

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-524357
(P2017-524357A)

(43) 公表日 平成29年8月31日(2017.8.31)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 H O 4 5
C O 7 K 14/00 (2006.01)	C O 7 K 14/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 301 頁)

(21) 出願番号 特願2017-502674 (P2017-502674)
 (86) (22) 出願日 平成27年7月16日 (2015. 7. 16)
 (85) 翻訳文提出日 平成29年3月15日 (2017. 3. 15)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2015/040699
 (87) 国際公開番号 W02016/011226
 (87) 国際公開日 平成28年1月21日 (2016. 1. 21)
 (31) 優先権主張番号 62/025, 399
 (32) 優先日 平成26年7月16日 (2014. 7. 16)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 62/045, 359
 (32) 優先日 平成26年9月3日 (2014. 9. 3)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 513084469
 モデルナティエックス インコーポレイテッド
 ModernaTX, Inc.
 アメリカ合衆国 02141 マサチューセッツ州 ケンブリッジ ペント ストリート 320
 (74) 代理人 100105957
 弁理士 恩田 誠
 (74) 代理人 100068755
 弁理士 恩田 博宣
 (74) 代理人 100142907
 弁理士 本田 淳
 (74) 代理人 100152489
 弁理士 中村 美樹

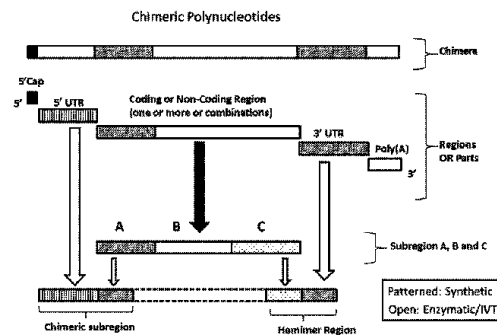
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 キメラポリヌクレオチド

(57) 【要約】

本発明は、キメラポリヌクレオチド分子の組成物、並びにその調製、製造及び治療的使用の方法に関し、これらは、化学修飾の配置、位置及びロード率のカスタマイズを可能にすることによって、ポリヌクレオチドの特定の物理化学的及び薬学的特性を改善、改変又は最適化する。1つの非制限的实施形態では、こうしたキメラポリヌクレオチドは、目的のポリペプチドをコードする修飾mRNAとしての形態をしているか、又は目的のポリペプチドをコードする修飾mRNAとして機能する。一実施形態では、上記のキメラポリヌクレオチドは、実質的に非コードである。

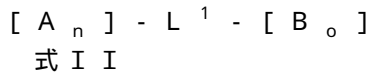
FIGURE 2



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ポリペプチドをコードするキメラポリヌクレオチドであって、ここで、前記キメラポリヌクレオチドは、式 I I :



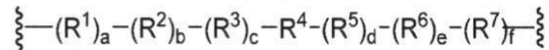
を含む配列を有し、

式中、A 及び B は各々、独立に、いずれかのヌクレオチドを含み；

n 及び o は、独立に、10 ~ 10, 000 であり；ここで、[A_n] 又は [B_{o.}] は、独立に、mRNA を含み、前記 mRNA は、5' 非翻訳領域 (UTR)、3' UTR 及びコード領域を含み；

L¹ は、式 I I I :

【化 1】



式 III

の構造を有し、

式中、a、b、c、d、e、及び f は各々、独立に、0 又は 1 であり；

R¹、R³、R⁵、及び R⁷ の各々は、独立に、任意選択で置換された C₁ ~ C₆ アルキレン、任意選択で置換された C₁ ~ C₆ ヘテロアルキレン、O、S、及び NR⁸ から選択され；

R² 及び R⁶ は各々、独立に、カルボニル、チオカルボニル、スルホニル、又はホスホリルから選択され；

R⁴ は、任意選択で置換された C₁ ~ C₁₀ アルキレン、任意選択で置換された C₂ ~ C₁₀ アルケニレン、任意選択で置換された C₂ ~ C₁₀ アルキニレン、任意選択で置換された C₂ ~ C₉ ヘテロシクリレン、任意選択で置換された C₆ ~ C₁₂ アリーレン、任意選択で置換された C₂ ~ C₁₀₀ ポリエチレングリコレン、若しくは任意選択で置換された C₁ ~ C₁₀ ヘテロアルキレン、又は (R¹)_a - (R²)_b - (R³)_c を (R⁵)_d - (R⁶)_e - (R⁷)_f に連結する結合であり、ここで、a、b、c、d、e、及び f が 0 であるとき、R⁴ は、結合ではなく；

R⁸ は、水素、任意選択で置換された C₁ ~ C₄ アルキル、任意選択で置換された C₂ ~ C₄ アルケニル、任意選択で置換された C₂ ~ C₄ アルキニル、任意選択で置換された C₂ ~ C₆ ヘテロシクリル、任意選択で置換された C₆ ~ C₁₂ アリール、又は任意選択で置換された C₁ ~ C₇ ヘテロアルキルであり；

L¹ は、前記ヌクレオチドのうちの 1 つの糖の [A_n] 及び [B_{o.}] に結合されている、キメラポリヌクレオチド。

【請求項 2】

[A_n] 及び [B_{o.}] の少なくとも 1 つが、式 I V 又は式 X V I I I :

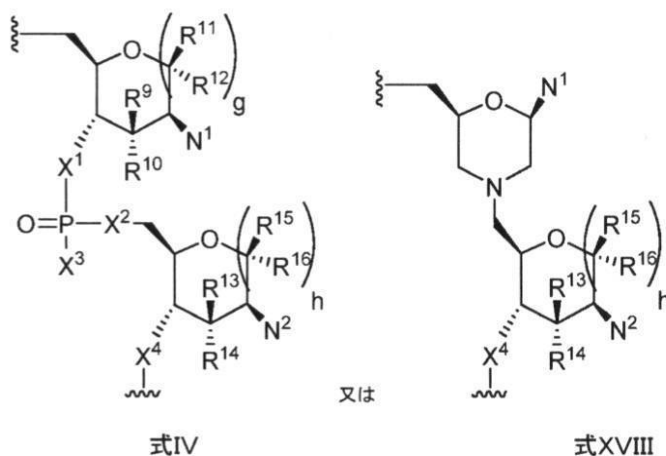
10

20

30

40

【化2】



10

の構造を含み、

式中、N¹及びN²の各々は、独立に、核酸塩基であり；

R⁹、R¹⁰、R¹¹、R¹²、R¹³、R¹⁴、R¹⁵、及びR¹⁶の各々は、独立に、H、ハロ、ヒドロキシ、チオール、任意選択で置換されたC₁~C₆アルキル、任意選択で置換されたC₁~C₆ヘテロアルキル、任意選択で置換されたC₂~C₆ヘテロアルケニル、任意選択で置換されたC₂~C₆ヘテロアルキニル、任意選択で置換されたアミノ、アジド、又は任意選択で置換されたC₆~C₁₀アリールであり；

20

g及びhの各々は、独立に、0又は1であり；

X¹及びX⁴は各々、独立に、O、NH、又はSであり；

各X²は、独立に、O、NH、又はSであり；

各X³は、OH若しくはSH、又はその塩である、

請求項1に記載のキメラポリヌクレオチド。

【請求項3】

hが、0であり；R¹³が、Hであり；R¹⁴が、任意選択で置換されたC₁~C₆ヘテロアルキルである、請求項2に記載のキメラポリヌクレオチド。

30

【請求項4】

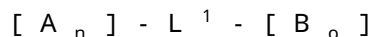
前記任意選択で置換されたC₁~C₆ヘテロアルキルが、メトキシである、請求項3に記載のキメラポリヌクレオチド。

【請求項5】

X³が、SHである、請求項2~4のいずれか1項に記載のキメラポリヌクレオチド。

【請求項6】

ポリペプチドをコードするキメラポリヌクレオチドであって、前記キメラポリヌクレオチドは、式II：



式II

40

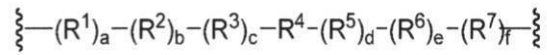
を含む配列を有し、

式中、A及びBは各々、独立に、いずれかのヌクレオチドを含み；

n及びoは、独立に、10~10、000であり、ここで、[A_n]又は[B_o]は、独立にmRNAを含み、前記mRNAは、5'非翻訳領域(UTR)、3'UTR及びコード領域を含み；

L¹は、結合であるか、又は式III：

【化 3】



式III

の構造を有し、

式中、a、b、c、d、e、及びfは各々、独立に、0又は1であり；

R¹、R³、R⁵、及びR⁷の各々は、独立に、任意選択で置換されたC₁～C₆アルキレン、任意選択で置換されたC₁～C₆ヘテロアルキレン、O、S、及びNR⁸から選択され； 10

R²及びR⁶は各々、独立に、カルボニル、チオカルボニル、スルホニル、又はホスホリルから選択され；

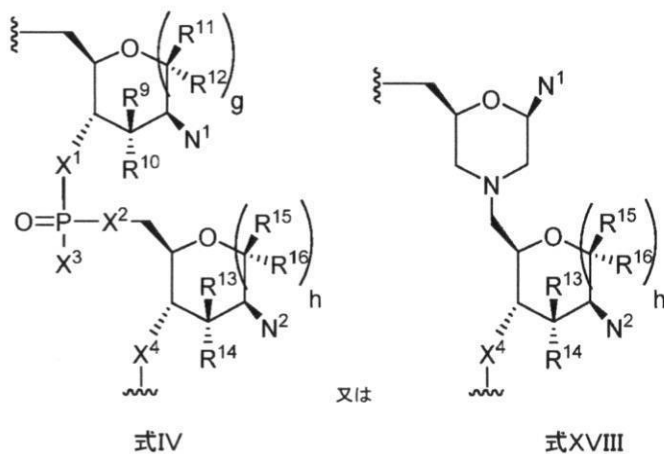
R⁴は、任意選択で置換されたC₁～C₁₀アルキレン、任意選択で置換されたC₂～C₁₀アルケニレン、任意選択で置換されたC₂～C₁₀アルキニレン、任意選択で置換されたC₂～C₉ヘテロシクリレン、任意選択で置換されたC₆～C₁₂アリーレン、任意選択で置換されたC₂～C₁₀₀ポリエチレングリコレン、又は任意選択で置換されたC₁～C₁₀ヘテロアルキレン、又は(R¹)_a-(R²)_b-(R³)_cを(R⁵)_d-(R⁶)_e-(R⁷)_fに連結する結合であり；

R⁸は、水素、任意選択で置換されたC₁～C₄アルキル、任意選択で置換されたC₂～C₄アルケニル、任意選択で置換されたC₂～C₄アルキニル、任意選択で置換されたC₂～C₆ヘテロシクリル、任意選択で置換されたC₆～C₁₂アリール、又は任意選択で置換されたC₁～C₇ヘテロアルキルであり； 20

L¹は、前記ヌクレオシドのうちの一つの糖の[A_n]及び[B_o]に結合され；

ここで、[A_n]又は[B_o]の少なくとも一つは、式IV又は式XVIII；

【化 4】



式IV

式XVIII

の構造を含み、

式中、N¹及びN²の各々は、独立に、核酸塩基であり；

R⁹、R¹⁰、R¹¹、R¹²、R¹³、R¹⁴、R¹⁵、及びR¹⁶の各々は、独立に、H、ハロ、ヒドロキシ、チオール、任意選択で置換されたC₁～C₆アルキル、任意選択で置換されたC₁～C₆ヘテロアルキル、任意選択で置換されたC₂～C₆ヘテロアルケニル、任意選択で置換されたC₂～C₆ヘテロアルキニル、任意選択で置換されたアミノ、アジド、又は任意選択で置換されたC₆～C₁₀アリールであり；

g及びhの各々は、独立に、0又は1であり；

X¹及びX⁴は各々、独立に、O、NH、又はSであり；

各X²は、独立に、O、NH、又はSであり；

各 X^3 は、OH 若しくは SH、又はその塩であり；

ここで、式 I V について、 X^1 、 X^2 、若しくは X^4 の少なくとも 1 つは、NH 又は S である、キメラポリヌクレオチド。

【請求項 7】

X^1 が、NH である、請求項 6 に記載のキメラポリヌクレオチド。

【請求項 8】

X^4 が、NH である、請求項 6 又は 7 に記載のキメラポリヌクレオチド。

【請求項 9】

X^2 が、S である、請求項 6 に記載のキメラポリヌクレオチド。

【請求項 10】

少なくとも 1 つの 5' キャップ構造をさらに含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載のキメラポリヌクレオチド。

【請求項 11】

ポリ-A-テイルをさらに含む、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載のキメラポリヌクレオチド。

【請求項 12】

前記コード領域、前記 5' UTR、前記 3' UTR、前記 5' キャップ構造、又は前記ポリ-A-テイルの 1 つが、式 I I : $[A_n] - L^1 - [B_0]$ を含む、請求項 1 又は 11 のいずれか 1 項に記載のキメラポリヌクレオチド。

【請求項 13】

前記コード領域、前記 5' UTR、前記 3' UTR、前記 5' キャップ構造、又は前記ポリ-A-テイルの 1 つが、 $[A_n]$ を含み、前記コード領域、前記 5' UTR、前記 3' UTR、前記 5' キャップ構造、又は前記ポリ-A-テイルのもう 1 つが、 $[B_0]$ を含む、請求項 1 又は 11 のいずれか 1 項に記載のキメラポリヌクレオチド。

【請求項 14】

前記 5' UTR が、少なくとも 1 つのコザック (Kozak) 配列を含む、請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載のキメラポリヌクレオチド。

【請求項 15】

前記キメラポリヌクレオチドが、少なくとも 1 つの修飾ヌクレオシドを含む、請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載のキメラポリヌクレオチド。

【請求項 16】

前記少なくとも 1 つの修飾ヌクレオシドが、表 2 のヌクレオチドである、請求項 15 に記載のキメラポリヌクレオチド。

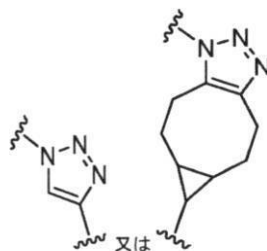
【請求項 17】

R^4 が、任意選択で置換された $C_2 \sim C_9$ ヘテロシリレンである、請求項 1 ~ 16 のいずれか 1 項に記載のキメラポリヌクレオチド。

【請求項 18】

前記任意選択で置換された $C_2 \sim C_9$ ヘテロシリレンが、以下の構造：

【化 5】



を有する、請求項 17 に記載のキメラポリヌクレオチド。

【請求項 19】

L^1 が、以下の構造：

10

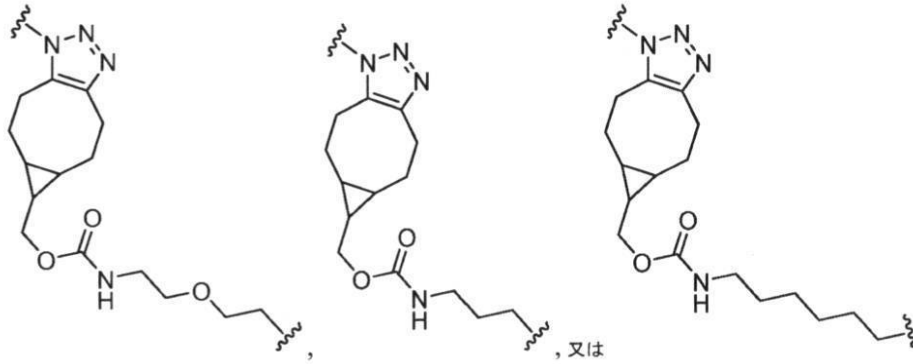
20

30

40

50

【化6】



10

を含む、請求項18に記載のキメラポリヌクレオチド。

【請求項20】

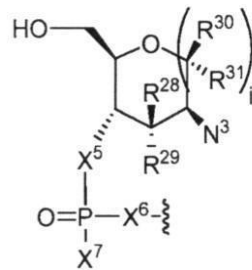
L^1 が、前記ヌクレオシドのうちの1つの糖の3'位又は4'位で $[A_n]$ に結合すると共に、前記ヌクレオシドのうちの1つの糖の5'位又は6'位で $[B_0]$ に結合する、請求項1~19のいずれか1項に記載のキメラポリヌクレオチド。

【請求項21】

ポリ-Aテイルが、式XXI:

【化7】

20



式XXI

30

の構造で終結し、

式中、 N^3 は、核酸塩基であり

R^{28} 、 R^{29} 、 R^{30} 、及び R^{31} の各々は、独立に、H、ハロ、ヒドロキシ、チオール、任意選択で置換された $C_1 \sim C_6$ アルキル、任意選択で置換された $C_1 \sim C_6$ ヘテロアルキル、任意選択で置換された $C_2 \sim C_6$ ヘテロアルケニル、任意選択で置換された $C_2 \sim C_6$ ヘテロアルキニル、任意選択で置換されたアミノ、アジド、又は任意選択で置換された $C_6 \sim C_{10}$ アリールであり；

i は、0又は1であり；

X^5 は、O、NH、又はSであり；

X^6 は、O又はSであり；

X^7 は、OH若しくはSH、又はその塩である、

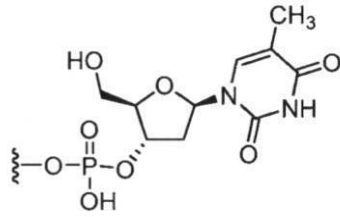
40

請求項8~20のいずれか1項に記載のキメラポリヌクレオチド。

【請求項22】

前記式XXIの構造が、

【化 8】



である、請求項 2 1 に記載のキメラポリヌクレオチド。

10

【請求項 2 3】

前記ポリ - A テイルが、40 ~ 80 個のヌクレオチドを有する、請求項 2 2 に記載のキメラポリヌクレオチド。

【請求項 2 4】

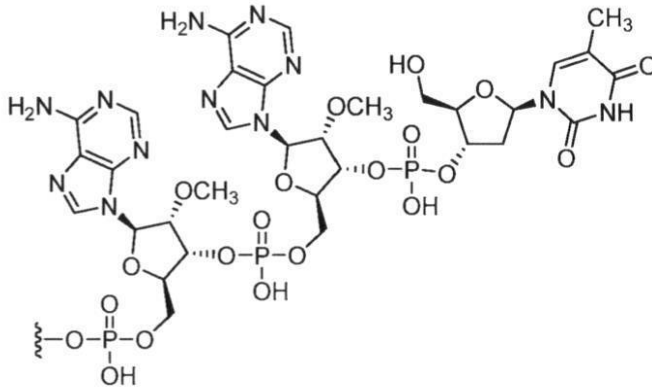
前記式 X X I の構造が、2 ~ 4 つの 2' - メトキシ - アデノシン及び / 又は 2' - フルオロ - アデノシンに結合する、請求項 2 1 ~ 2 3 のいずれか 1 項に記載のキメラポリヌクレオチド。

【請求項 2 5】

前記ポリ - A テイルが、以下の構造：

【化 9】

20



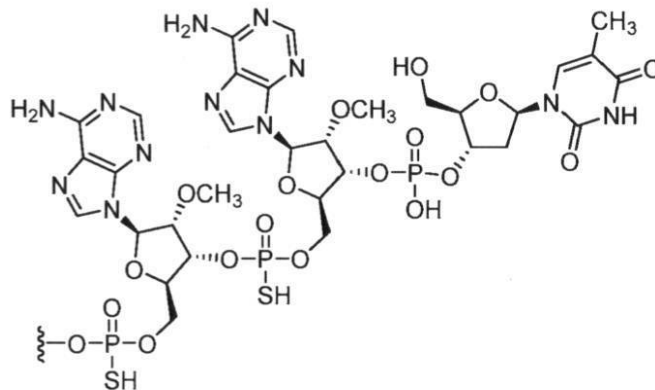
30

で終結する、請求項 2 1 ~ 2 4 のいずれか 1 項に記載のキメラポリヌクレオチド。

【請求項 2 6】

前記ポリ - A テイルが、以下の構造：

【化 10】



40

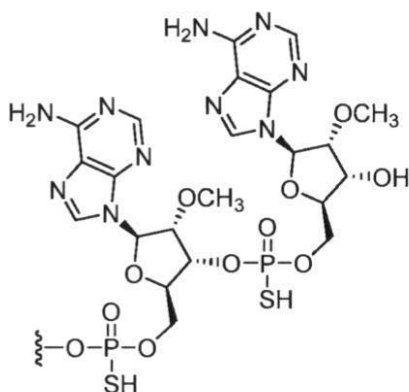
で終結する、請求項 2 1 ~ 2 4 のいずれか 1 項に記載のキメラポリヌクレオチド。

50

【請求項 27】

前記ポリ - A テイルが、以下の構造：

【化 11】



10

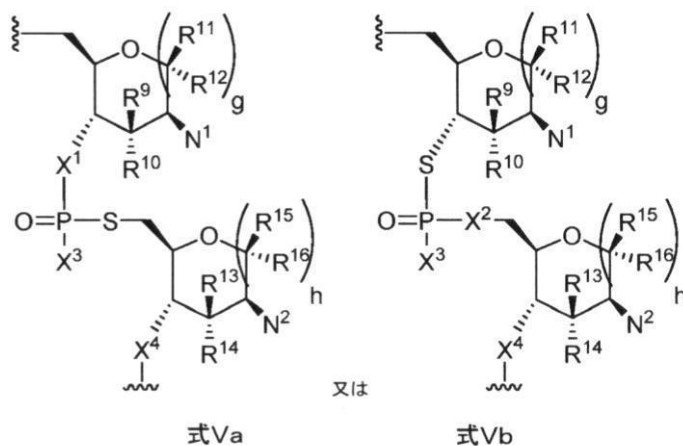
を含む、請求項 8 ~ 21 のいずれか 1 項に記載のキメラポリヌクレオチド。

【請求項 28】

ポリペプチドをコードするキメラポリヌクレオチドを含む組成物を生成する方法であって、ここで、前記キメラポリヌクレオチドは、式 Va 又は Vb :

【化 12】

20

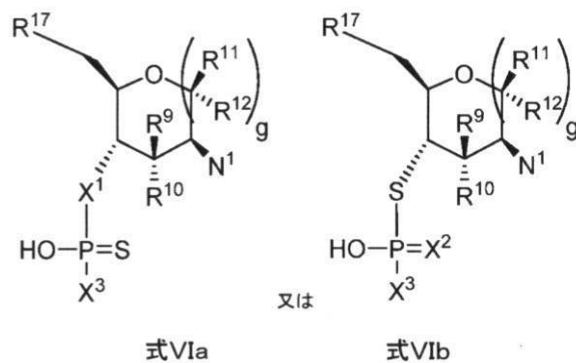


30

の構造を有し、

前記方法が、式 VI a 又は VI b :

【化 13】



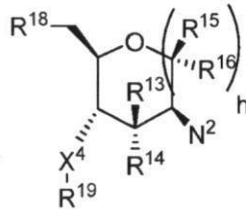
40

の構造を有する化合物と、

式 VII :

50

【化 1 4】



式VII

(式中、 N^1 及び N^2 の各々は、独立に、核酸塩基であり；

10

R^9 、 R^{10} 、 R^{11} 、 R^{12} 、 R^{13} 、 R^{14} 、 R^{15} 、及び R^{16} の各々は、独立に、H、ハロ、ヒドロキシ、チオール、任意選択で置換された $C_1 \sim C_6$ アルキル、任意選択で置換された $C_1 \sim C_6$ ヘテロアルキル、任意選択で置換された $C_2 \sim C_6$ ヘテロアルケニル、任意選択で置換された $C_2 \sim C_6$ ヘテロアルキニル、任意選択で置換されたアミノ、アジド、又は任意選択で置換された $C_6 \sim C_{10}$ アリールであり；

g 及び h の各々は、独立に、0 又は 1 であり；

X^1 及び X^4 は各々、独立に、O、NH、又は S であり；

各 X^2 は、独立に、O 又は S であり；

各 X^3 は、独立に、OH 若しくは SH、又はその塩であり；

R^{17} 及び R^{19} の各々は、独立に、連結ヌクレオシドの 1 領域であり；

20

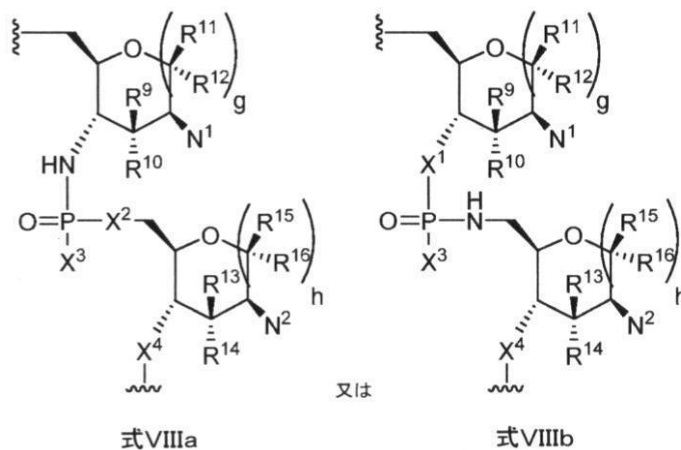
R^{18} は、ハロゲンである)

の構造を有する化合物を反応させて、ポリペプチドをコードするキメラポリヌクレオチドを含む組成物を生成するステップを含み、ここで、前記キメラポリヌクレオチドは、式 V a 又は V b の構造を含む、方法。

【請求項 2 9】

ポリペプチドをコードするキメラポリヌクレオチドを含む組成物を生成する方法であって、ここで、前記キメラポリヌクレオチドは、式 V I I I a 又は V I I I b：

【化 1 5】



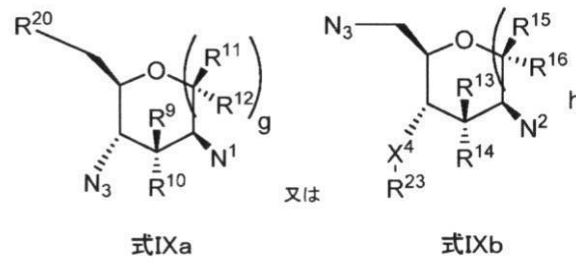
30

40

の構造を有し、

前記方法が、式 I X a 又は I X b：

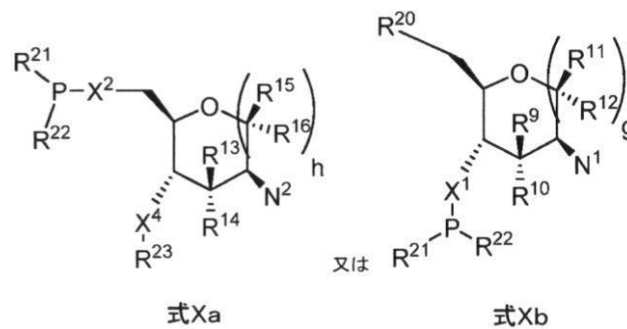
【化16】



10

の構造を有する化合物と、
式X a又はX b：

【化17】



20

の構造を有する化合物

(式中、 N^1 及び N^2 の各々は、独立に、核酸塩基であり；
 R^9 、 R^{10} 、 R^{11} 、 R^{12} 、 R^{13} 、 R^{14} 、 R^{15} 、及び R^{16} の各々は、独立に、H、ハロ、ヒドロキシ、チオール、任意選択で置換された $C_1 \sim C_6$ アルキル、任意選択で置換された $C_1 \sim C_6$ ヘテロアルキル、任意選択で置換された $C_2 \sim C_6$ ヘテロアルケニル、任意選択で置換された $C_2 \sim C_6$ ヘテロアルキニル、任意選択で置換されたアミノ、アジド、又は任意選択で置換された $C_6 \sim C_{10}$ アリールであり；
 g 及び h の各々は、独立に、0又は1であり；
各 X^4 は、独立に、O、NH、又はSであり；
 X^1 及び X^2 は各々、独立に、O又はSであり；
各 X^3 は、独立に、OH、SH、又はその塩であり；
 R^{20} 及び R^{23} の各々は、独立に、連結ヌクレオシドの1領域であり；
 R^{21} 及び R^{22} の各々は、独立に、任意選択で置換された $C_1 \sim C_6$ アルコキシである)

30

を反応させることにより、ポリペプチドをコードするキメラポリヌクレオチドを含む組成物を生成するステップを含み、ここで、前記キメラポリヌクレオチドは、式VII Ia又はVII Ibの構造を含む、方法。

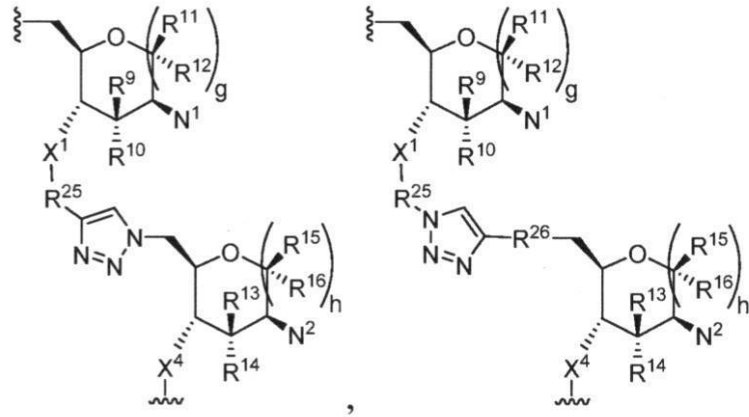
40

【請求項30】

ポリペプチドをコードするキメラポリヌクレオチドを含む組成物を生成する方法であって、ここで、前記キメラポリヌクレオチドは、式XI a、XI b、XII a又はXII b：

：

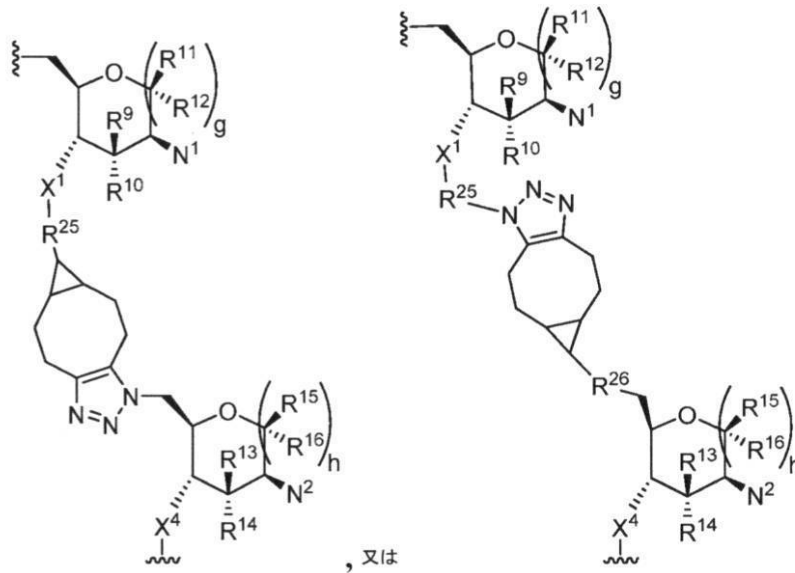
【化 1 8】



式XIa

式XIb

10



式XIIa

式XIIb

20

30

の構造を含み、
 前記方法が、
 式XIIIa、XIIIb、XIVa、又はXIVb：

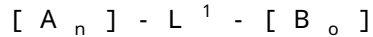
$R^{2,4}$ 及び $R^{2,7}$ の各々は、独立に、連結ヌクレオシドの 1 領域であり；

$R^{2,5}$ 、 $R^{2,5'}$ 、 $R^{2,6}$ 、及び $R^{2,6'}$ の各々は、独立に、非存在、任意選択で置換された $C_1 \sim C_6$ アルキレン又は任意選択で置換された $C_1 \sim C_6$ ヘテロアルキレンであるか、あるいは、 $R^{2,6}$ 又は $R^{2,6'}$ とアルキニル基は、一緒に、任意選択で置換されたシクロアルキニルを形成する)

を反応させることにより、ポリペプチドをコードするキメラポリヌクレオチドを含む組成物を生成するステップを含み、ここで、前記キメラポリヌクレオチドは、式 X I a、X I b、X I I a、又は X I I b の構造を含む、方法。

【請求項 3 1】

ポリペプチドをコードするキメラポリヌクレオチドを含む組成物を生成する方法であって、ここで、前記キメラポリヌクレオチドは、式 I I :



式 I I

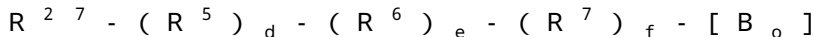
を含む配列を有し、

前記方法が、式 X V I :



式 X V I

の構造を有する化合物と、式 X V :



式 X V I I

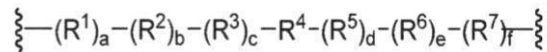
の構造を有する化合物

(式中、A 及び B は各々、独立に、いずれかのヌクレオシドを含み；

n 及び o は、独立に、1 0 ~ 1 0 , 0 0 0 であり；

L^1 は、式 I I I :

【化 2 1】



式 III

の構造を有し、

式中、a、b、c、d、e、及び f は各々、独立に、0 又は 1 であり；

R^1 、 R^3 、 R^5 、及び R^7 は各々、独立に、任意選択で置換された $C_1 \sim C_6$ アルキレン、任意選択で置換された $C_1 \sim C_6$ ヘテロアルキレン、O、S、及び NR⁸ から選択され；

R^2 及び R^6 は各々、独立に、カルボニル、チオカルボニル、スルホニル、又はホスホリルから選択され；

R^4 は、任意選択で置換されたトリアゾレンであり；

R^8 は、水素、任意選択で置換された $C_1 \sim C_4$ アルキル、任意選択で置換された $C_3 \sim C_4$ アルケニル、任意選択で置換された $C_2 \sim C_4$ アルキニル、任意選択で置換された $C_2 \sim C_6$ ヘテロシクリル、任意選択で置換された $C_6 \sim C_{1,2}$ アリール、又は任意選択で置換された $C_1 \sim C_7$ ヘテロアルキルであり；並びに

$R^{2,7}$ は、任意選択で置換された $C_2 \sim C_3$ アルキニル又は任意選択で置換された $C_8 \sim C_{1,2}$ シクロアルキニルであり、

ここで、 L^1 は、前記ヌクレオシドのうちの 1 つの糖の $[A_n]$ 及び $[B_o]$ に結合する)

を反応させることにより、ポリペプチドをコードするキメラポリヌクレオチドを含む組成物を生成するステップを含み、ここで、前記キメラポリヌクレオチドは、式 I I の配列を有する、方法。

【請求項 3 2】

10

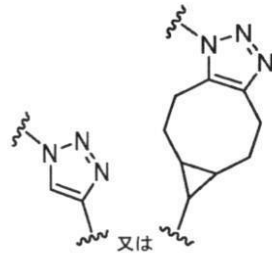
20

30

40

50

前記任意選択で置換されたトリアゾレンが、以下の構造：
【化 2 2】



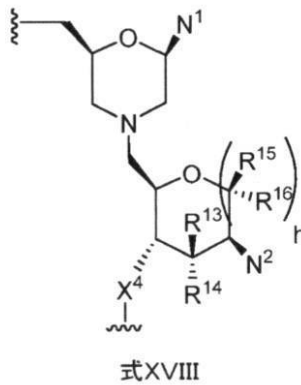
10

を有する、請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 3】

ポリペプチドをコードするキメラポリヌクレオチドを含む組成物を生成する方法であって、ここで、前記キメラポリヌクレオチドが、式 X V I I I :

【化 2 3】



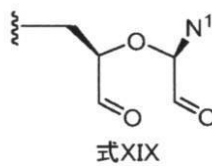
20

の構造を有し、

前記方法が、式 X I X :

30

【化 2 4】

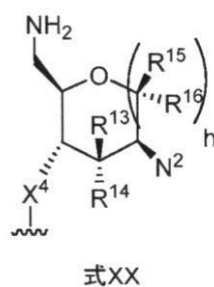


の構造を有する化合物と、

式 X X :

40

【化 2 5】



の構造を有する化合物

50

(式中、 N^1 及び N^2 の各々は、独立に、核酸塩基であり；

R^{13} 、 R^{14} 、 R^{15} 、及び R^{16} の各々は、独立に、H、ハロ、ヒドロキシ、チオール、任意選択で置換された $C_1 \sim C_6$ アルキル、任意選択で置換された $C_1 \sim C_6$ ヘテロアルキル、任意選択で置換された $C_2 \sim C_6$ ヘテロアルケニル、任意選択で置換された $C_2 \sim C_6$ ヘテロアルキニル、任意選択で置換されたアミノ、アジド、又は任意選択で置換された $C_6 \sim C_{10}$ アリールであり；

h は、0 又は 1 であり；並びに

X^4 は、O、NH、又は S である）

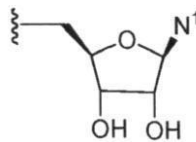
を反応させることにより、ポリペプチドをコードするキメラポリヌクレオチドを含む組成物を生成するステップを含み、ここで、前記キメラポリヌクレオチドが、式 X V I I I の構造を含む、方法。

10

【請求項 3 4】

式 X X I :

【化 2 6】



20

の化合物から式 X I X の化合物を生成するステップをさらに含む、請求項 3 3 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、キメラポリヌクレオチドの設計、調製、製造及び / 又は製剤化のための組成物、方法、製法、キット及び装置に関する。

【背景技術】

【0002】

1990年代初めに、ブルーム (Bloom) 及び共同研究者らは、*in vitro* 転写バソプレシン mRNA を視床下部に注入することによってバソプレシン欠乏ラットをレスキューすることに成功した (非特許文献 1)。しかしながら、翻訳レベルの低さ及び分子の免疫原性のために、治療薬としての mRNA の開発が阻まれ、それ以来、逆にこれらの落とし穴を利用し得る代替的用途、すなわち、癌抗原をコードする mRNA による免疫化に向けて努力が注がれている。

30

【0003】

さらに近年では、他の研究者らによって、mRNA を用いた目的のポリペプチドをコードする構築物の送達研究が研究され、mRNA 分子の特定の化学修飾、特に、プソイドウリジン及び 5 - メチル - シトシンが免疫刺激作用を低下させたことが明らかにされている。

【0004】

これらの研究は、例えば、リボステム社 (Ribostem Limited) の 2003 年 7 月 9 日出願され、現在は放棄されている英国特許出願 (特許文献 1)、(特許文献 2) として公開されている 2004 年 7 月 9 日出願の PCT 出願 PCT / GB 2004 / 002981 号、(特許文献 3) として公開され、現在は放棄されている 2006 年 6 月 8 日出願の米国特許出願国内段階 10 / 563, 897 号、及び (特許文献 4) として公開され、現在撤回されている 2004 年 7 月 9 日出願の欧州特許出願国内段階第 EP 2004743322 号；ノボザイムズ社 (Novozymes, Inc.) の (特許文献 5) として公開された 2007 年 12 月 19 日出願の PCT 出願 PCT / US 2007 / 88060 号)、(特許文献 6) として公開された 2009 年 7 月 2 日出願の米国特許出願国内段階第 12 / 520, 072 号、及び (特許文献 7) として公開された 2009

40

50

年7月7日出願の欧州特許出願国内段階第EP2007874376号；ロチェスター大学（University of Rochester）の（特許文献8）として公開された2006年12月4日出願のPCT出願PCT/US2006/46120号、及び（特許文献9）として公開された2006年12月1日出願の米国特許出願第11/606,995号；バイオNテックAG（BioNTech AG）の2007年12月14日に出願され、現在は放棄されている欧州特許出願（特許文献10）、（特許文献11）として公開された2008年12月12日出願のPCT出願PCT/EP2008/01059、（特許文献12）として公開された2010年6月2日出願の欧州特許出願国内段階第EP2008861423号、（特許文献13）として公開された2010年11月24日出願の米国特許出願国内段階第12/,735,060号、2005年9月28日出願のドイツ国特許出願（特許文献14）、（特許文献15）として公開された2006年9月28日出願のPCT出願PCT/EP2006/0448号、2012年3月21日公開の国内段階欧州特許（特許文献16）、及び（特許文献17）として公開された2009年8月14日出願の米国特許出願第11/992,638号；イミュン・ディーズ・インスティテュート社（Immune Disease Institute Inc.）の（特許文献18）として公開された2011年4月15日出願の米国特許出願第13/088,009号及び（特許文献19）として公開された2011年4月15日出願のPCT出願PCT/US2011/32679号；シャイア・ヒューマンジェネティック・セラピューティクス（Shire Human Genetic Therapeutics）の（特許文献20）として公開された2010年11月20日出願の米国特許出願第12/957,340号；セクイター社（Sequitur Inc.）の（特許文献21）として公開された1998年9月18日出願のPCT出願PCT/US1998/019492号；スクリップス研究所（The Scripps Research Institute）の（特許文献22）として公開された2010年2月24日出願のPCT出願PCT/US2010/00567号、及び（特許文献23）として公開された2011年11月3日出願の米国特許出願国内段階第13/203,229号；ルートヴィヒ・マクシミリアン大学（Ludwig-Maximilians University）の（特許文献24）として公開された2010年7月30日出願のPCT出願PCT/EP2010/004681号；セルスクリプト社（Cellscript Inc.）の2008年6月30日に出願され、2011年10月18日に付与された米国特許（特許文献25）、（特許文献26）として公開された2010年12月7日出願の米国特許出願第12/962,498号、（特許文献27）として公開された2010年12月7日出願の米国特許出願第12/962,468号、（特許文献28）として公開された2011年9月20日出願の米国特許出願13/237,451号、並びに（特許文献29）として公開された2010年12月7日出願のPCT出願PCT/US2010/59305号、及び（特許文献30）として公開された2010年12月7日出願のPCT/US2010/59317号；ペンシルベニア大学理事会（Trustees of the University of Pennsylvania）の（特許文献31）として公開された2006年8月21日出願のPCT/US2006/32372号、及び（特許文献32）として公開された2009年3月27日出願の米国特許出願国内段階第11/990,646号；キュアバック社（Curevac GmbH）の2001年6月5日出願のドイツ国特許出願（特許文献33）、2001年12月19日出願の（特許文献34）、及び2006年10月31日出願の（特許文献35）（これらは全て放棄されている）、2005年3月30日に付与された欧州特許（特許文献36）、及び2008年1月2日に付与された（特許文献37）、（特許文献38）として公開された2002年6月5日出願のPCT/EP2002/06180号、（特許文献39）として公開された2002年12月19日出願のPCT/EP2002/14577号、（特許文献40）として公開された2007年12月31日出願のPCT/EP2007/09469号、（特許文献41）として公開された2008年4月16日出願のPCT/EP2008/03033号、（特許文献42）として公開された2005年5

月19日出願のPCT/EP2006/004784号、(特許文献43)として公開された2007年1月9日出願のPCT/EP2008/00081号、並びに(特許文献44)として公開された2003年12月5日出願の米国特許出願第10/729,830号、(特許文献45)として公開された2004年6月18日出願の米国特許出願第10/870,110号)、(特許文献46)として公開された2008年7月7日出願の米国特許出願第11/914,945号、(特許文献47)として公開され、現在は放棄されている2009年10月27日出願の米国特許出願第12/446,912号、(特許文献48)として公開された2010年1月4日出願の米国特許出願第12/522,214号、(特許文献49)として公開された2010年5月26日出願の米国特許出願第12/787,566号、(特許文献50)として公開された2010年5月26日出願の米国特許出願第12/787,755号、(特許文献51)として公開された2011年7月18日出願の米国特許出願第13/185,119号、及び(特許文献52)として公開された2011年5月12日出願の米国特許出願第13/106,548号に記載されており、これらは全て、全体として参照により本明細書に組み込むものとする。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】英国特許出願第0316089.2号明細書

【特許文献2】国際公開第2005005622号

【特許文献3】米国特許出願公開第20060247195号明細書

【特許文献4】欧州特許第1646714号明細書

【特許文献5】国際公開第2008140615号

【特許文献6】米国特許出願公開第20100028943号明細書

【特許文献7】欧州特許第2104739号明細書

【特許文献8】国際公開第2007064952号

【特許文献9】米国特許出願公開第20070141030号明細書

【特許文献10】欧州特許出願第2007024312号明細書

【特許文献11】国際公開第2009077134号

【特許文献12】欧州特許第2240572号明細書

【特許文献13】米国特許出願公開第20110065103号明細書

【特許文献14】DE10 2005 046 490号明細書

【特許文献15】国際公開第2007036366号

【特許文献16】欧州特許第1934345号明細書

【特許文献17】米国特許出願公開第20100129877号明細書

【特許文献18】米国特許出願公開第20120046346号明細書

【特許文献19】国際公開第20110130624号

【特許文献20】米国特許出願公開第20110244026号明細書

【特許文献21】国際公開第1999014346号

【特許文献22】国際公開第2010098861号

【特許文献23】米国特許出願公開第20120053333号明細書

【特許文献24】国際公開第2011012316号

【特許文献25】米国特許第8,039,214号明細書

【特許文献26】米国特許出願公開第20110143436号明細書

【特許文献27】米国特許出願公開第20110143397号明細書

【特許文献28】米国特許出願公開第20120009649号明細書

【特許文献29】国際公開第2011071931号

【特許文献30】国際公開第2011071936号明細書

【特許文献31】国際公開第2007024708号

【特許文献32】米国特許出願公開第20090286852号明細書

【特許文献33】DE10 2001 027 283.9号明細書

10

20

30

40

50

【特許文献34】DE10 2001 062 480.8号明細書

【特許文献35】DE20 2006 051 516号明細書

【特許文献36】欧州特許第1392341号明細書

【特許文献37】欧州特許第1458410号明細書

【特許文献38】国際公開第2002098443号

【特許文献39】国際公開第2003051401号

【特許文献40】国際公開第2008052770号明細書

【特許文献41】国際公開第2009127230号

【特許文献42】国際公開第2006122828号

【特許文献43】国際公開第2008083949号

10

【特許文献44】米国特許出願公開第20050032730号明細書

【特許文献45】米国特許出願公開第20050059624号明細書

【特許文献46】米国特許出願公開第20080267873号明細書

【特許文献47】米国特許出願公開第2010047261号明細書

【特許文献48】米国特許出願公開第20100189729号明細書

【特許文献49】米国特許出願公開第20110077287号明細書

【特許文献50】米国特許出願公開第20100239608号明細書

【特許文献51】米国特許出願公開第20110269950号明細書

【特許文献52】米国特許出願公開第20110311472号明細書

【非特許文献】

20

【0006】

【非特許文献1】サイエンス (Science)、第255巻、p.996~998、1992年

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

これらの報告はあるものの、それらは、修飾がmRNA中に均質に存在する化学修飾（プソイドウリジン及び5-メチル-シトシンを含む）の選択に限定されており、当技術分野では、生理学的反応及び転帰を微調整し、又は個別に合わせて調整すべく、種々の化学修飾の選択的組み込みを阻む障壁を含む、ポリペプチドをコードする核酸の細胞内翻訳及びプロセシングの有効な調節を取り巻く無数の障壁に対処する治療モダリティが依然として必要とされている。

30

【0008】

今日まで、位置的に修飾されたポリヌクレオチド、例えば、修飾の選択的組み込みを有するものに関する研究は報告されていない。本発明は、当技術分野における課題のうちの1つ又は複数を回避する構造的及び/又は化学的特徴、例えば、核酸ベースの治療薬を最適化すると共に、構造的及び機能的完全性を維持し、発現の閾値を克服し、発現率、半減期及び/又はタンパク質濃度を改善し、タンパク質局在化を最適化し、且つ免疫応答及び/又は分解経路などの有害な生物学的反応を回避するのに有用な特徴を有する核酸ベースの化合物又はキメラポリヌクレオチド（コード及び非コードの両方並びにそれらの組み合わせ）を提供することにより、この必要に対処する。これらの障壁の各々が、本発明を用いて軽減され又は解消され得る。

40

【0009】

このために、本発明者らは、化学修飾の配置、位置及びロード率のカスタマイズを可能にすることによって、ポリヌクレオチドの特定の物理化学的及び薬学的特性を改善し、変更し又は最適化するキメラポリヌクレオチド及びそれらのポリヌクレオチドの合成方法を開発してきた。

【課題を解決するための手段】

【0010】

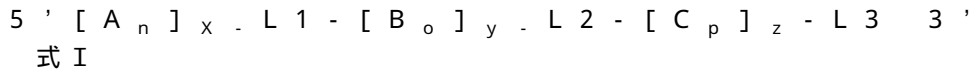
本明細書には、キメラポリヌクレオチドの設計、調製、製造及び/又は製剤化のための

50

組成物、方法、製法、キット及び装置が記載される。非制限的实施形態では、こうしたキメラポリヌクレオチドは、目的のポリヌクレオチドをコードする修飾 mRNA 分子の形態をしているか、又はそのような修飾 mRNA として機能する。一実施形態では、こうしたキメラポリヌクレオチドは、実質的に非コードである。

【0011】

本発明に従い、ポリペプチドをコードするキメラポリヌクレオチドが提供され、キメラポリヌクレオチドは、式 I :



を含む配列又は構造を有し、

10

式中、

A 及び B の各々は、独立に、連結ヌクレオシドの 1 領域を含み；

C は、連結ヌクレオシドの任意選択の領域であり；

領域 A、B 若しくは C の少なくとも 1 つは、位置的に修飾されており、前記位置的に修飾された領域は、アデノシン、チミジン、グアノシン、シチジン、又はウリジンの 1 つ又は複数の同じヌクレオシドタイプの少なくとも 2 つの化学修飾されたヌクレオシドを含み、同じタイプのヌクレオシドの化学修飾の少なくとも 2 つが、異なる化学修飾であり；

n、o 及び p は、独立に、15 ~ 1000 の整数であり；

x 及び y は、独立に、1 ~ 20 であり；

z は、0 ~ 5 であり；

20

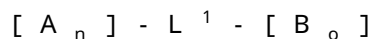
L1 及び L2 は、独立に、任意選択のリンカー部分であり、前記リンカー部分は、核酸ベース若しくは非核酸ベースのいずれかであり；

L3 は、任意選択のコンジュゲート又は任意選択のリンカー部分であり、前記リンカー部分は、核酸ベース若しくは非核酸ベースのいずれかである。

【0012】

また、研究、診断及び治療薬におけるキメラポリヌクレオチドを作製及び使用方法も提供される。

別の態様では、本発明は、ポリペプチドをコードするキメラポリヌクレオチドを特徴とし、ここで、ポリヌクレオチドは、式 II :



式 II

30

を含む配列を有し、

式中、A 及び B は各々、独立に、いずれかのヌクレオシド（例えば、ヌクレオチド）を含み；

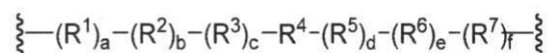
n 及び o は、独立に、10 ~ 10,000、例えば、10 ~ 10000 又は 10 ~ 20000 の整数であり；

L¹ は、式 III :

【0013】

【化 1】

40



式 III

の構造を有し、

式中、a、b、c、d、e、及び f は各々、独立に、0 又は 1 であり；

R¹、R³、R⁵、及び R⁷ の各々は、独立に、任意選択で置換された C₁ ~ C₆ アルキレン、任意選択で置換された C₁ ~ C₆ ヘテロアルキレン、O、S、及び NR⁸ から選択され；

R² 及び R⁶ は各々、独立に、カルボニル、チオカルボニル、スルホニル、又はホスホ

50

リルから選択され；

R^4 は、任意選択で置換された $C_1 \sim C_{10}$ アルキレン、任意選択で置換された $C_2 \sim C_{10}$ アルケニレン、任意選択で置換された $C_2 \sim C_{10}$ アルキニレン、任意選択で置換された $C_2 \sim C_9$ ヘテロシクリレン、任意選択で置換された $C_6 \sim C_{12}$ アリーレン、任意選択で置換された $C_2 \sim C_{100}$ ポリエチレングリコレン、若しくは任意選択で置換された $C_1 \sim C_{10}$ ヘテロアルキレン、又は $(R^1)_a - (R^2)_b - (R^3)_c$ を $(R^5)_d - (R^6)_e - (R^7)_f$ に連結する結合であり、ここで、 a 、 b 、 c 、 d 、 e 、及び f が 0 であるとき、 R^4 は、結合ではなく；

R^8 は、水素、任意選択で置換された $C_1 \sim C_4$ アルキル、任意選択で置換された $C_2 \sim C_4$ アルケニル、任意選択で置換された $C_2 \sim C_4$ アルキニル、任意選択で置換された $C_2 \sim C_6$ ヘテロシクリル、任意選択で置換された $C_6 \sim C_{12}$ アリール、又は任意選択で置換された $C_1 \sim C_7$ ヘテロアルキルであり；

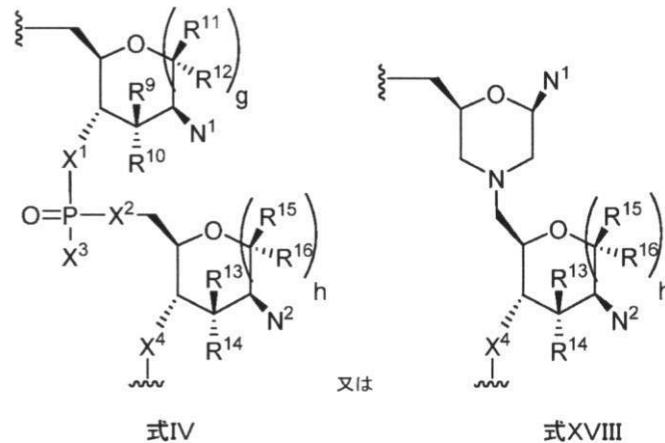
L^1 は、ヌクレオシドのうちの 1 つの糖の $[A_n]$ 及び $[B_o]$ (例えば、 $[A_n]$ のヌクレオシドの 5 員糖環の 3' 位又は 6 員糖環の 4' 位及び $[B_o]$ のヌクレオシドの 5 員糖環の 5' 位又は 6 員糖環の 6' 位、あるいは、 $[A_n]$ のヌクレオシドの 5 員糖環の 5' 位又は 6 員糖環の 6' 位及び $[B_o]$ のヌクレオシドの 5 員糖環の 3' 位又は 6 員糖環の 4' 位) に結合する。

【0014】

一部の実施形態では、 $[A_n]$ 及び $[B_o]$ の少なくとも 1 つは、式 IV 又は式 XVI I I：

【0015】

【化 2】



の構造を含み、

式中、 N^1 及び N^2 の各々は、独立に、核酸塩基であり；

R^9 、 R^{10} 、 R^{11} 、 R^{12} 、 R^{13} 、 R^{14} 、 R^{15} 、及び R^{16} の各々は、独立に、H、ハロ、ヒドロキシ、チオール、任意選択で置換された $C_1 \sim C_6$ アルキル、任意選択で置換された $C_1 \sim C_6$ ヘテロアルキル、任意選択で置換された $C_2 \sim C_6$ ヘテロアルケニル、任意選択で置換された $C_2 \sim C_6$ ヘテロアルキニル、任意選択で置換されたアミノ、アジド、又は任意選択で置換された $C_6 \sim C_{10}$ アリールであり；

g 及び h の各々は、独立に、0 又は 1 であり；

X^1 及び X^4 は各々、独立に、O、NH、又は S であり；

各 X^2 は、独立に、O、NH、又は S であり；

各 X^3 は、OH 若しくは SH、又はその塩である。

【0016】

一部の実施形態では、 h は、0 であり； R^{13} は、H であり； R^{14} は、任意選択で置換された $C_1 \sim C_6$ ヘテロアルキルである。

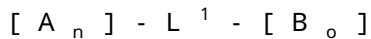
他の実施形態では、任意選択で置換された $C_1 \sim C_6$ ヘテロアルキルは、メトキシであ

る。

【0017】

いくつかの実施形態では、 X^3 は、SHである。

別の実施形態では、本発明は、ポリペプチドをコードするキメラポリヌクレオチドを特徴とし、ポリヌクレオチドは、式 I I :



式 I I

を含む配列を有し、

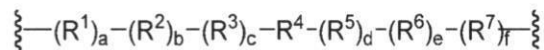
式中、A及びBは各々、独立に、いずれかのヌクレオシド(例えば、ヌクレオチド)を含み;

n及びoは、独立に、10~10, 000、例えば、10~1000又は10~2000の整数であり;

L^1 は、結合であるか、又は式 I I I :

【0018】

【化3】



式III

の構造を有し、

式中、a、b、c、d、e、及びfは各々、独立に、0又は1であり;

R^1 、 R^3 、 R^5 、及び R^7 の各々は、独立に、任意選択で置換された $C_1 \sim C_6$ アルキレン、任意選択で置換された $C_1 \sim C_6$ ヘテロアルキレン、O、S、及びNR⁸から選択され;

R^2 及び R^6 は各々、独立に、カルボニル、チオカルボニル、スルホニル、又はホスホリルから選択され;

R^4 は、任意選択で置換された $C_1 \sim C_{10}$ アルキレン、任意選択で置換された $C_2 \sim C_{10}$ アルケニレン、任意選択で置換された $C_2 \sim C_{10}$ アルキニレン、任意選択で置換された $C_2 \sim C_9$ ヘテロシクリレン、任意選択で置換された $C_6 \sim C_{12}$ アリーレン、任意選択で置換された $C_2 \sim C_{100}$ ポリエチレングリコレン、又は任意選択で置換された $C_1 \sim C_{10}$ ヘテロアルキレン、又は $(R^1)_a - (R^2)_b - (R^3)_c$ を $(R^5)_d - (R^6)_e - (R^7)_f$ に連結する結合であり;

R^8 は、水素、任意選択で置換された $C_1 \sim C_4$ アルキル、任意選択で置換された $C_2 \sim C_4$ アルケニル、任意選択で置換された $C_2 \sim C_4$ アルキニル、任意選択で置換された $C_2 \sim C_6$ ヘテロシクリル、任意選択で置換された $C_6 \sim C_{12}$ アリアル、又は任意選択で置換された $C_1 \sim C_7$ ヘテロアルキルであり;

L^1 は、ヌクレオシドのうちの1つの糖の $[A_n]$ 及び $[B_o.]$ (例えば、 $[A_n]$ のヌクレオシドの5員糖環の3'位又は6員糖環の4'位及び $[B_o.]$ のヌクレオシドの5員糖環の5'位又は6員糖環の6'位、あるいは、 $[A_n]$ のヌクレオシドの5員糖環の5'位又は6員糖環の6'位及び $[B_o.]$ のヌクレオシドの5員糖環の3'位又は6員糖環の4'位)に結合する。

【0019】

ここで、 $[A_n]$ 又は $[B_o.]$ の少なくとも1つは、式IV又は式XVII I I :

【0020】

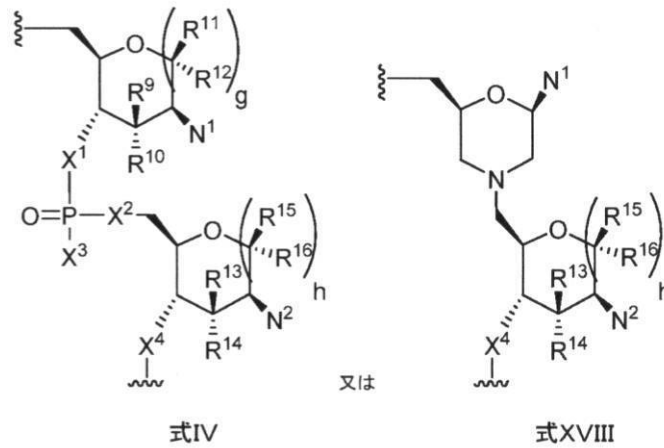
10

20

30

40

【化 4】



10

20

30

40

50

の構造を含み、

式中、 N^1 及び N^2 の各々は、独立に、核酸塩基であり；

R^9 、 R^{10} 、 R^{11} 、 R^{12} 、 R^{13} 、 R^{14} 、 R^{15} 、及び R^{16} の各々は、独立に、H、ハロ、ヒドロキシ、チオール、任意選択で置換された $C_1 \sim C_6$ アルキル、任意選択で置換された $C_1 \sim C_6$ ヘテロアルキル、任意選択で置換された $C_2 \sim C_6$ ヘテロアルケニル、任意選択で置換された $C_2 \sim C_6$ ヘテロアルキニル、任意選択で置換されたアミノ、アジド、又は任意選択で置換された $C_6 \sim C_{10}$ アリールであり；

g 及び h の各々は、独立に、0 又は 1 であり；

X^1 及び X^4 は各々、独立に、O、NH、又は S であり；

各 X^2 は、独立に、O、NH、又は S であり；

各 X^3 は、OH 若しくは SH、又はその塩であり；

ここで、式 IV について、 X^1 、 X^2 、若しくは X^4 の少なくとも 1 つは、NH 又は S である。

【0021】

一部の実施形態では、 X^1 は、NH である。他の実施形態では、 X^4 は、NH である。いくつかの実施形態では、 X^2 は、S である。

一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、(a) コード領域；(b) 5' UTR；及び (c) 3' UTR を含む。一部の実施形態では、ポリヌクレオチドはさらに、(d) 少なくとも 1 つの 5' キャップ構造を含む。他の実施形態では、ポリヌクレオチドはさらに、(e) ポリ-A-テイルを含む。

【0022】

一部の実施形態では、コード領域、5' UTR、3' UTR、5' キャップ構造、又はポリ-A-テイルの 1 つは、 $[A_n] - L^1 - [B_o]$ を含む。

他の実施形態では、コード領域、5' UTR、3' UTR、5' キャップ構造、又はポリ-A-テイルの 1 つが、 $[A_n]$ を含み、5' UTR、3' UTR、5' キャップ構造、又はポリ-A-テイルのもう 1 つが、 $[B_o]$ を含む。

【0023】

一部の実施形態では、5' UTR は、少なくとも 1 つのコザック (Kozak) 配列を含む。

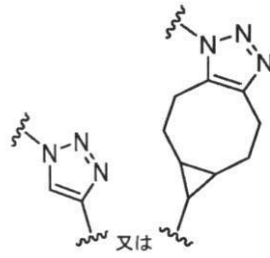
いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、少なくとも 1 つの修飾ヌクレオシド (例えば、表 2 のヌクレオシド) を含む。

【0024】

一部の実施形態では、 R^4 は、任意選択で置換された $C_2 \sim C_9$ ヘテロシクリレンであり、例えば、複素環は、以下の構造：

【0025】

【化5】



10

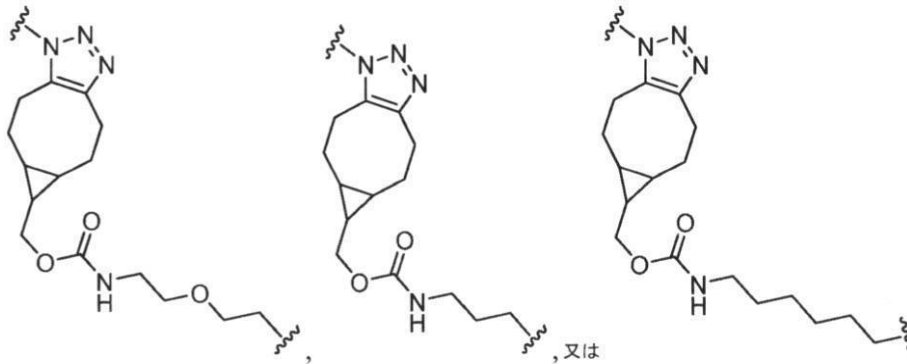
を有する。

【0026】

一部の実施形態では、L¹は、以下の構造：

【0027】

【化6】



20

を有する。

【0028】

一部の実施形態では、L¹は、上記ヌクレオシドのうちの1つの5員糖環の3'位又は6員糖環の4'位で[A_n]に結合すると共に、上記ヌクレオシドのうちの1つの5員糖環の5'位又は6員糖環の6'位で[B_o]に結合する。

30

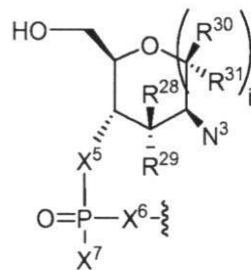
【0029】

一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、環状である。

いくつかの実施形態では、ポリ-Aテイルは、式XXI：

【0030】

【化7】



式XXI

40

の構造で終結し、

式中、N³は、核酸塩基であり

R²⁸、R²⁹、R³⁰、及びR³¹の各々は、独立に、H、ハロ、ヒドロキシ、チオ

50

ール、任意選択で置換された $C_1 \sim C_6$ アルキル、任意選択で置換された $C_1 \sim C_6$ ヘテロアルキル、任意選択で置換された $C_2 \sim C_6$ ヘテロアルケニル、任意選択で置換された $C_2 \sim C_6$ ヘテロアルキニル、任意選択で置換されたアミノ、アジド、又は任意選択で置換された $C_6 \sim C_{10}$ アリールであり；

i は、0 又は 1 であり；

X^5 は、O、NH、又は S であり；

X^6 は、O 又は S であり；

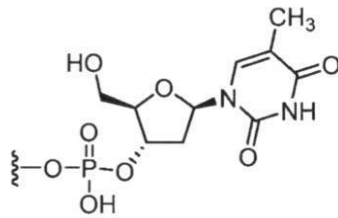
X^7 は、OH 若しくは SH、又はその塩である。

【0031】

一部の実施形態では、式 XXI の構造は、

【0032】

【化8】



10

20

である。

【0033】

他の実施形態では、ポリ-Aテイルは、40～80個のヌクレオシド（配列番号23）を有する。

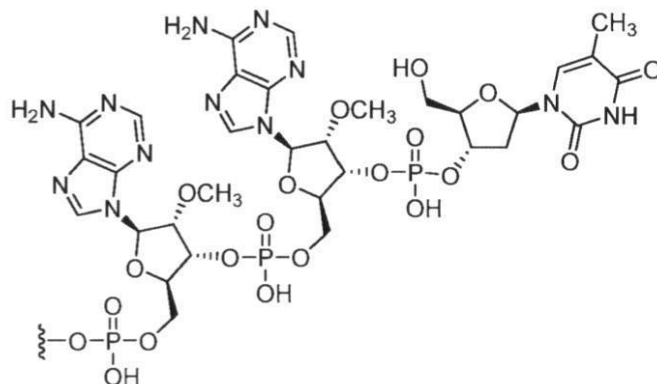
いくつかの実施形態では、式 XXI の構造は、2～4つの2'-メトキシ-アデノシン及び/又は2'-フルオロ-アデノシンに結合する。

