞれの脂肪アルコールをLNP賦剤と予め混合することによって調製し、製剤を実施例24に記載されるように調製した。製剤後のLNP F122AおよびF221～F226をpH7.5で50mM Trisに対して透析した。特性決定後のLNP F122AおよびF221～F226を、野生型C57BL/6雌性マウス($n=5$)に後眼窩注射により投与し、マウス肝臓におけるPCSK9編集パーセンテージを評価し、編集データを図24Aに示す。F122Aは0

． 5 および 0 . 2 5 m g / k g の R N A 用量で、 F 2 2 1 ～ F 2 2 6 は 0 . 2 5 m g / k g の R N A 用量で投薬された。実施例 1 3 に記載されるように、インビボ研究および編集分析を行った。別々の研究において、野生型 C 5 7 B L / 6 雌性マウス (n = 5) に L N P F 1 2 2 A および F 2 2 6 A ～ F 2 2 6 C を後眼窩注射により投与し、マウス肝臓における P C S K 9 編集パーセンテージを評価し、編集データを図 2 4 B に示す。

【 0 6 0 8 】

[0 4 6 3]

【 0 6 0 9 】

【表 2 5 】

表 24: LNP F122A、F221～F226 および F226A～F226C の脂質組成および物理化学的特性

LNP ID	VL422 mol %	コレステロール/ DSPC/PEG- DMG (507) mol %	N:P	脂肪アルコール mol %			Z 平均 (nm)	PDI	RNA 捕 捉%
				504	505	513			
F122A	50	38/9/3	6				67.8	0.19	93.0
F221	50	36.1/9/3		1.9			68.2	0.002	91.9
F222	50	32.3/9/3		5.7			76.9	0.01	92.1
F223	50	27.6/9/3		10.4			88.1	0.04	91.4
F224	50	36.1/9/3			1.9		82.3	0.21	92.0
F225	50	32.3/9/3			5.7		68.6	0.03	91.3
F226	50	27.6/9/3			10.4		72.3	0.002	85.2
F226A	50	27.6/9/3				1.9	67.1	0.07	93.6
F226B	50	27.6/9/3				5.7	70.0	0.16	92.5
F226C	50	27.6/9/3				10.4	71.3	0.03	88.4

【 0 6 1 0 】

[0 4 6 4] 実施例 2 7 . V L 4 5 4 、 V L 4 5 5 、 V L 4 7 2 A 、 V L 4 7 3 A 、 および V L 4 7 4 A の合成

【 0 6 1 1 】

10

20

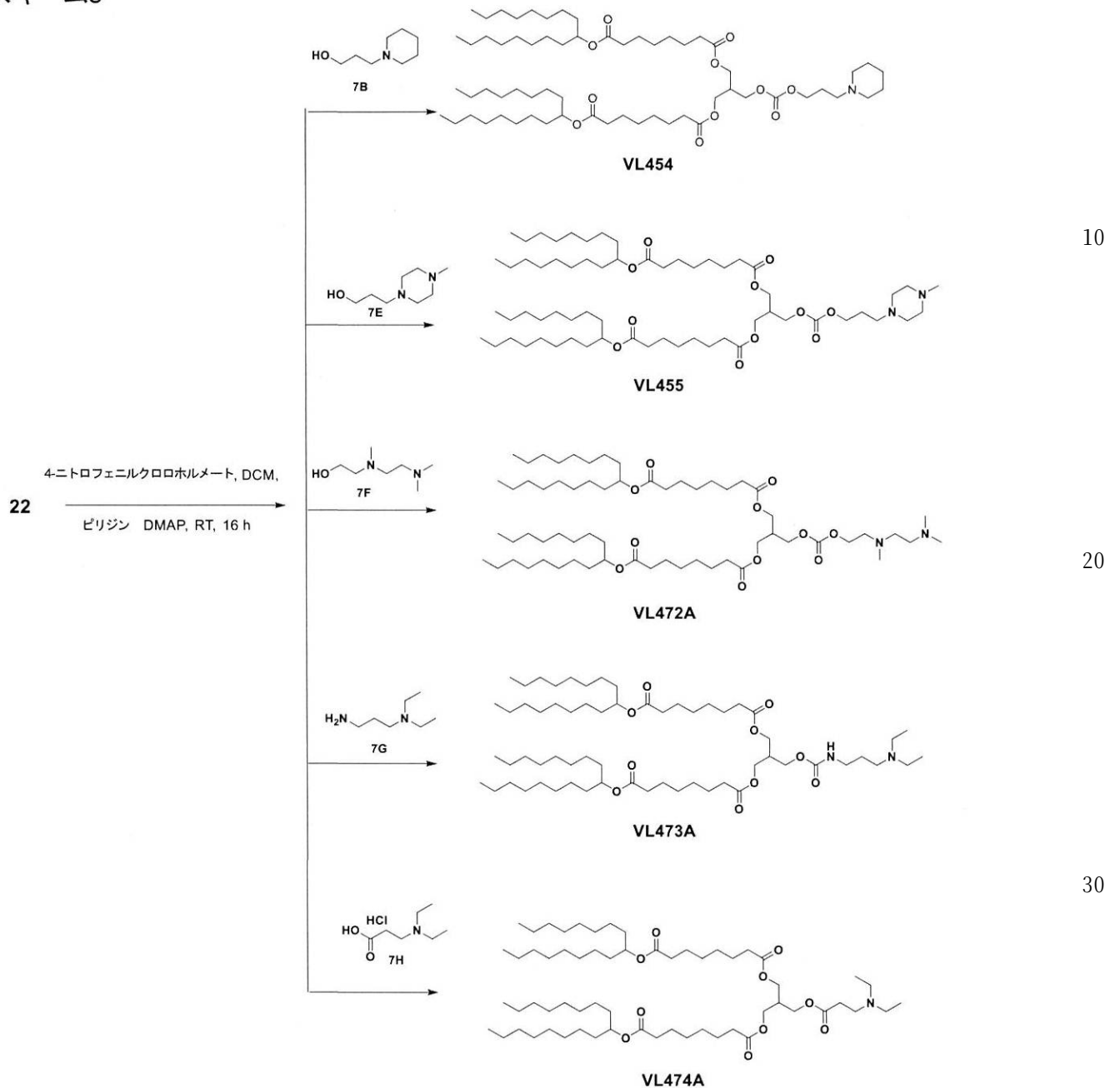
30

40

50

【化 7 5】

スキーム8



【0612】

[0465]ジクロロメタン (DCM、10 mL) 中の化合物 22 (1.0 g、1.11 mmol) の攪拌溶液に、4-ニトロフェニルクロロホルメート (0.67 g、3.33 mmol) およびピリジン (0.26 mL、3.33 mmol) を添加し、続いて 25~30 °C で DMAP (0.067 g、0.55 mmol) を添加した。得られた反応混合物を 5 時間攪拌し、7B (0.94 g、6.66 mmol) を添加し、25~30 °C でさらに 16 時間攪拌した。反応完了後、混合物を水 (20 mL) で希釈し、DCM (2×50 mL) 中に抽出した。有機層を分離し、減圧下で濃縮し、粗生成物を、溶離剤としてヘキサン中の 80% EtOAc を用いるシリカゲルカラムにより精製して、VL454 を淡黄色粘稠液体として得た (収率: 0.32 g、26.8%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ ppm 4.90-4.80 (m, 2H), δ 4.199-4.119 (m, 8H), 2.52-2.41 (m, 6H), 2.40-2.31 (m, 8H), 1.98-1.82 (m, 3H), 1.72-1.58 (m, 13H), 1.56-1.45 (m, 10H), 1.41-1.33 (m, 9H), 1.31-1.26 (m, 48H), 0.98-0.85 (t, 12H).

MS m/z : $[M+H]^+$ 、理論値 1064.8 ; 実測値 1065.0。

【0613】

【0466】VL455を化合物22および7EからVL454合成法に従って合成し、淡黄色粘性液体を得た（収率：0.30g、25.4%）。 ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ ppm 4.90-4.80 (m, 2H), δ 4.199- 4.119 (m, 8H), 2.61-2.48 (m, 5H), 2.50-2.31 (m, 6H), 2.40-2.31 (m, 8H), 1.98-1.82 (m, 2H), 1.72-1.68 (m, 8H), 1.56-1.45 (m, 8H), 1.41-1.33 (m, 10H), 1.31-1.26 (m, 44H), 0.98-0.85 (t, 12H). MS m/z : $[M+H]^+$ 、理論値 1079.9 ; 実測値 1079.9。

【0614】

【0467】VL472Aを化合物22および7FからVL454合成法（スキーム8に記載）に従って合成し、淡黄色粘性液体を得た（収率：0.30g、25.4%）。 ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 4.90-4.80 (m, 2H), δ 4.199- 4.119 (m, 8H), 2.71-2.70 (t, 2H), 2.58-2.55 (t, 2H), 2.40-2.31 (m, 3H), 2.32-2.5 (m, 17H), 1.72-1.68 (m, 8H), 1.56-1.45 (m, 8H), 1.41-1.33 (m, 57H), 0.98-0.85 (t, 12H). MS m/z : $[M+H]^+$ 、理論値 1067.9 ; 実測値 1067.9。

【0615】

【0468】VL473Aを化合物22および7GからVL454合成法に従って合成し、淡黄色粘性液体を得た（収率：0.35g、30.0%）。 ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 6.17 (s, 1H), 4.90-4.80 (m, 2H), δ 4.199- 4.119 (m, 6H), 3.32-3.26 (t, 2H), 2.66 (s, 6H), 2.41-2.26 (m, 8H), 1.72-1.68 (m, 9H), 1.51-1.45 (m, 9H), 1.41-1.33 (m, 60H), 1.22-1.09 (m, 7H), 0.98-0.85 (t, 12H). MS m/z : $[M+H]^+$ 、理論値 1051.9 ; 実測値 1051.9。

【0616】

【0469】VL474Aを化合物22および7HからVL454合成法に従って合成し、淡黄色粘性液体を得た（収率：0.35g、30%）。 ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 4.90-4.80 (m, 2H), δ 4.199- 4.119 (m, 6H), 2.80-2.77 (t, 2H), 2.62-2.48 (m, 6H), 2.41 (m, 1H), 2.31-2.28 (m, 8H), 1.71-1.59 (m, 10H), 1.61-1.41 (m, 9H), 1.41-1.31 (m, 9H), 1.32-1.21 (m, 50H), 1.01-0.99 (t, 6H), 0.98-0.85 (t, 12H). MS m/z : $[M+H]^+$ 、理論値 1022.8 ; 実測値 1022.8。

【0617】

【0470】実施例28. VL459、VL460、VL471A、VL475AおよびVL476Aの合成

VL459、VL460、VL471A、VL475AおよびVL476Aをスキーム9に示されるように、および実施例27に記載されるように合成した。

【0618】

10

20

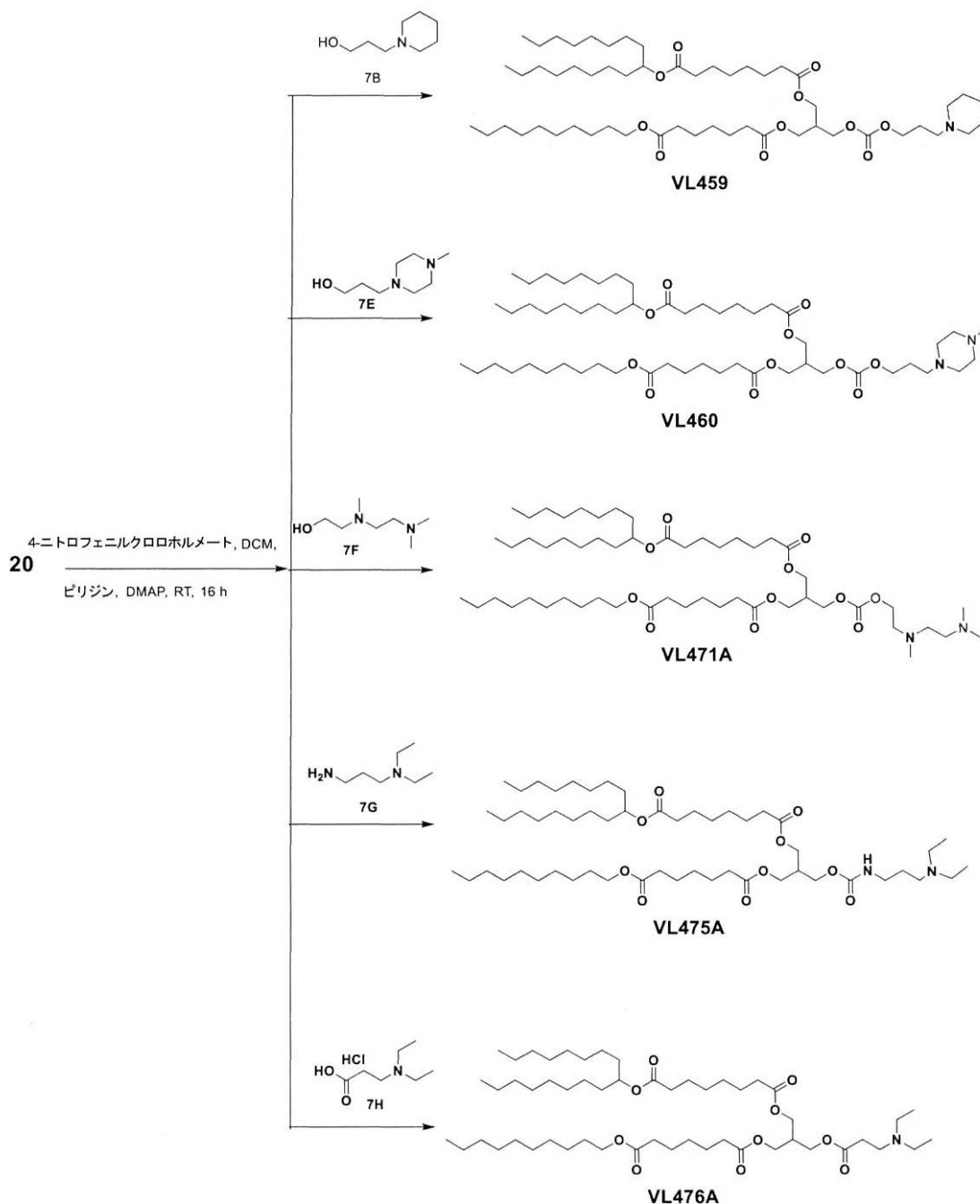
30

40

50

【化 7 6】

スキーム9



【0 6 1 9】

【0471】VL459を化合物20および7Bから調製し、淡黄色粘稠液体として単離した(0.26 g、収率：14.2%)。 ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 0.84-0.86 (t, 9H), 1.23-1.32 (m, 44H), 1.42-1.59 (m, 6H), 1.62-1.69, (m, 14H), 1.96-2.01 (m, 2H), 2.28-2.31 (m, 8H), 2.31-2.35 (m, 1H), 2.401-2.51 (m, 6H), 4.03-4.08 (t, 2H), 4.13-4.22 (m, 8H), 4.84-4.88 (m, 1H). MS m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ 、理論値 952.74; 実測値 952.52。

【0 6 2 0】

【0472】VL460を化合物20および7Eから調製し、淡黄色粘稠液体として単離した(0.42 g、収率：22.7%)。 ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 0.84-0.86

10

20

30

40

50

(t, 9H), 1.23-1.32 (m, 44H), 1.42-1.59 (m, 4H), 1.62-1.69, (m, 10H), 1.83-1.91 (m, 2H), 2.25-2.31 (m, 12H), 2.31-2.34 (m, 2H), 2.40-2.48 (m, 8H), 4.03-4.07 (t, 2H), 4.11-4.21 (m, 8H), 4.81-4.90 (m, 1H). MS m/z : $[M+H]^+$ 、理論値 967.7 ; 実測値 967.9。

【0621】

【0473】VL471Aを化合物20および7Fから調製し、淡黄色液体であり淡黄色粘稠液体として単離した。(0.21g、収率：11%) ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 0.838-0.855 (t, 9H), 1.225-1.317 (m, 44H), 1.416-1.550 (m, 5H), 1.589-1.668, (m, 9H), 2.258-2.418 (m, 18H), 2.535-2.552 (t, 2H), 2.612-2.634 (t, 2H), 2.692-2.731 (t, 2H), 4.033-4.078 (t, 2H), 4.128-4.255 (m, 8H), 4.843-4.905 (m, 1H). MS m/z : $[M+H]^+$ 、理論値 955.7 ; 実測値 955.6。

10

【0622】

【0474】VL475Aを化合物20および7Gから調製し、淡黄色粘稠液体として得た(0.42g、収率：22.7%)。 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 0.84-0.86 (t, 9H), 1.03-1.14, (m, 6H), 1.26-1.34 (m, 44H), 1.42-1.50 (m, 4H), 1.62-1.64, (m, 11H), 1.60-1.78 (m, 2H), 2.26-2.30 (m, 9H), 2.32-2.65 (m, 6H), 3.29 (t, 2H), 4.04-4.12 (m, 8H), 4.85-4.88 (t, 1H), 6.16 (t, 1H). MS m/z : $[M+H]^+$ 、理論値 939.7 ; 実測値 939.9。

20

【0623】

【0475】VL476Aを化合物20および7Hから調製し、淡黄色液体として精製した(0.28g、収率：16.3%)。 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 0.84-0.86 (t, 9H), 0.87-0.88 (t, 6H), 1.23-1.38 (m, 44H), 1.50-1.60 (m, 4H), 1.61-1.67, (m, 13H), 2.27-2.31 (m, 8H), 2.32-2.35 (m, 1H), 2.47-2.53 (m, 6H), 2.78-2.79 (t, 2H), 4.04-4.08 (t, 2H), 4.13-4.12 (m, 6H), 4.84-4.90 (m, 1H). MS m/z : $[M+H]^+$ 、理論値 910.7 ; 実測値 910.9。

【0624】

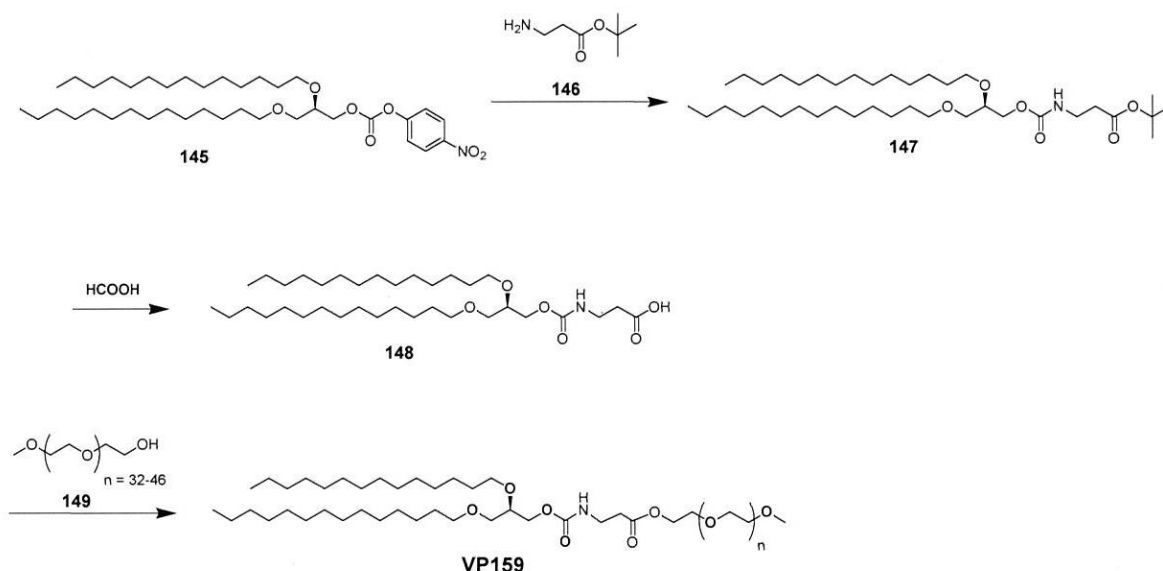
【0476】実施例29. PEG-脂質VP159の合成

【0625】

【化77】

30

スキーム10A



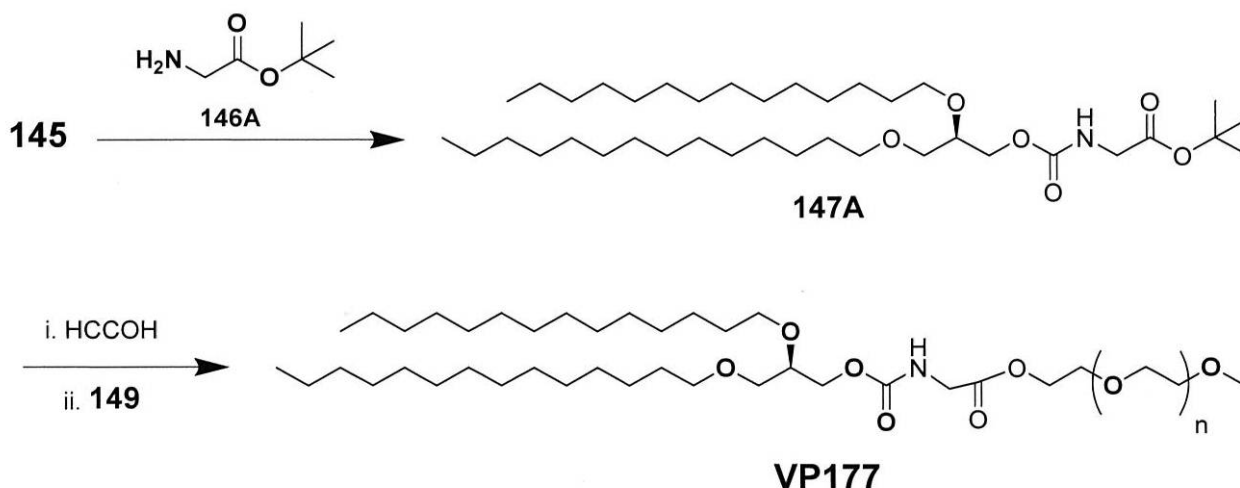
40

【0626】

50

【化 7 8】

スキーム 10B



10

【0627】

[0477] DCM (10 mL) 中の化合物 145 (6.5 g、10.77 mmol) の攪拌溶液に、20～25℃でピリジン (1.73 mL、21.54 mmol) を滴下し、次に化合物 146 (7.82 g、43.08 mmol) を攪拌溶液に添加した。反応混合物を室温 (RT) で6時間攪拌した。反応完了後、反応混合物を減圧下で濃縮し、粗生成物を溶離剤としてヘキサン中の5% EtOAcを用いるシリカゲルカラムクロマトグラフィー (Combi-flash) により精製して、無色液体として化合物 147を得た (5.4 g、84.60%)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 5.251-5.22 (m, 1H), δ 4.22-4.12 (m, 1H), 4.10-4.08 (m, 1H), 3.62-3.54 (m, 3H), 3.54-3.39 (m, 6H), 2.46-2.43 (m, 2H), 1.62-1.57 (m, 5H), 1.50 (s, 9H), 1.30 (m, 47H), 0.98-0.85 (m, 6H).

20

【0628】

[0478] DCM (25 mL) 中の化合物 147 (5.0 g、76.21 mmol) の攪拌溶液にギ酸 (40 mL) を加え、反応混合物を20～25℃で4時間攪拌した。反応混合物を濃縮してギ酸を除去し、トルエンとともに減圧下で共蒸発させて化合物 148を得、これをさらに精製することなく次の工程に使用することができた。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 5.33-5.31 (m, 1H), 4.23-4.11 (m, 3H), 3.61-3.56 (m, 4H), 3.49-3.42 (m, 8H), 2.61-2.56 (m, 3H), 1.56 (m, 6H), 1.27 (m, 59H), 0.90-0.87 (m, 6H).

30

【0629】

[0479] 化合物 148 の攪拌溶液に氷温で HBTU (1.98 g、4.999 mmol) を添加し、続いて不活性雰囲気下で乾燥 DCM (20 mL) 中で HOBt 水和物 (0.26 g、0.9984 mmol) を添加した。混合物を氷冷温度で10分間攪拌し、モレキュラーシーブ (10 mL) 上の乾燥 DCM 中の化合物 149 (7.141 g、3.328 mmol) の溶液を添加し、続いて DIPEA (1.73 mL、9.984 mmol) を滴下添加した。得られた混合物を氷冷温度でさらに10分間攪拌し、冷却浴を除去し、混合物を室温で16時間攪拌した。反応混合物を濃縮して粗生成物を得、それを移動相としてアセトニトリル／水を用いる逆相カラムクロマトグラフィーにより精製して、所望の生成物 VP159 をオフホワイト固体として得た (1.5 g、16%)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 5.34-5.33 (m, 1H), 4.26-4.20 (m, 2H), 4.19-4.16 (m, 1H), 4.10-4.06 (m, 1H), 3.83-3.80 (m, 1H), 3.74-3.55 (m, 176H), 3.55-3.54 (m, 5H), 3.47-3.41 (m, 7H), 3.38 (s, 3H), 2.58-2.55 (m, 2H), 1.56-1.

40

50

53 (m, 4H), 1.29-1.25 (m, 44H), 0.89-0.86 (t, 6H). 平均質量 m/z : $[M + Na]^+$ 、理論値 2732.0 ; 実測値 2732.1。

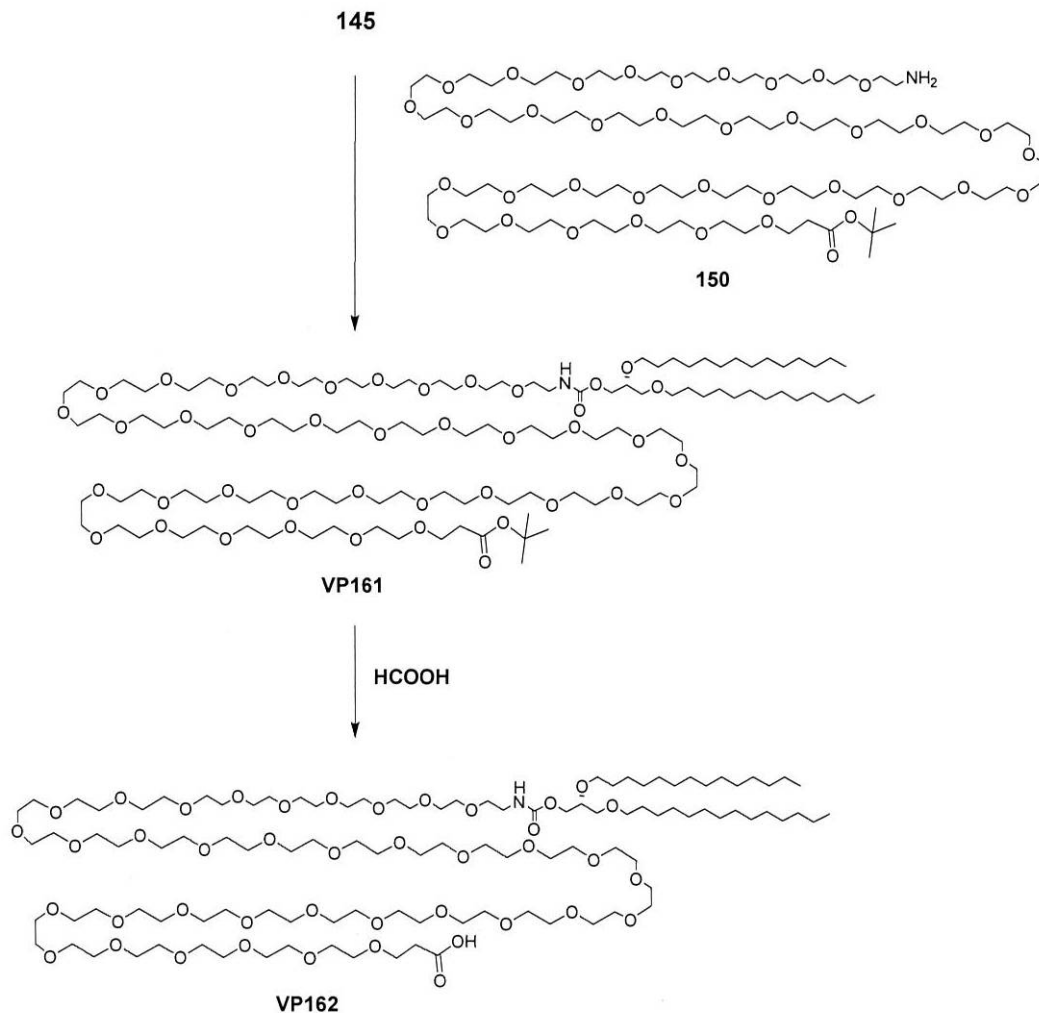
【0630】

【0480】実施例 30. PEG-脂質 VP161 および VP162 の合成

【0631】

【化79】

スキーム 11



【0632】

【0481】DCM (30 mL) 中の化合物 145 (3.0 g、0.0046 mol) の攪拌溶液に、ピリジン (0.74 mL、0.0092 mol) を室温で添加した。上記溶液に、化合物 150 (11.98 g、0.0069 mol) を添加し、12 時間、25℃で攪拌し続けた。反応混合物を減圧下で濃縮し、粗化合物を、溶離剤として 80% EtOAc / ヘキサンを用いるカラムクロマトグラフィー (中性アルミナ) により精製し、オフホワイト固体として化合物 VP161 を得た (5.35 g、収率: 51.9%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 7.13 (t, J=5.6 Hz, 1H), 3.86-3.99 (m, 2H), 3.47-3.57 (m, 4H), 3.30-3.49 (m, 146H), 3.07-3.11 (m, 2H), 2.39-2.49 (m, 2H), 1.45-1.55 (m, 4H), 1.45 (s, 9H), 1.20-1.45 (m, 43H), 0.75-0.85 (m, 6H).

【0633】

【0482】DCM (10 mL) 中の VP161 (5.0 g、2.2 mmol) の攪拌溶液を氷冷温度でギ酸 (35 mL) を添加し、得られた反応混合物を室温で 6 時間攪拌した。

反応混合物を濃縮してギ酸を除去し、減圧下でトルエンと共蒸留して、オフホワイト固体として所望の粗生成物 VP 1 6 2 を得た (4.28 g、収率：89.16)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 5.27 (bs, 1H), 4.06-4.20 (m, 4H), 3.75-3.85 (m, 3H), 3.50-3.70 (m, 144H), 3.30-3.50 (m, 6H), 2.59 (t, J = 6 Hz, 2H), 1.53-1.56 (m, 4H), 1.20-1.30 (m, 45H), 0.80-0.90 (m, 6H). MS m/z : [M + H]⁺、理論値 2185.4 ; 実測値 2185.0。

【0634】

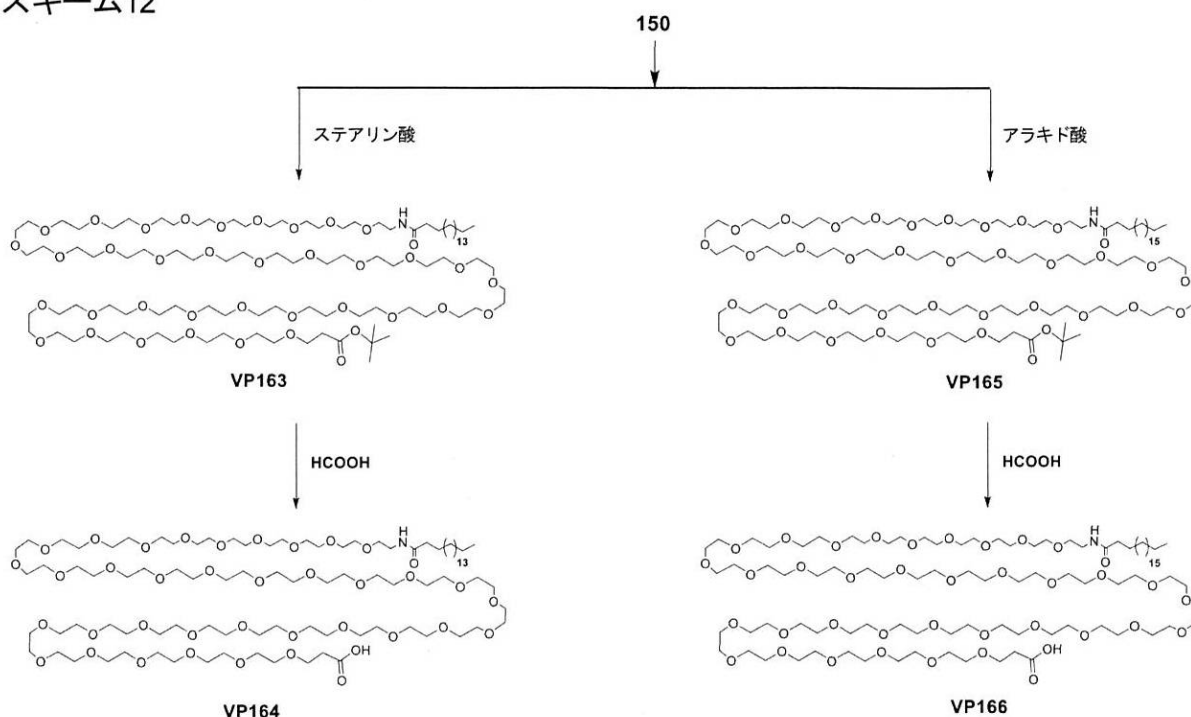
【0483】実施例 31. PEG-脂質 VP 1 6 3、VP 1 6 4、VP 1 6 5、VP 1 6 6、および VP 1 7 7 の合成

【0635】

10

【化 80】

スキーム 12



20

30

【0636】

【0484】DCM (8.6 mL) 中のステアリン酸 (430 mg、1.51 mmol) の攪拌溶液に、室温で HOBt (20.4 mg、0.15 mmol) を添加した。この反応混合物に氷冷温度で HBTU (720.5 mg、1.81 mmol) を添加し、続いて DIPEA (0.78 mL、4.53 mmol) を添加した。次に、DCM (2.1 mL、5 vol) 中の化合物 150 (2.61 g、1.51 mmol) の溶液を氷冷温度で添加し、得られた反応混合物を 4 時間、室温で攪拌した。反応混合物に水 (30.0 mL) を添加し、DCM (2 × 30 mL) で抽出した。有機層をブライン (30.0 mL) で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させて、濾過し、濾液を減圧下で蒸発させて所望の粗生成物を得た。粗生成物を溶離剤として DCM 中の 10% MeOH を用いるシリカゲルカラムクロマトグラフィー (Combiflash) により精製して、オフホワイト固体として VP 1 6 3 を得た (2.31 g、収率：76.74%)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 6.30-6.40 (bs, 1H), 3.38-3.72 (m, 151H), 2.68 (bs, 3H), 2.49 (t, J = 8.8 Hz, 2H), 2.19 (t, J = 9.6 Hz, 2H), 1.61-1.64 (m, 4H), 1.45 (s, 9H), 1.20-1.45 (m, 29H), 0.80-0.85 (m, 3H). MS m/z : [M + Na]⁺、理論値 2019.3 ; 実測値 2019.0。

40

【0637】

【0485】PEG-脂質 VP 1 6 4 を VP 1 6 2 の合成方法 (スキーム 11) に従って合

50

成した。VP164をオフホワイト固体として単離した（1.81 g、収率：88.72%）。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 6.25 (bs, 1H), 3.54-3.81 (m, 144H), 3.42-3.47 (m, 3H), 2.59 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 2.17 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 1.40-1.63 (m, 4H), 1.20-1.45 (m, 27H), 0.80-0.85 (m, 3H). MS m/z: [M+H]⁺、理論値1941.2；実測値1941.0。

【0638】

[0486]PEG-脂質VP165を、化合物150とアラキジン酸を反応させることにより、VP164と同じ合成方法でオフホワイト固体として単離した。（2.52 g、収率：89.0%）¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 6.38 (bs, 1H), 3.38-3.72 (m, 132H), 2.47-2.57 (m, 4H), 2.19 (t, J = 9.6 Hz, 1H), 1.61-1.64 (m, 1H), 1.43 (s, 9H), 1.20-1.24 (m, 29H), 0.80-0.85 (m, 3H). MS m/z: [M+N a]⁺、理論値2047.3；実測値2047.0。

10

【0639】

[0487]PEG-脂質VP166を実施例VP164と同じ合成方法でオフホワイト固体として単離した（2.52 g、収率：89.0%）。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 6.29 (bs, 1H), 5.03 (bs, 3H), 3.54-3.82 (m, 146H), 3.44-3.46 (m, 3H), 2.59 (t, J = 6 Hz, 2H), 2.18 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 1.59-1.63 (m, 2H), 1.25-1.35 (s, 32H), 0.80-0.85 (m, 3H). MS m/z: [M+H]⁺、理論値1969.2；実測値1969.0。

20

【0640】

[0488]PEG-脂質VP177は、実施例33に記載されるように、スキーム10Bに従って合成された。PEG-脂質VP177はオフホワイト固体として単離された。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 5.345-5.309 (m, 1H), 4.33-4.30 (m, 2H), 4.25-4.21 (m, 1H), 4.15-4.10 (m, 1H), 4.01-4.00 (m, 1H), 3.84 (m, 1H), 3.73-3.70 (m, 3H), 3.67-3.65 (m, 168H), 3.57-3.54 (m, 5H), 3.50-3.42 (m, 8H), 3.39 (s, 3H), 1.57-1.54 (m, 5H), 1.30-1.26 (m, 46H), 0.90-0.87 (t, 6H). MS m/z: [M+H/2]⁺、理論値1227.0；実測値1227.0。

【0641】

[0489]実施例32. アミノ脂質VL509、VL510およびVL511の合成

【0642】

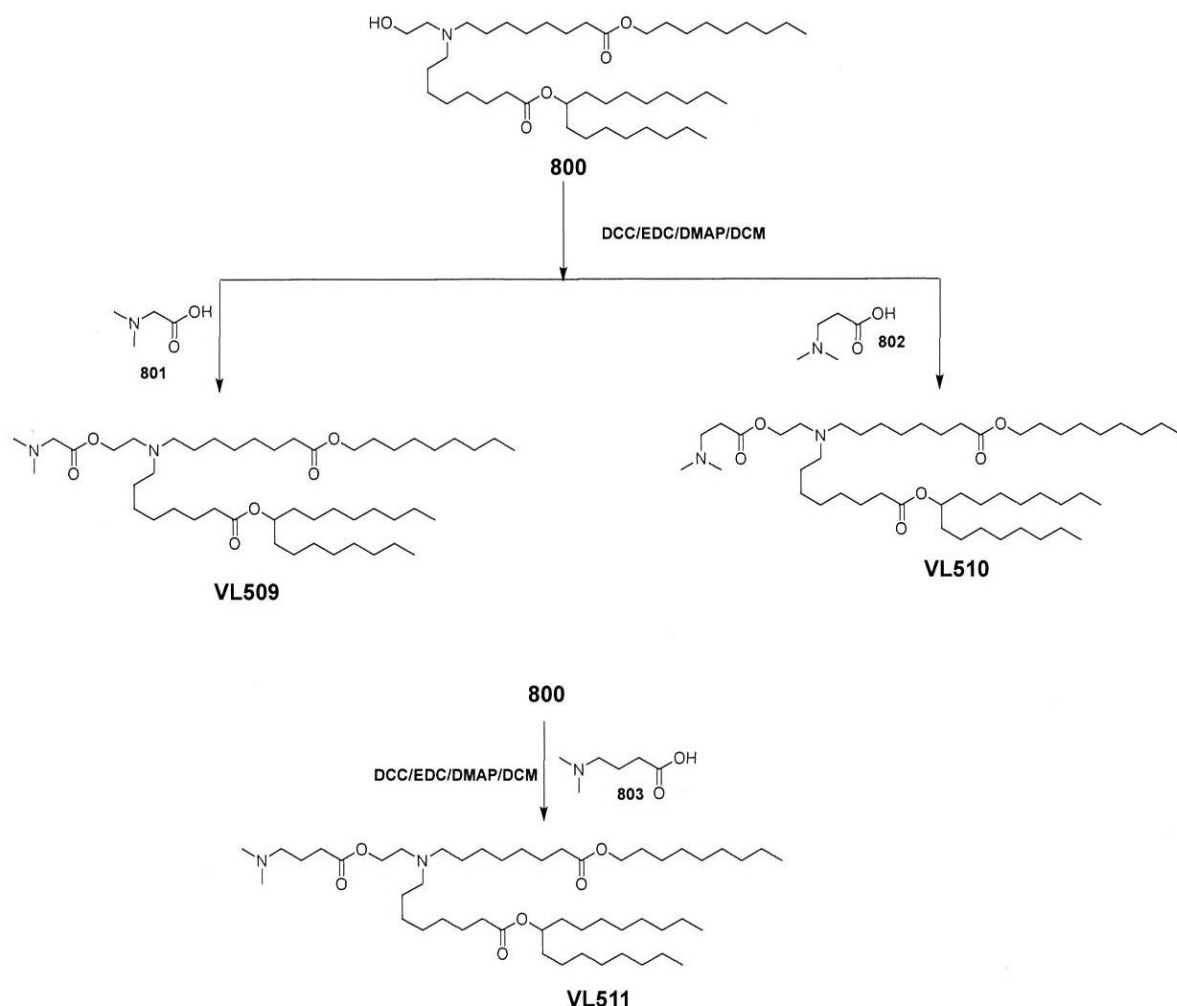
30

40

50

【化 8 1】

スキーム 13.



10

20

30

【0643】

[0490] DCM (60 mL) 中の 800 (3 g、4.23 mmol) および 801 (871 mg、8.46 mmol) の攪拌溶液に、EDC・HCl (1.61 g、8.46 mmol) および DMAP (774 mg、6.34 mmol) を添加した。反応物を室温で 18 時間攪拌した。反応物を DCM (100 mL) で希釈し、水 (100 mL) で洗浄した。有機層を分離し、ブラインで洗浄し、次に Na_2SO_4 で乾燥させて、濾過し、減圧下で蒸発させた。粗生成物を EtOAc (100 mL) に取り、1N HCl (50 mL) で処理し、次に有機層を飽和 NaHCO_3 溶液 (50 mL) で洗浄し、次にブラインで洗浄し、無水 Na_2SO_4 で乾燥させて、濾過し、減圧下で蒸発させ、無色液体として VL509 を得た (2.32 g、収率 70%)。 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 4.87-4.84 (m, 1H), 4.23-4.12 (br m, 2H), 4.05 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 3.17 (s, 2H), 2.52-2.49 (br m, 5H), 2.35 (s, 6H), 2.30-2.25 (m, 4H), 2.05-2.00 (m, 3H), 1.64-1.49 (m, 12H) 1.30-1.25 (m, 48H), 0.89-0.86 (m, 9H). MS m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ 、理論値 795.71; 実測値 795.83。

40

【0644】

[0491] アミノ脂質 VL510 は、アミノ脂質 VL509 の合成に関して記載されるように、化合物 800 および 802 から淡黄色液体として合成された。 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 4.87-4.84 (m, 1H), 4.14 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 4.05 (t, $J =$

50

6.8 Hz, 2H), 2.67-2.59 (m, 4H), 2.49-2.41 (m, 6H), 2.30-2.25 (m, 4H), 2.24 (s, 6H), 1.64-1.49 (m, 14H) 1.30-1.25 (m, 48 H), 0.89-0.85 (m, 9H). MS m/z : $[M+H]^+$ 、理論値 809.73; 実測値 809.84。

【0645】

[0492]アミノ脂質VL511は、アミノ脂質VL509の合成に関して記載されるように、化合物800および803から無色液体として合成された(1.2g、収率52%)。 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 4.87-4.84 (m, 1H), 4.13 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 4.07 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 2.69 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 2.45-2.30 (m, 8H), 2.30-2.25 (m, 10H), 1.84-1.83 (m, 2H), 1.63-1.30 (m, 14H) 1.30-1.25 (m, 48 H), 0.89-0.85 (m, 9H). MS m/z : $[M+H]^+$ 、理論値 823.74; 実測値 823.93。

10

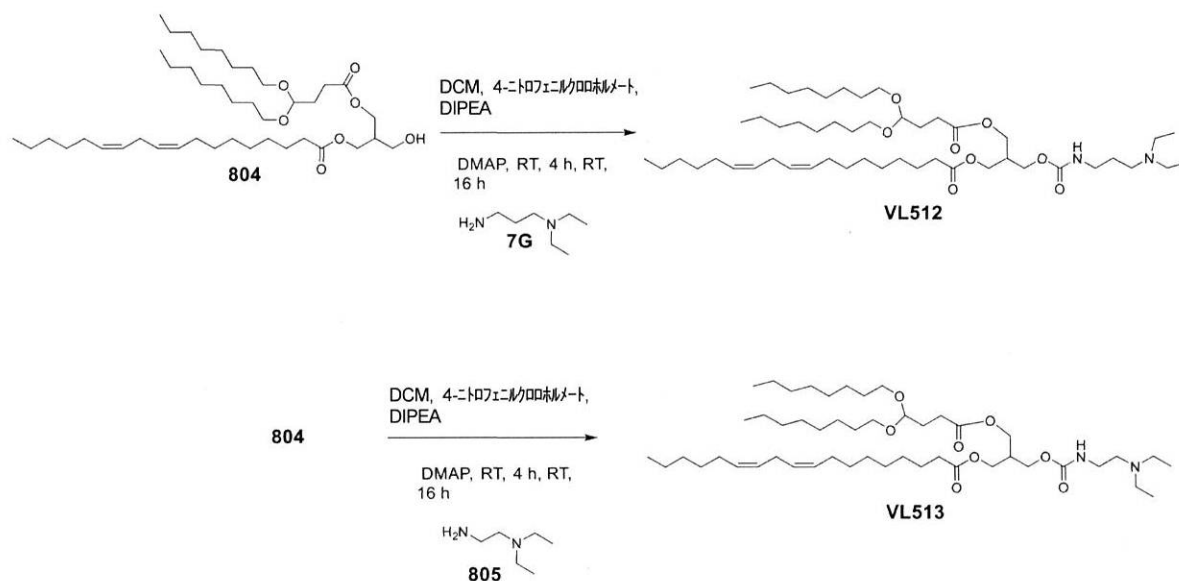
【0646】

[0493]実施例33. アミノ脂質VL512とVL513の合成

【0647】

【化82】

スキーム14.



20

30

【0648】

[0494]DCM (10 mL) 中の化合物 804 (1 g、1.43 mmol) の溶液に、4-ニトロフェニルクロロホルメート (578 mg、2.87 mmol)、続いて DIPEA (0.5 mL、2.87 mmol) および DMAP (35 mg、0.286 mmol) を添加し、反応を4時間継続した。反応完了後、化合物 7G (1.1 g、8.58 mmol) を添加した。16時間後、反応混合物を DCM および水で希釈し、有機層を分離し、蒸発して粗生成物を得た。これを5% EtOAc および pet-エーテルで溶出するシリカゲルカラムにより精製して、黄色油状物として VL512 を得た (320 mg、26%)。 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 6.2 (bs, 1H), 5.37-5.34 (m, 4H), 4.48 (t, 1H), 4.20-4.13 (m, 6H), 3.57-3.54 (m, 2H), 3.41-3.38 (m, 2H), 3.3-3.26 (m, 2H), 2.76 (t, 2H), 2.75-2.28 (m, 10H), 2.07-2.02 (m, 4H), 1.92-1.91 (m, 2H), 1.6-1.52 (m, 8H), 1.37-1.127 (m, 35H), 1.06 (m, 6H), 0.89-0.86 (m, 9H). MS m/z : $[M+H]^+$ 、理論値 851.5; 実測値 851.5。

40

【0649】

[0495]アミノ脂質VL513は、アミノ脂質VL512の合成に関して記載されるように、化合物 804 および 805 から無色液体として合成された (300 mg、24.9

50

%)。 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 5.36-5.34 (m, 4H), 4.48 (t, 1H), 4.20-4.12 (m, 6H), 3.57-3.54 (m, 2H), 3.41-3.38 (m, 2H), 3.25-3.15 (m, 2H), 2.77 (t, 2H), 2.60-2.45 (m, 5H), 2.43-2.34 (m, 3H), 2.30 (t, 2H), 2.1-2.0 (m, 4H), 1.92-1.91 (m, 2H), 1.6-1.52 (m, 8H), 1.37-1.27 (m, 35H), 1.06 (m, 6H), 0.89-0.86 (m, 9H). MS m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ 、理論値 837.7; 実測値 837.7。

【0650】

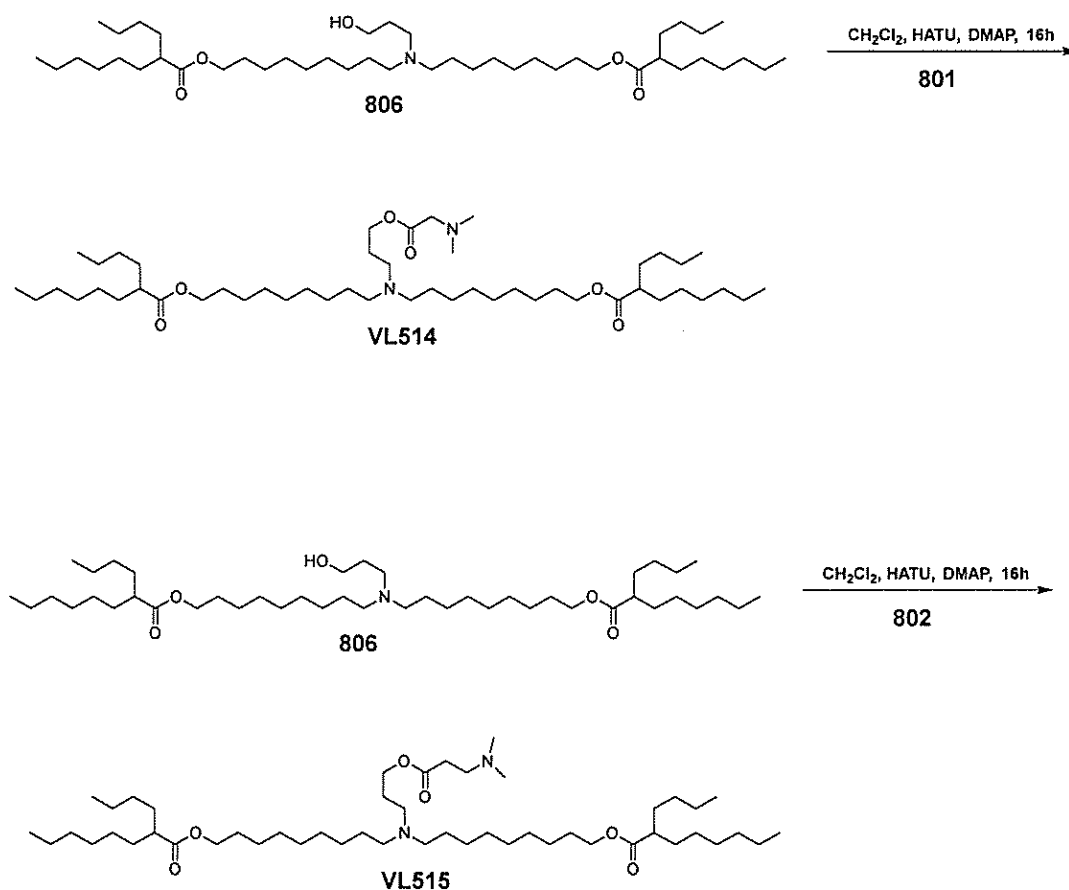
[0496] 実施例 34. アミノ脂質 VL514 および VL515 の合成

【0651】

【化 83】

10

スキーム 15



20

30

40

【0652】

[0497] DCM (8 mL) 中の化合物 806 (0.44 g、0.28 mmol) の攪拌溶液に、801 (0.06 g、0.56 mmol) を添加し、続いて HATU (0.22 g、0.58 mmol) および DMAP (0.05 g、0.42 mmol) を RT で添加し、次に 16 時間攪拌した。反応混合物を DCM (50 mL) で希釈し、水 (25 mL)、ブライン (25 mL) で洗浄した。有機層を無水 Na_2SO_4 で乾燥させて、濾過し、蒸発させて粗化合物を得た。得られた粗化合物を、まず、DCM 中の 3% MeOH で溶出することによりシリカゲルカラムにより精製し、次に、調製用 HPLC (移動相 A: 水中の 10 mM ギ酸アンモニウム: 移動相 B: アセトニトリル/イソプロピルアルコール (10:90)) で精製して、淡黄色ゴム状液体としてアミノ脂質 VL514 を得た (0.