【0034】

一部の実施形態では、ポリ-Aテイルは、以下の構造：

【0035】

【化9】



30

40

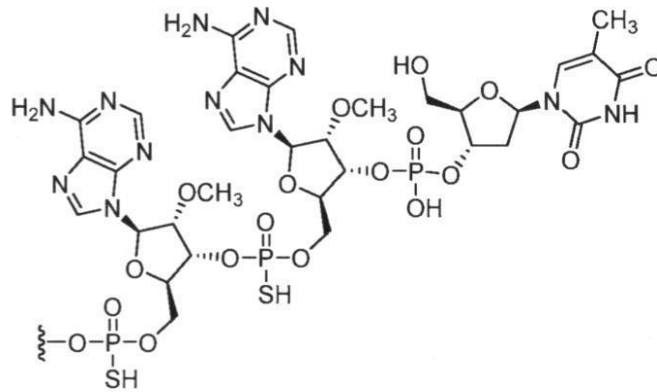
で終結する。

【0036】

他の実施形態では、ポリ-Aテイルは、以下の構造：

【0037】

【化10】



10

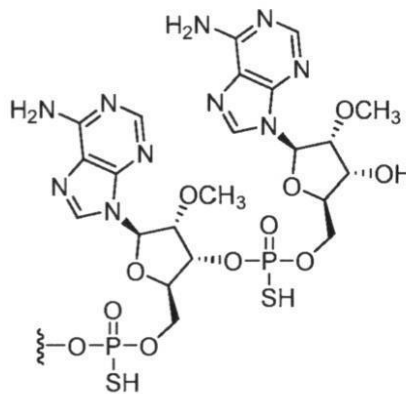
で終結する。

【0038】

いくつかの実施形態では、ポリ-Aテイルは、以下の構造：

【0039】

【化11】



20

30

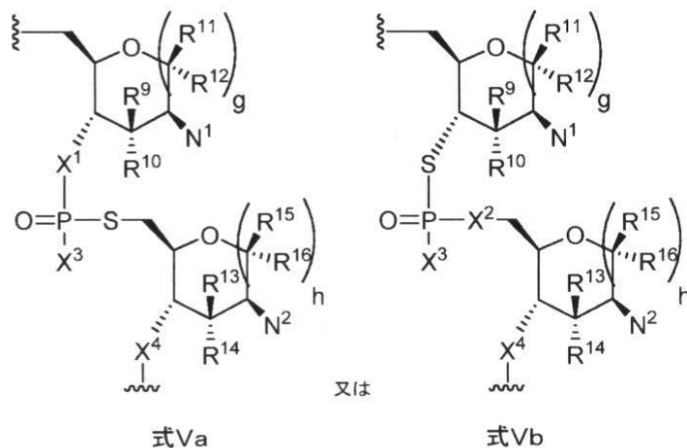
を含む。

【0040】

別の態様では、本発明は、ポリペプチドをコードするキメラポリヌクレオチドを含む組成物を生成する方法を特徴とし、ここで、ポリヌクレオチドは、式Va又はVb：

【0041】

【化12】



40

50

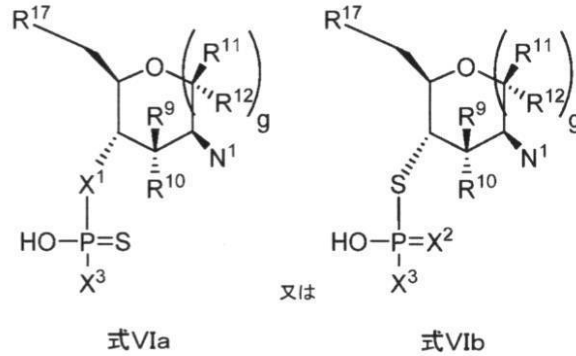
の構造を有する。

【0042】

この方法は、式VIa又はVIb：

【0043】

【化13】



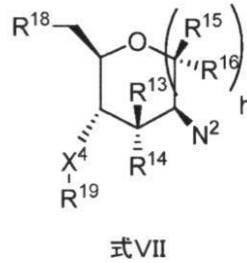
10

の構造を有する化合物と、

式VII：

【0044】

【化14】



20

(式中、 N^1 及び N^2 の各々は、独立に、核酸塩基であり；

R^9 、 R^{10} 、 R^{11} 、 R^{12} 、 R^{13} 、 R^{14} 、 R^{15} 、及び R^{16} の各々は、独立に、H、ハロ、ヒドロキシ、チオール、任意選択で置換された $C_1 \sim C_6$ アルキル、任意選択で置換された $C_1 \sim C_6$ ヘテロアルキル、任意選択で置換された $C_2 \sim C_6$ ヘテロアルケニル、任意選択で置換された $C_2 \sim C_6$ ヘテロアルキニル、任意選択で置換されたアミノ、アジド、又は任意選択で置換された $C_6 \sim C_{10}$ アリールであり；

30

g 及び h の各々は、独立に、0又は1であり；

X^1 及び X^4 は各々、独立に、O、NH、又はSであり；

各 X^2 は、独立に、O又はSであり；

各 X^3 は、独立に、OH若しくはSH、又はその塩であり；

R^{17} 及び R^{19} の各々は、独立に、連結ヌクレオシドの1領域であり；

R^{18} は、ハロゲンである)

40

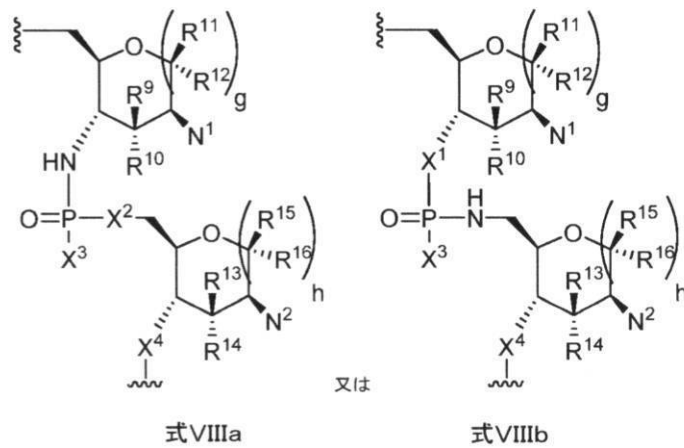
の構造を有する化合物を(例えば、アルキル化条件下で)反応させて、ポリペプチドをコードするキメラポリヌクレオチドを含む組成物を生成するステップを含み、ここで、ポリヌクレオチドは、式Va又はVbの構造を含む。

【0045】

別の態様では、本発明は、ポリペプチドをコードするキメラポリヌクレオチドを含む組成物を生成する方法を特徴とし、ここで、ポリヌクレオチドは、式VIIa又はVIIb：

【0046】

【化 1 5】



10

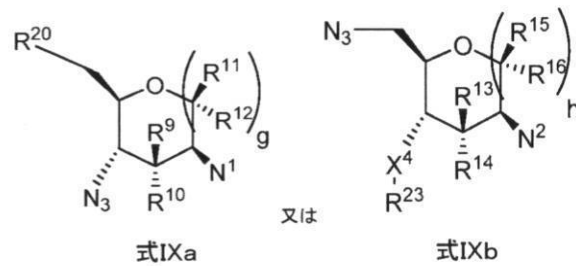
の構造を有する。

【0047】

この方法は、式IXa又はIXb：

【0048】

【化 1 6】



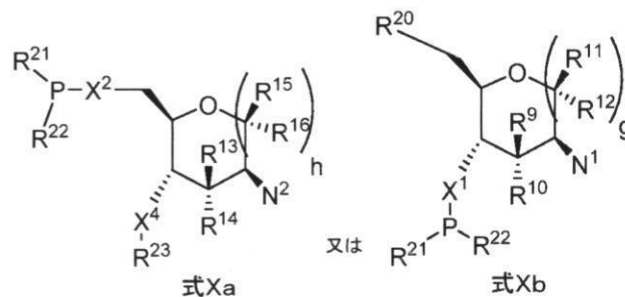
20

の構造を有する化合物と、

式Xa又はXb：

【0049】

【化 1 7】



30

40

(式中、 N^1 及び N^2 の各々は、独立に、核酸塩基であり；

R^9 、 R^{10} 、 R^{11} 、 R^{12} 、 R^{13} 、 R^{14} 、 R^{15} 、及び R^{16} の各々は、独立に、H、ハロ、ヒドロキシ、チオール、任意選択で置換された $C_1 \sim C_6$ アルキル、任意選択で置換された $C_1 \sim C_6$ ヘテロアルキル、任意選択で置換された $C_2 \sim C_6$ ヘテロアルケニル、任意選択で置換された $C_2 \sim C_6$ ヘテロアルキニル、任意選択で置換されたアミノ、アジド、又は任意選択で置換された $C_6 \sim C_{10}$ アリールであり；

g及びhの各々は、独立に、0又は1であり；

 X^4 は各々、独立に、O、NH、又はSであり； X^1 及び X^2 は各々、独立に、O又はSであり；

50

各 X^3 は、独立に、OH、SH、又はその塩であり；

R^{20} 及び R^{23} の各々は、独立に、連結ヌクレオシドの 1 領域であり；

R^{21} 及び R^{22} の各々は、独立に、任意選択で置換された $C_1 \sim C_6$ アルコキシである）

の構造を有する化合物を（例えば、シュタウディングー（Staudinger）反応条件下で）反応させることにより、ポリペプチドをコードするキメラポリヌクレオチドを含む組成物を生成するステップを含み、ここで、ポリヌクレオチドは、式VII Ia又はVII Ibの構造を含む。

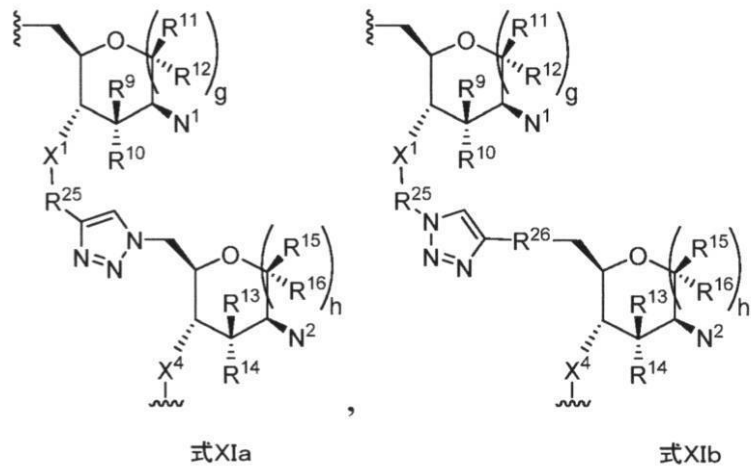
【0050】

別の実施形態では、本発明は、ポリペプチドをコードするキメラポリヌクレオチドを含む組成物を生成する方法を特徴とし、ここで、ポリヌクレオチドは、式XI a、XI b、XII a又はXII b：

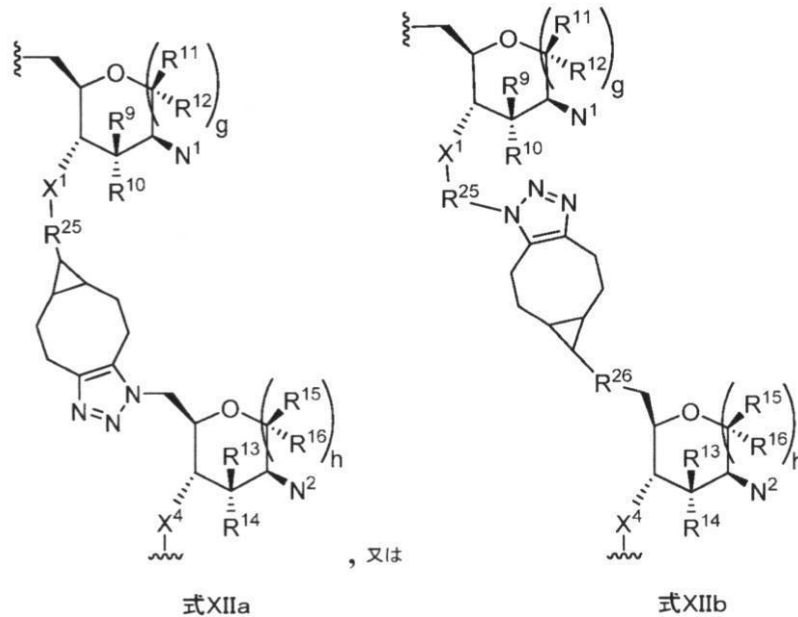
10

【0051】

【化18】



20



30

40

の構造を有する。

【0052】

この方法は、式XIII a、XIII b、XIV a、又はXIV b：

【0053】

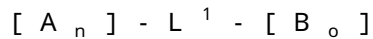
R^{24} 及び R^{27} の各々は、独立に、連結ヌクレオシドの 1 領域であり；

R^{25} 、 $R^{25'}$ 、 R^{26} 、及び $R^{26'}$ の各々は、非存在であるか、又は任意選択で置換された $C_1 \sim C_6$ アルキレン若しくは任意選択で置換された $C_1 \sim C_6$ ヘテロアルキレンであるか、あるいは、 R^{26} 又は $R^{26'}$ とアルキニル基は、一緒に、任意選択で置換されたシクロアルキニルを形成する)

を（例えば、銅供給源の存在若しくは非存在下の [3 + 2] 環状付加条件下で）反応させることにより、ポリペプチドをコードするキメラポリヌクレオチドを含む組成物を生成するステップを含み、ここで、ポリヌクレオチドは、式 X I a、X I b、X I I a 又は X I I b の構造を含む。

【 0 0 5 5 】

別の態様では、本発明は、ポリペプチドをコードするキメラポリヌクレオチドを含む組成物を生成する方法を特徴とし、ここで、ポリヌクレオチドは、式 I I :



式 I I

を含む配列を有する。

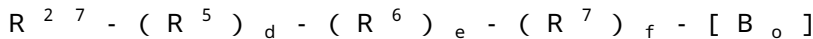
【 0 0 5 6 】

この方法は、式 X V I :



式 X V I

の構造を有する化合物と、式 X V I I :



式 X V I I

の構造を有する化合物

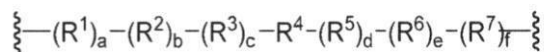
（式中、A 及び B は各々、独立に、いずれかのヌクレオチドを含み；

n 及び o は、独立に、10 ~ 10, 000、例えば、10 ~ 10000 又は 10 ~ 20000 であり；

L^1 は、式 I I I :

【 0 0 5 7 】

【 化 2 1 】



式 III

の構造を有し、

式中、a、b、c、d、e、及び f は各々、独立に、0 又は 1 であり；

R^1 、 R^3 、 R^5 、及び R^7 は各々、独立に、任意選択で置換された $C_1 \sim C_6$ アルキレン、任意選択で置換された $C_1 \sim C_6$ ヘテロアルキレン、O、S、及び NR^8 から選択され；

R^2 及び R^6 は各々、独立に、カルボニル、チオカルボニル、スルホニル、又はホスホリルから選択され；

R^4 は、任意選択で置換されたトリアゾレンであり；

R^8 は、水素、任意選択で置換された $C_1 \sim C_4$ アルキル、任意選択で置換された $C_3 \sim C_4$ アルケニル、任意選択で置換された $C_2 \sim C_4$ アルキニル、任意選択で置換された $C_2 \sim C_6$ ヘテロシクリル、任意選択で置換された $C_6 \sim C_{12}$ アリール、又は任意選択で置換された $C_1 \sim C_7$ ヘテロアルキルであり；並びに

R^{27} は、任意選択で置換された $C_2 \sim C_3$ アルキニル又は任意選択で置換された $C_8 \sim C_{12}$ シクロアルキニルであり、

ここで、 L^1 は、上記ヌクレオチドのうちの 1 つの糖の [A_n] 及び [B_o] に結合する)

10

20

30

40

50

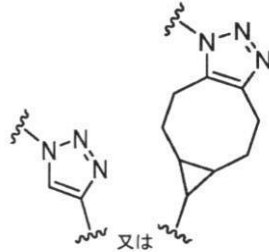
を（例えば、銅供給源の存在若しくは非存在下の [3 + 2] 環状付加条件下で）反応させることにより、ポリペプチドをコードするキメラポリヌクレオチドを含む組成物を生成するステップを含み、ここで、ポリヌクレオチドは、式 I I の配列を有する。

【 0 0 5 8 】

一部の実施形態では、任意選択で置換されたトリアゾレンは、以下の構造：

【 0 0 5 9 】

【 化 2 2 】



10

を有する。

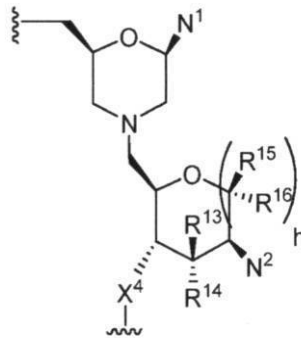
【 0 0 6 0 】

別の態様では、本発明は、ポリペプチドをコードするキメラポリヌクレオチドを含む組成物を生成する方法を特徴とし、ここで、ポリヌクレオチドは、式 X V I I I :

20

【 0 0 6 1 】

【 化 2 3 】



式XVIII

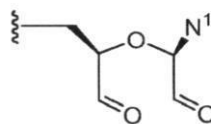
30

の構造を有し、

この方法は、式 X I X :

【 0 0 6 2 】

【 化 2 4 】



式XIX

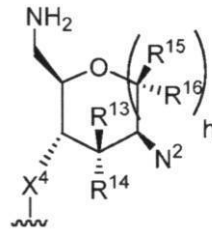
40

の構造を有する化合物と、

式 X X :

【 0 0 6 3 】

【化 2 5】



式XX

10

の構造を有する化合物

(式中、 N^1 及び N^2 の各々は、独立に、核酸塩基であり；

R^{13} 、 R^{14} 、 R^{15} 、及び R^{16} の各々は、独立に、H、ハロ、ヒドロキシ、チオール、任意選択で置換された $C_1 \sim C_6$ アルキル、任意選択で置換された $C_1 \sim C_6$ ヘテロアルキル、任意選択で置換された $C_2 \sim C_6$ ヘテロアルケニル、任意選択で置換された $C_2 \sim C_6$ ヘテロアルキニル、任意選択で置換されたアミノ、アジド、又は任意選択で置換された $C_6 \sim C_{10}$ アリールであり；

h は、0 又は 1 であり；

X^4 は、O、NH、又は S である)

を (例えば、還元アミド化条件下で) 反応させることにより、ポリペプチドをコードするキメラポリヌクレオチドを含む組成物を生成するステップを含み、ここで、ポリヌクレオチドは、式 XVII の構造を含む。

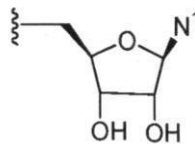
20

【0064】

一部の実施形態では、本方法は、式 XXI :

【0065】

【化 2 6】



式XIX

30

の化合物から式 XIX の化合物を生成するステップを含む。

【0066】

本発明の様々な実施形態の詳細を以下の説明に記載する。本発明の他の特徴、目的、及び利点は、説明及び図面、並びに特許請求の範囲から明らかになるであろう。

以上及びその他の目的、特徴、及び利点は、添付の図面に図示される通り、本発明の具体的な実施形態の以下の説明から明らかになるであろう。尚、図面中、類似の参照符号は、様々な図面全体を通して同じ部分を指す。図面は、必ずしも一定の縮尺に従っているわけではなく、本発明の様々な実施形態の原理を説明することに重点が置かれている。

40

【図面の簡単な説明】

【0067】

【図 1】ポリヌクレオチド構築物の概略図である。図 1 A は、2013 年 3 月 9 日に出版された共同所有の同時係属米国特許出願第 13 / 791, 922 号明細書 (その内容は、参照により本明細書に組み込む) に教示されるポリヌクレオチド構築物の概略図である。図 1 B は、線状ポリヌクレオチドの概略図である。

【図 2】本発明の一連のキメラポリヌクレオチドの概略図である。

【図 3】位置修飾の様々なパターンを例示し、mRNA ポリヌクレオチドの領域に類似す

50

る領域を示す一連のキメラポリヌクレオチドの概略図である。

【図4】式Iに基づく位置修飾の様々なパターンを例示する一連のキメラポリヌクレオチドの概略図である。

【図5】式Iに基づく位置修飾の様々なパターンを例示し、さらに、遮断又は構造化3'末端を示す一連のキメラポリヌクレオチドの概略図である。

【図6】本発明の環状構築物の概略図である。

【図7】本発明の環状構築物の概略図である。

【図8】少なくとも1つのスペーサ領域を含む本発明の環状一次構築物の概略図である。

【図9】少なくとも1つのセンサー領域を含む本発明の環状一次構築物の概略図である。

【図10】少なくとも1つのセンサー領域と1つのスペーサ領域を含む本発明の環状一次構築物の概略図である。

10

【図11】本発明の非コード環状一次構築物の概略図である。

【図12】本発明の非コード環状一次構築物の概略図である。

【図13】3'-アジド ddATP 組み込み前及び後の RNA 1 ~ 3 のキャピラリー電気泳動 (CE) 生成ゲルを示すイメージである。レーン1は、ラダー、レーン2は、RNA 1、レーン3は、3'-アジド ddATP 組み込み後の RNA 1、レーン4は、RNA 2、レーン5は、3'-アジド ddATP 組み込み後の RNA 2、レーン6は、RNA 3、レーン7は、3'-アジド ddATP 組み込み後の RNA 3 である。

【図14】RNA-ポリ(A)テイルコンジュゲートの形成の CE 生成ゲルを示すイメージである。レーン1は、ラダー、レーン2は、3'-アジド ddATP 組み込み後の RNA 1、レーン3は、テイル1との反応後の3'-アジド RNA 1、レーン4は、3'-アジド ddATP 組み込み後の RNA 2、レーン5は、テイル1との反応後の3'-アジド RNA 2、レーン6は、3'-アジド ddATP 組み込み後の RNA 3、並びにレーン7は、テイル1との反応後の3'-アジド RNA 3 である。レーン2、4、及び6の RNA は、非修飾及び3'-アジド RNA の混合物である。レーン3、5、及び7において、最短から最長へと移る3つの明瞭なバンドは、非反応テイル1、非修飾 RNA と非反応3'-アジド RNA との推定混合物、及び RNA-テイル1コンジュゲートである。

20

【図15】RNA-テイル1コンジュゲートを賦与する RNA 1 及びテイル1の DNA スプリント鑄型共役、続くオリゴ(T)ダイナビーズによる精製の CE 生成ゲルを示すイメージである。レーン1は、ラダー、レーン2は、非修飾 RNA 1、レーン3は、限外濾過による脱塩後の DNA スプリント鑄型反応混合物、レーン4は、DNase での消化後の反応混合物、レーン5は、オリゴ(T)ダイナビーズに結合しなかった反応混合物、レーン6は、オリゴ(T)ダイナビーズからの溶離後の精製済 RNA-テイル1コンジュゲートである。

30

【図16】オリゴ(T)ダイナビーズにより精製されたテイル1~6を含む RNA-テイル1コンジュゲートの CE 生成ゲルを示すイメージである。レーン1は、ラダー、レーン2は、3'-アジド RNA 1、レーン3は、RNA 1-テイル1コンジュゲート、レーン4は、RNA 1-テイル4コンジュゲート、レーン5は、RNA 1-テイル2コンジュゲート、レーン6は、RNA 1-テイル5コンジュゲート、レーン7は、RNA-テイル3コンジュゲート、レーン8は、RNA 1-テイル6コンジュゲート、レーン9は、3'-アジド RNA 2、レーン10は、RNA 2-テイル1コンジュゲート、レーン11は、RNA 2-テイル4コンジュゲート、レーン12は、3'-アジド RNA 3、レーン13は、RNA 3-テイル1コンジュゲート、レーン14は、RNA 3-テイル4コンジュゲートである。

40

【図17】キャップ付加 TPオリゴ1及び2の PAGE 分析を示すイメージである。レーン1は、TPオリゴ1、レーン2は、キャップ付加 TPオリゴ1、レーン3は、TPオリゴ2、レーン4は、キャップ付加 TPオリゴ2 である。

【図18】キャップオリゴ-RNA 5コンジュゲートの CE 分析を示すイメージである。レーン1は、ラダー、レーン2は、5'-アジド RNA 5、レーン3は、非キャップ付加 TPオリゴ1-RNA 5コンジュゲート、レーン4は、キャップ付加 TPオリゴ1-RN

50

A 5 コンジュゲート、レーン 5 は、非キャップ付加 TP オリゴ 2 - RNA 5 コンジュゲート、レーン 6 は、キャップ付加 TP オリゴ 1 - RNA 5 コンジュゲートである。レーン 7 ~ 11 は、5' - BCN テイルとの SPAAC 反応後の前述のサンプルである。

【図 19】3' - アジド RNA 3 の SPAAC 反応後の RNA とポリ (A) ポリメラーゼ (PAP) 処理前及び後のテイル 1 の混合物の CE 電気泳動図を示すイメージである。この例では、3' - アジド ddATP 組み込みは、46% であると算出された。

【図 20】ポリ (A) ポリメラーゼでの SPAAC 反応物の処理による RNA 1 ~ 3 への 3' - アジド ddATP の CE 生成ゲルを示すイメージである。レーン 1 は、ラダーである。レーン 2 及び 3 は、それぞれ、PAP での処理前及び後のテイル 1 を含む非修飾 RNA 1 である。レーン 4 及び 5 は、それぞれ PAP での処理前及び後のテイル 1 を含む 3' - アジド RNA 1 である。レーン 6 ~ 9 及びレーン 10 ~ 13 は、それぞれ、RNA 2 及び RNA 3 との同じ反応物である。文字は、各レーンの RNA の一般名称を示し、a は、非処理テイル 1 に、b は、非共役 RNA に、c は、RNA - テイル 1 コンジュゲートに、また、d は、PAP での反応により付加されたポリ (A) テイルを有する RNA に対応する。

10

【発明を実施するための形態】

【0068】

治療薬、診断薬、試薬の分野で、並びに生物学的アッセイにおいて、*in vitro*、*in vivo*、*in situ* 又は *ex vivo* のいずれにかかわらず、細胞内で核酸、例えば、リボ核酸 (RNA) を設計、合成、及び送達を可能にすること、例えば、細胞、組織若しくは臓器、最終的に生物にとって有益な生理学的帰結をもたらすことは非常に重要である。1つの有益な帰結は、核酸の細胞内翻訳及びコードされた目的のポリペプチドの産生を引き起こすことである。同様に、非コード RNA が、多くの研究の焦点となっており；非コードポリヌクレオチドは、単独で、及びコードポリヌクレオチドと併せて使用すると、治療シナリオに有益な帰結をもたらすことができる。

20

【0069】

本明細書には、ポリヌクレオチド、特にキメラポリヌクレオチドの設計、調製、製造及び / 又は製剤化のための組成物 (医薬組成物を含む) 及び方法が記載される。

また、本明細書に記載するキメラポリヌクレオチドの選択、設計及び / 又は使用のためのシステム、プロセス、デバイス及びキットも提供される。

30

【0070】

本発明によれば、当技術分野の他の分子の欠損を回避するように、キメラポリヌクレオチドを修飾するのが好ましい。

ヒトの疾患、抗体、ウイルス、獣医学適用、並びに多様な *in vivo* での状況における、ポリペプチドをコードする修飾ポリヌクレオチド (すなわち、修飾 mRNA) の使用は、本発明者らにより研究されており、これらの研究は、例えば、以下の文献に開示されている：国際公開第 2013151666 号パンフレット、同第 2013151668 号パンフレット、同第 2013151663 号パンフレット、同第 2013151669 号パンフレット、同第 2013151670 号パンフレット、同第 2013151664 号パンフレット、同第 2013151665 号パンフレット、同第 2013151736 号パンフレットの表 6；国際公開第 2013151672 号パンフレットの表 6 及び 7；国際公開第 2013151671 号パンフレットの表 6、178 及び 179；国際公開第 2013151667 号パンフレットの表 6、185 及び 186 (これら各々の内容は、全体として参照により本明細書に組み込む)。上記のいずれも、キメラポリヌクレオチドとして合成することができ、こうした実施形態は、本発明によって考慮される。

40

【0071】

従って、本明細書には、キメラポリヌクレオチドが提供され、これらは、そのキメラ性のために、以下：組織中での安定性及び / 若しくはクリアランス、受容体取り込み及び / 若しくは動態、細胞接触、翻訳機構との関与、mRNA 半減期、翻訳効率、免疫回避、免疫誘導 (例えば、ワクチンの場合)、タンパク質産生能力、分泌効率 (該当する場合)、

50

循環への進入可能性、タンパク質半減期並びにノ又は細胞の状態、機能及びノ若しくは活性の調節のうちの1つ又は複数を改善するように設計されている。

【0072】

I. 本発明の組成物

本発明は、キメラであり、一部の実施形態では、1つ又は複数の目的のポリペプチドをコードする核酸分子、具体的には、ポリヌクレオチドを提供する。用語「核酸」は、その最も広い意味において、ヌクレオチドのポリマーを含む任意の化合物及びノ又は物質を含む。これらのポリマーは、多くの場合、ポリヌクレオチドと称される。

【0073】

本発明の例示的核酸又はポリヌクレオチドとして、限定はしないが、リボ核酸 (RNA)、デオキシリボ核酸 (DNA)、トレース核酸 (TNA)、グリコール核酸 (GNA)、ペプチド核酸 (PNA)、ロックド核酸 (LNA、
-D-リボ配置を有する LNA、
-L-リボ配置を有する -LNA (LNA のジアステレオマー)、2'-アミノ官能化を有する 2'-アミノ-LNA、及び 2'-アミノ官能化を有する 2'-アミノ-LNA を含む)、エチレン核酸 (ENA)、シクロヘキシル核酸 (CeNA)、又はこれらのハイブリッド若しくは組み合わせが挙げられる。

10

【0074】

好ましい実施形態では、核酸分子は、メッセンジャー RNA (mRNA) である。本明細書で使用されるとき、用語「メッセンジャー RNA (mRNA)」は、目的のポリペプチドをコードし、且つ翻訳されて *in vitro*、*in vivo*、*in situ* 又は *ex vivo* で、コードされた目的のポリペプチドを産生することができる任意のポリヌクレオチドを指す。

20

【0075】

伝統的に、mRNA 分子の基本構成要素には、少なくともコード領域、5' UTR、3' UTR、5' キャップ、及びポリ A テイルが含まれる。図 1 は、本発明の代表的なポリヌクレオチド 100 を示し、これは、ポリペプチドをコードする本発明のキメラポリヌクレオチドを設計するための出発、親又はスカフォールド分子として役立ち得る。

【0076】

図 1 A 及び B を参照すると、ここでポリヌクレオチド 100 は、第 1 の連結ヌクレオチド領域 102 を含み、これは、第 1 のフランキング領域 104 及び第 2 のフランキング領域 106 によってフランキングされている。このポリヌクレオチドは、その 5' 末端で、シグナル領域 103 の 1 つ又は複数のシグナル配列をコードし得る。フランキング領域 104 は、1 つ又は複数の完全若しくは不完全な 5' UTR 配列 (完全にコドン最適化されていても、又は部分的にコドン最適化されていてもよい) を含む連結ヌクレオチド領域を含んでもよい。フランキング領域 104 は、限定はしないが、miR 配列、テルザック (TERZAK) (商標) 配列及び翻訳制御配列などの少なくとも 1 つの核酸配列を含んでもよい。フランキング領域 104 はまた、5' 末端キャップ 108 を含んでもよい。5' 末端キャップ領域 108 は、天然に存在するキャップ、合成キャップ又は最適化キャップなどのキャップを含んでもよい。最適化キャップの非制限的例として、ローズ (Rhoads) により、米国特許第 7074596 号明細書並びに国際公開第 2008157668 号パンフレット、同第 2009149253 号パンフレット及び同第 2013103659 号パンフレット (これらの各々の内容は、全体として参照により本明細書に組み込む) に教示されているキャップが挙げられる。第 2 のフランキング領域 106 は、1 つ又は複数の完全若しくは不完全な 3' UTR 配列を含む連結ヌクレオチド領域を含んでもよい。第 2 のフランキング領域 106 は、完全にコドン最適化されていても、又は一部がコドン最適化されていてもよい。フランキング領域 106 は、限定はしないが、miR 配列及び翻訳制御配列などの少なくとも 1 つの核酸配列を含んでもよい。フランキング領域 106 はまた、3' テイル付加配列 110 を含んでもよい。3' テイル付加配列 110 は、合成テイル付加領域 112 及びノ又は鎖終結ヌクレオチド 114 を含み得る。合成テイル付加領域の非制限的例として、ポリ A 配列、ポリ C 配列、ポリ A-G カルテットが挙げられ

30

40

50

る。鎖終結ヌクレオシドの非制限的例として、2'-Oメチル、F及びロックド核酸(LNA)が挙げられる。

【0077】

第1領域102の5'末端と第1フランキンク領域104とを架橋するのが、第1の作動領域105である。伝統的に、この作動領域は、開始コドンを含む。あるいは、作動領域は、開始コドンなどの任意の翻訳開始配列又はシグナルを含んでもよい。

【0078】

第1領域102の3'末端と第2フランキンク領域106とを架橋するのは、第2の作動領域107である。伝統的に、この作動領域は、終止コドンを含む。あるいは、作動領域は、終止コドンなどの任意の翻訳開始配列又はシグナルを含んでもよい。本発明によれば、複数の連続した終止コドンを用いてもよい。

10

【0079】

野生型モジュール構造に基づいて、本発明は、モジュール構成を維持しながらも、ポリヌクレオチドに有用な特性を付与する1つ又は複数の構造及び/若しくは化学修飾又は改変を含むキメラポリヌクレオチド又はRNA構築物を提供することにより、当技術分野における従来のmRNA分子並びにIVTにより産生されたmRNAの機能性の範囲を広げる。従って、本発明のmRNA分子であるキメラポリヌクレオチドは、「キメラ修飾mRNA」又は「キメラmRNA」と呼ばれる。

【0080】

キメラポリヌクレオチドのアーキテクチャ

20

本発明の「キメラ」は、2つ以上の不調和な若しくは異質の部分又は領域を有する実体である。本明細書で使用される時、「キメラポリヌクレオチド」又は「キメラポリヌクレオチド」は、サイズ及び/又は化学修飾パターン、化学修飾位置、化学修飾率(%)若しくは化学修飾集団並びにこれらの組み合わせが異なる部分又は領域を有する核酸ポリマーである。本明細書で使用される時、ポリヌクレオチドの「部分」又は「領域」は、ポリヌクレオチドの完全長より短いポリヌクレオチドの任意の部分として定義される。

【0081】

キメラポリヌクレオチドが、mRNAとして機能し、且つ目的のポリペプチドをコードする部分又は領域の例として、限定はしないが、非翻訳領域(UTR、例えば、5'UTR又は3'UTR)、コード領域、キャップ領域、ポリAテイル領域、出発領域、終止領域、シグナル配列領域、及びこれらの組み合わせが挙げられる。図2は、mRNAとして使用することができる本発明の特定のキメラポリヌクレオチドを示す。図3は、一連のキメラポリヌクレオチドの概略図を示し、位置修飾の様々なパターンを特定すると共に、mRNAポリヌクレオチドのそれらの領域に類似する領域を示す。他の領域をつなぎ合わせるか、又はそれらの間にある領域若しくは部分もまた、サブ領域を有するように設計することもできる。それらは、図に示す。

30

【0082】

一部の実施形態では、本発明のキメラポリヌクレオチドは、式I:



式I

40

を含む構造を有し、

式中、

A及びBの各々は、独立に、連結ヌクレオシド領域を含み；

Cは、連結ヌクレオシドの任意選択の領域であり；

領域A、B若しくはCの少なくとも1つは、位置的に修飾されており、位置的に修飾された領域は、アデノシン、チミジン、グアノシン、シチジン、又はウリジンの1つ又は複数の同じヌクレオシドタイプの少なくとも2つの化学修飾されたヌクレオシドを含み、同じタイプのヌクレオシドの化学修飾の少なくとも2つが、異なる化学修飾であり；

n、o及びpは、独立に、15~1000の整数であり；

x及びyは、独立に、1~20であり；

50

z は、0 ~ 5 であり；

L 1 及び L 2 は、独立に、任意選択のリンカー部分であり、リンカー部分は、核酸ベース若しくは非核酸ベースのいずれかであり；

L 3 は、任意選択のコンジュゲート又は任意選択のリンカー部分であり、リンカー部分は、核酸ベース若しくは非核酸ベースのいずれかである。

【0083】

一部の実施形態では、式 I のキメラポリヌクレオチドは、1 つ又は複数の目的のペプチド又はポリペプチドをコードする。このようなコードされた分子は、2 つ以上の領域にわたってコードされてもよい。

【0084】

図 4 及び図 5 は、式 I に基づく位置修飾の様々なパターン、並びにブロック化又は構造化された 3' 末端を有するものを示す一連のキメラポリヌクレオチドの概略図を提供する。

【0085】

本発明のキメラポリヌクレオチドは、その部分又は領域を含め、ヘミマー (hemimer)、ギャップマー (gapmer)、ウィングマー (wingmer)、又はブロックマー (blockmer) に分類され得る。

【0086】

本明細書で使用される時、「ヘミマー」は、あるパターン、割合 (%)、位置若しくは集団の化学修飾の半分と、第 2 のパターン、割合 (%)、位置若しくは集団の化学修飾の半分とを含む領域又は部分を含むキメラポリヌクレオチドである。本発明のキメラポリヌクレオチドはまた、ヘミマーサブ領域も含み得る。一実施形態では、部分又は領域は、50% の一方と 50% の他方である。

【0087】

一実施形態では、キメラポリヌクレオチド全体が、50% の一方と 50% の他方であってもよい。本発明の任意のキメラポリヌクレオチドの任意の領域又は部分は、ヘミマーであってもよい。ヘミマーのタイプには、パターンヘミマー、集団ヘミマー又は位置ヘミマーが含まれる。定義上、ヘミマーは、50 : 50 パーセントヘミマーである。

【0088】

本明細書で使用される時、「ギャップマー」は、少なくとも 3 つの部分又は領域を有し、それらの部分又は領域の間にギャップを含むキメラポリヌクレオチドである。「ギャップ」は、それにフランキングする 2 つの部分又は領域のキメラの性質とは異なる連結ヌクレオチド領域又は単一のヌクレオチドを含み得る。ギャップマーの 2 つの部分又は領域は、互いに同じであっても、又は異なってもよい。

【0089】

本明細書で使用される時、「ウィングマー」は、少なくとも 3 つの部分又は領域を有し、それらの部分又は領域の間にギャップを含むキメラポリヌクレオチドである。ギャップマーと異なり、ウィングマーでは、ギャップを取り囲む 2 つのフランキング部分又は領域が同じ程度又は種類である。このような類似性は、種々の修飾の単位数の長さ又は修飾数に関するものであってよい。ウィングマーのウィングは、ギャップより長くても、又は短くてもよい。ウィング部分又は領域は、ギャップを含む領域と比べて長さが 20、30、40、50、60、70、80、90 若しくは 95% 長くても、又は短くてもよい。

【0090】

本明細書で使用される時、「ブロックマー」は、部分又は領域が同等のサイズ若しくは数及びタイプの修飾である、パターン化したポリヌクレオチドである。ブロックマー内の領域又はサブ領域は、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109

10

20

30

40

50

、 110、111、112、113、114、115、116、117、118、119
 、 120、121、122、123、124、125、126、127、128、129
 、 130、131、132、133、134、135、136、137、138、139
 、 140、141、142、143、144、145、146、147、148、149
 、 150、151、152、153、154、155、156、157、158、159
 、 160、161、162、163、164、165、166、167、168、169
 、 170、171、172、173、174、175、176、177、178、179
 、 180、181、182、183、184、185、186、187、188、189
 、 190、191、192、193、194、195、196、197、198、199
 、 200、201、202、203、204、205、206、207、208、209
 、 210、211、212、213、214、215、216、217、218、219
 、 220、221、222、223、224、225、226、227、228、229
 、 230、231、232、233、234、235、236、237、238、239
 、 240、241、242、243、244、245、246、247、248、249
 、 250、251、252、253、254、255、256、257、258、259
 、 260、261、262、263、264、265、266、267、268、269
 、 270、271、272、273、274、275、276、277、278、279
 、 280、281、282、283、284、285、286、287、288、289
 、 290、291、292、293、294、295、296、297、298、299
 、 300、310、320、330、340、350、360、370、380、390
 、 400、410、420、430、440、450、460、470、480、490
 又は500ヌクレオシド長であってよい。

10

20

【0091】

化学修飾パターンを有する本発明のキメラポリヌクレオチドは、その部分又は領域を含め、「パターンキメラ」と称される。パターンキメラはまた、ブロックマーと呼ばれることもある。パターンキメラは、領域又は部分の範囲内に、それらにわたって又はそれらの間に修飾パターンを有するポリヌクレオチドである。

【0092】

部分又は領域の範囲内の修飾パターンは、画定された領域内で開始し、終止する。部分又は領域にわたる修飾パターンは、ある部分又は領域で開始し、別の隣接する部分又は領域で終止するパターンである。部分又は領域間での修飾パターンは、ある部分又は領域内で開始及び終止し、必ずしもその第1の領域又は部分に隣接しているとは限らない異なる部分又は領域内で繰り返されるものである。

30

【0093】

パターンキメラ又はブロックマーの領域若しくはサブ領域は、 $ABAB[AB]n$ （各「A」及び各「B」は、異なる化学修飾（塩基、糖又は主鎖リンカーの少なくとも1つにおける）、異なるタイプの化学修飾（例えば、天然に存在する、及び天然に存在しない）、異なる割合（%）の修飾又は異なる集団の修飾を表す）などの単純な交互のパターンを有してもよい。パターンは、 n 回（ $n=3\sim 300$ ）繰り返され得る。さらに、各A又はBが、パターン中の1～2500単位（例えば、ヌクレオシド）を表し得る。パターンはまた、 $AABB A A B B [A A B B]n$ （交互の2個組）又は $A A A B B B A A A B B B [A A A B B B]n$ （交互の3個組）パターンなどの交互の複数個組であってもよい。パターンは、 n 回（ $n=3\sim 300$ ）繰り返され得る。

40

【0094】

また異なるパターンが一緒に混合されて、二次パターンを形成してもよい。例えば、単一の交互パターンが3個組の交互パターンと組み合わせられて、二次交互パターン $A'B'$ を形成し得る。一例を挙げると、 $[ABABAB][A A A B B B A A A B B B][AB A B A B][A A A B B B A A A B B B][AB A B A B][A A A B B B A A A B B B]$ （ $[ABABAB]$ は A' であり、 $[A A A B B B A A A B B B]$ は B' である）となる。同様に、これらのパターンは、 n 回（ $n=3\sim 300$ ）繰り返され得る。

50

【0095】

パターンは3個又はそれ以上の異なる修飾を含み、ABCABC[ABC]ⁿパターンを形成し得る。これらの3成分パターンもまた、AABBCCCAABBCC[AABBCC]ⁿなど複数個組であってもよいし、ABCABCACAABBCCABCABCACAABBCCなど他のパターンとの組み合わせとして設計されてもよく、さらには、より高次のパターンであってもよい。

【0096】

位置、割合(%)、及び集団修飾の領域又はサブ領域が、各修飾タイプからの等しい寄与を反映する必要はない。それらは「1-2-3-4」、「1-2-4-8」(各整数は特定の修飾タイプの単位数を表す)などの系列を形成し得る。あるいは、それらは、「1-3-3-1-3-1-5」など奇数個のみであっても、又は偶数個のみの「2-4-2-4-6-4-8」であっても、あるいは「1-3-4-2-5-7-3-3-4」など奇数個の単位数と偶数個の単位数との混合であってもよい。

【0097】

パターンキメラは、その化学修飾の点で程度(上記に記載されるものなど)又は種類(例えば、異なる修飾)が異なってもよい。

同じヌクレオシドタイプ(A、C、G、T、又はU)の2つ以上のヌクレオシドメンバーの2つ以上の異なる化学修飾を含む少なくとも1つの領域を有する本発明のキメラポリヌクレオチドは、その部分又は領域を含め、「位置的に修飾された」キメラと称される。位置的に修飾されたキメラは、本明細書では、「選択的配置」キメラ又は「選択的配置ポリヌクレオチド」とも称される。その名称が示す通り、選択的配置とは、任意のA、C、G、T又はUに対する修飾が合成方法に起因して同じである当技術分野のポリヌクレオチドとは異なり、ポリヌクレオチド又はその領域内の個々のA、C、G、T又はUに異なる修飾を有し得るポリヌクレオチドの設計を指す。例えば、位置的に修飾されたキメラポリヌクレオチドでは、A、C、G、T、又はUのヌクレオシドタイプのいずれかに対して2つ以上の異なる化学修飾があり得る。また、同じヌクレオシドタイプの任意の2つ以上に対する2つ以上の組み合わせもあり得る。例えば、位置的に修飾されている又は選択的配置のキメラポリヌクレオチドは、分子中のアデニンの集団に対して3つの異なる修飾を含むことができ、また、構築物中のシトシンの集団に対しても3つの異なる修飾を有し得る。これらは全て、ユニークで非ランダムな配置を有し得る。

【0098】

化学修飾パーセントを有する本発明のキメラポリヌクレオチドは、その部分又は領域を含め、「パーセントキメラ」と称される。パーセントキメラは、少なくとも1%、少なくとも2%、少なくとも5%、少なくとも8%、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、若しくは少なくとも99%の位置、パターン又は集団修飾を含む領域若しくは部分を有し得る。あるいは、パーセントキメラは、修飾位置、パターン、又は集団に関して完全に修飾されていてもよい。パーセントキメラの修飾のパーセントは、天然に存在する修飾と天然に存在しない修飾とに分けることができる。

【0099】

化学修飾集団を有する本発明のキメラポリヌクレオチドは、その部分又は領域を含め、「集団キメラ」と称される。集団キメラは、ヌクレオシド(その塩基、糖又は主鎖連結、又はそれらの組み合わせ)が選択修飾集団を有する領域又は部分を含み得る。こうした修飾は、表現型の帰結を誘導、改変又は調節する修飾などの機能的集団から選択され得る。例えば、機能的集団は、サイトカインのレベルを増加させる化学修飾の集団又は選択であってもよい。他の機能的集団は、個々に、又は集合的に、1つ以上のサイトカインのレベルを低下させるように機能し得る。従って、キメラポリヌクレオチドにおいてこれらの同様の機能的修飾の選択を用いれば、「機能的集団キメラ」を構成し得る。本明細書で使用されるとき、「機能的集団キメラ」とは、そのユニークな機能的特徴が、上記に記載した

10

20

30

40

50

通りの修飾の集団によって定義されるものであってもよく、又はこの用語は、キメラポリヌクレオチドそれ自体の全体的な機能に適用することもできる。例えば、全体としてキメラポリヌクレオチドが、非修飾若しくは非キメラポリヌクレオチドと比較して、異なる、又はより優れた形で機能し得る。

【0100】

同じヌクレオシドタイプのいずれかの全ての均一な化学修飾を有するか、又は同じヌクレオシドタイプのいずれかの全てにおいて、若しくは同じヌクレオシドタイプのいずれか全ての一定パーセントにおいて、しかしランダムな組み込みで、同じ出発修飾の単なる漸減(downward titration)によって生じる修飾の集団を有するポリヌクレオチド、例えば、全てのウリジンがウリジン類似体、例えばプソイドウリジンにより置換される場合などは、キメラとみなされないことに留意すべきである。同様に、ポリヌクレオチド全体にわたり同じヌクレオシドタイプの2つ、3つ、又は4つの均一な化学修飾を有する(全てのウリジン及び全てのシトシン等が同じように修飾されているなどの)ポリヌクレオチドも、キメラポリヌクレオチドとはみなされない。キメラでないポリヌクレオチドの一例は、先行技術の標準プソイドウリジン/5-メチルシトシン修飾ポリヌクレオチドである。これらの先行技術のポリヌクレオチドは、in vitro転写(IVT)酵素合成によって完全に取得され;また、合成酵素の制約上、ポリヌクレオチドに見出される同じヌクレオシドタイプ、すなわち、アデノシン(A)、チミジン(T)、グアノシン(G)、シチジン(C)又はウリジン(U)の各々の存在毎に1種類の修飾のみを含む。

10

20

【0101】

本発明のキメラポリヌクレオチドは、構造的に修飾されても、又は化学的に修飾されてもよい。本明細書で使用されるとき、「構造的」修飾は、ヌクレオチドそれ自体に対する顕著な化学修飾なしに、キメラポリヌクレオチドにおいて2つ以上の連結ヌクレオシドが挿入され、欠失し、重複し、反転又はランダム化されるものである。構造的修飾が生じるには、必然的に化学結合が破壊され、再編成されることになるため、構造的修飾は化学的性質を帯びることから、化学修飾である。しかしながら、構造的修飾は、異なるヌクレオチド配列をもたらすことになる。例えば、ポリヌクレオチド「ATCG」は、化学的に修飾されて「AT-5meC-G」になり得る。同じポリヌクレオチドが、「ATCG」から「ATCCCG」へと構造的に修飾され得る。ここでは、ジヌクレオチド「CC」が挿入されており、これによりポリヌクレオチドの構造的修飾がもたらされる。

30

【0102】

本発明の一部の実施形態では、キメラポリヌクレオチドは、2つ以上のタンパク質又はペプチドをコードし得る。こうしたタンパク質又はペプチドは、抗体の重鎖及び軽鎖、酵素及びその基質、標識及びその結合分子、二次メッセンジャー及びその酵素又は多量体タンパク質若しくは複合体の成分を含む。

【0103】

本発明のキメラポリヌクレオチドの領域又は部分は、リンカー又はスペーサ部分によって分離され得る。こうしたリンカー又はスペーサは、核酸ベースであっても、又は非ヌクレオシドであってもよい。

40

【0104】

一実施形態では、本発明のキメラポリヌクレオチドは、自己開裂ペプチドをコードする配列を含んでもよい。自己開裂ペプチドは、限定はしないが、2Aペプチドであってもよい。非制限的例として、2Aペプチドは、タンパク質配列:GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP(配列番号1)、その断片又は変異体を有し得る。一実施形態では、2Aペプチドは、最後のグリシンと最後のプロリンとの間で開裂する。別の非制限的例として、本発明のキメラポリヌクレオチドは、タンパク質配列GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP(配列番号1)、その断片又は変異体を有する2Aペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含み得る。

【0105】

50

2 A ペプチドをコードするこうしたポリヌクレオチド配列の1つは、G G A A G C G G A G C T A C T A A C T T C A G C C T G C T G A A G C A G G C T G G A G A C G T G G A G G A G A A C C C T G G A C C T (配列番号2)である。ポリヌクレオチド配列は、本明細書に記載する方法及び/又は当技術分野において公知の方法によって修飾され、又はコドン最適化されてもよい。

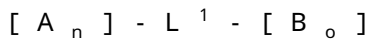
【0106】

一実施形態では、この配列を用いて、2つ以上の目的ポリペプチドのコード領域を分離することもできる。非制限的例として、2 A ペプチドをコードする配列は、第1のコード領域 A と第2のコード領域 B との間にあってもよい (A - 2 A p e p - B)。2 A ペプチドの存在により、1つの長いタンパク質が開裂してタンパク質 A、タンパク質 B 及び 2 A ペプチドになり得る。タンパク質 A とタンパク質 B は、同じ又は異なる目的ポリペプチドであってよい。別の実施形態では、2 A ペプチドを本発明のキメラポリヌクレオチドに用いて、2、3、4、5、6、7、8、9、10個又はそれ以上のタンパク質を産生させることができる。

10

【0107】

一実施形態では、本発明のキメラポリヌクレオチドは、式 I I :



式 I I

を含む配列を有し、

式中、A 及び B は各々、独立に、いずれかのヌクレオチド (例えば、ヌクレオチド) を含み；

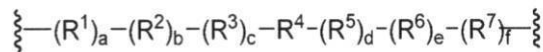
20

n 及び o は、独立に、10 ~ 10, 000、例えば、10 ~ 10000 又は 10 ~ 20000 の整数であり；

L¹ は、式 I I I :

【0108】

【化27】



式 III

30

の構造を有し、

式中、a、b、c、d、e、及び f は各々、独立に、0 又は 1 であり；

R¹、R³、R⁵、及び R⁷ の各々は、独立に、任意選択で置換された C₁ ~ C₆ アルキレン、任意選択で置換された C₁ ~ C₆ ヘテロアルキレン、O、S、及び N R⁸ から選択され；

R² 及び R⁶ は各々、独立に、カルボニル、チオカルボニル、スルホニル、又はホスホリルから選択され；

R⁴ は、任意選択で置換された C₁ ~ C₁₀ アルキレン、任意選択で置換された C₂ ~ C₁₀ アルケニレン、任意選択で置換された C₂ ~ C₁₀ アルキニレン、任意選択で置換された C₂ ~ C₉ ヘテロシクリレン、任意選択で置換された C₆ ~ C₁₂ アリーレン、任意選択で置換された C₂ ~ C₁₀₀ ポリエチレングリコレン、若しくは任意選択で置換された C₁ ~ C₁₀ ヘテロアルキレン、又は (R¹)_a - (R²)_b - (R³)_c を (R⁵)_d - (R⁶)_e - (R⁷)_f に連結する結合であり、ここで、a、b、c、d、e、及び f が 0 であるとき、R⁴ は、結合ではなく；

40

R⁸ は、水素、任意選択で置換された C₁ ~ C₄ アルキル、任意選択で置換された C₂ ~ C₄ アルケニル、任意選択で置換された C₂ ~ C₄ アルキニル、任意選択で置換された C₂ ~ C₆ ヘテロシクリル、任意選択で置換された C₆ ~ C₁₂ アリール、又は任意選択で置換された C₁ ~ C₇ ヘテロアルキルであり；

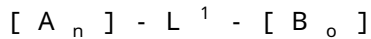
L¹ は、1つのヌクレオチドの糖の [A_n] 及び [B_o] (例えば、[A_n] のヌクレ

50

オシドの糖の 3' 位及び [B_o] のヌクレオシドの糖の 5' 位、又は [A_n] のヌクレオシドの糖の 5' 位及び [B_o] のヌクレオシドの糖の 3' 位) に結合する。

【 0 1 0 9 】

他の実施形態では、本発明のキメラポリヌクレオチドは、式 I I :



式 I I

を含む配列を有し、

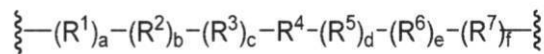
式中、A 及び B は各々、独立に、いずれかのヌクレオシド (例えば、ヌクレオチド) を含み；

n 及び o は、独立に、10 ~ 10, 000、例えば、10 ~ 10000 又は 10 ~ 20000 の整数であり；

L¹ は、式 I I I :

【 0 1 1 0 】

【 化 2 8 】



式 III

の構造を有し、

式中、a、b、c、d、e、及び f は各々、独立に、0 又は 1 であり；

R¹、R³、R⁵、及び R⁷ の各々は、独立に、任意選択で置換された C₁ ~ C₆ アルキレン、任意選択で置換された C₁ ~ C₆ ヘテロアルキレン、O、S、及び NR⁸ から選択され；

R² 及び R⁶ は各々、独立に、カルボニル、チオカルボニル、スルホニル、又はホスホリルから選択され；

R⁴ は、任意選択で置換された C₁ ~ C₁₀ アルキレン、任意選択で置換された C₂ ~ C₁₀ アルケニレン、任意選択で置換された C₂ ~ C₁₀ アルキニレン、任意選択で置換された C₂ ~ C₉ ヘテロシクリレン、任意選択で置換された C₆ ~ C₁₂ アリーレン、任意選択で置換された C₂ ~ C₁₀₀ ポリエチレングリコレン、若しくは任意選択で置換された C₁ ~ C₁₀ ヘテロアルキレン、又は (R¹)_a - (R²)_b - (R³)_c を (R⁵)_d - (R⁶)_e - (R⁷)_f に連結する結合であり；

R⁸ は、水素、任意選択で置換された C₁ ~ C₄ アルキル、任意選択で置換された C₂ ~ C₄ アルケニル、任意選択で置換された C₂ ~ C₄ アルキニル、任意選択で置換された C₂ ~ C₆ ヘテロシクリル、任意選択で置換された C₆ ~ C₁₂ アリール、又は任意選択で置換された C₁ ~ C₇ ヘテロアルキルであり；

L¹ は、1つのヌクレオシドの糖で [A_n] 及び [B_o] (例えば、[A_n] のヌクレオシドの糖の 3' 位及び [B_o] のヌクレオシドの糖の 5' 位、又は [A_n] のヌクレオシドの糖の 5' 位及び [B_o] のヌクレオシドの糖の 3' 位) に結合し；

ここで、[A_n] 及び [B_o] の少なくとも 1つは、式 I V 又は式 X V I I :

【 0 1 1 1 】

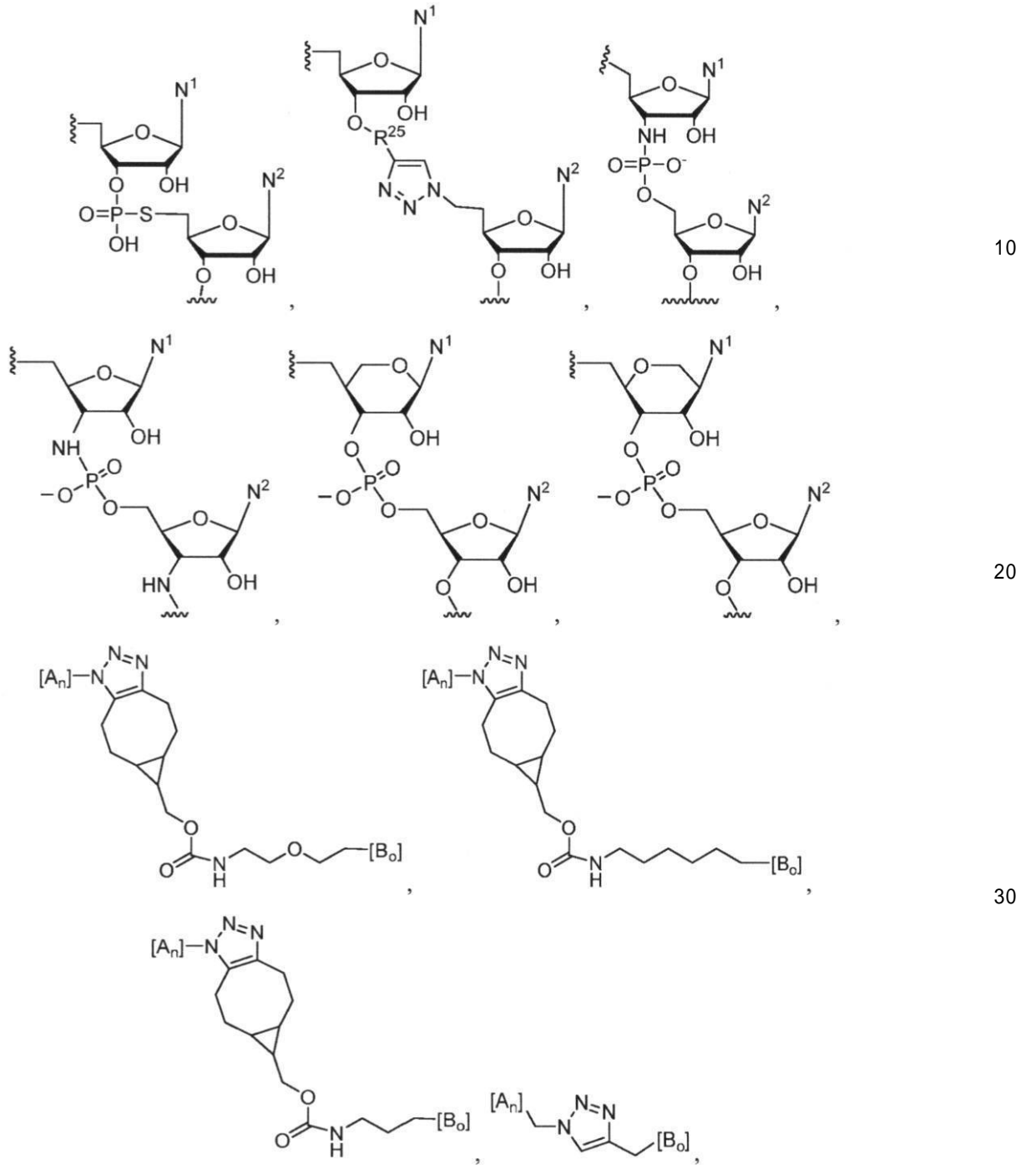
10

20

30

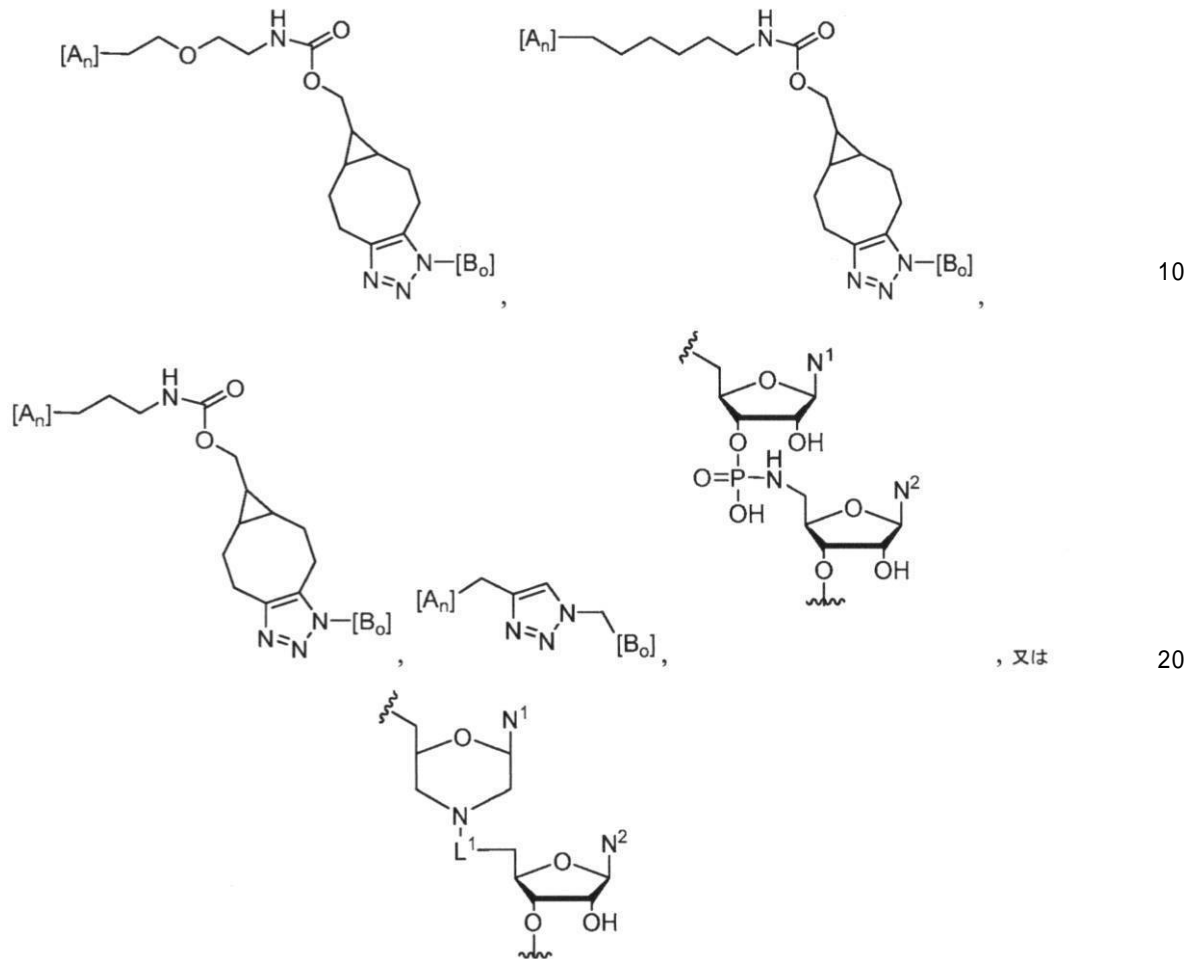
40

【化 3 0 - 1】



【 0 1 1 4】

【化 3 0 - 2】



の構造を含み、

式中、 R^{25} は、非存在であるか、任意選択で置換された $C_1 \sim C_6$ アルキレン、又は任意選択で置換された $C_1 \sim C_6$ ヘテロアルキレンである。 30

【0115】

一部の実施形態では、糖の 2' 位のヒドロキシルの存在によって、リボソーム認識の増大が可能になる。

本発明のキメラポリヌクレオチドのいくつかの実施形態では、コード領域、5' UTR、3' UTR、5' キャップ構造、又はポリ-A-テイルの 1 つは、 $[A_n] - L^1 - [B_o]$ を含む。

【0116】

本発明のキメラポリヌクレオチドの他の実施形態では、コード領域、5' UTR、3' UTR、5' キャップ構造、又はポリ-A-テイルの 1 つが、 $[A_n]$ を含み、5' UTR、3' UTR、5' キャップ構造、又はポリ-A-テイルのもう 1 つが、 $[B_o]$ を含む。例えば、一部の実施形態では、ポリAテイルが、 $[A_n]$ 又は $[B_o]$ の一方を含み、3' UTR が他方を含む。他の実施形態では、5' キャップ構造が、 $[A_n]$ 又は $[B_o]$ の一方を含み、5' UTR が他方を含む。 40

【0117】

一部の実施形態では、5' UTR は、少なくとも 1 つのコザック (Kozak) 配列を含む。

前述に関わらず、本発明のキメラポリヌクレオチドは、位置的に修飾されないか、又は本明細書に定義するキメラではない領域若しくは部分を含み得る。

【0118】

50

例えば、キメラポリヌクレオチドの領域又は部分は、1つ又は複数のA、T、C、G、若しくはUで均一に修飾されてもよいが、本発明によれば、ポリヌクレオチドが全領域又は部分にわたって均一に修飾されることはない。