50

0.86 g、19%)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ ppm 4.32 (t, 2H), 4.06 (t, 4H), 3.78 (s, 2H), 3.26 (t, 2H), 3.04 (br s, 4H), 2.83 (s, 6H), 2.33-2.25 (m, 4H), 1.73-1.58 (m, 8H), 1.47-1.25 (m, 52H), 0.89-0.88 (m, 12H). MS m/z: [M+H]⁺、理論値 809.6; 実測値 809.6。

【0653】

[0498] アミノ脂質 VL515 は、アミノ脂質 VL514 の合成に関して記載されるように、化合物 806 および 802 から無色液体として合成された (0.49 g、33%)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ ppm 4.30 (t, 2H), 4.06 (t, 4H), 3.49 (t, 2H), 3.29 (t, 2H), 3.07 (br s, 4H), 2.95 (s, 8H), 2.32-2.28 (m, 2H), 2.21 (br s, 2H), 1.71-1.54 (m, 12H), 1.47-1.25 (m, 48H), 0.89-0.86 (m, 12H). MS m/z: [M+H]⁺、理論値 823.6; 実測値 823.6。

10

【0654】

[0499] 実施例 35. アミノ脂質 VL516 の合成

[0500] DCM (1000 mL) 中の化合物 806 (50 g、412 mmol) の攪拌溶液に、TBDMS-Cl (224 g、1480 mmol) およびイミダゾール (210.8 g、3100 mmol) を 0℃ で添加した。反応混合物を 27℃ に加温し、16 時間攪拌した。完了時、反応混合物を濾過し、母液を飽和 NaHCO₃ 溶液、水およびブラインで洗浄した。有機層を Na₂SO₄ で乾燥させて、濾過し、濃縮して粗化合物を得た。これをシリカゲル (230~400 メッシュ) カラムクロマトグラフィーで精製し、pet-エーテル中の 5% EtOAc で溶出した。生成物を含有する画分を収集し、減圧下で濃縮して、無色液体として化合物 807 (100 g、収率: 49.6%) を得た。DCM (1500 mL) 中の攪拌溶液化合物 808 (36 g、215.84 mmol) に、0℃ で DIPEA (113 mL、647.5 mmol) および HATU (123.2 g、324.14 mmol) を添加した。10 分後、807 (100 g、215.84 mmol) を添加した。次に、反応混合物を 27℃ に加温し、16 時間攪拌した。完了時、真空中で除去された全ての揮発性物質および残渣を EtOAc で希釈した。有機層を飽和 NaHCO₃ 溶液、水、ブラインで洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥させて、濾過し、濃縮して所望の 809 (108 g、74%) を得た。THF (300 mL) 中の 809 (20 g、34.72 mmol) の攪拌溶液に、TBAF (THF 中の 1M 溶液) (121.5 mL、121.52 mmol) を 0℃ で添加した。反応混合物を 27℃ に加温し、2 時間攪拌して中間体 809A を得た。反応混合物に、EDC·HCl (26.6 g、138.8 mmol)、リノール酸 (38.95 g、138.88 mmol) および DMAP (850 mg、6.94 mmol) を添加し、得られた混合物を 27℃ で 16 時間攪拌した。完了時、全ての揮発性物質を真空中で除去し、残渣をシリカゲル (230~400 メッシュ、アンモニアで中和した) カラムクロマトグラフィーで精製し、pet-エーテル中の 40~50% EtOAc で溶出した。生成物を含有する画分を収集し、減圧下で濃縮して、黄色がかった濃い液体としてアミノ脂質 VL516 (5.1 g、収率: 14.4%) を得た。MS m/z: [M+H]⁺、理論値 1022.61; 実測値 1022.32。

20

30

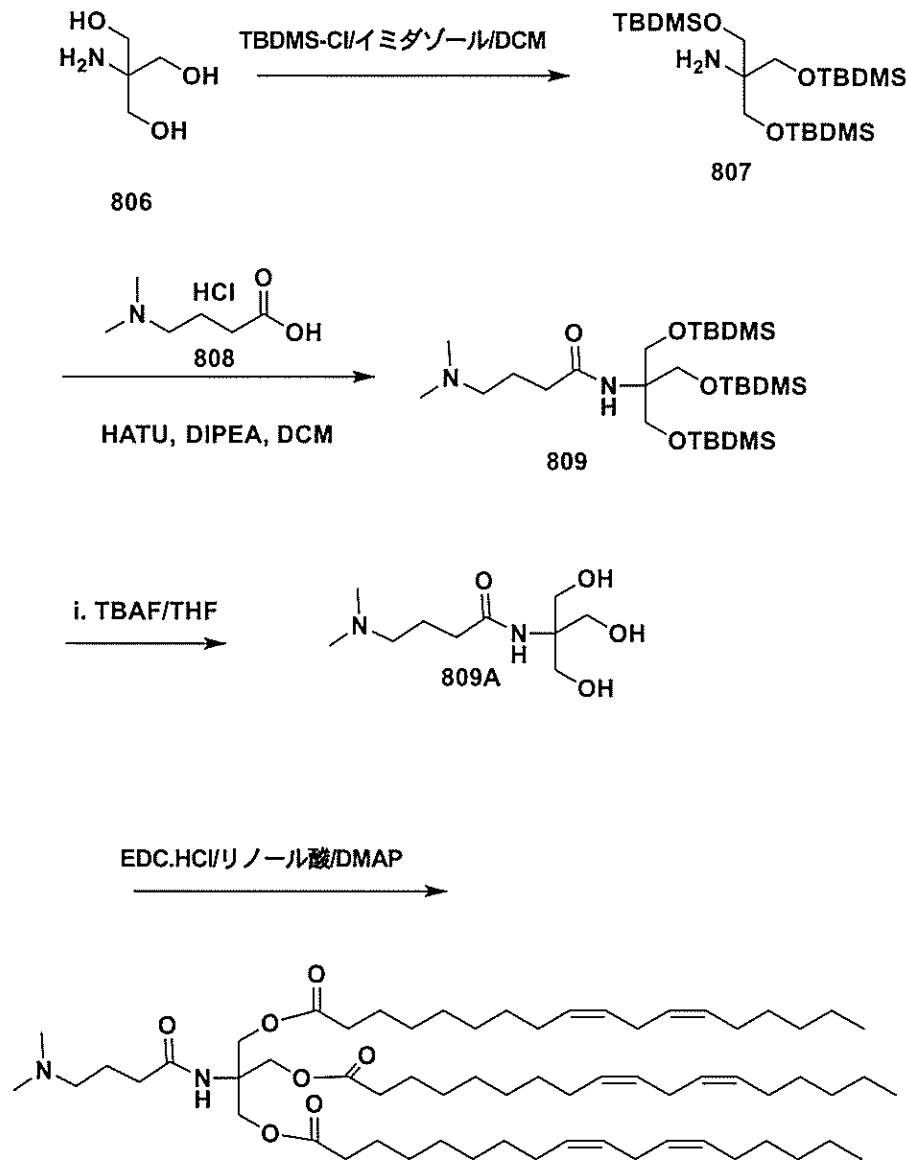
【0655】

40

50

【化 8 4】

スキーム16.



10

20

30

【0656】

[0501] 実施例 36. アミノ脂質 VL517 の合成

[0502] DCM (200 mL) 中の (9Z, 12Z) - オクタデカ-9, 12-ジエン-1-オール (20 g、75.1 mmol) の攪拌溶液に、ジヒドロフラン-2, 5-ジオン (9 g、90.2 mmol) および DMAP (11.9 g、97.7 mmol) を RT で添加し、2 時間攪拌した。完了時、反応混合物を 1 N HCl で酸性化し、DCM 中に抽出した。有機層を水、ブラインで洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥させて、濾過し、濃縮して所望の化合物 810 を得た (20 g、70%)。THF (150 mL) 中の 810 (8 g、13.9 mmol) の攪拌溶液に、EDC.HCl (13.2 g、69.4 mmol)、DMAP (338 mg、2.7 mmol) および 809A (20.3 g、55.5 mmol) を反応混合物に添加し、得られた混合物を 27 °C で 16 時間攪拌した。完了時

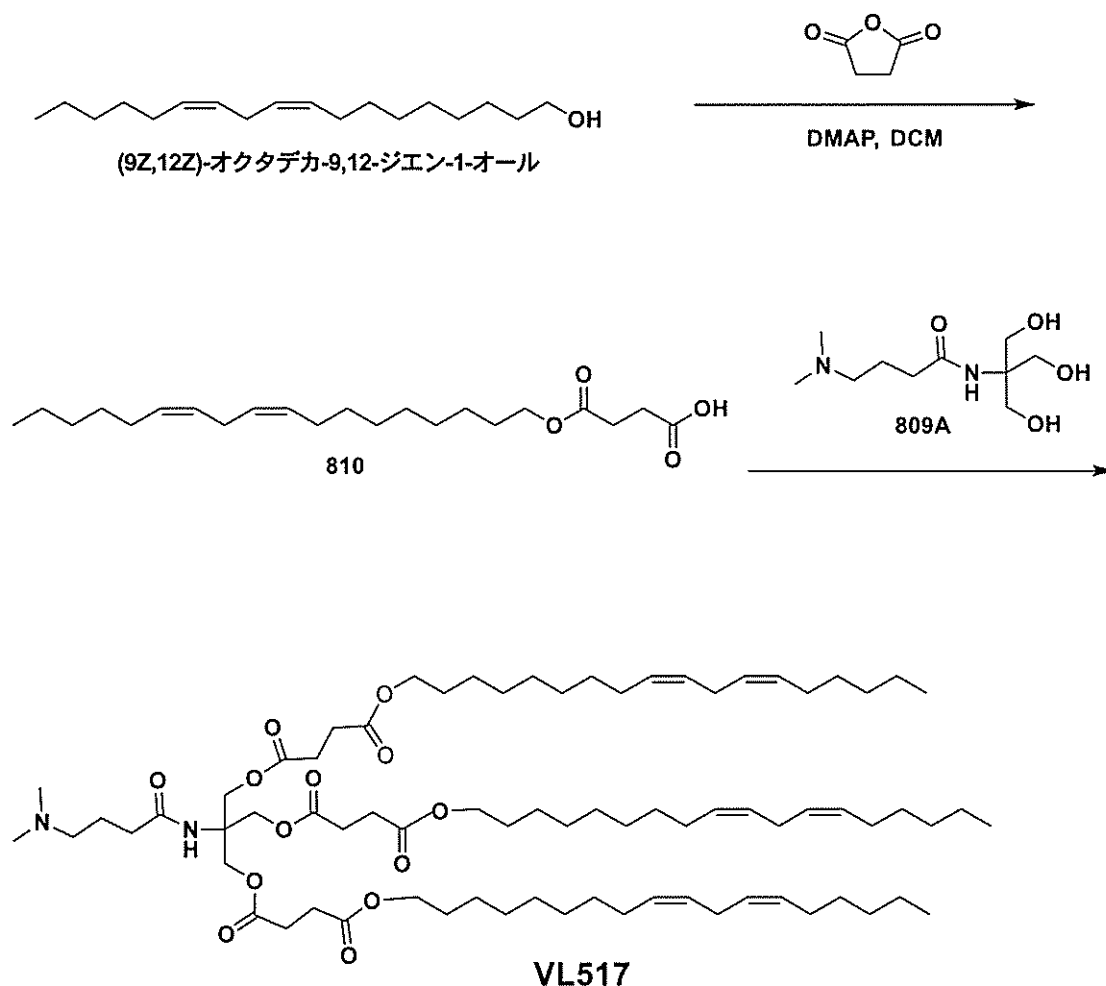
50

、全ての揮発性物質を真空中で除去し、残渣をシリカゲル（２３０～４００メッシュ、トリエチルアミンで中和した）カラムクロマトグラフィーで精製し、pet-エーテル中の４０～５０％EtOAcで溶出した。次に、得られた化合物を調製用HPLCにより精製し、生成物を含む画分を収集し、減圧下で濃縮し、次に凍結乾燥させて、黄色液体としてアミノ脂質VL517（１．４g、収率：８％）を得た。MS m/z : $[M+H]^+$ 、理論値１２８０．８８；実測値１２８０．０５。

【０６５７】

【化８５】

スキーム17.



【０６５８】

【０５０３】実施例３７．アミノ脂質VL518の合成

【０５０４】THF（６０mL）中の化合物８０８（７．０３g、４１．９５mmol）の攪拌溶液に、DIPEA（１６．６mL、９５．３５mmol）、続いてDCC（１５．７g、７６．２８mmol）を０℃で添加した。次に、反応混合物をRTで１５分間攪拌した。次に、化合物８１０Ａ（５g、３８．１４mmol）を０℃で添加し、得られた反応混合物をRTで４時間攪拌した。反応完了後、反応混合物を濾過し、次に、濾液を水（１５０mL）とDCM（３×１５０mL）の間に分配した。有機層を、飽和塩化アンモニウム溶液（２×８０mL）および飽和ブライン溶液（２×８０mL）で洗浄し、Na₂SO₄で乾燥させて、濾過し、蒸発させて、化合物８１１を得た（粗生成物、オフホワイトの濃い油状液体として）。粗生成物８１１を、さらなる精製なしに、次の工程で直接使用した。８１１（７g、２８．６６mmol）および酢酸（１２０mL、水中で８０％）をRTで１６時間攪拌した。反応混合物を真空下で蒸発させた。得られた白色固体を水（５

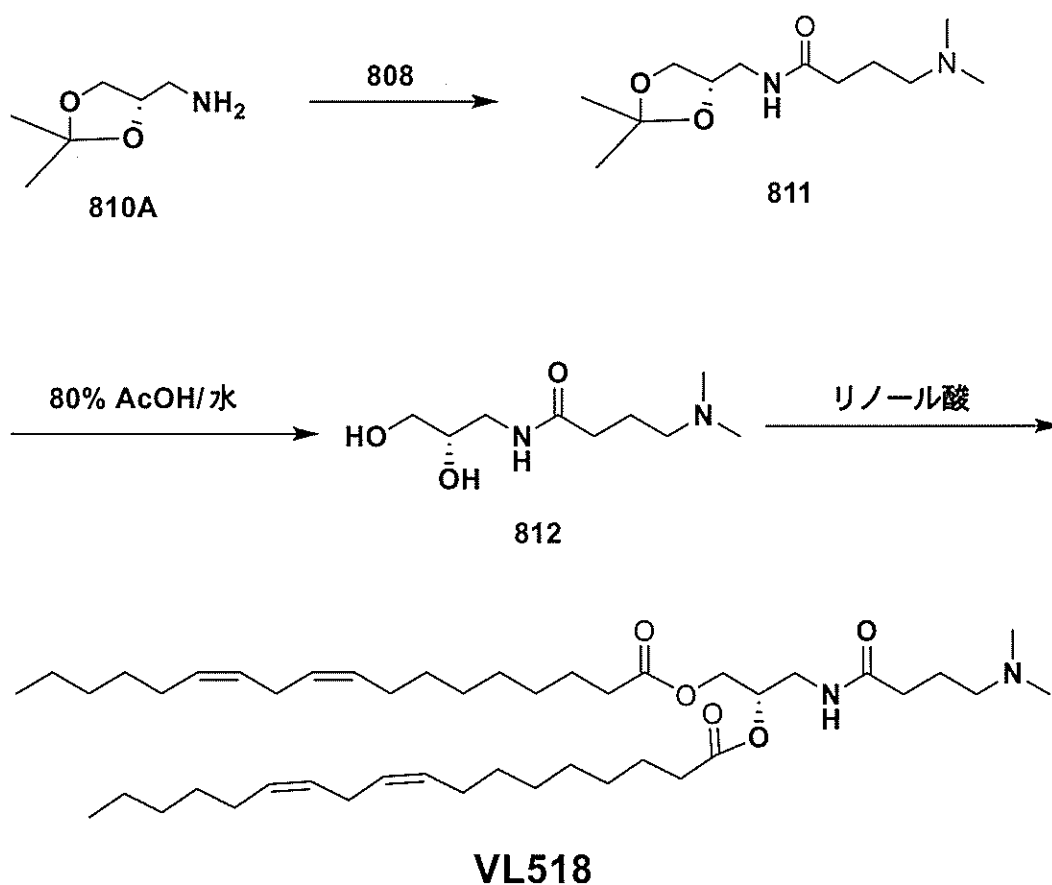
0 mL) に溶解し、RT で 15 分間攪拌し、濾過した。得られた濾液を集め、真空下で蒸発させて、粘稠油状物として化合物 812 (6 g、粗生成物) を得た。DCM (80 mL) 中の粗生成物 812 (6 g、29.39 mmol) およびリノール酸 (16.47 g、73.47 mmol) の攪拌溶液に、EDC・HCl (11.26 g、58.78 mmol)、DIPEA (12.7 mL、73.47 mmol) および DMAP (1.79 g、14.69 mmol) を 0 °C で添加し、反応混合物を RT で 16 時間攪拌した。反応混合物を水 (100 mL) と DCM (3 × 150 mL) の間に分配した。有機層を飽和ブライン (2 × 80 mL) で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥させて、濾過し、減圧下で蒸発させて粗生成物を得た。これを調製用 HPLC によりさらに精製して、黄色ゴム状物としてアミノ脂質 VL518 を得た。MS m/z : $[M+H]^+$ 、理論値 729.61; 実測値 729.3。

10

【0659】

【化86】

スキーム18.



20

30

【0660】

40

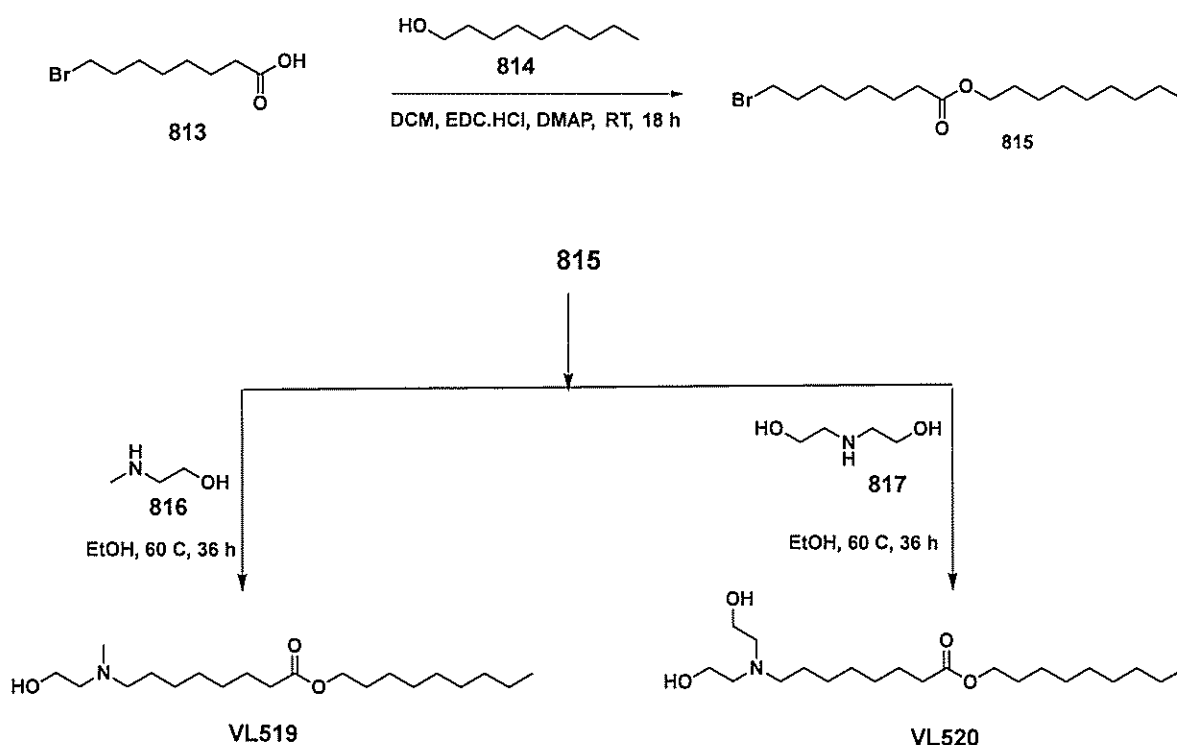
【0505】実施例38. アミノ脂質 VL519 および VL520 の合成

【0661】

50

【化 8 7】

スキーム 19.



【0 6 6 2】

[0506] DCM (100 mL) 中の化合物 813 (5 g、22 mmol) および化合物 814 (6.46 g、45 mmol) の攪拌溶液に、EDC.HCl (4.3 g、22 mmol) および DMAP (547 mg、4.5 mmol) を添加した。反応物を室温 (RT) で 18 時間攪拌した。反応物を DCM (100 mL) で希釈し、飽和 NaHCO₃ 水溶液 (50 mL) で抽出した。有機層を分離し、ブラインで洗浄し、次に Na₂SO₄ で乾燥させて、濾過し、真空下で蒸発させた。残渣を溶離剤として pet-エーテル中の 0~10% EtOAc を用いるシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製して、無色液体として化合物 815 (5 g、収率 64%) を得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4.06 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 3.40 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 3.40 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 2.29 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 1.85 (m, 2H), 1.72-0.97 (m, 22H), 0.88 (m, J = 6.8 Hz, 3H). エタノール (28 mL) 中の化合物 815 (7 g、20 mmol) の溶液に、化合物 816 (6.04 g、80 mmol) を添加し、60 °C で 36 時間加熱した。完了後、反応混合物を pet-エーテル (50 mL) および水 (50 mL) で希釈した。次に、有機層を分離し、ブライン溶液で洗浄した。得られた分離有機層を無水 Na₂SO₄ で乾燥させて、残留溶媒を高真空下で蒸発させた。粗生成物をペンタン (25 mL) に取り、-78 °C に冷却し、沈殿した固形物を濾過し、冷ペンタン (2 ×、20 mL) で洗浄した。固体を真空下で乾燥させて、オフホワイト半固体としてアミノ脂質 VL519 (2.1 g、収率 30%) を得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4.07 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 3.58 (t, J = 5.6 Hz, 2H), 2.52 (t, J = 5.6 Hz, 2H), 2.40 (

t, J = 7.2 Hz, 2H), 2.31 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 2.23 (s, 3H), 1.63-1.58 (m, 4H), 1.49-1.46 (m, 2H), 1.46-1.27 (m, 18H), 0.89 (t, J = 6.4 Hz, 3H). MS m/z: [M+H]⁺, 理論値 344.31; 実測値 344.36。

【0663】

【0507】VL520と同じ合成プロトコールに従って、スキーム19に示されるように、アミノ脂質VL520を合成した。アミノ酸脂質VL520をオフホワイト半固体として単離した(3.5g、収率44%)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4.07 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 3.63 (t, J = 5.6 Hz, 4H), 2.67 (t, J = 5.6 Hz, 4H), 2.54 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 2.31 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 1.84-1.83 (m, 4H), 1.59-1.48 (m, 2H), 1.46-1.27 (m, 18H), 0.89 (t, J = 6.4 Hz, 3H). MS m/z: [M+H]⁺, 理論値 374.32; 実測値 374.37。

10

【0664】

【0508】実施例39. LNP F227~F234を製剤化し、実施例24に記載されるように特性決定した。LNP F227~F230を、アミノ脂質502およびPEG-脂質VP196~VP199を用いて製剤化した。製剤F231~F234は、アミノ脂質VL422およびPEG-脂質VP196~VP199を用いて製剤化された。F227~F234の脂質組成を表25に記載する。

【0665】

【表26】

表 25. F227~F234 の脂質組成および物理化学的特性

20

LNP	mRNA	gRNA	アミノ脂質	PEG-脂質	アミノ脂質/コレステロール(511)/DSPC(512)/PEG-脂質 mol %	N:P	Z 平均 (nm)	PDI	RNA 捕捉%
F227	MA004	GA260	502	VP196	55/38.2/4.7/2.1	8	98.19	0.05	90.25
F228	MA004	GA260	502	VP197	55/38.2/4.7/2.1	8	99.18	0.06	90.40
F229	MA004	GA260	502	VP198	55/38.2/4.7/2.1	8	109.7	0.09	82.56
F230	MA004	GA260	502	VP199	55/38.2/4.7/2.1	8	107.2	0.10	84.50
F231	MA004	GA260	VL422	VP196	50/38/9/3	6	68.1	0.01	93.1
F232	MA004	GA260	VL422	VP197	50/38/9/3	6	65.8	0.01	93.3
F233	MA004	GA260	VL422	VP198	50/38/9/3	6	108.3	0.02	91.3
F234	MA004	GA260	VL422	VP199	50/38/9/3	6	113.7	0.002	89.8

30

40

【0666】

【0509】実施例40. 非ヒト霊長類(NHP)におけるアミノ脂質422および454を含有するLNP製剤の評価

【0510】表26に示されるLNP F190AおよびF235~237をX-ミキサーを用いて製剤化した。緩衝液交換(pH7.5で50mM Tris)をTFFを用いて行った。混合後のエタノール濃度を水性緩衝液中で8%に変更することにより、F235を調製した。LNP製剤F190AおよびF235~F237をカニクイザル(n=3)

50

に1時間かけて静脈内注入により投与した。カニクイザルにおけるANGPTL3遺伝子の編集を評価するために、ガイドRNA GA347およびmRNA MA004を用いて構成されるLNPを投与することにより、2週間の研究を行った(図25)。MA004/GA347 LNPは、肝臓におけるANGPTL3遺伝子の標的化アデニン塩基編集を生成する目的でカニクイザルに投与された。被験物質の投与2週間後、肝臓サンプルを採取するために動物を剖検し、サンプルを-86~-60℃で保存した。次世代シーケンシングによりスプライス部位の編集を分析し、塩基変化が生じたことを確認した。LNP製剤F190Aを2mg/kg、1.5mg/kgおよび1mg/kg(n=3)の総RNAで投与し、NHPにおけるVL422-LNPの編集活性に対する用量反応を評価した(図25)。LNP F235、F236およびF237を2mg/kgで投与した(表26)。

10

【0667】

【0511】全ての動物研究(マウスおよびサル)は、それぞれの動物実験委員会(IAUCUC)の承認を得た。

【0668】

【表27】

表 26. F190A および F235~F237 の脂質組成および物理化学的特性

LNP	mRNA	gRNA	アミノ脂質/コレステロール(511)/DSPC(512)/PEG-脂質(507) mol %	アミノ脂質	N:P	Z 平均(nm)	PDI	RNA 捕捉%	ANGPTL3 編集%
F190A	MA004	GA347	50/38/9/3	VL422	6	72.7	0.06	94.3	図 25 参照
F235	MA004	GA347	50/38/9/3	VL422	6	68.7	0.03	92.5	
F236	MA004	GA347	50/38/9/3	VL454	6	68.6	0.02	93.8	
F237	MA004	GA347	52.4/35.6/9/3	VL454	6	68.2	0.06	91.9	

20

30

【0669】

【0512】肝臓編集に加えて、血清ANGPTL3タンパク質をLNP製剤F190AおよびF235~F237の投与後にNHP(n=3)で測定した。血清ANGPTL3タンパク質分析のために、LNPの投与前(-10、-7および-5日目)および投与15日後の様々な時間点で全血サンプルを収集した。採取した血液サンプルから血清サンプルを分離し、ANGPTL3測定を行った。ANGPTL3タンパク質レベルの分析には、組換えカニクイザルANGPTL3タンパク質(10052-AN、R&D Systems)とヒトANGPTL3 ELISAキット(DANL30、R&D Systems、Minneapolis、MN)を用いて、LNP投与15日後に採取した前投与血清サンプルおよび血清サンプルをタンパク質レベルについて分析した(製造者の指示に従う)。15日目の処置NHPにおけるベースラインからの血清ANGPTL3レベルの変化パーセンテージを図26に示す。

40

【0670】

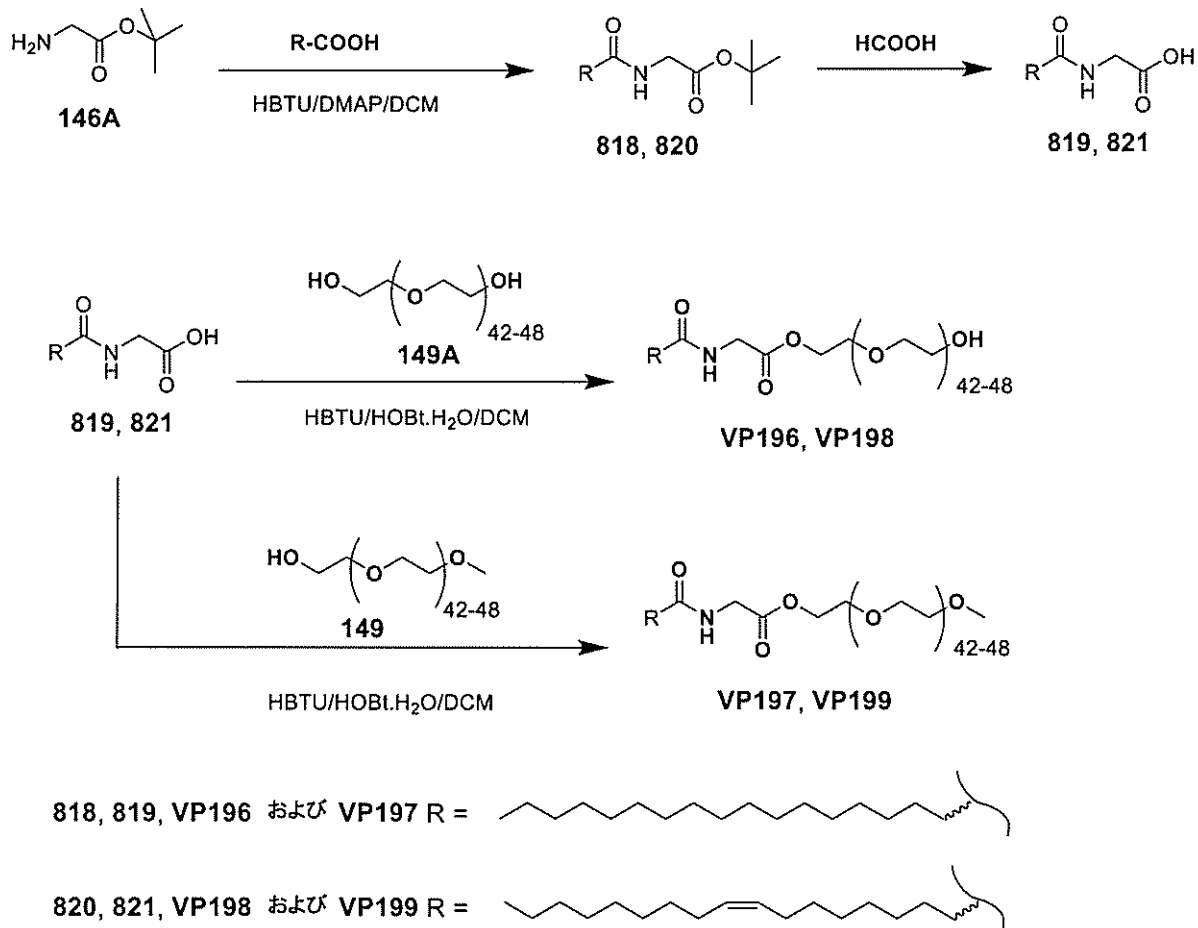
【0513】実施例41. PEG-脂質VP196、VP197、VP198およびVP199の合成はスキーム20に例証されるようにして達成した。

【0671】

50

【化 8 8】

スキーム20.