【0119】

キメラポリヌクレオチドの領域又は部分は、15～1000ヌクレオチド長さであってもよく、ポリヌクレオチドは、本明細書に記載する通りの2～100個の異なる領域又は領域のパターンを有し得る。

【0120】

一実施形態では、キメラポリヌクレオチドは、1つ又は複数の目的のポリペプチドをコードする。別の実施形態では、キメラポリヌクレオチドは、実質的に非コードである。別の実施形態では、キメラポリヌクレオチドは、コード及び非コードの両方の領域及び部分を有する。

10

【0121】

図2は、図1のポリヌクレオチドのスcaffoldに基づいたときの本発明の特定のキメラポリヌクレオチドの設計を示す。この図には、キメラポリヌクレオチドの領域又は部分が示され、ここで模様付きの領域は、位置的に修飾されている領域を表し、白抜きの領域は、修飾されていることも又は修飾されていないこともあるが、修飾されている場合には均一に修飾されている領域を示す。本発明のキメラポリヌクレオチドは、完全に位置修飾されていてもよいし、又は部分的に位置修飾されていてもよい。キメラポリヌクレオチドはまた、サブ領域も有し得るが、これらは、任意のパターン又は設計であってよい。この図には、キメラサブ領域及びヘミマーサブ領域が示されている。

20

【0122】

一実施形態では、ペプチドをコードする本発明のキメラポリヌクレオチドの領域のうち最も短い長さは、ジペプチド、トリペプチド、テトラペプチド、ペンタペプチド、ヘキサペプチド、ヘプタペプチド、オクタペプチド、ノナペプチド、又はデカペプチドをコードするのに十分な長さであり得る。別の実施形態では、この長さは、2～30アミノ酸、例えば、5～30、10～30、2～25、5～25、10～25、又は10～20アミノ酸のペプチドをコードするのに十分であってもよい。この長さは、少なくとも11、12、13、14、15、17、20、25又は30アミノ酸のペプチド、又は40アミノ酸以下、例えば、35、30、25、20、17、15、14、13、12、11又は10アミノ酸以下のペプチドをコードするのに十分であってもよい。ポリヌクレオチド配列がコードすることのできるジペプチドの例として、限定はしないが、カルノシン及びアンセリンが挙げられる。

30

【0123】

一実施形態では、本発明の目的のポリペプチドをコードする領域の長さは、約30ヌクレオチド長より長い(例えば、約35、40、45、50、55、60、70、80、90、100、120、140、160、180、200、250、300、350、400、450、500、600、700、800、900、1,000、1,100、1,200、1,300、1,400、1,500、1,600、1,700、1,800、1,900、2,000、2,500、及び3,000、4,000、5,000、6,000、7,000、8,000、9,000、10,000、20,000、30,000、40,000、50,000、60,000、70,000、80,000、90,000以上、又は100,000ヌクレオチド以下)。本明細書で使用されるとき、こうした領域は「コード領域」又は「領域コーディング」と呼ばれることがある。

40

【0124】

一部の実施形態では、キメラポリヌクレオチドは、約30～約100,000ヌクレオチド(例えば、30～50、30～100、30～250、30～500、30～1,000、30～1,500、30～3,000、30～5,000、30～7,000、30～10,000、30～25,000、30～50,000、30～70,000、100～250、100～500、100～1,000、100～1,500、100～3

50

, 000、100~5, 000、100~7, 000、100~10, 000、100~25, 000、100~50, 000、100~70, 000、100~100, 000、500~1, 000、500~1, 500、500~2, 000、500~3, 000、500~5, 000、500~7, 000、500~10, 000、500~25, 000、500~50, 000、500~70, 000、500~100, 000、1, 000~1, 500、1, 000~2, 000、1, 000~3, 000、1, 000~5, 000、1, 000~7, 000、1, 000~10, 000、1, 000~25, 000、1, 000~50, 000、1, 000~70, 000、1, 000~100, 000、1, 500~3, 000、1, 500~5, 000、1, 500~7, 000、1, 500~10, 000、1, 500~25, 000、1, 500~50, 000、1, 500~70, 000、1, 500~100, 000、2, 000~3, 000、2, 000~5, 000、2, 000~7, 000、2, 000~10, 000、2, 000~25, 000、2, 000~50, 000、2, 000~70, 000、及び2, 000~100, 000)を含む。

【0125】

本発明によれば、キメラポリヌクレオチドの領域又はサブ領域はまた、独立に、15~1, 000ヌクレオチド長の範囲(例えば、30、40、45、50、55、60、70、80、90、100、120、140、160、180、200、250、300、350、400、450、500、600、700、800、及び900ヌクレオチド超、又は少なくとも30、40、45、50、55、60、70、80、90、100、120、140、160、180、200、250、300、350、400、450、500、600、700、800、900、及び1, 000ヌクレオチド)であってよい。

【0126】

本発明によれば、キメラポリヌクレオチドの領域又はサブ領域は、非存在から500ヌクレオチド長の範囲(例えば、少なくとも60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、250、300、350、400、450、又は500ヌクレオチド)であってもよい。領域がポリAテイルである場合、長さは、ポリA結合タンパク質の結合の単位で、又はその関数として決定され得る。この実施形態では、ポリAテイルは、ポリA結合タンパク質の少なくとも4個のモノマーと結合するのに十分な長さである。ポリA結合タンパク質モノマーは、約38ヌクレオチドの区間に結合する。このように、約80ヌクレオチド及び160ヌクレオチドのポリAテイルが機能性であることが認められている。mRNAとして機能する本発明のキメラポリヌクレオチドは、ポリAテイルを含まなくてもよい。

【0127】

本発明によれば、mRNAとして機能するキメラポリヌクレオチドは、キャッピング領域を有し得る。キャッピング領域は、単一のキャップ、又はキャップを形成する一連のヌクレオチドを含み得る。この実施形態では、キャッピング領域は、1~10、例えば、2~9、3~8、4~7、1~5、5~10、若しくは少なくとも2、又は10以下のヌクレオチド長であってよい。一部の実施形態では、キャップは存在しない。

【0128】

環状キメラポリヌクレオチドのアーキテクチャ

本発明は、環状又は環式のキメラポリヌクレオチドを考慮する。その名称が示すように、環状ポリヌクレオチドは本質的に環状であり、つまり、連結、共有結合、同じタンパク質又は他の分子若しくは複合体との共通の会合によるか、あるいは、ハイブリダイゼーションによるかに関わらず、末端が何らかの方法で結合されていることを意味する。例えば、同時係属国際公開第2015034925号パンフレット(この内容は、全体として参照により本明細書に組み込む)に教示される通りの任意の環状ポリヌクレオチドは、本発明に従って、キメラにすることができる。

【0129】

本発明のキメラポリヌクレオチドは、図6~図12に示す環状RNA構築物スカフォール

10

20

30

40

50

ルドに従って設計することができる。こうしたポリヌクレオチドは、環状キメラポリヌクレオチド又は環状構築物である。

【0130】

本明細書で使用されるとき、「環状ポリヌクレオチド」又は「circP」は、実質的にRNAのように作用し、且つRNAの特性を有する一本鎖環状ポリヌクレオチドを意味する。用語「環状」はまた、circPの二次又は三次構造を包含することも意図される。

【0131】

少なくとも1つの目的のポリペプチドをコードする本発明のcircPは、環状RNA又はcircRNAとして知られている。本明細書で使用されるとき、「環状RNA」又は「circRNA」は、少なくとも1つの目的のポリペプチドをコードすることができる環状ポリヌクレオチドを意味する。少なくとも1つのセンサー配列を含み、且つ目的のポリペプチドをコードしない本発明のcircPは、環状スポンジ又はcircSPとして知られる。本明細書で使用されるとき、「環状スポンジ」、「環状ポリヌクレオチドスポンジ」又は「circSP」は、少なくとも1つのセンサー配列を含み、且つ目的のポリペプチドをコードしない環状ポリヌクレオチドを意味する。本明細書で使用されるとき、「センサー配列」は、内因性核酸結合分子の受容体又は擬似受容体を意味する。センサー配列の非制限的例としては、マイクロRNA結合部位、マイクロRNAシード配列、シード配列のないマイクロRNA結合部位、転写因子結合部位、及び擬似受容体として作用するように操作された人工結合部位並びにこれらの一部分及び断片が挙げられる。

10

20

【0132】

少なくとも1つのセンサー配列を含み、且つ少なくとも1つの目的のポリペプチドをコードする本発明のcircPは、環状RNAスポンジ又はcircRNA-SPとして知られる。本明細書で使用されるとき、「環状RNAスポンジ」又は「circRNA-SP」は、少なくとも1つのセンサー配列と、少なくとも1つの目的のポリペプチドをコードする少なくとも1つの領域とを含む環状ポリヌクレオチドを意味する。

【0133】

図6は、本発明の代表的な環状構築物200を示す。本明細書で使用されるとき、用語「環状構築物」は、RNA分子と実質的に同様に作用し、且つその特性を有し得る環状ポリヌクレオチド転写物を指す。一実施形態では、環状構築物は、mRNAとして作用する。環状構築物が、1つ又は複数の目的のポリペプチドをコードする場合（例えば、circRNA又はcircRNA-SP）、ポリヌクレオチド転写物は、そこでコードされる目的のポリペプチドの翻訳を可能にするのに十分な構造的及び/又は化学的特徴を保持している。環状構築物は、本発明のポリヌクレオチドであってもよい。構造的又は化学的に修飾されているとき、構築物は、修飾circP、circSP、circRNA又はcircRNA-SPと呼ばれることもある。

30

【0134】

図6に戻ると、ここで環状コンストラクト200は、第1のフランキング領域204と第2のフランキング領域206とがフランキングする第1の連結ヌクレオチド領域202を含む。本明細書で使用されるとき、「第1の領域」は、「コード領域」、「非コード領域」又は「領域コーディング」又は単に「第1領域」と呼ばれることもある。一実施形態では、この第1の領域は、限定はしないが、目的のポリペプチドをコードするヌクレオチド及び/又はセンサー領域をコードするか、若しくはそれを含むヌクレオチドなどを含み得る。ポリヌクレオチドは、その5'末端で、シグナル配列領域203内の1つ又は複数のシグナルペプチド配列をコードし得る。第1のフランキング領域204は、mRNA及び/又はDNA配列内の非翻訳領域(UTR)と同様に作用し得る連結ヌクレオチド領域又はその一部分を含み得る。第1のフランキング領域はまた、極性領域208を含んでもよい。極性領域208は、IRES配列又はその一部分を含み得る。非制限的例として、線状化されたとき、この領域が分断して、第1の部分が第1領域202の5'末端上になり、第2の部分が第1領域202の3'末端上になり得る。第2のフランキング領域20

40

50

6は、テイル付加配列領域210を含むことができ、mRNA及び/又はDNAのUTRと同様に作用し得る連結ヌクレオチドの領域又はその部分212を含むことができる。

【0135】

第1領域202の5'末端と第1フランキンク領域204とを架橋するのが、第1の作動領域205である。一実施形態では、この作動領域は、開始コドンを含んでもよい。あるいは、この作動領域は、開始コドンを含む任意の翻訳開始配列又はシグナルを含んでもよい。

【0136】

第1領域202の3'末端と第2フランキンク領域206とを架橋するのが、第2の作動領域207である。伝統的に、この作動領域は、終止コドンを含む。あるいは、この作動領域は、終止コドンを含む任意の翻訳開始配列又はシグナルを含み得る。本発明によれば、複数の連続する終止コドンを用いてもよい。一実施形態では、本発明の作動領域は2つの終止コドンを含み得る。第1の終止コドンは「TGA」又は「UGA」であってもよく、第2の終止コドンは、「TAA」、「TGA」、「TAG」、「UAA」、「UGA」又は「UAG」からなる群から選択されてもよい。

10

【0137】

図7を参照すると、環状ポリヌクレオチド200の調製に少なくとも1つの非核酸部分201が使用されてもよく、その場合、非核酸部分201を用いて、第1フランキンク領域204を第2フランキンク領域206に近付ける。本発明で使用することができる非核酸部分の非制限的例は、本明細書に記載する。環状ポリヌクレオチド200は、2つ以上の非核酸部分を含むことができ、これらのさらなる非核酸部分は、第1の非核酸部分に対して異種であっても、又は同種であってもよい。

20

【0138】

図8を参照すると、第1の連結ヌクレオチド領域202は、スペーサ領域214を含み得る。このスペーサ領域214を使用することにより、第1の連結ヌクレオチド領域202を分離して、環状構築物が、2つ以上のオープンリーディングフレーム、非コード領域又はオープンリーディングフレーム及び非コード領域を含むことができるようにしてもよい。

【0139】

図9を参照すると、第2のフランキンク領域206は、3'UTR212に1つ又は複数のセンサー領域216を含み得る。本明細書で論述する通りのこれらのセンサー配列は、環状構築物又は環状ポリヌクレオチドの局所微小環境のリガンドに対する擬似受容体(又は結合部位)として動作する。例えば、マイクロRNA結合部位又はmiRNAシードは、これらが、環状ポリヌクレオチドの環境に存在する任意のマイクロRNAに対する擬似受容体として機能するように、センサーとして用いることができる。図9に示すように、1つ又は複数のセンサー領域216は、スペーサ領域214によって分離することができる。

30

【0140】

図10に示すように、1つ又は複数のセンサー領域216を含む環状構築物200は、第1の連結ヌクレオチド領域202内にスペーサ領域214を含んでもよい。図7について上で述べたように、このスペーサ領域214を使用することにより、第1の連結ヌクレオチド領域202を分離して、環状構築物が、2つ以上のオープンリーディングフレーム及び/又は2つ以上の非コード領域を含むことができるようにしてもよい。

40

【0141】

図11を参照すると、環状構築物200は、少なくとも1つの非コード領域、例えば、限定はしないが、センサー領域216を含むcircSPとして知られる非コード構築物であってもよい。センサー領域216の各々は、限定はしないが、miR配列、miRシード、miR結合部位及び/又はシードのないmiR配列を含み得る。

【0142】

図12を参照すると、少なくとも1つの核酸部分201を用いて、非コード構築物であ

50

る環状ポリヌクレオチド200を調製することができる。非コード構築物である環状ポリヌクレオチド200は、2つ以上の非核酸部分を含んでもよく、ここで、追加の非核酸部分は、第1の非核酸部分に対して異種又は同種のいずれであってもよい。

【0143】

キメラポリヌクレオチドの多量体

本発明によれば、3'末端で修飾されているヌクレオチドを用い、3'末端を介して複数の異なるキメラポリヌクレオチドを互いに連結することができる。細胞への送達の化学量論を制御するために化学的コンジュゲーションを用いることができる。例えば、グリオキシル酸回路酵素であるイソクエン酸リアーゼ及びリンゴ酸シンターゼを1:1比で細胞に供給すると、細胞脂肪酸代謝が改変され得る。この比は、一方のキメラポリヌクレオチド種の3'-アジド末端ヌクレオチドと、反対側のキメラポリヌクレオチド種のC5-エチニル又はアルキニル含有ヌクレオチドを使用して、キメラポリヌクレオチドを化学的に連結することにより制御することができる。修飾ヌクレオチドは、ターミナルトランスフェラーゼ(ニュー・イングランド・バイオラボ(New England Biolabs)、マサチューセッツ州イプスウィッチ)を使用し、製造者のプロトコルに従って、転写後に付加する。3'-修飾ヌクレオチドの付加後、銅の存在又は非存在下、2つのキメラポリヌクレオチド種を水溶液中で結合させて、文献に記載される通りのクリックケミストリー機構により新規の共有結合性の連結を形成することができる。

10

【0144】

別の例では、官能化されたリンカー分子を用いて、3つ以上のポリヌクレオチドを互いに連結させてもよい。例えば、官能化サッカリド分子が複数の化学反応基(SH-、NH₂-、N₃など)を含有するように化学的に修飾することにより、3'-官能化mRNA分子(すなわち、3'-マレイミドエステル、3'-NHS-エステル、アルキニル)のコグネイト部分と反応させることができる。修飾されたサッカリドの反応基の数を化学量論的に制御することにより、共役させるキメラポリヌクレオチドの化学量論比を直接制御することができる。

20

【0145】

キメラポリヌクレオチドのコンジュゲート及び組み合わせ

タンパク質産生をさらに促進するために、本発明のキメラポリヌクレオチドは、他のポリヌクレオチド、色素、挿入剤(例えばアクリジン)、架橋剤(例えばソラレン、マイトマイシンC)、ポルフィリン(TPPC4、テキサフィリン、サフィリン(Sapphyrin))、多環式芳香族炭化水素(例えば、フェナジン、ジヒドロフェナジン)、人工エンドヌクレアーゼ(例えば、EDTA)、アルキル化剤、リン酸塩、アミノ、メルカプト、PEG(例えば、PEG-40K)、MPEG、[MPEG]₂、ポリアミノ、アルキル、置換アルキル、放射性標識マーカ、酵素、ハプテン(例えばビオチン)、輸送/吸収促進剤(例えば、アスピリン、ビタミンE、葉酸)、合成リボヌクレアーゼ、タンパク質、例えば、糖タンパク質類、又はペプチド、例えば、コリガンドに対して特異的親和性を有する分子、又は抗体、例えば、癌細胞、内皮細胞、若しくは骨細胞などの指定の細胞型に結合する抗体、ホルモン及びホルモン受容体、非ペプチド種、例えば、脂質、レクチン、炭水化物、ビタミン、補因子、又は薬物と共役するように設計することができる。

30

40

【0146】

共役は、安定性及び/又は半減期の増大をもたらすことができ、キメラポリヌクレオチドを細胞、組織又は生物中の特定の部位にターゲティングする上で特に有用となり得る。

本発明によれば、キメラポリヌクレオチドは、RNAi剤、siRNA、shRNA、miRNA、miRNA結合部位、アンチセンスRNA、リボザイム、触媒DNA、tRNA、トリプルヘリックス形成を誘導するRNA、アプタマー又はベクターなどの1つ又は複数と一緒に投与してもよいし、それと共役させるか、又はそれをさらにコードし得る。

【0147】

二官能性キメラポリヌクレオチド

50

本発明の一実施形態では、二官能性ポリヌクレオチド（例えば、二官能性キメラポリヌクレオチド）がある。名称が意味するように、二官能性ポリヌクレオチドは、少なくとも2つの官能基を有するか、又はその能力を有するものである。これらの分子は、慣例により、多官能性と呼ばれることもある。

【0148】

二官能性ポリヌクレオチドの複数の官能性は、RNAによってコードされ得る（官能基は、コードされた産物が翻訳されるまで、現れない場合がある）か、又はポリヌクレオチド自体の特性であってもよい。これは、構造的又は化学的のいずれであってもよい。二官能性修飾ポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチドと共有結合又は静電気結合した官能基を含んでもよい。さらに、2つの官能基は、キメラポリヌクレオチドと別の分子との複合体として提供されてもよい。

10

【0149】

二官能性ポリヌクレオチドは、抗増殖性であるペプチドをコードし得る。これらのペプチドは、線状、環状、拘束、又はランダムコイルであってもよい。これらは、アダプター、シグナル伝達分子、リガンド又はそれらの模倣体若しくは擬似物として機能し得る。抗増殖性ペプチドは、翻訳されると、3～50アミノ酸長となり得る。これらのペプチドは、5～40、10～30、又は約15アミノ酸長であってもよい。これらは、単鎖、複鎖若しくは分岐状のいずれであってもよく、また、一旦翻訳されると、複合体、凝集体、又はいずれかのマルチユニット構造を形成し得る。

【0150】

20

非コードキメラポリヌクレオチド

本明細書に記載するように、部分的又は実質的に翻訳不可能な領域を有し得る、例えば、非コード領域を有するキメラポリヌクレオチドが提供される。こうした非コード領域は、キメラポリヌクレオチドの「第1の領域」であってもよい。あるいは、非コード領域は、第1の領域以外の領域であってもよい。このような分子は、概して、翻訳されないが、リボソームタンパク質若しくは輸送RNA（tRNA）などの1つ又は複数の翻訳機構成分との結合及びそれらの隔離の1つ又は複数により、タンパク質産生に作用を及ぼし、それによって、細胞でのタンパク質発現を効果的に低減するか、又は細胞中の1つ又は複数の経路若しくはカスケードを調節して、タンパク質レベルを改変することができる。キメラポリヌクレオチドは、1つ又は複数の長鎖ノンコーディングRNA（lncRNA、若しくはlinRNA）若しくはその部分、核小体RNA（sno-RNA）、マイクロRNA（miRNA）、低分子干渉RNA（siRNA）又はPwi-相互作用RNA（piRNA）を含有するか、又はコードし得る。上記のlncRNA分子及びこうしたlncRNAをターゲティングするように設計されたRNAi構築物（そのいずれもキメラポリヌクレオチドにおいてコードされ得る）の例は、国際公開第2012/018881 A2号パンフレット（この内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）に教示されている。

30

【0151】

目的のポリペプチド

本発明のキメラポリヌクレオチドは、1つ又は複数の目的のペプチド又はポリペプチドをコードし得る。本発明のキメラポリヌクレオチドはまた、1つ又は複数のポリペプチドのレベル、シグナル伝達又は機能に影響を及ぼし得る。本発明によれば、目的のポリペプチドには、以下の文献に教示されるもの、例えば、そこに掲載されているもののいずれかを含む：国際公開第2013151666号パンフレット、同第2013151668号パンフレット、同第2013151663号パンフレット、同第2013151669号パンフレット、同第2013151670号パンフレット、同第2013151664号パンフレット、同第2013151665号パンフレット、同第2013151736号パンフレットの表6；国際公開第2013151672号パンフレットの表6及び7；国際公開第2013151671号パンフレットの表6、178及び179；国際公開第2013151667号パンフレットの表6、185及び186（これら各々の内容は、全

40

50

体として参照により本明細書に組み込む)。

【0152】

本発明によれば、キメラポリヌクレオチドは、1つ又は複数の目的のポリペプチド又はその断片をコードするように設計することができる。こうした目的のポリペプチドとしては、限定はしないが、全ポリペプチド、複数のポリペプチド又はポリペプチドの断片を挙げることができ、これらは、独立に、キメラポリヌクレオチドの1つ又は複数の領域若しくは部分又はその全体によってコードされ得る。本明細書で使用されるとき、用語「目的のポリペプチド」は、本発明のキメラポリヌクレオチド内でコードされるように選択されるか、又はそれによって機能が影響を受ける任意のポリペプチドを指す。

【0153】

本明細書で使用されるとき、「ポリペプチド」は、最も一般的にはペプチド結合により連結されたアミノ酸残基(天然若しくは非天然)のポリマーを意味する。この用語は、本明細書で使用されるとき、任意のサイズ、構造、又は機能のタンパク質、ポリペプチド、及びペプチドを指す。いくつかの事例では、コードされたポリペプチドは、約50アミノ酸より小さく、その場合、ポリペプチドは、ペプチドと呼ばれる。ポリペプチドがペプチドであるとき、それは、少なくとも約2、3、4、又は少なくとも5アミノ酸残基長となる。従って、ポリペプチドは、遺伝子産物、天然に存在するポリペプチド、合成ポリペプチド、ホモログ、オルソログ、パラログ、断片並びにこれらの他の同等物、変異体、及び類似体を含む。ポリペプチドは、単分子であってもよいし、又は二量体、三量体若しくは四量体などの多分子複合体であってもよい。これらはまた、抗体若しくはインスリンなどの一本鎖又は複鎖ポリペプチドを含んでもよいし、結合又は連結していてもよい。最も一般的には、複鎖ポリペプチドにはジスルフィド結合が存在する。また、ポリペプチドという用語は、1つ又は複数のアミノ酸残基が、対応する天然アミノ酸の人工的化学類似体である、アミノ酸ポリマーにも適用され得る。

【0154】

「ポリペプチド変異体」という用語は、ネイティブ又は基準配列とはアミノ酸配列が異なる分子を指す。アミノ酸配列は、ネイティブ又は基準配列と比較して、アミノ酸配列内の特定の位置に置換、欠失、及び/又は挿入を有し得る。通常、変異体は、ネイティブ又は基準配列に対して少なくとも約50%の同一性(相同性)を有し、好ましくは、ネイティブ又は基準配列に対して少なくとも約80%、より好ましくは、少なくとも約90%同一(相同)である。

【0155】

一部の実施形態では、「変異体模倣体」が提供される。本明細書で用いられるとき、「変異体模倣体」という用語は、活性化配列を模倣する1つ又は複数のアミノ酸を含有するものである。例えば、グルタミン酸塩は、ホスホロ-トレオニン及び/又はホスホロ-セリンの模倣体として役立つ。あるいは、変異体模倣体は、脱活性化又は模倣体を含有する不活性化産物をもたらす場合もあり、例えば、フェニルアラニンは、チロシンの不活性化置換物として作用し;又はアラニンは、セリンの不活性化置換物として作用し得る。

【0156】

「相同性」は、アミノ酸配列に適用されるとき、配列をアラインメントし、最大相同率を達成するために、必要であれば、ギャップを導入した後、第2配列中のアミノ酸配列の残基と同一である候補アミノ酸配列中の残基のパーセンテージとして定義される。アラインメントのための方法及びコンピュータプログラムは、当技術分野において公知である。相同性は、同一性(%)の計算に左右されるが、計算に導入されたギャップ及びペナルティによって値が相違し得る。

【0157】

「相同体」は、ポリペプチド配列に適用されるとき、第2の種の第2配列と実質的な同一性を有する他の種の対応する配列を意味する。

「類似体」は、1つ又は複数のアミノ酸改変、例えば、アミノ酸残基の置換、付加若しくは欠失によって異なるが、親若しくは出発ポリペプチドの特性の1つ又は複数に依然と

10

20

30

40

50

して維持するポリペプチド変異体を包含するものとする。

【0158】

本発明は、変異体及び誘導体を含む、ポリペプチドベースの数種の組成物を考慮する。これらは、置換、挿入、欠失及び共有結合変異体及び誘導体を含む。用語「誘導体」は、用語「変異体」と類義に用いられるが、一般に、基準分子又は出発分子に対して何らかの方法で修飾及び/又は変更されている分子を指す。

【0159】

従って、基準配列、特に、本明細書に開示するポリペプチド配列に対して、置換、挿入、及び/又は付加、欠失及び共有結合修飾を含むポリペプチドをコードするキメラポリヌクレオチドは、本発明の範囲に含まれる。例えば、1つ又は複数のリシンなどの配列タグ又はアミノ酸を本発明のペプチド配列に付加することができる（例えば、N末端若しくはC末端で）。配列タグは、ペプチド精製又は局在化に用いることができる。リシンは、ペプチド溶解度を高めるか、又はビオチン化を可能にするために用いることができる。あるいは、ペプチド又はタンパク質のアミノ酸配列のカルボキシ及びアミノ末端領域に位置するアミノ酸残基を任意選択で欠失させて、切断型配列を取得することもできる。いくつかのアミノ酸（例えば、C末端又はN末端残基）は、例えば、可溶性であるか、又は固体支持体に結合したより大きな配列の一部として配列の発現など、配列の用途に応じて欠失させてもよい。

10

【0160】

「置換変異体」は、ポリペプチドに関連する場合、ネイティブ又は出発配列中の少なくとも1つのアミノ酸残基が除去されており、同じ位置のその場所に挿入された異なるアミノ酸を有するものである。置換は、単一（その場合、分子中のただ1つのアミノ酸が置換されている）であってもよいし、又は多数（その場合、同じ分子中の2つ以上のアミノ酸が置換されている）であってもよい。

20

【0161】

本発明で使用されるとき、「保存的アミノ酸置換」という用語は、類似のサイズ、電荷、又は極性を有する別のアミノ酸による、配列に通常存在するアミノ酸の置換を指す。保存的置換の例として、イソロイシン、バリン及びロイシンなどの非極性（疎水性）残基による別の非極性残基の置換がある。同様に、保存的置換の例として、アルギニンとリシン同士、グルタミンとアスパラギン同士、並びにグリシンとセリン同市など、ある極性（親水性）残基による別の残基の置換が挙げられる。さらに、リシン、アルギニン若しくはヒスチジンなどの塩基性残基による別の残基の置換、又はアスパラギン酸又はグルタミン酸などのある酸性残基による別の酸性残基の置換は、保存的置換の別の例である。非保存的置換の例として、イソロイシン、バリン、ロイシン、アラニン、メチオニンなどの非極性（疎水性）アミノ酸残基による、システイン、グルタミン、グルタミン酸若しくはリシンなどの極性（親水性）残基の置換及び/又は極性残基による非極性残基の置換が挙げられる。

30

【0162】

ポリペプチドに関連する場合、「挿入変異体」は、ネイティブ又は出発配列における特定の位置のアミノ酸に直接隣接して挿入される1つ又は複数のアミノ酸を有するものである。アミノ酸に「直接隣接して」とは、アミノ酸の -カルボキシ又は -アミノ官能基のいずれかに連結することを意味する。

40

【0163】

ポリペプチドに関連する場合、「欠失変異体」は、ネイティブ又は出発アミノ酸配列において1つ又は複数のアミノ酸が除去されたものである。通常、欠失変異体は、分子の特定の領域で1つ又は複数のアミノ酸が欠失することになる。

【0164】

ポリペプチドに関連する場合、「共有結合誘導体」は、有機タンパク質性若しくは非タンパク質性誘導体化剤によるネイティブ又は出発タンパク質の修飾、及び/又は翻訳後修飾を含む。共有結合修飾は、伝統的に、選択した側鎖若しくは末端残基と反応することが

50

できる有機誘導体化剤と、タンパク質の標的アミノ酸残基を反応させることによって、又は選択した組換え宿主細胞で機能する翻訳後修飾の機構を抑制することによって導入される。得られる共有結合誘導体は、組換え糖タンパク質の免疫親和性精製のための抗タンパク質抗体の生物活性、免疫アッセイ、又は調製に重要な残基を見出すことを目的とするプログラムにおいて有用である。こうした修飾は、当業者の通常の技術の範囲内であり、過度の実験を行うことなく実施される。

【0165】

いくつかの翻訳後修飾は、発現されたポリペプチドに対する組換え宿主細胞の作用によって得られる。グルタミンル及びアスパラギンル残基は、翻訳後、対応するグルタミンル及びアスパルチル残基に、脱アミド化されることが多い。あるいは、これらの残基は、弱酸性条件下で脱アミド化される。これらの残基のいずれの形態も、本発明に従って生成されるポリペプチド中に存在し得る。

10

【0166】

その他の翻訳後修飾として、プロリン及びリシンのヒドロキシル化、セリル若しくはトレオニル残基のヒドロキシル基のリン酸化、リシン、アルギニン及びヒスチジン側鎖の-アミノ基のメチル化が挙げられる(T. E. Creighton (T. E. Creighton) 著、「タンパク質：構造及び分子特性 (Proteins: Structure and Molecular Properties)」、W. H. フリーマン社 (W. H. Freeman & Co.)、サンフランシスコ、pp. 79~86、1983年)。

20

【0167】

ポリペプチドに関連する場合、「特徴」は、分子の異なるアミノ配列ベースの成分として定義される。本発明のキメラポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドの特徴としては、表面出現、局所立体構造形状、フォールド、ループ、ハーフループ、ドメイン、ハーフドメイン、部位、末端又はこれらの任意の組み合わせが挙げられる。

【0168】

本明細書において、ポリペプチドに関連して用いられるとき、用語「表面出現」は、最表面上に出現するタンパク質のポリペプチドベースの成分を指す。

本明細書において、ポリペプチドに関連して用いられるとき、用語「局所立体構造形状」は、タンパク質の画定可能な空間内に位置するタンパク質のポリペプチドベースの構造出現を意味する。

30

【0169】

本明細書において、ポリペプチドに関連して用いられるとき、用語「フォールド」は、エネルギー最小化時に得られるアミノ酸配列の立体配座を指す。フォールドは、フォールディングプロセスの二次又は三次レベルで起こり得る。二次レベルの例として、シート及びヘリックスがある。三次フォールドの例として、エネルギー力の凝集又は分離によって形成されたドメイン及び領域がある。このようにして形成された領域には、疎水性及び親水性ポケットなどがある。

【0170】

本明細書において、タンパク質立体配座に関連して用いられるとき、用語「ターン (turn)」は、ペプチド又はポリペプチドの骨格の方向を変更する曲がりを含み、1、2、3個若しくはそれ以上のアミノ酸残基を伴い得る。

40

【0171】

本明細書において、ポリペプチドに関連して用いられるとき、用語「ループ」は、ペプチド又はポリペプチドの骨格の方向を逆転するのに役立つポリペプチドの構造的特徴を指す。ループがポリペプチドに存在し、骨格の方向を変更するだけであれば、これは、4個以上のアミノ酸残基を含み得る。オリバ (Oliva) らは、少なくとも5つのクラスのアミノ酸残基を見出している (分子生物学会誌 (J. Mol Biol) 第266巻 (4) : p. 814~830; 1997年)。ループは、開又は閉のいずれであってもよい。閉ループ又は「環状」ループは、架橋部分の間に、2、3、4、5、6、7、8、9、10個又はそれ以上のアミノ酸を含み得る。こうした架橋部分は、ジスルフィド架

50

橋を有するポリペプチドに典型的なシステイン - システイン架橋 (Cys - Cys) を含んでもよいし、あるいは、架橋部分は、本明細書で使用するジプロモジリル剤のように、非タンパク質ベースであってもよい。

【0172】

本明細書において、ポリペプチドに関連して用いられるとき、用語「ハーフループ」は、それが由来するループのアミノ酸残基数の少なくとも半分を有する、同定されたループの一部を指す。ループは、必ずしも偶数のアミノ酸残基を含むとは限らないことは理解されたい。従って、ループが、奇数のアミノ酸を含むか、又は含むことが判明した場合には、奇数ループのハーフループは、ループの整数部分又は次の整数部分を含むことになる (ループのアミノ酸の数 / 2 + / - 0.5 アミノ酸)。例えば、7アミノ酸ループとして同定されたループは、3アミノ酸又は4アミノ酸 ($7 / 2 = 3.5 + / - 0.5$ は、3又は4) のハーフループを生成し得る。

10

【0173】

本明細書において、ポリペプチドに関連して用いられるとき、用語「ドメイン」は、1つ又は複数の同定可能な構造又は機能的特徴若しくは特性 (例えば、タンパク質 - タンパク質相互作用のための部位として作用する、結合能力) を有するポリペプチドのモチーフを指す。

【0174】

本明細書において、ポリペプチドに関連して用いられるとき、用語「ハーフドメイン」は、それが由来するドメインのアミノ酸残基数の少なくとも半分を有する、同定されたドメインの一部を意味する。ドメインは、必ずしも偶数のアミノ酸残基を含むとは限らないことは理解されたい。従って、ドメインが、奇数のアミノ酸を含むか、又は含むことが判明した場合には、奇数ドメインのハーフドメインは、ドメインの整数部分又は次の整数部分を含むことになる (ドメインのアミノ酸の数 / 2 + / - 0.5 アミノ酸)。例えば、7アミノ酸ドメインとして同定されたドメインは、3アミノ酸又は4アミノ酸 ($7 / 2 = 3.5 + / - 0.5$ は、3又は4) のハーフドメインを生成し得る。また、ドメイン又はハーフドメイン内にサブドメインが識別される場合もあり、これらのサブドメインは、それらが由来するドメイン又はハーフドメインにおいて同定される全構造若しくは機能的特性の一部を有することも理解されたい。さらに、本明細書のドメインタイプのいずれかを含むアミノ酸が、ポリペプチドの骨格に沿って連続的である必要はない (すなわち、非隣接アミノ酸は、ドメイン、ハーフドメイン又はサブドメインを生成するように構造的にフォールドし得る) ことも理解されたい。

20

30

【0175】

本明細書において、ポリペプチドに関連して用いられるとき、用語「部位」は、アミノ酸ベースの実施形態に関する場合、「アミノ酸残基」及び「アミノ酸側鎖」と類義に使用される。部位は、本発明のポリペプチドベースの分子内で修飾、操作、改変、誘導体化若しくは変異され得る、ペプチド又はポリペプチド内の位置を表す。

【0176】

本明細書において、ポリペプチドに関連して用いられるとき、用語「(複数の) 末端」又は「末端」は、ペプチド又はポリペプチドの末端を指す。こうした末端は、ペプチド又はポリペプチドの最初若しくは最後の部位に限定されるわけではなく、末端領域内の別のアミノ酸も含み得る。本発明のポリペプチドベースの分子は、N末端 (遊離アミノ基 (NH₂) を有するアミノ酸で終結) 及びC末端 (遊離カルボキシル基 (COOH) を有するアミノ酸で終結) の両方を有することを特徴とし得る。本発明のタンパク質は、一部の事例で、ジスルフィド結合により、又は非共有結合力によって連結された複数のポリペプチド鎖から構成されている (多量体、オリゴマー)。こうした種類のタンパク質は、複数のN及びC末端を有することになる。あるいは、場合に応じて、有機コンジュゲートなどの非ポリペプチドベースの部分で開始又は終了するように、ポリペプチドの末端を修飾してもよい。

40

【0177】

50

一旦これらの特徴のいずれかが、本発明の環状一次構築物、キメラポリヌクレオチドによってコードしようとするポリペプチドの所望の成分として同定又は決定されたら、移動、交換、反転、欠失、ランダム化若しくは複製によって上記の特徴のいくつかの操作及び/又は修飾のいずれかを実施してよい。さらに、特徴の操作によって、本発明の分子に対する修飾と同じ結果が生じ得ることも理解されたい。例えば、ドメインの欠失を含む操作によって、完全長より短い分子をコードするような核酸の修飾と全く同じ分子の長さの改変が起こり得る。

【0178】

修飾及び操作は、限定はしないが、部位指定突然変異誘発、又は化学合成の間の事前組み込みなどの当技術分野では公知の方法により達成することができる。次に、こうして得られた修飾分子は、本明細書に記載するもの又は当技術分野で公知であるいずれか他の好適なスクリーニングアッセイなどの *in vitro* 又は *in vivo* アッセイを用いて活性について試験してもよい。

10

【0179】

本発明によれば、ポリペプチドは、共通配列を含んでもよく、これは、複数ラウンドの実験によって見出される。本明細書で用いられるとき、「共通」配列は、1つ又は複数の部位での可変性を可能にする配列の集団を代表する1配列である。

【0180】

当業者には認識されるように、タンパク質断片、機能性タンパク質ドメイン、及び相同タンパク質も、本発明の目的のポリペプチドの範囲内に含まれると考えられる。例えば、本明細書において、基準タンパク質10、20、30、40、50、60、70、80、90、100又は100以上のアミノ酸長のいずれかのタンパク質断片(基準ポリペプチド配列より少なくとも1アミノ酸残基短いか、あるいはそれと等しいポリペプチド配列を意味する)が提供される。別の例では、本明細書に記載する配列のいずれかと約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約95%、又は約100%同一である約20、約30、約40、約50、若しくは約100アミノ酸の区間を含む任意のタンパク質を本発明に従って使用することができる。いくつかの実施形態では、本発明に従って使用されるポリペプチドは、本明細書で提供又は参照される配列のいずれかに示されるように、2、3、4、5、6、7、8、9、10、若しくはそれ以上の突然変異を含む。

20

30

【0181】

目的のポリペプチドのタイプ

本発明のキメラポリヌクレオチドは、いくつかの標的カテゴリーのいずれかから選択される目的ポリペプチドをコードするように設計することができ、こうしたカテゴリーとして、限定はしないが、以下のものが挙げられる：生物学的製剤、抗体、ワクチン、治療用タンパク質又はペプチド、細胞透過性ペプチド、分泌タンパク質、原形質膜タンパク質、細胞質又は細胞骨格タンパク質、細胞内膜結合タンパク質、核タンパク質、ヒト疾患に関連するタンパク質、ターゲティング部分、又は治療適用は見出されていないが、それにも関わらず研究及び創薬の分野で有用性があるヒトゲノムによってコードされるタンパク質。

40

【0182】

一実施形態では、キメラポリヌクレオチドは、基準ポリペプチド配列とある程度の同一性を有する変異体ポリペプチドをコードし得る。本明細書で使用されるとき、「基準ポリペプチド配列」は、出発ポリペプチド配列を指す。基準配列は、野生型配列、又は別の配列の設計で参照されるいずれの配列であってもよい。「基準ポリペプチド配列」は、例えば、国際公開第2013151666号パンフレット、同第2013151668号パンフレット、同第2013151663号パンフレット、同第2013151669号パンフレット、同第2013151670号パンフレット、同第2013151664号パンフレット、同第2013151665号パンフレット、同第2013151736号パンフレットの表6；国際公開第2013151672号パンフレットの表6及び7；国際公

50

開第2013151671号パンフレットの表6、178及び179；国際公開第2013151667号パンフレットの表6、185及び186（これら各々の内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）に開示されているポリペプチドのいずれであってもよい。

【0183】

基準分子（ポリペプチド又はポリヌクレオチド）は、設計された分子（ポリペプチド又はポリヌクレオチド）とある程度の同一性を共有する。用語「同一性」は、当技術分野で公知のように、配列を比較することにより決定される通りの、2つ以上のペプチド、ポリペプチド又はポリヌクレオチドの配列同士の関係性を指す。当技術分野では、同一性は、2つ以上のアミノ酸残基又はヌクレオシドの鎖同士の一致の数によって決定される通りの、ペプチド同士の配列関連性の度合も意味する。同一性では、特定の数学モデル又はコンピュータプログラム（すなわち「アルゴリズム」）によって処理される、2つ以上の配列の小さい方とギャップアラインメント（もしあれば）の間の完全な一致のパーセントを測定する。関連ペプチドの同一性は、公知の方法によって容易に計算することができる。このような方法として、限定はしないが、以下の文献に記載されているものが挙げられる：「分子計算生物学（Computational Molecular Biology）」、レスク，A.M.（Lesk，A.M.）編、オックスフォード大学プレス（Oxford University Press）、ニューヨーク州、1988年；「バイオコンピューティング：インフォマティクス及びゲノムプロジェクト（Biocomputing: Informatics and Genome Projects）」、スミス，D.W.（Smith，D.W.）編、アカデミック・プレス（Academic Press）、ニューヨーク州、1993年；「配列データのコンピュータ解析（Computer Analysis of Sequence Data）」、第1部、グリフィン，A.M.（Griffin，A.M.）及びグリフィン，H.G.（Griffin，H.G.）編、ヒューマナ・プレス（Humana Press）、ニュージャージー州、1994年；「分子生物学における配列解析（Sequence Analysis in Molecular Biology）」、フォン・ハイネ，G.（von Heinje，G.）著、アカデミック・プレス（Academic Press）、1987年；「配列解析プライマー（Sequence Analysis Primer）」、グリブスコフ，M.（Gribnikov，M.）及びデベロー，J.（Devereux，J.）編、M.ストックトン・プレス（M. Stockton Press）、ニューヨーク州、1991年；カリロ（Carillo）ら著、SIAM応用数学会誌（SIAM J. Applied Math.）、第48巻、p.1073、1988年。

【0184】

一部の実施形態では、ポリペプチド変異体は、基準ポリペプチドと同じか、又は類似の活性を有してもよい。あるいは、変異体は、基準ポリペプチドに対して改変された（例えば、増大又は低減した）活性を有してもよい。概して、本発明の特定のポリヌクレオチド又はポリペプチドの変異体は、本明細書に記載され、また当業者には周知の配列アラインメントプログラム及びパラメータにより決定される通りに、特定の基準ポリヌクレオチド又はポリペプチドに対して、少なくとも約40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の、しかし約100%未満の配列同一性を有することになる。こうしたアラインメントのツールとして、BLASTスイート（ステフェン F.アルトシエル（Stephen F. Altschul）、トーマス L.マッデン（Thomas L. Madden）、アレハンドロ A.シェファー（Alejandro A. Schaeffer）、ジンフィ・チャン（Jinghui Zhang）、チェン・チャン（Zheng Zhang）、ウェブ・ミラー（Webb Miller）、及びデイビッド J.リップマン（David J. Lipman）著、1997年、「ギャップ付BLAST及びPSI-BLAST：新世代タンパク質データベース検

10

20

30

40

50

索プログラム (G a p p e d B L A S T a n d P S I - B L A S T : a n e w g e n e r a t i o n o f p r o t e i n d a t a b a s e s e a r c h p r o g r a m s)」、核酸研究 (N u c l e i c A c i d s R e s .)、第 2 5 卷、p . 3 3 8 9 ~ 3 4 0 2) のツールがある。

【 0 1 8 5 】

B L A S T アルゴリズムのデフォルトパラメータとしては、例えば、期待閾値 1 0、ワードサイズ 2 8、マッチ/ミスマッチスコア 1、- 2、ギャップコストリニア (G a p c o s t s L i n e a r) がある。任意のフィルター、並びに例えば、ホモサピエンス (H o m o s a p i e n s) などの種特異的 反復単位の選択を適用することができる。

【 0 1 8 6 】

生物製剤

本明細書に開示するキメラポリヌクレオチドは、1 種又は複数種の生物製剤をコードし得る。本明細書で用いられるとき、「生物製剤」は、本明細書に提供される方法で生成され、重症又は命を脅かす疾患若しくは病状を治療、治癒、緩和、予防、又は診断するために使用することができるポリペプチドベースの分子である。生物製剤は、同時係属国際公開第 2 0 1 5 0 3 4 9 2 8 号パンフレット (その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む) において、例えば、パラグラフ [0 0 0 1 5 9] 及び [0 0 0 1 6 0] に記載されている。

【 0 1 8 7 】

抗体

本明細書に開示するキメラポリヌクレオチドは、1 種又は複数種の抗体若しくはその断片をコードし得る。用語「抗体」は、モノクローナル抗体 (免疫グロブリン F c 領域を有する完全長抗体)、多エピトープ特異性、多重特異性抗体 (例えば、二重特異性抗体、ダイアボディ、及び単鎖分子)、並びに抗体断片を含む。抗体は、同時係属国際公開第 2 0 1 5 0 3 4 9 2 8 号パンフレット (その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む) において、例えば、パラグラフ [0 0 0 1 6 1] ~ [0 0 0 1 6 7] に記載されている。

【 0 1 8 8 】

ワクチン

本明細書に開示するキメラポリヌクレオチドは、1 種又は複数種のワクチンをコードし得る。本明細書で用いられるとき、「ワクチン」は、特定の疾患又は感染因子に対する免疫を向上させる生物学的製剤である。本発明によれば、現在市販されているか、若しくは開発中の 1 種又は複数種のワクチンが、本発明のキメラポリヌクレオチドによりコードされ得る。特定の理論に拘束される意図はないが、本発明のキメラポリヌクレオチドへの組み込みは、少なくとも部分的に、構築物設計の特異性、純度及び選択性によって、改善された治療効果をもたらすと考えられる。

【 0 1 8 9 】

本発明のキメラポリヌクレオチドにコードされるワクチンは、多くの治療分野、例えば、限定はしないが、心血管、C N S、皮膚科、内分泌学、腫瘍学、免疫学、呼吸器、及び抗感染症における病状又は疾患を治療するために使用することができる。

【 0 1 9 0 】

治療用タンパク質又はペプチド

本明細書に開示するキメラポリヌクレオチドは、1 種又は複数種の承認済又は「試験中の」治療用タンパク質又はペプチドをコードし得る。

【 0 1 9 1 】

本発明によれば、現在市販されているか、若しくは開発中の 1 種又は複数種の治療用タンパク質又はペプチドは、本発明のキメラポリヌクレオチドによってコードされ得る。特定の理論に拘束される意図はないが、本発明のキメラポリヌクレオチドへの組み込みは、少なくとも部分的に、構築物設計の特異性、純度及び選択性によって、改善された治療効果をもたらすと考えられる。

10

20

30

40

50

【0192】

本発明のキメラポリヌクレオチドにコードされる治療用タンパク質又はペプチドは、多くの治療分野、例えば、限定はしないが、血液、心血管、CNS、中毒（抗毒素を含む）、皮膚科、内分泌学、遺伝学、泌尿生殖器、胃腸、筋骨格、腫瘍学、及び免疫学、呼吸器、感覚並びに抗感染症における病状又は疾患を治療するために使用することができる。

【0193】

細胞透過性ポリペプチド

本明細書に開示するキメラポリヌクレオチドは、1種又は複数種の細胞透過性ポリペプチドをコードし得る。本明細書で用いられるとき、「細胞透過性ポリペプチド」又はCPは、細胞による分子の取り込みを促進することができるポリペプチドを指す。本発明の細胞透過性ポリペプチドは、1種又は複数種の検出可能な標識を含んでもよい。ポリペプチドは、部分的に標識しても、又は全体を完全に標識してもよい。キメラポリヌクレオチドは、検出可能な標識を完全にコードしてもよいし、一部をコードするか、又は全くコードしなくてもよい。細胞透過性ペプチドはまた、シグナル配列を含んでもよい。本明細書で用いられるとき、「シグナル配列」は、タンパク質翻訳中の新生タンパク質のアミノ末端で結合したアミノ残基の配列を指す。シグナル配列は、細胞透過性ポリペプチドの分泌をシグナル伝達するために用いることができる。

10

【0194】

一実施形態では、キメラポリヌクレオチドはまた、融合タンパク質もコードし得る。融合タンパク質は、荷電タンパク質を治療用タンパク質に作動可能に連結することによって作製することができる。本明細書で用いられるとき、「作動可能に連結される」は、細胞に導入されると、複合体の発現を可能にするように連結された治療用タンパク質と荷電タンパク質を指す。本明細書で用いられるとき、「荷電タンパク質」は、正、負又は総合中和電荷を帯びたタンパク質を指す。治療用タンパク質は、融合タンパク質の形成中に荷電タンパク質に共有結合させるのが好ましい。表面電荷と総又は表面アミノ酸の比は、約0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8又は0.9であってよい。

20

【0195】

キメラポリヌクレオチドによりコードされる細胞透過性ポリペプチドは、翻訳後に、複合体を形成し得る。複合体は、細胞透過性ポリペプチドに連結した、例えば、共有結合した荷電タンパク質を含んでもよい。「治療用タンパク質」は、細胞に投与されると、治療、診断、及び/若しくは予防効果を有し、並びに/又は所望の生物学的及び/若しくは薬理学的効果を有するタンパク質を指す。

30

【0196】

一実施形態では、細胞透過性ポリペプチドは、第1ドメイン及び第2ドメインを含んでもよい。第1ドメインは、超荷電ポリペプチドを含み得る。第2ドメインは、タンパク質結合パートナーを含み得る。本明細書で用いられるとき、「タンパク質結合パートナー」は、限定はしないが、抗体及びその機能性断片、スカフォールドタンパク質、又はペプチドを含む。細胞透過性ポリペプチドは、タンパク質結合パートナーに対する細胞内結合パートナーをさらに含んでもよい。細胞透過性ポリペプチドは、キメラポリヌクレオチドが導入され得る細胞から分泌させることができる。細胞透過性ポリペプチドはまた、第1細胞を透過することもできる。

40

【0197】

別の実施形態では、細胞透過性ポリペプチドは、第2細胞を透過することができる。第2細胞は、第1細胞と同じ部位に由来するものであってもよいし、又は異なる部位に由来するものでよい。部位として、限定はしないが、組織及び臓器が挙げられる。第2細胞はまた、第1細胞に対し近位又は遠位のいずれかであってもよい。

【0198】

一実施形態では、キメラポリヌクレオチドは、タンパク質結合パートナーを含み得る細胞透過性ポリペプチドをコードすることもできる。タンパク質結合パートナーとして、限

50

定はしないが、抗体、超荷電抗体又は機能性断片が挙げられる。キメラポリヌクレオチドは、タンパク質結合パートナーを含む細胞透過性ポリペプチドが導入される細胞に導入してもよい。

【0199】

分泌タンパク質

ヒト及び他の真核細胞は、膜によって多数の機能的に異なるコンパートメントに細分されている。膜で仕切られたコンパートメント、すなわち細胞小器官の各々は、細胞小器官の機能に必須の異なるタンパク質を含有する。細胞は、タンパク質を特定の細胞小器官にターゲティングするために、タンパク質内に位置するアミノ酸モチーフである「選別シグナル」を使用する。

10

【0200】

シグナル配列、シグナルペプチド、又はリーダ配列と呼ばれる1タイプの選別シグナルは、小胞体(E R)と呼ばれる細胞小器官に1クラスのタンパク質を向ける。

シグナル配列によってE Rにターゲティングされたタンパク質は、分泌タンパク質として細胞外空間に放出させることができる。同様に、細胞膜上に常在するタンパク質も、タンパク質を膜に保持する「リンカー」のタンパク質分解切断によって、細胞外空間に分泌させることができる。特定の理論に拘束される意図はないが、上記の細胞輸送を利用するために、本発明の分子を用いることができる。従って、本発明の一部の実施形態では、分泌したタンパク質を発現させるために、キメラポリヌクレオチドが提供される。分泌させるタンパク質は、本明細書に記載するもの、又は米国特許出願公開第20100255574号明細書(その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む)に記載のものから選択してもよい。

20

【0201】

一実施形態では、これらは、多量のヒト遺伝子産物の製造に用いることができる。

形質膜タンパク質

本発明の一部の実施形態では、形質膜タンパク質を発現させるために、キメラポリヌクレオチドが提供される。

【0202】

細胞質又は細胞骨格タンパク質

本発明の一部の実施形態では、細胞質又は細胞骨格タンパク質を発現させるために、キメラポリヌクレオチドが提供される。

30

【0203】

細胞内膜結合タンパク質

本発明の一部の実施形態では、細胞内膜結合タンパク質を発現させるために、キメラポリヌクレオチドが提供される。

【0204】

核タンパク質

本発明の一部の実施形態では、核タンパク質を発現させるために、キメラポリヌクレオチドが提供される。

【0205】

ヒトの疾患に関連するタンパク質

本発明の一部の実施形態では、ヒトの疾患に関連するタンパク質を発現させるために、キメラポリヌクレオチドが提供される。

40

【0206】

その他のタンパク質

本発明の一部の実施形態では、現在未知の治療機能を有するタンパク質を発現させるために、キメラポリヌクレオチドが提供される。

【0207】

ターゲティング部分

本発明の一部の実施形態では、ターゲティング部分を発現するキメラポリヌクレオチド

50

が提供される。これらは、タンパク質結合パートナー又は細胞の表面上の受容体を含み、*in vivo*又は*in vitro*のいずれかで細胞を特定の組織空間にターゲティングする、又は特定の部分と相互作用する機能を果たす。好適なタンパク質結合パートナーとして、限定はしないが、抗体及びその機能性断片、スカフォールドタンパク質、又はペプチドがある。さらに、*circRNA*は、脂質、炭水化物、又はその他の生物学的部分若しくは生体分子の合成及び細胞外局在化を指令するために使用することもできる。

【0208】

ペプチドライブラリー

一実施形態では、キメラポリヌクレオチドは、ポリペプチドライブラリーを生成するために用いてもよい。これらのライブラリーは、各々が様々な構造的又は化学修飾設計を含むキメラポリヌクレオチドの集団から生じ得る。この実施形態では、キメラポリヌクレオチドの集団は、限定はしないが、抗体若しくは抗体断片、タンパク質結合パートナー、スカフォールドタンパク質、並びに本明細書に教示する又は当技術分野で公知の他のポリペプチドを含む、複数のコードされたポリペプチドを含み得る。好ましい実施形態では、キメラポリヌクレオチドは、標的細胞又は培養物への直接導入に好適であると考えられ、これらの標的細胞又は培養物が、コードされたポリペプチドを合成することができる。

10

【0209】

いくつかの実施形態では、各々が異なるアミノ酸修飾を含むタンパク質の様々な変異体を生成して、これらを試験することにより、薬物動態、安定性、生体適合性、及び/若しくは生物活性、又は発現レベルなどの生物物理学的特性に関して最良の変異体を決定することができる。このようなライブラリーは、 10 、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、若しくは 10^9 超の考えられる変異体（限定はしないが、1つ又は複数の残基の置換、欠失、及び1つ又は複数の残基の挿入を含む）を含み得る。

20

【0210】

抗菌及び抗ウイルスポリペプチド

本発明のキメラポリヌクレオチドは、1種又は複数種の抗菌ペプチド（AMP）又は抗ウイルスペプチド（AVP）をコードするように設計することができる。AMP及びAVPは、限定はしないが、微生物、脊椎動物、植物、両性類、鳥類、魚類、及び哺乳動物などの非常に多様な動物から単離され、記載されている（ワング（Wang）ら著、核酸研究（*Nucleic Acids Res.*）、2009年、p. 37（データベース特集号）：D933-7）。抗菌及び抗ウイルスポリペプチドは、国際公開第2013151666号パンフレットに記載されており、その内容は、参照により本明細書に組み込むものとする。非制限的例として、抗菌ポリペプチドが、国際公開第2013151666号パンフレット（その内容は、参照により本明細書に組み込む）の段落[000189]～[000199]に記載されている。別の非制限的例として、抗ウイルスポリペプチドが、国際公開第2013151666号パンフレット（その内容は、参照により本明細書に組み込む）の段落[000189]～[000195]及び[000200]に記載されている。

30

【0211】

キメラポリヌクレオチド領域

一実施形態では、キメラポリヌクレオチドは、他の核酸ベースの分子の既知の領域又は部分と同様に機能する領域、サブ領域若しくは部分を含むように設計することができる。こうした領域には、本明細書で述べるmRNA領域並びに非コード領域が含まれる。非コード領域は、領域が1つ又は複数の細胞傷害性ヌクレオチドであるか又はそれを組み込む場合のように、単一ヌクレオチドのレベルであってもよい。

40

【0212】

細胞傷害性ヌクレオチド

一実施形態では、本発明のキメラポリヌクレオチドは、1種又は複数種の細胞傷害性ヌクレオチドを組み込んでいてもよい。細胞傷害性ヌクレオチドは、同時係属国際公開第2

50

015034928号パンフレット(その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む)において、例えば、パラグラフ[000194]~[000198]に記載されている。

【0213】

非翻訳領域(UTR)を有するキメラポリヌクレオチド

本発明のキメラポリヌクレオチドは、非翻訳領域として作用又は機能する1つ又は複数の領域又は部分を含み得る。キメラポリヌクレオチドが目的のポリペプチドをコードするように設計される場合、キメラポリヌクレオチドは、これらの非翻訳領域のうちの1つ以上を含み得る。

【0214】

定義上、遺伝子の野生型非翻訳領域(UTR)は、転写されるが、翻訳されない。mRNAにおいて、5'UTRは、転写開始部位から始まり、開始コドンまで続くが、開始コドンは含まないのに対して、3'UTRは、終止コドンの直後から始まり、転写終結シグナルまで続く。核酸分子の安定性及び翻訳に関してUTRが果たす調節の役割についての一連の証拠が増えている。UTRの調節に関する特徴を本発明のキメラポリヌクレオチドに組み込むことにより、分子の安定性を増強することができる。さらに、特定の特徴を組み込むことにより、転写物が所望外の器官部位に誤って向けられた場合に、転写物の制御された下方調節を確実にすることもできる。

【0215】

5'UTR及び翻訳開始

天然の5'UTRは、転写開始において役割を果たすという特徴を有する。これらは、シグネチャー様コザック(Kozak)配列を有し、これらの配列は、リボソームが多くの遺伝子の翻訳を開始するプロセスに関与していることが一般に知られている。コザック(Kozak)配列は、共通CCR(A/G)CCAUGGを有し、ここで、Rは、開始コドン(AUG)の3塩基上流のプリン(アデニン又はグアニン)であり、これにもう1つの「G」が続く。5'UTRはまた、伸長因子結合に関与する二次構造を形成することもわかっている。

【0216】

特定の標的臓器の豊富に発現される遺伝子に典型的に見出される特徴を操作することによって、本発明のキメラポリヌクレオチドの安定性及びタンパク質産生を増強することができる。例えば、アルブミン、血清アミロイドA、アポリポタンパク質A/B/E、トラスフェリン、フェトプロテイン、エリスロポエチン、又は因子VIIIIなどの肝臓に発現するmRNAの5'UTRの導入を用いて、肝細胞株若しくは肝臓におけるキメラポリヌクレオチドなどの核酸分子の発現を増強することができる。同様に、該当組織における発現の向上を目的とする、他の組織特異的mRNAからの5'UTRの使用は、筋肉(MyoD、ミオシン、ミオグロビン、ミオゲニン、ヘルクリン)、上皮細胞(Tie-1、CD36)、骨髄細胞(C/EBP、AML1、G-CSF、GM-CSF、CD11b、MSR、Fr-1、i-NOS)、白血球(CD45、CD18)、脂肪組織(CD36、GLUT4、ACRP30、アディポネクチン)及び肺上皮細胞(SP-A/B/C/D)についても可能である。キメラポリヌクレオチドの設計及び製造に有用な非翻訳領域として、限定はしないが、同時係属中で、共同所有の米国特許出願(USSN)第61/829372号明細書(代理人整理番号M42)(その内容は全体として参照により本明細書に組み込む)に開示されるものが挙げられる。

【0217】

キメラポリヌクレオチド内の領域又はサブ領域として他の非UTR配列を使用してもよい。例えば、イントロン又はイントロン配列の部分を本発明のキメラポリヌクレオチドの領域に組み込んでよい。イントロン配列の組み込みにより、タンパク質産生並びにポリヌクレオチドレベルが増加し得る。

【0218】

特徴の組み合わせをフランキング領域に含ませてもよいし、他の特徴内に含有させても

10

20

30

40

50

よい。例えば、ORFは、強力なコザック翻訳開始シグナルを含有し得る5'UTR及び/又はポリAテイルの鋳型付加のためのオリゴ(dT)配列を含み得る3'UTRによってフランキングされてもよい。5'UTRは、米国特許出願公開第20100293625号明細書(本明細書において全体として参照により組み込む)に記載される5'UTRなどの、同じ及び/又は異なる遺伝子由来の第1のポリヌクレオチド断片と第2のポリヌクレオチド断片とを含んでもよい。

【0219】

同時係属中で、共同所有の国際公開第201416453号パンフレット(代理人整理番号M42)は、本発明のキメラポリヌクレオチドでフランキング領域として使用することができる例示的UTRの一覧を提供している。5'又は3'UTRの変異体を使用してもよく、この場合、末端に対し、A、T、C又はGを含めた1つ又は複数のヌクレオチドが付加又は除去されている。

10

【0220】

キメラポリヌクレオチドの領域に、任意の遺伝子由来の任意のUTRが組み込まれ得ることは理解すべきである。さらに、任意の既知の遺伝子の複数の野生型UTRを使用してもよい。また、野生型領域の変異体でない人工UTRを提供することも、本発明の範囲に含まれる。これらのUTR又はその部分は、それらが選択された元の転写物と同じ配向で配置してもよいし、又は配向若しくは位置が変更されてもよい。従って、5'又は3'UTRは、反転、短縮、延長してもよいし、1つ又は複数の他の5'UTR若しくは3'UTRと共にキメラ化してもよい。本明細書で使用されるとき、用語「変更される」は、UTR配列に関する場合、UTRが基準配列に対して何らかの形で変更されていることを意味する。例えば、3'又は5'UTRは、野生型又は天然UTRに対し、上記に教示したように配向若しくは位置の変更によって変更してもよいし、又は追加ヌクレオチドの含有、ヌクレオチドの欠失、ヌクレオチドの交換若しくは転位によって変更してもよい。「変更された」UTR(3'又は5'のいずれであるかに関わらず)を生成するこれらの変更のいずれも、変異UTRを構成する。

20

【0221】

一実施形態では、5'又は3'UTRなどの二重、三重又は四重UTRを用いてもよい。本明細書で用いられるとき、「二重」UTRは、同じUTRの2つのコピーが、連続して、又は実質的に連続して、コードされるものである。例えば、米国特許出願公開第20100129877号明細書(これは、全体として参照により本明細書に組み込む)に記載されている通りに、二重 - グロブリン3'UTRを用いることができる。

30

【0222】

さらに、パターン化UTRを有することも本発明の範囲に含まれる。本明細書で用いられるとき、「パターン化UTR」は、1回、2回、又は3回以上反復されるA B A B A B若しくはA A B B A A B B A A B B若しくはA B C A B C A B C若しくはそれらの変形などの反復又は交互のパターンを表すUTRである。これらのパターンにおいて、A、B、又はCの各文字は、ヌクレオチドレベルで異なるUTRを表す。

【0223】

一実施形態では、そのタンパク質が、共通の機能、構造、特性の特徴を有する転写物のファミリーから、フランキング領域を選択する。例えば、目的のポリペプチドは、特定の細胞、組織又は発生中のある時点で発現されるタンパク質のファミリーに属し得る。これらの遺伝子のいずれかに由来するUTRを同じ又は異なるタンパク質ファミリーの任意の他のUTRと交換して、新たなキメラポリヌクレオチドを作製することができる。本明細書で用いられるとき、「タンパク質のファミリー」は、少なくとも1つの機能、構造、特徴、局在化、起源、若しくは発現パターンを共通に有する2つ以上の目的のポリペプチドの群を指して、最も広義に用いられる。

40

【0224】

非翻訳領域はまた、翻訳エンハンサーエレメント(TEE)を含んでもよい。非制限的例として、TEEは、米国特許出願公開第20090226470号明細書(これは全体

50

として参照により本明細書に組み込む)に記載されるもの、及び当技術分野で公知のものを含んでもよい。

【0225】

3' UTR及びAUリッチエレメント

天然又は野生型3' UTRは、アデノシンとウリジンが埋め込まれた区間を有することがわかっている。これらのAUリッチシグネチャーは、高速度のターンオーバーを有する遺伝子において特に優勢である。それらの配列の特徴及び機能的特性に基づいて、AUリッチエレメント(ARE)は、次の3つのクラスに分けることができる(チェン(Chen)ら著、1995年):クラスI AREは、Uリッチ領域内にAUUAモチーフのいくつかの分散したコピーを含む。C-My c及びMy o Dは、クラスI AREを含む。クラスII AREは、2つ以上のオーバーラップするUUAUUUA(U/A)(U/A)ノナーを有する。このタイプのAREを含有する分子としては、GM-CSF及びTNF-aがある。クラスIII AREは、それほど明確に定義されていない。これらのUリッチ領域は、AUUAモチーフを含んでいない。c-Jun及びミオゲニンは、このクラスの十分に研究された2つの例である。AREに結合するほとんどのタンパク質は、メッセンジャーを脱安定化するのに対し、ELAVファミリーのメンバー、とりわけHuRは、mRNAの安定性を増大することが文献に記載されている。HuRは、3つのクラス全てのAREに結合する。核酸分子の3' UTRにHuR特異的結合部位を操作により導入すれば、HuRの結合、従って、in vivoでのメッセージの安定化が達成されることになる。