【0672】

[0514] PEG-脂質VP196: DCM (30 mL) 中のステアリン酸 (3.0 g、10.5 mmol、1.0 当量) の攪拌溶液に、HBTU (6.0 g、15.8 mmol、1.5 当量)、続いてDMAP (0.26 g、2.1 mmol、0.2 当量) をアルゴン雰囲気下で添加した。混合物を10~15℃で30分間攪拌し、tert-ブチルグリシネート (146A、1.38 g、10.5 mmol、1.0 当量) を添加し、続いてDIPEA (4.68 mL、26.7 mmol、2.5 当量) を滴下した。混合物を10~15℃でさらに10分間攪拌し、冷却浴を除去し、混合物を室温 (RT) で16時間攪拌した。反応完了時、反応混合物を減圧下で濃縮して粗生成物を得た。これをヘキサン中20~25% EtOAcを用いるカラムクロマトグラフィーにより精製して、白色固体として化合物818を得た (3.32 g、79.2%)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ ppm, 5.91 (s, 1H), δ 3.95-3.94 (d, 2H), 2.24-2.21 (t, 2H), 1.66-1.59 (m, 2H), 1.48 (s, 9H), 1.32-1.25 (m, 30H), 0.90 (m, 3H). DCM (18 mL) 中の中間体818 (3.3 g、8.3 mmol) の攪拌溶液に、RTでギ酸 (29 mL) を添加し、16時間攪拌し、混合物を濃縮してギ酸を除去し、減圧下でトルエンと共蒸発させて、粗化合物819を白色固体として得、これをさらに精製することなく次の工程に使用することができた。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ ppm, 12.46 (s, 1H), δ 8.08-8.05 (m, 1H), 3.70-3.68 (d, 2H), 2.10-2.06 (m, 2H), 1.47-1.44 (m, 2H), 1.38-1.27 (m, 30H), 0.90 (m, 3H). 乾燥DCM (5 mL) 中の化合物819 (0.5 g、1.46 mmol、1.0 当量) の攪拌溶液に、HBTU (0.83 g、2.19 mmol、1.5 当量) を10~15℃で添加し、続いて不活性雰囲気下でH

OBt水和物 (0.06 g、0.43 mmol、0.3 当量) を添加した。混合物を 10 ~ 15 °C で 30 分間攪拌し、乾燥 DCM (2.5 mL、モレキュラーシーブで処理した) 中の 149A (2.92 g、1.46 mmol、1.0 当量) の溶液を添加し、次に DIPEA (0.76 mL、4.38 mmol、3.0 当量) を滴下添加した。攪拌を 10 ~ 15 °C でさらに 10 分間継続し、冷却浴を除去し、混合物を室温で 16 時間攪拌した。完了時、反応混合物を濃縮して粗生成物を得た。これを EtOAc 中 20 ~ 25 % MeOH を用いるシリカゲルクロマトグラフィー、続いて水中 40 ~ 50 % アセトニトリルを用いる逆相カラムクロマトグラフィーにより精製し、白色固体として所望の生成物 VP196 を得た (0.63 g、18.52%)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ ppm, 6.09 (t, 1H), δ 4.32-4.29 (m, 2H), 4.08-4.07 (d, 2H), 3.83-3.80 (t, 1H), 3.74-3.66 (m, 185H), 3.62-3.60 (t, 1H), 2.78 (s, 1H), 2.25-2.21 (t, 2H), 1.93 (s, 6H), 1.65-1.60 (m, 2H), 1.29 (s, 30H), 0.89-0.86 (t, 3H). MS m/z : [M+H/2]⁺、理論値 1250.28 ; 実測値 1250.60。

10

【0673】

[0515] PEG-脂質 VP197 : 乾燥 DCM (5 mL) 中の化合物 819 (0.5 g、1.46 mmol、1.0 当量) の攪拌溶液に、HBTU (0.83 g、2.19 mmol、1.5 当量) を 10 ~ 15 °C で添加し、続いて不活性雰囲気下で HOBt 水和物 (0.06 g、0.43 mmol、0.3 当量) を添加した。混合物を 10 ~ 15 °C で 30 分間攪拌し、乾燥 DCM (2.5 mL) 中の PEG 化合物 149 (2.92 g、1.46 mmol、1.0 当量) の溶液を加え、続いて DIPEA (0.76 mL、4.38 mmol、3.0 当量) を滴下した。混合物を 10 ~ 15 °C でさらに 10 分間攪拌し、冷却浴を除去し；混合物を RT で 16 時間攪拌した。VP197 を精製し、VP196 と同様に単離して白色固体を得た (0.82 g、24.11%)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ ppm, 7.27 (t, 1H), δ 4.31-4.29 (m, 2H), 4.08-4.04 (m, 2H), 3.82-3.80 (m, 1H), 3.76-3.69 (m, 4H), 3.65-3.64 (d, 172H), 3.61-3.57 (m, 2H), 3.56-3.45 (m, 1H), 3.38 (s, 3H), 2.25-2.21 (t, 3H), 1.65-1.59 (m, 2H), 1.29-1.24 (m, 29H), 0.89-0.86 (t, 4H). MS m/z : [M+H/2]⁺、理論値 1257.29 ; 実測値 1257.60。

20

【0674】

[0516] PEG-脂質 VP198 : DCM (30 mL) 中のオレイン酸 (3.0 g、10.6 mmol、1.0 当量) の攪拌溶液に、不活性雰囲気下で HBTU (6.05 g、15.9 mmol、1.5 当量)、次に DMAP (0.25 g、2.1 mmol、0.2 当量) を添加した。混合物を 10 ~ 15 °C で 30 分間攪拌し、tert-ブチルグリシネート (146A、1.39 g、10.6 mmol、1.0 当量) を添加し、続いて DIPEA (4.71 mL、26.5 mmol、2.5 当量) を滴下した。混合物をさらに 10 ~ 15 °C で 10 分間攪拌し、冷却浴を除去し、混合物を RT で 16 時間攪拌した。完了後、反応混合物を濃縮して粗生成物を得、これを 20 ~ 25 % EtOAc / ヘキサンを用いるシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製して、無色液体として化合物 820 (3.2 g、76.5%)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ ppm, 5.92 (s, 1H), δ 5.38-5.30 (d, 2H), 3.95-3.93 (d, 2H), 2.24-2.20 (t, 2H), 2.03-1.98 (m, 4H), 1.66-1.60 (m, 3H), 1.48 (s, 9H), 1.30-1.27 (m, 22H), 0.90 (m, 3H). DCM (15.5 mL) 中の中間体 820 (3.1 g、7.8 mmol、1.0 当量) の攪拌溶液に、20 ~ 25 °C でギ酸 (25 mL) を添加し、16 時間攪拌した。反応混合物を濃縮してギ酸を除去し、トルエンとともに減圧下で共蒸発させて、所望の化合物 821 (2.6 g、97.7%) を白色固体として得、これをさらに精製することなく次の工程に使用することができた。乾燥 DCM (5 mL) 中の 821 (0.5 g、1.47 mmol、1.0 当量) の攪拌溶液に、HBTU (0.84 g、2.2 mmol、1.5 当量) を 10 ~ 15 °C で添加し、続いて HOBt 水和物 (0.06 g、0.43 mmol、0.3 当量) をアルゴン雰囲気下で添加した。混合物を 10 ~ 15 °C で 30 分間攪拌し、乾燥 DCM (2.5 mL) 中の PEG 化合物 149A (2.94 g、1.47 mmol、1.

30

40

50

0 当量) の溶液を添加し、続いて D I P E A (0 . 7 7 m L 、 4 . 4 1 m m o l 、 3 . 0 当量) を滴下した。混合物を 1 0 ~ 1 5 ° C でさらに 1 0 分間攪拌し、冷却浴を除去し；混合物を R T で 1 6 時間攪拌した。V P 1 9 8 を精製し、V P 1 9 6 と同様の方法で単離して、白色固体 (0 . 3 5 g 、 1 0 . 2 %) として得た。¹H NMR (4 0 0 M H z , C D C l ₃) : δ ppm , 6.07 (t , 1 H) , 6.06 (m , 2 H) , 5.36-5.32 (m , 2 H) , 4.32-4.29 (t , 2 H) , 4.08-4.06 (d , 2 H) , 3.83-3.80 (t , 1 H) , 3.74-3.69 (m , 7 H) , 3.66-3.64 (d , 178 H) , 3.46-3.45 (d , 1 H) , 2.25-2.19 (m , 4 H) , 2.06-1.98 (m , 4 H) , 1.65-1.60 (m , 2 H) , 1.30-1.26 (d , 21 H) , 0.89-0.86 (t , 3 H) . M S m / z : [M + H / 2] ⁺ 、理論値 1 2 5 5 . 2 9 ; 実測値 1 2 5 5 . 7 。

【 0 6 7 5 】

[0 5 1 7] P E G - 脂質 V P 1 9 9 。乾燥 D C M (5 m L) 中の 8 2 1 (0 . 5 g 、 1 . 4 7 m m o l 、 1 . 0 当量) の攪拌溶液に、H B T U (0 . 8 4 g 、 2 . 2 m m o l 、 1 . 5 当量) を 1 0 ~ 1 5 ° C で添加し、続いて H O B t 水和物 (0 . 0 6 g 、 0 . 4 3 m m o l 、 0 . 3 当量) をアルゴン雰囲気下で添加した。混合物を 1 0 ~ 1 5 ° C で 3 0 分間攪拌し、乾燥 D C M (2 . 5 m L) 中の m P E G 化合物 1 4 9 (2 . 9 4 g 、 1 . 4 7 m m o l 、 1 . 0 当量) の溶液を加え、続いて D I P E A (0 . 7 7 m L 、 4 . 4 1 m m o l 、 3 . 0 当量) を滴下した。混合物を 1 0 ~ 1 5 ° C でさらに 1 0 分間攪拌し、冷却浴を除去し；混合物を室温で 1 6 時間攪拌した。V P 1 9 9 を精製し、V P 1 9 8 (0 . 6 8 0 g 、 1 9 . 9 %) と同様の方法で単離した。¹H NMR (4 0 0 M H z , C D C l ₃) : δ ppm , 6.08 (s , 1 H) , δ 5.35-5.32 (m , 2 H) , 4.32-4.30 (m , 2 H) , 4.08-4.07 (d , 2 H) , 3.83-3.80 (m , 2 H) , 3.74-3.71 (m , 4 H) , 3.66-3.64 (d , 182 H) , 3.56-3.48 (m , 3 H) , 3.47-3.46 (m , 1 H) , 3.38 (s , 3 H) , 2.25-2.21 (t , 2 H) , 2.06-1.98 (q , 7 H) , 1.66-1.62 (t , 2 H) , 1.30-1.26 (d , 22 H) , 0.89-0.86 (t , 3 H) . M S m / z : [M + H / 2] ⁺ 、理論値 1 2 6 9 . 2 ; 実測値 1 2 5 5 . 5 。

【 0 6 7 6 】

[0 5 1 8] 実施例 4 2 . 表 2 7 に示される L N P F 2 3 8 および F 2 3 9 を、X - ミキサーを用いて製剤化した。緩衝液交換 (p H 8 で 5 0 m M T r i s) を T F F を用いて行った。L N P F 2 3 8 を V L 4 0 4 を用いて製剤化し、F 2 3 9 をアミノ脂質として V L 4 2 2 を用いて製剤化した。アミノ脂質 V L 4 0 4 から構成された L N P F 2 3 8 は 1 2 9 . 7 n m の平均粒径をもたらし、アミノ脂質 V L 4 2 2 から構成された F 2 3 9 は同じ L N P 組成と R N A ペイロードを用いながら 7 5 . 6 n m の平均粒径をもたらし。製剤 F 2 3 8 および F 2 3 9 をカニクイザル (n = 3) に 1 時間かけて静脈内投与した。実施例 4 1 に記載されるように、ガイド R N A G A 0 6 7 および m R N A M A 0 0 4 (図 2 7) を用いて構成された L N P を投与することにより、カニクイザルの肝臓における A N G P T L 3 遺伝子の編集を評価するために 2 週間の研究を行った。L N P 製剤 F 2 3 8 を 3 m g / k g で投与し、F 2 3 9 を 2 . 6 m g / k g の総 R N A でそれぞれ投与した。N H P の A N G P T L 3 編集肝臓パーセンテージを図 2 7 に示す。

【 0 6 7 7 】

10

20

30

40

50

【表 28】

表 27. F238 および F239 の脂質組成および物理化学的特性

LNP	mRNA	gRNA	アミノ脂質/コレステロール (511)/DSPC (512)/PEG-脂質 (507) mol %	アミノ脂質	N:P	Z 平均 (nm)	PDI	RNA 捕捉%	ANGPTL3 編集%
F238	MA004	GA067	55/38.2/4.7/2.1	VL404	6	129.7	0.009	89.1	図 27 参照
F239	MA004	GA067	55/38.2/4.7/2.1	VL422	8	75.6	0.11	95.0	

10

【0678】

実施形態

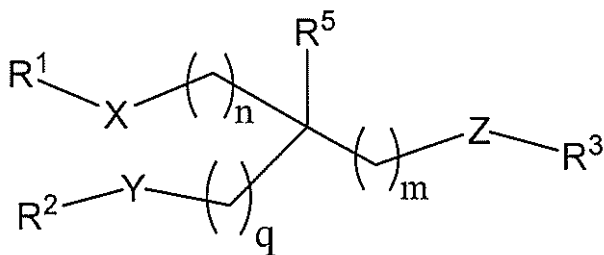
非限定例の実施形態：

1. 式 (I)：

【0679】

【化89】

20



式(I)

30

【0680】

の構造を有し、

式中、

R^1 および R^2 の各々が独立に、 $C_3 \sim C_{30}$ アルキル、 $C_3 \sim C_{30}$ アルケニル、 $C_3 \sim C_{30}$ アルキニル、 $C_3 \sim C_{30}$ ヘテロアルキル、 $C_3 \sim C_{30}$ ヘテロアルケニル、 $C_3 \sim C_{30}$ ヘテロアルキニル、 $C_3 \sim C_{10}$ シクロアルキル、 $-C_0 \sim C_{10}$ アルキレン- $L-R^6$ 、または $-C_2 \sim C_{10}$ アルケニレン- $L-R^6$ であり、アルキル、アルキレン、アルケニル、アルケニレン、アルキニル、ヘテロアルキル、ヘテロアルケニル、ヘテロアルキニル、およびシクロアルキルの各々が独立に置換されているか、または非置換であり、

40

X 、 Y 、および Z の各々が独立に、 $-C(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=O)-$ 、 $-C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)-$ 、 $-OC(=O)O-$ 、 $-NR^4C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=NR^4)NR^4-$ 、 $-C(=S)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=S)-$ 、 $-C(=S)O-$ 、 $-OC(=S)-$ 、 $OC(=S)O-$ 、 $-NR^4C(=S)O-$ 、 $-OC(=S)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=S)NR^4-$ 、 $-C(=O)S-$ 、 $-SC(=O)-$ 、 $-OC(=O)S-$ 、 $-NR^4C(=O)S-$ 、 $-SC(=O)NR^4-$ 、 $-C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)-$ 、 $-SC(=S)O-$ 、 $-NR^4C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)NR^4-$ 、 $-C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)-$ 、 $-SC(=O)S-$ 、 $-SC(=S)S-$ 、 $-NR^4C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)NR^4-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、または結合であり、

50

Lの各々が独立に、 $-C(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=O)-$ 、 $-C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)-$ 、 $-OC(=O)O-$ 、 $-NR^4C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=NR^4)NR^4-$ 、 $-C(=S)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=S)-$ 、 $-C(=S)O-$ 、 $-OC(=S)-$ 、 $OC(=S)O-$ 、 $-NR^4C(=S)O-$ 、 $-OC(=S)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=S)NR^4-$ 、 $-C(=O)S-$ 、 $-SC(=O)-$ 、 $-OC(=O)S-$ 、 $-NR^4C(=O)S-$ 、 $-SC(=O)NR^4-$ 、 $-C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)-$ 、 $-SC(=S)O-$ 、 $-NR^4C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)NR^4-$ 、 $-C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)S-$ 、 $-SC(=O)S-$ 、 $-SC(=S)S-$ 、 $-NR^4C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)NR^4-$ 、 $-O-N=CR^4-$ 、 $-CR^4=N-O-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-C_1\sim C_{10}$ アルキレン $-O-$ 、 $-C_1\sim C_{10}$ アルキレン $-C(=O)O-$ 、 $-C_1\sim C_{10}$ アルキレン $-OC(=O)-$ 、または結合であり、アルキレンが置換されているか、または非置換であり、

10

R^3 が、 $-C_0\sim C_{10}$ アルキレン $-NR^7R^8$ 、 $-C_0\sim C_{10}$ アルキレン $-$ ヘテロシクロアルキル、または $-C_0\sim C_{10}$ アルキレン $-$ ヘテロシクロアリアルであり、アルキレン、ヘテロシクロアルキル、およびヘテロシクロアリアルが独立に置換されているか、または非置換であり、

R^4 の各々が独立に、水素または置換もしくは非置換の $C_1\sim C_6$ アルキルであり、

R^5 が、水素または置換もしくは非置換の $C_1\sim C_6$ アルキルであり、

R^6 の各々が独立に、 $C_3\sim C_{30}$ アルキル、 $C_3\sim C_{30}$ アルケニル、 $C_3\sim C_{30}$ アルキニル、 $C_y-C_3\sim C_{30}$ アルキル、 $C_y-C_3\sim C_{30}$ アルケニル、または $C_y-C_3\sim C_{30}$ アルキニルであり、アルキル、アルケニル、およびアルキニルがそれぞれ独立に、置換されているか、または非置換であり、

20

C_y の各々が、置換もしくは非置換のシクロアルキル、置換もしくは非置換のヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換のアリアル、または置換もしくは非置換のヘテロアリアルであり、

R^7 および R^8 の各々が独立に、水素または置換もしくは非置換の $C_1\sim C_6$ アルキルであるか、または R^7 および R^8 が、それらが結合している窒素と一緒にあって、置換もしくは非置換の $C_2\sim C_6$ ヘテロシクリルを形成し、

n 、 m 、および q の各々が独立に、0、1、2、3、4、または5である、
アミノ脂質またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物。

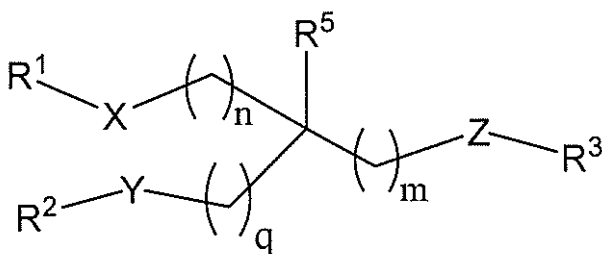
30

【0681】

2. 式(I*)：

【0682】

【化90】



40

式(I*)

【0683】

の構造を有し、

式中、

R^1 が、水素、 $C_3\sim C_{30}$ アルキル、 $C_3\sim C_{30}$ アルケニル、 $C_3\sim C_{30}$ アルキニ

50

ル、 $C_3 \sim C_{30}$ ヘテロアルキル、 $C_3 \sim C_{30}$ ヘテロアルケニル、 $C_3 \sim C_{30}$ ヘテロアルキニル、 $C_3 \sim C_{10}$ シクロアルキル、 $-C_0 \sim C_{10}$ アルキレン- $L-R^6$ 、または $-C_2 \sim C_{10}$ アルケニレン- $L-R^6$ であり、アルキル、アルキレン、アルケニル、アルケニレン、アルキニル、ヘテロアルキル、ヘテロアルケニル、ヘテロアルキニル、およびシクロアルキルの各々が独立に置換されているか、または非置換であり、

R^2 が、水素、 $C_3 \sim C_{30}$ アルキル、 $C_3 \sim C_{30}$ アルケニル、 $C_3 \sim C_{30}$ アルキニル、 $C_3 \sim C_{30}$ ヘテロアルキル、 $C_3 \sim C_{30}$ ヘテロアルケニル、 $C_3 \sim C_{30}$ ヘテロアルキニル、 $C_3 \sim C_{10}$ シクロアルキル、 $-C_0 \sim C_{10}$ アルキレン- $L-R^6$ 、または $-C_2 \sim C_{10}$ アルケニレン- $L-R^6$ であり、アルキル、アルキレン、アルケニル、アルケニレン、アルキニル、ヘテロアルキル、ヘテロアルケニル、ヘテロアルキニル、およびシクロアルキルの各々が独立に置換されているか、または非置換であり、

X、Y、およびZの各々が独立に、 $-C(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=O)-$ 、 $-C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)-$ 、 $-OC(=O)O-$ 、 $-NR^4C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=NR^4)NR^4-$ 、 $-C(=S)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=S)-$ 、 $-C(=S)O-$ 、 $-OC(=S)-$ 、 $OC(=S)O-$ 、 $-NR^4C(=S)O-$ 、 $-OC(=S)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=S)NR^4-$ 、 $-C(=O)S-$ 、 $-SC(=O)-$ 、 $-OC(=O)S-$ 、 $-NR^4C(=O)S-$ 、 $-SC(=O)NR^4-$ 、 $-C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)-$ 、 $-SC(=O)S-$ 、 $-SC(=S)S-$ 、 $-NR^4C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)NR^4-$ 、 $-R^{11}C(=O)N(R^4)R^9-$ 、 $-NR^7C(=O)R^9-$ 、 $-C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)-$ 、 $-R^{11}C(=O)OR^9-$ 、 $-R^{11}OC(=O)R^9-$ 、 $-R^{11}OC(=O)OR^9-$ 、 $-R^{11}N(R^4)C(=O)OR^9-$ 、 $-R^{11}OC(=O)N(R^4)R^9-$ 、 $-R^{11}(NR^4)C(=O)N(R^4)R^9-$ 、 $-R^{11}N(R^4)C(=NR^4)R^9-$ 、 $-R^{11}C(=S)N(R^4)R^9-$ 、 $-R^{11}N(R^4)C(=S)R^9-$ 、 $-R^{11}C(=S)OR^9-$ 、 $-R^{11}OC(=S)R^9-$ 、 $-R^{11}OC(=S)OR^9-$ 、 $-R^{11}N(R^4)C(=S)OR^9-$ 、 $-R^{11}OC(=S)N(R^4)R^9-$ 、 $-R^{11}N(R^4)C(=S)N(R^4)R^9-$ 、 $-R^{11}C(=O)SR^9-$ 、 $-R^{11}SC(=O)R^9-$ 、 $-R^{11}OC(=O)SR^9-$ 、 $-R^{11}N(R^4)C(=O)SR^9-$ 、 $-R^{11}SC(=O)N(R^4)R^9-$ 、 $-R^{11}C(=S)SR^9-$ 、 $-R^{11}SC(=S)R^9-$ 、 $-R^{11}SC(=S)OR^9-$ 、 $-R^{11}N(R^4)C(=S)SR^9-$ 、 $-R^{11}SC(=S)N(R^4)R^9-$ 、 $-R^{11}C(=S)SR^9-$ 、 $-R^{11}SC(=S)R^9-$ 、 $-R^{11}SC(=O)SR^9-$ 、 $-R^{11}SC(=S)SR^9-$ 、 $-R^{11}N(R^4)C(=S)SR^9-$ 、 $-R^{11}SC(=S)N(R^4)R^9-$ 、 $-R^{11}OR^9-$ 、 $-R^{11}SR^9-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、または結合であり、

Lの各々が独立に、 $-C(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=O)-$ 、 $-C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)-$ 、 $-C(=O)-$ 、 $-OC(=O)O-$ 、 $-NR^4C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=NR^4)NR^4-$ 、 $-C(=S)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=S)-$ 、 $-C(=S)O-$ 、 $-OC(=S)-$ 、 $OC(=S)O-$ 、 $-NR^4C(=S)O-$ 、 $-OC(=S)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=S)NR^4-$ 、 $-C(=O)S-$ 、 $-SC(=O)-$ 、 $-OC(=O)S-$ 、 $-NR^4C(=O)S-$ 、 $-SC(=O)NR^4-$ 、 $-C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)-$ 、 $-SC(=O)S-$ 、 $-SC(=S)S-$ 、 $-NR^4C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)NR^4-$ 、 $-O-N=CR^4-$ 、 $-CR^4=N-O-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-R^{11}C(=O)N(R^4)R^9-$ 、 $-R^{11}N(R^4)C(=O)R^9-$ 、 $-R^{11}C(=O)OR^9-$ 、 $-R^{11}OC(=O)R^9-$ 、 $-R^{11}OC(=O)OR^9-$ 、 $-R^{11}N(R^4)C(=O)OR^9-$ 、 $-R^{11}OC(=O)N(R^4)R^9-$ 、 $-R^{11}N(R^4)C(=O)N(R^4)R^9-$ 、 $-R^{11}N(R^4)C(=NR^4)N(R^4)R^9-$ 、

R^9- 、 $-R^{11}C(=S)N(R^4)R^9-$ 、 $-R^{11}N(R^4)C(=S)R^9-$ 、 $-R^{11}C(=S)OR^9-$ 、 $-R^{11}OC(=S)R^9-$ 、 $-R^{11}OC(=S)OR^9-$ 、 $-R^{11}N(R^4)C(=S)OR^9-$ 、 $-R^{11}OC(=S)N(R^4)R^9-$ 、 $-R^{11}N(R^4)C(=S)N(R^4)R^9-$ 、 $-R^{11}C(=O)SR^9-$ 、 $-R^{11}SC(=O)R^9-$ 、 $-R^{11}OC(=O)SR^9-$ 、 $-R^{11}N(R^4)C(=O)SR^9-$ 、 $-R^{11}SC(=O)N(R^4)R^9-$ 、 $-R^{11}C(=S)SR^9-$ 、 $-R^{11}SC(=S)R^9-$ 、 $-R^{11}SC(=S)OR^9-$ 、 $-R^{11}N(R^4)C(=S)SR^9-$ 、 $-R^{11}SC(=S)N(R^4)R^9-$ 、 $-R^{11}C(=S)SR^9-$ 、 $-R^{11}SC(=S)R^9-$ 、 $-R^{11}SC(=O)SR^9-$ 、 $-R^{11}SC(=S)SR^9-$ 、 $-R^{11}N(R^4)C(=S)SR^9-$ 、 $-R^{11}SC(=S)N(R^4)R^9-$ 、 $-R^{11}O-N-CR^9-$ 、 $-R^{11}C(R^{10})=N-OR^9-$ 、 $-R^{11}OR^9-$ 、 $-R^{11}SR^9-$ 、 $-C_1\sim C_{10}$ アルキレン- $C(=O)O-$ 、 $-C_1\sim C_{10}$ アルキレン- $OC(=O)-$ 、 $-C_1\sim C_{10}$ アルキレン- $O-$ 、 $-C_1\sim C_{10}$ アルキレン- $C(=O)O-$ 、 $-C_1\sim C_{10}$ アルキレン- $OC(=O)-$ 、または結合であり、アルキレンが置換されているか、または非置換であり、

10

R^3 が、 $-C_0\sim C_{10}$ アルキレン- NR^7R^8 、 $-C_0\sim C_{10}$ アルキレン-ヘテロシクロアルキル、または $-C_0\sim C_{10}$ アルキレン-ヘテロシクロアリールであり、アルキレン、ヘテロシクロアルキル、およびヘテロシクロアリールが独立に、置換されているか、または非置換であり、

R^4 の各々が独立に、水素、置換もしくは非置換の $C_1\sim C_{16}$ アルキルまたは置換もしくは非置換の $C_1\sim C_{16}$ ヘテロアルキルであり、

20

R^5 が、水素または置換もしくは非置換の $-C_0\sim C_{10}$ アルキレン- $L-R^4$ であり、

R^6 の各々が独立に、水素、 $C_3\sim C_{30}$ アルキル、 $C_3\sim C_{30}$ アルケニル、 $C_3\sim C_{30}$ アルキニル、 $C_y-C_3\sim C_{30}$ アルキル、 $C_y-C_3\sim C_{30}$ アルケニル、または $C_y-C_3\sim C_{30}$ アルキニルであり、アルキル、アルケニル、およびアルキニルがそれぞれ独立に、置換されているか、または非置換であり、

C_y の各々が、置換もしくは非置換のシクロアルキル、置換もしくは非置換のヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換のアリール、または置換もしくは非置換のヘテロアリールであり、

R^7 および R^8 の各々が独立に、水素または置換もしくは非置換の $C_1\sim C_{16}$ アルキル、置換もしくは非置換の $C_1\sim C_{16}$ ヘテロアルキルであるか、または R^7 および R^8 が、それらが結合している窒素と一緒にあって、置換もしくは非置換の $C_2\sim C_6$ ヘテロシクリルを形成し、

30

R^9 の各々が独立に、水素または置換もしくは非置換の $C_1\sim C_{16}$ アルキレンまたは置換もしくは非置換の $C_1\sim C_{16}$ ヘテロアルキレンであり、

R^{10} の各々が独立に、水素または置換もしくは非置換の $C_1\sim C_{16}$ アルキレンまたは置換もしくは非置換の $C_1\sim C_{16}$ ヘテロアルキレンであり、 R^{11} の各々が独立に、置換もしくは非置換の $C_1\sim C_{16}$ アルキレンまたは置換もしくは非置換の $C_1\sim C_{16}$ ヘテロアルキレンであり、

n 、 m 、および q の各々が独立に、0、1、2、3、4、または5である、
 アミノ脂質またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物。

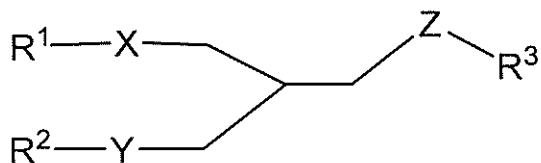
40

【0684】

3. 前記アミノ脂質が、式(Ia)：

【0685】

【化 9 1】



式(la)

10

【0686】

またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物の構造を有し、
式中、

R^1 および R^2 の各々が独立に、 $C_3 \sim C_{30}$ アルキル、 $C_3 \sim C_{30}$ アルケニル、 $C_3 \sim C_{30}$ アルキニル、 $C_3 \sim C_{30}$ ヘテロアルキル、 $C_3 \sim C_{30}$ ヘテロアルケニル、 $C_3 \sim C_{30}$ ヘテロアルキニル、 $C_3 \sim C_{10}$ シクロアルキル、 $-C_0 \sim C_{10}$ アルキレン- L - R^6 、または $-C_2 \sim C_{10}$ アルケニレン- L - R^6 であり、アルキル、アルキレン、アルケニル、アルケニレン、アルキニル、ヘテロアルキル、ヘテロアルケニル、ヘテロアルキニル、およびシクロアルキルの各々が独立に置換されているか、または非置換であり、

20

X 、 Y 、および Z の各々が独立に、 $C(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=O)-$ 、 $-C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)-$ 、 $-OC(=O)O-$ 、 $-NR^4C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=NR^4)NR^4-$ 、 $-C(=S)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=S)-$ 、 $-C(=S)O-$ 、 $-OC(=S)-$ 、 $OC(=S)O-$ 、 $-NR^4C(=S)O-$ 、 $-OC(=S)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=S)NR^4-$ 、 $-C(=O)S-$ 、 $-SC(=O)-$ 、 $-OC(=O)S-$ 、 $-NR^4C(=O)S-$ 、 $-SC(=O)NR^4-$ 、 $-C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)-$ 、 $-SC(=S)O-$ 、 $-NR^4C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)NR^4-$ 、 $-C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)-$ 、 $-SC(=O)S-$ 、 $-SC(=S)S-$ 、 $-NR^4C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)NR^4-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-C_1 \sim C_{10}$ アルキレン- $O-$ 、または結合であり、アルキレンが置換されているか、または非置換であり、

30

L の各々が独立に、 $-C(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=O)-$ 、 $-C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)-$ 、 $-OC(=O)O-$ 、 $-NR^4C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=NR^4)NR^4-$ 、 $-C(=S)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=S)-$ 、 $-C(=S)O-$ 、 $-OC(=S)-$ 、 $OC(=S)O-$ 、 $-NR^4C(=S)O-$ 、 $-OC(=S)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=S)NR^4-$ 、 $-C(=O)S-$ 、 $-SC(=O)-$ 、 $-OC(=O)S-$ 、 $-NR^4C(=O)S-$ 、 $-SC(=O)NR^4-$ 、 $-C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)-$ 、 $-SC(=S)O-$ 、 $-NR^4C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)NR^4-$ 、 $-C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)-$ 、 $-SC(=O)S-$ 、 $-SC(=S)S-$ 、 $-NR^4C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)NR^4-$ 、 $-O-N=CR^4-$ 、 $-CR^4=N-O-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-C_1 \sim C_{10}$ アルキレン- $O-$ 、 $-C_1 \sim C_{10}$ アルキレン- $C(=O)O-$ 、 $-C_1 \sim C_{10}$ アルキレン- $OC(=O)-$ 、または結合であり、アルキレンが置換されているか、または非置換であり、

40

R^3 が、 $-C_0 \sim C_{10}$ アルキレン- NR^7R^8 または $-C_0 \sim C_{10}$ アルキレン-ヘテロシクロアルキルであり、アルキレンおよびヘテロシクロアルキルがそれぞれ独立に、置換されているか、または非置換であり、

R^4 の各々が独立に、水素または置換もしくは非置換の $C_1 \sim C_6$ アルキルであり、

R^6 の各々が独立に、 $C_3 \sim C_{30}$ アルキル、 $C_3 \sim C_{30}$ アルケニル、 $C_3 \sim C_{30}$ アルキニル、 $C_y \sim C_{30}$ アルキル、 $C_y \sim C_{30}$ アルケニル、または $C_y \sim C_3 \sim$

50

30 アルキニルであり、アルキル、アルケニル、およびアルキニルがそれぞれ独立に、置換されているか、または非置換であり、

C_yの各々が、置換もしくは非置換のシクロアルキル、置換もしくは非置換のヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換のアリール、置換もしくは非置換のヘテロアリールであり、

R⁷およびR⁸の各々が独立に、水素または置換もしくは非置換のC₁～C₆アルキルであるか、またはR⁷およびR⁸が、それらが結合している窒素と一緒にあって、置換もしくは非置換のC₂～C₆ヘテロシクリルを形成する、

実施形態1もしくは2に記載のアミノ脂質またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物。

10

【0687】

4. XおよびYがそれぞれ独立に、-C(=O)O-および-OC(=O)-から選択される、実施形態1～3のいずれか1つに記載のアミノ脂質またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物。

【0688】

5. R¹およびR²がそれぞれ独立に、置換もしくは非置換のC₃～C₃₀アルキルまたは置換もしくは非置換のC₃～C₃₀アルケニルから選択される、実施形態1～3のいずれか1つに記載のアミノ脂質またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物。

【0689】

6. R¹およびR²がそれぞれ独立に、-C₀～C₁₀アルキレン-L-R⁶から選択される、実施形態1～3のいずれか1つに記載のアミノ脂質またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物。

20

【0690】

7. Lが独立に、-C(=O)O-または-OC(=O)-である、実施形態6に記載のアミノ脂質またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物。

8. R⁶が、直鎖状または分岐状のC₆～C₂₀アルキルである、実施形態6に記載のアミノ脂質またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物。

【0691】

9. R⁶が、C_y-C₃～C₃₀アルキル、C_y-C₃～C₃₀アルケニル、またはC_y-C₃～C₃₀アルキニルである、実施形態6に記載のアミノ脂質またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物。

30

【0692】

10. R¹および/またはR²が非対称ヘテロ原子を含む、実施形態1～9のいずれか1つに記載のアミノ脂質またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物。

11. Zが、-C(=O)NR⁴-, -NR⁴C(=O)O-, -OC(=O)O-, -C(=O)O-, -OC(=O)-、または-O-であり、R⁴が、水素またはCH₃である、実施形態1～10のいずれか1つに記載のアミノ脂質またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物。

【0693】

12. Zが、-OC(=O)O-, -C(=O)O-または-OC(=O)-である、実施形態1～10のいずれか1つに記載のアミノ脂質またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物。

40

【0694】

13. R³が-C₁～C₆アルキレン-NR⁷R⁸である、実施形態1～12のいずれか1つに記載のアミノ脂質またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物。

14. R⁷およびR⁸それぞれが独立に、置換または非置換のC₁～C₆アルキルである、実施形態13に記載のアミノ脂質またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物。

【0695】

15. R⁷およびR⁸それぞれが-CH₂CH₃である、実施形態13に記載のアミノ

50

脂質またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物。

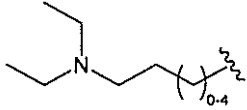
16. R^7 および R^8 が、それらが結合している窒素と一緒に、置換または非置換の3～7員のヘテロシクロアルキルを形成する、実施形態13に記載のアミノ脂質またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物。

【0696】

17. R^3 が、

【0697】

【化92】



10

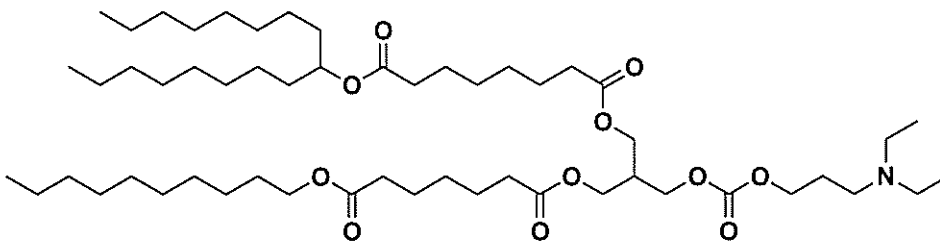
【0698】

である、実施形態1～12のいずれか1つに記載のアミノ脂質またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物。

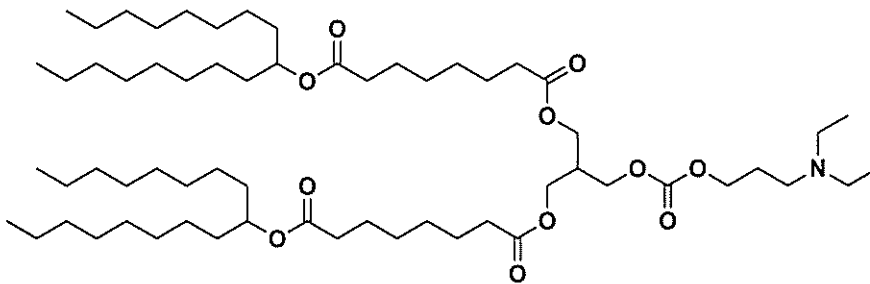
18. アミノ脂質が、

【0699】

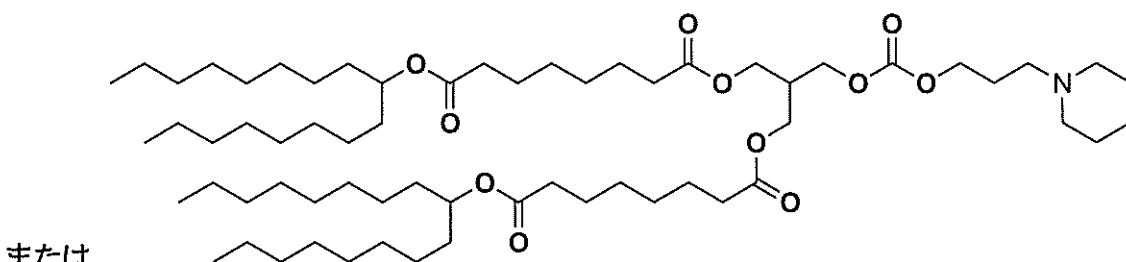
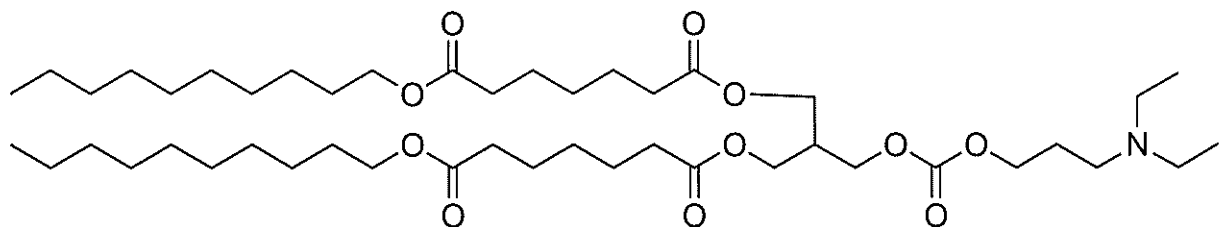
【化93】



または



, または



または

20

30

40

50

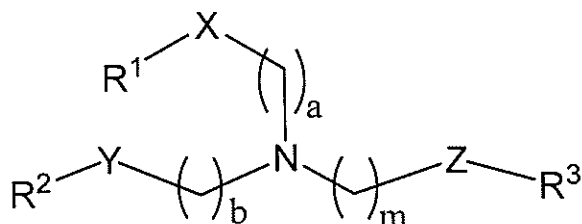
【 0 7 0 0 】

である、実施形態 1 に記載のアミノ脂質またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物。

19. 式 (I I)

【 0 7 0 1 】

【 化 9 4 】



式(II)

【 0 7 0 2 】

の構造を有し、

式中、

R^1 および R^2 の各々が独立に、 $C_3 \sim C_{30}$ アルキル、 $C_3 \sim C_{30}$ アルケニル、 $C_3 \sim C_{30}$ アルキニル、 $C_3 \sim C_{30}$ ヘテロアルキル、 $C_3 \sim C_{30}$ ヘテロアルケニル、 $C_3 \sim C_{30}$ ヘテロアルキニル、 $C_3 \sim C_{10}$ シクロアルキル、 $-C_0 \sim C_{10}$ アルキレン- $L-R^6$ 、または $-C_1 \sim C_{10}$ アルケニレン- $L-R^6$ であり、アルキル、アルキレン、アルケニル、アルケニレン、アルキニル、ヘテロアルキル、ヘテロアルケニル、ヘテロアルキニル、およびシクロアルキルの各々が独立に置換されているか、または非置換であり、

X 、 Y 、および Z の各々が独立に、 $-C(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=O)-$ 、 $-C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)-$ 、 $-OC(=O)O-$ 、 $-NR^4C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=NR^4)NR^4-$ 、 $-C(=S)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=S)-$ 、 $-C(=S)O-$ 、 $-OC(=S)-$ 、 $OC(=S)O-$ 、 $-NR^4C(=S)O-$ 、 $-OC(=S)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=S)NR^4-$ 、 $-C(=O)S-$ 、 $-SC(=O)-$ 、 $-OC(=O)S-$ 、 $-NR^4C(=O)S-$ 、 $-SC(=O)NR^4-$ 、 $-C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)-$ 、 $-SC(=S)O-$ 、 $-NR^4C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)NR^4-$ 、 $-C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)-$ 、 $-SC(=O)S-$ 、 $-SC(=S)S-$ 、 $-NR^4C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)NR^4-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、または結合であり、

L の各々が独立に、 $-C(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=O)-$ 、 $-C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)-$ 、 $-OC(=O)O-$ 、 $-NR^4C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=NR^4)NR^4-$ 、 $-C(=S)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=S)-$ 、 $-C(=S)O-$ 、 $-OC(=S)-$ 、 $OC(=S)O-$ 、 $-NR^4C(=S)O-$ 、 $-OC(=S)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=S)NR^4-$ 、 $-C(=O)S-$ 、 $-SC(=O)-$ 、 $-OC(=O)S-$ 、 $-NR^4C(=O)S-$ 、 $-SC(=O)NR^4-$ 、 $-C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)-$ 、 $-SC(=S)O-$ 、 $-NR^4C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)NR^4-$ 、 $-C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)-$ 、 $-SC(=O)S-$ 、 $-SC(=S)S-$ 、 $-NR^4C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)NR^4-$ 、 $-O-N=CR^4-$ 、 $-CR^4=N-O-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-C_1 \sim C_{10}$ アルキレン- $O-$ 、 $-C_1 \sim C_{10}$ アルキレン- $C(=O)O-$ 、 $-C_1 \sim C_{10}$ アルキレン- $OC(=O)-$ 、または結合であり、アルキレンが置換されているか、または非置換であり、

R^3 が、 $-C_0 \sim C_{10}$ アルキレン- NR^7R^8 、 $-C_0 \sim C_{10}$ アルキレン-ヘテロシクロアルキル、または $-C_0 \sim C_{10}$ アルキレン-ヘテロシクロアリールであり、アルキレン、ヘテロシクロアルキル、およびヘテロシクロアリールが独立に、置換されているか、または非置換であり、

R^4 の各々が独立に、水素または置換もしくは非置換の $C_1 \sim C_6$ アルキルであり、

R^6 の各々が独立に、 $C_3 \sim C_{30}$ アルキル、 $C_3 \sim C_{30}$ アルケニル、 $C_3 \sim C_{30}$ アルキニル、 $C_y - C_3 \sim C_{30}$ アルキル、 $C_y - C_3 \sim C_{30}$ アルケニル、または $C_y - C_3 \sim C_{30}$ アルキニルであり、アルキル、アルケニル、およびアルキニルがそれぞれ独立に、置換されているか、または非置換であり、

C_y の各々が、置換もしくは非置換のシクロアルキル、置換もしくは非置換のヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換のアリール、または置換もしくは非置換のヘテロアリールであり、

R^7 および R^8 の各々が独立に、水素または置換もしくは非置換の $C_1 \sim C_6$ アルキルであるか、または R^7 および R^8 が、それらが結合している窒素と一緒にあって、置換もしくは非置換の $C_2 \sim C_6$ ヘテロシクリルを形成し、

a および b の各々が独立に、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または 10 であり、

m が、0、1、2、3、4、または 5 である、

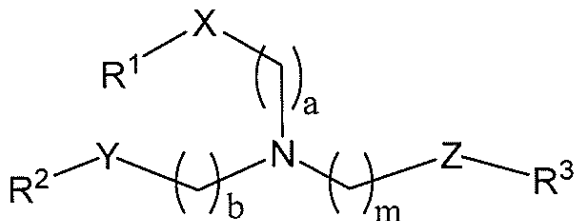
アミノ脂質またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物。

【0703】

20. 式 (II*) :

【0704】

【化95】



式(II*)

【0705】

の構造を有し、

式中、

R^1 および R^2 の各々が独立に、水素、 $C_3 \sim C_{30}$ アルキル、 $C_3 \sim C_{30}$ アルケニル、 $C_3 \sim C_{30}$ アルキニル、 $C_3 \sim C_{30}$ ヘテロアルキル、 $C_3 \sim C_{30}$ ヘテロアルケニル、 $C_3 \sim C_{30}$ ヘテロアルキニル、 $C_3 \sim C_{10}$ シクロアルキル、 $-C_0 \sim C_{10}$ アルキレン- $L-R^6$ 、または $-C_1 \sim C_{10}$ アルケニレン- $L-R^6$ であり、アルキル、アルキレン、アルケニル、アルケニレン、アルキニル、ヘテロアルキル、ヘテロアルケニル、ヘテロアルキニル、およびシクロアルキルの各々が独立に置換されているか、または非置換であり、

X、Y、および Z の各々が独立に、 $-C(=O)NR^4-$ 、 $-C(=O)-$ 、 $-NR^4C(=O)-$ 、 $-C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)-$ 、 $-OC(=O)O-$ 、 $-NR^4C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=NR^4)NR^4-$ 、 $-C(=S)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=S)-$ 、 $-C(=S)O-$ 、 $-OC(=S)-$ 、 $OC(=S)O-$ 、 $-NR^4C(=S)O-$ 、 $-OC(=S)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=S)NR^4-$ 、 $-C(=O)S-$ 、 $-SC(=O)-$ 、 $-OC(=O)S-$ 、 $-NR^4C(=O)S-$ 、 $-SC(=O)NR^4-$ 、 $-C(=S)S-$ 、 $-SC$

(=S) -, -SC(=S)O-, -NR⁴C(=S)S-, -SC(=S)NR⁴-,
-C(=S)S-, -SC(=S)-, -SC(=O)S-, -SC(=S)S-, -NR⁴C(=S)S-, -SC(=S)NR⁴-, -O-, -S-, または結合であり、

Lの各々が独立に、-C(=O)NR⁴-, -NR⁴C(=O)-, -C(=O)O-,
-OC(=O)-, -OC(=O)O-, -NR⁴C(=O)O-, -OC(=O)NR⁴-,
-NR⁴C(=O)NR⁴-, -NR⁴C(=NR⁴)NR⁴-, -C(=S)NR⁴-,
-NR⁴C(=S)-, -C(=S)O-, -OC(=S)-, OC(=S)O-,
-NR⁴C(=S)O-, -OC(=S)NR⁴-, -NR⁴C(=S)NR⁴-,
-C(=O)S-, -SC(=O)-, -OC(=O)S-, -NR⁴C(=O)S-,
-SC(=O)NR⁴-, -C(=S)S-, -SC(=S)-, -SC(=S)O-,
-NR⁴C(=S)S-, -SC(=S)NR⁴-, -C(=S)S-, -SC(=S)-,
-SC(=O)S-, -SC(=S)S-, -NR⁴C(=S)S-, -SC(=S)NR⁴-,
-O-N=CR⁴-, -CR⁴=N-O-, -O-, -S-, -C₁~C₁₀アルキレン-O-,
-C₁~C₁₀アルキレン-C(=O)O-, -C₁~C₁₀アルキレン-OC(=O)-,
または結合であり、アルキレンが置換されているか、または非置換であり、

10

R³が、水素、-C₁~C₆アルキル、-C₀~C₁₀アルキレン-NR⁷R⁸、-C₀~C₁₀アルキレン-ヘテロシクロアルキル、または-C₀~C₁₀アルキレン-ヘテロシクロアリールであり、アルキル、アルキレン、ヘテロシクロアルキル、およびヘテロシクロアリールが独立に、置換されているか、または非置換であり、

20

R⁴の各々が独立に、水素または置換もしくは非置換のC₁~C₆アルキルであり、

R⁶の各々が独立に、C₃~C₃₀アルキル、C₃~C₃₀アルケニル、C₃~C₃₀アルキニル、Cy-C₃~C₃₀アルキル、Cy-C₃~C₃₀アルケニル、またはCy-C₃~C₃₀アルキニルであり、アルキル、アルケニル、およびアルキニルがそれぞれ独立に、置換されているか、または非置換であり、

Cyの各々が、置換もしくは非置換のシクロアルキル、置換もしくは非置換のヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換のアリール、または置換もしくは非置換のヘテロアリールであり、

R⁷およびR⁸の各々が独立に、水素または置換もしくは非置換のC₁~C₆アルキルであるか、またはR⁷およびR⁸が、それらが結合している窒素と一緒にあって、置換もしくは非置換のC₂~C₆ヘテロシクリルを形成し、

30

aおよびbの各々が独立に、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10であり、

mが、0、1、2、3、4、または5である、

アミノ脂質またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物。

【0706】

21. aおよびbの各々が独立に、3、4、5、6、7、8、9、または10である、実施形態19または20のアミノ脂質またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物。

【0707】

22. mが、0、1、2、3、4、または5である、実施形態19~21いずれか1つに記載のアミノ脂質またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物。

40

23. XおよびYがそれぞれ独立に、-C(=O)O-および-OC(=O)-から選択される、実施形態19~22のいずれか1つに記載のアミノ脂質またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物。

【0708】

24. R¹およびR²がそれぞれ独立に、置換もしくは非置換のC₃~C₃₀アルキルまたは置換もしくは非置換のC₃~C₃₀アルケニルから選択される、実施形態19~23のいずれか1つに記載のアミノ脂質またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物。

50

【0709】

25. R^1 および R^2 がそれぞれ独立に、 $-C_0 \sim C_{10}$ アルキレン- $L-R^6$ から選択される、実施形態 19～23 のいずれか 1 つに記載のアミノ脂質またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物。

【0710】

26. L が独立に、 $-C(=O)O-$ または $-OC(=O)-$ である、実施形態 25 に記載のアミノ脂質またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物。

27. R^6 が、直鎖状または分岐状の $C_6 \sim C_{20}$ アルキルである、実施形態 25 に記載のアミノ脂質またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物。

【0711】

28. R^6 が、 $Cy-C_3 \sim 30$ アルキル、 $Cy-C_3 \sim 30$ アルケニル、または $Cy-C_3 \sim 30$ アルキニルである、実施形態 25 に記載のアミノ脂質またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物。

【0712】

29. Z が、 $-C(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)O-$ 、 $-C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)-$ 、または $-O-$ であり、 R^4 が、水素または CH_3 である、実施形態 19～28 のいずれか 1 つに記載のアミノ脂質またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物。

【0713】

30. Z が、 $-OC(=O)O-$ 、 $-C(=O)O-$ または $-OC(=O)-$ である、実施形態 19～29 のいずれか 1 つに記載のアミノ脂質またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物。

【0714】

31. R^3 が $-C_1 \sim C_6$ アルキレン- NR^7R^8 である、実施形態 19～30 のいずれか 1 つに記載のアミノ脂質またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物。

32. R^7 および R^8 がそれぞれが独立に、置換または非置換の $C_1 \sim C_6$ アルキルである、実施形態 31 に記載のアミノ脂質またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物。

【0715】

33. R^7 および R^8 がそれぞれが $-CH_2CH_3$ である、実施形態 31 に記載のアミノ脂質またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物。

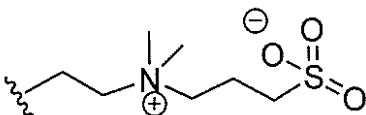
34. R^7 および R^8 が、それらが結合している窒素と一緒に、置換または非置換の 3～7 員のヘテロシクロアルキルを形成する、実施形態 31 に記載のアミノ脂質またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物。

【0716】

35. R^3 が、

【0717】

【化96】



【0718】

である、実施形態 19～30 のいずれか 1 つに記載のアミノ脂質またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物。