10

20

【0226】

3' UTR AUリッチエレメント(ARE)の導入、除去又は修飾を用いて、本発明のキメラポリヌクレオチドの安定性を調節することができる。特定のキメラポリヌクレオチドを操作する場合、AREの1つ又は複数のコピーを導入して、本発明のキメラポリヌクレオチドをより不安定にすることができ、それにより翻訳を短縮し、その結果得られるタンパク質の生産を低減する。同様に、AREを同定し、除去又は突然変異させて、細胞内安定性を増大し、それにより、翻訳、並びにその結果得られるタンパク質の生産を増大することもできる。本発明のキメラポリヌクレオチドを用いて、トランスフェクション実験を関連細胞株で実施することができ、トランスフェクション後の様々な時点でタンパク質の生産をアッセイすることができる。例えば、異なるARE操作分子で細胞をトランスフェクトすることができ、関連タンパク質に対しELISAキットを用いて、トランスフェクトから6時間、12時間、24時間、48時間、及び7日後に産生されたタンパク質をアッセイすることができる。

30

【0227】

マイクロRNA結合部位

マイクロRNA(又はmiRNA)は、19~25ヌクレオチド長の非コードRNAであり、これは、核酸分子の3' UTRに結合して、核酸分子安定性を低減するか、又は翻訳を阻害するかのいずれかにより、遺伝子発現を下方制御する。本発明のキメラポリヌクレオチドは、1つ又は複数のマイクロRNA標的配列、マイクロRNA配列、又はマイクロRNAシードを含んでもよい。このような配列は、米国特許出願公開第2005/0261218号明細書及び同第2005/0059005号明細書(その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む)に教示されているものなどのいずれか公知のマイクロRNAに対応し得る。

40

【0228】

マイクロRNA配列は、「シード」領域、すなわち成熟マイクロRNAの2~8位の領域の配列を含み、この配列は、マイクロRNA標的配列に対して完全なワトソン-クリック(Watson-Crick)相補性を有する。マイクロRNAシードは、成熟マイクロRNAの2~8位又は2~7位を含み得る。一部の実施形態では、マイクロRNAシードは、7個のヌクレオチド(例えば、成熟マイクロRNAの2~8位)を含み得るが、この場合、対応するmiRNA標的におけるシード相補性部位は、マイクロRNA1位に向

50

き合うアデニン (A) によってフランキングされる。一部の実施形態では、マイクロRNAシードは、6個のヌクレオチド (例えば、成熟マイクロRNAのヌクレオチド2~7位) を含み得るが、この場合、対応するmiRNA標的におけるシード相補性部位は、マイクロRNA1位と向き合うアデニン (A) によってフランキングされる。例えば、グリムソン A (Grimson A)、ファー KK (Farh KK)、ジョンストン WK (Johnston WK)、ギャレット-エンジェレ P (Garret-Englele P)、リム LP (Lim LP)、バーテル DP (Bartel DP) ら著、分子細胞 (Mol Cell)、2007年、7月6日、第27巻(1)、p. 91~105 (これらの各々は、全体として参照により本明細書に組み込む) を参照されたい。マイクロRNAシードの塩基は、標的配列と完全な相補性を有する。該当するマイクロRNAが利用可能であれば、マイクロRNA標的配列の操作により本発明のキメラポリヌクレオチド (例えば、3' UTR様領域又は他の領域) に導入することによって、分解又は翻訳低減のために分子をターゲティングすることができる。このプロセスは、核酸分子送達の際のオフターゲット効果の危険性を軽減し得る。マイクロRNA、マイクロRNA標的領域、並びに生物学におけるそれらの発現パターン及び役割が報告されている (ボナウアー (Bonauer) 著、カレント・ドラッグ・ターゲット (Curr Drug Targets)、2010年、第11巻、p. 943~949; アナド (Anand) 及びチェレシュ (Cheresh) 著、カレント・オピニオン・イン・ヘマトロジー (Curr Opin Hematol)、2011年、第18巻、p. 171~176; コントラス (Contreras) 及びラオ (Rao) 著、白血病 (Leukemia)、2012年、第26号、p. 404~413 (2011年、12月20日、doi: 10.1038/leu.2011.356); バーテル (Bartel) 著、細胞 (Cell)、2009年、第136巻、p. 215~233; ランドグラフ (Landgraf) 著、細胞 (Cell)、2007年、第129巻、p. 1401~1414; これらの各々は、全体として参照により本明細書に組み込む)。

10

20

30

40

50

【0229】

例えば、核酸分子が、mRNAであり、肝臓に送達されるのではなく、そこに最後まで留まることが意図される場合、肝臓に豊富なマイクロRNAであるmiR-122は、miR-122の1つ又は複数の標的部位が、操作によりキメラポリヌクレオチドの3' UTR領域中に導入されていれば、目的の遺伝子の発現を阻害することができる。異なるマイクロRNAに対する1つ又は複数の結合部位の導入を操作することによって、キメラポリヌクレオチドの寿命、安定性、及びタンパク質翻訳をさらに低減することができる。

【0230】

本明細書で用いられるとき、用語「マイクロRNA部位」は、マイクロRNA標的部位又はマイクロRNA認識部位、又はマイクロRNAが結合又は会合する任意のヌクレオチド配列を指す。「結合」が、伝統的なワトソン-クリックハイブリダイゼーション法則に従うか、あるいは、マイクロRNA部位での又はそれに隣接した標的配列とマイクロRNAの何らかの安定な結合を表し得ることは理解すべきである。

【0231】

反対に、本発明のキメラポリヌクレオチドの目的で、例えば、特定の組織におけるタンパク質発現を増大するために、マイクロRNA結合部位は、それらが存在する配列から操作により取り出す (すなわち、除去する) ことができる。例えば、肝臓におけるタンパク質発現を改善するために、miR-122結合部位を除去することができる。様々な組織における発現の調節は、1つ又はいくつかのマイクロRNA結合部位の導入又は除去によって達成することができる。

【0232】

マイクロRNAが、mRNAを調節し、それによってタンパク質発現を調節することがわかっている組織の例として、限定はしないが、肝臓 (miR-122)、筋肉 (miR-133、miR-206、miR-208)、上皮細胞 (miR-17-92、miR-126)、骨髄細胞 (miR-142-3p、miR-142-5p、miR-16、

miR-21、miR-223、miR-24、miR-27)、脂肪組織(let-7、miR-30c)、心臓(miR-1d、miR-149)、腎臓(miR-192、miR-194、miR-204)、及び肺上皮細胞(let-7、miR-133、miR-126)が挙げられる。マイクロRNAはまた、血管新生などの複雑な生物学的プロセスも調節することができる(miR-132)(アナド(Anand)及びチェレシユ(Cheresh)著、カレント・オピニオン・イン・ヘマトロジー(Curr Opin Hematol)、2011年、第18巻、p.171~176;これは、全体として参照により本明細書に組み込む)。

【0233】

本発明において有用な発現プロフィール、マイクロRNA及び細胞株として、例えば、米国仮特許出願第61/857,436号明細書(代理人整理番号M39)及び同第61/857,307号明細書(代理人整理番号M37)(いずれも2013年6月23日出願)に教示されるものがあり、これらの内容は、全体として参照により本明細書に組み込むものとする。

10

【0234】

本発明のキメラポリヌクレオチドにおいて、キメラポリヌクレオチドの発現を生物学的に関連する細胞型又は関連する生物学的プロセスの状況に合わせて調整するために、こうしたプロセスに参与するマイクロRNAの結合部位を除去又は導入することができる。マイクロRNA、miR配列及びmiR結合部位のリストは、2013年1月17日出願された米国仮特許出願第61/753,661号明細書の表9、2013年1月18日出願された米国仮特許出願第61/754,159号明細書の表9、2013年1月31日出願された米国仮特許出願第61/758,921号明細書の表7に掲載されており、これらの各々は、全体として参照により本明細書に組み込む。

20

【0235】

組織又は疾患特異的遺伝子発現を駆動するためのマイクロRNAの使用の例が列記されている(ゲトナー(Getner)及びナルディニ(Naldini)著、組織抗原(Tissue Antigens)、2012年、第80巻、p.393~403;これは、全体として参照により本明細書に組み込む)。さらに、マイクロRNAシード部位をmRNAに組み込むことにより、特定の細胞における発現を低減して、生物学的改善をもたらすこともできる。この一例は、UGT1A1発現レンチウイルスベクターへのmiR-142部位の組み込みである。miR-142シードの存在によって、造血細胞における発現が低減し、その結果、抗原提示細胞での発現が減少し、ウイルス発現UGT1A1に対する免疫応答が消失した(シュミット(Schmitt)ら著、消化器病学(Gastroenterology)、2010年、第139巻、p.999~1007;ゴンザレス-アセキノラザ(Gonzalez-Asequinolaza)ら著、消化器病学(Gastroenterology)、2010年、第139巻、p.726~729;いずれも、全体として参照により本明細書に組み込む)。miR-142部位の修飾mRNAへの組み込みによって、造血細胞でのコードされたタンパク質の発現を低減することができただけでなく、mRNAでコードされたタンパク質に対する免疫応答を低減又は無効にすることもできた。miR-142シード部位(1つ又は複数)のmRNAへの組み込みは、完全なタンパク質欠乏症を有する患者(I型UGT1A1、LDLR欠損患者、CRIM陰性Pompe患者など)を治療する際に重要となり得る。

30

40

【0236】

最後に、様々な細胞型におけるマイクロRNAの発現パターンを理解することによって、特定の細胞型において、又は特定の生物学的条件下でのみ、より標的化された発現のために、キメラポリヌクレオチドを操作することができる。組織特異的マイクロRNA結合部位の導入により、ある組織、又は生物学的条件の状況におけるタンパク質発現のために最適となるキメラポリヌクレオチドを設計することができる。

【0237】

操作されたキメラポリヌクレオチドを用いて、トランスフェクション実験を関連細胞株

50

において行うことができ、トランスフェクション後の様々な時点でタンパク質産生をアッセイすることができる。例えば、種々のマイクロRNA結合部位操作キメラポリヌクレオチドで細胞をトランスフェクトすることができ、関連タンパク質に対しELISAキットを用いて、トランスフェクション後6時間、12時間、24時間、48時間、72時間、及び7日の時点で産生されたタンパク質をアッセイすることができる。マイクロRNA結合部位操作分子を用いた*in vivo*実験を実施して、製剤化されたキメラポリヌクレオチドの組織特異的発現の変化を検査することもできる。

【0238】

5'キャップを有する領域

天然のmRNAの5'キャップ構造は、核の輸出に関与し、mRNA安定を増大し、mRNAキャップ結合タンパク質(CBP)に結合するが、これは、CBPとポリ(A)結合タンパク質の会合を通じて、細胞内のmRNAの安定性並びに翻訳能力を担い、成熟環状mRNA種を形成する。キャップはさらに、mRNAスプライシングの間、5'近位イントロンの除去も促進する。

10

【0239】

内因性mRNA分子は、5'末端でキャップ付加されて、mRNA分子の末端グアノシンキャップ残基と5'末端転写センスヌクレオチドとの間に5'-ppp-5'-三リン酸結合が生じる。次に、この5'-グアニル酸塩キャップをメチル化して、N7-メチル-グアニル酸残基を生成することができる。mRNAの5'末端の末端及び/又は末端前(antiterminal)の転写ヌクレオチドのリボース糖も、任意選択で2'-O-メチル化してよい。グアニル酸キャップ構造の加水分解及び切断による5'キャップ除去は、mRNA分子などの核酸分子を分解のためにターゲティングすることができる。

20

【0240】

一部の実施形態では、キャップ部分を組み込むように、キメラポリヌクレオチドを設計することができる。本発明のキメラポリヌクレオチドに対する修飾は、キャップ除去を阻止する加水分解抵抗性のキャップ構造を生成することができるため、mRNAの半減期を延長し得る。キャップ構造の加水分解には、5'-ppp-5'ホスホロジエステル結合の切断が必要であることから、キャッピング反応中に修飾ヌクレオチドを使用することができる。例えば、ニュー・イングランド・バイオラボ(New England Biolabs)(マサチューセッツ州イプスウィッチ)のワクチニアキャッピング酵素を、チオ-グアノシンヌクレオチドと一緒に、製造者の指示に従い使用して、5'-ppp-5'キャップ内にホスホロチオエート結合を形成してもよい。N7-メチル-ホスホネート及びセレノ-リン酸ヌクレオチドなどの追加の修飾グアノシンヌクレオチドを使用してもよい。

30

【0241】

追加の修飾には、限定はしないが、糖環の2'-ヒドロキシル基のキメラポリヌクレオチドの5'末端及び/又は5'末端前のヌクレオチドのリボース糖の2'-O-メチル化(前述の通り)が含まれる。複数の異なる5'キャップ構造を用いて、mRNA分子として機能するキメラポリヌクレオチドなどの核酸分子の5'キャップを生成することができる。

40

【0242】

キャップ類似体は、本明細書では合成キャップ類似体、化学キャップ、化学キャップ類似体、又は構造的若しくは機能的キャップ類似体とも呼ばれ、キャップ機能を保持しながら、その化学構造は天然の(すなわち内因性、野生型又は生理学的)5'-キャップとは異なる。キャップ類似体は、化学的(すなわち、非酵素的)又は酵素的に合成してもよいし、及び/又は本発明のキメラポリヌクレオチドに連結させてもよい。

【0243】

例えば、アンチリバーScap類似体(Anti-Reverse Cap Analog)(ARCA)キャップは、5'-5'-三リン酸基で連結された2つのグアニンを含み、一方のグアニンは、3'-O-メチル基のほかにもN7メチル基を含む(すなわ

50

ち、 $N^7, 3' - O - \text{ジメチル} - \text{グアノシン} - 5' - \text{三リン酸} - 5' - \text{グアノシン}$ ($m^7 G - 3' m p p p - G$; 同じく $3' O - Me - m^7 G (5') p p p (5') G$ とも呼ばれる)。他方の非修飾グアニンの $3' - O$ 原子は、キャップ付加されたキメラポリヌクレオチドの $5'$ 末端ヌクレオチドに連結される。 $N^7 -$ 及び $3' - O -$ メチル化グアニンは、キャップ付加されたキメラポリヌクレオチドの末端部分をもたらす。

【0244】

別の例示的キャップは、 $mCAP$ であり、 $ARCA$ に類似しているが、 $2' - O -$ メチル基をグアノシン上に有する (すなわち、 $N^7, 2' - O - \text{ジメチル} - \text{グアノシン} - 5' - \text{三リン酸} - 5' - \text{グアノシン}$ 、 $m^7 G m - p p p - G$)。

【0245】

キャップ類似体は、インビトロ転写反応においてキメラポリヌクレオチド又はその領域の同時キャッピングを可能にするが、転写物の最大 20% がキャッピングされていないままであってもよい。このことと、内因性の細胞転写機構により産生された核酸の内因性 $5'$ キャップ構造とのキャップ類似体の構造的相違は、翻訳能力の低下及び細胞安定性の低下を招き得る。

【0246】

本発明のキメラポリヌクレオチドは、より真正な $5'$ キャップ構造を生成するために、製造後 (IVT 又は化学合成のいずれにかかわらず) にも酵素を用いてキャッピングすることができる。本明細書で使用されるとき、語句「より真正」は、構造的若しくは機能的に内因性又は野生型の特徴を非常によく反映又は模倣した特徴を指す。つまり、「より真正」な特徴は、従来技術の合成の特徴又は類似体などと比較して、内因性、野生型、天然若しくは生理学的な細胞機能及び/又は構造をよりよく表すか、あるいは、1つ又は複数の点において、対応する内因性、野生型、天然若しくは生理学的な特徴よりも性能がよい特徴である。本発明のより真正な $5'$ キャップ構造の非制限的例は、とりわけ、当技術分野で知られる合成の $5'$ キャップ構造 (又は野生型、天然若しくは生理学的 $5'$ キャップ構造) と比較して、キャップ結合タンパク質の結合の増強、半減期の延長、 $5'$ エンドヌクレアーゼに対する感受性の低下及び/又は $5'$ キャップ除去の抑制を有するものである。例えば、組換えワクチニアウイルス (*Vaccinia virus*) キャッピング酵素及び組換え $2' - O -$ メチルトランスフェラーゼ酵素は、キメラポリヌクレオチドの $5'$ 末端ヌクレオチドとグアニンキャップヌクレオチドの間に標準的な $5' - 5' -$ 三リン酸結合を生成することができ、ここで、キャップグアニンは、 N^7 メチル化を含み、 $mRNA$ の $5'$ 末端ヌクレオチドは、 $2' - O -$ メチルを含んでいる。このような構造は、キャップ1構造と呼ばれる。このキャップは、例えば、当技術分野で公知の他の $5'$ キャップ類似体と比較して、高度な翻訳能力と細胞安定性及び細胞の炎症促進性サイトカインの活性化の低下をもたらす。キャップ構造は、限定はしないが、 $7mG (5') p p p (5') N$ 、 $pN2p$ (キャップ0)、 $7mG (5') p p p (5') N1mpNp$ (キャップ1)、及び $7mG (5') - p p p (5') N1mpN2mp$ (キャップ2) を含む。

【0247】

キメラポリヌクレオチドは、製造後にキャップ付加してもよく、また、このプロセスは、より高効率であるため、ほぼ 100% のキメラポリヌクレオチドがキャップ付加され得る。これは、キャップ類似体が、*in vitro* 転写反応の過程でキメラポリヌクレオチドに連結される場合の約 80% と対照的である。

【0248】

本発明によれば、 $5'$ 末端キャップは、内因性キャップ又はキャップ類似体を含んでもよい。本発明によれば、 $5'$ 末端キャップは、グアニン類似体を含んでもよい。有用なグアニン類似体として、限定はしないが、イノシン、 $N^1 -$ メチル - グアノシン、 $2'$ フルオロ - グアノシン、 $7 -$ デアザ - グアノシン、 $8 -$ オキソ - グアノシン、 $2 -$ アミノ - グアノシン、 $LNA -$ グアノシン、及び $2 -$ アジド - グアノシンが挙げられる。

【0249】

10

20

30

40

50

ウイルス配列

別のウイルス配列、例えば、限定はしないが、オオムギ黄萎ウイルス (barley yellow dwarf virus) (BYDV - PAV)、ヤーグジークテヒツジレトロウイルス (Jaagsiekte sheep retrovirus) (JSRV) 及び / 又は動物地方流行性鼻腫瘍ウイルス (enzootic nasal tumor virus) の翻訳エンハンサー配列など (例えば、国際公開第 2012129648 号パンフレットを参照; 全体として参照により本明細書に組み込む) を操作して、本発明のキメラポリヌクレオチドに挿入することで、in vitro 及び in vivo での構築物の翻訳を刺激することができる。トランスフェクション実験を関連細胞株において行うことができ、ELISA によって、トランスフェクション後 12 時間、24 時間、48 時間、72 時間、及び 7 日の時点でタンパク質産生をアッセイすることができる。

10

【0250】

IRES 配列

さらに、内部リボソーム侵入部位 (IRES) を含有し得るキメラポリヌクレオチドが提供される。特徴的なピコルナウイルス (Picorna virus) として最初に同定され、IRES は、5' キャップ構造の非存在下でタンパク質合成を開始する上で重要な役割を果たす。IRES は、唯一のリボソーム結合部位として作用し得るか、又は mRNA の複数のリボソーム結合部位の 1 つとして作用し得る。2 つ以上の機能的リボソーム結合部位を含有するキメラポリヌクレオチドは、リボソームにより独立して翻訳される複数のペプチド又はポリペプチドをコードし得る (マルチシストロン性核酸分子)。キメラポリヌクレオチドが、IRES と一緒に提供されるとき、任意選択で、第 2 の翻訳可能な領域もさらに提供される。本発明に従って使用することができる IRES 配列の例として、限定はしないが、ピコルナウイルス (picorna virus) (例えば、FMDV)、ペストウイルス (pest virus) (CFPV)、ポリオウイルス (polio virus) (PV)、脳脊髄炎ウイルス (encephalomyocarditis virus) (ECMV)、口蹄疫ウイルス (foot-and-mouth disease virus) (FMDV)、C 型肝炎ウイルス (hepatitis C virus) (HCV)、ブタコレラウイルス (classical swine fever virus) (CSFV)、マウス白血病ウイルス (murine leukemia virus) (MLV)、サル免疫不全ウイルス (simian immune deficiency virus) (SIV)、又はコオロギ麻痺ウイルス (CRPV) が挙げられる。

20

30

【0251】

ポリ A テイル

安定性を高めるために、RNA のプロセシング中に、アデニンヌクレオチドの長鎖 (ポリ A テイル) を mRNA 分子などのポリヌクレオチドに付加することができる。転写直後に、転写物の 3' 末端を切断して、3' ヒドロキシルを遊離させることができる。そのとき、ポリ A ポリメラーゼは、RNA にアデニンヌクレオチドの鎖を付加する。ポリアデニル化と呼ばれるプロセスは、ポリ A テイルを付加するが、これは、例えば、約 100 ~ 250 残基長であってよい。

40

【0252】

また、ポリ A テイルは、構築物が核から輸出された後に付加することもできる。

本発明によれば、ポリ A テイル上の末端基を安定化のために組み込んでもよい。本発明のキメラポリヌクレオチドは、des-3' ヒドロキシルテイルを含んでもよい。これらはまた、ジュンジエ・リー (Junjie Li) ら (カレント・バイオロジー (Current Biology)、第 15 巻、p. 1501 ~ 1507、2005 年 8 月 23 日) (その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む) により教示される通りの構造部分又は 2' - O メチル修飾を含んでもよい。

【0253】

本発明のキメラポリヌクレオチドは、ヒストン mRNA を含む別のポリ A テイルを含む

50

転写物をコードするように設計することができる。ノーベリー (Norbury) によれば、「末端ウリジン化もヒト複製依存性ヒストン mRNA に検出されている。これらの mRNA のターンオーバーは、染色体 DNA 複製の完了又は阻害後の潜在的に毒性のヒストン蓄積を阻止する上で重要であると考えられる。これらの mRNA は、3'ポリ(A)テイルの欠如により識別され、その機能は、それよりもむしろ、安定したステム-ループ構造及びそのコグネイトステム-ループ結合タンパク質 (SLBP) により想定され；後者は、ポリアデニル化 mRNA 上の PABP のそれと同じ機能を果たす」(ノーベリー (Norbury) 著、「細胞質 RNA：本末転倒の事例 (Cytoplasmic RNA：a case of the tail wagging the dog)」、ネイチャー・レビューズ 分子細胞生物学 (Nature Reviews Molecular Cell Biology；AOP、2013年8月29日にオンラインで公開；doi：10.1038/nrm3645) (これらの内容は、全体として参照により本明細書に組み込む)。

【0254】

ユニークなポリAテイルの長さが、本発明のキメラポリヌクレオチドにいくつかの利点をもたらす。

一般に、本発明のポリAテイルの長さは、30ヌクレオチド長より長い。別の実施形態では、ポリAテイルは、35ヌクレオチド長より長い(例えば、約35、40、45、50、55、60、70、80、90、100、120、140、160、180、200、250、300、350、400、450、500、600、700、800、900、1,000、1,100、1,200、1,300、1,400、1,500、1,600、1,700、1,800、1,900、2,000、2,500、及び3,000ヌクレオチド以上)。一部の実施形態では、キメラポリヌクレオチド又はその領域は、約30~約3,000ヌクレオチドを含む(例えば、30~50、30~100、30~250、30~500、30~750、30~1,000、30~1,500、30~2,000、30~2,500、50~100、50~250、50~500、50~750、50~1,000、50~1,500、50~2,000、50~2,500、50~3,000、100~500、100~750、100~1,000、100~1,500、100~2,000、100~2,500、100~3,000、500~750、500~1,000、500~1,500、500~2,000、500~2,500、500~3,000、1,000~1,500、1,000~2,000、1,000~2,500、1,000~3,000、1,500~2,000、1,500~2,500、1,500~3,000、2,000~3,000、2,000~2,500、2,500~3,000)。

【0255】

一実施形態では、ポリAテイルは、キメラポリヌクレオチド全体の長さ又はキメラポリヌクレオチドの特定の領域の長さに対して設計される。この設計は、コード領域の長さ、特定の特徴若しくは領域の長さに基づいて、又はキメラポリヌクレオチドから発現された最終産物の長さに基づいて行ってもよい。

【0256】

これに関して、ポリAテイルは、長さが、キメラポリヌクレオチド又はそれらの特徴よりも10、20、30、40、50、60、70、80、90、又は100%長くてもよい。ポリAテイルはまた、それが属するキメラポリヌクレオチドの画分として設計してもよい。これに関連して、ポリAテイルは、構築物の全長、構築物領域又はポリAテイルを除いた構築物の全長の10、20、30、40、50、60、70、80、若しくは90%、又はそれ以上であってもよい。さらに、ポリA結合タンパク質に対するキメラポリヌクレオチドの操作された結合部位及び共役によって、発現を増強することができる。

【0257】

さらに、ポリAテイルの3'末端での修飾ヌクレオチドを用いたPABP(ポリA結合タンパク質)を介して、複数の異なるキメラポリヌクレオチドを互いに連結することがで

きる。トランスフェクション実験を関連細胞株において行うことができ、ELISAにより、トランスフェクション後12時間、24時間、48時間、72時間、及び7日の時点でタンパク質産生をアッセイすることができる。

【0258】

一実施形態では、本発明のキメラポリヌクレオチドは、ポリA-Gカルテット(Quartet)領域を含有するように設計される。G-カルテットは、DNA及びRNAの両方でGリッチ配列によって形成することができる、4つのグアニンヌクレオチドの環状水素結合配列である。この実施形態において、G-カルテットは、ポリAテイルの末端に組み込まれる。得られたポリヌクレオチドは、様々な時点で、安定性、タンパク質産生及び半減期などのその他のパラメータについてアッセイする。ポリA-Gカルテットによって、120ヌクレオチドのポリAテイル(配列番号21)を単独で用いて認められたものの少なくとも75%と同等のmRNAからのタンパク質産生が達成されることが判明している。

10

【0259】**開始コドン**

一実施形態では、本発明のキメラポリヌクレオチドは、開始コドン領域に類似するか、又はそれと同様に機能する領域を有し得る。

【0260】

一実施形態では、キメラポリヌクレオチドの翻訳は、開始コドンAUGではないコドンで開始し得る。キメラポリヌクレオチドの翻訳は、例えば、限定はしないが、ACG、AGG、AAG、CTG/CUG、GTG/GUG、ATA/AUA、ATT/AUU、TTG/UUG(トゥリオール(Touriol)ら著、細胞の生物学(Biology of the Cell)、第95巻、2003年、p.169~178、並びにマツダ(Matsuda)及びマウロ(Mauro)著、プロス・ワン(PLoS ONE)、2010年、第5巻、p.11を参照;これらの各々の内容は、全体として参照により本明細書に組み込む)などの代替開始コドンで開始し得る。非制限的例として、キメラポリヌクレオチドの翻訳は、代替開始コドンACGで開始する。別の非制限的例として、キメラポリヌクレオチドの翻訳は、代替開始コドンCTG/CUGで開始する。また別の非制限的例として、キメラポリヌクレオチドの翻訳は、代替開始コドンGTG/GUGで開始する。

20

30

【0261】

翻訳を開始するコドン、例えば、限定はしないが、開始コドン又は代替開始コドンなどにフランキングするヌクレオチドは、ポリヌクレオチドの翻訳効率、長さ及び/又は構造に影響を与えることがわかっている。(例えば、マツダ(Matsuda)及びマウロ(Mauro)著、プロス・ワン(PLoS ONE)、2010年、第5巻、p.11を参照のこと;これらの各々の内容は、全体として参照により本明細書に組み込む)。翻訳を開始するコドンにフランキングするヌクレオチドのいずれかのマスキングを用いて、ポリヌクレオチドの翻訳開始、翻訳効率、長さ及び/又は構造を改変することもできる。

【0262】

一実施形態では、コドンをマスキング又は隠蔽して、マスキングした開始コドン又は代替開始コドンでの翻訳開始の確率を低下させるために、開始コドン又は代替開始コドン付近でマスキング剤を使用してもよい。マスキング剤の非制限的例として、アンチセンスロッド核酸(LNA)ポリヌクレオチド及びエキソン接合部複合体(EJC)が挙げられる(例えば、マツダ(Matsuda)及びマウロ(Mauro)が記載するマスキング剤LNAポリヌクレオチド及びEJC(プロス・ワン(PLoS ONE)、2010年、第5巻:p.11)を参照のこと;これらの内容は、全体として参照により本明細書に組み込む)。

40

【0263】

別の実施形態では、翻訳が代替開始コドンで開始する見込みを高めるために、マスキング剤を用いて、キメラポリヌクレオチドの開始コドンをマスキングすることができる。

50

一実施形態では、翻訳が、マスクングした開始コドン又は代替開始コドンの下流で開始する見込みを高めるために、マスクング剤を用いて、第1の開始コドン又は代替開始コドンをマスクングすることができる。

【0264】

一実施形態では、開始コドン又は代替開始コドンは、miR結合部位の完全な補体内に位置してもよい。miR結合部位の完全な補体は、マスクング剤と同様に、キメラポリヌクレオチドの翻訳、長さ及び/又は構造を制御する上で役立ち得る。非制限的例として、開始コドン又は代替開始コドンは、miR-122結合部位の完全な補体の中央に位置してもよい。開始コドン又は代替開始コドンは、第1ヌクレオチド、第2ヌクレオチド、第3ヌクレオチド、第4ヌクレオチド、第5ヌクレオチド、第6ヌクレオチド、第7ヌクレオチド、第8ヌクレオチド、第9ヌクレオチド、第10ヌクレオチド、第11ヌクレオチド、第12ヌクレオチド、第13ヌクレオチド、第14ヌクレオチド、第15ヌクレオチド、第16ヌクレオチド、第17ヌクレオチド、第18ヌクレオチド、第19ヌクレオチド、第20ヌクレオチド若しくは第21ヌクレオチドの後に位置してもよい。

10

【0265】

別の実施形態では、本発明のキメラポリヌクレオチドの開始コドンは、開始コドンではないコドンでキメラポリヌクレオチドの翻訳を開始させるために、キメラポリヌクレオチド配列から除去してもよい。キメラポリヌクレオチドの翻訳は、除去された開始コドンの後のコドンで、又は下流の開始コドンで、あるいは代替開始コドンで開始し得る。非制限的例では、下流の開始コドン又は代替開始コドンで翻訳を開始させるために、キメラポリヌクレオチド配列の最初の3つのヌクレオチドとして開始コドンATG/AUGを除外する。開始コドンが除去されたキメラポリヌクレオチド配列は、キメラポリヌクレオチドの翻訳開始、長さ及び/若しくはキメラポリヌクレオチドの構造を制御する、又は制御を試みるために、下流の開始コドン及び/又は代替開始コドンに対する少なくとも1種のマスクング剤をさらに含んでもよい。

20

【0266】

終止コドン

一実施形態では、本発明のキメラポリヌクレオチドは、3'非翻訳領域(UTR)の前に、少なくとも2つの終止コドンを含んでもよい。終止コドンは、TGA、TAA及びTAGから選択することができる。一実施形態では、本発明のキメラポリヌクレオチドは、終止コドンTGAと追加の終止コドンを含む。さらに別の実施形態では、追加の終止コドンは、TAAであってもよい。別の実施形態では、本発明のキメラポリヌクレオチドは、3つの終止コドンを含む。

30

【0267】

シグナル配列

キメラポリヌクレオチドはまた、治療に関連する部位へのポリペプチドの輸送を促進する追加の特徴もコードし得る。タンパク質輸送を補助するような特徴の1つは、シグナル配列である。本明細書で用いられるとき、「シグナル配列」又は「シグナルペプチド」は、それぞれ、コード領域又はコードされたポリペプチドの5'側(若しくはN末端)に組み込まれる約9~200ヌクレオチド(3~60アミノ酸)長の、ポリヌクレオチド又はポリペプチドである。これらの配列の付加によって、1つ又は複数の分泌経路を介した小胞体への、コードされたポリペプチドの輸送が達成される。いくつかのシグナルペプチドは、タンパク質が輸送された後、シグナルペプチダーゼによってタンパク質から切断される。

40

【0268】

本明細書で使用することができる追加のシグナル配列は、例えば、<http://www.signalpeptide.de/>又は<http://proline.bic.nus.edu.sg/spdb/>に見出されるものなどのデータベースに教示されているものを含む。米国特許第8,124,379号明細書;同第7,413,875号明細書及び同第7,385,034号明細書に記載されているものもまた、本発明の範囲に含

50

まれ、これらの文献の各々の内容は、全体として参照により本明細書に組み込むものとする。

【0269】

タンパク質切断シグナル及び部位

一実施形態では、本発明のポリペプチドは、少なくとも1つのタンパク質切断部位を含有する少なくとも1つのタンパク質切断シグナルを含んでもよい。タンパク質切断部位は、N末端、C末端、N末端とC末端の間の任意の空間、例えば、限定はしないが、N末端とC末端との中間、N末端と中間地点の間、中間地点とC末端の間、並びにこれらの組み合わせに位置してよい。

【0270】

本発明のポリペプチドは、限定はしないが、プロタンパク質コンベルターゼ（若しくはプロホルモンコンベルターゼ）、トロンピン又は因子X aタンパク質切断シグナルを含み得る。プロタンパク質コンベルターゼは、9つのプロテイナーゼのファミリーであり、これは、酵母ケキシンに関連する7つの塩基性アミノ酸特異的スブチリシン様セリンプロテイナーゼ（プロホルモンコンベルターゼ1/3（PC1/3）、PC2、フリン、PC4、PC5/6、対合塩基性アミノ酸切断酵素4（PACE4）及びPC7として知られる）と、非塩基性残基を切断する他の2つのスブチラーゼ（スブチリシンケキシニンイソザイム1（SKI-1）及びプロタンパク質コンベルターゼスブチリシンケキシニン8（PCSK9）と呼ばれる）を含む。

【0271】

一実施形態では、本発明のキメラポリヌクレオチドは、キメラポリヌクレオチドが、少なくとも1つのコードされたタンパク質切断シグナルを含有するように操作することもできる。コードされたタンパク質切断シグナルは、開始コドンの前、開始コドンの後、コード領域の前、コード領域内、例えば、限定はしないが、コード領域内の中間、開始コドンと中間地点の間、中間地点と終止コドンの間、コード領域の後、終止コドンの前、2つの終止コドンの間、終止コドンの後、並びにこれらの組み合わせに位置してよい。

【0272】

一実施形態では、本発明のキメラポリヌクレオチドは、少なくとも1つのタンパク質切断部位を含有する少なくとも1つのコードされたタンパク質切断シグナルを含んでもよい。コードされたタンパク質切断シグナルとして、限定はしないが、プロタンパク質コンベルターゼ（若しくはプロホルモンコンベルターゼ）、トロンピン及び/又は因子X aタンパク質切断シグナルが挙げられる。

【0273】

非制限的例として、米国特許第7,373,930号明細書及び米国特許出願公開第20090227660号明細書では、フリン切断部位を使用して、細胞のゴルジ装置からの発現産物におけるGLP-1のN末端メチオニンを切断する。一実施形態では、本発明のポリペプチドは、ポリペプチドがGLP-1ではないという条件で、少なくとも1つのタンパク質切断シグナル及び/又は部位を含む。

【0274】

挿入及び置換

一実施形態では、キメラポリヌクレオチドの5'UTRは、同じ塩基のヌクレオチドの少なくとも1つの領域及び/又はストリングの挿入によって置換してもよい。ヌクレオチド領域及び/又はストリングは、限定はしないが、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又は少なくとも8個のヌクレオチドを含んでもよく、ヌクレオチドは、天然及び/又は非天然のいずれであってもよい。非制限的例として、ヌクレオチドの群は、5~8個のアデニン、シトシン、チミン、本明細書に開示する他のヌクレオチドのいずれかの鎖及び/又はこれらの組み合わせを含み得る。

【0275】

一実施形態では、キメラポリヌクレオチドの5'UTRは、2つの異なる塩基、例えば、限定はしないが、アデニン、シトシン、チミン、並びに本明細書に開示する他のヌクレ

10

20

30

40

50

オチドのいずれか及び／又はこれらの組み合わせのヌクレオチドの少なくとも2つの領域及び／又は鎖の挿入によって置換してもよい。例えば、5' UTRは、5～8個のアデニン塩基の挿入、続いて5～8個のシトシン塩基の挿入により置換することができる。別の例では、5' UTRは、5～8個のシトシン塩基の挿入、続いて5～8個のアデニン塩基の挿入により置換することができる。

【0276】

一実施形態では、キメラポリヌクレオチドは、RNAポリメラーゼにより認識され得る転写開始部位の下流に少なくとも1つの置換及び／又は挿入を含んでもよい。非制限的例として、少なくとも1つの置換及び／又は挿入は、転写開始部位のすぐ下流（例えば、限定はしないが、+1～+6）の領域における少なくとも1つの核酸を置換することによって、転写開始部位の下流で起こり得る。転写開始部位のすぐ下流のヌクレオチド領域に対する変化は、開始速度に影響を与え、見掛けヌクレオチド三リン酸（NTP）反応定数の値を増加すると共に、転写複合体からの短い転写物の解離を増大して、初期転写をキュアリング（curing）し得る（ブリーバ（Briebe）ら著、生化学（Biochemistry）、2002年、第41巻、p. 5144～5149；全体として参照により本明細書に組み込む）。少なくとも1つのヌクレオチドの修飾、置換及び／又は挿入は、当該配列のサイレント突然変異を引き起こすか、又はアミノ酸配列に突然変異を引き起こし得る。

10

【0277】

一実施形態では、キメラポリヌクレオチドは、転写開始部位の下流に、少なくとも1、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、又は少なくとも13個のグアニン塩基の置換を含み得る。

20

【0278】

一実施形態では、キメラポリヌクレオチドは、転写開始部位のすぐ下流の領域に、少なくとも1、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、又は少なくとも6個のグアニン塩基の置換を含み得る。非制限的例として、上記領域中のヌクレオチドが、GGGAGAであるとき、グアニン塩基は、少なくとも1、少なくとも2、少なくとも3、又は少なくとも4個のアデニンヌクレオチドによって置換され得る。別の非制限的例では、上記領域中のヌクレオチドが、GGGAGAであるとき、グアニン塩基は、少なくとも1、少なくとも2、少なくとも3、又は少なくとも4個のシトシン塩基によって置換され得る。別の非制限的例では、上記領域中のヌクレオチドが、GGGAGAであるとき、グアニン塩基は、少なくとも1、少なくとも2、少なくとも3、若しくは少なくとも4個のチミン、及び／又は本明細書に記載するヌクレオチドのいずれかによって置換され得る。

30

【0279】

一実施形態では、キメラポリヌクレオチドは、開始コドンの上流に少なくとも1つの置換及び／又は挿入を含んでもよい。明瞭化の目的で、開始コドンが、タンパク質コード領域の最初のコドンであり、また、転写開始部位は、転写が開始する部位であることを当業者は理解されよう。キメラポリヌクレオチドは、限定はしないが、ヌクレオチド塩基の少なくとも1、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、若しくは少なくとも8つの置換及び／又は挿入を含み得る。ヌクレオチド塩基は、開始コドンの上流の1、少なくとも1、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、若しくは少なくとも5つの位置で挿入又は置換されていてもよい。挿入及び／又は置換されたヌクレオチドは、同じ塩基（例えば、全てA若しくは全てC若しくは全てT若しくは全てG）、2つの異なる塩基（例えば、AとC、AとT、若しくはCとT）、3つの異なる塩基（例えば、A、C及びT若しくはA、C及びT）又は少なくとも4つの異なる塩基であってもよい。非制限的例として、キメラポリヌクレオチドのコード領域上流のグアニン塩基は、アデニン、シトシン、チミン、又は本明細書に記載するヌクレオチドのいずれかで置換してもよい。別の非制限的例では、キメラポリヌクレオチド中のグアニ

40

50

ン塩基の置換は、転写開始の下流の領域で、且つ開始コドンの前に1つのグアニン塩基を残すように設計してもよい(エスベルト(E s v e l t)ら著、ネイチャー(N a t u r e)、2011年、第472巻(7344)、p.499~503を参照;これは、全体として参照により本明細書に組み込む)。非制限的例として、転写開始部位の下流で、しかも開始コドンの上流の1位置に少なくとも5個のヌクレオチドを挿入することができ、これら少なくとも5個のヌクレオチドは同じ塩基タイプであってもよい。

【0280】

転写後制御モジュレータの組み込み

一実施形態では、本発明のキメラポリヌクレオチドは、少なくとも1つの転写後制御モジュレータを含んでもよい。これらの転写後制御モジュレータは、限定はしないが、小分子、化合物及び調節配列であってよい。非制限的例として、転写後制御は、PTCセラピューティクス社(PTC Therapeutics Inc.)(ニュージャージー州サウスプレインフィールド)によって、そのGEMS(商標)(小分子による遺伝子発現調節(Gene Expression Modulation by Small-Molecules)スクリーニング技術を用いて同定される小分子を使用して達成することができる。

10

【0281】

一実施形態では、本発明のキメラポリヌクレオチドは、国際公開第2013151666号パンフレット(その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む)に記載されている少なくとも1つの転写後制御モジュレータを含んでもよい。転写後制御モジュレータの非制限的例は、国際公開第2013151666号パンフレットのパラグラフ[000299]~[000304]に記載されており、その内容は、全体として参照により本明細書に組み込むものとする。

20

【0282】

II. キメラポリヌクレオチドの設計、合成及び定量

設計 - コドン最適化

キメラポリヌクレオチド、その領域又は部分若しくはサブ領域は、コドン最適化してもよい。コドン最適化の方法は、当技術分野で公知であり、いくつかの目標の1つ又は複数達成する試みにおいて有用となり得る。これらの目標としては、以下のものが挙げられる: 適正な折り畳みを確実にするために標的及び宿主生物のコドン使用頻度をマッチさせること、mRNAの安定性の増大若しくは二次構造の低減のためにGC含量を偏らせること、遺伝子構築若しくは発現を障害し得るタンDEM反復コドン若しくは塩基ランを最小限化にすること、転写及び翻訳制御領域をカスタマイズすること、タンパク質輸送配列を挿入若しくは除去すること、コードされたタンパク質における翻訳後修飾部位(例えば、グリコシル化部位)を除去/付加すること、タンパク質ドメインを付加、除去若しくはシャッフルすること、制限部位を挿入する、又は欠失させること、リボソーム結合部位及びmRNA分解部位を修飾すること、タンパク質の様々なドメインの適正な折り畳みを可能にするように翻訳速度を調節すること、あるいは、ポリヌクレオチド内で問題となる二次構造を低減又は排除すること。コドン最適化ツール、アルゴリズム及びサービスは、当技術分野において公知であり、非制限的例として、ジーンアート(Gene Art)(ライフ・テクノロジーズ(Life Technologies))、DNA2.0(カリフォルニア州メンロパーク)及び/又は専有の方法がある。一実施形態では、最適化アルゴリズムを用いて、ORF配列を最適化する。各アミノ酸についてのコドンオプションを表1に記載する。

30

40

【0283】

【表 1】

表 1. コドンオプシオン

アミノ酸	1文字略号	コドンオプシオン
イソロイシン	I	ATT, ATC, ATA
ロイシン	L	CTT, CTC, CTA, CTG, TTA, TTG
バリン	V	GTT, GTC, GTA, GTG
フェニルアラニン	F	TTT, TTC
メチオニン	M	ATG
システイン	C	TGT, TGC
アラニン	A	GCT, GCC, GCA, GCG
グリシン	G	GGT, GGC, GGA, GGG
プロリン	P	CCT, CCC, CCA, CCG
トレオニン	T	ACT, ACC, ACA, ACG
セリン	S	TCT, TCC, TCA, TCG, AGT, AGC
チロシン	Y	TAT, TAC
トリプトファン	W	TGG
グルタミン	Q	CAA, CAG
アスパラギン	N	AAT, AAC
ヒスチジン	H	CAT, CAC
グルタミン酸	E	GAA, GAG
アスパラギン酸	D	GAT, GAC
リシン	K	AAA, AAG
アルギニン	R	CGT, CGC, CGA, CGG, AGA, AGG
セレノシステイン	Sec	セレノシステイン挿入エレメント (SECIS)の存在下のmRNA中のUGA
終止コドン	終止	TAA, TAG, TGA

10

20

30

本発明の一部の実施形態において有益と考えられ得る特徴は、キメラポリヌクレオチドの領域によりコードすることができ、こうした領域は、ポリペプチドをコードする領域に対して上流（5'）又は下流（3'）のいずれであってもよい。これらの領域は、タンパク質コード領域若しくはオープンリーディングフレーム（ORF）のコドン最適化前及び/又は後に、キメラポリヌクレオチドに組み込んでもよい。キメラポリヌクレオチドが、5'及び3'フランキンク領域の両方を含む必要はない。こうした特徴の例として、限定はしないが、非翻訳領域（UTR）、コザック（Kozak）配列、オリゴ（dT）配列、及び検出可能なタグが挙げられ、XbaI認識を有し得る複数のクローン化部位も含まれ得る。

40

【0284】

一部の実施形態では、5'UTR及び/又は3'UTRは、フランキンク領域として提供される。複数の5'又は3'UTRがフランキンク領域に含まれていてもよく、同じ又は異なる配列であってもよい。フランキンク領域のいずれかの部分（ない場合もある）をコドン最適化してもよく、これらは、独立して、コドン最適化の前及び/又は後に、1つ又は複数の異なる構造的若しくは化学修飾を含んでもよい。

【0285】

50

最適化の後（所望であれば）、キメラポリヌクレオチド成分を再構成して、ベクター、例えば、限定はしないが、プラスミド、ウイルス、コスミド、及び人工染色体に形質転換する。例えば、最適化ポリヌクレオチドを再構成した後、ケミカルコンピテント大腸菌（*E. coli*）、酵母、アカパンカビ（*neurospora*）、トウモロコシ、ショウジョウバエ（*drosophila*）などに形質転換することができ、ここで、本明細書に記載する方法により、多コピープラスミド様又は染色体構造が形成される。

【0286】

合成ポリヌクレオチド及びその核酸類似体は、生化学プロセスの研究及び試験において重要な役割を果たす。ポリヌクレオチド及び核酸を合成するために、様々な酵素補助及び化学的方法が開発されている。

【0287】

酵素的な方法

in vitro 転写 - 酵素的合成

キメラポリヌクレオチドをコードする cDNA は、*in vitro* 転写（IVT）システムを用いて、転写することができる。このシステムは、典型的に、転写バッファー、ヌクレオチド三リン酸（NTP）、RNase 阻害剤及びポリメラーゼを含む。NTP は、所内で製造するか、供給業者から選択するか、又は本明細書に記載する通りに合成してもよい。NTP は、限定はしないが、天然及び非天然（修飾）NTP などの本明細書に記載するものから選択することができる。ポリメラーゼは、限定はしないが、T7 RNA ポリメラーゼ、T3 RNA ポリメラーゼ、並びに限定はしないが、キメラポリヌクレオチド（例えば、修飾核酸）を組み込むことができるポリメラーゼなどの突然変異ポリメラーゼから選択することができる。

【0288】

合成に有用な RNA ポリメラーゼ

本発明のキメラポリヌクレオチドの合成には、任意の数の RNA ポリメラーゼ又は変異体を使用してよい。

【0289】

RNA ポリメラーゼは、RNA ポリメラーゼ配列のアミノ酸の挿入又は欠失によって修飾してもよい。非制限的例として、RNA ポリメラーゼは、非修飾 RNA ポリメラーゼと比較して、2' - 修飾ヌクレオチド三リン酸を組み込む能力の増大を呈示するように、修飾してもよい（国際公開第 2008078180 号パンフレット及び米国特許第 8,101,385 号明細書を参照のこと；これらの各々は、全体として参照により本明細書に組み込む）。

【0290】

変異体は、RNA ポリメラーゼを進化させ、RNA ポリメラーゼアミノ酸及び/若しくは核酸配列を最適化する、並びに/又は当分野で公知の方法を用いることにより、取得することができる。非制限的例として、T7 RNA ポリメラーゼ変異体は、エスベルト（Esvelt）ら（ネイチャー（Nature）（2011年）第 472 巻（7344）、p. 499 ~ 503；これは、全体として参照により本明細書に組み込む）により記載される持続的定向進化システムを用いて進化させることができ、ここで、T7 RNA ポリメラーゼのクローンは、限定はしないが、トレオニン（K93T）、I4M、A7T、E63V、V64D、A65E、D66Y、T76N、C125R、S128R、A136T、N165S、G175R、H176L、Y178H、F182L、L196F、G198V、D208Y、E222K、S228A、Q239R、T243N、G259D、M267I、G280C、H300R、D351A、A354S、E356D、L360P、A383V、Y385C、D388Y、S397R、M401T、N410S、K450R、P451T、G452V、E484A、H523L、H524N、G542V、E565K、K577E、K577M、N601S、S684Y、L699I、K713E、N748D、Q754R、E775K、A827V、D851N 又は L864F が置換された 93 位のリシンなどの少なくとも 1 つの突然変異をコードし得る。別の非制限的例

10

20

30

40

50

として、T7RNAポリメラーゼ変異体は、米国特許出願公開第20100120024号明細書及び同第20070117112号明細書(全体として参照により本明細書に組み込む)に記載されている通りの少なくとも突然変異をコードしてもよい。RNAポリメラーゼの変異体は、限定はしないが、置換変異体、保存的アミノ酸置換、挿入変異体、欠失変異体、及び/又は共有結合誘導体も含み得る。

【0291】

一実施形態では、キメラポリヌクレオチドは、野生型又は変異型RNAポリメラーゼによって認識されるように設計してもよい。それを実施する際に、野生型又は親キメラポリヌクレオチドからの配列変化の部位若しくは領域を含有するように、キメラポリヌクレオチドを修飾することができる。

10

【0292】

ポリヌクレオチド又は核酸合成反応は、ポリメラーゼを用いた酵素的方法により実施することもできる。ポリメラーゼは、ポリヌクレオチド又は核酸鎖においてヌクレオチド同士のリン酸ジエステル結合の形成を触媒する。現在既知のDNAポリメラーゼは、アミノ酸配列比較及び結晶構造分析に基づいて種々のファミリーに分けることができる。大腸菌(*E. coli*)のクレノウ(*Klenow*)断片、バチルス属(*Bacillus*) DNAポリメラーゼI、テルムス・アクアティクス(*Thermus aquaticus*) (Taq) DNAポリメラーゼ、並びにT7RNA及びDNAポリメラーゼを含むDNAポリメラーゼI (pol I) 又はAポリメラーゼファミリーは、これらのファミリーのうち最もよく研究されているものである。別の大きなファミリーは、DNAポリメラーゼ (pol) 又はBポリメラーゼファミリーであり、全ての真核生物複製DNAポリメラーゼ及びファージT4及びRB69由来のポリメラーゼが含まれる。これらは、類似した触媒機構を使用するが、これらのポリメラーゼファミリーは、基質特異性、プライマー伸長のための基質類似体組み込み効率、程度及び速度、DNA合成の様式、エキソヌクレアーゼ活性、及び阻害剤に対する感受性が異なる。

20

【0293】

DNAポリメラーゼはまた、それらに必要な最適反応条件、例えば、反応温度、pH、並びに鑄型及びプライマー濃度に基づいて選択される。場合によっては、所望のDNA断片サイズ及び合成効率を達成するために、2つ以上のDNAポリメラーゼの組み合わせを使用する。例えば、チェン(*Cheng*)らは、クローン化挿入片及びヒトゲノムDNA由来の長い標的を効果的に増幅するために、pHを高め、グリセロール及びジメチルスルホキシドを添加し、変性時間を減少させ、伸長時間を増加すると共に、3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する二次熱安定性DNAポリメラーゼを使用する。(チェン(*Cheng*)ら、PNAS, 第91巻、p. 5695 ~ 5699、1994年; その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む)。バクテリオファージT3、T7、及びSP6ポリメラーゼからのRNAポリメラーゼは、生化学及び生物物理学研究のためのRNAを調製するのに広く使用されている。RNAポリメラーゼ、キャッピング酵素、及びポリAポリメラーゼは、同時係属国際公開第2014028429号パンフレットに開示されており、その内容は、全体として参照により本明細書に組み込むものとする。

30

【0294】

一実施形態では、本明細書に記載するキメラポリヌクレオチドの合成に使用することができるRNAポリメラーゼは、Syn5RNAポリメラーゼである(チュー(*Zhu*)ら著、核酸研究(*Nucleic Acids Research*)、2013年を参照; その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む)。Syn5RNAポリメラーゼは、近年、チュー(*Zhu*)らにより海洋シアノファージから特性決定されており、その際、彼らは、プロモータ配列も同定した(チュー(*Zhu*)ら著、核酸研究(*Nucleic Acids Research*)、2013年を参照; その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む)。チュー(*Zhu*)らは、Syn5RNAポリメラーゼが、T7RNAポリメラーゼと比較して、広い温度範囲及び塩分濃度にわたってRNA合成を触媒することを見出した。さらに、プロモータでヌクレオチドを開始するための要件は

40

50

、Syn5RNAポリメラーゼの場合、T7RNAポリメラーゼと比較して、それほど厳しくないことも判明し、RNA合成を目的とするSyn5RNAポリメラーゼが有望となった。

【0295】

一実施形態では、本明細書に記載するキメラポリヌクレオチドの合成に、Syn5RNAポリメラーゼを使用することができる。非制限的例として、Syn5RNAポリメラーゼは、正確な3'末端を必要とするキメラポリヌクレオチドの合成に用いてもよい。

【0296】

一実施形態では、キメラポリヌクレオチドの合成に、Syn5プロモータを使用することができる。非制限的例として、Syn5プロモータは、チュー（Zhu）ら（核酸研究（Nucleic Acids Research）、2013年；その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）により記載される通りに、5'-ATTGGGCA CCGTAAGGG-3'（配列番号3）であってもよい。

10

【0297】

一実施形態では、本明細書に記載の及び/又は当技術分野で公知の少なくとも1つの化学修飾を含むキメラポリヌクレオチドの合成に、Syn5RNAポリメラーゼを使用することができる。（例えば、チュー（Zhu）ら著、核酸研究（Nucleic Acids Research）、2013年に記載されているプソイド-UTP及び5Me-CTPの組み込みを参照；その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）。

【0298】

一実施形態では、本明細書に記載するキメラポリヌクレオチドは、チュー（Zhu）ら（核酸研究（Nucleic Acids Research）、2013年を参照；その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）により記載される修正及び改善された精製方法を用いて精製したSyn5RNAポリメラーゼを使用して、合成することもできる。

20

【0299】

遺伝子工学における様々なツールは、鋳型として作用する標的遺伝子の酵素的増幅に基づく。個々の遺伝子又は目的とする特定の領域の配列の研究、及び他の研究ニーズのために、ポリヌクレオチド又は核酸の小さなサンプルから標的遺伝子の多数のコピーを作製する必要がある。このような方法は、本発明のキメラポリヌクレオチドの製造に適用することも可能である。

30

【0300】

ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）は、標的遺伝子の高速増幅、並びにゲノムマッピング及び配列決定において広い用途を有する。DNAを合成する重要な構成要素には、鋳型としての標的DNA分子、標的DNA鎖の末端と相補的なプライマー、ビルディングブロックとしてのデオキシヌクレオシド三リン酸（dNTP）、及びDNAポリメラーゼが含まれる。PCRは、変性、アニーリング及び伸長ステップを通して進行するため、新たに生成されるDNA分子が、次の複製の環の鋳型として働くことができ、標的DNAの指数関数的増幅を達成する。PCRは、変性及びアニーリングの加熱及び冷却サイクルを必要とする。基本的なPCRの変形として、以下のものが挙げられる：非対称PCR [イニス（Innis）ら著、PNAS、第85巻、p. 9436~9440、1988年]、インバースPCR [オフマン（Ochman）ら著、遺伝子学（Genetics）、第120巻（3）、p. 612~623、1988年]、逆転写PCR（RT-PCR）（フリーマン（Freeman）ら著、バイオテクニクス（BioTechniques）、第26巻（1）、p. 112~22、p. 124~5（1999）；その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）。RT-PCRでは、一本鎖RNAが所望の標的であり、最初に逆転写酵素によって二本鎖DNAに変換される。

40

【0301】

PCRに代わり、又はその補完物として多様な等温in vitro核酸増幅技術が開発されている。例えば、鎖置換増幅（SDA）は、制限酵素がニックを形成する能力に基

50

づく。(ウォーカ(Walker)ら著、PNAS、第89巻、p.392~396、1992年;その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む)。アニーリングしたプライマー配列に制限酵素認識配列を挿入する。プライマーは、DNAポリメラーゼ及びdNTPにより伸長されて、二重螺旋を形成する。次に、制限酵素により二重螺旋の一方の鎖のみを切断する。このとき、各一本鎖は、後の合成のための鋳型として利用可能である。SDAは、PCRの複雑な温度制御サイクルを必要としない。

【0302】

核酸配列ベースの増幅(NASBA)は、転写媒介増幅(TMA)とも呼ばれ、これもまた、DNAポリメラーゼ、逆転写酵素、RNase H、及びT7RNAポリメラーゼを使用する等温増幅である。[コンプトン(Compton)著、ネイチャー(Nature) 10、第350巻、p.91~92、1991年](その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む)。標的RNAを鋳型として使用すると、逆転写酵素は、その相補的DNA鎖を合成する。RNase Hは、RNA鋳型とハイブリダイズして、DNAポリメラーゼが、RNA標的と相補的な第1のDNA鎖と相補的なDNA鎖を合成するための空間を作り、これによってDNA二重螺旋を形成する。T7RNAポリメラーゼは、このDNA二重螺旋の相補的RNA鎖を連続的に生成する。これらのRNA鎖は、DNA合成の新たなサイクルの鋳型として働き、標的遺伝子の増幅をもたらす。

【0303】

ローリングサークル増幅(RCA)は、一本鎖環状ポリヌクレオチドを増幅するが、複数ラウンドの等温酵素的合成を必要とし、その際、29DNAポリメラーゼは、ポリヌクレオチド環の周囲を連続的に進み、その配列を繰り返し複製することにより、プライマーを伸長する。従って、環状鋳型の線状コピーが達成される。次に、この線状コピーにプライマーをアニーリングして、その相補的鎖を合成することができる。[リザーディ(Lizardi)ら著、ネイチャー・ジェネティクス(Nature Genetics) 20、第19巻、p.225~232、1998年](その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む)。一本鎖環状DNAもまた、RNAポリメラーゼの存在下でのRNA合成の鋳型として使用することができる。(ダウベンディーク(Daubendiek)ら著、JACS、第117巻、p.7817~7819、1995年;その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む)。cDNA末端のインバース高速増幅(RACE) RCAが、ポリドロス(Polidoros)らにより記載されている。メッセンジャーRNA(mRNA)をcDNAに逆転写した後、RNase H処理に付すことにより、cDNAを分離する。次に、サークリガーゼ(CircLigase)によりcDNAを環状DNAに環状化する。得られた環状DNAの増幅は、RCAを用いて達成される。(ポリドロス(Polidoros)ら著、バイオテクニクス(BioTechniques) 30、第41巻、p.35~42(2006);その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む)。

【0304】

本発明のキメラポリヌクレオチドの1つ又は複数の領域の製造に前述の方法のいずれを使用してもよい。

リガーゼによるポリヌクレオチド又は核酸のアセンブリもまた広く使用されている。DNA又はRNAリガーゼは、リン酸ジエステル結合の形成を介してポリヌクレオチド鎖の5'及び3'末端の分子内連結を促進する。リガーゼ連鎖反応(LCR)は、2つの隣接するポリヌクレオチドプロンプが、標的遺伝子の一方の鎖とハイブリダイズして、リガーゼにより互いに結合するという原理に基づく有望な診断技術である。標的遺伝子が存在しない場合、又は標的遺伝子にミスマッチ、例えば、一塩基多型(SNP)が存在する場合には、プロンプは、リガーゼとして働くことができない。(ウィードマン(Wiedmann)ら著、PCR法及び適用(PCR Methods and Application)、第3巻(4)、p.s51~s64、1994年;その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む)。LCRは、検出の感度を高める、又はポリヌクレオチド及び核酸の合成に使用される場合には、産物の量を増加するために、様々な増幅技術と 40 50

組み合わせてもよい。

【0305】

核酸のためのいくつかのライブラリー調製キットが現在市販されている。これらは、少量の核酸サンプルを下流適用のための指示ライブラリーに変換する酵素及びバッファーを含む。例えば、DNA断片は、最終調製、連結、サイズ選択、クリーンアップ、PCR増幅及び最終クリーンアップのために、ニュー・イングランド・バイオラボ(New England Biolabs) (登録商標)によるネブネクスト(NEBNEXT) (登録商標)ウルトラ(ULTRA) (商標) DNAライブラリープレップキット(DNA Library Prep Kit)内に配置する。

【0306】

増幅技術を改善するために、継続的な開発が進行中である。例えば、アサダ(Asada)らの米国特許第8,367,328号明細書(その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む)は、DNAポリメラーゼによるDNA合成反応の効率を増大するために反応促進剤の使用を教示している。反応促進剤は、酸性物質又は酸性物質のカチオン性複合体を含む。キタバヤシ(Kitabayashi)らの米国特許第7,384,749号明細書(その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む)は、酵素的DNA合成を促進するカルボン酸イオン補充物質を教示しており、ここで、カルボン酸イオン補充物質は、シュウ酸、マロン酸、シュウ酸のエステル、マロン酸のエステル、マロン酸の塩、及びマレイン酸のエステルから選択される。ソベク(Sobek)らの米国特許第7,378,262号明細書(その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む)は、DNA増幅の忠実性を増大する酵素組成物を開示している。この組成物は、3'エキソヌクレアーゼ活性を有するが、ポリメラーゼ活性のない1つの酵素と、ポリメラーゼである別の酵素を含む。いずれの酵素も熱安定性であり、より低温で不活性となるように可逆的に修飾される。

【0307】

ゲッツ(Getts)らの米国特許第7,550,264号明細書(その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む)は、オリゴデオキシヌクレオチドテイルをcDNA分子の3'末端に結合させた後、RNAポリメラーゼを用いてRNA転写を開始することにより、センスRNA分子の合成を複数回ラウンド実施することを教示している。ロハイム(Rohayem)の米国特許出願公開第2013/0183718号明細書(その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む)は、一本鎖DNA鋳型にRNAポリメラーゼ活性を展示するRNA依存性RNAポリメラーゼ(RdRp)によるRNA合成を教示している。非標準ヌクレオチドを有するオリゴヌクレオチドは、酵素的重合を用い、ベナー(Benner)の米国特許第6,617,106号明細書(その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む)に開示される通りに、非標準ヌクレオチドを含む鋳型をその鋳型のヌクレオチドに相補的なヌクレオチドの混合物と接触させることによって合成することができる。

【0308】

固相化学合成

本発明の化学ポリヌクレオチドは、固相技術を用いて全部又は一部を製造することができる。

【0309】

ポリヌクレオチド又は核酸の固相化学合成は、自動化された方法であり、この方法では、分子を固体支持体上で固定化してから、反応体溶液中で段階的に合成する。不純物及び余剰の反応体は洗い流すため、各ステップ後に精製は必要ない。工程の自動化は、コンピュータ制御固相合成装置で実施しやすい。固相合成によって、比較的大きな規模でのポリヌクレオチド又は核酸の高速生産が可能になり、これにより、一部のポリヌクレオチド又は核酸が市場で入手可能となる。さらに、これは、ポリヌクレオチド又は核酸配列への化学修飾の部位特異的導入にも有用である。これは、天然の核酸の修飾誘導体を設計する上で不可欠なツールである。

10

20

30

40

50

【0310】

自動化固相合成において、鎖は3'から5'方向に合成される。ヌクレオシドの3'末端のヒドロキシル基は、化学的に切断可能な、又は光分解リンカーを介して固体支持体に係留される。活性化ヌクレオシドモノマー、例えば、2'-デオキシヌクレオシド(dA、dC、dG及びT)、リボヌクレオシド(A、C、G、及びU)、又は化学修飾ヌクレオシドを順次支持体結合ヌクレオシドに付加する。現在最も広く使用されているモノマーは、ヌクレオシドビルディングブロックの3'-ホスホロアミダイト誘導体である。活性化モノマーの3'リン原子は、支持体結合ヌクレオシドの5'酸素原子とカップリングして、リン酸トリエステルを形成する。副反応を防止するために、カップリング反応に関与しないあらゆる官能基、例えば、5'ヒドロキシル基、3'リン原子上のヒドロキシル基、リボヌクレオシド分子中の2'ヒドロキシル基、及びプリン若しくはピリミジン塩基上のアミノ基などは全て、保護基で遮断する。次のステップは、リン酸トリエステルを酸化して、リン酸トリエステル又はホスホトリエステルを形成するものであり、ここで、リン原子は、五価である。続いて、成長する鎖の末端の5'ヒドロキシル基上の保護基を除去すると、新来の活性化モノマービルディングブロックとのカップリングが可能になる。合成の終了時に、アンモニア又は水酸化アンモニウムなどの切断剤を添加して、保護基を全て除去することにより、固体支持体からポリヌクレオチド鎖を放出させる。また、光を当てて、ポリヌクレオチド鎖を切断してもよい。次に、高圧液体クロマトグラフィー(HPLC)又は電気泳動を用いて、産物を精製することができる。