36. 実施形態 1～35 のいずれか 1 つに記載のアミノ脂質またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物を含むナノ粒子組成物。

【0719】

37. 表 1 A から選択される構造を有するアミノ脂質またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物。

10

20

30

40

50

38. 表1Aから選択される構造を有するアミノ脂質またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物を含むナノ粒子組成物。

【0720】

39. 前記アミノ脂質またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物が、前記ナノ粒子組成物中に存在する総脂質含有量の20mol%～80mol%を構成する、実施形態1または37に記載のナノ粒子組成物。

【0721】

40. 前記アミノ脂質またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物が、前記ナノ粒子組成物中に存在する総脂質含有量の40mol%～60mol%を構成する、実施形態1または37に記載のナノ粒子組成物。

【0722】

41. 前記アミノ脂質またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物が、前記ナノ粒子組成物中に存在する総脂質含有量の50mol%～60mol%を構成する、実施形態1または37に記載のナノ粒子組成物。

【0723】

42. 前記アミノ脂質またはその塩もしくは溶媒和物が、1つまたは複数のイオン化可能な窒素原子を含む、実施形態1または37～40のいずれか1つに記載のナノ粒子組成物。

【0724】

43. 1つまたは複数のアミノ脂質に由来する1つまたは複数のイオン化可能な窒素原子を含む、実施形態1または37～40のいずれか1つに記載のナノ粒子組成物。

44. 1つのアミノ脂質またはその塩もしくは溶媒和物のみを含む、実施形態1または37～42のいずれか1つに記載のナノ粒子組成物。

【0725】

45. 1つまたは複数の核酸分子実体を含む、実施形態1または37～43のいずれか1つに記載のナノ粒子組成物。

46. 前記核酸分子実体に存在するリン酸基に対する前記イオン化可能な窒素原子のモル比(Pに対するNの比またはN/P比)が、約2～約20である、実施形態44に記載のナノ粒子組成物。

【0726】

47. 前記N/P比が、約2～約15、約2～約10、約2～約8、約2～約6、約3～約15、約3～約10、約3～約8、約3～約6、約4～約15、約4～約10、約4～約8、または約4～約6である、実施形態45に記載のナノ粒子組成物。

【0727】

48. 前記N/P比が約3.5～約10ある、実施形態45に記載のナノ粒子組成物。

49. 中性脂質を含む、実施形態1または36～47のいずれか1つに記載のナノ粒子組成物。

【0728】

50. 前記中性脂質が、前記ナノ粒子組成物中に存在する総脂質含有量の約1mol%～約20mol%を構成する、実施形態48に記載のナノ粒子組成物。

51. 前記中性脂質が、前記ナノ粒子組成物中に存在する総脂質含有量の約2mol%～約25mol%を構成する、実施形態48または49に記載のナノ粒子組成物。

【0729】

52. 前記中性脂質が、前記ナノ粒子組成物中に存在する総脂質含有量の約5mol%～約10mol%を構成する、実施形態48または49に記載のナノ粒子組成物。

53. 前記中性脂質が、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DSPC)、1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DPPC)、1,2-ジミリスチル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DMPC)、2-オレオイル-1-パルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(POPC)、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン(DOPE)、およびスフィ

10

20

30

40

50

ンゴミエリンから選択される、実施形態 48～51 のいずれか 1 つに記載のナノ粒子組成物。

【0730】

54．前記中性脂質が DSPC である、実施形態 48～51 のいずれか 1 つに記載のナノ粒子組成物。

55．構造脂質を含む、実施形態 1 または 37～53 のいずれか 1 つに記載のナノ粒子組成物。

【0731】

56．前記構造脂質が、ステロールかその誘導体である、実施形態 54 に記載のナノ粒子組成物。

57．前記ステロールまたは前記その誘導体が、コレステロールまたはコレステロール誘導体である、実施形態 54 または 55 に記載のナノ粒子組成物。

【0732】

58．前記構造脂質が、前記ナノ粒子組成物中に存在する総脂質含有量の約 15 mol %～約 65 mol % を構成する、実施形態 54～56 のいずれか 1 つに記載のナノ粒子組成物。

【0733】

59．前記構造脂質が、前記ナノ粒子組成物中に存在する総脂質含有量の約 30 mol %～約 60 mol % を構成する、実施形態 54～56 に記載のいずれか 1 つのナノ粒子組成物。

【0734】

60．前記構造脂質が、前記ナノ粒子組成物中に存在する総脂質含有量の約 30 mol %～約 40 mol % を構成する、実施形態 54～56 のいずれか 1 つに記載のナノ粒子組成物。

【0735】

61．PEG 脂質を含む、実施形態 1 または 37～59 のいずれか 1 つに記載のナノ粒子組成物。

62．前記 PEG 脂質が、表 2 の PEG-脂質である、実施形態 60 に記載のナノ粒子組成物。

【0736】

63．前記 PEG 脂質が、前記ナノ粒子組成物中に存在する総脂質含有量の約 0.1 mol %～約 6 mol % を構成する、実施形態 60 または 61 に記載のナノ粒子組成物。

64．前記 PEG 脂質が、前記ナノ粒子組成物中に存在する総脂質含有量の約 2.0 mol %～約 2.5 mol % を構成する、実施形態 60 または 61 に記載のナノ粒子組成物。

【0737】

65．前記 PEG-脂質の数平均分子量が約 200 Da～約 5000 Da である、実施形態 60～63 のいずれか 1 つに記載のナノ粒子組成物。

66．前記 1 つまたは複数の核酸分子実体が、目的の病原遺伝子をターゲティングするガイド RNA (gRNA) を含む、実施形態 44～64 のいずれか 1 つに記載のナノ粒子組成物。

【0738】

67．前記ガイド RNA が、シングルガイド RNA (sgRNA) である、実施形態 65 に記載のナノ粒子組成物。

68．目的の病原遺伝子が肝細胞で生成される、実施形態 65 または 66 に記載のナノ粒子組成物。

【0739】

69．前記 1 つまたは複数の核酸分子実体が、SpCas9、CBE、および／または ABE タンパク質をコードする mRNA を含む、実施形態 44～67 のいずれか 1 つに記載のナノ粒子組成物。

10

20

30

40

50

【0740】

70. 核酸安定化剤をさらに含む、実施形態1または37～68のいずれか1つに記載のナノ粒子組成物。

71. (a) 1つまたは複数の核酸分子実体と、

(b) 実施形態1～35または36のいずれか1つに記載のアミノ脂質またはその塩もしくは溶媒和物であって、

前記アミノ脂質またはその塩が、前記ナノ粒子組成物中に存在する総脂質含有量の20mol%～80mol%を構成し、

前記アミノ脂質またはその塩が、1つまたは複数のイオン化可能な窒素原子を含み、前記核酸分子実体内に存在するリン酸基に対する、前記イオン化可能な窒素原子のモル比が2～12である、アミノ脂質またはその塩もしくは溶媒和物と、

(c) 前記ナノ粒子組成物中に存在する前記総脂質含有量の2mol%～25mol%を構成する中性脂質と、

(d) 前記ナノ粒子組成物中に存在する前記総脂質含有量の30mol%～60mol%を構成する構造脂質と、

(e) 前記ナノ粒子組成物中に存在する前記総脂質含有量の0.1mol%～6mol%を構成するPEG脂質を含むナノ粒子組成物。

【0741】

72. 核酸安定化剤をさらに含む、実施形態37～70のいずれか1つに記載のナノ粒子組成物。

73. 核酸安定化剤が、ポリエチレングリコール、臭化セトリモニウム、またはキトサンを含む、実施形態71に記載のナノ粒子組成物。

【0742】

74. 核酸安定化剤が、約120～約2000Daの数平均分子量を有するポリエチレングリコールを含む、実施形態71に記載のナノ粒子組成物。

75. (a) 1つまたは複数の核酸分子実体と、

(b) アミノ脂質またはその塩であって、

前記アミノ脂質またはその塩が、前記ナノ粒子組成物中に存在する総脂質含有量の20mol%～80mol%を構成し、

前記アミノ脂質またはその塩が、1つまたは複数のイオン化可能な窒素原子を含み、前記核酸分子実体内に存在するリン酸基に対する前記イオン化可能な窒素原子のモル比が2～12である、アミノ脂質またはその塩と、

(c) 前記ナノ粒子組成物中に存在する前記総脂質含有量の2mol%～25mol%を構成する中性脂質と、

(d) 前記ナノ粒子組成物中に存在する前記総脂質含有量の30mol%～60mol%を構成する構造脂質と、

(e) 前記ナノ粒子組成物中に存在する前記総脂質含有量の0.1mol%～6mol%を構成するPEG脂質と、

(f) 約120～約2000Daの数平均分子量を有する、キトサン、臭化セトリモニウム、ポリエチレングリコール、またはこれらの組合せを含む核酸安定化剤を含むナノ粒子組成物。

【0743】

76. 核酸安定化剤が、PEG200、PEG400、またはPEG600を含む、実施形態71～74のいずれか1つに記載のナノ粒子組成物。

77. 核酸安定化剤がPEG400である、実施形態71～74のいずれか1つに記載のナノ粒子組成物。

【0744】

78. 核酸安定化剤が、ナノ粒子組成物中に、全重で約0.01%～約20%の量で存在する、実施形態71～76のいずれか1つに記載のナノ粒子組成物。

79. 核酸安定化剤が、全重量で約0.5%~約5%の量でナノ粒子組成物中に存在する、実施形態71~76のいずれか1つに記載のナノ粒子組成物。

【0745】

80. 前記1つまたは複数の核酸分子実体がPCSK9 gRNAを含む、実施形態44~78のいずれか1つに記載のナノ粒子組成物。

81. 前記1つまたは複数の核酸分子実体が、CasヌクレアーゼをコードするmRNAを含む、実施形態44~78のいずれか1つに記載のナノ粒子組成物。

【0746】

82. 前記1つまたは複数の核酸分子実体が、mRNA、gRNA、siRNA、アンチセンスオリゴヌクレオチド、マイクロRNA、抗マイクロRNA、RNA活性化因子、アプタマー、またはこれらの組合せを含む、実施形態44~78のいずれか1つに記載のナノ粒子組成物。

10

【0747】

83. 酸化防止剤を含む、実施形態1または37~81のいずれか1つに記載のナノ粒子組成物。

84. 前記酸化防止剤がEDTAを含む、実施形態82に記載のナノ粒子組成物。

【0748】

85. 界面活性剤をさらに含む、実施形態1または37~83のいずれか1つに記載のナノ粒子組成物。

86. 界面活性剤が、脂肪酸または脂肪アルコールである、実施形態84に記載のナノ粒子組成物。

20

【0749】

87. 界面活性剤が、C₁₂~C₂₄脂肪アルコールである、実施形態84に記載のナノ粒子組成物。

88. C₁₂~C₂₄脂肪アルコールが、ラウリルアルコール、トリデシルアルコール、ミリスチルアルコール、ペンタデシルアルコール、セチルアルコール、パルミトレイルアルコール、ヘプタデシルアルコール、ステアリルアルコール、オレイルアルコール、ノナデシルアルコール、アラキシルアルコール、またはこれらの組合せである、実施形態86に記載のナノ粒子組成物。

【0750】

89. C₁₂~C₂₄脂肪アルコールが、オレイルアルコール、ステアリルアルコール、またはその混合物である、実施形態86に記載のナノ粒子組成物。

30

90. 界面活性剤が、前記ナノ粒子組成物中に存在する総脂質含有量の約1.0mol%~約10mol%を構成する、実施形態84~88のいずれか1つに記載のナノ粒子組成物。

【0751】

91. ナノ粒子のメディアン径が、約50nm~約150nmである、実施形態1または37~89のいずれか1つに記載のナノ粒子組成物。

92. ナノ粒子の多分散指数が0~0.15である、実施形態1または37~90のいずれか1つに記載のナノ粒子組成物。

40

【0752】

93. ナノ粒子の多分散指数が0~0.05である、実施形態1または37~90のいずれか1つに記載のナノ粒子組成物。

94. ナノ粒子組成物の核酸捕捉効率が、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%である、実施形態44~92のいずれか1つに記載のナノ粒子組成物。

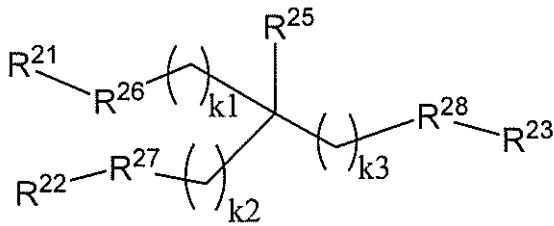
【0753】

95. 式(III)：

50

【0754】

【化97】



式(III)

10

【0755】

の構造を有し、

式中、

R^{21} および R^{22} の各々が独立に、置換もしくは非置換の $C_3 \sim C_{30}$ アルキル、置換もしくは非置換の $C_3 \sim C_{30}$ アルケニル、または置換もしくは非置換の $C_3 \sim C_{30}$ アルキニルであり、

R^{26} 、 R^{27} 、および R^{28} の各々が独立に、 $-C(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=O)-$ 、 $-C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)-$ 、 $-OC(=O)O-$ 、 $-NR^4C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=NR^4)NR^4-$ 、 $-C(=S)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=S)-$ 、 $-C(=S)O-$ 、 $-OC(=S)-$ 、 $OC(=S)O-$ 、 $-NR^4C(=S)O-$ 、 $-OC(=S)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=S)NR^4-$ 、 $-C(=O)S-$ 、 $-SC(=O)-$ 、 $-OC(=O)S-$ 、 $-NR^4C(=O)S-$ 、 $-SC(=O)NR^4-$ 、 $-C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)NR^4-$ 、 $-C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)-$ 、 $-SC(=O)S-$ 、 $-SC(=S)S-$ 、 $-NR^4C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)NR^4-$ 、 $-O(CH_2)_2C(O)O-$ 、 $-O(CH_2)_2C(O)NH-$ 、 $-OC(O)(CH_2)_2O-$ 、 $-OC(O)(CH_2)_2NH-$ 、 $-O(CH_2)_2C(O)N(CH_3)-$ 、 $-O(CH_2)_2C(NH)O-$ 、 $-O(CH_2)_2C(NAc)NH-$ 、 $-O(CH_2)_2C(NH)N(CH_3)-$ 、 $-O(CH_2)_2C(NH)NH-$ 、 $-O(CH_2)_2C(NH)N(CH_3)-$ 、 $-NH(CH_2)_2C(O)O-$ 、 $-NH(CH_2)_2C(O)NH-$ 、 $NH(CH_2)_2C(O)N(CH_3)-$ 、 $-NH(CH_2)_2C(NH)O-$ 、 $-NH(CH_2)_2C(NAc)NH-$ 、 $-NH(CH_2)_2C(NH)N(CH_3)-$ 、 $-NH(CH_2)_2C(NH)NH-$ 、 $-NH(CH_2)_2C(NH)N(CH_3)-$ 、 $-OC(O)(CH_2)_2N(CH_3)-$ 、 $-OC(NH)(CH_2)_2O-$ 、 $-OC(NMe)(CH_2)_2NH-$ 、 $-O_2C(NH)(CH_2)N(CH_3)-$ 、 $-O(CH_2)_2C(NH)NH-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、または結合であり、

20

30

40

R^4 の各々が独立に、水素または置換もしくは非置換の $C_1 \sim C_6$ アルキルであり、

R^{23} が、 $-C_0 \sim C_{10}$ アルキレン- $(CH_2-CH_2-O)_{k4}-R^{24}$ または $-C_1 \sim C_{10}$ ヘテロアルキレン- $(CH_2-CH_2-O)_{k4}-R^{24}$ であり、アルキレンおよびヘテロアルキレンがそれぞれ独立に、置換されているか、または非置換であり、

R^{24} が独立に、水素または置換もしくは非置換の $C_1 \sim C_3$ アルキルであり、

R^{25} が、水素または置換もしくは非置換の $C_1 \sim C_6$ アルキルであり、

k_1 、 k_2 、および k_3 の各々が独立に、0、1、2、3、4、または5であり、

k_4 が、1～100から選択される整数である、

PEG脂質またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物。

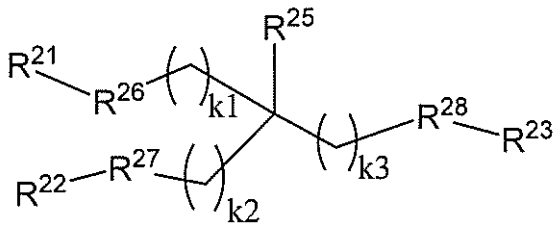
【0756】

96. 式(III*)：

50

【 0 7 5 7 】

【 化 9 8 】



式(III*)

10

【 0 7 5 8 】

の構造を有し、

式中、

R^{21} が、水素、置換もしくは非置換の $C_1 \sim C_{30}$ アルキル、置換もしくは非置換の $C_3 \sim C_{30}$ アルケニル、または置換もしくは非置換の $C_3 \sim C_{30}$ アルキニルであり、

R^{22} が、水素、置換もしくは非置換の $C_1 \sim C_{30}$ アルキル、置換もしくは非置換の $C_3 \sim C_{30}$ アルケニル、または置換もしくは非置換の $C_3 \sim C_{30}$ アルキニルであり、

R^{26} 、 R^{27} 、および R^{28} の各々が独立に、 $-C(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=O)-$ 、 $-C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)-$ 、 $-OC(=O)O-$ 、 $-NR^4C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=NR^4)NR^4-$ 、 $-C(=S)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=S)-$ 、 $-C(=S)O-$ 、 $-OC(=S)-$ 、 $OC(=S)O-$ 、 $-NR^4C(=S)O-$ 、 $-OC(=S)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=S)NR^4-$ 、 $-C(=O)S-$ 、 $-SC(=O)-$ 、 $-OC(=O)S-$ 、 $-NR^4C(=O)S-$ 、 $-N(Ac)-$ 、 $-OC(O)OCH_2C(O)O-$ 、 $-OC(O)OCH_2C(O)NH-$ 、 $-OC(O)NHCH_2C(O)O-$ 、 $-OC(O)NHCH_2C(O)NH-$ 、 $-OC(O)O(CH_2)_2C(O)O-$ 、 $-OC(O)O(CH_2)_2C(O)NH-$ 、 $-OC(O)NH(CH_2)_2C(O)O-$ 、 $-OC(O)NH(CH_2)_2C(O)NH-$ 、 $-OC(O)O(CH_2)_3C(O)O-$ 、 $-OC(O)O(CH_2)_3C(O)NH-$ 、 $-OC(O)NH(CH_2)_3C(O)O-$ 、 $-OC(O)NH(CH_2)_3C(O)NH-$ 、 $-C(O)OCH_2C(O)NH-$ 、 $-C(O)NHCH_2C(O)O-$ 、 $-C(O)NHCH_2C(O)NH-$ 、 $-C(O)O(CH_2)_2C(O)O-$ 、 $-C(O)NH(CH_2)_2C(O)O-$ 、 $-C(O)NH(CH_2)_2C(O)NH-$ 、 $-C(O)O(CH_2)_3C(O)O-$ 、 $-C(O)O(CH_2)_3C(O)NH-$ 、 $-C(O)NH(CH_2)_3C(O)O-$ 、 $-C(O)NH(CH_2)_3C(O)NH-$ 、 $-OC(=O)NR^4(CH_2)_{1 \sim 3}C(=O)NH-$ 、 $-OC(=O)NR^4(CH_2)_{1 \sim 3}C(=O)O-$ 、 $-C(=O)NR^4(CH_2)_{1 \sim 3}C(=O)NH-$ 、 $-SC(=O)NR^4-$ 、 $-C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)-$ 、 $-SC(=S)O-$ 、 $-NR^4C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)NR^4-$ 、 $-C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)-$ 、 $-SC(=S)O-$ 、 $-SC(=S)S-$ 、 $-NR^4C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)NR^4-$ 、 $-O(CH_2)_2C(O)O-$ 、 $-O(CH_2)_2C(O)NH-$ 、 $-OC(O)(CH_2)_2O-$ 、 $-OC(O)(CH_2)_2NH-$ 、 $-O(CH_2)_2C(O)N(CH_3)-$ 、 $-O(CH_2)_2C(NH)O-$ 、 $-O(CH_2)_2C(NAc)NH-$ 、 $-O(CH_2)_2C(NH)N(CH_3)-$ 、 $-O(CH_2)_2C(NH)NH-$ 、 $-O(CH_2)_2C(NH)N(CH_3)-$ 、 $-NH(CH_2)_2C(O)O-$ 、 $-NH(CH_2)_2C(O)NH-$ 、 $-NH(CH_2)_2C(O)N(CH_3)-$ 、 $-NH(CH_2)_2C(NH)O-$ 、 $-NH(CH_2)_2C(NAc)NH-$ 、 $-NH(CH_2)_2C(NH)N(CH_3)-$ 、 $-NH(CH_2)_2C(NH)NH-$ 、 $-NH(CH_2)_2C(NH)N(CH_3)-$

20

30

40

50

) - -OC(O)(CH₂)₂N(CH₃)-、-OC(NH)(CH₂)₂O-、-OC(NMe)(CH₂)₂NH-、-O₂C(NH)(CH₂)N(CH₃)-、-O(CH₂)₂C(NH)NH-、-O-、-S-、または結合であり、

R⁴の各々が独立に、水素または置換もしくは非置換のC₁~C₆アルキルであり、

R^{2 3}が、-C₀~C₁₀アルキレン(CH₂-CH₂-O)_{k 4}-R^{2 4}、-C₁~C₁₀ヘテロアルキレン-(CH₂-CH₂-O)_{k 4}-R^{2 4}、-C₀~C₁₀アルキレン-(O-CH₂-CH₂)_{k 4}-R^{2 4}、または-C₀~C₁₀ヘテロアルキレン-(O-CH₂-CH₂)_{k 4}-R^{2 4}であり、アルキレンおよびヘテロアルキレンがそれぞれ独立に、置換されているか、または非置換であり、

R^{2 4}が独立に、水素、置換もしくは非置換のC₁~C₃アルキル、-O-R⁴、-C(=O)OR⁴、または-C(=O)R⁴であり、

R^{2 5}が、水素または置換もしくは非置換のC₁~C₂₂アルキルであり、

k₁、k₂、およびk₃の各々が独立に、0、1、2、3、4、または5であり、

k₄が、1~100から選択される整数である、

PEG脂質またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物。

[0759]

97. R^{2 1}が、置換もしくは非置換のC₃~C₃₀アルキル、置換もしくは非置換のC₃~C₃₀アルケニル、または置換もしくは非置換のC₃~C₃₀アルキニルであり、

R^{2 2}が、水素、置換もしくは非置換のC₃~C₃₀アルキル、置換もしくは非置換のC₃~C₃₀アルケニル、または置換もしくは非置換のC₃~C₃₀アルキニルであり、

R^{2 6}、R^{2 7}、およびR^{2 8}の各々が独立に、-C(=O)NR⁴-、-NR⁴C(=O)-、-C(=O)O-、-OC(=O)-、-OC(=O)O-、-NR⁴C(=O)O-、-OC(=O)NR⁴-、-NR⁴C(=O)NR⁴-、-NR⁴C(=NR⁴)NR⁴-、-C(=S)NR⁴-、-NR⁴C(=S)-、-C(=S)O-、-OC(=S)-、OC(=S)O-、-NR⁴C(=S)O-、-OC(=S)NR⁴-、-NR⁴C(=S)NR⁴-、-C(=O)S-、-SC(=O)-、-OC(=O)S-、-NR⁴C(=O)S-、-OC(=O)NR⁴(CH₂)_{1~3}C(=O)NH-、-OC(=O)NR⁴(CH₂)_{1~3}C(=O)O-、-C(=O)NR⁴(CH₂)_{1~3}C(=O)NH-、-SC(=O)NR⁴-、-C(=S)S-、-SC(=S)-、-SC(=S)O-、-NR⁴C(=S)S-、-SC(=S)NR⁴-、-C(=S)S-、-SC(=S)-、-SC(=O)S-、-SC(=S)S-、-NR⁴C(=S)S-、-SC(=S)NR⁴-、-O(CH₂)₂C(O)O-、-O(CH₂)₂C(O)NH-、-OC(O)(CH₂)₂O-、-OC(O)(CH₂)₂NH-、-O(CH₂)₂C(O)N(CH₃)-、-O(CH₂)₂C(NH)O-、-O(CH₂)₂C(NAc)NH-、-O(CH₂)₂C(NH)N(CH₃)-、-O(CH₂)₂C(NH)NH-、-O(CH₂)₂C(NH)N(CH₃)-、-NH(CH₂)₂C(O)O-、-NH(CH₂)₂C(O)NH-、NH(CH₂)₂C(O)N(CH₃)-、-NH(CH₂)₂C(NH)O-、-NH(CH₂)₂C(NAc)NH-、-NH(CH₂)₂C(NH)N(CH₃)-、-NH(CH₂)₂C(NH)NH-、-NH(CH₂)₂C(NH)N(CH₃)- -OC(O)(CH₂)₂N(CH₃)-、-OC(NH)(CH₂)₂O-、-OC(NMe)(CH₂)₂NH-、-O₂C(NH)(CH₂)N(CH₃)-、-O(CH₂)₂C(NH)NH-、-O-、-S-、または結合であり、

R⁴の各々が独立に、水素または置換もしくは非置換のC₁~C₆アルキルであり、

R^{2 3}が、-C₀~C₁₀アルキレン-(CH₂-CH₂-O)_{k 4}-R^{2 4}または-C₁~C₁₀ヘテロアルキレン-(CH₂-CH₂-O)_{k 4}-R^{2 4}であり、アルキレンおよびヘテロアルキレンがそれぞれ独立に、置換されているか、または非置換であり、

R^{2 4}が独立に、水素、置換もしくは非置換のC₁~C₃アルキル、-O-R⁴、-C(=O)OH、または-C(=O)R⁴であり、

R^{2 5}が、水素または置換もしくは非置換のC₁~C₆アルキルであり、

10

20

30

40

50

k 1、k 2、および k 3 の各々が独立に、0、1、2、3、4、または 5 であり、
k 4 が、1～100 から選択される整数である、
実施形態 95 に記載の PEG 脂質またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物。

【0760】

98. R²¹ および R²² の各々が独立に、非置換の直鎖状 C₁₂～C₂₅ アルキルである、実施形態 94～96 のいずれか 1 つに記載の PEG 脂質またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物。

【0761】

99. R²⁶、R²⁷、および R²⁸ の各々が独立に、
-O(CH₂)₂C(O)O-、
-O(CH₂)₂C(O)NH-、-OC(O)(CH₂)₂O-、-OC(O)(CH₂)₂NH-、
-O(CH₂)₂C(O)N(CH₃)-、-O(CH₂)₂C(NH)O-、
-O(CH₂)₂C(NAc)NH-、-O(CH₂)₂C(NH)N(CH₃)-、
-O(CH₂)₂C(NH)NH-、-O(CH₂)₂C(NH)N(CH₃)-、
-NH(CH₂)₂C(O)O-、-NH(CH₂)₂C(O)NH-、NH(CH₂)₂C(O)N(CH₃)-、
-NH(CH₂)₂C(NH)O-、-NH(CH₂)₂C(NAc)NH-、
-NH(CH₂)₂C(NH)N(CH₃)-、-NH(CH₂)₂C(NH)NH-、
-NH(CH₂)₂C(NH)N(CH₃)-、-OC(O)(CH₂)₂N(CH₃)-、
-OC(NH)(CH₂)₂O-、-OC(NMe)(CH₂)₂NH-、
-O₂C(NH)(CH₂)₂N(CH₃)-、および -O(CH₂)₂C(NH)NH から選択される、
実施形態 94～97 のいずれか 1 つに記載の PEG 脂質またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物。