10

【0311】

固相合成では、3'ヒドロキシル基を介してポリヌクレオチド鎖を固体支持体に共有結合させる。固体支持体は、典型的には直径50~200µmの不溶性粒子であり、樹脂とも呼ばれる。ギュザイブ(Guzayev)による「ポリヌクレオチド合成のための固相支持体(Solid-phase supports for polynucleotide synthesis)[ギュザイブ(Guzayev)著、核酸化学における最新プロトコル(Current Protocol in Nucleic Acid Chemistry)、3.1.1~3.1.60、2013年](その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む)に論じられている通り、多種の樹脂が現在入手可能である。樹脂に最も一般的な材料としては、高度架橋ポリスチレンビーズ及び多孔性ガラス(CPG)ビーズが挙げられる。ビーズの表面は、官能基、例えば、ヌクレオシドを係留するリンカーのための係留点として用いることができるアミノ又はアミノメチル基を有するように処理してもよい。こうした処理は、カラム、マルチウェルプレート、マイクロアレイ又はマイクロチップにおいて実施することができる。カラムを用いたフォーマットは、ポリヌクレオチド又は核酸の比較的大きな規模の合成を可能にする。カラム内のフィルターの間に樹脂を保持して、全ての試薬及び溶媒を自由に通過させることができる。マルチウェルプレート、マイクロアレイ、又はマイクロチップは、特に費用効果的小規模合成のために設計されている。単一のマイクロアレイチップで最大百万個のヌクレオチドを生成することができる。しかしながら、マイクロチップを用いた合成の誤り率は、伝統的なカラム法より高い。[ボロフコフ(Borovkov)ら著、核酸研究(Nucleic Acids Research)、第38巻(19)、e180、2010年](その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む)。マルチウェルプレートは、種々の配列と同時にポリヌクレオチド又は核酸の並行合成を可能にする。[シンドラー(Sindelar)ら著、核酸研究(Nucleic Acids Research)、第23巻、p.982~987、1995年](その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む)。固体支持体へのローディングは限定される。その上、伸長が進むと、固体支持体への成長する鎖の形態及び嵩高性によって、新来モノマーと成長鎖の末端基との反応が妨害される。そのため、成長鎖に付加することができるモノマーの数も限定される。

20

30

40

【0312】

鎖のさらなる伸長のためにリンカーを固体支持体に結合させる。リンカーは、鎖が固体支持体から脱離する合成の終了時を除いて、合成工程で使用される全ての試薬に対して安

50

定している。特定のヌクレオシドリンカー、すなわち、A、C、dT、G、又はUを有する固体支持体を用いて、配列中の最初のヌクレオチドとして、それぞれA、C、T、G、又はUを有するポリヌクレオチドを調製することができる。非ヌクレオシドリンカーを有するユニバーサル固体支持体は、全てのポリヌクレオチド配列に使用することができる。(ギュザイブ(Guzayev)らの米国特許第6,653,468号明細書;その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む)。ユニバーサル支持体のために様々な非ヌクレオシドリンカーが開発されているが、それらの多くは、2つのビシナルヒドロキシル基を有する。例えば、スクシニル基は、よく使用されているリンカーである。

【0313】

本明細書で使用されるとき、リンカーは、例えば、10~1,000原子といった原子団を指し、例えば、限定はしないが、炭素、アミノ、アルキルアミノ、酸素、イオウ、スルホキッド、スルホニル、カルボニル、及びイミンなどの原子又は原子団から構成され得る。リンカーは、核酸塩基又は糖部分上の修飾ヌクレオシド若しくはヌクレオチドに結合させることができる。リンカーは、核酸ベース又は非ヌクレオシドであってもよい。リンカーは、核酸配列への組み込みを妨害しない、十分な長さのものであってよい。リンカーは、本明細書に記載する通り、任意の有用な目的、例えば、多量体(例えば、2つ以上のキメラポリヌクレオチド分子の連結による)若しくはコンジュゲートの形成、並びに治療分子の投与又は標識の組み込みのために使用することができる。リンカーに組み込むことができる化学基の例として、限定はしないが、アルキル、アルケニル、アルキニル、アミド、アミノ、エーテル、チオエーテル、エステル、アルキレン、ヘテロアルキレン、アリーール、又はヘテロシクリルが挙げられ、これらの各々は、本明細書に記載する通り、任意選択で置換することができる。リンカーの例として、限定はしないが、不飽和アルカン、ポリエチレングリコール(例えば、エチレン又はプロピレングリコールモノマー単位、例えば、ジエチレングリコール、ジプロピレングリコール、トリエチレングリコール、トリプロピレングリコール、テトラエチレングリコール、又はテトラエチレングリコール)、並びにデキストランポリマー及びその誘導体が挙げられる。他の例として、限定はしないが、リンカー内で切断可能な部分、例えば、ジスルフィド結合(-S-S-)又はアゾ結合(-N=N-)があり、これらは、還元剤又は光分解を用いて切断することができる。選択的に切断可能な結合の非制限的例として、アミノ結合があり、これは、例えば、トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン(TCEP)、又は他の還元剤、及び/若しくは光分解の使用により切断することができ、さらには、エステル結合は、例えば、酸性又は塩基性加水分解によって切断することができる)。

【0314】

鎖を伸長するためのカップリング反応に必要な、活性化モノマー及び成長鎖上の官能基を除いて、他の全ての官能基は、副反応の回避のために保護する必要がある。保護及び脱保護の条件、及び適切な保護基の選択は、当業者が容易に決定することができる。保護基の化学は、例えば、グリーン(Greene)ら著、有機合成における保護基(Protective Groups in Organic Synthesis)、第2版、ウィリー・アンド・サンズ(Wiley & Sons)、1991年(これは、全体として参照により本明細書に組み込む)に見出すことができる。例えば、活性化ヌクレオチドホスホロアミダイト上の5'ヒドロキシル基は、4,4'-ジメトキシトリチル(DMT)で保護することができ、リン原子上のヒドロキシル基は、2-シアノエチルで保護することができる。A、C、G塩基上の環外アミノ基は、アシル基で保護することができる。

【0315】

固相合成系では、媒質が不均質であることから、活性化モノマーの反応性が重要である。固相合成の大部分は、ホスホロアミダイトヌクレオチドを使用するが、その機構については上で述べている。別の活性化モノマーの例は、ヌクレオチドH-リン酸である。[アブラモバ(Abramova)、分子(Molecules)、第18巻、p.1063~1075、2013年]。固相合成系での高い収率を確実にするために、大量の試薬、例えば、モノマー、酸化剤、及び脱保護剤が必要である。

10

20

30

40

50

【0316】

固相合成法をさらに改良するために、科学的調査及び研究が進められている。例えば、十分に確立された3'から5'への合成ではなく、スリバスタバ(Srivastava)らの米国特許第8,309,707号明細書及び米国特許出願公開第2013/0072670号明細書は、新規のホスホロアミダイト及び新規のヌクレオシド誘導体を用いたRNAの5'から3'への合成を開示しており、これによって、3'末端での合成RNAの容易な修飾が可能になった。チャーチ(Church)らの国際公開第2013123125号パンフレット(その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む)は、複数の配列からの標的核酸配列のアセンブリを記載しており、ここで、サブ配列を含む樹脂がエマルション小滴に導入される。サブ配列は、樹脂から切断されて、エマルション小滴内でアセンブリする。固体支持体のコストを削減するために、ハイドロキノン-O, O'-二酢酸リンカー(Q-リンカー)を用いて、再利用可能なCPG固体支持体が開発された(ポン(Pon)ら著、核酸研究(Nucleic Acids Research)、第27巻、p.1531~1538、1999年;その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む)。

10

【0317】

固相合成のための新たな保護基が開発されている。ナガト(Nagat)らは、2'-ヒドロキシ保護基として2-シアノエトキシメチル(CEM)を用いることにより、候補前駆体マイクロRNAの配列を含む110-nt長RNAの合成に成功した。(シバ(Shiba)ら著、核酸研究(Nucleic Acids Research)、第35巻、p.3287~3296、2007年;その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む)。また、2'-O-保護基を用いて、グルカゴン様ペプチド-1(GLP-1)の配列を含む33アミノ酸ペプチドをコードする130-ntmRNAも合成されている。人工的130-ntmRNAの生物活性は、無細胞タンパク質合成系及びチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞においてGLP-1を産生することによって証明されている。(ナガタ(Nagata)ら著、核酸研究(Nucleic Acids Research)、第38巻、p.7845~7857、2010年;その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む)。固相合成モノマーの新規の保護基として、限定はしないが、以下のものが挙げられる: デリンジャー(Dellinger)らの米国特許第8,309,706号明細書に開示される炭酸塩保護基、デリンジャー(Dellinger)らの米国特許第8,242,258号明細書に開示されるオルトエステルタイプ2'-ヒドロキシ保護基及び炭酸アシルタイプヒドロキシル保護基、デリンジャー(Dellinger)らの米国特許第8,202,983号明細書に開示される2'-ヒドロキシルチオ炭素保護基、デリンジャー(Dellinger)らの米国特許第7,999,087号明細書に開示される2'-シリル含有チオ炭酸塩保護基、アルバラド(Alvarado)の米国特許第7,667,033号明細書に開示されるアミノ保護基としての9-フルオレニルメトキシカルボニル(FMOS)誘導体、スカリンジ(Scarling)らの米国特許第5,889,136号明細書に開示されるフッ化物不安定性5'シリル保護基、並びにグリフェイ(Grieffey)らの米国特許出願公開第2008/0119645号明細書に開示されるピキシル保護基(これらの内容は、全体として参照により本明細書に組み込む)。デバート(Debart)らの米国特許出願公開第2011/0275793号明細書(その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む)は、リボースの2'位のヒドロキシルの保護基を用いたRNA合成を教示しており、この保護基は、塩基により除去することができる。新規の固体支持体は、ムーディ(Moody)らの米国特許第7,476,709号明細書(その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む)に教示される重合性単位に結合した保護ヒドロキシポリC2~4アルキレンオキシ鎖を含むモノマーから構成されるポリマーを含む。

20

30

40

【0318】

液相化学合成

モノマービルディングブロックの連続的付加によるキメラポリヌクレオチドの合成は、

50

液相で実施することもできる。モノマー同士、又は成長鎖の末端官能基と新来モノマーとの間に、共有結合が形成される。反応に関与しない官能基は、一時的に保護しなければならない。各モノマービルディングブロックの付加後、次のモノマービルディングブロックを付加する前に、反応混合物を精製する必要がある。鎖の一方の末端の官能基は、次のモノマービルディングブロックと反応することができるように、脱保護しなければならない。液相合成は、労力及び時間がかかるため、自動化することができない。こうした制約にもかかわらず、液相合成は、短いポリヌクレオチドを大規模に調製する上でいまだに有用である。この系は均質であるため、大量の試薬を必要とせず、この点では費用効果的である。

【0319】

様々な合成方法の組み合わせ

前述した合成方法は各々、独自の利点及び制約を有する。制約を解決するために、これらの方法を組み合わせる試みが行われている。こうした方法の組み合わせは、本発明の範囲内である。

【0320】

2～4ヌクレオチドの短いポリヌクレオチド鎖を液相で調製した後、固相合成による伸長反応のために、固体支持体に結合させることができる。モノマービルディングブロックの支持体としてポリエチレングリコールのモノメチルエーテル(MPEG)ビーズを使用する高効率液相(HELP)合成が開発されている。MPEGは、塩化メチレン及びピリジン溶媒に可溶性であるが、ジエチルエーテル溶媒中では沈殿する。適切な溶媒を選択することにより、モノマー同士、又は成長鎖と、MPEGに結合した新来モノマーとのカップリング反応は、均質な液相系で実施することができる。次に、混合物をジエチルエーテル溶媒で洗浄することにより、産物を容易に沈殿させると共に精製することができる。[ボノラ(Bonora)ら著、核酸研究(Nucleic Acids Research)、第18巻、p.3155～3159、1990年](その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む)。アダモ(Adamo)らの米国特許第8,304,532号明細書(その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む)は、試薬の少なくとも一部が固体支持される溶液相オリゴヌクレオチド合成を教示している。

【0321】

酵素的連結と組み合わせた固相又は液相化学合成を使用すると、化学合成単独では得ることができない長鎖ポリヌクレオチドを産生する効率的な方法が提供される。ムーア(Moore)及びシャープ(Sharp)は、化学合成によりRNA断片10～20nt長(これに、部位特異的修飾を導入してもよい)を調製し、これらの断片をcDNA架橋にアニーリングした後、T4DNAリガーゼを含む断片をアセンブリすることを記載している。(ムーア(Moore)ら著、サイエンス(Science)、第256巻、p.999～997(1992);その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む)。

【0322】

固相合成装置は、PCR及びその他の増幅技術を実施する上で十分な優れた純度のポリヌクレオチド又は核酸を生産することができる。アジレント・テクノロジーズ(Agilent Technologies)は、マイクロアレイを開発し、これらは市販されている。マイクロアレイ支持体上でポリヌクレオチドを合成し、強塩基又は光により切断した後、PCR増幅により、ポリヌクレオチドのライブラリーを作製することができる。[クリアリー(Clearly)ら著、ネイチャー・メソッズ(Nature Methods)、第1巻(3)、p.241～247、2004年](その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む)。

【0323】

小領域合成

本発明のキメラポリヌクレオチドの領域又はサブ領域は、siRNAなどの小RNA分子を含み得ることから、同じように合成することができる。適切に保護されたりボヌクレオチドホスホロアミダイト、in vitro転写、siRNA発現ベクター、及びPC

10

20

30

40

50

R発現カセットを用いて、化学合成などの siRNA を調製するいくつかの方法がある。シグマ・アルドリッチ (Sigma-Aldrich) (登録商標) は、siRNA 供給業者の1つであり、t-ブチルメチルシリル (TBDMs) 基で、2'位が保護されたりボヌクレオシドホスホロアミダイトモノマーを用いて、それらの siRNA を合成する。高いカップリング効率及び高速脱保護を達成するために、固相化学合成は、シグマ・アルドリッチ (Sigma-Aldrich) (登録商標) のウルトラ・ファスト・パラレル・シンセシス (Ultra Fast Parallel Synthesis) (UFPS) 及びウルトラ・ファスト・パラレル・デプロテクション (Ultra Fast Parallel Deprotection) (UFPD) を用いて実施する。最終 siRNA 産物は、HPLC 又は PAGE で精製することができる。こうした方法を用いて、キメラポリヌクレオチドの領域又はサブ領域を合成することができる。

10

【0324】

ベクター又は PCR 生成 siRNA カセットからの in vitro 転写及び発現は、siRNA を生成するための適切な鑄型が必要である。市販のアンピオン (Ambion) (登録商標) サイレンサー (Silencer) (登録商標) siRNA 構築キットは、DNA 鑄型の in vitro 転写により siRNA を生成するが、これは、必要な酵素、バッファー、プライマーを含む。こうした方法を用いて、キメラポリヌクレオチドの領域又はサブ領域を合成することができる。

【0325】

キメラポリヌクレオチドの領域又はサブ領域の連結

20

連結は、ポリヌクレオチド又は核酸断片をより大きな構築物にアセンブリする上で不可欠なツールである。リガーゼ触媒反応により、DNA 断片を結合させることによって、様々な機能を備えた組換え DNA を作製することができる。2つのオリゴデオキシヌクレオチド (1つは 5'ホスホリル基を含み、もう1つは、遊離 3'ヒドロキシル基を有する) が、DNA リガーゼの基質として役立つ。蛍光又は化学発光標識を有するオリゴデオキシヌクレオチドもまた、DNA リガーゼ基質として用いられ得る。(マーチネリ (Martinielli) ら著、臨床化学 (Clinical Chemistry)、第42巻、p. 14~18、1996年;その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む)。T4 RNA リガーゼなどの RNA リガーゼは、2つの一本鎖オリゴボヌクレオチド又は RNA 断片同士のリン酸ジエステル結合の形成を触媒する。大きな DNA 構築物のコピーは、ポリヌクレオチド断片、熱安定性 DNA ポリメラーゼ、及び DNA リガーゼの組み合わせで合成されている。イグナトフ (Ignatov) らの米国特許出願公開第 2009/0170090号明細書 (その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む) は、DNA ポリメラーゼに加えて DNA リガーゼを用いることにより、PCT を改善する、特に、長距離 PCR 及び / 又はローコピー DNA 鑄型 PCR 増幅の収率を増大することを開示している。

30

【0326】

リガーゼを他の酵素と一緒に用いることにより、キメラポリヌクレオチド又は核酸分子を調製し、ゲノム分析を実施することもできる。例えば、連結媒介選択性 PCR 増幅が、カトウ (Kato) の欧州特許第 0735144号明細書に開示されている。組織若しくは細胞由来 RNA 又は DNA から逆転写された相補的 DNA (cDNA) は、IIS 型制限酵素で断片に消化する (その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む)。大腸菌 (E. coli) DNA リガーゼにより、上記の断片にピオチン化アダプター配列を結合させる。次に、ピオチン標識 DNA 断片を下流での分析のためにストレプトアビジン被覆ビーズ上に固定化する。

40

【0327】

連結スプリント又は連結スプリントオリゴは、リガーゼ又はリガーゼ活性を有する別の酵素を用いて、1つの核酸の2つの末端 (すなわち、分子内結合)、又は2つの核酸の2つの末端 (すなわち、分子間結合) を結合するためのアニーリング部位又は連結鑄型を提供するために用いられるオリゴヌクレオチドである。連結スプリントは、互いに隣接した

50

末端を保持して、連結しようとする5'-リン酸化及び3'-ヒドロキシル化末端の間に連結点を形成する。

【0328】

一実施形態では、スプリント媒介連結又はスプリント連結法を用いて、本明細書に記載するキメラポリヌクレオチドを合成することができる。キメラポリヌクレオチドは、国際公開第2012138453号パンフレット（その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）に記載の方法など、制限エンドヌクレアーゼ切断部位の存在を利用しない方法を用いてアセンブリしてもよい。スプリント媒介連結は、制御されたコンカテマー化を用い、しかも領域の結合に制限部位の導入を必要としないか、又は必要な場合も限定的なもので、構築物の高速合成を可能にする。非制限的例として、スプリント連結を用いることにより、少なくとも1つの非翻訳領域をキメラポリヌクレオチドのコード領域に付加することもできる。一実施形態では、本明細書に記載するキメラポリヌクレオチドの合成に、他の合成方法と組み合わせるスプリント連結を用いてもよい。

10

【0329】

核酸の5'-リン酸化及び3'-ヒドロキシル末端を連結する場合、末端同士が隣接するように、末端を連結スプリントにアニーリングするとき、例えば、限定はしないが、T4DNAリガーゼ、アンプリガーゼ（Ampligase）（登録商標）DNAリガーゼ（エピセンター（Epicentre）（登録商標）テクノロジーズ（Technologies）、TthDNAリガーゼ、TflDNAリガーゼ、又はTscDNAリガーゼ（プロカリア（Prokaria））を用いることができる。ファルグイ（Farugui）の米国特許第6,368,801号明細書（その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）は、T4RNAリガーゼがRNA分子の末端を効率的に連結できることを開示しており、これらは、RNAスプリントとハイブリダイズすると、互いに隣接する。従って、T4RNAリガーゼは、DNA末端と、RNA又は修飾RNAを含む連結スプリントオリゴを結合するために好適なリガーゼである。RNAスプリントの例として、ダール（Dahl）らの米国特許第8,137,911号明細書及び米国特許出願公開第2012/0156679号明細書に開示される、デュラスクライブ（DuraScribe）（登録商標）T7転写キット（エピセンター（Epicentre）（登録商標）テクノロジーズ（Technologies））を用いて製造される、2'-フルオリン-CTP（2'-F-dCTP）及び2'-フルオリン-UTP（2'-F-dUTP）を含有する修飾RNAが挙げられる。デュラスクライブ（DuraScribe）（登録商標）T7転写キットから生成される修飾RNAは、RNase A消化に対して完全に耐性である。DNAスプリント及びDNAリガーゼを用いて、スゾスタク（Szostak）らの米国特許第6,258,558号明細書（その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）に開示されるRNA-タンパク質融合物を作製することができる。

20

30

【0330】

線状ssDNAの分子間連結のためには、クール（Cool）らの米国特許第7,906,490号明細書（その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）は、DNA合成装置で線状オリゴデオキシヌクレオチド断片を製造した後、T4DNAリガーゼと2つの30ヌクレオチドスプリントオリゴヌクレオチドの連結により83ヌクレオチド環を構築することを教示している。線状センスプロモータ含有cDNAの環状化は、ダール（Dahl）らの米国特許出願公開第2012/0156679号明細書（その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）に開示されている。サーマス・スコトダクタス（Thermus scotoductus）に感染するファージTS2126に由来するサーモファージ（Thermophage）（商標）ssDNAリガーゼ（プロカザイム）は、DNA及びRNAのATP依存性分子内及び分子間連結を触媒する。

40

【0331】

ホスホロアミダイトモノマーを使用する固相化学合成法は、短鎖のDNA分子の生成に限定される。長さが150塩基を超えると、DNA産物の純度及び反応物の収率が低くなる。高収率で長いポリヌクレオチドを合成するために、化学合成と並行して酵素的連結法

50

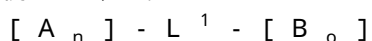
を使用すれば、より好都合である。例えば、ムーア (Moore) 及びシャープ (Sharp) は、化学合成により RNA 断片 10 ~ 20 nt 長 (これに、部位特異的修飾を導入してもよい) を調製し、この断片を cDNA スプリントにアニーリングした後、T4 DNA リガーゼを含む断片をアセンブリすることを記載している。(ムーア (Moore) 著、サイエンス (Science)、第 256 巻、p. 992 ~ 997 (1992) ; その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む)。T4 RNA リガーゼを含むオリゴリボヌクレオチドと DNA スプリント又はポリリボヌクレオチドの連結反応は、ベイン (Bain) 著、核酸研究 (Nucleic Acids Research)、第 20 巻 (16)、p. 4372、1992 年、スターク (Stark) 著、RNA、第 12 巻、p. 2014 ~ 2019、2006 年、及びデラス (Deras) らの米国特許出願第 2005/0130201 号明細書に記載されており、これらの文献の内容は、全体として参照により本明細書に組み込むものとする。固相法で合成されたオリゴヌクレオチドには、酵素的付加により 5' - キャップ及び 3' - ポリ A テイルが付加されることが多い。非制限的例として、イワセ (Iwase) 著 (核酸研究 (Nucleic Acids Research)、第 20 巻、p. 1643 ~ 1648、1992 年 ; その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む) により記載される通り、酵素的に連結された 3 つの断片として合成キャップ付加 42-mer mRNA が合成されている。16.3 - キロベースマウスミトコンドリアゲノムが、600 の重複 60-mer ポリヌクレオチドを産生している。この方法は、所望の長さ到達するまで、*in vitro* 組換えから増幅までが反復される。(ギブソン (Gibson) 著、ネイチャー・メソッズ (Nature Methods)、第 7 巻、p. 901 ~ 903、2010 年 (その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む))。1.08 メガベースのマイコプラズマ・ミコイデス (*Mycoplasma mycoides*) JCVI-syn1.0 ゲノムのアセンブリが報告されている。ポリヌクレオチド合成装置から化学的に作製されたポリヌクレオチド断片をアセンブリすることにより、1080 bp カセットを生成する。次に、酵母内での形質転換及び相同組換えにより 3 段階でゲノムをアセンブリする。(ギブソン (Gibson) 著、サイエンス (Science)、第 329 巻、p. 52 ~ 56、2010 年 ; その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む)。

【0332】

短い DNA 断片を化学リンカーと結合させるために、研究がおこなわれている。「クリック」ケミストリー又は「クリック」連結、すなわちアジ化物とアルキンとの間の環状付加反応は、穏やかな反応条件、高い収率、及び無害な副産物といったその利点によって、多くの関心を集めている。「クリック」ケミストリーは、ヌウェ (Nwe) 著、癌生物療法及び放射性医薬品 (Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals)、第 24 (3)、p. 289 ~ 302、2009 年 ; その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む)。クリック連結により、最大 300 塩基長の DNA 構築物が生成されており、それより長い配列も実現可能である。環状付加反応によって生じる断片間のトリアゾールリンカーにもかかわらず、様々な DNA ポリメラーゼが、クリック連結により製造された合成 DNA 構築物を増幅できることが PCR データで実証されている。また、*in vitro* 転写及びローリングサークル増幅も合成 DNA 構築物に対し実施することができる。最大 100 ヌクレオチド長のヘアピンリボザイム及び環状ミニ DNA 二重螺旋もまた、クリック連結で調製されている。(エル・サグヘア (El-Sagheer) 著、アカウンツ・オブ・ケミカルリサーチ (Accounts of Chemical Research)、第 45 巻 (8)、p. 1258 ~ 1267、2012 年 ; その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む)。

【0333】

例えば、式 I :



式 I

を含む配列を有する本発明のポリヌクレオチドは、

10

20

30

40

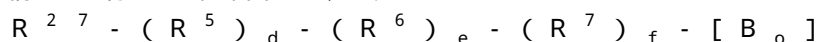
50

式 X V I :



式 X V I

の構造を有する化合物と、式 X V I I :



式 X V I I

の構造を有する化合物を反応させることによって合成することができ、

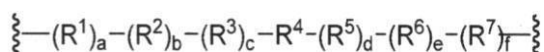
式中、A 及び B は各々、独立に、いずれかのヌクレオシド（例えば、ヌクレオチド）を含み；

n 及び o は、独立に、10 ~ 10, 000、例えば、10 ~ 1000 又は 10 ~ 2000 の整数であり；

L¹ は、式 I I I :

【0334】

【化31】



式III

20

の構造を有し、

式中、a、b、c、d、e、及び f は各々、独立に、0 又は 1 であり；

R¹、R³、R⁵、及び R⁷ の各々は、独立に、任意選択で置換された C₁ ~ C₆ アルキレン、任意選択で置換された C₁ ~ C₆ ヘテロアルキレン、O、S、及び NR⁸ から選択され；

R² 及び R⁶ は各々、独立に、カルボニル、チオカルボニル、スルホニル、又はホスホリルから選択され；

R⁴ は、任意選択で置換されたトリアゾレンであり；

R⁸ は、水素、任意選択で置換された C₁ ~ C₄ アルキル、任意選択で置換された C₃ ~ C₄ アルケニル、任意選択で置換された C₂ ~ C₄ アルキニル、任意選択で置換された C₂ ~ C₆ ヘテロシクリル、任意選択で置換された C₆ ~ C₁₂ アリール、又は任意選択で置換された C₁ ~ C₇ ヘテロアルキルであり；

R²⁷ は、任意選択で置換された C₂ ~ C₃ アルキニル又は任意選択で置換された C₈ ~ C₁₂ シクロアルキニルであり、

L¹ は、ヌクレオシドのうちの 1 つの糖の [A_n] 及び [B_o] に結合する。

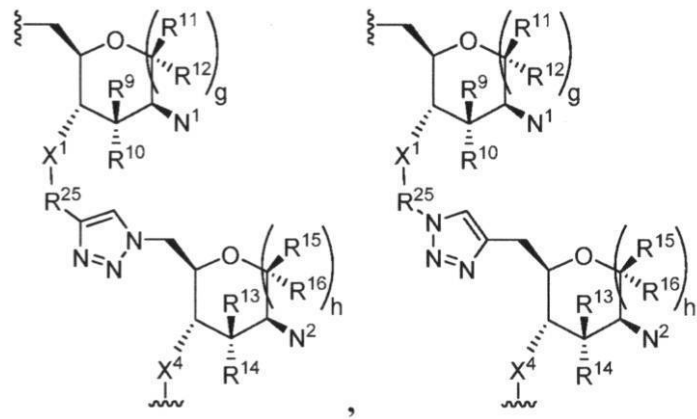
30

【0335】

式 X I a、X I b、X I I a 又は X I I b :

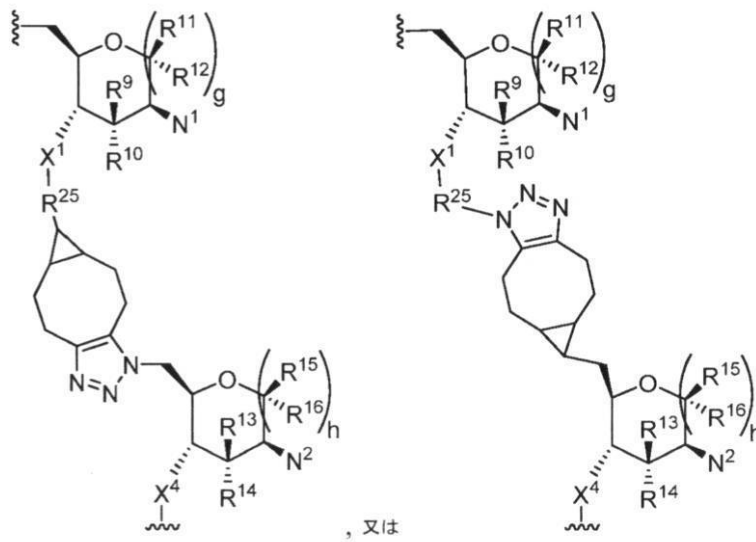
【0336】

【化 3 2】



式XIa

式XIb



式XIIa

式XIIb

の構造を有する本発明のキメラポリヌクレオチドは、式XIIIIa、XIIIIb、XIVa、又はXIVb：

【0337】

10

20

30

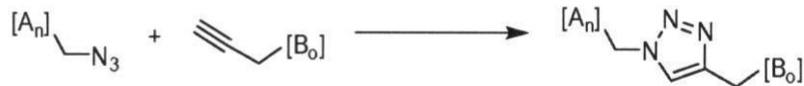
X^1 及び X^4 は各々、独立に、O、NH、若しくはSであり；
 $R^{2,4}$ 及び $R^{2,7}$ の各々は、独立に、連結ヌクレオシドの1領域であり；
 $R^{2,5}$ 、 $R^{2,5'}$ 、 $R^{2,6}$ 、及び $R^{2,6'}$ の各々は、独立に、任意選択で置換された $C_1 \sim C_6$ アルキレン又は任意選択で置換された $C_1 \sim C_6$ ヘテロアルキレンであるか、あるいは、 $R^{2,5'}$ 又は $R^{2,6'}$ とアルキニル基は、一緒に、任意選択で置換されたシクロアルキニルを形成する)
 を（例えば、銅供給源の存在若しくは非存在下の [3 + 2] 環状付加条件下で）反応させることにより合成することができる。

【0339】

例えば、本発明のキメラポリヌクレオチドは、以下：

【0340】

【化35】



10

に示すように合成することができる。一部の実施形態では、この方法で、5' キャップ構造又はポリ-Aテイルを本発明のキメラポリヌクレオチドに結合させることができる。

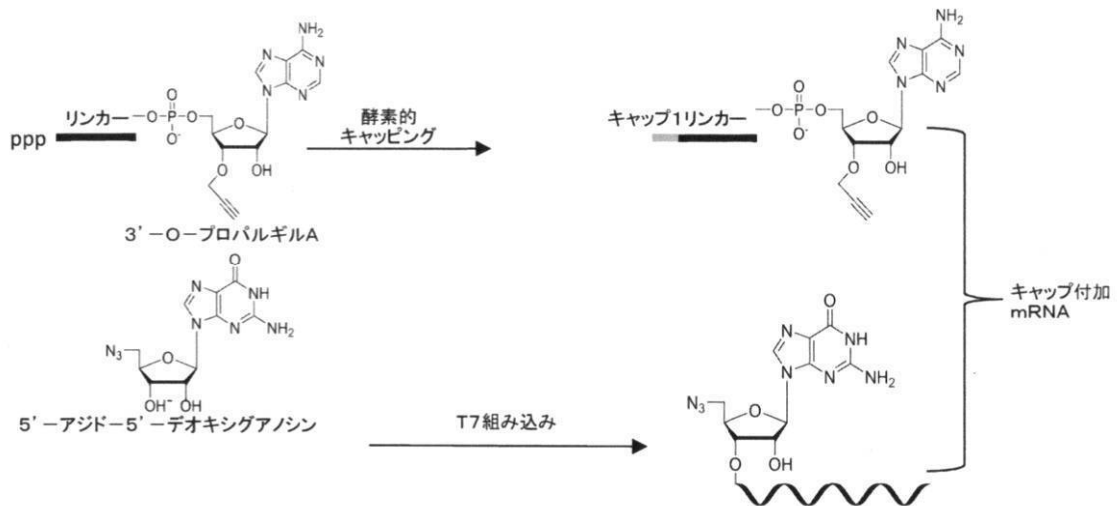
【0341】

20

5' キャップ構造は、以下に示すように、本発明のキメラポリヌクレオチドに結合させることができる：

【0342】

【化36】



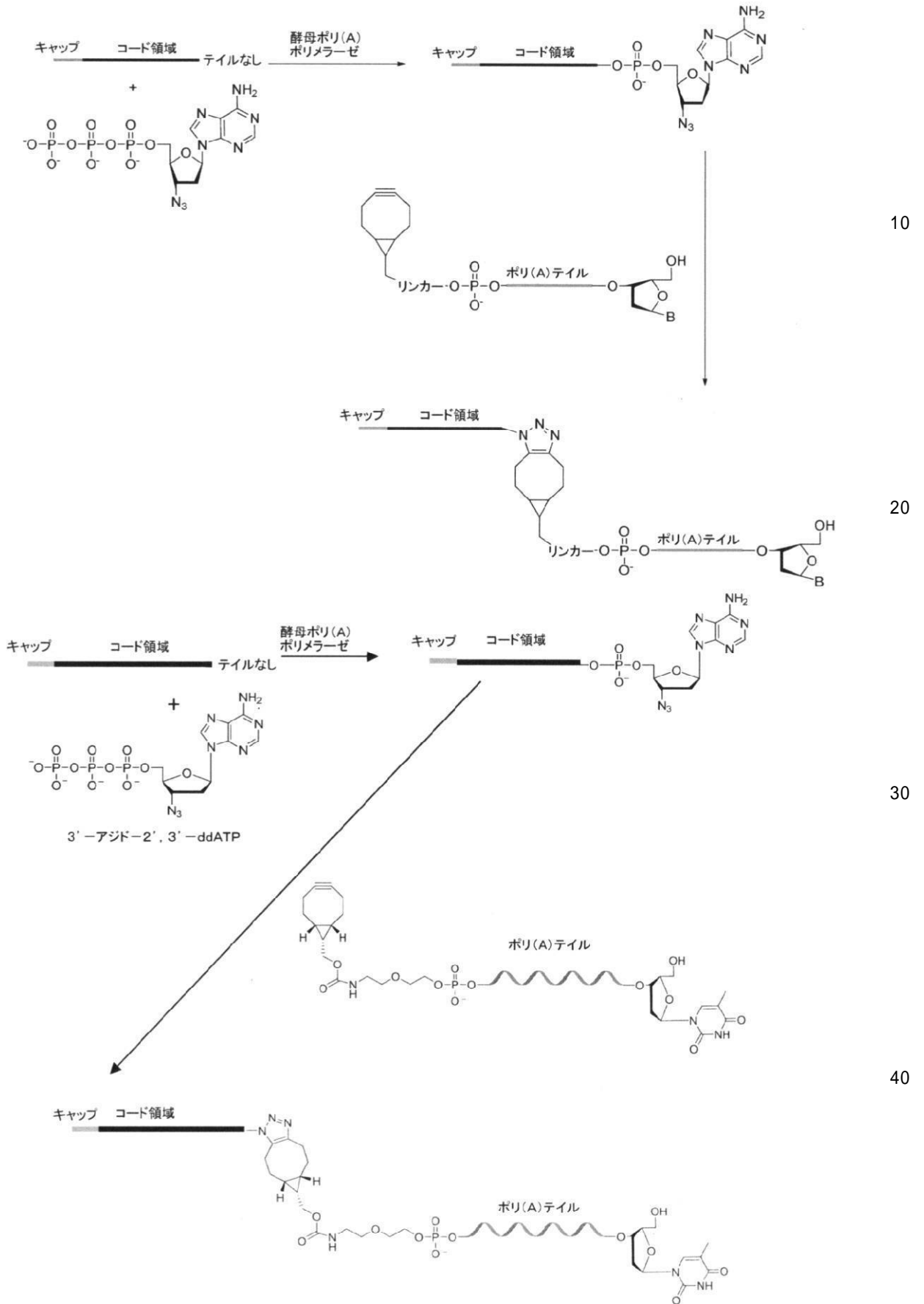
30

ポリ-Aテイルは、以下に示すように、本発明のキメラポリヌクレオチドに結合させることができる：

40

【0343】

【化 3 7】



10

20

30

40

固体支持体上で連続的連結を実施することができる。例えば、ビオチンで末端を修飾した最初のリンカー-DNA分子をストレプトアビジン被覆ビーズに結合させる。リンカー-D

50

NA分子の3'末端は、新来のDNA断片の5'末端と相補的である。各連結ステップ後、ビーズを洗浄してから、回収し、メガヌクレアーゼにより最終線状産物を放出させる。この方法によって、最適化された順序及び方向で、遺伝子の高速且つ効率的なアセンブリが可能になる。(タキタ(Takita)、DNA研究(DNA Research)、第20巻(4)、p.1~10、2013年;その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む)。固体支持体で合成された標識ポリヌクレオチドは、ソロベイチク(Soloveichik)らの米国特許出願公開第2001/0014753号明細書及びピナヤク(Vinayak)らの同第2003/0191303号明細書に開示されており、これらの内容は、全体として参照により本明細書に組み込むものとする。

【0344】

修飾及び結合キメラポリヌクレオチド

所望の機能又は特性を達成するために、鎖の合成中又は合成後に、キメラポリヌクレオチド又は核酸に非天然の修飾ヌクレオチドを導入してもよい。修飾は、ヌクレオチド間系統、プリン若しくはピリミジン塩基、又は糖に行ってもよい。修飾は、化学合成又はポリメラーゼ酵素を用いて、鎖の末端又は鎖のいずれか他の箇所に導入することができる。例えば、ヘキシトール核酸(HNA)は、ヌクレアーゼ耐性であり、RNAとの強力なハイブリダイゼーションをもたらす。2つのコドンにヘキシトール残基を有する短いメッセンジャーRNA(mRNA)が構築されている。(ラブリック(Lavrik)ら著、生化学(Biochemistry)、第40巻、p.11777~11784、2001年;その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む)。5'及び3'HNA配列によりフランキングされるホスホロチオエート中央配列を含むキメラHNAギャップマーオリゴヌクレオチドのアンチセンス効果も研究されている。(カン(Kang)ら著、核酸研究(Nucleic Acids Research)、第32巻(4)、p.4411~4419、2004年;その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む)。RNA妨害、アンチセンス療法又は他の用途における6員環を有する修飾ヌクレオチドの調製及び使用は、ヘルデウィジン(Herdewijin)らの米国特許出願第2008/0261905号明細書、同第2010/0009865号明細書、及び国際公開第97/30064号パンフレットに開示されている。修飾核酸及びその合成は、PCT/US2012/058519号明細書(代理人整理番号M09)(その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む)に開示されている。修飾ポリヌクレオチドの合成及び戦略は、フェルマ(Verma)及びエクシュタイン(Eckstein)により、アニュアルレビュー・オブ・バイオケミストリー(Annual Review of Biochemistry)、第76巻、p.99~134、1998年(その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む)に論じられている。

【0345】

キメラポリヌクレオチド又は核酸を種々の機能性ブロック、例えば、蛍光標識、液体、ナノ粒子、送達剤などと共役させるために、酵素的又は化学的連結方法のいずれを用いてもよい。ポリヌクレオチド及び修飾ポリヌクレオチドのコンジュゲートは、グッドチャイルド(Goodchild)により、バイオコンジュゲート・ケミストリー(Bioconjugate Chemistry)、第1巻(3)、p.165~187、1990年(その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む)により論じられている。ピナヤク(Vinayak)らの米国特許第6,835,827号明細書及び同第6,525,183号明細書は、標識固体支持体を用いた標識オリゴヌクレオチドの合成を教示している。

【0346】

例えば、本発明のキメラポリヌクレオチドは、式Va又はVb:

【0347】

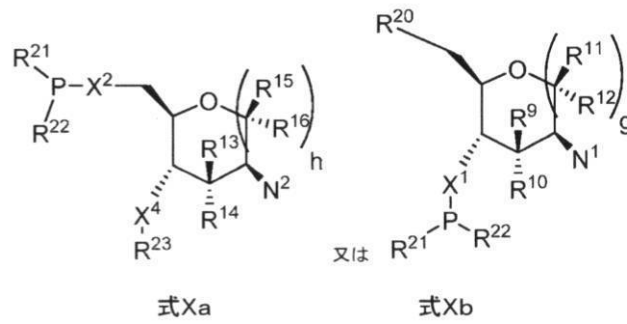
10

20

30

40

【化 4 3】



10

の構造を有する化合物

(式中、 N^1 及び N^2 の各々は、独立に、核酸塩基であり；

R^9 、 R^{10} 、 R^{11} 、 R^{12} 、 R^{13} 、 R^{14} 、 R^{15} 、及び R^{16} の各々は、独立に、H、ハロ、ヒドロキシ、チオール、任意選択で置換された $C_1 \sim C_6$ アルキル、任意選択で置換された $C_1 \sim C_6$ ヘテロアルキル、任意選択で置換された $C_2 \sim C_6$ ヘテロアルケニル、任意選択で置換された $C_2 \sim C_6$ ヘテロアルキニル、任意選択で置換されたアミノ、アジド、又は任意選択で置換された $C_6 \sim C_{10}$ アリールであり；

g 及び h の各々は、独立に、0 又は 1 であり；

X^4 は各々、独立に、O、NH、又は S であり；

X^1 及び X^2 は各々、独立に、O 又は S であり；

X^3 は各々、独立に、OH、SH、又はその塩であり；

R^{20} 及び R^{23} の各々は、独立に、連結ヌクレオシドの 1 領域であり；

R^{21} 及び R^{22} の各々は、独立に、任意選択で置換された $C_1 \sim C_6$ アルコキシである

る)

を (例えば、シュタウディングー (Staudinger) 反応条件下で) 反応させるステップを含む。

【0356】

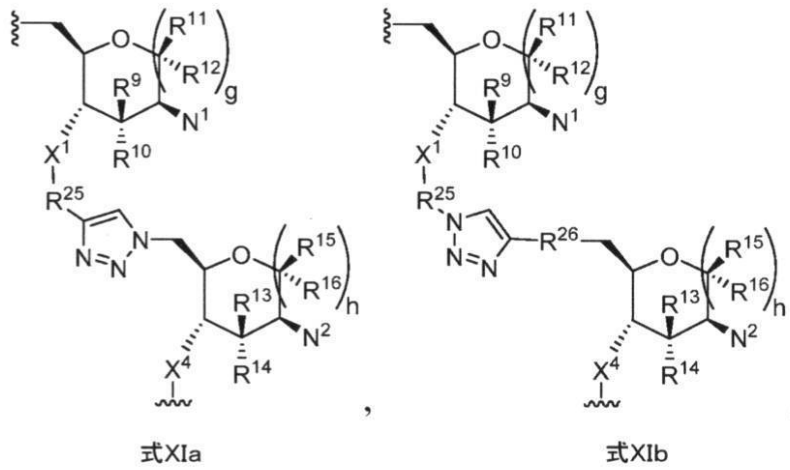
式 X I a、X I b、X I I a 又は X I I a :

【0357】

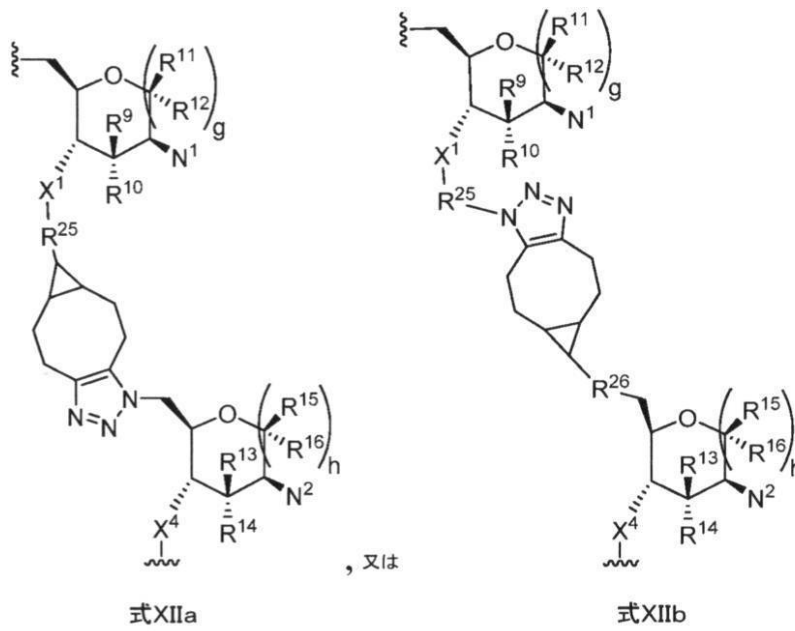
20

30

【化 4 4】



10



20

30

の構造を含む、本発明のキメラポリヌクレオチド。

【 0 3 5 8 】

この方法は、式XIIIa、XIIIb、XIVa、又はXIVb：

【 0 3 5 9 】

R^{24} 及び R^{27} の各々は、独立に、連結ヌクレオシドの 1 領域であり；

R^{25} 、 $R^{25'}$ 、 R^{26} 、及び $R^{26'}$ の各々は、非存在であるか、又は任意選択で置換された $C_1 \sim C_6$ アルキレン若しくは任意選択で置換された $C_1 \sim C_6$ ヘテロアルキレンであるか、あるいは、 R^{25} とアルキニル基は、一緒に、任意選択で置換されたシクロアルキニレンを形成する)

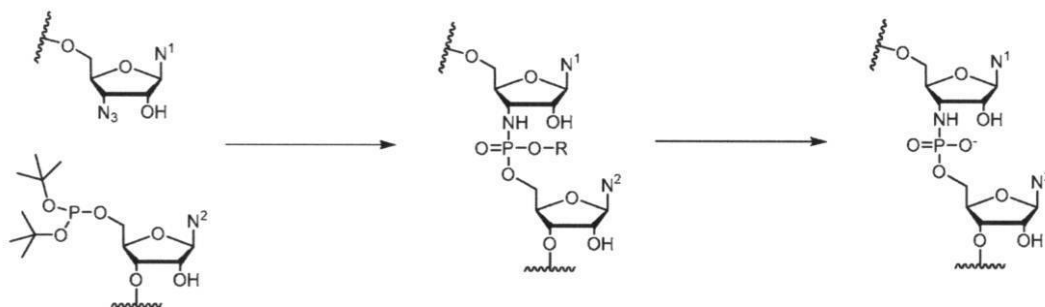
を（例えば、銅供給源の存在若しくは非存在下の [3 + 2] 環状付加条件下で）反応させるステップを含む。

【0361】

本発明のキメラポリヌクレオチドは、以下：

【0362】

【化47】



10

20

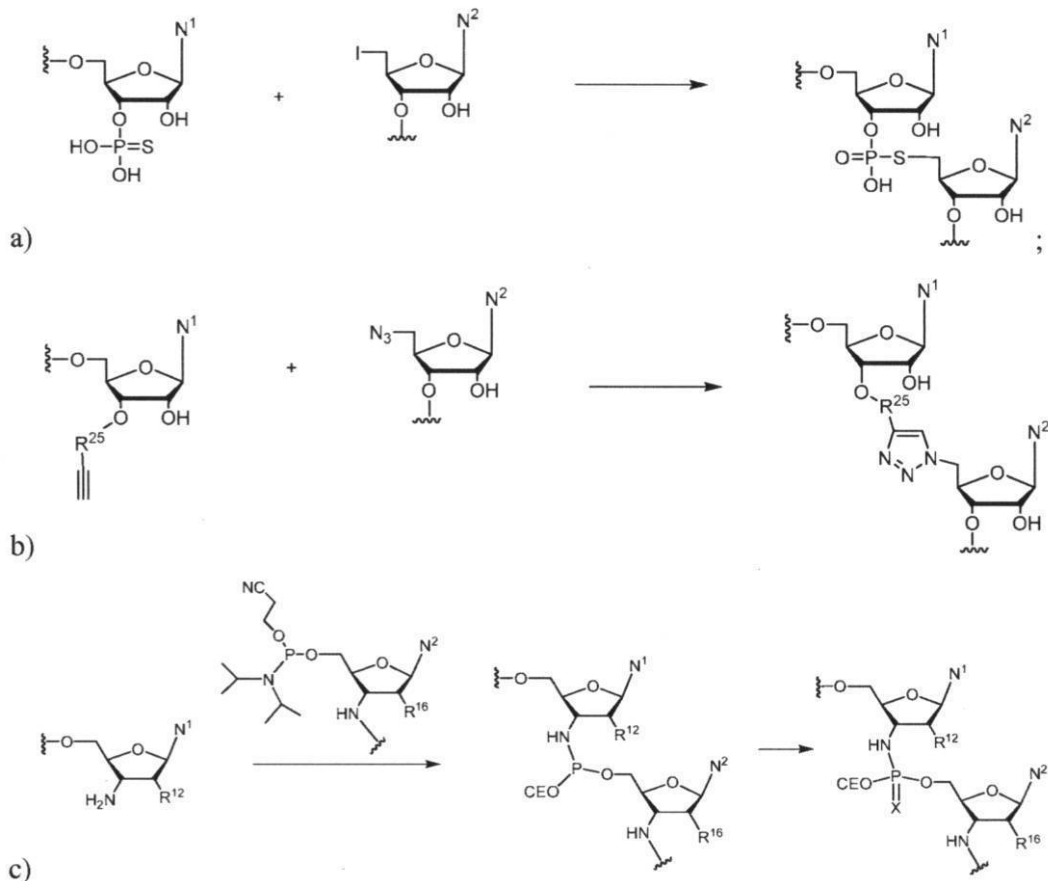
に示すように合成することができる。

【0363】

本発明のキメラポリヌクレオチドの他の合成方法を以下に示す：

【0364】

【化48】



30

40

50

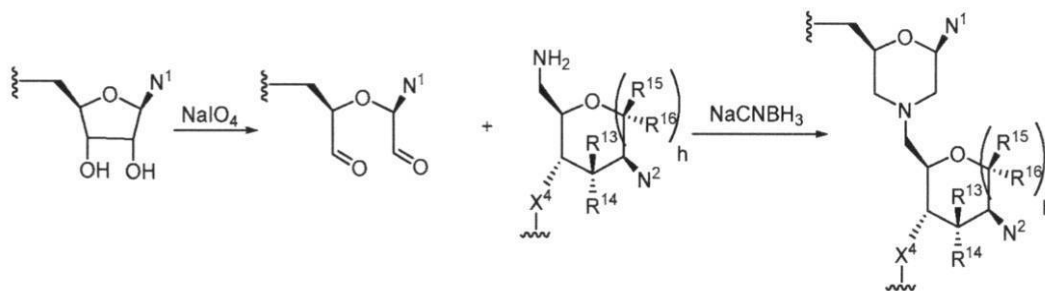
式中、C E Oは、2 - シアノエトキシであり、X は、O 又はS である。

【0365】

本発明のキメラポリヌクレオチドの他の合成方法を以下に示す：

【0366】

【化49】



10

3' (又は、g 若しくはh が1 のとき、4' 位) 及び5' (又は、g 若しくはh が1 のとき、6' 位) を逆転することができることは理解されよう。例えば、ハロゲン、アジド、又はアルキニル基を5' 位 (又は、g 若しくはh が1 のとき、6' 位) に結合させてもよいし、あるいは、チオリン酸、(チオ)ホスホリル、又はアジド基を3' 位 (又は、g 若しくはh が1 のとき、4' 位) に結合させてもよい。

20

【0367】

定量

一実施形態では、本発明のキメラポリヌクレオチドは、エキソソームで又は1種又は複数種の体液から得られる場合に定量してもよい。本明細書において、「体液」は、血液、血清、血漿、腹水、尿、脳髄液(CSF)、喀痰、唾液、骨髄、滑液、房水、羊水、耳垢、母乳、気管支肺胞洗浄液、精液、前立腺液、腺液若しくは前射精液、汗、大便、毛髪、涙、囊胞液、胸膜及び腹膜液、心膜液、リンパ液、キームス、乳糜、胆汁、腸液、月経、膿、皮脂、吐しゃ物、腔分泌物、粘液分泌物、水様便、腓液、鼻腔からの洗浄液、気管支肺吸引液、胚盤胞腔液、並びに臍帯血を含む。あるいは、エキソソームは、肺、心臓、膵臓、胃、腸、膀胱、腎臓、卵巣、精巣、皮膚、結腸、乳房、前立腺、脳、食道、肝臓、及び胎盤からなる群から選択される臓器から採取してもよい。

30

【0368】

エキソソーム定量方法では、対象から2 mL以下のサンプルを取得し、サイズ排除クロマトグラフィー、密度勾配遠心分離、分画遠心分離、ナノ膜限外濾過、免疫吸着捕捉、アフィニティ精製、マイクロ流体分離、又はこれらの組み合わせによってエキソソームを単離する。分析において、キメラポリヌクレオチドのレベル若しくは濃度は、投与された構築物の発現レベル、存在、非存在、切断又は改変であってもよい。1つ又は複数の臨床的表現型又はヒトの疾患バイオマーカのアッセイと上記のレベルを相関させることが有利である。アッセイは、構築物特異的プローブ、サイトメトリー、qRT-PCR、リアルタイムPCR、PCR、フローサイトメトリー、電気泳動、質量分析法、又はこれらの組み合わせを用いて実施することができ、エキソソームは、酵素結合イムノソルベントアッセイ(ELISA)法などの免疫組織化学法を用いて単離することができる。エキソソームはまた、サイズ排除クロマトグラフィー、密度勾配遠心分離、分画遠心分離、ナノ膜限外濾過、免疫吸着捕捉、アフィニティ精製、マイクロ流体分離、又はこれらの組み合わせによって単離することもできる。

40

【0369】

これらの方法によって、検査者は、残留する、又は送達されたキメラポリヌクレオチドのレベルをリアルタイムでモニターすることができる。これは、本発明のキメラポリヌクレオチドが、構造的又は化学的修飾によって、内因性の形態とは異なるために可能である。

50

【0370】

－実施形態では、キメラポリヌクレオチドは、限定はしないが、紫外・可視分光法（UV/Vis）などの方法を用いて定量することができる。UV/Vis分光計の非制限的例は、ナノドロップ（NANODROP）（登録商標）分光計（サーモフィッシャー（ThermoFisher）、マサチューセッツ州ウォルサム）である。キメラポリヌクレオチドが、適切なサイズであるか否かを決定し、キメラポリヌクレオチドの分解が起こっていないことを調べるために、定量したキメラポリヌクレオチドを分析してもよい。キメラポリヌクレオチドの分解は、アガロースゲル電気泳動、HPLC精製方法（例えば、限定はしないが、強アニオン交換HPLC、弱アニオン交換HPLC、逆相HPLC（RP-HPLC）、及び疎水性相互作用HPLC（HIC-HPLC）、液体クロマトグラフィー・質量分析法（LCMS）、キャピラリー電気泳動（CE）並びにキャピラリーゲル電気泳動（CGE）などの方法によって調べることができる。

10

【0371】

精製

キメラポリヌクレオチドの精製は、限定はしないが、クリーンアップ、品質保証及び品質管理を含み得る。クリーンアップは、当技術分野で公知の方法、例えば、限定はしないが、アジェンコート（AGENCOURT）（登録商標）ビーズ（ベックマン・コールター・ゲノミクス（Beckman Coulter Genomics）、マサチューセッツ州デーパー）、ポリ-Tビーズ、LNA（商標）オリゴT捕捉プローブ（エキシコン社（EXIQON（登録商標）Inc）、デンマーク、ベドベーク（Vedbaek））、又は例えば、限定はしないが、強アニオン交換HPLC、弱アニオン交換HPLC、逆相HPLC（RP-HPLC）、及び疎水性相互作用HPLC（HIC-HPLC）などのHPLC精製方法によって、実施することができる。用語「精製（された）」は、「精製キメラポリヌクレオチド」などのポリヌクレオチドに関して用いられるとき、少なくとも1つの混入物から分離されたものを指す。本明細書で用いられるとき、「混入物」は、他の物質を不適合、不純又は劣等にするいずれかの物質である。従って、精製されたポリヌクレオチド（例えば、DNA及びRNA）は、天然に見出されるものとは異なる形態若しくは状況、又はそれを処理若しくは精製方法に付す前に存在した形態とは異なる形態若しくは環境で存在する。

20

【0372】

品質保証及び/又は品質管理検査は、限定はしないが、ゲル電気泳動、UV吸光度、又は分析HPLCなどの方法を用いて実施することができる。

30

別の実施形態では、キメラポリヌクレオチドは、限定はしないが、逆転写酵素-PCRなどの方法によって配列決定することができる。

【0373】

III. 修飾

本明細書で、ポリヌクレオチド（例えば、コード又は非コードにかかわらず、キメラポリヌクレオチド）に使用されるとき、用語「化学修飾」、又は必要に応じて「化学的に修飾された」は、アデノシン（A）、グアノシン（G）、ウリジン（U）、チミジン（T）又はシチジン（C）リボ-若しくはデオキシリボヌクレオチドに対し、それらの位置、パターン、割合（%）若しくは集団の1つ又は複数において為される修飾を指す。概して、本明細書では、これらの用語は、天然に存在する5'-末端mRNAキャップ部分におけるリボヌクレオチド修飾を指すことは意図しない。

40

【0374】

ポリペプチドの場合、「修飾」という用語は、20アミノ酸の標準的なセットと比較した修飾を指す。

修飾は、様々な異なる修飾であってもよい。一部の実施形態では、領域は、1つ、2つ、又はそれ以上の（任意選択で異なる）ヌクレオチド又はヌクレオチド修飾を含み得る。一部の実施形態では、導入された修飾キメラポリヌクレオチドは、非修飾ポリヌクレオチドと比較して、細胞中での分解の低減を呈示し得る。

50

【 0 3 7 5 】

本発明で有用な修飾として、限定はしないが、表 2 に示すものが挙げられる。この表には、修飾の符号、核酸塩基のタイプ、及び / 又は修飾が天然に存在するか否かを表示している。

【 0 3 7 6 】

【表 2 - 1】

表 2. 修飾

名称	符号	塩基	天然に存在
2-メチルチオ-N6-(シス-ヒドロキシイソペンテニル)アデノシン	ms2i6A	A	する
2-メチルチオ-N6-メチルアデノシン	ms2m6A	A	する
2-メチルチオ-N6-スレオニルカルバモイルアデノシン	ms2t6A	A	する
N6-グリシニルカルバモイルアデノシン	g6A	A	する
N6-イソペンテニルアデノシン	i6A	A	する
N6-メチルアデノシン	m6A	A	する
N6-スレオニルカルバモイルアデノシン	t6A	A	する
1,2'-O-ジメチルアデノシン	m1Am	A	する
1-メチルアデノシン	m1A	A	する
2'-O-メチルアデノシン	Am	A	する
2'-O-リボシルアデノシン(リン酸)	Ar(p)	A	する
2-メチルアデノシン	m2A	A	する
2-メチルチオ-N6イソペンテニルアデノシン	ms2i6A	A	する
2-メチルチオ-N6-ヒドロキシノルバリルカルバモイルアデノシン	ms2hn6A	A	する
2'-O-メチルアデノシン	m6A	A	する
2'-O-リボシルアデノシン(リン酸)	Ar(p)	A	する
イソペンテニルアデノシン	Iga	A	する
N6-(シス-ヒドロキシイソペンテニル)アデノシン	io6A	A	する
N6,2'-O-ジメチルアデノシン	m6Am	A	する
N ⁶ ,2'-O-ジメチルアデノシン	m ⁶ Am	A	する
N6,N6,2'-O-トリメチルアデノシン	m62Am	A	する
N6,N6-ジメチルアデノシン	m62A	A	する
N6-アセチルアデノシン	ac6A	A	する
N6-ヒドロキシノルバリルカルバモイルアデノシン	hn6A	A	する
N6-メチル-N6-スレオニルカルバモイルアデノシン	m6t6A	A	する
2-メチルアデノシン	m ² A	A	する
2-メチルチオ-N ⁶ -イソペンテニルアデノシン	ms ² i ⁶ A	A	する
7-デアザ-アデノシン	--	A	しない
N1-メチルアデノシン	--	A	しない
N6, N6 (ジメチル)アデニン	--	A	しない
N6-シス-ヒドロキシイソペンテニル-アデノシン	--	A	しない
α-チオ-アデノシン	--	A	しない
2 (アミノ)アデニン	--	A	しない
2 (アミノプロピル)アデニン	--	A	しない
2 (メチルチオ) N6 (イソペンテニル)アデニン	--	A	しない
2-(アルキル)アデニン	--	A	しない

10

20

30

40

【表 2 - 2】

2-(アミノアルキル)アデニン	--	A	しない
2-(アミノプロピル)アデニン	--	A	しない
2-(ハロ)アデニン	--	A	しない
2-(ハロ)アデニン	--	A	しない
2-(プロピル)アデニン	--	A	しない
2'-アミノ-2'-デオキシ-ATP	--	A	しない
2'-アジド-2'-デオキシ-ATP	--	A	しない
2'-デオキシ-2'-a-アミノアデノシン TP	--	A	しない
2'-デオキシ-2'-a-アジドアデノシン TP	--	A	しない
6(アルキル)アデニン	--	A	しない
6(メチル)アデニン	--	A	しない
6-(アルキル)アデニン	--	A	しない
6-(メチル)アデニン	--	A	しない
7(デアザ)アデニン	--	A	しない
8(アルケニル)アデニン	--	A	しない
8(アルキニル)アデニン	--	A	しない
8(アミノ)アデニン	--	A	しない
8(チオアルキル)アデニン	--	A	しない
8-(アルケニル)アデニン	--	A	しない
8-(アルキル)アデニン	--	A	しない
8-(アルキニル)アデニン	--	A	しない
8-(アミノ)アデニン	--	A	しない
8-(ハロ)アデニン	--	A	しない
8-(ヒドロキシル)アデニン	--	A	しない
8-(チオアルキル)アデニン	--	A	しない
8-(チオール)アデニン	--	A	しない
8-アジド-アデノシン	--	A	しない
アザアデニン	--	A	しない
デアザアデニン	--	A	しない
N6(メチル)アデニン	--	A	しない
N6-(イソペンチル)アデニン	--	A	しない
7-デアザ-8-アザ-アデノシン	--	A	しない
7-メチルアデニン	--	A	しない
1-デアザアデノシンTP	--	A	しない
2'フルオロ-N6-Bz-デオキシアデノシン TP	--	A	しない
2'-OMe-2'-アミノ-ATP	--	A	しない
2'O-メチル-N6-Bz-デオキシアデノシンTP	--	A	しない
2'-a-エチニルアデノシンTP	--	A	しない
2-アミノアデニン	--	A	しない
2-アミノアデノシンTP	--	A	しない
2-アミノ-ATP	--	A	しない
2'-a-トリフルオロメチルアデノシンTP	--	A	しない
2-アジドアデノシンTP	--	A	しない
2'-b-エチニルアデノシンTP	--	A	しない
2-ブロモアデノシンTP	--	A	しない
2'-b-トリフルオロメチルアデノシン TP	--	A	しない
2-クロロアデノシンTP	--	A	しない
2'-デオキシ-2',2'-ジフルオロアデノシンTP	--	A	しない

10

20

30

40

【表 2 - 3】

2'-デオキシ-2'-a-メルカプトアデノシンTP	--	A	しない
2'-デオキシ-2'-a-チオメトキシアデノシンTP	--	A	しない
2'-デオキシ-2'-b-アミノアデノシンTP	--	A	しない
2'-デオキシ-2'-b-アジドアデノシンTP	--	A	しない
2'-デオキシ-2'-b-プロモアデノシンTP	--	A	しない
2'-デオキシ-2'-b-クロロアデノシンTP	--	A	しない
2'-デオキシ-2'-b-フルオロアデノシンTP	--	A	しない
2'-デオキシ-2'-b-ヨードアデノシンTP	--	A	しない
2'-デオキシ-2'-b-メルカプトアデノシンTP	--	A	しない
2'-デオキシ-2'-b-チオメトキシアデノシンTP	--	A	しない
2-フルオロアデノシンTP	--	A	しない
2-ヨードアデノシンTP	--	A	しない
2-メルカプトアデノシンTP	--	A	しない
2-メトキシ-アデニン	--	A	しない
2-メチルチオ-アデニン	--	A	しない
2-トリフルオロメチルアデノシンTP	--	A	しない
3-デアザ-3-プロモアデノシンTP	--	A	しない
3-デアザ-3-クロロアデノシンTP	--	A	しない
3-デアザ-3-フルオロアデノシンTP	--	A	しない
3-デアザ-3-ヨードアデノシンTP	--	A	しない
3-デアザアデノシンTP	--	A	しない
4'-アジドアデノシンTP	--	A	しない
4'-炭素環式アデノシンTP	--	A	しない
4'-エチニルアデノシンTP	--	A	しない
5'-ホモ-アデノシンTP	--	A	しない
8-アザ-ATP	--	A	しない
8-プロモ-アデノシンTP	--	A	しない
8-トリフルオロメチルアデノシンTP	--	A	しない
9-デアザアデノシンTP	--	A	しない
2-アミノプリン	--	A/G	しない
7-デアザ-2,6-ジアミノプリン	--	A/G	しない
7-デアザ-8-アザ-2,6-ジアミノプリン	--	A/G	しない
7-デアザ-8-アザ-2-アミノプリン	--	A/G	しない
2,6-ジアミノプリン	--	A/G	しない
7-デアザ-8-アザ-アデニン, 7-デアザ-2-アミノプリン	--	A/G	しない
2-チオシチジン	s2C	C	する
3-メチルシチジン	m3C	C	する
5-ホルミルシチジン	f5C	C	する
5-ヒドロキシメチルシチジン	hm5C	C	する
5-メチルシチジン	m5C	C	する
N4-アセチルシチジン	ac4C	C	する
2'-O-メチルシチジン	Cm	C	する
5,2'-O-ジメチルシチジン	m5 Cm	C	する
5-ホルミル-2'-O-メチルシチジン	f5Cm	C	する
リシジン	k2C	C	する
N4,2'-O-ジメチルシチジン	m4Cm	C	する
N4-アセチル-2'-O-メチルシチジン	ac4Cm	C	する