【0762】

100. R²⁶ および R²⁷ の各々が、-O(CH₂)₂C(O)O- または -O(CH₂)₂C(O)NH- である、実施形態 94～97 のいずれか 1 つに記載の PEG 脂質またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物。

【0763】

101. R²⁸ が、-O(CH₂)₂C(O)O- または -O(CH₂)₂C(O)NH- である、実施形態 94～99 のいずれか 1 つに記載の PEG 脂質またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物。

【0764】

102. R²⁸ が、-O-、-C(=O)O-、または -OC(=O)- である、実施形態 94～99 のいずれか 1 つに記載の PEG 脂質またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物。

【0765】

103. k 1 が 0 であり、k 2 が 1 であり、k 3 が 1 である、実施形態 94～101 のいずれか 1 つに記載の PEG 脂質またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物。

104. R²³ が、-C₀～C₃ アルキレン-(CH₂-CH₂-O)_{k4}-R²⁴ であり、R²⁴ が H またはメチルである、実施形態 94～102 のいずれか 1 つに記載の PEG 脂質またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物。

【0766】

105. k 4 が 1～50 である、実施形態 94～103 のいずれか 1 つに記載の PEG 脂質またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物。

106. R²⁵ が水素である、実施形態 94～104 のいずれか 1 つに記載の PEG 脂質またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物。

【0767】

107. 表 2 から選択される構造を有する PEG 脂質またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物。

108. PEG 脂質が、

【0768】

10

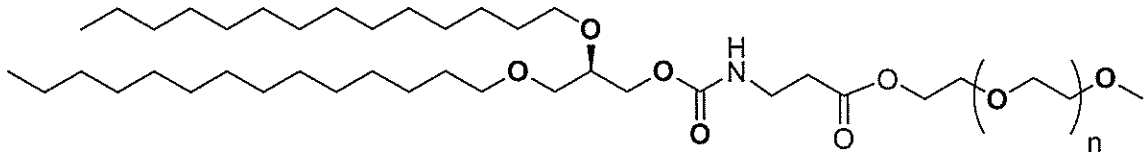
20

30

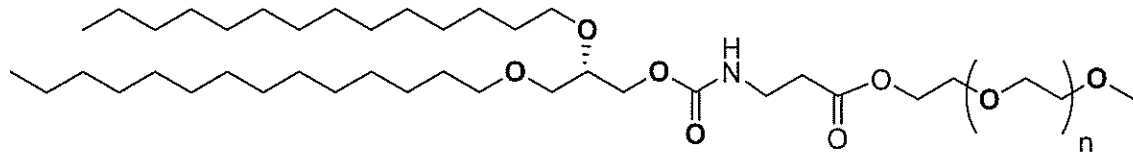
40

50

【化 9 9】

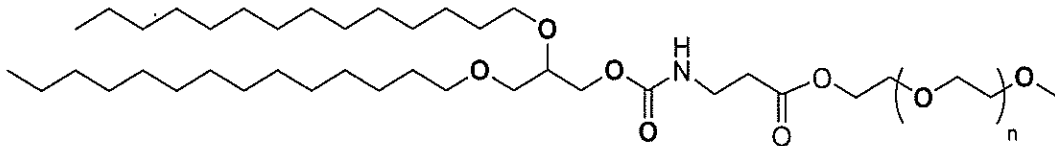


または

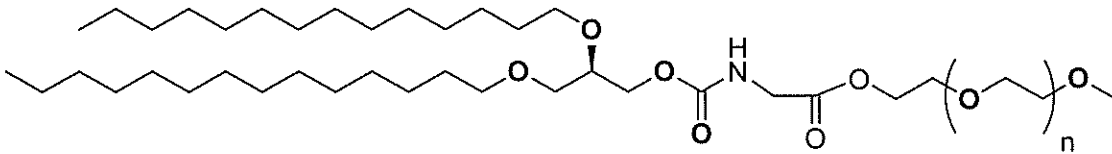


10

または

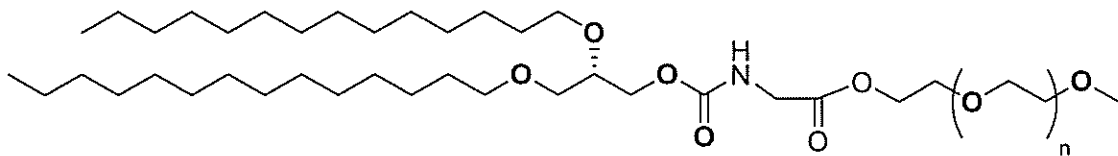


または

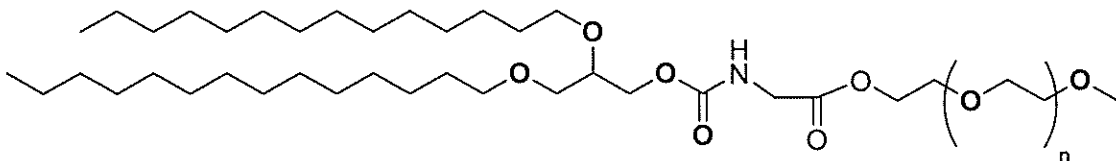


20

または

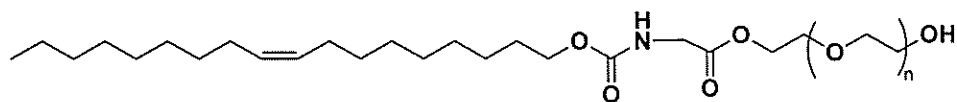


または



30

または



【0769】

40

である、実施形態 95 の PEG 脂質またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物。

109. 実施形態 1 または 37 ~ 93 のいずれか 1 つに記載の前記ナノ粒子組成物および賦形剤または担体を含む薬学的組成物。

【0770】

110. 遺伝子編集因子ヌクレアーゼをコードする mRNA を含む、実施形態 108 に記載の薬学的組成物。

111. 1 つまたは複数のガイド RNA 分子を含む、実施形態 108 または 109 に記載の薬学的組成物。

【0771】

112. PCSK9 ガイド RNA を含む、実施形態 108 または 109 に記載の薬学的

50

組成物。

113. 2つ以上のガイドRNA分子を含む、実施形態108または109に記載の薬学的組成物。

【0772】

114. 前記2つ以上のガイドRNA分子が、2つ以上の目的の遺伝子を標的とする、実施形態112に記載の薬学的組成物。

115. 前記mRNAがCas9ヌクレアーゼをコードする、実施形態109～113のいずれか1項に記載の薬学的組成物。

【0773】

116. 前記mRNAが、塩基編集ヌクレアーゼをコードする、実施形態109～113のいずれか1つに記載の薬学的組成物。

117. 前記mRNAおよび前記1つまたは複数のガイドRNA分子が、同じナノ粒子組成物中に存在する、実施形態110～115のいずれか1つに記載の薬学的組成物。

【0774】

118. 前記mRNAおよび前記1つまたは複数のガイドRNA分子が、異なるナノ粒子組成物中に存在する、実施形態110～115のいずれか1項に記載の薬学的組成物。

119. 前記薬学的組成物中の前記mRNAに対する前記gRNA分子の比が、重量またはモルで約0.01～約100である、実施形態110～117のいずれか1項に記載の薬学的組成物。

【0775】

120. 前記薬学的組成物中の前記gRNA分子と前記mRNAの比が、重量またはモルで、約50:1、約40:1、約30:1、約20:1、約18:1、約16:1、約14:1、約12:1、約10:1、約9:1、約8:1、約7:1、約6:1、約5:1、約4:1、約3:1、約2:1、約1:1、約1:2、約1:3、約1:4、約1:5、約1:6、約1:7、約1:8、約1:9、または約1:10である、実施形態118に記載の薬学的組成物。

【0776】

121. (a) 実施形態1または37～93のいずれか1つに記載の第1のナノ粒子組成物と、

(b) 実施形態1または37～93のいずれか1つに記載の第2のナノ粒子組成物を含む薬学的組成物。

【0777】

122. 前記第1のナノ粒子組成物が遺伝子編集因子mRNAを含み、前記第2のナノ粒子組成物が、1つまたは複数のガイドRNA分子を含む、実施形態120に記載の薬学的組成物。

【0778】

123. 前記薬学的組成物中のmRNAに対するガイドRNA分子の比が、重量またはモルで約50:1、約40:1、約30:1、約20:1、約18:1、約16:1、約14:1、約12:1、約10:1、約9:1、約8:1、約7:1、約6:1、約5:1、約4:1、約3:1、約2:1、約1:1、約1:2、約1:3、約1:4、約1:5、約1:6、約1:7、約1:8、約1:9、または約1:10である、薬学的組成物120または121。

【0779】

124. 前記薬学的組成物中のmRNAに対するガイドRNA分子の比が、重量またはモルで約1:1である、薬学的組成物120または121。

125. 核酸分子実体を細胞に送達する方法であって、前記細胞を、実施形態1または37～93のいずれか1つに記載のナノ粒子組成物または実施形態108～123のいずれか1つに記載の薬学的組成物と接触させるステップを含み、それによって前記核酸分子実体が前記細胞に送達される、方法。

【0780】

10

20

30

40

50

126. 前記細胞をインピボ、エクスピボ、またはインビトロで接触させる、実施形態124に記載の方法。

127. 細胞内で目的のポリペプチドを生成する方法であって、前記細胞を、実施形態1または37～93のいずれか1つに記載のナノ粒子組成物または実施形態108～123のいずれか1つに記載の薬学的組成物と接触させるステップを含み、前記ナノ粒子組成物または前記薬学的組成物が、核酸分子実体を含み、前記核酸分子実体が細胞内で翻訳され、それによって、ポリペプチドを生成する、方法。

【0781】

128. 薬学的組成物を作製する方法であって、実施形態1または37～93のいずれか1つに記載の第1のナノ粒子組成物と、実施形態1または37～93のいずれか1つに記載の第2のナノ粒子組成物と組み合わせるステップを含む方法。

【0782】

129. 哺乳動物における疾患または状態を処置する方法であって、治療有効量の、実施形態108～123のいずれか1つに記載の薬学的組成物を哺乳動物に投与するステップを含む方法。

【0783】

130. 細胞内のPCSK9遺伝子を編集する方法であって、前記細胞を、実施形態1または37～93のいずれか1つに記載のナノ粒子組成物または実施形態108～123のいずれか1つに記載の薬学的組成物と接触させるステップを含み、前記ナノ粒子組成物または前記薬学的組成物が、PCSK9ガイドRNAを含む、方法。

【0784】

131. 実施形態71～93のいずれか1つに記載の安定したナノ粒子組成物を生成する方法であって、核酸安定化剤を、核酸安定化剤を欠くナノ粒子組成物と組み合わせるステップを含む方法。

【0785】

132. 核酸安定化剤が、冷凍または保存の前にナノ粒子組成物と組み合わせられる、実施形態130に記載の方法。

133. 核酸安定化剤が、1つまたは複数の核酸実体の添加の前、それと同時、またはその後にナノ粒子組成物と組み合わせられる、実施形態130に記載の方法。

【0786】

134. 組み合わせるステップが、核酸安定化剤を、水性緩衝液中で1つまたは複数の核酸実体と混合するステップを含む、実施形態130～132のいずれか1つに記載の方法。

【0787】

135. 安定したナノ粒子組成物を生成する方法であって、

(a) 核酸安定化剤を、1つまたは複数の核酸分子実体と組み合わせ、それによって、安定化された1つまたは複数の核酸分子実体を含む溶液を生成するステップと、

(b) (a)の溶液を、アミノ脂質、中性脂質、構造脂質、およびPEG脂質のうちの1つまたは複数を含むナノ粒子組成物と組み合わせるステップとを含む方法。

【0788】

136. (a)における組み合わせるステップが、核酸安定化剤を、水性緩衝液中で1つまたは複数の核酸実体と混合するステップを含む、実施形態134に記載の方法。

137. ナノ粒子組成物を収集し、約6.5～約8.0のpHを有する緩衝液に対して透析するステップをさらに含む、実施形態130～135のいずれか1つに記載の方法。

【0789】

138. 核酸安定化剤が、約120～約1000の数平均分子量を有するポリエチレングリコールである、実施形態130～136のいずれか1つに記載の方法。

139. 脂質ナノ粒子を含む製剤を調製する方法であって、ナノ粒子が、(i) 1つまたは複数の核酸分子実体、(ii) アミノ脂質、ならびに(iii) 構造脂質、中性脂質

10

20

30

40

50

、および P E G 脂質から選択される 1 つまたは複数の脂質を含み、方法が

(a) アミノ脂質の第 1 の画分を、第 1 の溶液中で 1 つまたは複数の核酸分子実体と組み合わせるステップであって、第 1 の画分が総アミノ脂質の 0 . 1 m o l % ~ 9 9 m o l % を構成するステップと、

(b) アミノ脂質の残りを、第 2 の溶液中で、構造脂質、中性脂質、および P E G 脂質から選択される 1 つまたは複数の脂質と組み合わせるステップと、

(c) 第 1 の溶液および第 2 の溶液を混合するステップであって、それによって脂質ナノ粒子を生成するステップとを含む、方法。

【 0 7 9 0 】

1 4 0 . アミノ脂質の第 1 の画分が、1 つまたは複数の核酸分子実体内のリン酸の 0 . 1 ~ 9 9 % (N : P ベース) を中和するように構成される、実施形態 1 3 8 に記載の方法。

【 0 7 9 1 】

1 4 1 . アミノ脂質の第 1 の画分が、1 つまたは複数の核酸分子実体内のリン酸の 0 . 5 ~ 9 9 % (N : P ベース) を中和するように構成される、実施形態 1 3 8 に記載の方法。

【 0 7 9 2 】

1 4 2 . アミノ脂質の第 1 の画分が、1 つまたは複数の核酸分子実体内のリン酸の約 1 0 % 、 1 5 % 、 2 5 % 、 5 0 % 、または 7 5 % (N : P ベース) を中和するように構成される、実施形態 1 3 8 に記載の方法。

【 0 7 9 3 】

1 4 3 . 第 1 の溶液が水性緩衝溶液である、実施形態 1 3 8 ~ 1 4 1 のいずれか 1 つに記載の方法。

1 4 4 . 第 1 の溶液が核酸安定化剤をさらに含む、実施形態 1 3 8 ~ 1 4 2 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 7 9 4 】

1 4 5 . 第 1 の溶液および第 2 の溶液がインラインミキサーで混合される、実施形態 1 3 8 ~ 1 4 3 のいずれか 1 つに記載の方法。

10

20

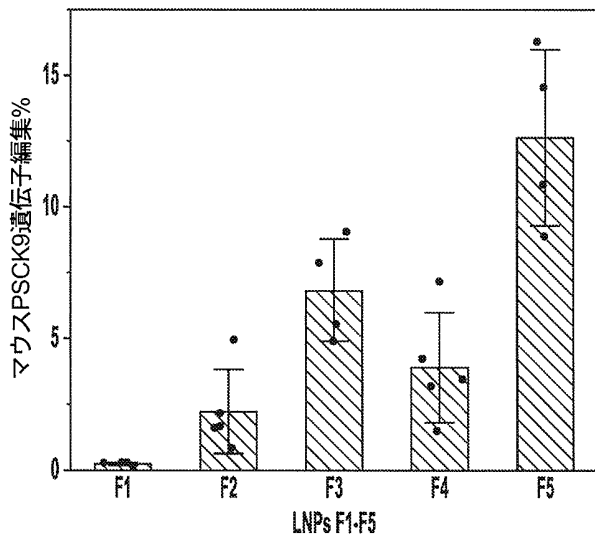
30

40

50

【図面】

【図 1】



【図 2】

図 2 A

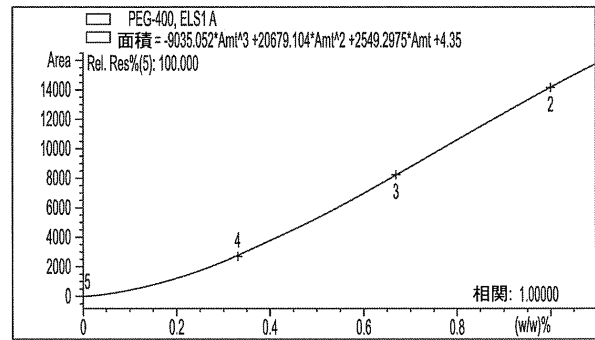
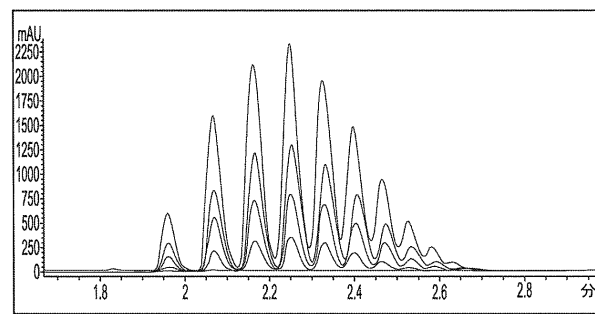
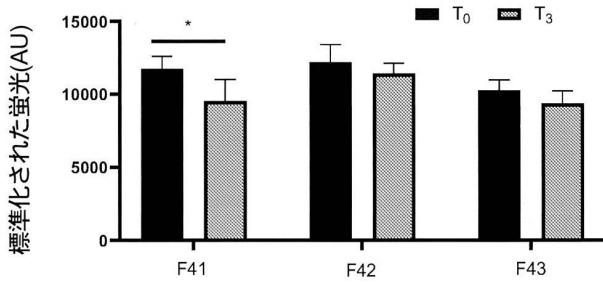