10

20

30

40

【表 2 - 4】

N4-メチルシチジン	m4C	C	する
N4,N4-ジメチル-2'-OMe-シチジンTP	--	C	する
4-メチルシチジン	--	C	しない
5-アザ-シチジン	--	C	しない
プソイド-イソ-シチジン	--	C	しない
ピロロ-シチジン	--	C	しない
α -チオ-シチジン	--	C	しない
2-(チオ)シトシン	--	C	しない
2'-アミノ-2'-デオキシ-CTP	--	C	しない
2'-アジド-2'-デオキシ-CTP	--	C	しない
2'-デオキシ-2'-a-アミノシチジンTP	--	C	しない
2'-デオキシ-2'-a-アジドシチジンTP	--	C	しない
3(デアザ)5(アザ)シトシン	--	C	しない
3(メチル)シトシン	--	C	しない
3-(アルキル)シトシン	--	C	しない
3-(デアザ)5(アザ)シトシン	--	C	しない
3-(メチル)シチジン	--	C	しない
4,2'-O-ジメチルシチジン	--	C	しない
5(ハロ)シトシン	--	C	しない
5(メチル)シトシン	--	C	しない
5(プロピニル)シトシン	--	C	しない
5(トリフルオロメチル)シトシン	--	C	しない
5-(アルキル)シトシン	--	C	しない
5-(アルキニル)シトシン	--	C	しない
5-(ハロ)シトシン	--	C	しない
5-(プロピニル)シトシン	--	C	しない
5-(トリフルオロメチル)シトシン	--	C	しない
5-ブロモ-シチジン	--	C	しない
5-ヨード-シチジン	--	C	しない
5-プロピニル シトシン	--	C	しない
6-(アゾ)シトシン	--	C	しない
6-アザ-シチジン	--	C	しない
アザシトシン	--	C	しない
デアザシトシン	--	C	しない
N4(アセチル)シトシン	--	C	しない
1-メチル-1-デアザ-プソイドイソシチジン	--	C	しない
1-メチル-プソイドイソシチジン	--	C	しない
2-メトキシ-5-メチルシチジン	--	C	しない
2-メトキシ-シチジン	--	C	しない
2-チオ-5-メチルシチジン	--	C	しない
4-メトキシ-1-メチル-プソイドイソシチジン	--	C	しない
4-メトキシ-プソイドイソシチジン	--	C	しない
4-チオ-1-メチル-1-デアザ-プソイドイソシチジン	--	C	しない
4-チオ-1-メチル-プソイドイソシチジン	--	C	しない
4-チオ-プソイドイソシチジン	--	C	しない
5-アザ-ゼブラリン	--	C	しない
5-メチル-ゼブラリン	--	C	しない

10

20

30

40

【表 2 - 5】

ピロロ-プソイドイソシチジン	--	C	しない
ゼブラリン	--	C	しない
(E)-5-(2-ブロモ-ビニル)シチジンTP	--	C	しない
2,2'-アンヒドロ-シチジンTP塩酸塩	--	C	しない
2'フルオール-N4-Bz-シチジンTP	--	C	しない
2'フルオロ-N4-アセチル-シチジンTP	--	C	しない
2'-O-メチル-N4-アセチル-シチジン TP	--	C	しない
2'O-メチル-N4-Bz-シチジンTP	--	C	しない
2'-a-エチニルシチジンTP	--	C	しない
2'-a-トリフルオロメチルシチジンTP	--	C	しない
2'-b-エチニルシチジンTP	--	C	しない
2'-b-トリフルオロメチルシチジンTP	--	C	しない
2'-デオキシ-2',2'-ジフルオロシチジン TP	--	C	しない
2'-デオキシ-2'-a-メルカプトシチジン TP	--	C	しない
2'-デオキシ-2'-a-チオメトキシシチジンTP	--	C	しない
2'-デオキシ-2'-b-アミノシチジンTP	--	C	しない
2'-デオキシ-2'-b-アジドシチジンTP	--	C	しない
2'-デオキシ-2'-b-ブロモシチジンTP	--	C	しない
2'-デオキシ-2'-b-クロロシチジンTP	--	C	しない
2'-デオキシ-2'-b-フルオロシチジン TP	--	C	しない
2'-デオキシ-2'-b-ヨードシチジンTP	--	C	しない
2'-デオキシ-2'-b-メルカプトシチジン TP	--	C	しない
2'-デオキシ-2'-b-チオメトキシシチジンTP	--	C	しない
2'-O-メチル-5-(1-プロピニル)シチジン TP	--	C	しない
3'-エチニルシチジンTP	--	C	しない
4'-アジドシチジンTP	--	C	しない
4'-炭素環式シチジンTP	--	C	しない
4'-エチニルシチジンTP	--	C	しない
5-(1-プロピニル)アラ-シチジンTP	--	C	しない
5-(2-クロロ-フェニル)-2-チオシチジン TP	--	C	しない
5-(4-アミノ-フェニル)-2-チオシチジン TP	--	C	しない
5-アミノアリル-CTP	--	C	しない
5-シアノシチジンTP	--	C	しない
5-エチニルアラ-シチジンTP	--	C	しない
5-エチニルシチジンTP	--	C	しない
5'-ホモ-シチジンTP	--	C	しない
5-メトキシシチジンTP	--	C	しない
5-トリフルオロメチルシチジンTP	--	C	しない
N4-アミノシチジンTP	--	C	しない
N4-ベンゾイル-シチジンTP	--	C	しない
プソイドイソシチジン	--	C	しない
7-メチルグアノシン	m7G	G	する
N2,2'-O-ジメチルグアノシン	m2Gm	G	する
N2-メチルグアノシン	m2G	G	する
ワイオシン	imG	G	する
1,2'-O-ジメチルグアノシン	m1Gm	G	する
1-メチルグアノシン	m1G	G	する
2'-O-メチルグアノシン	Gm	G	する

10

20

30

40

【表 2 - 6】

2'-O-リボシルグアノシン(リン酸)	Gr(p)	G	する
2'-O-メチルグアノシン	Gm	G	する
2'-O-リボシルグアノシン(リン酸)	Gr(p)	G	する
7-アミノメチル-7-デアザグアノシン	preQ1	G	する
7-シアノ-7-デアザグアノシン	preQ0	G	する
アルカエオシン	G+	G	する
メチルワイオシン	mimG	G	する
N2,7-ジメチルグアノシン	m2,7G	G	する
N2,N2,2'-O-トリメチルグアノシン	m22Gm	G	する
N2,N2,7-トリメチルグアノシン	m2,2,7G	G	する
N2,N2-ジメチルグアノシン	m22G	G	する
N ² ,7,2'-O-トリメチルグアノシン	m ^{2,7} Gm	G	する
6-チオ-グアノシン	--	G	しない
7-デアザ-グアノシン	--	G	しない
8-オキソ-グアノシン	--	G	しない
N1-メチルグアノシン	--	G	しない
α-チオ-グアノシン	--	G	しない
2 (プロピル)グアニン	--	G	しない
2-(アルキル)グアニン	--	G	しない
2'-アミノ-2'-デオキシ-GTP	--	G	しない
2'-アジド-2'-デオキシ-GTP	--	G	しない
2'-デオキシ-2'-a-アミノグアノシン TP	--	G	しない
2'-デオキシ-2'-a-アジドグアノシン TP	--	G	しない
6 (メチル)グアニン	--	G	しない
6-(アルキル)グアニン	--	G	しない
6-(メチル)グアニン	--	G	しない
6-メチルグアノシン	--	G	しない
7 (アルキル)グアニン	--	G	しない
7 (デアザ)グアニン	--	G	しない
7 (メチル)グアニン	--	G	しない
7-(アルキル)グアニン	--	G	しない
7-(デアザ)グアニン	--	G	しない
7-(メチル)グアニン	--	G	しない
8 (アルキル)グアニン	--	G	しない
8 (アルキニル)グアニン	--	G	しない
8 (ハロ)グアニン	--	G	しない
8 (チオアルキル)グアニン	--	G	しない
8-(アルケニル)グアニン	--	G	しない
8-(アルキル)グアニン	--	G	しない
8-(アルキニル)グアニン	--	G	しない
8-(アミノ)グアニン	--	G	しない
8-(ハロ)グアニン	--	G	しない
8-(ヒドロキシル)グアニン	--	G	しない
8-(チオアルキル)グアニン	--	G	しない
8-(チオール)グアニン	--	G	しない
アザグアニン	--	G	しない
デアザグアニン	--	G	しない
N-(メチル)グアニン	--	G	しない

10

20

30

40

【表 2 - 7】

1-メチル-6-チオ-グアノシン	--	G	しない
6-メトキシ-グアノシン	--	G	しない
6-チオ-7-デアザ-8-アザ-グアノシン	--	G	しない
6-チオ-7-デアザ-グアノシン	--	G	しない
6-チオ-7-メチルグアノシン	--	G	しない
7-デアザ-8-アザ-グアノシン	--	G	しない
7-メチル-8-オキソ-グアノシン	--	G	しない
N2,N2-ジメチル-6-チオ-グアノシン	--	G	しない
N2-メチル-6-チオ-グアノシン	--	G	しない
1-Me-GTP	--	G	しない
2'フルオロ-N2-イソブチル-グアノシン TP	--	G	しない
2'O-メチル-N2-イソブチル-グアノシン TP	--	G	しない
2'-a-エチニルグアノシンTP	--	G	しない
2'-a-トリフルオロメチルグアノシン TP	--	G	しない
2'-b-エチニルグアノシンTP	--	G	しない
2'-b-トリフルオロメチルグアノシンTP	--	G	しない
2'-デオキシ-2',2'-ジフルオログアノシンTP	--	G	しない
2'-デオキシ-2'-a-メルカプトグアノシンTP	--	G	しない
2'-デオキシ-2'-a-チオメトキシグアノシンTP	--	G	しない
2'-デオキシ-2'-b-アミノグアノシン TP	--	G	しない
2'-デオキシ-2'-b-アジドグアノシン TP	--	G	しない
2'-デオキシ-2'-b-プロモグアノシン TP	--	G	しない
2'-デオキシ-2'-b-クロログアノシン TP	--	G	しない
2'-デオキシ-2'-b-フルオログアノシン TP	--	G	しない
2'-デオキシ-2'-b-ヨードグアノシン TP	--	G	しない
2'-デオキシ-2'-b-メルカプトグアノシンTP	--	G	しない
2'-デオキシ-2'-b-チオメトキシグアノシンTP	--	G	しない
4'-アジドグアノシンTP	--	G	しない
4'-炭素環式 グアノシンTP	--	G	しない
4'-エチニルグアノシンTP	--	G	しない
5'-ホモ-グアノシンTP	--	G	しない
8-プロモ-グアノシンTP	--	G	しない
9-デアザグアノシンTP	--	G	しない
N2-イソブチル-グアノシンTP	--	G	しない
1-メチルイノシン	mII	I	する
イノシン	I	I	する
1,2'-O-ジメチルイノシン	mIIIm	I	する
2'-O-メチルイノシン	Im	I	する
7-メチルイノシン		I	しない
2'-O-メチルイノシン	Im	I	する
エポキシクエオシン	oQ	Q	する
ガラクトシル-クエオシン	galQ	Q	する
マンノシルクエオシン	manQ	Q	する
クエオシン	Q	Q	する
アリアミノ-チミジン	--	T	しない
アザ チミジン	--	T	しない
デアザ チミジン	--	T	しない
デオキシ-チミジン	--	T	しない

10

20

30

40

【表 2 - 8】

2'-O-メチルウリジン	--	U	する
2-チオウリジン	s2U	U	する
3-メチルウリジン	m3U	U	する
5-カルボキシメチルウリジン	cm5U	U	する
5-ヒドロキシウリジン	ho5U	U	する
5-メチルウリジン	m5U	U	する
5-タウリノメチル-2-チオウリジン	tm5s2U	U	する
5-タウリノメチルウリジン	tm5U	U	する
ジヒドロウリジン	D	U	する
プソイドウリジン	Ψ	U	する
(3-(3-アミノ-3-カルボキシプロピル)ウリジン	acp3U	U	する
1-メチル-3-(3-アミノ-5-カルボキシプロピル)プソイドウリジン	m1acp3Ψ	U	する
1-メチルプソイドウリジン	m1Ψ	U	する
2'-O-メチルウリジン	Um	U	する
2'-O-メチルプソイドウリジン	Ψm	U	する
2-チオ-2'-O-メチルウリジン	s2Um	U	する
3-(3-アミノ-3-カルボキシプロピル)ウリジン	acp3U	U	する
3,2'-O-ジメチルウリジン	m3Um	U	する
3-メチル-プソイド-ウリジンTP	--	U	する
4-チオウリジン	s4U	U	する
5-(カルボキシヒドロキシメチル)ウリジン	chm5U	U	する
5-(カルボキシヒドロキシメチル)ウリジン メチル エステル	mchm5U	U	する
5,2'-O-ジメチルウリジン	m5Um	U	する
5,6-ジヒドロ-ウリジン	--	U	する
5-アミノメチル-2-チオウリジン	nm5s2U	U	する
5-カルバモイルメチル-2'-O-メチルウリジン	nem5Um	U	する
5-カルバモイルメチルウリジン	nem5U	U	する
5-カルボキシヒドロキシメチルウリジン	--	U	する
5-カルボキシヒドロキシメチルウリジン メチル エステル	--	U	する
5-カルボキシメチルアミノメチル-2'-O-メチルウリジン	cmnm5Um	U	する
5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン	cmnm5s2U	U	する
5-カルボキシメチルアミノメチルウリジン	cmnm5U	U	する
5-カルバモイルメチルウリジンTP	--	U	する
5-メトキシカルボニルメチル-2'-O-メチルウリジン	mcm5Um	U	する
5-メトキシカルボニルメチル-2-チオウリジン	mcm5s2U	U	する
5-メトキシカルボニルメチルウリジン	mcm5U	U	する
5-メトキシウリジン	mo5U	U	する
5-メチル-2-チオウリジン	m5s2U	U	する
5-メチルアミノメチル-2-セレノウリジン	mn5se2U	U	する
5-メチルアミノメチル-2-チオウリジン	mn5s2U	U	する
5-メチルアミノメチルウリジン	mn5U	U	する
5-メチルジヒドロウリジン	--	U	する

10

20

30

40

【表 2 - 9】

5-オキシ酢酸-ウリジンTP	--	U	する
5-オキシ酢酸-メチル エステル-ウリジンTP	--	U	する
N1-メチル-プソイド-ウリジン	--	U	する
ウリジン5-オキシ酢酸	cmo5U	U	する
ウリジ5-オキシ酢酸メチルエステル	mcmo5U	U	する
3-(3-アミノ-3-カルボキシプロピル)-ウリジンTP	--	U	する
5-(イソペンテニルアミノメチル)- 2-チオウリジンTP	--	U	する
5-(イソペンテニルアミノメチル)-2'-O-メチルウリジンTP	--	U	する
5-(イソペンテニルアミノメチル)ウリジンTP	--	U	する
5-プロピニルウラシル	--	U	しない
α -チオウリジン	--	U	しない
1 (アミノアルキルアミノ-カルボニルエチレニル)-2(チオ)-プソイドウラシル	--	U	しない
1 (アミノアルキルアミノカルボニルエチレニル)-2,4-(ジチオ)プソイドウラシル	--	U	しない
1 (アミノアルキルアミノカルボニルエチレニル)-4(チオ)プソイドウラシル	--	U	しない
1 (アミノアルキルアミノカルボニルエチレニル)-プソイドウラシル	--	U	しない
1 (アミノカルボニルエチレニル)-2(チオ)-プソイドウラシル	--	U	しない
1 (アミノカルボニルエチレニル)-2,4-(ジチオ)プソイドウラシル	--	U	しない
1 (アミノカルボニルエチレニル)-4(チオ)プソイドウラシル	--	U	しない
1 (アミノカルボニルエチレニル)-プソイドウラシル	--	U	しない
1 置換2(チオ)-プソイドウラシル	--	U	しない
1 置換2,4-(ジチオ)プソイドウラシル	--	U	しない
1 置換4(チオ)プソイドウラシル	--	U	しない
1 置換プソイドウラシル	--	U	しない
1-(アミノアルキルアミノ-カルボニルエチレニル)-2-(チオ)-プソイドウラシル	--	U	しない
1-メチル-3-(3-アミノ-3-カルボキシプロピル)プソイドウリジンTP	--	U	しない
1-メチル-3-(3-アミノ-3-カルボキシプロピル)プソイド-UTP	--	U	しない
1-メチル-プソイド-UTP	--	U	しない
2(チオ)プソイドウラシル	--	U	しない
2' デオキシウリジン	--	U	しない
2' フルオロウリジン	--	U	しない
2-(チオ)ウラシル	--	U	しない
2,4-(ジチオ)プソイドウラシル	--	U	しない
2' メチル, 2'アミノ, 2'アジド, 2'フルロ-グアノシン	--	U	しない

10

20

30

40

【表 2 - 1 0】

2'-アミノ-2'-デオキシ-UTP	--	U	しない
2'-アジド-2'-デオキシ-UTP	--	U	しない
2'-アジド-デオキシウリジンTP	--	U	しない
2'-O-メチルプソイドウリジン	--	U	しない
2' デオキシウリジン	2' dU	U	しない
2' フルオロウリジン	--	U	しない
2'-デオキシ-2'-a-アミノウリジンTP	--	U	しない
2'-デオキシ-2'-a-アジドウリジンTP	--	U	しない
2-メチルプソイドウリジン	m3Ψ	U	しない
3 (3アミノ-3 カルボキシプロピル)ウラシル	--	U	しない
4 (チオ)プソイドウラシル	--	U	しない
4-チオウラシル	--	U	しない
5 (1,3-ジアゾール-1-アルキル)ウラシル	--	U	しない
5 (2-アミノプロピル)ウラシル	--	U	しない
5 (アミノアルキル)ウラシル	--	U	しない
5 (ジメチルアミノアルキル)ウラシル	--	U	しない
5 (グアニジニウムアルキル)ウラシル	--	U	しない
5 (メトキシカルボニルメチル)-2-(チオ)ウラシル	--	U	しない
5 (メトキシカルボニル-メチル)ウラシル	--	U	しない
5 (メチル) 2 (チオ)ウラシル	--	U	しない
5 (メチル) 2,4 (ジチオ)ウラシル	--	U	しない
5 (メチル) 4 (チオ)ウラシル	--	U	しない
5 (メチルアミノメチル)-2 (チオ)ウラシル	--	U	しない
5 (メチルアミノメチル)-2,4 (ジチオ)ウラシル	--	U	しない
5 (メチルアミノメチル)-4 (チオ)ウラシル	--	U	しない
5 (プロピニル)ウラシル	--	U	しない
5 (トリフルオロメチル)ウラシル	--	U	しない
5-(2-アミノプロピル)ウラシル	--	U	しない
5-(アルキル)-2-(チオ)プソイドウラシル	--	U	しない
5-(アルキル)-2,4 (ジチオ)プソイドウラシル	--	U	しない
5-(アルキル)-4 (チオ)プソイドウラシル	--	U	しない
5-(アルキル)プソイドウラシル	--	U	しない
5-(アルキル)ウラシル	--	U	しない
5-(アルキニル)ウラシル	--	U	しない
5-(アリルアミノ)ウラシル	--	U	しない
5-(シアノアルキル)ウラシル	--	U	しない
5-(ジアルキルアミノアルキル)ウラシル	--	U	しない
5-(ジメチルアミノアルキル)ウラシル	--	U	しない
5-(グアニジニウムアルキル)ウラシル	--	U	しない
5-(ハロ)ウラシル	--	U	しない
5-(1,3-ジアゾール-1-アルキル)ウラシル	--	U	しない
5-(メトキシ)ウラシル	--	U	しない
5-(メトキシカルボニルメチル)-2-(チオ)ウラシル	--	U	しない
5-(メトキシカルボニル-メチル)ウラシル	--	U	しない
5-(メチル) 2(チオ)ウラシル	--	U	しない
5-(メチル) 2,4 (ジチオ)ウラシル	--	U	しない

10

20

30

40

【表 2 - 1 1】

5-(メチル)4(チオ)ウラシル	--	U	しない
5-(メチル)-2-(チオ)プソイドウラシル	--	U	しない
5-(メチル)-2,4(ジチオ)プソイドウラシル	--	U	しない
5-(メチル)-4(チオ)プソイドウラシル	--	U	しない
5-(メチル)プソイドウラシル	--	U	しない
5-(メチルアミノメチル)-2(チオ)ウラシル	--	U	しない
5-(メチルアミノメチル)-2,4(ジチオ)ウラシル	--	U	しない
5-(メチルアミノメチル)-4-(チオ)ウラシル	--	U	しない
5-(プロピニル)ウラシル	--	U	しない
5-(トリフルオロメチル)ウラシル	--	U	しない
5-アミノアシル-ウリジン	--	U	しない
5-プロモ-ウリジン	--	U	しない
5-ヨード-ウリジン	--	U	しない
5-ウラシル	--	U	しない
6-(アゾ)ウラシル	--	U	しない
6-アザ-ウリジン	--	U	しない
アリアミノ-ウラシル	--	U	しない
アザ ウラシル	--	U	しない
デアザ ウラシル	--	U	しない
N3(メチル)ウラシル	--	U	しない
プソイド-UTP-1-2-エタン酸	--	U	しない
プソイドウラシル	--	U	しない
4-チオ-プソイド-UTP	--	U	しない
1-カルボキシメチル-プソイドウリジン	--	U	しない
1-メチル-1-デアザ-プソイドウリジン	--	U	しない
1-プロピニル-ウリジン	--	U	しない
1-タウリノメチル-1-メチル-ウリジン	--	U	しない
1-タウリノメチル-4-チオウリジン	--	U	しない
1-タウリノメチル-プソイドウリジン	--	U	しない
2-メトキシ-4-チオ-プソイドウリジン	--	U	しない
2-チオ-1-メチル-1-デアザ-プソイドウリジン	--	U	しない
2-チオ-1-メチル-プソイドウリジン	--	U	しない
2-チオ-5-アザ-ウリジン	--	U	しない
2-チオ-ジヒドロプソイドウリジン	--	U	しない
2-チオ-ジヒドロウリジン	--	U	しない
2-チオ-プソイドウリジン	--	U	しない
4-メトキシ-2-チオ-プソイドウリジン	--	U	しない
4-メトキシ-プソイドウリジン	--	U	しない
4-チオ-1-メチル-プソイドウリジン	--	U	しない
4-チオ-プソイドウリジン	--	U	しない
5-アザ-ウリジン	--	U	しない
ジヒドロプソイドウリジン	--	U	しない
(±)1-(2-ヒドロキシプロピル)プソイドウリジン TP	--	U	しない
(2R)-1-(2-ヒドロキシプロピル)プソイドウリジン TP	--	U	しない
(2S)-1-(2-ヒドロキシプロピル)プソイドウリジン TP	--	U	しない

10

20

30

40

【表 2 - 1 2】

(E)-5-(2-プロモ-ビニル)アラ-ウリジン TP	--	U	しない
(E)-5-(2-プロモ-ビニル)ウリジンTP	--	U	しない
(Z)-5-(2-プロモ-ビニル)アラ-ウリジン TP	--	U	しない
(Z)-5-(2-プロモ-ビニル)ウリジンTP	--	U	しない
1-(2,2,2-トリフルオロエチル)-プソイド-UTP	--	U	しない
1-(2,2,3,3,3-ペンタフルオロプロピル)プソイドウリジン TP	--	U	しない
1-(2,2-ジエトキシエチル)プソイドウリジン TP	--	U	しない
1-(2,4,6-トリメチルベンジル)プソイドウリジン TP	--	U	しない
1-(2,4,6-トリメチルベンジル)プソイド-UTP	--	U	しない
1-(2,4,6-トリメチルフェニル)プソイド-UTP	--	U	しない
1-(2-アミノ-2-カルボキシエチル)プソイド-UTP	--	U	しない
1-(2-アミノ-エチル)プソイド-UTP	--	U	しない
1-(2-ヒドロキシエチル)プソイドウリジン TP	--	U	しない
1-(2-メトキシエチル)プソイドウリジン TP	--	U	しない
1-(3,4-ビス-トリフルオロメトキシベンジル)プソイドウリジン TP	--	U	しない
1-(3,4-ジメトキシベンジル)プソイドウリジン TP	--	U	しない
1-(3-アミノ-3-カルボキシプロピル)プソイド-UTP	--	U	しない
1-(3-アミノプロピル)プソイド-UTP	--	U	しない
1-(3-シクロプロピル-プロパ-2-イニル)プソイドウリジンTP	--	U	しない
1-(4-アミノ-4-カルボキシブチル)プソイド-UTP	--	U	しない
1-(4-アミノ-ベンジル)プソイド-UTP	--	U	しない
1-(4-アミノ-ブチル)プソイド-UTP	--	U	しない
1-(4-アミノ-フェニル)プソイド-UTP	--	U	しない
1-(4-アジドベンジル)プソイドウリジン TP	--	U	しない
1-(4-ブロモベンジル)プソイドウリジン TP	--	U	しない
1-(4-クロロベンジル)プソイドウリジン TP	--	U	しない
1-(4-フルオロベンジル)プソイドウリジン TP	--	U	しない
1-(4-ヨードベンジル)プソイドウリジン TP	--	U	しない
1-(4-メタンスルホニルベンジル)プソイドウリジンTP	--	U	しない
1-(4-メトキシベンジル)プソイドウリジンTP	--	U	しない
1-(4-メトキシ-フェニル)プソイド-UTP	--	U	しない
1-(4-メチルベンジル)プソイドウリジン TP	--	U	しない
1-(4-ニトロベンジル)プソイドウリジン TP	--	U	しない
1(4-ニトロ-フェニル)プソイド-UTP	--	U	しない
1-(4-チオメトキシベンジル)プソイドウリジン TP	--	U	しない
1-(4-トリフルオロメトキシベンジル)プソイドウリジンTP	--	U	しない

10

20

30

40

【表 2 - 1 3】

1-(4-トリフルオロメチルベンジル)プソイドウ リジンTP	--	U	しない
1-(5-アミノ-ペンチル)プソイド-UTP	--	U	しない
1-(6-アミノ-ヘキシル)プソイド-UTP	--	U	しない
1,6-ジメチル-プソイド-UTP	--	U	しない
1-[3-(2-{2-[2-(2-アミノエトキシ)-エトキシ]- エトキシ}-エトキシ)-プロピオニル]プソイド ウリジンTP	--	U	しない
1-{3-[2-(2-アミノエトキシ)-エトキシ]-プロピ オニル } プソイドウリジンTP	--	U	しない
1-アセチルプソイドウリジンTP	--	U	しない
1-アルキル-6-(1-プロビニル)-プソイド-UTP	--	U	しない
1-アルキル-6-(2-プロビニル)-プソイド-UTP	--	U	しない
1-アルキル-6-アリル-プソイド-UTP	--	U	しない
1-アルキル-6-エチニル-プソイド-UTP	--	U	しない
1-アルキル-6-ホモアリル-プソイド-UTP	--	U	しない
1-アルキル-6-ビニル-プソイド-UTP	--	U	しない
1-アリルプソイドウリジン TP	--	U	しない
1-アミノメチル-プソイド-UTP	--	U	しない
1-ベンゾイルプソイドウリジン TP	--	U	しない
1-ベンジルオキシメチルプソイドウリジン TP	--	U	しない
1-ベンジル-プソイド-UTP	--	U	しない
1-ビオチニル-PEG2-プソイドウリジン TP	--	U	しない
1-ビオチニルプソイドウリジンTP	--	U	しない
1-ブチル-プソイド-UTP	--	U	しない
1-シアノメチルプソイドウリジンTP	--	U	しない
1-シクロブチルメチル-プソイド-UTP	--	U	しない
1-シクロブチル-プソイド-UTP	--	U	しない
1-シクロヘプチルメチル-プソイド-UTP	--	U	しない
1-シクロヘプチル-プソイド-UTP	--	U	しない
1-シクロヘキシルメチル-プソイド-UTP	--	U	しない
1-シクロヘキシル-プソイド-UTP	--	U	しない
1-シクロオクチルメチル-プソイド-UTP	--	U	しない
1-シクロオクチル-プソイド-UTP	--	U	しない
1-シクロペンチルメチル-プソイド-UTP	--	U	しない
1-シクロペンチル-プソイド-UTP	--	U	しない
1-シクロプロピルメチル-プソイド-UTP	--	U	しない
1-シクロプロピル-プソイド-UTP	--	U	しない
1-エチル-プソイド-UTP	--	U	しない
1-ヘキシル-プソイド-UTP	--	U	しない
1-ホモアリルプソイドウリジンTP	--	U	しない
1-ヒドロキシメチルプソイドウリジン TP	--	U	しない
1-イソ-プロピル-プソイド-UTP	--	U	しない
1-Me-2-チオ-プソイド-UTP	--	U	しない
1-Me-4-チオ-プソイド-UTP	--	U	しない
1-Me- α -チオ-プソイド-UTP	--	U	しない
1-メタンスルホニルメチルプソイドウリジン TP	--	U	しない

10

20

30

40

【表 2 - 1 4】

1-メトキシメチルプソイドウリジンTP	--	U	しない
1-メチル-6-(2,2,2-トリフルオロエチル)プソイド-UTP	--	U	しない
1-メチル-6-(4-モルホリノ)-プソイド-UTP	--	U	しない
1-メチル-6-(4-チオモルホリノ)-プソイド-UTP	--	U	しない
1-メチル-6-(置換フェニル)プソイド-UTP	--	U	しない
1-メチル-6-アミノ-プソイド-UTP	--	U	しない
1-メチル-6-アジド-プソイド-UTP	--	U	しない
1-メチル-6-ブロモ-プソイド-UTP	--	U	しない
1-メチル-6-ブチル-プソイド-UTP	--	U	しない
1-メチル-6-クロロ-プソイド-UTP	--	U	しない
1-メチル-6-シアノ-プソイド-UTP	--	U	しない
1-メチル-6-ジメチルアミノ-プソイド-UTP	--	U	しない
1-メチル-6-エトキシ-プソイド-UTP	--	U	しない
1-メチル-6-エチルカルボキシレート-プソイド-UTP	--	U	しない
1-メチル-6-エチル-プソイド-UTP	--	U	しない
1-メチル-6-フルオロ-プソイド-UTP	--	U	しない
1-メチル-6-ホルミル-プソイド-UTP	--	U	しない
1-メチル-6-ヒドロキシアミノ-プソイド-UTP	--	U	しない
1-メチル-6-ヒドロキシ-プソイド-UTP	--	U	しない
1-メチル-6-ヨード-プソイド-UTP	--	U	しない
1-メチル-6-イソ-プロピル-プソイド-UTP	--	U	しない
1-メチル-6-メトキシ-プソイド-UTP	--	U	しない
1-メチル-6-メチルアミノ-プソイド-UTP	--	U	しない
1-メチル-6-フェニル-プソイド-UTP	--	U	しない
1-メチル-6-プロピル-プソイド-UTP	--	U	しない
1-メチル-6-tert-ブチル-プソイド-UTP	--	U	しない
1-メチル-6-トリフルオロメトキシ-プソイド-UTP	--	U	しない
1-メチル-6-トリフルオロメチル-プソイド-UTP	--	U	しない
1-モルホリノメチルプソイドウリジン TP	--	U	しない
1-ペンチル-プソイド-UTP	--	U	しない
1-フェニル-プソイド-UTP	--	U	しない
1-ピバロイルプソイドウリジンTP	--	U	しない
1-プロバルギルプソイドウリジンTP	--	U	しない
1-プロピル-プソイド-UTP	--	U	しない
1-プロピニル-プソイドウリジン	--	U	しない
1-p-トリル-プソイド-UTP	--	U	しない
1-tert-ブチル-プソイド-UTP	--	U	しない
1-チオメトキシメチルプソイドウリジンTP	--	U	しない
1-チオモルホリノメチルプソイドウリジンTP	--	U	しない
1-トリフルオロアセチルプソイドウリジンTP	--	U	しない
1-トリフルオロメチル-プソイド-UTP	--	U	しない
1-ビニルプソイドウリジンTP	--	U	しない
2,2'-アンヒドロ-ウリジンTP	--	U	しない
2'-ブロモ-デオキシウリジンTP	--	U	しない

10

20

30

40

【表 2 - 1 5】

2'-F-5-メチル-2'-デオキシ-UTP	--	U	しない
2'-OMe-5-Me-UTP	--	U	しない
2'-OMe-プソイド-UTP	--	U	しない
2'-a-エチニルウリジンTP	--	U	しない
2'-a-トリフルオロメチルウリジンTP	--	U	しない
2'-b-エチニルウリジンTP	--	U	しない
2'-b-トリフルオロメチルウリジンTP	--	U	しない
2'-デオキシ-2',2'-ジフルオロウリジンTP	--	U	しない
2'-デオキシ-2'-a-メルカプトウリジンTP	--	U	しない
2'-デオキシ-2'-a-チオメトキシウリジンTP	--	U	しない
2'-デオキシ-2'-b-アミノウリジンTP	--	U	しない
2'-デオキシ-2'-b-アジドウリジンTP	--	U	しない
2'-デオキシ-2'-b-ブロモウリジンTP	--	U	しない
2'-デオキシ-2'-b-クロロウリジンTP	--	U	しない
2'-デオキシ-2'-b-フルオロウリジンTP	--	U	しない
2'-デオキシ-2'-b-ヨードウリジンTP	--	U	しない
2'-デオキシ-2'-b-メルカプトウリジンTP	--	U	しない
2'-デオキシ-2'-b-チオメトキシウリジンTP	--	U	しない
2-メトキシ-4-チオウリジン	--	U	しない
2-メトキシウリジン	--	U	しない
2'-O-メチル-5-(1-プロピニル)ウリジンTP	--	U	しない
3-アルキル-プソイド-UTP	--	U	しない
4'-アジドウリジンTP	--	U	しない
4'-炭素環式ウリジンTP	--	U	しない
4'-エチニルウリジンTP	--	U	しない
5-(1-プロピニル)アラ-ウリジンTP	--	U	しない
5-(2-フラニル)ウリジンTP	--	U	しない
5-シアノウリジンTP	--	U	しない
5-ジメチルアミノウリジンTP	--	U	しない
5'-ホモ-ウリジンTP	--	U	しない
5-ヨード-2'-フルオロ-デオキシウリジンTP	--	U	しない
5-フェニルエチニルウリジンTP	--	U	しない
5-トリデューテロメチル-6-デューテロウリジンTP	--	U	しない
5-トリフルオロメチル-ウリジンTP	--	U	しない
5-ビニルアラウリジンTP	--	U	しない
6-(2,2,2-トリフルオロエチル)-プソイド-UTP	--	U	しない
6-(4-モルホリノ)-プソイド-UTP	--	U	しない
6-(4-チオモルホリノ)-プソイド-UTP	--	U	しない
6-(置換-フェニル)-プソイド-UTP	--	U	しない
6-アミノ-プソイド-UTP	--	U	しない
6-アジド-プソイド-UTP	--	U	しない
6-ブロモ-プソイド-UTP	--	U	しない
6-ブチル-プソイド-UTP	--	U	しない
6-クロロ-プソイド-UTP	--	U	しない
6-シアノ-プソイド-UTP	--	U	しない
6-ジメチルアミノ-プソイド-UTP	--	U	しない
6-エトキシ-プソイド-UTP	--	U	しない

10

20

30

40

【表 2 - 1 6】

6-エチルカルボキシレート-プソイド-UTP	--	U	しない
6-エチル-プソイド-UTP	--	U	しない
6-フルオロ-プソイド-UTP	--	U	しない
6-ホルミル-プソイド-UTP	--	U	しない
6-ヒドロキシアミノ-プソイド-UTP	--	U	しない
6-ヒドロキシ-プソイド-UTP	--	U	しない
6-ヨード-プソイド-UTP	--	U	しない
6-イソ-プロピル-プソイド-UTP	--	U	しない
6-メトキシ-プソイド-UTP	--	U	しない
6-メチルアミノ-プソイド-UTP	--	U	しない
6-メチル-プソイド-UTP	--	U	しない
6-フェニル-プソイド-UTP	--	U	しない
6-プロピル-プソイド-UTP	--	U	しない
6-tert-ブチル-プソイド-UTP	--	U	しない
6-トリフルオロメトキシ-プソイド-UTP	--	U	しない
6-トリフルオロメチル-プソイド-UTP	--	U	しない
α -チオ-プソイド-UTP	--	U	しない
プソイドウリジン1-(4-メチルベンゼンスルホン酸) TP	--	U	しない
プソイドウリジン1-(4-メチル安息香酸) TP	--	U	しない
プソイドウリジンTP 1-[3-(2-エトキシ)]プロピオン酸	--	U	しない
プソイドウリジンTP 1-[3-{2-(2-[2-(2-エトキシ)-エトキシ]-エトキシ)-エトキシ}]プロピオン酸	--	U	しない
プソイドウリジンTP 1-[3-{2-(2-[2-{2(2-エトキシ)-エトキシ}-エトキシ]-エトキシ)-エトキシ}]プロピオン酸	--	U	しない
プソイドウリジンTP 1-[3-{2-(2-[2-エトキシ]-エトキシ)-エトキシ}]プロピオン酸	--	U	しない
プソイドウリジンTP 1-[3-{2-(2-エトキシ)-エトキシ}]プロピオン酸	--	U	しない
プソイドウリジンTP 1-メチルホスホン酸	--	U	しない
プソイドウリジンTP 1-メチルホスホン酸 ジエチル エステル	--	U	しない
プソイド-UTP-N1-3-プロピオン酸	--	U	しない
プソイド-UTP-N1-4-酪酸	--	U	しない
プソイド-UTP-N1-5-ペンタン酸	--	U	しない
プソイド-UTP-N1-6-ヘキサン酸	--	U	しない
プソイド-UTP-N1-7-ヘプタン酸	--	U	しない
プソイド-UTP-N1-メチル-p-安息香酸	--	U	しない
プソイド-UTP-N1-p-安息香酸	--	U	しない
ワイブトシン	yW	W	する
ヒドロキシワイブトシン	OHyW	W	する
イソワイオシン	imG2	W	する
ペロキシワイブトシン	o2yW	W	する
非修飾ワイブトシン	OHyW*	W	する
4-デメチルワイオシン	imG-14	W	する

本発明のキメラポリヌクレオチドに有用となり得る他の修飾を表 3 に記載する。

10

20

30

40

50

【 0 3 9 2 】

【 表 3 - 1 】

表 3. 別の修飾タイプ

名称	タイプ
2,6-(ジアミノ)プリン	その他
1-(アザ)-2-(チオ)-3-(アザ)-フェノキサジン-1-イル	その他
1,3-(ジアザ)-2-(オキソ)-フェンチアジン-1-イル	その他
1,3-(ジアザ)-2-(オキソ)-フェノキサジン-1-イル	その他
1,3,5-(トリアザ)-2,6-(ジオキサ)-ナフタレン	その他
2(アミノ)プリン	その他
2,4,5-(トリメチル)フェニル	その他
2'メチル, 2'アミノ, 2'アジド, 2'フルロ-シチジン	その他
2'メチル, 2'アミノ, 2'アジド, 2'フルロ-アデニン	その他
2'メチル, 2'アミノ, 2'アジド, 2'フルロ-ウリジン	その他
2'-アミノ-2'-デオキシリボース	その他
2-アミノ-6-クロロ-プリン	その他
2-アザ-イノシニル	その他
2'-アジド-2'-デオキシリボース	その他
2'フルオロ-2'-デオキシリボース	その他
2'-フルオロ-修飾塩基	その他
2'-O-メチル-リボース	その他
2-オキソ-7-アミノピリドピリミジン-3-イル	その他
2-オキソ-ピリドピリミジン-3-イル	その他
2-ピリジノン	その他
3ニトロピロール	その他
3-(メチル)-7-(プロピニル)イソカルボスチリル	その他
3-(メチル)イソカルボスチリル	その他
4-(フルオロ)-6-(メチル)ベンズイミダゾール	その他
4-(メチル)ベンズイミダゾール	その他
4-(メチル)インドリル	その他
4,6-(ジメチル)インドリル	その他
5ニトロインドール	その他
5置換ピリミジン	その他
5-(メチル)イソカルボスチリル	その他
5-ニトロインドール	その他
6-(アザ)ピリミジン	その他
6-(アゾ)チミン	その他
6-(メチル)-7-(アザ)インドリル	その他
6-クロロ-プリン	その他
6-フェニル-ピロロ-ピリミジン-2-オン-3-イル	その他
7-(アミノアルキルヒドロキシ)-1-(アザ)-2-(チオ)-3-(アザ)-フェンチアジン-1-イル	その他
7-(アミノアルキルヒドロキシ)-1-(アザ)-2-(チオ)-3-(アザ)-フェノキサジン-1-イル	その他
7-(アミノアルキルヒドロキシ)-1,3-(ジアザ)-2-(オキソ)-フェノキサジン-1-イル	その他
7-(アミノアルキルヒドロキシ)-1,3-(ジアザ)-2-(オキ)-フェンチアジン-1-イル	その他

10

20

30

40

【 0 3 9 3 】

50

【表 3 - 2】

7-(アミノアルキルヒドロキシ)-1,3-(ジアザ)-2-(オキソ)-フェノキサジン-1-イル	その他
7-(アザ)インドリル	その他
7-(グアニジニウムアルキルヒドロキシ)-1-(アザ)-2-(チオ)-3-(アザ)-フェノキサジン-1-イル	その他
7-(グアニジニウムアルキルヒドロキシ)-1-(アザ)-2-(チオ)-3-(アザ)-フェンチアジン-1-イル	その他
7-(グアニジニウムアルキルヒドロキシ)-1-(アザ)-2-(チオ)-3-(アザ)-フェノキサジン-1-イル	その他
7-(グアニジニウムアルキルヒドロキシ)-1,3-(ジアザ)-2-(オキソ)-フェノキサジン-1-イル	その他
7-(グアニジニウムアルキルヒドロキシ)-1,3-(ジアザ)-2-(オキソ)-フェンチアジン-1-イル	その他
7-(グアニジニウムアルキルヒドロキシ)-1,3-(ジアザ)-2-(オキソ)-フェノキサジン-1-イル	その他
7-(プロピニル)イソカルボスチリル	その他
7-(プロピニル)イソカルボスチリル, プロピニル-7-(アザ)インドリル	その他
7-デアザ-イノシニル	その他
7-置換1-(アザ)-2-(チオ)-3-(アザ)-フェノキサジン-1-イル	その他
7-置換1,3-(ジアザ)-2-(オキソ)-フェノキサジン-1-イル	その他
9-(メチル)-イミジゾピリジニル	その他
アミノインドリル	その他
アントラセニル	その他
ビス-オルト-(アミノアルキルヒドロキシ)-6-フェニル-ピロロ-ピリミジン-2-オン-3-イル	その他
ビス-オルト-置換-6-フェニル-ピロロ-ピリミジン-2-オン-3-イル	その他
ジフルオロトリル	その他
ヒポキサントシン	その他
イミジゾピリジニル	その他
イノシニル	その他
イソカルボスチリル	その他
イソグアニシン	その他
N2-置換プリン	その他
N6-メチル-2-アミノプリン	その他
N6-置換プリン	その他
N-アルキル化誘導体	その他
ナフタレニル	その他
ニトロベンズイミダゾリル	その他
ニトロイミダゾリル	その他
ニトロインダゾリル	その他
ニトロピラノリル	その他
ヌブラリン	その他
O6-置換プリン	その他
O-アルキル化誘導体	その他
オルト-(アミノアルキルヒドロキシ)-6-フェニル-ピロロ-ピリミジン-2-オン-3-イル	その他
オルト-置換-6-フェニル-ピロロ-ピリミジン-2-オン-3-イル	その他

10

20

30

40

【表 3 - 3】

オキソホルミシンTP	その他
パラ-(アミノアルキルヒドロキシ)-6-フェニル-ピロロ-ピリミジン-2-オン-3-イル	その他
パラ-置換-6-フェニル-ピロロ-ピリミジン-2-オン-3-イル	その他
ペンタセニル	その他
フェナントラセニル	その他
フェニル	その他
プロピニル-7-(アザ)インドリル	その他
ピレニル	その他
ピリドピリミジン-3-イル	その他
ピリドピリミジン-3-イル, 2-オキソ-7-アミノ-ピリドピリミジン-3-イル	その他
ピロロ-ピリミジン-2-オン-3-イル	その他
ピロロピリミジニル	その他
ピロロピリジニル	その他
スチルベンジル	その他
置換 1,2,4-トリアゾール	その他
テトラアセニル	その他
ツベルシジン	その他
キササンチン	その他
キサントシン-5'-TP	その他
2-チオ-ゼブラリン	その他
5-アザ-2-チオ-ゼブラリン	その他
7-デアザ-2-アミノプリン	その他
ピリジン-4-オンリボヌクレオシド	その他
2-アミノ-リボシド-TP	その他
ホルミシンATP	その他
ホルミシンBTP	その他
ピロロシンTP	その他
2'-OH-アラ-アデノシンTP	その他
2'-OH-アラ-シチジンTP	その他
2'-OH-アラ-ウリジンTP	その他
2'-OH-アラ-グアノシンTP	その他
5-(2-カルボトキシビニル)ウリジンTP	その他
N6-(19-アミノ-ペンタオキサノアデシル)アデノシンTP	その他

10

20

30

キメラポリヌクレオチドは、ヌクレオシド間に任意の有用なリンカーを含んでもよい。骨格修飾を含め、こうしたリンカーを表 4 に記載する。

【 0 3 9 5 】

40

【表 4】

表 4. リンカー修飾

名称	種類
3'-アルキレンホスホネート	リンカー
3'-アミノホスホロアミダイト	リンカー
アルケン含有骨格	リンカー
アミノアルキルホスホロアミダイト	リンカー
アミノアルキルリン酸トリエステル	リンカー
ボラノリン酸塩	リンカー
-CH ₂ -O-N(CH ₃)-CH ₂ -	リンカー
-CH ₂ -N(CH ₃)-N(CH ₃)-CH ₂ -	リンカー
-CH ₂ -NH-CH ₂ -	リンカー
キラルホスホネート	リンカー
キラルホスホロチオエート	リンカー
ホルムアセチル及びチオホルムアセチル骨格	リンカー
メチレン (メチルイミノ)	リンカー
メチレンホルムアセチル及びチオホルムアセチル骨格	リンカー
メチレンイミノ及びメチレンヒドラジノ骨格	リンカー
モルホリノ結合	リンカー
-N(CH ₃)-CH ₂ -CH ₂ -	リンカー
ヘテロ原子ヌクレオシド間結合を有するオリゴヌクレオシド	リンカー
ホスフィン酸塩	リンカー
ホスホロアミダイト	リンカー
ホスホホスホロチオエート	リンカー
ホスホロチオエートヌクレオシド間結合	リンカー
ホスホロチオエート	リンカー
リン酸トリエステル	リンカー
PNA	リンカー
シロキササン骨格	リンカー
スルファミン酸骨格	リンカー
スルフィドスルホキシド及びスルホン骨格	リンカー
スルホン酸及びスルホンアミド骨格	リンカー
チオノアルキルホスホネート	リンカー
チオノアルキルリン酸トリエステル	リンカー
チオノホスホロアミダイト	リンカー

10

20

30

40

キメラポリヌクレオチドは、例えば、糖、核酸塩基、又はヌクレオシド間結合に対する（例えば、連結リン酸塩/リン酸ジエステル結合/リン酸ジエステル骨格に対する）任意の有用な修飾を含み得る。ピリミジン核酸塩基の1つ又は複数の原子は、任意選択で置換されたアミノ、任意選択で置換されたチオール、任意選択で置換されたアルキル（例えば、メチル若しくはエチル）、又はハロ（例えば、クロロ若しくはフルオロ）で置換してもよい。いくつかの実施形態では、修飾（例えば、1つ又は複数の修飾）は、糖及びヌクレオシド間結合の各々に存在する。本発明の修飾は、リボ核酸（RNA）からデオキシリボ核酸（DNA）、トレース核酸（TNA）、グリコール核酸（GNA）、ペプチド核酸

50

(PNA)、ロックド核酸(LNA)又はこれらのハイブリッド)への修飾であってもよい。別の修飾も本明細書に記載する。

【0396】

一部の実施形態では、本発明のキメラポリヌクレオチドは、mRNAが導入された細胞の自然免疫応答を実質的に誘導しない。誘導される免疫応答の特徴としては、1)炎症促進性サイトカインの発現増大、2)細胞内PRR(RIG-I、MDA5などの活性化、及び/又は3)タンパク質翻訳の終結又は短縮が挙げられる。

【0397】

いくつかの実施形態では、細胞に導入されるキメラポリヌクレオチドを細胞内で分解することが望ましい。例えば、タンパク質産生の正確なタイミングが所望される場合には、キメラポリヌクレオチドの分解が好ましいであろう。従って、一部の実施形態において、本発明は、細胞内で指令された様式で作用させることができる分解ドメインを含有するキメラポリヌクレオチドを提供する。

10

【0398】

キメラポリヌクレオチドの領域のいずれも、本明細書に教示する通りに、又は2012年10月3日に出願された国際出願PCT/2012/058519号明細書(代理人整理番号M9)及び2013年6月20日に出願された米国仮特許出願第61/837297号明細書(代理人整理番号M36)(これらの各々の内容は、全体として参照により本明細書に組み込む)に教示される通りに化学的に修飾することができる。

20

【0399】

修飾キメラポリヌクレオチド分子

本発明はまた、キメラポリヌクレオチド分子のビルディングブロック、例えば、修飾リボヌクレオチド、及び修飾リボヌクレオチドも含む。例えば、これらのビルディングブロックは、本発明のキメラポリヌクレオチドを調製する上で有用となり得る。こうしたビルディングブロックは、2012年10月3日に出願された国際公開第2013052523号パンフレット及び2013年12月13日に出願された国際公開第2014093924号パンフレット(その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む)に教示されている。

【0400】

糖での修飾

キメラポリヌクレオチド(例えば、本明細書に記載する通りのRNA若しくはmRNA)に組み込むことができる修飾ヌクレオチド及びヌクレオチド(例えば、ビルディングブロック分子)は、リボ核酸の糖で修飾することができる。例えば、2'ヒドロキシル基(OH)を修飾するか、又はいくつかの異なる置換基で置換することができる。2'位の例示的置換として、限定はしないが、以下のものが挙げられる: H、ハロ、任意選択で置換されたC₁₋₆アルキル;任意選択で置換されたC₁₋₆アルコキシ;任意選択で置換されたC₆₋₁₀アリーロキシ;任意選択で置換されたC₃₋₈シクロアルキル;任意選択で置換されたC₃₋₈シクロアルコキシ;任意選択で置換されたC₆₋₁₀アリーロキシ;任意選択で置換されたC₆₋₁₀アリール-C₁₋₆アルコキシ;任意選択で置換されたC₁₋₁₂(ヘテロシクリル)オキシ;糖(例えば、リボース、ペントース、又は本明細書に記載のいずれか);ポリエチレングリコール(PEG)、-O(CH₂CH₂O)_nCH₂CH₂OR(Rは、H又は任意選択で置換されたアルキルであり、nは、0~20(例えば、0~4、0~8、0~10、0~16、1~4、1~8、1~10、1~16、1~20、2~4、2~8、2~10、2~16、2~20、4~8、4~10、4~16、及び4~20)の整数である);「ロックド」核酸(LNA)(ここで、2'-ヒドロキシルは、C₁₋₆アルキレン又はC₁₋₆ヘテロアルキレン架橋により、同じリボース糖の4'-炭素に連結しており、例示的架橋として、メチレン、プロピレン、エーテル、若しくはアミノ架橋がある);本明細書に記載のアミノアルキル;本明細書に記載のアミノアルコキシ;本明細書に記載のアミノ;並びに本明細書に記載のアミノ酸。

30

40

【0401】

50

概して、RNAは、酸素を有する5員環である糖基リボースを含む。非制限的な修飾ヌクレオチドの例として、以下のものが挙げられる：リボースにおける酸素の置換（例えば、S、Se、又はメチレン若しくはエチレンなどのアルキレンによる）；二重結合の付加（これにより、例えば、シクロペンテニル若しくはシクロヘキセニルでリボースを置換する）；リボースの環縮小（これにより、例えば、シクロブタン又はオキセタンの4員環を形成する）；リボースの環拡張（これにより、例えば、アンヒドロヘキシトール、アルトリトール、マンニトール、シクロヘキサニル、シクロヘキセニル、及びホスホロアミダイト骨格も有するモルホリノなどのように、追加の炭素又はヘテロ原子を有する6-若しくは7員環を形成する）；多環式形態（例えば、トリシクロ；並びに、グリコール核酸（GNA）（例えば、R-GNA若しくはS-GNA、ここで、リボースは、リン酸ジエステル結合に結合したグリコール単位で置換される）、トレース核酸（TNA、ここで、リボースは、 β -L-トレオフラノシル-(3'-2')で置換される）、及びペプチド核酸（PNA、ここで、2-アミノ-エチル-グリシン結合でリボース及びリン酸ジエステル骨格を置換する）。さらに、糖基は、リボース内の対応する炭素とは反対の立体化学的配置を有する1つ又は複数の炭素も含有し得る。従って、キメラポリヌクレオチド分子は、糖として、例えば、アラビノースを含有するヌクレオチドを含み得る。こうした糖修飾は、2012年10月3日に出願された国際出願PCT/2012/058519号明細書（代理人整理番号M9）及び国際公開第2014093924号パンフレット（代理人整理番号M36）（これらの各々の内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）に教示されている。

10

20

【0402】

核酸塩基での修飾

本開示は、修飾ヌクレオチド及びヌクレオチドを提供する。本明細書に記載される時、「ヌクレオチド」は、有機塩基（例えば、プリン若しくはピリミジン）又はその誘導体（本明細書では「核酸塩基」とも呼ばれる）と組み合わせ、糖分子（例えば、ペントース若しくはリボース）又はその誘導体を含む化合物として定義される。本明細書に記載される時、「ヌクレオチド」は、リン酸基を含むヌクレオチドとして定義される。修飾ヌクレオチドは、本明細書に記載するいずれかの有用な方法（例えば、化学的、酵素的、又は組換えにより、1つ又は複数の修飾若しくは非天然ヌクレオチドを含有させる方法）によって合成することができる。キメラポリヌクレオチドは、1つ又は複数の連結ヌクレオチド領域を含み得る。こうした領域は、多様な骨格連結を有し得る。連結は、標準的リン酸エステル結合であってもよく、その場合、キメラポリヌクレオチドは、複数のヌクレオチド領域を含むことになる。

30

【0403】

修飾ヌクレオチド塩基対合は、標準的なアデノシン-チミン、アデノシン-ウラシル、又はグアノシン-シトシン塩基対だけではなく、ヌクレオチド及び/又は非標準若しくは修飾塩基を含む修飾ヌクレオチドの間に形成される塩基対も包含し、ここで、水素結合ドナーと水素結合アクセプターの構成が、非標準塩基と標準塩基、又は2つの相補的非標準塩基構造同士の水素結合を可能にする。こうした非標準塩基対合の一例は、修飾ヌクレオチドイノシンと、アデニン、シトシン又はウラシルとの塩基対合である。

40

【0404】

修飾ヌクレオチド及びヌクレオチドは、修飾核酸塩基を含むことができる。RNAに見出される核酸塩基の例として、限定はしないが、アデニン、グアニン、シトシン、及びウラシルが挙げられる。DNAに見出される核酸塩基の例として、限定はしないが、アデニン、グアニン、シトシン、及びチミンが挙げられる。こうした修飾核酸塩基（天然及び非天然の識別を含む）は、2012年10月3日に出願された国際出願PCT/2012/058519号明細書（代理人整理番号M9）及び国際公開第2014093924号パンフレット（代理人整理番号M36）（これらの各々の内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）に教示されている。

【0405】

50

修飾糖、核酸塩基、及びヌクレオシド間連結の組み合わせ

本発明のキメラポリヌクレオチドは、糖、核酸塩基、及び/又はヌクレオシド間連結に対する修飾の組み合わせを含み得る。これらの組み合わせは、本明細書に記載するいずれか1つ又は複数の修飾を含み得る。

【0406】

修飾ヌクレオチド及び修飾ヌクレオチド組み合わせの例を表5及び表6に列記する。修飾ヌクレオチドのこれらの組み合わせは、本発明のキメラポリヌクレオチドを形成するために使用することができる。別に記載のない限り、修飾ヌクレオチドで、本発明のキメラポリヌクレオチドの天然ヌクレオチドを完全に置換してもよい。非制限的例として、天然ヌクレオチドウリジンは、本明細書に記載する修飾ヌクレオチドで置換することができる。別の非制限的例では、天然ヌクレオチドウリジンは、本明細書に開示する修飾ヌクレオチドの少なくとも1つで、一部(例えば、約0.1%、1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%又は99.9%)を置換することができる。

10

【0407】

塩基/糖又はリンカーの任意の組み合わせを本発明のキメラポリヌクレオチドに組み込んでよく、こうした修飾は、以下の文献に教示されている：国際公開第2013052523号パンフレット(代理人整理番号M9)；国際出願PCT/US2013/75177号明細書(代理人整理番号M36)；国際公開第2015051173号パンフレット(代理人整理番号M71)；これらの各々の内容は、全体として参照により本明細書に組み込むものとする。

20

【0408】

【表 5 - 1】

表 5. 組み合わせ

修飾ヌクレオチド	修飾ヌクレオチド 組み合わせ
α-チオシチジン	α-チオシチジン/5-ヨード-ウリジン
	α-チオシチジン/N1-メチル-プソイドウリジン
	α-チオシチジン/α-チオウリジン
	α-チオシチジン/5-メチル-ウリジン
	α-チオシチジン/プソイド-ウリジン
	約50%のシトシンは、α-チオシチジンである
プソイドイソシチジン	プソイドイソシチジン/5-ヨード-ウリジン
	プソイドイソシチジン/N1-メチル-プソイドウリジン
	プソイドイソシチジン/α-チオウリジン
	プソイドイソシチジン/5-メチル-ウリジン
	プソイドイソシチジン/プソイドウリジン
	約25%のシトシンは、プソイドイソシチジンである
	プソイドイソシチジン/約50%のウリジンは、N1-メチル-プソイドウリジンであり、約50%のウリジンは、プソイドウリジンである
	プソイドイソシチジン/約25%のウリジンは、N1-メチル-プソイドウリジンであり、約25%のウリジンは、プソイドウリジンである
ピロロ-シチジン	ピロロ-シチジン/5-ヨード-ウリジン
	ピロロ-シチジン/N1-メチル-プソイドウリジン
	ピロロ-シチジン/α-チオウリジン
	ピロロ-シチジン/5-メチル-ウリジン
	ピロロ-シチジン/プソイドウリジン
	約50%のシトシンは、ピロロ-シチジンである
5-メチルシチジン	5-メチルシチジン/5-ヨード-ウリジン
	5-メチルシチジン/N1-メチル-プソイドウリジン
	5-メチルシチジン/α-チオウリジン
	5-メチルシチジン/5-メチル-ウリジン
	5-メチルシチジン/プソイドウリジン
	約25%のシトシンは、5-メチルシチジンである
	約50%のシトシンは、5-メチルシチジンである
	5-メチルシチジン/5-メトキシ-ウリジン
	5-メチルシチジン/5-ブロモ-ウリジン
	5-メチルシチジン/2-チオウリジン
	5-メチルシチジン/約50%のウリジンは、2-チオウリジンである
	約50%のウリジンは、5-メチルシチジンであり/約50%のウリジンは、2-チオウリジンである
N4-アセチル-シチジン	N4-アセチル-シチジン/5-ヨード-ウリジン
	N4-アセチル-シチジン/N1-メチル-プソイドウリジン
	N4-アセチル-シチジン/α-チオ-ウリジン
	N4-アセチル-シチジン/5-メチル-ウリジン
	N4-アセチル-シチジン/プソイドウリジン
	約50%のシトシンは、N4-アセチル-シチジンである

10

20

30

40

【表 5 - 2】

	約25%のシトシンは、N4-アセチル-シチジンである
	N4-アセチル-シチジン/5-メトキシ-ウリジン
	N4-アセチル-シチジン/5-プロモ-ウリジン
	N4-アセチル-シチジン/2-チオウリジン
	約50%のシトシンは、N4-アセチル-シチジンであり/約50%のウリジンは、2-チオウリジンである

【 0 4 1 0 】

【表 6 - 1】

表 6. 組み合わせ

1-(2,2,2-トリフルオロエチル)プソイド-UTP	
1-エチル-プソイド-UTP	
1-メチル-プソイド-U- α -チオ-TP	
1-メチル-プソイドウリジンTP, ATP, GTP, CTP	
1-メチル-プソイド-UTP/5-メチル-CTP/ATP/GTP	
1-メチル-プソイド-UTP/CTP/ATP/GTP	
1-プロピル-プソイド-UTP	
25 % 5-アミノアリル-CTP + 75 % CTP/ 25 % 5-メトキシ-UTP + 75 % UTP	10
25 % 5-アミノアリル-CTP + 75 % CTP/ 75 % 5-メトキシ-UTP + 25 % UTP	
25 % 5-ブロモ-CTP + 75 % CTP/ 25 % 5-メトキシ-UTP + 75 % UTP	
25 % 5-ブロモ-CTP + 75 % CTP/ 75 % 5-メトキシ-UTP + 25 % UTP	
25 % 5-ブロモ-CTP + 75 % CTP/1-メチル-プソイド-UTP	
25 % 5-カルボキシ-CTP + 75 % CTP/ 25 % 5-メトキシ-UTP + 75 % UTP	
25 % 5-カルボキシ-CTP + 75 % CTP/ 75 % 5-メトキシ-UTP + 25 % UTP	
25 % 5-エチル-CTP + 75 % CTP/ 25 % 5-メトキシ-UTP + 75 % UTP	
25 % 5-エチル-CTP + 75 % CTP/ 75 % 5-メトキシ-UTP + 25 % UTP	
25 % 5-エチニル-CTP + 75 % CTP/ 25 % 5-メトキシ-UTP + 75 % UTP	20
25 % 5-エチニル-CTP + 75 % CTP/ 75 % 5-メトキシ-UTP + 25 % UTP	
25 % 5-フルオロ-CTP + 75 % CTP/ 25 % 5-メトキシ-UTP + 75 % UTP	
25 % 5-フルオロ-CTP + 75 % CTP/ 75 % 5-メトキシ-UTP + 25 % UTP	
25 % 5-ホルミル-CTP + 75 % CTP/ 25 % 5-メトキシ-UTP + 75 % UTP	
25 % 5-ホルミル-CTP + 75 % CTP/ 75 % 5-メトキシ-UTP + 25 % UTP	
25 % 5-ヒドロキシメチル-CTP + 75 % CTP/ 25 % 5-メトキシ-UTP + 75 % UTP	
25 % 5-ヒドロキシメチル-CTP + 75 % CTP/ 75 % 5-メトキシ-UTP + 25 % UTP	
25 % 5-ヨード-CTP + 75 % CTP/ 25 % 5-メトキシ-UTP + 75 % UTP	30
25 % 5-ヨード-CTP + 75 % CTP/ 75 % 5-メトキシ-UTP + 25 % UTP	
25 % 5-メトキシ-CTP + 75 % CTP/ 25 % 5-メトキシ-UTP + 75 % UTP	
25 % 5-メトキシ-CTP + 75 % CTP/ 75 % 5-メトキシ-UTP + 25 % UTP	
25 % 5-メチル-CTP + 75 % CTP/25 % 5-メトキシ-UTP + 75 % 1-メチル-プソイド-UTP	
25 % 5-メチル-CTP + 75 % CTP/25 % 5-メトキシ-UTP + 75 % UTP	
25 % 5-メチル-CTP + 75 % CTP/50 % 5-メトキシ-UTP + 50 % 1-メチル-プソイド-UTP	
25 % 5-メチル-CTP + 75 % CTP/50 % 5-メトキシ-UTP + 50 % UTP	
25 % 5-メチル-CTP + 75 % CTP/5-メトキシ-UTP	40
25 % 5-メチル-CTP + 75 % CTP/75 % 5-メトキシ-UTP + 25 % 1-メチル-プソイド-UTP	
25 % 5-メチル-CTP + 75 % CTP/75 % 5-メトキシ-UTP + 25 % UTP	
25 % 5-フェニル-CTP + 75 % CTP/ 25 % 5-メトキシ-UTP + 75 % UTP	
25 % 5-フェニル-CTP + 75 % CTP/ 75 % 5-メトキシ-UTP + 25 % UTP	
25 % 5-トリフルオロメチル-CTP + 75 % CTP/ 25 % 5-メトキシ-UTP + 75 % UTP	
25 % 5-トリフルオロメチル-CTP + 75 % CTP/ 75 % 5-メトキシ-UTP + 25	