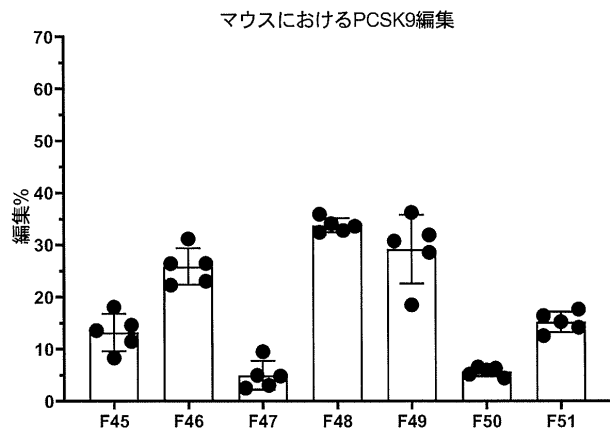
図 2 B



【図 3】



【図 4】



10

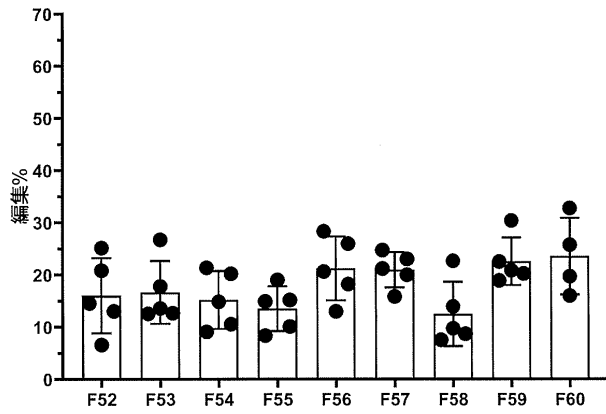
20

30

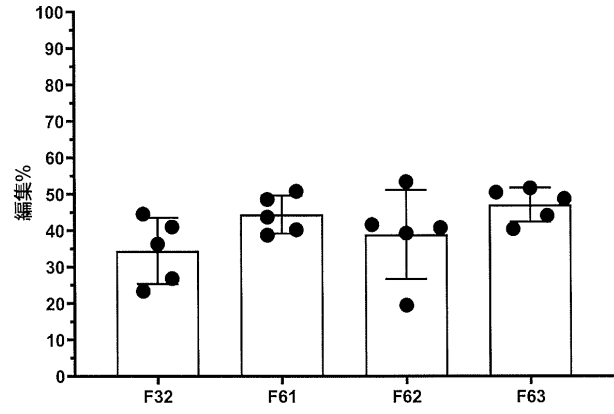
40

50

【図 5】

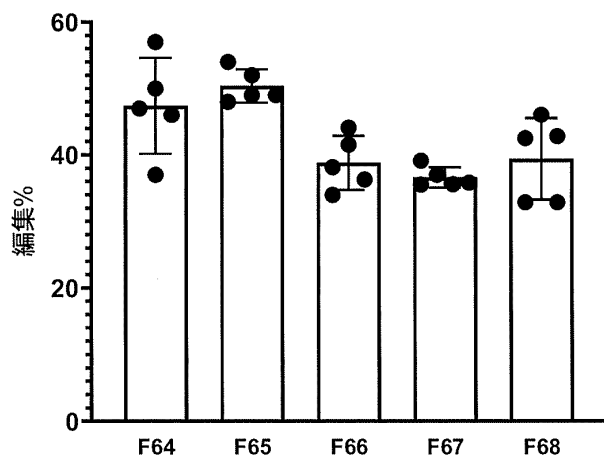


【図 6】

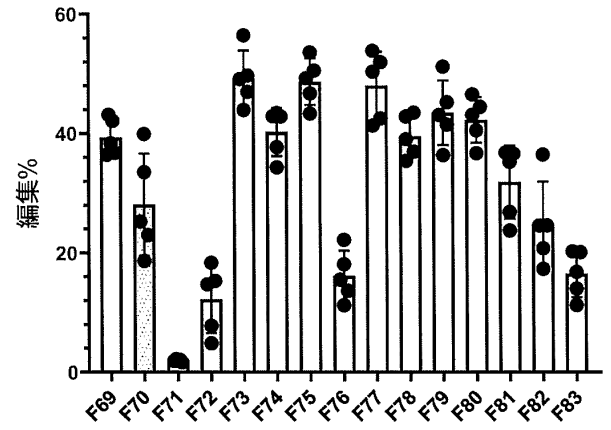


10

【図 7】



【図 8】



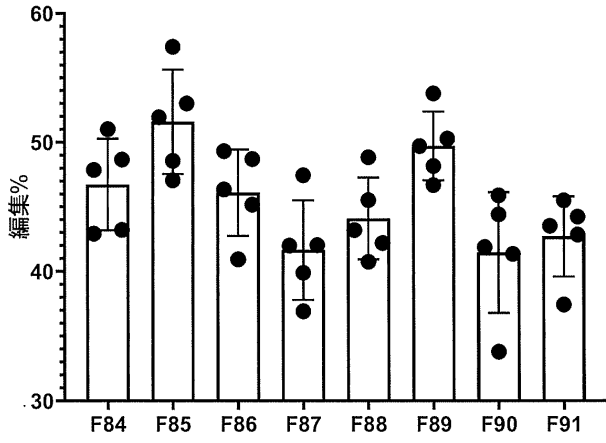
20

30

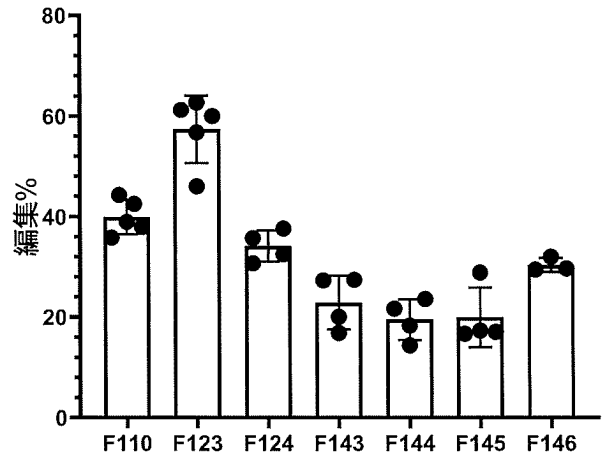
40

50

【図 9】

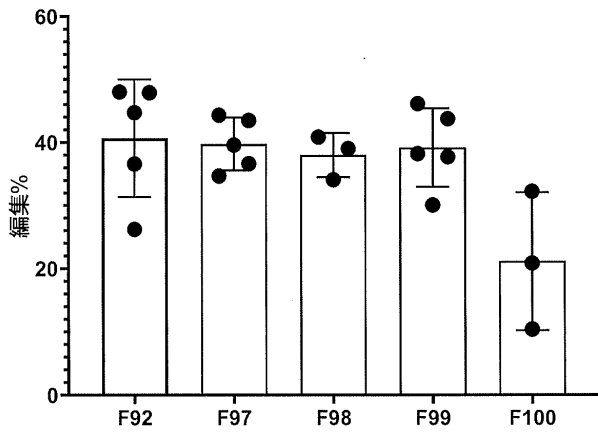


【図 10】

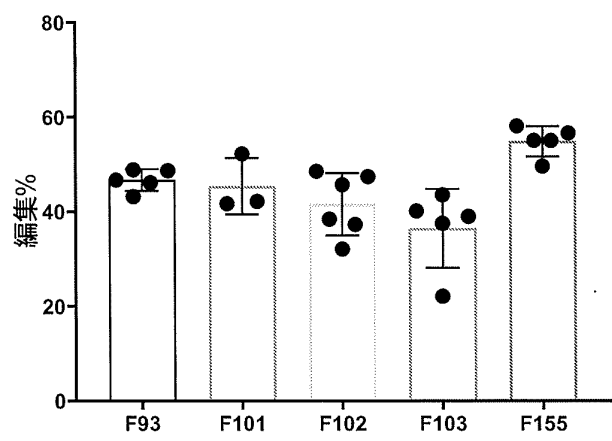


10

【図 11】



【図 12】



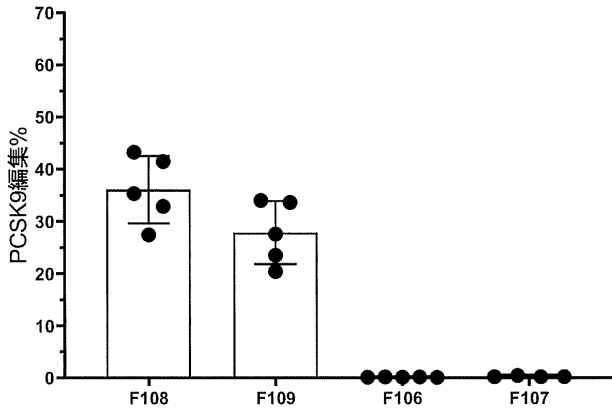
20

30

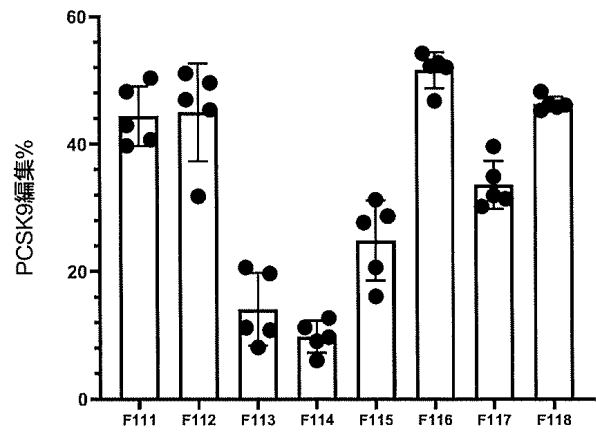
40

50

【図 1 3】

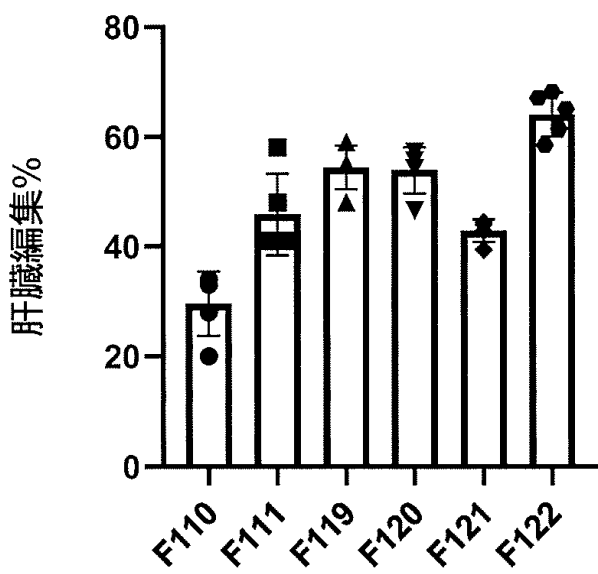


【図 1 4】

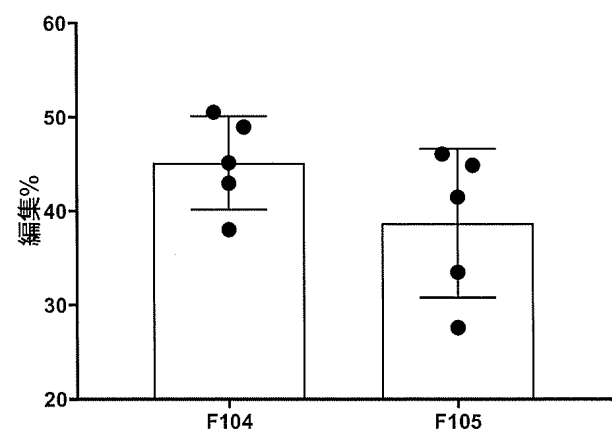


10

【図 1 5】



【図 1 6】



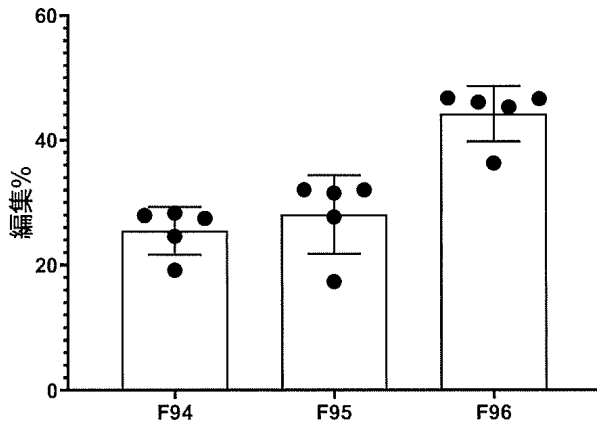
20

30

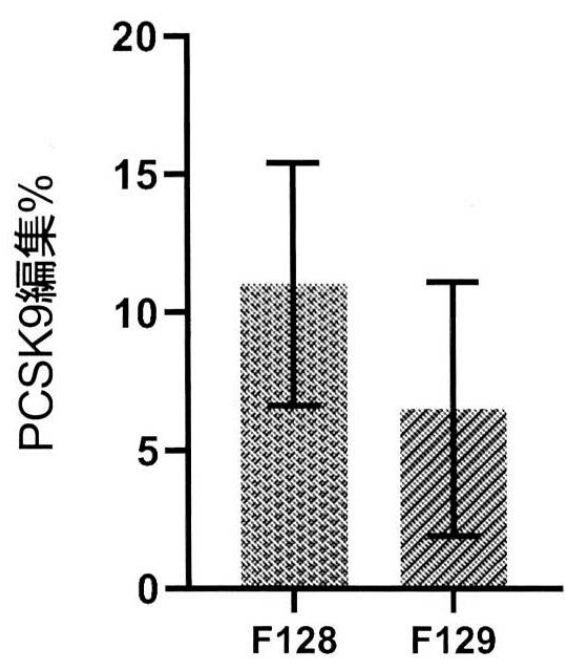
40

50

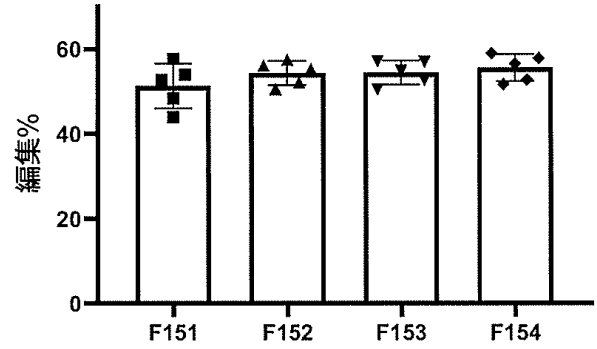
【図 17】



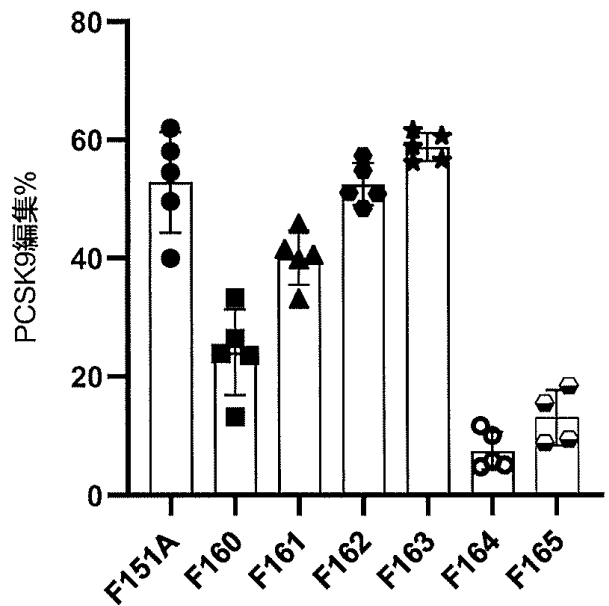
【図 18】



【図 19】



【図 20】



10

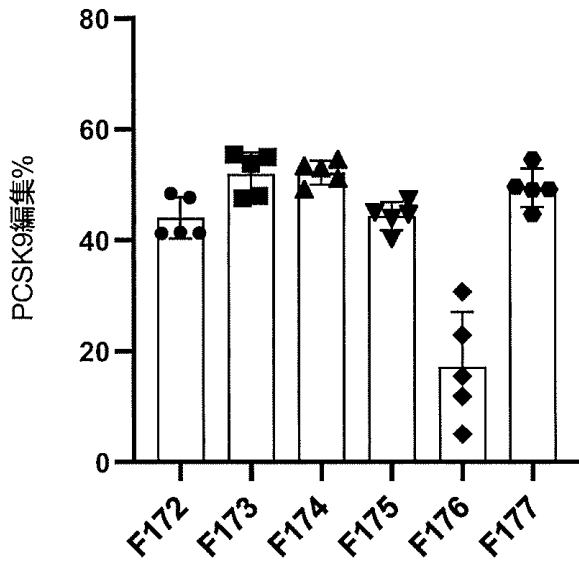
20

30

40

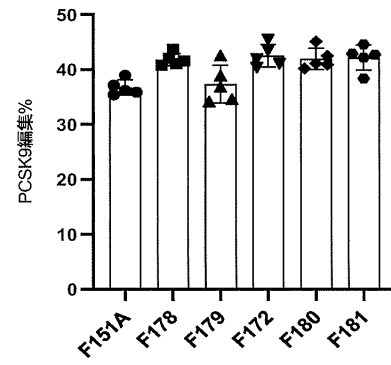
50

【図 2 1】

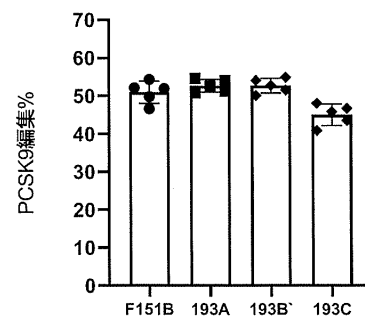


【図 2 2】

(A)

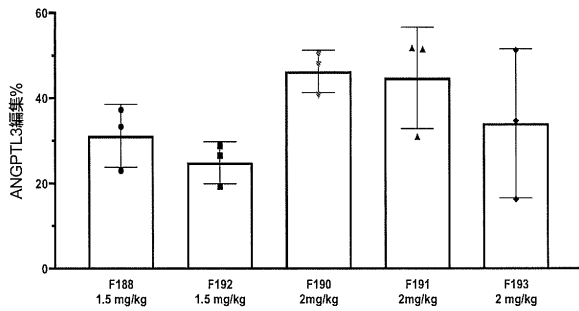


(B)

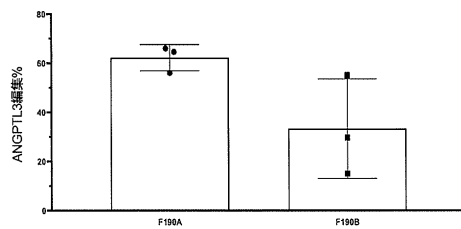


【図 2 3】

(A)

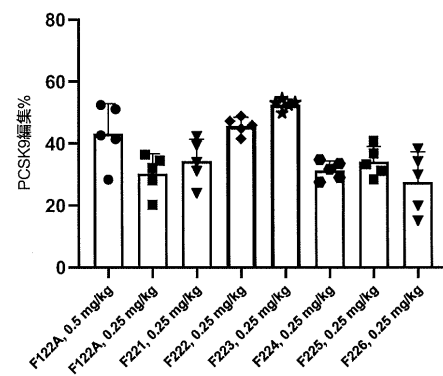


(B)

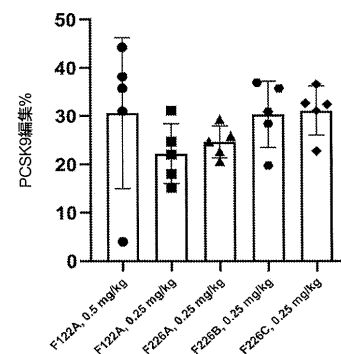


【図 2 4】

(A)



(B)



10

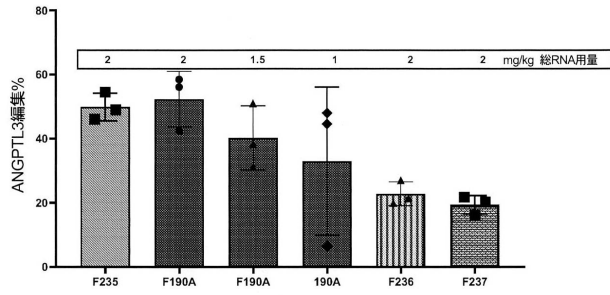
20

30

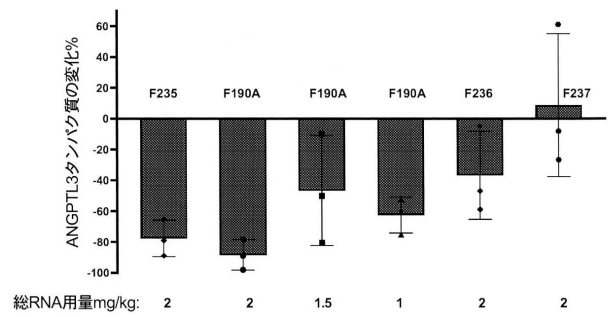
40

50

【図 25】

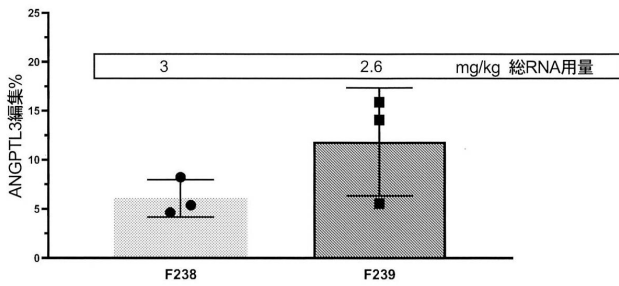


【図 26】

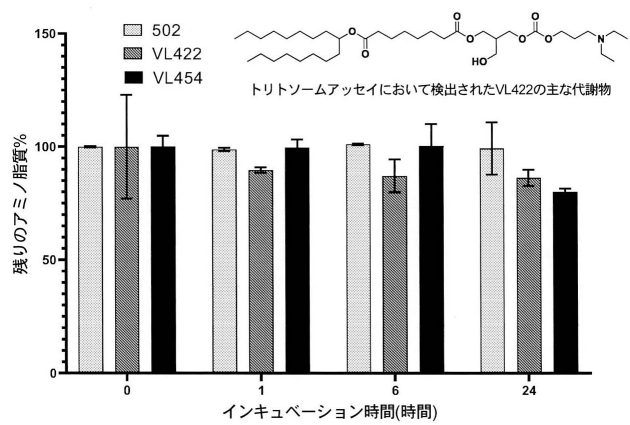


10

【図 27】



【図 28】



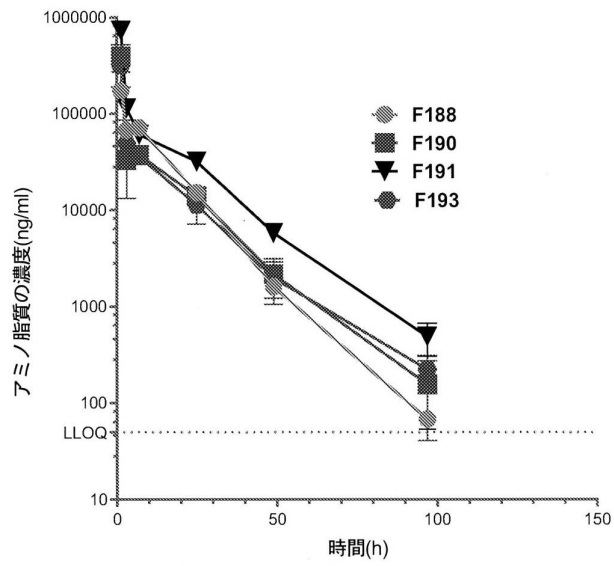
20

30

40

50

【図 29】



10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US21/50511

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC - A61K 47/18; A61K 31/16; A61K 9/26; A61K 9/127; A61K 9/10 (2021.01)

CPC - A61K 47/18; A61K 31/16; A61K 9/127; A61K 9/10

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 2009/0053142 A1 (WYNN, D et al.) 26 February 2009; abstract; paragraphs [0123], [0127]	1
Y	WO 2017/196969 A1 (Z BIOTECH, LLC) 16 November 2017; paragraphs [0058], [0100]	1
A	US 2015/0050295 A9 (AXOLABS GMBH) 19 February 2015; abstract; paragraphs [0011], [0101], [0190]-[0191]	1
A	(MOSS, KH et al.) Lipid Nanoparticles for Delivery of Therapeutic RNA Oligonucleotides. Molecular Pharmaceutics. 3 June 2019, Vol. 16, No. 6; pages 2265-2277; DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.8b01290	1

☐ 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

19 November 2021 (19.11.2021)

Date of mailing of the international search report

JAN 31 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

Shane Thomas

Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US21/50511

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.: 15-22,31-34,38-69,71-73,75-93,97-104,107-132,135-136,142-143
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:
-***Please See Supplemental Page-***

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.:
Group I+: Claims 1-14, 23, 35-37, 70, 74, 94-96, 105-106, 144-147, Formula I* having methyl core

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/US21/50511

-***-Continued From Box No. III: Observations where unity of invention is lacking-***-

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I+: Claims 1-14, 23, 35-37, 70, 74, 94-96, 105-106, 144-147 disclose compounds of Formula I* having methyl core

Group II+: Claims 24-30, 32-33 disclose compounds of Formula II* having tertiary amine core

Group III: Claims 133-134, 137-141 disclose methods of producing a stabilized nanoparticle composition

The compound and methods will be searched to the extent the compound encompasses a compound of Formula I* wherein R1 is hydrogen, R2 is hydrogen, each of X, Y, and Z is -C(=O)NR4, wherein R3 is -C0 alkylene-NR7R8-, R7 and R8 is hydrogen, R4 is hydrogen, R5 is hydrogen, each of n, m, and q is (first exemplary compound structure), where it is believed that Claim 1 encompasses this criteria and will be the claim searched as the first invention of Group I+. Applicant is invited to elect additional compound(s), with fully specified structure (e.g. no optional or variable atoms or substituents) for each, to be searched. Additional compound(s) will be searched upon the payment of additional fees. It is believed that claim 1 encompasses this first named invention and thus this claim will be searched without fee to the extent that it encompasses a compound of Formula I* wherein R1 is hydrogen, R2 is hydrogen, each of X, Y, and Z is -C(=O)NR4, wherein R3 is -C0 alkylene-NR7R8-, R7 and R8 is hydrogen, R4 is hydrogen, R5 is hydrogen, each of n, m, and q is (first exemplary compound structure). Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected compound structure(s). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "*" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined. An exemplary election would be a compound of Formula I* wherein R1 is C3-C30 alkenyl, R2 is hydrogen, each of X, Y, and Z is -C(=O)NR4, wherein R3 is -C0 alkylene-NR7R8-, R7 and R8 is hydrogen, R4 is hydrogen, R5 is hydrogen, each of n, m, and q is (compound structure).

The inventions listed as Groups I+ and II-III 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: the special technical features of Groups I+ include amino lipids having a structure of Formula I* having methyl core, which are not present in Groups II-III; the special technical features of Group II include amino lipids having a structure of Formula II* having tertiary amine core, which are not present in Groups I+ and III; the special technical features of Group III include methods of producing a stabilized nanoparticle composition and preparing a formulation comprising lipid nanoparticles, which are not present in Groups I+ and II.

Groups I+ share the technical features including: amino lipid having a structure of Formula I*. However, these shared technical features are previously disclosed by US 2009/0053142 A1 to Wynn, et al. (hereinafter "Wynn") in view of WO 2017/196969 A1 (Z BIOTECH, LLC) (hereinafter "BIOTECH").

Wynn discloses an amino lipid having a structure similar to the structure of Formula I*, as shown (methanetricarboxamide, which is the first formula in the scheme in paragraph [0123]; paragraph [0123]), wherein R1 is hydrogen (the hydrogen atom is attached to the nitrogen atom of the first amido group of the compound; paragraph [0123]); R2 is hydrogen (the hydrogen atom is attached to the nitrogen atom of the second amido group of the compound; paragraph [0123]); each of X, Y, and Z is -C(=O)NR4 (three amido groups are linked to the methyl core of the compound; paragraph [0123]); R4 is hydrogen (the second hydrogen atom is attached to the nitrogen atoms of the first, second and the third amido groups of the compound; paragraph [0123]); R5 is hydrogen (the hydrogen atom is attached to the methyl core of the compound; paragraph [0123]), each of n, m, and q is (the carbon atom of each amido group is linked directly to the carbon atom of the methyl core of the compound, each of n, m, and q is 0; paragraph [0123]). Wynn does not disclose wherein R3 is -C0 alkylene-NR7R8-, R7 and R8 is hydrogen. However, BIOTECH discloses wherein R3 is -C0 alkylene-NR7R8- (the terminal amino group of the adipic acid dihydrazide that is used as a linker; paragraph [0058]), R7 and R8 is hydrogen (two hydrogen atoms are attached to the nitrogen atom of the terminal amino group of the adipic acid dihydrazide that is used as a linker; paragraph [0058]). It would have been obvious to a person of ordinary skill in the art, at the time of the invention, to have modified the structure, as previously disclosed by Wynn, in order to have provided for wherein R3 is -C0 alkylene-NR7R8-, R7 and R8 is hydrogen, as previously disclosed by BIOTECH (BIOTECH; paragraph [0058]), for replacing one of the amido groups of the methanetricarboxamide with hydrazide moiety to adjust the properties of the compounds synthesized using the methanetricarboxamide as a linking group in manufacturing agents for medical diagnostics (Wynn; abstract; paragraphs [0123], [0127]). Further, provided that Wynn and BIOTECH both disclose the use of the polyhydrazides or polyamides as linking groups in manufacturing agents for medical diagnostics (Wynn; abstract; paragraphs [0123], [0127]) (BIOTECH; paragraph [0058], [0100]), the modification to Wynn's structure, of providing for wherein R3 is -C0 alkylene-NR7R8-, R7 and R8 is hydrogen, would provide the benefit of replacing one of the amido groups of the methanetricarboxamide with hydrazide moiety to adjust the properties of the compounds synthesized using the methanetricarboxamide as a linking group in manufacturing agents for medical diagnostics (Wynn; abstract; paragraphs [0123], [0127]).

Since none of the special technical features of the Groups I+ inventions is found in more than one of the inventions, and since all of the shared technical features are previously disclosed by the Wynn and BIOTECH references, unity of invention is lacking.

Group II+, claims 24-30, 32-33 disclose the compounds of Formula II*, wherein each of R1 and R2 is hydrogen, each of X, Y, and Z is -C(=O)NR4, R3 is hydrogen, each of R4 is hydrogen, each of a and b is 1, m is (compound structure).

The agents can be searched to the extent they encompass an agent having the structure of Formula II*, wherein each of R1 and R2 is hydrogen, each of X, Y, and Z is -C(=O)NR4, R3 is hydrogen, each of R4 is hydrogen, each of a and b is 1, m is (first exemplary compound structure of Group II+). Applicant is invited to elect additional compounds, with fully specified structure(s) thereof (i.e. no optional or variable residues, atoms, bonds, or substituents), and where available as an option within at least one searchable claim, to be searched. Additional agent(s) can be searched upon the payment of additional fees. It is believed that claim 24 encompasses this first named invention of Groups II+ and thus this claims can be searched with payment of a fee for the search of Groups II+, to the extent that they encompass an agent having the structure of Formula II*, wherein each of R1 and R2 is hydrogen, each of X, Y, and Z is -C(=O)NR4, R3 is hydrogen, each of R4 is hydrogen, each of a and b is 1, m is (compound structure).

-***-Continued Within the Next Supplemental Box-***-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US21/50511

-***-Continued from previous Supplemental Box-***-

Applicants must specify the searchable claims that encompass any additionally elected agent(s). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention of Groups II+, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) can result in only the first claimed invention of groups II+ to be searched/examined. An exemplary election would be an agent having the structure of Formula II*, wherein each of R1 and R2 is hydrogen, each of X, Y, and Z is -C(=O)NR4, R3 is hydrogen, each of R4 is hydrogen, each of a and b is 1, m is (compound structure).

Groups II+ share the technical features including compounds of Formula II* having tertiary amine core.

However, these shared technical features are previously disclosed by The publication entitled "Conformational Analysis and the Binding Sites of Nitrotriacetamide: A Computational Study" by SINGH, et al. (hereinafter "SINGH"). SINGH discloses an amino lipid having a structure of Formula II*, as shown (formula nitrotriacetamide; abstract; page 1431, scheme 1) wherein each of R1 and R2 is hydrogen (the hydrogen atoms are attached to the nitrogen atoms of the first and the second amido groups of nitrotriacetamide; abstract; page 1431, scheme 1), each of X, Y, and Z is -C(=O)NR4 (three amido groups are in the nitrotriacetamide; abstract; page 1431, scheme 1), R3 is hydrogen (the hydrogen atom is attached to the nitrogen atom of the third amido group of nitrotriacetamide; abstract; page 1431, scheme 1), each of R4 is hydrogen (the second hydrogen atoms are attached to each of three amido groups are in the nitrotriacetamide; abstract; page 1431, scheme 1), each of a and b is 1 (the first and the second amido groups are linked to the tertiary nitrogen core through the methylene bridges in nitrotriacetamide; abstract; page 1431, scheme 1), m is 1 (the third amido group is linked to the tertiary nitrogen core through the methylene bridge in nitrotriacetamide; abstract; page 1431, scheme 1).

Since none of the special technical features of the Groups II+ inventions is found in more than one of the inventions, and since all of the shared technical features are previously disclosed by the SINGH reference, unity of invention is lacking.

No technical features are shared between the inhibitors of Groups I+ and Group II+, accordingly, these groups lack unity a priori.

The common technical features of Groups I+, II+ and III include an amino lipid.

However, these common technical features are disclosed by US 2015/0050295 A9 (AXOLABS GMBH) (hereinafter "AXOLABS"). AXOLABS discloses an amino lipid (amino-lipids significantly enhance the intracellular delivery of nucleic acids into hepatocytes, siRNA in sodium citrate buffer was combined with amino-lipid solution to produce siRNA lipid nanoparticles; abstract; paragraphs [0011], [0101], [0190]-[0191]).

Since the common technical features are previously disclosed by AXOLABS, these common features are not special and so Groups I+, II+ and III lack unity.

-***-Continued From Item 4 -***-

Claims 15-22,31-34,38-69,71-73,75-93,97-104,107-132,135-136,142-143 are unsearchable

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 9/51 (2006.01)	A 6 1 K 9/51	
A 6 1 K 9/127(2006.01)	A 6 1 K 9/127	
A 6 1 K 47/18 (2017.01)	A 6 1 K 47/18	
A 6 1 K 47/22 (2006.01)	A 6 1 K 47/22	
A 6 1 K 47/28 (2006.01)	A 6 1 K 47/28	
A 6 1 K 47/24 (2006.01)	A 6 1 K 47/24	
A 6 1 K 47/10 (2017.01)	A 6 1 K 47/10	
A 6 1 K 47/36 (2006.01)	A 6 1 K 47/36	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 5
A 6 1 K 31/7105(2006.01)	A 6 1 K 31/7105	
A 6 1 K 31/713 (2006.01)	A 6 1 K 31/713	
A 6 1 K 31/7088(2006.01)	A 6 1 K 31/7088	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/09	Z
C 0 7 C 271/22 (2006.01)	C 0 7 C 271/22	
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	C 1 2 N 15/113	Z

,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,D
K,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),O
A(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,B
B,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD
,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,
LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,
RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,Z
W

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T R I T O N

アメリカ合衆国マサチューセッツ州0 2 1 3 9 , ケンブリッジ, テクノロジー・スクエア 5 0 0
, スイート 9 0 1

(72)発明者 ビスワス, スービク

アメリカ合衆国マサチューセッツ州0 2 1 3 9 , ケンブリッジ, テクノロジー・スクエア 5 0 0
, スイート 9 0 1

(72)発明者 マリャラ, パドマ

アメリカ合衆国マサチューセッツ州0 2 1 3 9 , ケンブリッジ, テクノロジー・スクエア 5 0 0
, スイート 9 0 1

(72)発明者 カシエビッチ, リサ・エヌ

アメリカ合衆国マサチューセッツ州0 2 1 3 9 , ケンブリッジ, テクノロジー・スクエア 5 0 0
, スイート 9 0 1

(72)発明者 ビーチ, アーロン

アメリカ合衆国マサチューセッツ州0 2 1 3 9 , ケンブリッジ, テクノロジー・スクエア 5 0 0
, スイート 9 0 1

(72)発明者 コレース, トーマス・ブイ

アメリカ合衆国マサチューセッツ州0 2 1 3 9 , ケンブリッジ, テクノロジー・スクエア 5 0 0
, スイート 9 0 1

F ターム (参考) 4C076 AA19 AA29 AA65 AA95 BB11 CC29 DD37 DD37F DD49 DD49Q
DD51 DD51S DD63 DD70 EE23 EE23Q EE37 EE37Q FF43 FF51 FF63
GG41
4C084 AA13 MA05 MA24 MA38 MA41 MA43 MA66 NA13 ZB211 ZB212
4C086 AA01 AA02 EA16 MA03 MA05 MA24 MA38 MA41 MA43 MA66
NA13 ZB21

F ターム (参考)

1

4C091 AA01 BB06 CC01 DD01 EE05 FF01 GG01 HH01 JJ03 KK01
LL01 MM03 NN01 PA02 PA05 PB05 QQ01 RR08
4H006 AA01 AA03 AB20 RA16 RB04