【表 6 - 2】

% UTP
25 % 5-トリフルオロメチル-CTP + 75 % CTP/1-メチル-プソイド-UTP
25 % N4-Ac-CTP + 75 % CTP/ 25 % 5-メトキシ-UTP + 75 % UTP
25 % N4-Ac-CTP + 75 % CTP/ 75 % 5-メトキシ-UTP + 25 % UTP
25 % N4-Bz-CTP + 75 % CTP/ 25 % 5-メトキシ-UTP + 75 % UTP
25 % N4-Bz-CTP + 75 % CTP/ 75 % 5-メトキシ-UTP + 25 % UTP
25 % N4-メチル-CTP + 75 % CTP/ 25 % 5-メトキシ-UTP + 75 % UTP
25 % N4-メチル-CTP + 75 % CTP/ 75 % 5-メトキシ-UTP + 25 % UTP
25 % プソイドイソ-CTP + 75 % CTP/ 25 % 5-メトキシ-UTP + 75 % UTP
25 % プソイドイソ-CTP + 75 % CTP/ 75 % 5-メトキシ-UTP + 25 % UTP
25% 5-プロモ-CTP/75% CTP/ プソイド-UTP
25% 5-メトキシ-UTP/25% 5-メチル-CTP/ATP/GTP
25% 5-メトキシ-UTP/5-メチル-CTP/ATP/GTP
25% 5-メトキシ-UTP/75% 5-メチル-CTP/ATP/GTP
25% 5-メトキシ-UTP/CTP/ATP/GTP
25% 5-メトキシ-UTP/50% 5-メチル-CTP/ATP/GTP
2-アミノ-ATP
2-チオ-CTP
2-チオ-プソイドウリジン TP, ATP, GTP, CTP
2-チオ-プソイド-UTP
2-チオ-UTP
3-メチル-CTP
3-メチル-プソイド-UTP
4-チオ-UTP
50 % 5-プロモ-CTP + 50 % CTP/1-メチル-プソイド-UTP
50 % 5-ヒドロキシメチル-CTP + 50 % CTP/1-メチル-プソイド-UTP
50 % 5-メトキシ-UTP/5-メチル-CTP/ATP/GTP
50 % 5-メチル-CTP + 50 % CTP/25 % 5-メトキシ-UTP + 75 % 1-メチル-プソイド-UTP
50 % 5-メチル-CTP + 50 % CTP/25 % 5-メトキシ-UTP + 75 % UTP
50 % 5-メチル-CTP + 50 % CTP/50 % 5-メトキシ-UTP + 50 % 1-メチル-プソイド-UTP
50 % 5-メチル-CTP + 50 % CTP/50 % 5-メトキシ-UTP + 50 % UTP
50 % 5-メチル-CTP + 50 % CTP/5-メトキシ-UTP
50 % 5-メチル-CTP + 50 % CTP/75 % 5-メトキシ-UTP + 25 % 1-メチル-プソイド-UTP
50 % 5-メチル-CTP + 50 % CTP/75 % 5-メトキシ-UTP + 25 % UTP
50 % 5-トリフルオロメチル-CTP + 50 % CTP/1-メチル-プソイド-UTP
50% 5-プロモ-CTP/ 50% CTP/プソイド-UTP
50% 5-メトキシ-UTP/25% 5-メチル-CTP/ATP/GTP
50% 5-メトキシ-UTP/50% 5-メチル-CTP/ATP/GTP
50% 5-メトキシ-UTP/75% 5-メチル-CTP/ATP/GTP
50% 5-メトキシ-UTP/CTP/ATP/GTP
5-アミノアリル-CTP
5-アミノアリル-CTP/ 5-メトキシ-UTP
5-アミノアリル-UTP
5-プロモ-CTP
5-プロモ-CTP/ 5-メトキシ-UTP

10

20

30

40

【表 6 - 3】

5-プロモ-CTP/1-メチル-プソイド-UTP	
5-プロモ-CTP/プソイド-UTP	
5-プロモシチジン TP, ATP, GTP, UTP	
5-プロモ-UTP	
5-カルボキシ-CTP/ 5-メトキシ-UTP	
5-エチル-CTP/5-メトキシ-UTP	
5-エチニル-CTP/5-メトキシ-UTP	
5-フルオロ-CTP/ 5-メトキシ-UTP	10
5-ホルミル-CTP/ 5-メトキシ-UTP	
5-ヒドロキシ-メチル-CTP/ 5-メトキシ-UTP	
5-ヒドロキシメチル-CTP	
5-ヒドロキシメチル-CTP/1-メチル-プソイド-UTP	
5-ヒドロキシメチル-CTP/5-メトキシ-UTP	
5-ヒドロキシメチルシチジンTP, ATP, GTP, UTP	
5-ヨード-CTP/ 5-メトキシ-UTP	
5-Me-CTP/5-メトキシ-UTP	
5-メトキシカルボニルメチル-UTP	
5-メトキシ-CTP/5-メトキシ-UTP	
5-メトキシ-ウリジンTP, ATP, GTP, UTP	20
5-メトキシ-UTP	
5-メトキシ-UTP	
5-メトキシ-UTP/ N6-イソペンテニル-ATP	
5-メトキシ-UTP/25% 5-メチル-CTP/ATP/GTP	
5-メトキシ-UTP/5-メチル-CTP/ATP/GTP	
5-メトキシ-UTP/75% 5-メチル-CTP/ATP/GTP	
5-メトキシ-UTP/CTP/ATP/GTP	
5-メチル-2-チオ-UTP	
5-メチルアミノメチル-UTP	
5-メチル-CTP/ 5-メトキシ-UTP	30
5-メチル-CTP/ 5-メトキシ-UTP(キャップ 0)	
5-メチル-CTP/ 5-メトキシ-UTP(キャップなし)	
5-メチル-CTP/25 % 5-メトキシ-UTP + 75 % 1-メチル-プソイド-UTP	
5-メチル-CTP/25 % 5-メトキシ-UTP + 75 % UTP	
5-メチル-CTP/50 % 5-メトキシ-UTP + 50 % 1-メチル-プソイド-UTP	
5-メチル-CTP/50 % 5-メトキシ-UTP + 50 % UTP	
5-メチル-CTP/5-メトキシ-UTP/N6-Me-ATP	
5-メチル-CTP/75 % 5-メトキシ-UTP + 25 % 1-メチル-プソイド-UTP	
5-メチル-CTP/75 % 5-メトキシ-UTP + 25 % UTP	
5-フェニル-CTP/ 5-メトキシ-UTP	
5-トリフルオロ-メチル-CTP/ 5-メトキシ-UTP	40
5-トリフルオロメチル-CTP	
5-トリフルオロメチル-CTP/ 5-メトキシ-UTP	
5-トリフルオロメチル-CTP/1-メチル-プソイド-UTP	
5-トリフルオロメチル-CTP/プソイド-UTP	
5-トリフルオロメチル-UTP	
5-トリフルロメチルシチジンTP, ATP, GTP, UTP	
75 % 5-アミノアリル-CTP + 25 % CTP/ 25 % 5-メトキシ-UTP + 75 % UTP	
75 % 5-アミノアリル-CTP + 25 % CTP/ 75 % 5-メトキシ-UTP + 25 % UTP	

【表 6 - 4】

75 % 5-ブromo-CTP + 25 % CTP/ 25 % 5-メトキシ-UTP + 75 % UTP	
75 % 5-ブromo-CTP + 25 % CTP/ 75 % 5-メトキシ-UTP + 25 % UTP	
75 % 5-カルボキシ-CTP + 25 % CTP/ 25 % 5-メトキシ-UTP + 75 % UTP	
75 % 5-カルボキシ-CTP + 25 % CTP/ 75 % 5-メトキシ-UTP + 25 % UTP	
75 % 5-エチル-CTP + 25 % CTP/ 25 % 5-メトキシ-UTP + 75 % UTP	
75 % 5-エチル-CTP + 25 % CTP/ 75 % 5-メトキシ-UTP + 25 % UTP	
75 % 5-エチニル-CTP + 25 % CTP/ 25 % 5-メトキシ-UTP + 75 % UTP	
75 % 5-エチニル-CTP + 25 % CTP/ 75 % 5-メトキシ-UTP + 25 % UTP	10
75 % 5-フルオロ-CTP + 25 % CTP/ 25 % 5-メトキシ-UTP + 75 % UTP	
75 % 5-フルオロ-CTP + 25 % CTP/ 75 % 5-メトキシ-UTP + 25 % UTP	
75 % 5-ホルミル-CTP + 25 % CTP/ 25 % 5-メトキシ-UTP + 75 % UTP	
75 % 5-ホルミル-CTP + 25 % CTP/ 75 % 5-メトキシ-UTP + 25 % UTP	
75 % 5-ヒドロキシメチル-CTP + 25 % CTP/ 25 % 5-メトキシ-UTP + 75 % UTP	
75 % 5-ヒドロキシメチル-CTP + 25 % CTP/ 75 % 5-メトキシ-UTP + 25 % UTP	
75 % 5-ヨード-CTP + 25 % CTP/ 25 % 5-メトキシ-UTP + 75 % UTP	
75 % 5-ヨード-CTP + 25 % CTP/ 75 % 5-メトキシ-UTP + 25 % UTP	
75 % 5-メトキシ-CTP + 25 % CTP/ 25 % 5-メトキシ-UTP + 75 % UTP	20
75 % 5-メトキシ-CTP + 25 % CTP/ 75 % 5-メトキシ-UTP + 25 % UTP	
75 % 5-メトキシ-UTP/5-メチル-CTP/ATP/GTP	
75 % 5-メチル-CTP + 25 % CTP/25 % 5-メトキシ-UTP + 75 % 1-メチル-プソイド-UTP	
75 % 5-メチル-CTP + 25 % CTP/25 % 5-メトキシ-UTP + 75 % UTP	
75 % 5-メチル-CTP + 25 % CTP/50 % 5-メトキシ-UTP + 50 % 1-メチル-プソイド-UTP	
75 % 5-メチル-CTP + 25 % CTP/50 % 5-メトキシ-UTP + 50 % UTP	
75 % 5-メチル-CTP + 25 % CTP/5-メトキシ-UTP	
75 % 5-メチル-CTP + 25 % CTP/75 % 5-メトキシ-UTP + 25 % 1-メチル-プソイド-UTP	30
75 % 5-メチル-CTP + 25 % CTP/75 % 5-メトキシ-UTP + 25 % UTP	
75 % 5-フェニル-CTP + 25 % CTP/ 25 % 5-メトキシ-UTP + 75 % UTP	
75 % 5-フェニル-CTP + 25 % CTP/ 75 % 5-メトキシ-UTP + 25 % UTP	
75 % 5-トリフルオロメチル-CTP + 25 % CTP/ 25 % 5-メトキシ-UTP + 75 % UTP	
75 % 5-トリフルオロメチル-CTP + 25 % CTP/ 75 % 5-メトキシ-UTP + 25 % UTP	
75 % 5-トリフルオロメチル-CTP + 25 % CTP/1-メチル-プソイド-UTP	
75 % N4-Ac-CTP + 25 % CTP/ 25 % 5-メトキシ-UTP + 75 % UTP	
75 % N4-Ac-CTP + 25 % CTP/ 75 % 5-メトキシ-UTP + 25 % UTP	40
75 % N4-Bz-CTP + 25 % CTP/ 25 % 5-メトキシ-UTP + 75 % UTP	
75 % N4-Bz-CTP + 25 % CTP/ 75 % 5-メトキシ-UTP + 25 % UTP	
75 % N4-メチル-CTP + 25 % CTP/ 25 % 5-メトキシ-UTP + 75 % UTP	
75 % N4-メチル-CTP + 25 % CTP/ 75 % 5-メトキシ-UTP + 25 % UTP	
75 % プソイドイソ-CTP + 25 % CTP/ 25 % 5-メトキシ-UTP + 75 % UTP	
75 % プソイドイソ-CTP + 25 % CTP/ 75 % 5-メトキシ-UTP + 25 % UTP	
75% 5-ブromo-CTP/25% CTP/ 1-メチル-プソイド-UTP	
75% 5-ブromo-CTP/25% CTP/ プソイド-UTP	

【表 6 - 5】

75% 5-メトキシ-UTP/25% 5-メチル-CTP/ATP/GTP
75% 5-メトキシ-UTP/50% 5-メチル-CTP/ATP/GTP
75% 5-メトキシ-UTP/75% 5-メチル-CTP/ATP/GTP
75% 5-メトキシ-UTP/CTP/ATP/GTP
8-アザ-ATP
A-チオ-CTP
CTP/25 % 5-メトキシ-UTP + 75 % 1-メチル-プソイド-UTP
CTP/25 % 5-メトキシ-UTP + 75 % UTP
CTP/50 % 5-メトキシ-UTP + 50 % 1-メチル-プソイド-UTP
CTP/50 % 5-メトキシ-UTP + 50 % UTP
CTP/5-メトキシ-UTP
CTP/5-メトキシ-UTP (キャップ 0)
CTP/5-メトキシ-UTP(キャップなし)
CTP/75 % 5-メトキシ-UTP + 25 % 1-メチル-プソイド-UTP
CTP/75 % 5-メトキシ-UTP + 25 % UTP
CTP/UTP(キャップなし)
N1-Me-GTP
N4-Ac-CTP
N4Ac-CTP/1-メチル-プソイド-UTP
N4Ac-CTP/5-メトキシ-UTP
N4-アセチル-シチジンTP, ATP, GTP, UTP
N4-Bz-CTP/ 5-メトキシ-UTP
N4-メチル CTP
N4-メチル-CTP/ 5-メトキシ-UTP
プソイドイソ-CTP/ 5-メトキシ-UTP
プソイドU- α -チオ-TP
プソイドウリジンTP, ATP, GTP, CTP
プソイド-UTP/5-メチル-CTP/ATP/GTP
UTP-5-オキシ酢酸Meエステル
キサントシン

10

20

30

本発明によれば、本発明のポリヌクレオチドは、表 6 の組み合わせ又は単一の修飾を含むように合成することができる。

【0415】

単一の修飾が記載されている場合、記載されるヌクレオシド又はヌクレオチドは、その A、U、G、若しくは C ヌクレオチド又はヌクレオシドの 100% が修飾されていることを示す。パーセンテージが記載されている場合には、これらは、存在する A、U、G、又は C 三リン酸の総量の特定の A、U、G、又は C のパーセンテージを表す。例えば、組み合わせ：25% 5-アミノアリル-CTP + 75% CTP / 25% 5-アミノアリル-UTP + 75% UTP は、25% のシトシン三リン酸が、5-アミノアリル-CTP であり、且つ 75% のシトシンが CTP であると共に；25% のウラシルが、5-メトキシ UTP であり、且つ 75% のウラシルが、UTP であるポリヌクレオチドを指す。修飾 UTP が記載されていない場合には、ポリヌクレオチドに見出されるヌクレオチドの部位の 100% に、天然に存在する ATP、UTP、GTP 及び / 又は CTP が使用されている。この例では、GTP 及び ATP ヌクレオチドの全てが、非修飾のままである。

40

【0416】

IV. 医薬組成物

50

製剤化、投与、送達及び用量決定

本発明は、キメラポリヌクレオチド組成物、並びに1種又は複数種の薬学的に許容される賦形剤と組み合わせた複合体を提供する。医薬組成物は、任意選択で、1種又は複数種の追加の活性物質、例えば、治療及び/又は予防に活性の物質を含んでもよい。本発明の医薬組成物は、滅菌であっても、及び/又は発熱物質除去されていてもよい。薬剤の製剤化及び/又は製造に際しての一般的な考慮事項は、例えば、「レミントン：薬学の科学と実践 (Remington: The Science and Practice of Pharmacy)」、第21版、リップニコット・ウィリアムズ・アンド・ウィルキンス (Lippincott Williams & Wilkins)、2005年(参照によりその全体を本明細書に組み込む)に見出すことができる。

10

【0417】

一部の実施形態では、組成物は、ヒト、ヒト患者又は対象に投与される。本開示の目的のために、語句「活性成分」は、概して、本明細書に記載するように送達しようとするキメラポリヌクレオチドを指す。

【0418】

本明細書に提供する医薬組成物の説明は、主として、ヒトへの投与に好適な医薬組成物に関するものであるが、当業者には、こうした組成物が、例えば、非ヒト動物、例えば、非ヒト哺乳動物などの他の動物への投与に一般に好適であることは理解されよう。組成物を様々な動物への投与に好適にするための、ヒトへの投与に好適な医薬組成物の修飾は十分に理解されており、通常の獣医薬理学者であれば、必要であるとしても、常用の実験だけで、こうした修飾を設計及び/又は実施することができる。医薬組成物の投与が考慮される対象として、限定はしないが、ヒト及び/又は他の霊長類；畜牛、ブタ、ウマ、ヒツジ、ネコ、イヌ、マウス、及び/又はラットなどの商業関連の哺乳動物を含む哺乳動物；及び/又は家禽、ニワトリ、アヒル、ガチョウ、及び/又はシチメンチョウなどの商業関連の鳥類を含む鳥類が挙げられる。

20

【0419】

本明細書に記載する医薬組成物の製剤は、薬理学の分野で公知であるか、又は今後開発される任意の方法によって調製することができる。一般に、こうした調製方法は、賦形剤及び/又は1つ又は複数の他の補助成分と活性成分を結合させるステップ、並びにその後、必要な及び/若しくは望ましい場合には、生成物を所望の1回若しくは複数回用量単位に分割、造形及び/又はパッケージングするステップを含む。

30

【0420】

本発明の医薬組成物中の活性成分、薬学的に許容される賦形剤、及び/又は任意の追加成分の相対量は、治療対象の種、大きさ、及び/又は状態に応じて、さらには、組成物を投与しようとする経路に応じて変動し得る。例として、組成物は、0.1%~100%、例えば、.5~50%、1~30%、5~80%、少なくとも80%(w/w)の活性成分を含み得る。

【0421】

製剤

本発明のキメラポリヌクレオチドは、(1)安定性を高める；(2)細胞トランスフェクションを増大する；(3)持続的若しくは遅延放出(例えば、キメラポリヌクレオチドのデポー剤から)を可能にする；(4)生体分布を改変する(例えば、キメラポリヌクレオチドを特定の組織若しくは細胞型にターゲティングする)；(5)コードされたタンパク質の翻訳を *in vivo* で増大する；並びに/又は(6)コードされたタンパク質の放出プロファイルを *in vivo* で改変するために、1種又は複数種の賦形剤を用いて製剤化することができる。溶媒、分散媒、希釈剤、又は他の液体ビヒクル、分散若しくは懸濁助剤、界面活性剤、等張剤、増粘若しくは乳化剤、防腐剤のいずれか若しくは全てなどの伝統的賦形剤以外にも、本発明の賦形剤は、限定はしないが、リポイド、リポソーム、脂質ナノ粒子、ポリマー、リポプレックス、コア-シェルナノ粒子、ペプチド、タンパク質、キメラポリヌクレオチドでトランスフェクトされた細胞(例えば、対象への移植

40

50

のために)、ヒアルロニダーゼ、ナノ粒子模倣体並びにこれらの組み合わせを含んでもよい。従って、本発明の製剤は、1種又は複数種の賦形剤を含んでもよく、これらは各々が、一緒にキメラポリヌクレオチドの安定性を高め、キメラポリヌクレオチドによる細胞トランスフェクションを増大しキメラポリヌクレオチドにコードされたタンパク質の発現を増大し、並びに/又はキメラポリヌクレオチドにコードされたタンパク質の放出プロフィールを改変する量で含まれる。さらに、本発明のキメラポリヌクレオチドは、自己集合核酸ナノ粒子を用いて製剤化することもできる。

【0422】

本明細書に記載する医薬組成物の製剤は、薬理学の分野で公知であるか、又は今後開発される任意の方法によって調製することができる。一般に、こうした調製方法は、賦形剤及び/又は1つ又は複数の他の補助成分と活性成分を結合させるステップを含む。

10

【0423】

本開示の医薬組成物は、1単位用量として、及び/若しくは複数の1単位用量として、調製、パッケージング、並びに/又は大量販売することができる。本明細書で用いられるとき、「単位用量」は、予定量の活性成分を含む医薬組成物の個別量を指す。活性成分の量は、概して、対象に投与される活性成分の投与量、及び/又はそうした投与量の好適な部分(例えば、上記投与量の2分の1又は3分の1など)に等しい。

【0424】

本開示の医薬組成物中の活性成分、薬学的に許容される賦形剤、及び/又は任意の追加成分の相対量は、治療対象の種、大きさ、及び/又は状態に応じて、さらには、組成物を投与しようとする経路に応じて変動し得る。例として、組成物は、0.1%~99%(w/w)の活性成分を含み得る。例として、組成物は、0.1%~100%、例えば、.5~50%、1~30%、5~80%、少なくとも80%(w/w)の活性成分を含み得る。

20

【0425】

一部の実施形態では、本明細書に記載する製剤は、少なくとも1つのキメラポリヌクレオチドを含有し得る。非制限的例として、製剤は、1つ、2つ、3つ、4つ若しくは5つのキメラポリヌクレオチドを含有し得る。一実施形態では、製剤は、限定はしないが、以下:ヒトタンパク質、家畜タンパク質、細菌タンパク質、生物学的タンパク質、抗体、免疫原性タンパク質、治療用ペプチド及びタンパク質、分泌タンパク質、原形質膜タンパク質、細胞質及び細胞骨格タンパク質、細胞内膜結合タンパク質、核タンパク質、ヒト疾患に関連するタンパク質及び/又は非ヒト疾患に関連するタンパク質などのカテゴリーから選択されるタンパク質をコードするキメラポリヌクレオチドを含有し得る。一実施形態では、製剤は、タンパク質をコードする少なくとも3つのキメラポリヌクレオチドを含有する。一実施形態では、製剤は、タンパク質をコードする少なくとも5つのキメラポリヌクレオチドを含有する。

30

【0426】

医薬組成物は、さらに、薬学的に許容される賦形剤を含んでもよく、これらは、本明細書で使用する通り、限定はしないが、所望される特定の剤形に合わせて、溶媒、分散媒、希釈剤、又は他の液体ビヒクル、分散若しくは懸濁助剤、界面活性剤、等張剤、増粘若しくは乳化剤、防腐剤などのいずれか若しくは全てを含む。医薬組成物を製剤化するための様々な賦形剤、及び組成物を調製するための技術は、当技術分野において公知である(「レミントン:薬学の科学と実践(Remington: The Science and Practice of Pharmacy)」、第21版、A.R.ジェナロ(A.R. Gennaro)、リップンコット・ウィリアムズ・アンド・ウィルキンス(Lippincott Williams & Wilkins)、メリーランド州ボルティモア、2006年を参照のこと;これは、全体として参照により本明細書に組み込む)。従来の賦形剤媒体の使用は、従来の賦形剤媒体が、例えば、何らかの望ましくない生物学的効果を生み出すか、又はそうでなければ、医薬組成物のいずれかの他の成分と有害な形で相互作用するなどによって、物質若しくはその誘導体と不適合性となり得る場合を除いて、

40

50

本開示の範囲内で考慮され得る。

【0427】

一部の実施形態では、脂質ナノ粒子の粒度は、増加及び/又は減少し得る。粒度の変化は、限定はしないが、炎症などの生物学的反応に対抗するのを助けることができるか、又は哺乳動物に送達される修飾mRNAの生物学的効果を増大し得る。

【0428】

医薬組成物の製造に用いられる薬学的に許容される賦形剤として、限定はしないが、不活性希釈剤、界面活性剤及び/若しくは乳化剤、防腐剤、緩衝剤、潤滑剤、並びに/又は油が挙げられる。こうした賦形剤は、任意選択で、本発明の医薬製剤に含有させることができる。

10

【0429】

リポイド

リポイドの合成は、広く記載されており、これらの化合物を含有する製剤は、キメラポリヌクレオチドの送達に特に適している（マホン（Mahon）ら著、バイオコンジュゲート化学（Bioconj Chem.）、2010年、第21巻、p.1448~1454；シュローダー（Schroeder）ら著、内科学会誌（J Intern Med.）、2010年、第267巻、P.9~21；アキンク（Akinic）ら著、ネイチャー・バイオテクノロジー（Nat Biotechnol.）、2008年、第26巻、p.561~569；ラブ（Love）ら著、米国科学アカデミー紀要（Proc Natl Acad Sci U S A.）、2010年、第107巻、p.1864~1869；シーグワルト（Siegwart）ら著、米国科学アカデミー紀要（Proc Natl Acad Sci U S A.）、2011年、第108巻、p.12996~3001を参照のこと；これらは全て、全体として参照により本明細書に組み込む）。

20

【0430】

これらのリポイドは、げっ歯類及び非ヒト霊長類における二本鎖低分子干渉RNA分子を有効に送達するために使用されている（アキンク（Akinic）ら著、ネイチャー・バイオテクノロジー（Nat Biotechnol.）、2008年、第26巻、p.561~569；フランク・カメネツキー（Frank-Kamenetsky）ら著、米国科学アカデミー紀要（Proc Natl Acad Sci U S A.）、2008年、第105巻、p.11915~11920；アキンク（Akinic）ら著、分子療法（Mol Ther.）、2009年、第17巻、p.872~879；ラブ（Love）ら著、米国科学アカデミー紀要（Proc Natl Acad Sci U S A.）、2010年、第107巻、p.1864~1869；ロイシュナー（Leuschner）ら著、ネイチャー・バイオテクノロジー（Nat Biotechnol.）、2011年、第29巻、p.1005~1010を参照のこと；これらは全て、全体として参照により本明細書に組み込む）が、本開示は、それらの製剤化、並びにキメラポリヌクレオチドの送達におけるそれらの使用を記載する。

30

【0431】

これらのリポイドを含有する複合体、ミセル、リポソーム又は粒子を調製することができ、従って、局所及び/又は全身投与経路を介したリポイド製剤の注射後に、コードされるタンパク質の産生により判断される通りのキメラポリヌクレオチドの有効な送達を達成することができる。キメラポリヌクレオチドのリポイド複合体は、限定はしないが、静脈内、筋肉内、又は皮下経路などの様々な手段により投与することができる。

40

【0432】

核酸のin vivo送達は、限定はしないが、製剤組成物、粒子ペグ化の性質、ローディングの程度、ポリヌクレオチドと脂質の比、並びに限定はしないが、粒度などの生物物理学的パラメータを含む多種のパラメータにより影響され得る（アキンク（Akinic）ら著、分子療法（Mol Ther.）、2009年、第17巻、p.872~879を参照のこと；全体として参照により本明細書に組み込む）。一例として、ポリ（エチレ

50

ングリコール) (PEG) 脂質のアンカー鎖長さのわずかな変化によって、*in vivo* 効力に有意な影響が及ぼされ得る。限定はしないが、以下：ペンタ[3-(1-ラウリルアミノプロピオニル)]-トリエチレンテトラミン塩酸塩 (TETA-5LAP; 別名 98N12-5、ムルガイア (Murugaiyah) ら著、分析生化学 (Analytical Biochemistry)、第401巻、p. 61、2010年を参照のこと; これは、全体として参照により本明細書に組み込む)、C12-200 (誘導体及び変異体を含む)、並びにMDIなど、種々のリポイドを含む製剤を *in vivo* 活性について試験することができる。

【0433】

本明細書で「98N12-5」と呼ばれるリポイドは、アキンク (Akinck) ら著、分子療法 (Mol Ther.)、2009年、第17巻、p. 872~879に開示されており、これは、全体として参照により本明細書に組み込む。

10

【0434】

本明細書で「C12-200」と呼ばれるリポイドは、ラブ (Love) ら著、米国科学アカデミー紀要 (Proc Natl Acad Sci U S A.)、2010年、第107巻、p. 1864~1869並びにリュウ (Liu) 及びフアン (Huang) ら著、分子療法 (Molecular Therapy)、2010年、p. 669~670に開示されており、これらのいずれも、全体として参照により本明細書に組み込む。リポイド製剤は、キメラポリヌクレオチド以外に、3つ又は4つ以上の成分を含む粒子を含んでもよい。一例として、いくつかのリポイドを含む製剤は、限定はしないが、98N12-5を含んでおり、これは、42%のリポイド、48%のコレステロール及び10%のPEG (C14アルキル鎖長) を含有してもよい。別の例として、いくつかのリポイドを含む製剤は、限定はしないが、C12-200を含んでおり、これは、50%のリポイド、10%のジステロイルホスファチジルコリン、38.5%のコレステロール、及び1.5%のPEG-DMGを含有してもよい。

20

【0435】

一実施形態では、全身性静脈内投与のために、リポイドと一緒に製剤化されるキメラポリヌクレオチドは、肝臓をターゲティングすることができる。例えば、キメラポリヌクレオチドを使用し、42%の98N12-5、48%のコレステロール及び10%のPEG-脂質の脂質モル組成物を含み、総脂質：circRNAの最終重量比が約7.5:1であり、且つPEG脂質上でC14アルキル鎖長を有し、平均粒度が約50~60nmの最終最適化静脈内製剤は、肝臓に対して90%超の製剤の分布をもたらすことができる。(アキンク (Akinck) ら著、分子療法 (Mol Ther.)、2009年、第17巻、p. 872~879を参照のこと; これは、全体として参照により本明細書に組み込む)。別の例では、C12-200 (米国仮特許出願第61/175,770号明細書及び国際公開第2010129709号パンフレットを参照のこと; これらの各々は、全体として参照により本明細書に組み込む) リポイドを使用する静脈内製剤は、C12-200/ジステロイルホスファチジルコリン/コレステロール/PEG-DMGのモル比50/10/38.5/1.5を有し、総脂質：キメラポリヌクレオチドの重量比が7:1で、平均粒度が80nmであってよく、これは、肝細胞にキメラポリヌクレオチドを送達するのに有効であり得る (ラブ (Love) ら著、米国科学アカデミー紀要 (Proc Natl Acad Sci U S A.)、2010年、第107巻、p. 1864~1869を参照のこと; 全体として参照により本明細書に組み込む)。別の実施形態では、MD1リポイド含有製剤を用いて、*in vivo* で肝細胞にキメラポリヌクレオチドを有効に送達することができる。

30

40

【0436】

筋肉内又は皮下経路用の最適化リポイド製剤の特徴は、標的細胞型及び製剤が細胞外マトリックスを介して血流中に拡散する能力に応じて、有意に変動し得る。内皮透過窓 (fenestrae) のサイズのために、有効な肝細胞送達には150nm未満の粒度が望ましいと思われる (アキンク (Akinck) ら著、分子療法 (Mol Ther.)、

50

2009年、第17巻、p. 872~879を参照のこと；全体として参照により本明細書に組み込む）が、限定はしないが、内皮細胞、骨髄細胞、及び筋肉細胞などの他の細胞型に製剤を送達するためのリポイド製剤化キメラポリヌクレオチドの使用は、それと同様にサイズ制限しなくてもよい。

【0437】

骨髄細胞及び内皮細胞などの他の非肝細胞に *in vivo* で *siRNA* を送達するためのリポイド製剤の使用が報告されている（アキンク（Akinc）ら著、ネイチャー・バイオテクノロジー（*Nat Biotechnol.*）、2008年、第26巻、p. 561~569；ロイシュナー（Leuschner）ら著、ネイチャー・バイオテクノロジー（*Nat Biotechnol.*）、2011年、第29巻、p. 1005~1010；チョー（Cho）ら著、アドバンスト・ファンクショナル・マテリアルズ（*Adv. Funct. Mater.*）、2009年、第19巻、p. 3112~3118；第8回国際ユダ・フォークマン会議（8th International Judah Folkman Conference）、マサチューセッツ州ケンブリッジ、2010年10月8日~9日を参照のこと；これらの各々は、全体として参照により本明細書に組み込む）。単球、リポイド製剤などの骨髄性細胞への有効な送達は、同様の構成成分モル比を有し得る。異なる比のリポイド及び他の構成成分、例えば限定はしないが、ジステロイルホスファチジルコリン、コレステロール及びPEG-DMGを用いて、キメラポリヌクレオチドの製剤を、限定はしないが、肝細胞、骨髄性細胞、筋肉細胞などの種々の細胞型への送達のために最適化することができる。例えば、構成成分モル比は、限定はしないが、50%のC12-200、10%のジステロイルホスファチジルコリン、38.5%のコレステロール、及び1.5%のPEG-DMGを含み得る（ロイシュナー（Leuschner）ら著、ネイチャー・バイオテクノロジー（*Nat Biotechnol.*）、2011年、第29巻、p. 1005~1010を参照；全体として参照により本明細書に組み込む）。核酸を皮下送達又は筋肉内送達のいずれかによって、細胞（限定はしないが、脂肪細胞及び筋肉細胞など）に局所送達するためのリポイド製剤の使用は、全身送達に望ましい製剤構成成分を全て必要とするわけではなく、従って、リポイド及びキメラポリヌクレオチドのみを含む場合もある。

【0438】

リポイドは、キメラポリヌクレオチドによる細胞トランスフェクションを増大し得る；及び/又はコードされたタンパク質の翻訳を増加し得るため、種々のリポイドの組み合わせを用いることにより、*circRNA* 誘導によるタンパク質産生の効力を改善することができる（ホワイトヘッド（Whitehead）ら著、分子療法（*Mol. Ther.*）、2011年、第19巻、p. 1688~1694を参照；これは、全体として参照により本明細書に組み込む）。

【0439】

リポソーム、リポブックス、及び脂質ナノ粒子

本発明のキメラポリヌクレオチドは、1つ以上のリポソーム、リポブックス、又は脂質ナノ粒子を用いて製剤化することができる。一実施形態では、キメラポリヌクレオチドの医薬組成物は、リポソームを含む。リポソームは、主として脂質二重層で構成され得る人工的に調製された小胞であり、栄養素及び医薬製剤の投与のための送達ビヒクルとして用いることができる。リポソームは、限定はしないが、直径が数百ナノメートルであり、狭い水性コンパートメントによって分離された一続きの同心二重層を含み得る多重膜小胞（MLV）、直径50nm未満であり得る小さい単細胞小胞（SUV）、及び直径50~500nmであり得る大きい単層小胞（LUV）など、様々なサイズであってよい。非健常組織に対するリポソームの付着を改善する、又は限定はしないがエンドサイトーシスなどのイベントを活性化するために、リポソーム設計は、限定はしないが、オプソニン又はリガンドを含んでもよい。リポソームは、医薬製剤の送達を改善するために、低い又は高いpHを含有してよい。

【0440】

リポソームの形成は、限定はしないが、封入される医薬製剤及びリポソーム成分、脂質小胞を分散させる媒体の性質、封入物質の有効濃度及びその潜在的毒性、小胞の適用中及び/又は送達中に関与する任意の追加プロセス、意図する用途に対する小胞の最適サイズ、多分散性及び貯蔵寿命、並びに安全且つ効率的なリポソーム産物のバッチ間再現性及び大量生産の可能性などの、物理化学的特性に左右され得る。

【0441】

非制限的例として、合成膜小胞などのリポソームは、以下の文献に記載されている方法、装置及びデバイスによって調製することができる：米国特許出願公開第20130177638号明細書、同第20130177637号明細書、同第20130177636号明細書、同第20130177635号明細書、同第20130177634号明細書、同第20130177633号明細書、同第20130183375号明細書、同第20130183373号明細書、及び同第20130183372号明細書；これらの各々は、全体として参照により本明細書に組み込む。

10

【0442】

一実施形態では、本明細書に記載される医薬組成物は、限定なしに、以下：1, 2 - ジオレイルオキシ - N, N - ジメチルアミノプロパン (DODMA) リポソーム、マリナ・バイオテック (Marina Biotech) (ワシントン州ボセル) の DiLa2 リポソーム、1, 2 - ジリノレイルオキシ - 3 - ジメチルアミノプロパン (DLin - 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)、及び MC3 (米国特許出願公開第20100324120号明細書；これは、全体として参照により本明細書に組み込む) から形成されるリポソーム、並びに、限定はしないが、ヤンセン・バイオテック社 (Janssen Biotech, Inc.) (ペンシルベニア州ホーシャム) の DOXIL (登録商標) などの小分子薬物を送達し得るリポソームなどのリポソームを含み得る。

20

【0443】

一実施形態では、本明細書に記載される医薬組成物は、限定なしに、以前記載されており、且つ *in vitro* 及び *in vivo* でのオリゴヌクレオチド送達に好適であることが証明されている安定化プラスミド脂質粒子 (SPLP) 又は安定化核酸脂質粒子 (SNALP) の合成から形成されるリポソームなどのリポソームを含み得る (ホイーラー (Wheeler) ら著、遺伝子療法 (Gene Therapy)、1999年、第6巻、p. 271 ~ 281；チャン (Zhang) ら著、遺伝子療法 (Gene Therapy)、1999年、第6巻、p. 1438 ~ 1447；ジェフズ (Jeffs) ら著、薬剤学研究 (Pharm Res.)、2005年、第22巻、p. 362 ~ 372；モリッシー (Morrissey) ら著、ネイチャー・バイオテクノロジー (Nat Biotechnol.)、2005年、第2巻、p. 1002 ~ 1007；ツインマーマン (Zimmermann) ら著、ネイチャー (Nature)、2006年、第441巻、p. 111 ~ 114；ヘイズ (Heyes) ら著、ジャーナル・オブ・コントロールド・リリース (J Contr Rel.)、2005年、第107巻、p. 276 ~ 287；センプル (Semple) ら著、ネイチャー・バイオテクノロジー (Nature Biotech.)、2010年、第28巻、p. 172 ~ 176；ジャッジ (Judge) ら著、ジャーナル・オブ・クリニカル・インベスティゲーション (J Clin Invest.)、2009年、第119巻、p. 661 ~ 673；ドフジュロール (deFougerolles) 著、ヒト遺伝子療法 (Hum Gene Ther.)、2008年、第19巻、p. 125 ~ 132；米国特許出願公開第20130122104号明細書を参照のこと；これらは全て、全体として参照により本明細書に組み込む)。ホイーラー (Wheeler) らによる最初の製造方法は、デタージェント透析法であったが、これは、後にジェフズ (Jeffs) らにより改良されており、自発的小胞形成法と呼ばれる。リポソーム製剤は、キメラポリヌクレオチドに加えて、3 ~ 4つの脂質構成成分から構成される。一例として、リポソームは、限定はしないが、ジェフズ (Jeffs) らにより記載される通り、55%のコレステロール、20%のジステロイルホスファチジ

30

40

50

ルコリン (DSPC)、10%のPEG-S-DSG、及び15%の1,2-ジオレイルオキシ-N,N-ジメチルアミノプロパン(DODMA)を含有することができる。別の例として、いくつかのリポソーム製剤は、限定はしないが、ヘイズ(Heyes)らにより記載される通り、48%のコレステロール、20%のDSPC、2%のPEG-c-DMA、及び30%のカチオン性脂質を含有してもよく、ここで、カチオン性脂質は、1,2-ジステアリルオキシ-N,N-ジメチルアミノプロパン(DSDMA)、DODMA、DLin-DMA、又は1,2-ジリノレニルオキシ-3-ジメチルアミノプロパン(DLenDMA)であってもよい。

【0444】

一部の実施形態では、リポソーム製剤は、約25.0%~約40.0%のコレステロール、約30.0%~約45.0%のコレステロール、約35.0%~約50.0%のコレステロール、及び/又は約48.5%~約60%のコレステロールを含んでもよい。好ましい実施形態では、製剤は、28.5%、31.5%、33.5%、36.5%、37.0%、38.5%、39.0%及び43.5%からなる群から選択されるパーセンテージのコレステロールを含み得る。一部の実施形態では、製剤は、約5.0%~約10.0%のDSPC及び/又は約7.0%~約15.0%のDSPCを含み得る。

10

【0445】

一実施形態では、医薬組成物は、少なくとも1つの免疫原又は別の目的のポリペプチドをコードし得るキメラポリヌクレオチドを送達するように形成することができるリポソームを含み得る。キメラポリヌクレオチドは、リポソームによって封入してもよいし、及び/又は水性コアに含有させた後、これをリポソームによって封入してもよい(国際公開第2012031046号パンフレット、同第2012031043号パンフレット、同第2012030901号パンフレット、同第2012006378号パンフレット、米国特許出願公開第20130189351号明細書、同第20130195969号明細書、同第20130202684号明細書を参照;これらの各々の内容は、全体として参照により本明細書に組み込む)。

20

【0446】

別の実施形態では、リポソームを標的送達のために製剤化することができる。非制限的例として、リポソームは、肝臓への標的送達のために製剤化することができる。標的送達のために用いられるリポソームとして、限定はしないが、米国特許出願公開第20130195967号明細書(その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む)に記載されているリポソーム、及びリポソームの製造方法が挙げられる。

30

【0447】

別の実施形態では、免疫原をコードし得るキメラポリヌクレオチドは、カチオン性水中油形エマルジョン中に製剤化することができ、ここで、エマルジョン粒子は、オイルコア、及びキメラポリヌクレオチドと相互作用して、その分子をエマルジョン粒子に係留することができるカチオン性脂質を含む(国際公開第2012006380号パンフレットを参照;これは、全体として参照により本明細書に組み込む)。

【0448】

一実施形態では、キメラポリヌクレオチドは、親水相が分散している連続的疎水相を含む油中水形エマルジョン中に製剤化することもできる。非制限的例として、エマルジョンは、国際公開第201087791号パンフレット(これは、全体として参照により本明細書に組み込む)に記載されている方法によって製造することができる。

40

【0449】

別の実施形態では、脂質製剤は、少なくともカチオン性脂質、トランスフェクションを増強する脂質、及び脂質部分に連結した親水性ヘッドグループを含有する少なくとも1つの脂質を含み得る(国際公開第2011076807号パンフレット及び米国特許出願公開第20110200582号明細書;これらの各々の内容は、全体として参照により本明細書に組み込む)。別の実施形態では、免疫原をコードするキメラポリヌクレオチドは、官能化脂質二重層の間に架橋を有し得る脂質小胞に製剤化することができる(米国特許

50

出願公開第20120177724号明細書を参照；その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）。

【0450】

一実施形態では、キメラポリヌクレオチドは、国際公開第2013086526号パンフレット（全体として参照により本明細書に組み込む）に記載のリボソーム中に製剤化することができる。キメラポリヌクレオチドは、国際公開第2013086526号パンフレット（全体として参照により本明細書に組み込む）に記載される通り、逆転pH勾配及び/又は最適化内部バッファー組成物を用いて、リボソーム中に封入することができる。

【0451】

一実施形態では、医薬組成物は、限定はしないが、DiLa2リボソーム（マリナ・バイオテック（Marina Biotech）、ワシントン州ボセル）、スマートICLES（登録商標）（マリナ・バイオテック（Marina Biotech）、ワシントン州ボセル）、中性DOPC（1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン）ベースのリボソーム（例えば、卵巣癌へのsiRNA送達（ランデン（Landen）ら著、癌生物学及び療法（Cancer Biology & Therapy）、2006年、第5巻（12）、p.1708~1713）；これは、全体として参照により本明細書に組み込む）及びヒアルロナン被覆リボソーム（クイテット・セラピューティクス（Quiet Therapeutics）、イスラエル）などのリボソームに製剤化することができる。

10

【0452】

一実施形態では、カチオン性脂質は、米国特許出願公開第20130090372号明細書（全体として参照により本明細書に組み込む）に記載されているものなどの、低分子量カチオン性脂質であってもよい。

20

【0453】

一実施形態では、キメラポリヌクレオチドは、官能化脂質二重層の間に架橋を有し得る脂質小胞中に製剤化することができる。

一実施形態では、キメラポリヌクレオチドは、カチオン性脂質を含むリボソーム中に製剤化することができる。リボソームは、国際公開第2013006825号パンフレット（全体として参照により本明細書に組み込む）に記載される通り、1:1~20:1のカチオン性脂質中の窒素対RNA中のリン酸のモル比（N:P比）を有してよい。別の実施形態では、リボソームは、20:1超又は1:1未満のN:P比を有し得る。

30

【0454】

一実施形態では、キメラポリヌクレオチドは、脂質-ポリカチオン複合体中に製剤化することができる。脂質-ポリカチオン複合体の形成は、当技術分野で公知の方法及び/又は米国特許出願公開第20120178702号明細書（全体として参照により本明細書に組み込む）に記載の方法によって達成することができる。非制限的例として、ポリカチオンは、限定はしないが、ポリリジン、ポリオルニチン及び/又はポリアルギニン、並びに国際公開第2012013326号パンフレット又は米国特許出願公開第20130142818号明細書（これらの各々は、全体として参照により本明細書に組み込む）に記載されているカチオン性ペプチドなどのカチオン性ペプチド又はポリペプチドを含み得る。別の実施形態では、キメラポリヌクレオチドは、限定はしないが、コレステロール又はジオレオイルホスファチジルエタノールアミン（DOPE）などの中性脂質をさらに含み得る脂質-ポリカチオン複合体中に製剤化してもよい。

40

【0455】

一実施形態では、キメラポリヌクレオチドは、アミノアルコールリピドイド中に製剤化することができる。本発明で用いられ得るアミノアルコールリピドイドは、米国特許第8,450,298号明細書（全体として参照により本明細書に組み込む）に記載の方法によって調製することができる。

【0456】

リボソーム製剤は、限定はしないが、カチオン性脂質構成成分の選択、カチオン性脂質

50

の飽和度、ペグ化の性質、全構成成分の比及びサイズなどの生物物理学的パラメータによって影響され得る。センプル (S e m p l e) ら (センプル (S e m p l e) ら著、ネイチャー・バイオテクノロジー (N a t u r e B i o t e c h)、2010年、第28巻、p. 172 ~ 176 ; これは、全体として参照により本明細書に組み込む) による一例では、リポソーム製剤は、57.1%のカチオン性脂質、7.1%のジバルミトイルホスファチジルコリン、34.3%のコレステロール、及び1.4%のPEG-c-DMAから構成された。別の例として、カチオン性脂質の組成を変えると、様々な抗原提示細胞に s i R N A をより効果的に送達することができた (バシャ (B a s h a) ら著、分子療法 (M o l T h e r)、2011年、第19巻、p. 2186 ~ 2200 ; これは、全体として参照により本明細書に組み込む)。一部の実施形態では、リポソーム製剤は、約35 ~ 約45%のカチオン性脂質、約40 ~ 約50%のカチオン性脂質、約50 ~ 約60%のカチオン性脂質、及び / 又は約55 ~ 約65%のカチオン性脂質を含み得る。一部の実施形態では、リポソーム中の脂質対 m R N A の比は、約5 : 1 ~ 約20 : 1、約10 : 1 ~ 約25 : 1、約15 : 1 ~ 約30 : 1、及び / 又は少なくとも30 : 1 であってよい。

【0457】

一部の実施形態では、脂質ナノ粒子 (L N P) 中のPEGの比を増減する、及び / 又はPEG脂質の炭素鎖長さをC14からC18に変更することにより、LNP製剤の薬物動態及び / 又は生体分布を改変することができる。非制限的例として、LNP製剤は、カチオン性脂質、DSPC及びコレステロールと比較して、約0.5% ~ 約3.0%、約1.0% ~ 約3.5%、約1.5% ~ 約4.0%、約2.0% ~ 約4.5%、約2.5% ~ 約5.0%、及び / 又は約3.0% ~ 約6.0%の脂質モル比のPEG-c-DOMGを含有し得る。別の実施形態では、PEG-c-DOMGは、限定はしないが、PEG-DSG (1, 2 - ジステアロイル - s n - グリセロール、メトキシポリエチレングリコール)、PEG-DMG (1, 2 - ジメリストイル - s n - グリセロール) 及び / 又はPEG-DPG (1, 2 - ジバルミトイル - s n - グリセロール、メトキシポリエチレングリコール) などのPEG脂質で置換してもよい。カチオン性脂質は、当技術分野で公知の任意の脂質、例えば、限定はしないが、DLin-MC3-DMA、DLin-DMA、C12-200及び / 又はDLin-KC2-DMAなどから選択することができる。

【0458】

一実施形態では、キメラポリヌクレオチドは、国際公開第2012170930号パンフレット (全体として参照により本明細書に組み込む) に記載されているものなどの脂質ナノ粒子中に製剤化することができる。

【0459】

一実施形態では、キメラポリヌクレオチドを含む製剤は、少なくとも1つの脂質を含み得るナノ粒子である。脂質は、限定はしないが、以下：DLin-DMA、DLin-K-DMA、98N12-5、C12-200、DLin-MC3-DMA、DLin-KC2-DMA、DODMA、PLGA、PEG、PEG-DMG、ペグ化脂質及びアミノアルコール脂質から選択することができる。別の態様では、脂質は、限定はしないが、DLin-DMA、DLin-D-DMA、DLin-MC3-DMA、DLin-KC2-DMA、DODMA及びアミノアルコール脂質などのカチオン性脂質であってもよい。アミノアルコールカチオン性脂質は、本明細書に記載の脂質及び / 又は米国特許出願公開第20130150625号明細書 (全体として参照により本明細書に組み込む) に記載の方法により製造される脂質であってもよい。非制限的例として、カチオン性脂質は、2-アミノ-3-[(9Z, 12Z) - オクタデカ - 9, 12 - ジエン - 1 - イルオキシ] - 2 - { [(9Z, 2Z) - オクタデカ - 9, 12 - ジエン - 1 - イルオキシ] メチル } プロパン - 1 - オール (米国特許出願公開第20130150625号明細書の化合物1) ; 2-アミノ-3-[(9Z) - オクタデカ - 9 - エン - 1 - イルオキシ] - 2 - { [(9Z) - オクタデカ - 9 - エン - 1 - イルオキシ] メチル } プロパン - 1 - オール (米国特許出願公開第20130150625号明細書の化合物2) ; 2-アミノ-3-[(9Z, 12Z) - オクタデカ - 9, 12 - ジエン - 1 - イルオキシ] - 2 - [(オクチル

10

20

30

40

50

オキシ)メチル]プロパン-1-オール(米国特許出願公開第20130150625号明細書の化合物3);及び2-(ジメチルアミノ)-3-[(9Z,12Z)-オクタデカ-9,12-ジエン-1-イルオキシ]-2-{[(9Z,2Z)-オクタデカ-9,12-ジエン-1-イルオキシ]メチル}プロパン-1-オール(米国特許出願公開第20130150625号明細書の化合物4);又はこれらの任意の薬学的に許容される塩若しくは立体異性体であってもよい。

【0460】

一実施形態では、カチオン性脂質は、限定はしないが、同時係属国際公開第2015034928号パンフレット(その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む)の paragraph [000398]に記載のカチオン性脂質から選択することができる。

10

【0461】

一実施形態では、脂質は、国際公開第2012170889号パンフレット(全体として参照により本明細書に組み込む)に記載のものなどの切断可能な脂質であってもよい。

別の実施形態では、脂質は、限定はしないが、米国特許出願公開第20130064894号明細書(全体として参照により本明細書に組み込む)の式(I)などのカチオン性脂質であってもよい。

【0462】

一実施形態では、カチオン性脂質は、当技術分野で公知の方法及び/又は以下の文献に記載の方法により合成することができる:国際公開第2012040184号パンフレット、同第2011153120号パンフレット、同第2011149733号パンフレット、同第2011090965号パンフレット、同第2011043913号パンフレット、同第2011022460号パンフレット、同第2012061259号パンフレット、同第2012054365号パンフレット、同第2012044638号パンフレット、同第2010080724号パンフレット、同第201021865号パンフレット、同第2013086373号パンフレット、及び同第2013086354号パンフレット(これらの各々の内容は、全体として参照により本明細書に組み込む)。

20

【0463】

別の実施形態では、カチオン性脂質は、トリアルキルカチオン性脂質であってもよい。トリアルキルカチオン性脂質並びにトリアルキルカチオン性脂質の製造及び使用方法の非制限的例は、国際公開第2013126803号パンフレット(その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む)に記載されている。

30

【0464】

一実施形態では、キメラポリヌクレオチドのLNP製剤は、3%の脂質モル比でPEG-c-DOMGを含有し得る。別の実施形態では、キメラポリヌクレオチドのLNP製剤は、1.5%の脂質モル比でPEG-c-DOMGを含有し得る。

【0465】

一実施形態では、キメラポリヌクレオチドの医薬組成物は、国際公開第2012099755号パンフレット(全体として参照により本明細書に組み込む)に記載されているペグ化脂質の少なくとも1つを含んでもよい。

【0466】

一実施形態では、LNP製剤は、PEG-DMG2000(1,2-ジミリストイル-sn-グリセロ-3-ホ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])を含有してもよい。一実施形態では、LNP製剤は、PEG-DMG2000、当技術分野で公知のカチオン性脂質及び少なくとも1つの他の成分を含有してもよい。別の実施形態では、LNP製剤は、PEG-DMG2000、当技術分野で公知のカチオン性脂質、DSPC及びコレステロールを含有してもよい。非制限的例として、LNP製剤は、PEG-DMG2000、DLin-DMA、DSPC及びコレステロールを含有してもよい。別の非制限的例として、LNP製剤は、PEG-DMG2000、DLin-DMA、DSPC及びコレステロールを2:40:10:48のモル比で含有してもよい(例えば、ギール(Geall)ら著、「自己増幅RNAワクチンの非ウイルス送

40

50

達 (Nonviral delivery of self-amplifying RNA vaccines)」、PNAS、2012年、PMID: 22908294を参照；全体として参照により本明細書に組み込む）。

【0467】

一実施形態では、LNP製剤は、国際公開第2011127255号パンフレット又は同第2008103276号パンフレット（これらの各々の内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）に記載の方法によって製剤化することができる。非制限的例として、本明細書に記載するキメラポリヌクレオチドは、国際公開第2011127255号パンフレット又は同第2008103276号パンフレット（これらの各々の内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）に記載される通り、LNP製剤に封入することができる。

10

【0468】

一実施形態では、本明細書に記載するキメラポリヌクレオチドは、米国特許出願公開第20120207845号明細書（その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）に記載される通り、非経口経路によって送達するためにナノ粒子に製剤化することができる。

【0469】

一実施形態では、キメラポリヌクレオチドは、米国特許出願公開第20130156845号明細書又は国際公開第2013093648号パンフレット若しくは同第2012024526号パンフレット（これらの各々は、全体として参照により本明細書に組み込む）に記載の方法により製造される脂質ナノ粒子に製剤化することができる。

20

【0470】

本明細書に記載する脂質ナノ粒子は、米国特許出願公開第20130164400号明細書（全体として参照により本明細書に組み込む）に記載のシステム及び/又は方法により、滅菌環境において製造することができる。

【0471】

一実施形態では、LNP製剤は、米国特許第8,492,359号明細書（その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）に記載されている核酸-脂質粒子などのナノ粒子に製剤化することができる。非制限的例として、脂質粒子は、以下のものを含む：1種又は複数種の活性剤若しくは治療薬；粒子中に存在する総脂質の約50モル%～約85モル%を占める1種又は複数種のカチオン性脂質；粒子中に存在する総脂質の約13モル%～約49.5モル%を占める1種又は複数種の非カチオン性脂質；粒子中に存在する総脂質の約0.5モル%～約2モル%を占め、粒子の凝集を阻害する1種又は複数種の共役脂質。ナノ粒子中の核酸は、本明細書に記載する、及び/又は当技術分野で公知のキメラポリヌクレオチドであってよい。

30

【0472】

一実施形態では、LNP製剤は、国際公開第2011127255号パンフレット又は同第2008103276号パンフレット（これらの各々の内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）に記載されている方法によって製剤化することができる。非制限的例として、本明細書に記載するmRNAは、国際公開第2011127255号パンフレット及び/又は同第2008103276号パンフレット（これらの各々の内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）に記載される通り、LNP製剤に封入することができる。

40

【0473】

一実施形態では、本明細書に記載するLNP製剤は、ポリカチオン性組成物を含んでもよい。非制限的例として、ポリカチオン性組成物は、米国特許出願公開第20050222064号明細書（その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）の式1～60から選択することができる。別の実施形態では、ポリカチオン性組成物を含むLNP製剤は、本明細書に記載するmRNAの*in vivo*及び/又は*in vitro*での送達に使用することができる。

50

【0474】

一実施形態では、本明細書に記載するLNP製剤は、さらに、透過性促進剤分子を含んでもよい。透過性促進剤分子の非制限的例は、米国特許出願公開第20050222064号明細書（その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）に記載されている。

【0475】

一実施形態では、医薬組成物は、限定はしないが、DiLa2リポソーム（マリナ・バイオテック（Marina Biotech）、ワシントン州ボセル）、スマーティクレス（SMARTICLES）（登録商標）（マリナ・バイオテック（Marina Biotech）、ワシントン州ボセル）、中性DOPC（1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン）ベースのリポソーム（例えば、卵巣癌へのsiRNA送達（ランデン（Landen）ら著、癌生物学及び療法（Cancer Biology & Therapy）、2006年、第5巻（12）、p.1708~1713）；これは、全体として参照により本明細書に組み込む）及びヒアルロン被覆リポソーム（クワイエット・セラピューティクス（Quiet Therapeutics）、イスラエル）などのリポソームに製剤化することができる。

10

【0476】

一実施形態では、キメラポリヌクレオチドは、米国特許出願公開第2012060293号明細書（これは、全体として参照により本明細書に組み込む）に記載されているように、凍結乾燥ゲル相リポソーム組成物に製剤化することができる。

20

【0477】

ナノ粒子製剤は、リン酸コンジュゲートを含んでもよい。リン酸コンジュゲートは、in vivo循環時間を増加し、及び/又はナノ粒子の標的送達を増大し得る。本発明で使用するリン酸コンジュゲートは、国際公開第2013033438号パンフレット又は米国特許出願公開第20130196948号明細書（これらの各々の内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）に記載の方法により製造することができる。非制限的例として、リン酸コンジュゲートは、国際公開第2013033438号パンフレット（これは、全体として参照により本明細書に組み込む）に記載されている式のいずれか1つの化合物を含んでもよい。

【0478】

ナノ粒子製剤は、ポリマーコンジュゲートを含んでもよい。ポリマーコンジュゲートは、水溶性コンジュゲートであってもよい。ポリマーコンジュゲートは、米国特許出願公開第20130059360号明細書（その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）に記載されている構造を有し得る。一態様では、本発明のキメラポリヌクレオチドとのポリマーコンジュゲートは、米国特許出願公開第20130072709号明細書（これは、全体として参照により本明細書に組み込む）に記載されている方法及び/又はセグメント化ポリマー試薬を用いて、製造することができる。別の態様では、ポリマーコンジュゲートは、限定はしないが、米国特許出願公開第20130196948号明細書（これらの各々の内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）に記載されているポリマーコンジュゲートなどの環部分を含むペンダント側基を有していてもよい。

30

40

【0479】

ナノ粒子製剤は、対象における本発明のナノ粒子の送達を促進するためのコンジュゲートを含んでもよい。さらに、コンジュゲートは、対象におけるナノ粒子の貪食細胞によるクリアランスを阻害し得る。一態様では、コンジュゲートは、ヒト膜タンパク質CD47から設計される「自己」ペプチドであってもよい（例えば、ロドリゲス（Rodriguez）らにより記載される「自己」粒子（“self” particles）（サイエンス（Science）、2013年、第339巻、p.971~975）を参照；これは、全体として参照により本明細書に組み込む）。ロドリゲス（Rodriguez）らにより示される通り、自己ペプチドは、ナノ粒子のマクロファージ媒介のクリアランスを遅延させ、これによって、ナノ粒子の送達が進められた。別の態様では、コンジュゲートは

50

、膜タンパク質CD47であってもよい（例えば、ロドリゲス（Rodriguez）ら著、サイエンス（Science）、2013年、第339巻、p.971～975を参照のこと；これは、全体として参照により本明細書に組み込む）。ロドリゲス（Rodriguez）らは、「自己」ペプチドと同様に、CD47は、スクランブルペプチド及びPEG被覆ナノ粒子と比較して、対象における循環粒子比率を増大することができることを示した。

【0480】

一実施形態では、本発明のキメラポリヌクレオチドは、対象における本発明のナノ粒子の送達を促進するためのコンジュゲートを含むナノ粒子に製剤化する。コンジュゲートは、CD47膜であってもよいし、又はコンジュゲートは、前述した「自己」ペプチドなどのCD47膜タンパク質に由来するものであってもよい。別の態様では、ナノ粒子は、PEG及びCD47のコンジュゲート又はその誘導体を含んでもよい。また別の態様では、ナノ粒子は、前述した「自己」ペプチド及び膜タンパク質CD47の両方を含んでもよい。

10

【0481】

別の態様では、「自己」ペプチド及び/又はCD47タンパク質は、本発明のキメラポリヌクレオチドの送達のために、本明細書に記載するように、ウイルス様粒子又は偽ビリオン（pseudovirion）に共役させてもよい。

【0482】

別の実施形態では、本発明のキメラポリヌクレオチドと、分解可能な結合を有し得るコンジュゲートを含む医薬組成物。コンジュゲートの非制限的例は、イオン化水素原子含有の芳香族部分、スペーサ部分、及び水溶性ポリマーを含む。非制限的例として、分解可能な結合を有するコンジュゲートを含む医薬組成物、及びこのような医薬組成物の送達方法が、米国特許出願公開第20130184443号明細書（その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）に記載されている。

20

【0483】

ナノ粒子製剤は、炭水化物担体と、キメラポリヌクレオチドを含む炭水化物ナノ粒子であってもよい。非制限的例として、炭水化物担体は、限定はしないが、無水物修飾フィトグリコーゲン若しくはグリコーゲンタイプ材料、フィトグリコーゲンオクテニルコハク酸塩、フィトグリコーゲン - デキストリン、無水物修飾フィトグリコーゲン - デキストリンを含み得る。（例えば、国際公開第2012109121号パンフレットを参照のこと；その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）。

30

【0484】

本発明のナノ粒子製剤は、粒子の送達を改善するために、界面活性剤又はポリマーで被覆してもよい。一実施形態では、ナノ粒子は、限定はしないが、PEGコーティング及び/又は中性表面電荷を有するコーティングなどの親水性コーティングで被覆してもよい。親水性コーティングは、より大きなペイロード、例えば、限定はしないが、キメラポリヌクレオチドなどを有するナノ粒子を中枢神経系内に送達する上で役立ち得る。非制限的例として、親水性コーティングを含むナノ粒子及びそうしたナノ粒子を製造する方法が、米国特許出願公開第20130183244号明細書（その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）に記載されている。

40

【0485】

一実施形態では、本発明の脂質ナノ粒子は、親水性ポリマー粒子であってもよい。親水性ポリマー粒子及び親水性ポリマー粒子の製造方法の非制限的例は、米国特許出願公開第20130210991号明細書（その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）に記載されている。

【0486】

別の実施形態では、本発明の脂質ナノ粒子は、疎水性ポリマー粒子であってもよい。脂質ナノ粒子製剤は、急速に排除される脂質ナノ粒子（reLNPs）として知られる生分解性カチオン性脂質で、カチオン性脂質を置換することにより改善することができる。

50

限定はしないが、DLin-DMA、DLin-KC2-DMA、DLin-MC3-DMAなどのイオン化カチオン性脂質は、時間の経過とともに血漿及び組織中に蓄積することがわかっており、潜在的な毒性源となり得る。急速に排除される脂質の急速な代謝は、ラットにおいて、脂質ナノ粒子の耐容性及び治療指数を1mg/kg用量から10mg/kg用量へと一桁分改善することができる。酵素により分解されるエステル結合の含有によって、reLNP製剤の活性を依然として維持しながら、カチオン性成分の分解及び代謝プロフィールを改善することができる。エステル結合は、脂質鎖の内部に配置してもよいし、又は脂質鎖の末端に配置してもよい。内部エステル結合で、脂質鎖内の任意の炭素を置換してもよい。

【0487】

一実施形態では、内部エステル結合は、同時係属国際公開第2015034928号パンフレット（その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）のパラグラフ[000426]に記載されるreLNPなどの飽和炭素のいずれの側に位置してもよい。

【0488】

一実施形態では、ナノ種、ポリマー及び免疫原を含み得る脂質ナノ粒子を送達することによって、免疫応答を誘発することができる。（米国特許出願公開第20120189700号明細書及び国際公開第2012099805号パンフレット；これらの各々の内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）。ポリマーでナノ種を封入してもよいし、又はナノ種を部分的に封入してもよい。免疫原は、本明細書に記載する組換えタンパク質、mRNA及び/又はキメラポリヌクレオチドであってもよい。一実施形態では、脂質ナノ粒子は、ワクチン、例えば、限定はしないが、病原体に対するワクチンなどに使用するために製剤化することもできる。

【0489】

脂質ナノ粒子は、粒子の表面特性を改変するように操作してもよく、これによって、脂質ナノ粒子は、粘膜障壁を透過することができるようにしてもよい。粘液は、限定はしないが、口腔（例えば、頬及び食道膜並びに扁桃腺組織）、眼、胃腸（例えば、胃、小腸、大腸、結腸、直腸）、鼻、呼吸器（例えば、鼻、咽頭、気管及び気管支膜）、生殖器（例えば、膣、子宮頸及び尿道膜）などの粘膜組織に位置している。より高い薬物封入効率及び多種多様な薬物の持続的送達をもたらす能力のために好ましい10~200nm超のナノ粒子は、粘膜障壁を通過して急速に拡散するには大きすぎると考えられている。粘液は、連続的に分泌、放出、廃棄又は消化及び再利用されているため、捕捉された粒子のほとんどが数十秒以内若しくは数時間以内に粘膜組織から除去され得る。低分子量ポリエチレングリコール（PEG）で密にコーティングされた大きなポリマーナノ粒子（直径200nm~500nm）は、水中に拡散する同じ粒子よりわずかに4~6倍低速で粘膜を介して拡散した（ライ（Lai）ら著、PNAS、2007年、第104巻（5）、p.1482~487；ライ（Lai）ら著、アドバンスド・ドラッグ・デリバリー・レビュー（Adv Drug Deliv Rev.）、2009年、第61巻（2）、p.158~171；これらの各々の内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）。ナノ粒子の輸送は、透過速度、及び/又は限定はしないが、光退色後蛍光回復（FRAP）法及び高解像度多粒子追跡（MPT）法などの蛍光顕微鏡検査法を用いて、決定することができる。非制限的例として、米国特許第8,241,670号明細書、又は国際公開第2013110028号パンフレット（これらの内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）に記載される通りに、粘膜障壁を透過することができる組成物を製造することができる。

【0490】

粘膜を透過するように操作された脂質ナノ粒子は、ポリマー材料（すなわち、ポリマーコア）及び/又はポリマー-ビタミンコンジュゲート及び/又はトリブロックポリマーを含んでもよい。ポリマー材料として、限定はしないが、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、ポリ尿素、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

10

20

30

40

50

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、及びポリアリレートが挙げられる。ポリマー材料は、生分解性及び/
 又は生体適合性であってもよい。生体適合性ポリマーの非制限的例が、国際公開第201
 3116804号パンフレット(その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む
)に記載されている。さらに、ポリマー材料は照射してもよい。非制限的例として、ポリ
 マー材料に線照射してもよい(例えば、国際公開第201282165号パンフレット
 を参照のこと;全体として参照により本明細書に組み込む)。具体的なポリマーの非制限
 的例として、以下のものが挙げられる: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-コ-グリコール酸)(PLGA)、ポリ
 (L-乳酸-コ-グリコール酸)(PLLGA)、ポリ(D,L-ラクチド)(PDL
 A)、ポリ(L-ラクチド)(PLLA)、ポリ(D,L-ラクチド-コ-カプロラクト
 ン)、ポリ(D,L-ラクチド-コ-カプロラクトン-コ-グリコリド)、ポリ(D,L
 -ラクチド-コ-PEO-コ-D,L-ラクチド)、ポリ(D,L-ラクチド-コ-PP
 O-コ-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-リシン(PLL)、ヒドロキシプロピルメタクリレート(HPMA)、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、ポリエチレン及びポリプロピレンなどのポリアルキレン、ポリ(エチレングリ
 コール)(PEG)などのポリアルキレングリコール、ポリアルキレンオキシド(PEO
)、ポリ(エチレンテレフタレート)などのポリアルキレンテレフタレート、ポリビニル
 アルコール(PVA)、ポリ(酢酸ビニル)などのポリビニルエステル、ポリ(塩化ビニ
 ル)(PVC)などのポリハロゲン化ビニル、ポリビニルピロリドン、ポリシロキサン、
 ポリスチレン(PS)、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(メト)アクリレート)(PMMA)、ポリ(エチル
 (メト)アクリレート)、ポリ(ブチル(メト)アクリレート)、ポリ(イソブチル(メ
 ト)アクリレート)、ポリ(ヘキシル(メト)アクリレート)、ポリ(イソデシル(メ
 ト)アクリレート)、ポリ(ラウリル(メト)アクリレート)、ポリ(フェニル(メト)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)並びにこれらのコポリ
 マー及び混合物、ポリジオキサノン及びそのコポリマー、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、ポリ(オルト)エ
 ステル、ポリ(酪酸)、ポリ(吉草酸)、ポリ(ラクチド-コ-カプロラクトン)、PEG
 -PLGA-PEG及びトリメチレンカルボネート、ポリビニルピロリドン。脂質ナノ粒
 子は、限定はしないが、ブロックコポリマー(国際公開第2013012476号パンフ
 レット(これは、全体として参照により本明細書に組み込む)に記載されている分岐状ポ
 リエーテル-ポリアミドブロックコポリマーなど)、及び(ポリ(エチレングリコール)
)-(ポリ(プロピレンオキシド))-(ポリ(エチレングリコール))トリブロックコ
 ポリマー(例えば、米国特許出願公開第20120121718号明細書及び同第201
 00003337号明細書及び米国特許第8,263,665号明細書を参照のこと;こ
 れらの各々は、全体として参照により本明細書に組み込む)などのコポリマーで被覆す
 るか、又はコポリマーと結合させてもよい。コポリマーは、一般に安全と認められる(G
 R
 A
 S)ポリマーであってよく、脂質ナノ粒子の形成は、新たな化学的実体が生成されない
 ように行ってよい。例えば、脂質ナノ粒子は、新たな化学的実体を形成することなく、P
 L
 G
 Aナノ粒子を被覆するポロキサマーを含んでもよく、こうした粒子は、依然として急
 速にヒト粘膜を透過することができる(ヤン(Yang)ら著、アンゲヴァンテ・ケミー
 国際版(Angew.Chem.Int.Ed.)、2011年、第50巻、p.259
 7~2600;その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む)。ヒト粘膜を透

10

20

30

40

50

過することができるナノ粒子を生成する非制限的なスケラブルな方法が、シュー（Xu）らにより記載されている（例えば、ジャーナル・オブ・コントロールド・リリース（*Journal of Controlled Release*）、2013年、第170巻（2）、p. 279～86を参照のこと；その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）。

【0491】

ポリマー-ビタミンコンジュゲートのビタミンは、ビタミンEであってよい。コンジュゲートのビタミン部分は、限定はしないが、ビタミンA、ビタミンE、他のビタミン、コレステロール、疎水性部分、又は他の界面活性剤の疎水性成分（例えば、ステロール鎖、脂肪酸、炭化水素鎖及びアルキレンオキシド鎖）などの他の好適な成分で置換してもよい。

10

【0492】

粘液を透過するように操作される脂質ナノ粒子は、表面改変剤を含んでもよく、そのようなものとして、限定はしないが、キメラポリヌクレオチド、アニオン性タンパク質（例えば、ウシ血清アルブミン）、界面活性剤（例えば、ジメチルジオクタデシル-臭化アンモニウムなどのカチオン性界面活性剤）、糖若しくは糖誘導体（例えば、シクロデキストリン）、核酸、ポリマー（例えば、ヘパリン、ポリエチレングリコール及びポロキサマー）、粘液溶解剤（例えば、N-アセチルシステイン、モグサ（*mugwort*）、プロメライン、パpain、クレロデンドロン（*clerodendrum*）、アセチルシステイン、プロムヘキシン、カルボシステイン、エブラジノン、メスナ、アムプロキソール、ソブレロール、ドミオドル、レトステイン、ステプロニン、チオプロニン、ゲルゾリン、チモシン 4ドルナーゼ、ネルテネキシン、エルドステイン）並びに *rhDNase* を含む種々の *DNase* がある。表面改変剤は、粒子の表面に埋め込むか、若しくはメッシュに絡ませてよいし、又は脂質ナノ粒子の表面上に付着させてもよい（例えば、コーティング、吸着、共有結合、若しくは他のプロセスにより）。（例えば、米国特許出願公開第20100215580号明細書、同第20080166414号明細書及び米国特許出願公開第20130164343号明細書を参照のこと；これらの各々は、全体として参照により本明細書に組み込む）。

20

【0493】

粘膜透過性脂質ナノ粒子は、本明細書に記載する少なくとも1つのキメラポリヌクレオチドを含んでもよい。キメラポリヌクレオチドは、脂質ナノ粒子に封入してもよいし、及び/又は粒子の表面に付着させてもよい。脂質ナノ粒子の表面にキメラポリヌクレオチドを共有結合させてもよい。粘膜透過性脂質ナノ粒子の製剤は、複数種のナノ粒子を含んでもよい。さらに、製剤は、粘液と相互作用して、周囲の粘液の構造的及び/又は付着特性を改変することにより粘液付着を低減する粒子を含有してもよく、これにより、粘膜組織に対する粘液透過性脂質ナノ粒子の送達が増大し得る。

30

【0494】

別の実施形態では、粘膜透過性脂質ナノ粒子は、粘膜透過促進コーティングを含む、低張性製剤であってよい。製剤は、それが送達される上皮に対して低張性であってよい。低張性製剤の非制限的例は、国際公開第2013110028号パンフレット（その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）に見出すことができる。

40

【0495】

一実施形態では、粘膜障壁を通過する送達を促進するために、製剤は、低張性溶液を含むか、又は低張性溶液であってよい。低張性溶液は、粘液不活性粒子、例えば、限定はしないが、粘膜透過性粒子などが、腔上皮表面に到達することができる速度を高めることが判明している（例えば、エンサイン（*Ensign*）ら著、バイオマテリアルズ（*Biomaterials*）、2013年、第34巻（28）、p. 6922～9を参照のこと；その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）。

【0496】

一実施形態では、キメラポリヌクレオチドは、限定なしに、サイレンス・セラピューティクス（*Silence Therapeutics*）（英国、ロンドン）のアトアップレ

50

ックス (ATUPLEX) (商標) システム、DACC システム、DBTC システム及び他の siRNA - リポプレックス技術、ステムジェント (STEMGENT) (登録商標) (マサチューセッツ州ケンブリッジ) のステムフェクト (STEMFECT) (商標)、並びにポリエチレンイミン (PEI) 又はプロタミンベースの標的及び非標的核酸送達などの、リポプレックスとして製剤化してもよい (アレク (Aleku) ら著、癌研究 (Cancer Res)、2008年、第68巻、p. 9788~9798; ストランバーク (Strumberg) ら著、臨床薬理学及び治療薬国際ジャーナル (Int J Clin Pharmacol Ther)、2012年、第50巻、p. 76~78; サンテル (Santel) ら著、遺伝子療法 (Gene Ther)、2006年、第13巻、p. 1222~1234; サンテル (Santel) ら著、遺伝子療法 (Gene Ther)、2006年、第13巻、p. 1360~1370; ゲートピア (Gutbier) ら著、肺薬理学及び治療薬 (Pulm Pharmacol Ther)、2010年、第23巻、p. 334~344; カウフマン (Kaufmann) ら著、微小管研究 (Microvasc Res)、2010年、第80巻、p. 286~293; ワイデ (Weide) ら著、免疫療法学会誌 (J Immunother)、2009年、第32巻、p. 498~507; ワイデ (Weide) ら著、免疫療法学会誌 (J Immunother)、2008年、第31巻、p. 180~188; パスコロ (Pascolo) 著、エキスパート・オピニオン・オン・バイオロジカル・セラピー (Expert Opin Biol Ther)、第4巻、p. 1285~1294; フォティン・ムレチェク (Fotin-Mleczek) ら著、2011年、免疫療法学会誌 (J Immunother)、第34巻、p. 1~15; ソン (Song) ら著、ネイチャー・バイオテクノロジー (Nature Biotechnol)、2005年、第23巻、p. 709~717; ピア (Peer) ら著、米国科学アカデミー紀要 (Proc Natl Acad Sci USA)、2007年6月、第104巻、p. 4095~4100; ドフジュロール (deFougerolles) 著、ヒト遺伝子療法 (Hum Gene Ther)、2008年、第19巻、p. 125~132; これらは全て、全体として参照により本明細書に組み込む)。

【0497】

一実施形態では、こうした製剤はまた、限定はしないが、肝細胞、免疫細胞、腫瘍細胞、内皮細胞、抗原提示細胞、及び白血球など、種々の細胞型に *in vivo* で受動的又は能動的に向かわせるように構築するか、又は組成物を改変させてもよい (アキンク (Akinck) ら著、分子療法 (Mol Ther)、2010年、第18巻、p. 1357~1364; ソン (Song) ら著、ネイチャー・バイオテクノロジー (Nat Biotechnol)、2005年、第23巻、p. 709~717; ジャッジ (Judge) ら著、ジャーナル・オブ・クリニカル・インベスティゲーション (J Clin Invest)、2009年、第119巻、p. 661~673; カウフマン (Kaufmann) ら著、微小管研究 (Microvasc Res)、2010年、第80巻、p. 286~293; サンテル (Santel) ら著、遺伝子療法 (Gene Ther)、2006年、第13巻、p. 1222~1234; サンテル (Santel) ら著、遺伝子療法 (Gene Ther)、2006年、第13巻、p. 1360~1370; ゲートピア (Gutbier) ら著、肺薬理学及び治療薬 (Pulm Pharmacol Ther)、2010年、第23巻、p. 334~344; バシャ (Basha) ら著、分子療法 (Mol Ther)、2011年、第19巻、p. 2186~2200; フェンスケ (Fenske) 及びカリス (Cullis) 著、エキスパート・オピニオン・ドラッグ・デリバリー (Expert Opin Drug Deliv)、2008年、第5巻、p. 25~44; ピア (Peer) ら著、サイエンス (Science)、2008年、第319巻、p. 627~630; ピア (Peer) 及びリーバーマン (Lieberman) 著、遺伝子療法 (Gene Ther)、2011年、第18巻、p. 1127~1133; これらは全て、全体として参照により本明細書に組み込む)。肝細胞に対する製剤の受動的ターゲティングの一例として、DLin-D

10

20

30

40

50

MA、DLin-KC2-DMA及びDLin-MC3-DMAベースの脂質ナノ粒子製剤が挙げられ、これらは、アポリポタンパク質Eに結合し、これらの製剤の*in vivo*での肝細胞への結合及び取込みを促進することが明らかにされている(アキンク(Akinc)ら著、分子療法(Mol Ther.)、2010年、第18巻、p.1357~1364;これは、全体として参照により本明細書に組み込む)。製剤はまた、限定はしないが、葉酸塩、トランスフェリン、N-アセチルガラクトサミン(GalNAc)、及び抗体標的化手法により例示されるように、その表面上での種々のリガンドの発現を介して選択的にターゲティングさせることもできる(コールハトカー(Kolhatkar)ら著、カレント・ドラッグ・ディスカバリー・テクノロジー(Curr Drug Discov Technol.)、2011年、第8巻、p.197~206;ムサッチオ(Musacchio)及びトーチリン(Torchilin)著、フロンティア・イン・バイオサイエンス(Front Biosci.)、2011年、第16巻、p.1388~1412;ユー(Yu)ら著、分子膜生物学(Mol Membr Biol.)、2010年、第27巻、p.286~298;パティル(Patil)ら著、クリティカル・レビュー・イン・セラピューティック・ドラッグ・キャリア・システム(Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.)、2008年、第25巻、p.1~61;ブノワ(Benoit)ら著、生体高分子(Biomacromolecules)、2011年、第12巻、p.2708~2714;チャオ(Zhao)ら著、エキスパート・オピニオン・オン・ドラッグ・デリバリー(Expert Opin Drug Deliv.)、2008年、第5巻、p.309~319;アキンク(Akinc)ら著、分子療法(Mol Ther.)、2010年、第18巻、p.1357~1364;スリニバサン(Srinivasan)ら著、分子生物学による方法(Methods Mol Biol.)、2012年、第820巻、p.105~116;ベン-アリー(Ben-Arie)ら著、分子生物学による方法(Methods Mol Biol.)、2012年、第757巻、p.497~507;ピア(Peer)著、2010年、ジャーナル・オブ・コントロールド・リリース(J Control Release)、第20巻、p.63~68;ピア(Peer)ら著、米国科学アカデミー紀要(Proc Natl Acad Sci USA)、2007年、第104巻、p.4095~4100;キム(Kim)ら著、分子生物学による方法(Methods Mol Biol.)、2011年、第721巻、p.339~353;スブラマニヤ(Subramanya)ら著、分子療法(Mol Ther.)、2010年、第18巻、p.2028~2037;ソン(Song)ら著、ネイチャー・バイオテクノロジー(Nat Biotechnol.)、2005年、第23巻、p.709~717;ピア(Peer)ら著、サイエンス(Science)、2008年、第319巻、p.627~630;ピア(Peer)及びリーバーマン(Lieberman)著、遺伝子療法(Gene Ther.)、2011年、第18巻、p.1127~1133;これらは全て、全体として参照により本明細書に組み込む)。

【0498】

一実施形態では、キメラポリヌクレオチドは、固体脂質ナノ粒子として製剤化する。固体脂質ナノ粒子(SLN)は、平均直径が10~1000nmの球形であってもよい。SLNは、親油性分子を可溶化することのできる固体脂質コアマトリックスを有し、界面活性剤及び/又は乳化剤と共に安定化し得る。別の実施形態において、脂質ナノ粒子は、自己集合脂質-ポリマーナノ粒子であってもよい(チャン(Zhang)ら著、ACSナノ(ACS Nano)、2008年、第2巻(8)、p.1696~1702を参照のこと;その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む)。非制限的例として、SLNは、国際公開第2013105101号パンフレット(その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む)に記載されているSLNであってもよい。別の非制限的例として、SLNは、国際公開第2013105101号パンフレット(その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む)に記載されている方法により製造することができる。

【0499】

10

20

30

40

50

リポソーム、リポブックス、又は脂質ナノ粒子を使用すると、これらの製剤は、キメラポリヌクレオチドによる細胞トランスフェクションを増大することができ；且つ／又はコードされたタンパク質の翻訳を増大することができるため、キメラポリヌクレオチドに誘導されるタンパク質産生の効力を向上させ得る。1つのこうした例は、ポリブックスプラスミドDNAの有効な全身送達を可能にする脂質封入の使用を伴う（ヘイズ（Heyes）ら著、分子療法（Mol Ther.）、2007年、第15巻、p.713~720；これは、全体として参照により本明細書に組み込む）。また、リポソーム、リポブックス、又は脂質ナノ粒子を使用することにより、キメラポリヌクレオチドの安定性を高めることもできる。

【0500】

一実施形態では、本発明のキメラポリヌクレオチドは、制御放出及び／又は標的送達のために製剤化することができる。本明細書で用いられるとき、「制御放出」は、治療成果を実施する特定の放出パターンに適合する医薬組成物又は化合物放出プロフィールを指す。一実施形態では、制御放出及び／又は標的送達のために本明細書に記載の及び／又は当技術分野で公知の送達剤に、キメラポリヌクレオチドを封入することができる。本明細書で用いられるとき、「封入する」という用語は、包み込む、取り囲む、又は包むことを意味する。本発明の化合物の製剤に関する場合、封入は、実質的、完全又は部分的のいずれであってもよい。用語「実質的に封入された」は、本発明の医薬組成物又は化合物の少なくとも50、60、70、80、85、90、95、96、97、98、99、99.9、99.9超若しくは99.999%超が、送達剤内に包み込まれる、取り囲まれる、又は包まれることを意味する。「部分的封入」とは、本発明の医薬組成物又は化合物の10、10、20、30、40、50以下が送達剤内に包み込まれる、取り囲まれる、又は包まれることを意味する。有利には、封入は、蛍光及び／又は電子顕微鏡写真を用いて、本発明の医薬組成物又は化合物のエスケープ又は活性を測定することによって、決定することができる。例えば、本発明の医薬組成物又は化合物の少なくとも1、5、10、20、30、40、50、60、70、80、85、90、95、96、97、98、99、99.9、99.9若しくは99.99%超が、送達剤内に封入される。

【0501】

一実施形態では、制御放出製剤は、限定はしないが、トリブロックコポリマーを含んでもよい。非制限的例として、製剤は、2つの異なる種類のトリブロックコポリマーを含み得る（国際公開第2012131104号パンフレット及び同第2012131106号パンフレット；これらの各々は、全体として参照により本明細書に組み込む）。

【0502】

別の実施形態では、キメラポリヌクレオチドは、脂質ナノ粒子又は急速排除脂質ナノ粒子に封入した後、本明細書に記載の及び／若しくは当技術分野で公知のポリマー、ハイドロゲル並びに／又は外科密閉剤に、この脂質ナノ粒子又は急速排除脂質ナノ粒子を封入してもよい。非制限的例として、ポリマー、ハイドロゲル及び／又は外科密閉剤は、以下に挙げるものであってよい：PLGA、エチレン酢酸ビニル（EVAc）、ポロキサマー、ゲルサイト（GELSITE）（登録商標）（ナノセラピューティクス社（Nanotherapeutics, Inc.）、フロリダ州アラチュア）、ヒレネクス（HYLENEX）（登録商標）（ハロザイム・セラピューティクス（Halozyme Therapeutics）、カリフォルニア州サンディエゴ）、外科密閉剤、例えば、フィブリノーゲンポリマー（エチコン社（Ethicon Inc.）、ジョージア州コーネリア）、ティッセル（TISSELL）（登録商標）（バクスター・インターナショナル社（Baxter International, Inc.）、イリノイ州ディアフィールド）、PEGベースの密閉剤、並びにコシール（COSEAL）（登録商標）（バクスター・インターナショナル社（Baxter International, Inc.）、イリノイ州ディアフィールド）。

【0503】

別の実施形態では、脂質ナノ粒子は、対象に注入すると、ゲルを形成し得る当技術分野

10

20

30

40

50

で公知の任意のポリマーに封入してもよい。別の非制限的例として、脂質ナノ粒子は、生分解性であり得るポリマーマトリックスに封入してもよい。

【0504】

一実施形態では、制御放出及び/又は標的送達のためのキメラポリヌクレオチド製剤はまた、少なくとも1つの制御放出コーティングを含んでもよい。制御放出コーティングとして、限定はしないが、オパドライ(OPADRY)(登録商標)、ポリビニルピロリドン/酢酸ビニルコポリマー、ポリビニルピロリドン、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ユードラギット RL(EUDRAGIT RL)(登録商標)、ユードラギット RS(EUDRAGIT RS)(登録商標)並びにエチルセルロース水性分散液(アクアコート(AQUACOAT)(登録商標)及びシュアリース(SURELEASE)(登録商標))などのセルロース誘導体が挙げられる。

10

【0505】

一実施形態では、制御放出及び/又は標的送達製剤は、ポリカチオン性側鎖を含有し得る少なくとも1種の生分解性ポリエステルを含んでもよい。生分解性ポリエステルとして、限定はしないが、ポリ(セリンエステル)、ポリ(L-ラクチド-コ-L-リシン)、ポリ(4-ヒドロキシ-L-プロリンエステル)、及びこれらの組み合わせが挙げられる。別の実施形態では、生分解性ポリエステルは、ペグ化ポリマーを形成するPEG共役を含んでもよい。

20

【0506】

一実施形態では、少なくとも1つのキメラポリヌクレオチドを含む制御放出及び/又は標的送達製剤は、米国特許第8,404,222号明細書(これは、全体として参照により本明細書に組み込む)に記載のように、少なくとも1種のPEG及び/又はPEG関連ポリマー誘導体を含んでもよい。

【0507】

別の実施形態では、少なくとも1つのキメラポリヌクレオチドを含む制御放出送達製剤は、米国特許出願公開第20130130348号明細書(これは、全体として参照により本明細書に組み込む)に記載の制御放出ポリマー系であってもよい。

【0508】

一実施形態では、本発明のキメラポリヌクレオチドは、治療用ナノ粒子に封入してもよい。治療用ナノ粒子は、本明細書に記載の、並びに限定はしないが、以下：国際公開第2010005740号パンフレット、同第2010030763号パンフレット、同第2010005721号パンフレット、同第2010005723号パンフレット、同第2012054923号パンフレット、米国特許出願公開第20110262491号明細書、同第20100104645号明細書、同第20100087337号明細書、同第20100068285号明細書、同第20110274759号明細書、同第20100068286号明細書、同第20120288541号明細書、同第20130123351号明細書及び同第20130230567号明細書、並びに米国特許第8,206,747号明細書、同第8,293,276号明細書、同第8,318,208号明細書及び同第8,318,211号明細書(これらの各々の内容は、全体として参照により本明細書に組み込む)など、当技術分野で公知の方法によって製剤化することができる。別の実施形態では、治療用ポリマーナノ粒子は、米国特許出願公開第20120140790号明細書(これは、全体として参照により本明細書に組み込む)に記載の方法によって同定することができる。

30

40

【0509】

一実施形態では、治療用ナノ粒子は、持続放出のために製剤化することができる。本明細書で用いられるとき、「持続放出」は、特定の期間にわたる放出速度に適合する医薬組成物又は化合物を指す。期間は、限定はしないが、数時間、数日、数週間、数ヵ月及び数年を含み得る。非制限的例として、持続放出ナノ粒子は、ポリマー、及び限定はしないが、本発明のキメラポリヌクレオチドなどの治療薬を含んでもよい(国際公開第20100

50

75072号パンフレット及び米国特許出願公開第20100216804号明細書、同第20110217377号明細書及び同第20120201859号明細書を参照のこと；これらの各々は、全体として参照により本明細書に組み込む）。別の非制限的例では、持続放出製剤は、持続的な生体利用可能性を可能にする物質、例えば、限定はしないが、結晶、高分子ゲル及び/又は粒子状懸濁物を含んでもよい（米国特許出願公開第20130150295号明細書を参照のこと；その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）。

【0510】

一実施形態では、治療用ナノ粒子は、標的特異的となるように製剤化することができる。非制限的例として、治療用ナノ粒子は、コルチコステロイドを含んでもよい（国際公開第2011084518号パンフレットを参照のこと；これは、全体として参照により本明細書に組み込む）。一実施形態では、治療用ナノ粒子は、癌特異的となるように製剤化することができる。非制限的例として、治療用ナノ粒子は、国際公開第2008121949号パンフレット、同第2010005726号パンフレット、同第2010005725号パンフレット、同第2011084521号パンフレット、並びに米国特許出願公開第20100069426号明細書、同第20120004293号明細書及び同第20100104655号明細書（これらの各々は、全体として参照により本明細書に組み込む）に記載されているナノ粒子に製剤化してもよい。

10

【0511】

一実施形態では、治療用ナノ粒子は、ポリマーマトリックスを含んでもよい。非制限的例として、ナノ粒子は、限定はしないが、以下：ポリエチレン、ポリカーボネート、ポリ無水物、ポリヒドロキシ酸、ポリプロピルフェレート（polypropylfumerate）、ポリカプロラクトン、ポリアミド、ポリアセタール、ポリエーテル、ポリエステル、ポリ（オルトエステル）、ポリシアノアクリレート、ポリビニルアルコール、ポリウレタン、ポリホスファゼン、ポリアクリレート、ポリメタクリレート、ポリシアノアクリレート、ポリ尿素、ポリスチレン、ポリアミン、ポリリジン、ポリ（エチレンジミン）、ポリ（セリンエステル）、ポリ（L-ラクチド-コ-L-リシン）、ポリ（4-ヒドロキシ-L-プロリンエステル）又はこれらの組み合わせなどの2種以上のポリマーを含み得る。

20

【0512】

一実施形態では、治療用ナノ粒子は、ジブロックコポリマーを含む。一実施形態では、ジブロックコポリマーは、限定はしないが、以下：ポリエチレン、ポリカーボネート、ポリ無水物、ポリヒドロキシ酸、ポリプロピルフェレート（polypropylfumerate）、ポリカプロラクトン、ポリアミド、ポリアセタール、ポリエーテル、ポリエステル、ポリ（オルトエステル）、ポリシアノアクリレート、ポリビニルアルコール、ポリウレタン、ポリホスファゼン、ポリアクリレート、ポリメタクリレート、ポリシアノアクリレート、ポリ尿素、ポリスチレン、ポリアミン、ポリリジン、ポリ（エチレンジミン）、ポリ（セリンエステル）、ポリ（L-ラクチド-コ-L-リシン）、ポリ（4-ヒドロキシ-L-プロリンエステル）又はこれらの組み合わせなどのポリマーと組み合わせてPEGを含んでもよい。別の実施形態では、ジブロックコポリマーは、欧州特許出願公開第（その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）に記載されているジブロックコポリマーを含んでもよい。また別の実施形態では、ジブロックコポリマーは、国際公開第2013120052号パンフレット（その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）に記載されているものなどのハイX（high X）ジブロックコポリマーであってもよい。

30

40

【0513】

非制限的例として、治療用ナノ粒子は、PLGA-PEGブロックコポリマー（米国特許出願公開第20120004293号明細書及び米国特許第8,236,330号明細書を参照のこと；これらの各々は、全体として参照により本明細書に組み込む）を含む。別の非制限的例では、治療用ナノ粒子は、PEG及びPLA又はPEG及びPLGAのジ

50

ブロックコポリマーを含むステルスナノ粒子である（米国特許第 8, 246, 968 号明細書及び国際公開第 2012166923 号パンフレットを参照のこと；これらの各々の内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）。また別の非制限的例では、治療用ナノ粒子は、米国特許出願公開第 20130172406 号明細書（その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）に記載されているステルスナノ粒子又は標的特異的ステルスナノ粒子である。

【0514】

一実施形態では、治療用ナノ粒子は、マルチブロックコポリマーを含んでもよい（例えば、米国特許第 8, 263, 665 号明細書及び同第 8, 287, 910 号明細書並びに米国特許出願公開第 20130195987 号明細書を参照のこと；これらの各々の内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）。

10

【0515】

また別の非制限的例では、脂質ナノ粒子は、ブロックコポリマー PEG-PLGA-PEG を含む（例えば、以下を参照：感熱性ハイドロゲル（PEG-PLGA-PEG）は、リー（Lee）ら著、「Tgf-1 遺伝子送達ビヒクルとしての感熱性ハイドロゲルは、糖尿病性損傷治癒を促進する（Thermosensitive Hydrogel as a Tgf-1 Gene Delivery Vehicle Enhances Diabetic Wound Healing）」、薬剤学研究（Pharmaceutical Research）、2003 年、第 20 巻（12）、p. 1995~2000 では、TFG-1 遺伝子送達ビヒクルとして；リー（Li）ら著、「感熱性生分解性ハイドロゲルを基材とする制御遺伝子送達系（Controlled Gene Delivery System Based on Thermosensitive Biodegradable Hydrogel）」、薬剤学研究（Pharmaceutical Research）、2003 年、第 20 巻（6）、p. 884~888；及びチャン（Chang）ら著、「ノニオン性両親媒性生分解性 PEG-PLGA-PEG コポリマーは、ラット骨格筋において遺伝子送達効率を高める（Non-ionic amphiphilic biodegradable PEG-PLGA-PEG copolymer enhances gene delivery efficiency in rat skeletal muscle）」、ジャーナル・オブ・コントロールド・リリース（J Controlled Release）、2007 年、第 118 巻、p. 245~253 では、制御遺伝子送達系として、使用された；これらの文献の各々は、全体として参照により本明細書に組み込む）。本発明のキメラポリヌクレオチドは、PEG-PLGA-PEG ブロックコポリマーを含む脂質ナノ粒子に製剤化することができる。

20

30

【0516】

一実施形態では、治療用ナノ粒子は、マルチブロックコポリマーを含んでもよい（例えば、米国特許第 8, 263, 665 号明細書及び同第 8, 287, 910 号明細書並びに米国特許出願公開第 20130195987 号明細書を参照のこと；これらの各々の内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）。

【0517】

一実施形態では、本明細書に記載するブロックコポリマーは、非ポリマーミセル及びブロックコポリマーを含むポリオン複合体に含有させてもよい。（例えば、米国特許出願公開第 20120076836 号明細書を参照のこと；これは、全体として参照により本明細書に組み込む）。

40

【0518】

一実施形態では、治療用ナノ粒子は、少なくとも 1 種のアクリル酸ポリマーを含んでもよい。アクリル酸ポリマーとして、限定はしないが、アクリル酸、メタクリル酸、アクリル酸及びメタクリル酸コポリマー、メチルメタクリル酸コポリマー、エトキシエチルメタクリレート、シアノエチルメタクリレート、アミノアルキルメタクリレートコポリマー、ポリ（アクリル酸）、ポリ（メタクリル酸）、ポリシアノアクリレート並びにこれらの組

50

み合わせが挙げられる。

【0519】

一実施形態では、治療用ナノ粒子は、少なくとも1種のポリ(ビニルエステル)ポリマーを含んでもよい。ポリ(ビニルエステル)ポリマーは、ランダムコポリマーなどのコポリマーであってもよい。非制限的例として、ランダムコポリマーは、国際公開第2013032829号パンフレット又は米国特許出願公開第20130121954号明細書(これらの内容は、全体として参照により本明細書に組み込む)に記載されているものなどの構造を有し得る。一態様では、ポリ(ビニルエステル)ポリマーは、本明細書に記載のキメラポリヌクレオチドに共役させてもよい。別の態様では、本発明で使用するすることができるポリ(ビニルエステル)ポリマーは、(全体として参照により本明細書に組み込む)に記載のものであってもよい。

10

【0520】

一実施形態では、治療用ナノ粒子は、少なくとも1種のジブロックコポリマーを含んでもよい。ジブロックコポリマーは、限定はしないが、ポリ(乳酸)-ポリ(エチレン)グリコールコポリマーであってよい(例えば、国際公開第2013044219号パンフレットを参照のこと;これは、全体として参照により本明細書に組み込む)。非制限的例として、治療用ナノ粒子は、癌を治療するために使用することができる(国際公開第2013044219号パンフレットを参照のこと;これは、全体として参照により本明細書に組み込む)。

20

【0521】

一実施形態では、治療用ナノ粒子は、本明細書に記載の、及び/又は当技術分野で公知の少なくとも1種のカチオン性ポリマーを含んでもよい。

一実施形態では、治療用ナノ粒子は、少なくとも1種のアミン含有ポリマー、例えば、限定はしないが、ポリリジン、ポリエチレンジイミン、ポリ(アミドアミン)デンドリマー、ポリ(-アミノエステル)(例えば、米国特許第8,287,849号明細書を参照;これは、全体として参照により本明細書に組み込む)及びこれらの組み合わせを含んでもよい。

【0522】

別の実施形態では、本明細書に記載のナノ粒子は、国際公開第2013059496号パンフレット(その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む)に記載されているものなどのアミンカチオン性脂質を含んでもよい。一態様では、カチオン性脂質は、アミノ-アミン又はアミノ-アミド部分を有し得る。

30

【0523】

一実施形態では、治療用ナノ粒子は、ポリカチオン性側鎖を含有し得る少なくとも1種の分解性ポリエステルを含んでもよい。分解性ポリエステルとして、限定はしないが、ポリ(セリンエステル)、ポリ(L-ラクチド-コ-L-リシン)、ポリ(4-ヒドロキシ-L-プロリンエステル)、及びこれらの組み合わせが挙げられる。別の実施形態では、分解性ポリエステルは、ベグ化ポリマーを形成するPEG共役を含んでもよい。

【0524】

別の実施形態では、治療用ナノ粒子は、少なくとも1つのターゲティングリガンドの共役を含んでもよい。ターゲティングリガンドは、限定はしないが、モノクローナル抗体などの当技術分野で公知の任意のリガンドであってよい。(キルポチン(Kirpochin)ら著、癌研究(Cancer Res.), 2006年、第66巻、p.6732~6740;これは、全体として参照により本明細書に組み込む)。

40

【0525】

一実施形態では、治療用ナノ粒子は、癌をターゲティングするのに用いることができる水溶液中に製剤化することができる(国際公開第2011084513号パンフレット及び米国特許出願公開第20110294717号明細書を参照;これらの各々は、全体として参照により本明細書に組み込む)。

【0526】

50

一実施形態では、少なくとも1つのキメラポリヌクレオチドを含む治療用ナノ粒子は、ポドビンスキー (Podobinski) らにより、米国特許第 8,404,799 号明細書 (その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む) に記載されている方法を用いて製剤化することができる。

【0527】

一実施形態では、キメラポリヌクレオチドは、合成ナノキャリアに封入する、これと連結させる、及び/又は結合させることができる。合成ナノキャリアとして、限定はしないが、同時係属国際公開第 2015034928 号パンフレットのパラグラフ [000468] ~ [000477] に記載のものがあり、その内容は、全体として参照により本明細書に組み込むものとする。

【0528】

一実施形態では、キメラポリヌクレオチドは、双性イオン性脂質に封入する、これと連結させる、及び/又は結合させることができる。双性イオン性脂質及び双性イオン性脂質の使用法の非制限的例は、米国特許出願公開第 20130216607 号明細書 (その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む) に記載されている。一態様では、双性イオン性脂質は、本明細書に記載のリポソーム及び脂質ナノ粒子に使用することができる。

【0529】

一実施形態では、キメラポリヌクレオチドは、米国特許出願公開第 20130197100 号明細書 (その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む) に記載される通り、コロイドナノキャリアに製剤化することができる。

【0530】

一実施形態では、ナノ粒子は、経口投与のために最適化することができる。ナノ粒子は、限定はしないが、キトサン又はその誘導体などの少なくとも1種のカチオン性バイオリマーを含んでもよい。非制限的例として、ナノ粒子は、米国特許出願公開第 20120282343 号明細書 (これは、全体として参照により本明細書に組み込む) に記載されている方法によって製剤化することができる。

【0531】

一部の実施形態では、LNP は、脂質 KL52 (参照によりその全体が明示的に本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第 2012/0295832 号明細書に開示されているアミノ-脂質) を含む。LNP 投与の活性及び/又は安全性 (1つ又は複数の ALT / AST、白血球数並びにサイトカイン誘導を検査することにより測定される) は、こうした脂質の組み込みによって改善され得る。KL52 を含む LNP は、静脈内及び/又は1つ又は複数の用量で投与することができる。一部の実施形態では、KL52 を含む LNP の投与によって、MC3 を含む LNP と比較して、同等若しくは改善された mRNA 及び/又はタンパク質発現が達成される。

【0532】

一部の実施形態では、より小さい LNP を用いて、キメラポリヌクレオチドを送達することができる。こうした粒子は、直径が 0.1 µm 未満から 100 nm 以下、例えば、限定はしないが、0.1 µm 未満、1.0 µm 未満、5 µm 未満、10 µm 未満、15 µm 未満、20 µm 未満、25 µm 未満、30 µm 未満、35 µm 未満、40 µm 未満、50 µm 未満、55 µm 未満、60 µm 未満、65 µm 未満、70 µm 未満、75 µm 未満、80 µm 未満、85 µm 未満、90 µm 未満、95 µm 未満、100 µm 未満、125 µm 未満、150 µm 未満、175 µm 未満、200 µm 未満、225 µm 未満、250 µm 未満、275 µm 未満、300 µm 未満、325 µm 未満、350 µm 未満、375 µm 未満、400 µm 未満、425 µm 未満、450 µm 未満、475 µm 未満、500 µm 未満、525 µm 未満、550 µm 未満、575 µm 未満、600 µm 未満、625 µm 未満、650 µm 未満、675 µm 未満、700 µm 未満、725 µm 未満、750 µm 未満、775 µm 未満、800 µm 未満、825 µm 未満、850 µm 未満、875 µm 未満、900 µm 未満、925 µm 未満、950 µm 未満、975 µm 未満であってよ

10

20

30

40

50

い。

【0533】

別の実施形態では、約1nm～約100nm、約1nm～約10nm、約1nm～約20nm、約1nm～約30nm、約1nm～約40nm、約1nm～約50nm、約1nm～約60nm、約1nm～約70nm、約1nm～約80nm、約1nm～約90nm、約5nm～約100nm、約5nm～約10nm、約5nm～約20nm、約5nm～約30nm、約5nm～約40nm、約5nm～約50nm、約5nm～約60nm、約5nm～約70nm、約5nm～約80nm、約5nm～約90nm、約10nm～約50nm、約20nm～約50nm、約30nm～約50nm、約40nm～約50nm、約20nm～約60nm、約30nm～約60nm、約40nm～約60nm、約20nm～約70nm、約30nm～約70nm、約40nm～約70nm、約50nm～約70nm、約60nm～約70nm、約20nm～約80nm、約30nm～約80nm、約40nm～約80nm、約50nm～約80nm、約60nm～約80nm、約20nm～約90nm、約30nm～約90nm、約40nm～約90nm、約50nm～約90nm、約60nm～約90nm及び/又は約70nm～約90nmの直径を含み得る、より小さいLNPを用いて、キメラポリヌクレオチドを送達することができる。

10

【0534】

一部の実施形態では、こうしたLNPは、マイクロ流体力学ミキサーを含む方法を用いて合成する。例示的マイクロ流体力学スミキサーとして、限定はしないが、以下のものが挙げられる：限定なしに、マイクロイノバ(Microinova)(アラーハイリゲン・バイ・ヴィルドン(Allerheiligen bei Wildon)、オーストリア)などのスリット型インターデジタルマイクロミキサー、及び/又はスタガー・ヘリンボーン(staggered herringbone)マイクロミキサー(SHM)(チガルツェフ, I. V. (Zhigaltsev, I. V.)ら著、ミリ秒のマイクロ流体混合を用いた、水性及びトリグリセリドコアを備える制限サイズ脂質ナノ粒子のボトムアップ設計及び合成が公開されている(ラングミュア(Langmuir)著、2012年、第28巻、p. 3633～40; ベリポー, N. M. (Belliveau, N. M.)ら著、「siRNAのin vivo送達のための極めて強力な制限サイズ脂質ナノ粒子のマイクロ流体合成(Microfluidic synthesis of highly potent limit-size lipid nanoparticles for in vivo delivery of siRNA)」、分子療法-核酸(Molecular Therapy - Nucleic Acids)、2012年、第1巻、e37; チェン, D. (Chen, D.)ら著、「制御マイクロ流体製剤により達成される強力なsiRNA含有脂質ナノ粒子の迅速な発見(Rapid discovery of potent siRNA-containing lipid nanoparticles enabled by controlled microfluidic formulation)」、米国化学会誌、(J Am Chem Soc.)、2012年、第134巻(16)、p. 6948～51; これらの各々は、全体として参照により本明細書に組み込む)。一部の実施形態では、SHMを含むLNP作製方法は、少なくとも2つの入力ストリームの混合をさらに含み、その場合、混合は、マイクロ構造誘導のカオス的移流(MICA)によって起こる。本方法によれば、流体ストリームは、ヘリンボーンパターンに存在する流路を通して流れ、これが旋回流を引き起こして、互いの周囲に流体を折り重ねる。この方法はまた、流体混合のための表面も含み得るが、その場合、上記の表面は、流体の循環中に方向を変更する。SHMを用いてLNPを作製する方法としては、米国特許出願公開第2004/0262223号明細書及び同第2012/0276209号明細書(これらの各々は、全体として参照により本明細書に組み込む)に開示されているものがある。

20

30

40

【0535】

一実施形態では、本発明のキメラポリヌクレオチドは、限定はしないが、インスティテュート・フュア・マイクロテクニク・マインツ社(Institut fuer Mik

50

rotechnik Mainz GmbH)、ドイツ、マインツ)製のスリット・インターデジタル・マイクロストラクチャード・ミキサー(Slit Interdigital Microstructured Mixer)(SIMM-V2)又はスタンダード・スリット・インターデジタル・マイクロミキサー(Standard Slit Interdigital Micro Mixer)(SSIMM)又はキャタピラー(Caterpillar)(CPMM)若しくはインピンギング・ジェット(Impinging-jet)(IJMM)などのマイクロミキサーを用いて、作製される脂質ナノ粒子に製剤化することができる。

【0536】

一実施形態では、本発明のキメラポリヌクレオチドは、マイクロ流体技術を用いて、作製された脂質ナノ粒子に製剤化することができる(ホワイトサイズ, ジョージ M. (Whitesides, George M.) 著、「マイクロフルイディックスの起源及び未来(The Origins and the Future of Microfluidics)」、ネイチャー(Nature)、2006年、第442巻、p.368~373;及びアブラハム(Abraham)ら著、「マイクロ流路のためのカオスマキサー(Chaotic Mixer for Microchannels)」、サイエンス(Science)、2002年、第295巻、p.647~651を参照のこと;これらの各々は、全体として参照により本明細書に組み込む)。非制限的例として、制御マイクロ流体製剤化は、低いレイノルズ数(Reynolds number)で、マイクロ流路中の定常圧力駆動流のストリームを混合するための受動的方法を含む(例えば、アブラハム(Abraham)ら著、「マイクロ流路のためのカオスマキサー(Chaotic Mixer for Microchannels)」、サイエンス(Science)、2002年、第295巻、p.647~651を参照のこと;これは、全体として参照により本明細書に組み込む)。

【0537】

一実施形態では、本発明のキメラポリヌクレオチドは、限定はしないが、ハーバード・アパラタス(Harvard Apparatus)(マサチューセッツ州ホリントン)又はドロマイト・マイクロフルイディックス(Dolomite Microfluidics)(英国、ロイストン)製のものなどのマイクロミキサーチップを用いて作製された脂質ナノ粒子に製剤化することができる。マイクロミキサーチップは、分割及び再結合機構による2つ以上の流体ストリームの高速混合のために使用することができる。

【0538】

一実施形態では、本発明のキメラポリヌクレオチドは、国際公開第2013063468号パンフレット又は米国特許第8,440,614号明細書(これらの各々は、全体として参照により本明細書に組み込む)に記載されている薬剤封入マイクロスフィアを用いて、送達のために製剤化することができる。マイクロスフィアは、国際公開第2013063468号パンフレット(その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む)に記載されている式(I)、(II)、(III)、(IV)、(V)又は(VI)の化合物を含み得る。別の態様では、アミノ酸、ペプチド、ポリペプチド、脂質(APPL)は、本発明のキメラポリヌクレオチドを細胞に送達する上で有用である(国際公開第2013063468号パンフレットを参照のこと;これは、全体として参照により本明細書に組み込む)。

【0539】

一実施形態では、本発明のキメラポリヌクレオチドは、約10~約100nm、例えば、限定はしないが、約10~約20nm、約10~約30nm、約10~約40nm、約10~約50nm、約10~約60nm、約10~約70nm、約10~約80nm、約10~約90nm、約20~約30nm、約20~約40nm、約20~約50nm、約20~約60nm、約20~約70nm、約20~約80nm、約20~約90nm、約20~約100nm、約30~約40nm、約30~約50nm、約30~約60nm、約30~約70nm、約30~約80nm、約30~約90nm、約30~約100nm

、約40～約50nm、約40～約60nm、約40～約70nm、約40～約80nm、約40～約90nm、約40～約100nm、約50～約60nm、約50～約70nm、約50～約80nm、約50～約90nm、約50～約100nm、約60～約70nm、約60～約80nm、約60～約90nm、約60～約100nm、約70～約80nm、約70～約90nm、約70～約100nm、約80～約90nm、約80～約100nm、及び/又は約90～約100nmの直径を有する脂質ナノ粒子に製剤化することができる。

【0540】

一実施形態では、脂質ナノ粒子は、約10～約500nmの直径を有し得る。

一実施形態では、脂質ナノ粒子は、100nm超、150nm超、200nm超、250nm超、300nm超、350nm超、400nm超、450nm超、500nm超、550nm超、600nm超、650nm超、700nm超、750nm超、800nm超、850nm超、900nm超、950nm超又は1000nm超の直径を有し得る。

10

【0541】

一実施形態では、脂質ナノ粒子は、国際公開第2013059922号パンフレット(その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む)に記載されている制限サイズ脂質ナノ粒子であってもよい。制限サイズ脂質ナノ粒子は、水性コア又は疎水性コアを取り囲む脂質二重層を含んでよく;ここで、脂質二重層は、リン脂質、例えば、限定はしないが、ジアシルホスファチジルコリン、ジアシルホスファチジルエタノールアミン、セラミド、スフィンゴミエリン、ジヒドロスフィンゴミエリン、セファリン、セレブロシド、C8～C20脂肪酸ジアシルホスファチジルコリン、及び1-パルミトイル-2-オレオイルホスファチジルコリン(POPC)を含み得る。別の態様では、制限サイズ脂質ナノ粒子は、ポリエチレングリコール-脂質、例えば、限定はしないが、DLPE-PEG、DMPE-PEG、DPPC-PEG及びDSPE-PEGを含んでもよい。

20

【0542】

一実施形態では、キメラポリヌクレオチドは、国際公開第2013063530号パンフレット(その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む)に記載されている送達方法を用いて、特定の位置に送達、局在化及び/又は濃縮することができる。非制限的例として、キメラポリヌクレオチドの送達前、送達と同時に、又は送達後に、中空ポリマー粒子を対象に投与することができる。中空ポリマー粒子は、一旦対象と接触すると、体積の変化を被り、対象の特定の位置に留まる、埋め込まれる、固定化されるか、又は捕捉される。

30

【0543】

一実施形態では、キメラポリヌクレオチドは、活性物質放出系に製剤化することができる(例えば、米国特許出願公開第20130102545号明細書を参照のこと;これは、全体として参照により本明細書に組み込む)。活性物質放出系は、1)触媒活性核酸とハイブリダイズされるオリゴヌクレオチド阻害剤ストランドに結合した少なくとも1つのナノ粒子、及び2)治療活性物質に結合する少なくとも1つの基質分子に結合する化合物(例えば、本明細書に記載のキメラポリヌクレオチド)を含んでもよく、その場合、治療活性物質は、触媒活性核酸による基質分子の切断によって放出される。

40

【0544】

一実施形態では、キメラポリヌクレオチドは、非細胞材料を含む内部コアと、細胞膜を含む外側表面とを含む、ナノ粒子に製剤化することができる。細胞膜は、細胞に由来してもよいし、又はウイルス由来の膜であってもよい。非制限的例として、ナノ粒子は、国際公開第2013052167号パンフレット(これは、全体として参照により本明細書に組み込む)に記載されている方法によって製造することができる。別の非制限的例として、国際公開第2013052167号パンフレット(これは、全体として参照により本明細書に組み込む)に記載のナノ粒子を用いて、本明細書に記載のキメラポリヌクレオチドを送達することもできる。

【0545】

50

一実施形態では、キメラポリヌクレオチドは、多孔質ナノ粒子支持脂質二重層（プロトセル）に製剤化してもよい。プロトセルは、国際公開第2013056132号パンフレットに記載されており、その内容は、全体として参照により本明細書に組み込むものとする。

【0546】

一実施形態では、本明細書に記載するキメラポリヌクレオチドは、米国特許第8,420,123号明細書及び同第8,518,963号明細書並びに欧州特許第2073848B1号明細書（これらの各々は、全体として参照により本明細書に組み込む）に記載されている又はそれに記載されている方法により作製されるポリマーナノ粒子に製剤化することができる。非制限的例として、ポリマーナノ粒子は、米国特許第8,518,963号明細書（その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）に記載のナノ粒子、又は記載の方法によって製造されるナノ粒子のように、高いガラス転移温度を有し得る。別の非制限的例として、経口、非経口及び局所製剤のためのポリマーナノ粒子は、欧州特許第2073848B1号明細書（その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）に記載されている方法によって製造することができる。

10

【0547】

別の実施形態では、本明細書に記載するキメラポリヌクレオチドは、イメージングに用いられるナノ粒子に製剤化することができる。ナノ粒子は、米国特許出願公開第20130129636号明細書（これは、全体として参照により本明細書に組み込む）に記載されているものなどのリポソームナノ粒子であってもよい。非制限的例として、リポソームは、ガドリニウム（III） $2 - \{ 4, 7 - \text{ビス} - \text{カルボキシメチル} - 10 - [(N, N - \text{ジステアリルアミドメチル} - N' - \text{アミド} - \text{メチル}] - 1, 4, 7, 10 - \text{テトラ} - \text{アザシクロドデカ} - 1 - \text{イル} \} - \text{酢酸}$ 及び中性の完全飽和リン脂質成分を含み得る（例えば、米国特許出願公開第20130129636号明細書を参照のこと；その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）。

20

【0548】

一実施形態では、本発明で使用することができるナノ粒子は、米国特許出願公開第20130130348号明細書（これは、全体として参照により本明細書に組み込む）に記載されている方法により形成される。

【0549】

本発明のナノ粒子は、限定はしないが、その欠乏によって、貧血から神経管欠損までの健康障害を引き起こし得るものなどの栄養素をさらにも含む（例えば、国際公開第2013072929号パンフレットに記載のナノ粒子を参照のこと；これらの各々の内容は、その全体として参照により本明細書に組み込む）。非制限的例として、栄養素は、第一鉄塩、第二鉄塩若しくは元素鉄の形態の鉄、ヨウ素、葉酸、ビタミン又は微量栄養素であってもよい。

30

【0550】

一実施形態では、本発明のキメラポリヌクレオチドは、膨潤性ナノ粒子に製剤化することができる。膨潤性ナノ粒子は、限定はしないが、米国特許第8,440,231号明細書（その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）に記載されているのもであってもよい。非制限的例として、膨潤性ナノ粒子は、呼吸器系に対する本発明のキメラポリヌクレオチドの送達に用いることができる（例えば、米国特許第8,440,231号明細書を参照のこと；その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）。

40

【0551】

本発明のキメラポリヌクレオチドは、限定はしないが、米国特許第8,449,916号明細書（その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）に記載されているものなどのポリ無水物ナノ粒子に製剤化することができる。

【0552】

本発明のナノ粒子及びマイクロ粒子は、マクロファージ及び/又は免疫応答を調節するように幾何学的に操作してもよい。一態様では、幾何学的に操作した粒子は、例えば、限

50

定はしないが、肺への送達などの標的送達のための本発明のキメラポリヌクレオチドを組み込む目的で、様々な形状、サイズ及び/又は表面変化を有し得る（例えば、国際公開第2013082111号パンフレットを参照のこと；その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）。幾何学的操作粒子が有し得る他の物理的特徴として、限定はしないが、開窓、角のあるアーム、非対称及び粗い表面、細胞及び組織との相互作用を改変し得る電荷が挙げられる。非制限的例として、本発明のナノ粒子は、国際公開第2013082111号パンフレット（その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）に記載の方法により製造することができる。

【0553】

一実施形態では、本発明のナノ粒子は、限定はしないが、国際公開第2013090601号パンフレット（その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）に記載されているものなどの水溶性ナノ粒子であってもよい。ナノ粒子は、優れた水溶性を呈示するために、小型の双性イオン性リガンドを有する無機ナノ粒子であってもよい。ナノ粒子はまた、小さい流体学的径（HD）、時間、pH、及び塩分濃度に対する安定性、並びに低レベルの非特異的タンパク質結合を有し得る。

10

【0554】

一実施形態では、本発明のナノ粒子は、限定はしないが、米国特許出願公開第20130172406号明細書（その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）に記載の方法により作製することができる。

【0555】

一実施形態では、本発明のナノ粒子は、限定はしないが、米国特許出願公開第20130172406号明細書（その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）に記載されているものなどのステルスナノ粒子又は標的特異的ステルスナノ粒子である。本発明のナノ粒子は、米国特許出願公開第20130172406号明細書（その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）に記載の方法により製造することができる。

20

【0556】

別の実施形態では、ステルスナノ粒子又は標的特異的ステルスナノ粒子は、ポリマーマトリックスを含んでもよい。ポリマーマトリックスは、限定はしないが、ポリエチレン、ポリカーボネート、ポリ無水物、ポリヒドロキシ酸、ポリプロピルフェレート（polypropylfumerate）、ポリカプロラクトン、ポリアミド、ポリアセタール、ポリエーテル、ポリエステル、ポリ（オルトエステル）、ポリシアノアクリレート、ポリビニルアルコール、ポリウレタン、ポリホスファゼン、ポリアクリレート、ポリメタクリレート、ポリシアノアクリレート、ポリ尿素、ポリスチレン、ポリアミン、ポリエステル、ポリ無水物、ポリエーテル、ポリウレタン、ポリメタクリレート、ポリアクリレート、ポリシアノアクリレート又はこれらの組み合わせなどの2種以上のポリマーを含み得る。

30

【0557】

一実施形態では、ナノ粒子は、高密度核酸層を有するナノ粒子-核酸ハイブリッド構造を有し得る。非制限的例として、ナノ粒子-核酸ハイブリッド構造は、米国特許出願公開第20130171646号明細書（その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）に記載の方法により製造することができる。ナノ粒子は、限定はしないが、本明細書に記載の、並びに/又は当技術分野で公知のキメラポリヌクレオチドなどの核酸を含んでもよい。

40

【0558】

本発明のナノ粒子の少なくとも1つは、ナノ構造のコアに埋め込むか、あるいは、ナノ構造内若しくは表面上の少なくとも1つのペイロードを担持するか若しくはそれと結合することができる低密度多孔質3D構造又はコーティングで被覆してもよい。少なくとも1種のナノ粒子を含むナノ構造の非制限的例が、国際公開第2013123523号パンフレット（その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）に記載されている。

【0559】

ポリマー、生分解性ナノ粒子、及びコア-シェルナノ粒子

50

本発明のキメラポリヌクレオチドは、天然及び/若しくは合成ポリマーを用いて製剤化することができる。送達に用いることができるポリマーの非制限的例として、限定はしないが、ミラス(MIRUS)(登録商標)バイオ(Bio)(ウィスコンシン州マディソン)及びロシュ・マディソン(Roche Madison)(ウィスコンシン州マディソン)のダイナミック・ポリコンジュゲート(DYNAMIC POLYCONJUGATE)(登録商標)(アローヘッド・リサーチ社(Arrowhead Research Corp.))、カリフォルニア州パサデナ)製剤、フェーズRX(PHASERX)(商標)ポリマー製剤、例えば、限定なしに、スマート・ポリマー・テクノロジー(SMARTT POLYMER TECHNOLOGY)(商標)(フェーズRX(PHASERX)(登録商標)、ワシントン州シアトル)、DMRI/DOPE、ポロキサマー、バイカル(Vical)(カリフォルニア州サンディエゴ)のバクスフェクチン(VAXFECTIN)(登録商標)アジュバント、キトサン、カランド・ファーマシューティカルズ(Calandro Pharmaceuticals)(カリフォルニア州パサデナ)のシクロデキストリン、デンドリマー及びポリ(乳酸-コ-グリコール酸)(PLGA)ポリマー、ロンデル(RONDEL)(商標)(RNAi/オリゴヌクレオチドナノ粒子送達)ポリマー(アローヘッド・リサーチ社(Arrowhead Research Corporation))、カリフォルニア州パサデナ)及びpH反応性コブロックポリマー、例えば、限定はしないが、フェーズRX(PHASERX)(登録商標)(ワシントン州シアトル)が挙げられる。

10

20

【0560】

キトサン製剤の非制限的例は、正荷電キトサンのコアと、負荷電基質の外側部分を含む(米国特許出願公開第20120258176号明細書;これは、全体として参照により本明細書に組み込む)。キトサンとしては、限定はしないが、N-トリメチルキトサン、モノ-N-カルボキシメチルキトサン(MCC)、N-バルミトイルキトサン(NPCS)、EDTA-キトサン、低分子量キトサン、キトサン誘導体、又はこれらの組み合わせが挙げられる。

【0561】

一実施形態では、本発明で用いられるポリマーは、不要な物質、例えば、限定はしないが、細菌がポリマーの表面に付着するのを低減及び/又は阻害するための処理に付してある。ポリマーは、当技術分野で公知の、及び/若しくは当技術分野に記載の方法、並びに/又は国際公開第2012150467号パンフレット(これは、全体として参照により本明細書に組み込む)に記載の方法により処理することができる。

30

【0562】

PLGA製剤の非制限的例として、限定はしないが、PLGA注射デポー剤(例えば、66%N-メチル-2-ピロリドン(NMP)、並びに水性溶媒及びロイプロリド中にPLGAを溶解させて形成されるELIGARD(登録商標)。一旦注射されると、PLGA及びロイプロリドペプチドは、皮下空間中に沈降する)がある。

【0563】

これらのポリマー手法の多くは、in vivoでのオリゴヌクレオチドの細胞質への送達における効力が実証されている(ドフジュロール(deFougeroles)著、ヒト遺伝子療法(Hum Gene Ther.)、2008年、第19巻、p.125~132に論じられている;これは、全体として参照により本明細書に組み込む)。核酸の頑健なin vivo送達をもたらした(この場合、低分子干渉RNA(siRNA)を用いて)2つのポリマー手法は、動的ポリコンジュゲート及びシクロデキストリンベースのナノ粒子である(例えば、米国特許出願公開第20130156721号明細書を参照のこと;これは、全体として参照により本明細書に組み込む)。これらの送達手法のうち最初のもは、動的ポリコンジュゲートを使用するもので、マウスにおいてin vivoでsiRNAを有効に送達し、肝細胞における内因性の標的mRNAをサイレンシングすることが示されている(ロゼマ(Rozema)ら著、米国科学アカデミー紀要(Proc Natl Acad Sci U S A.)、2007年、第104巻、

40

50

p 1 2 9 8 2 ~ 1 2 8 8 7 ; これは、全体として参照により本明細書に組み込む)。この特定の手法は多成分ポリマー系であり、その重要な特徴としては、核酸、この場合、s i R N A が、ジスルフィド結合を介して共有結合される膜活性ポリマーが挙げられ、そこに P E G 基 (電荷マスキング用) 及び N - アセチルガラクトサミン基 (肝細胞ターゲティング用) の両方が p H 感受性結合を介して連結される (ロゼマ (R o z e m a) ら著、米国科学アカデミー紀要 (P r o c N a t l A c a d S c i U S A .)、2 0 0 7 年、第 1 0 4 巻、p . 1 2 9 8 2 ~ 1 2 8 8 7 ; これは、全体として参照により本明細書に組み込む)。ポリマー複合体は、肝細胞に結合してエンドソームに侵入すると、低 p H 環境で分解し、ポリマーがその正電荷を露出することによって、ポリマーからのエンドソームエスケープ及び s i R N A の細胞質放出が起こる。N - アセチルガラクトサミン基をマンノース基で置換することにより、アジアロ糖タンパク質受容体発現肝細胞から、類洞内皮細胞及びクッパー細胞へとターゲティングを変更できることが判明した。別のポリマー手法は、トランスフェリン標的シクロデキストリン含有ポリカチオンナノ粒子の使用を含む。これらのナノ粒子は、トランスフェリン受容体発現ユーイング肉腫腫瘍細胞における E W S - F L I 1 遺伝子産物の標的サイレンシングを実証しており (フー・リースコバン (H u - L i e s k o v a n) ら著、癌研究 (C a n c e r R e s)、2 0 0 5 年、第 6 5 巻、p . 8 9 8 4 ~ 8 9 8 2 ; これは、全体として参照により本明細書に組み込む)、これらのナノ粒子に製剤化された s i R N A は、非ヒト霊長類において良好な耐容性を示した (ハイデル (H e i d e l) ら著、米国科学アカデミー紀要 (P r o c N a t l A c a d S c i U S A)、2 0 0 7 年、第 1 0 4 巻、p . 5 7 1 5 ~ 2 1 ; これは、全体として参照により本明細書に組み込む)。これらの送達戦略はいずれも、標的送達及びエンドソームエスケープ機構の両者を用いた合理的な手法を取り入れている。

10

20

【 0 5 6 4 】

ポリマー製剤は、キメラポリヌクレオチドの持続的若しくは遅延放出を可能にし得る (例えば、筋肉内若しくは皮下注射の後)。キメラポリヌクレオチドの放出プロフィールを改変することにより、例えば、長期間にわたって、コードされたタンパク質の翻訳をもたらすことができる。また、ポリマー製剤を用いて、キメラポリヌクレオチドの安定性を高めることもできる。生分解性ポリマーは、これまで、キメラポリヌクレオチド以外の核酸を分解から保護するために用いられており、i n v i v o でペイロードの持続放出をもたらすことが示されている (ロゼマ (R o z e m a) ら著、米国科学アカデミー紀要 (P r o c N a t l A c a d S c i U S A .)、2 0 0 7 年、第 1 0 4 巻、p . 1 2 9 8 2 ~ 1 2 8 8 7 ; サリバン (S u l l i v a n) ら著、エキスパート・オピニオン・オン・ドラッグ・デリバリー (E x p e r t O p i n D r u g D e l i v .)、2 0 1 0 年、第 7 巻、p . 1 4 3 3 ~ 1 4 4 6 ; コンバーチン (C o n v e r t i n e) ら著、生体高分子 (B i o m a c r o m o l e c u l e s)、2 0 1 0 年 1 0 月 1 日 ; チュー (C h u) ら著、アカウント・オブ・ケミカル・リサーチ (A c c C h e m R e s .)、2 0 1 2 年 1 月 1 3 日 ; マンガニエロ (M a n g a n i e l l o) ら著、バイオマテリアルズ (B i o m a t e r i a l s)、2 0 1 2 年、第 3 3 巻、p . 2 3 0 1 ~ 2 3 0 9 ; ブノワ (B e n o i t) ら著、生体高分子 (B i o m a c r o m o l e c u l e s)、2 0 1 1 年、第 1 2 巻、p . 2 7 0 8 ~ 2 7 1 4 ; シンハ (S i n g h a) ら著、核酸治療薬 (N u c l e i c A c i d T h e r .)、2 0 1 1 年、第 2 巻、p . 1 3 3 ~ 1 4 7 ; ドフジュロール (d e F o u g e r o l l e s) 著、ヒト遺伝子療法 (H u m G e n e T h e r .)、2 0 0 8 年、第 1 9 巻、p . 1 2 5 ~ 1 3 2 ; シャファート (S c h a f f e r t) 及びワグナー (W a g n e r) 著、遺伝子療法 (G e n e T h e r .)、2 0 0 8 年、第 1 6 巻、p . 1 1 3 1 ~ 1 1 3 8 ; チャツルベディ (C h a t u r v e d i) ら著、エキスパート・オピニオン・オン・ドラッグ・デリバリー (E x p e r t O p i n D r u g D e l i v .)、2 0 1 1 年、第 8 巻、p . 1 4 5 5 ~ 1 4 6 8 ; デイビス (D a v i s) 著、分子薬理学 (M o l P h a r m .)、2 0 0 9 年、第 6 巻、p . 6 5 9 ~ 6 6 8 ; デイビス (D a v i s) 著、ネイチャー (N a t u r e)、2 0 1 0 年、第 4 6 4 巻、p . 1 0 6 7 ~ 1 0 7 0 ; これらの各々は、全体とし

30

40

50

て参照により本明細書に組み込む)。

【0565】

一実施形態では、医薬組成物は、持続放出製剤であってもよい。別の実施形態では、持続放出製剤は、皮下送達用であってもよい。持続放出製剤として、限定はしないが、以下のものが挙げられる：PLGAマイクロスフィア、エチレン酢酸ビニル(EVAc)、ポロキサマー、ゲルサイト(GELSITE)(登録商標)(ナノセラピューティクス社(Nanotherapeutics, Inc.))、フロリダ州アラチュア)、ヒレネクス(HYLENEX)(登録商標)(ハロザイム・セラピューティクス(Halozyme Therapeutics))、カリフォルニア州サンディエゴ)、外科密閉剤、例えば、フィブリノーゲンポリマー(エチコン社(Ethicon Inc.))、ジョージア州コーネリア)、ティッセル(TISSELL)(登録商標)(バクスター・インターナショナル社(Baxter International, Inc.))、イリノイ州ディアフィールド)、PEGベースの密閉剤、並びにコシール(COSEAL)(登録商標)(バクスター・インターナショナル社(Baxter International, Inc.))、イリノイ州ディアフィールド)。

10

【0566】

非制限的例として、調整可能な放出速度(例えば、数日及び数週間)のPLGAマイクロスフィアを調製し、封入工程中に修飾mRNAの完全性を維持しながら、修飾mRNAをPLGAマイクロスフィアに封入することによって、修飾mRNAをPLGAマイクロスフィアに製剤化することができる。EVAcは、前臨床持続放出インプラント用途(例えば、徐放剤オキュサート(Ocusert)(緑内障用のピロカルピン眼球インサート)又はプロゲスタサート(progestasert)(持続放出プロゲステロン子宮内デバイス;経皮送達系テストダーム(Testoderm)、デュラゲシク(Duragesic)及びセレギリン(Selegiline);カテーテル)に広く使用されている非生分解性、生分解性ポリマーである。ポロキサマーF-407NFは、ポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレン-ポリオキシエチレンからなる親水性のノニオン性界面活性剤トリブロックコポリマーであり、5未満の温度で低粘度を有し、15を超える温度で固体ゲルを形成する。PEG化外科密閉剤は、送達デバイス中で混合される2種の合成PEG成分を含み、このデバイスは、1分で調製することができ、3分で密閉し、30日以内に再吸収される。ゲルサイト(GELSITE)(登録商標)及び天然ポリマーは、投与部位でのin situゲル化が可能である。これらは、イオン相互作用によって、タンパク質及びペプチド治療薬候補と相互作用して、安定化効果をもたらすことが判明している。

20

30

【0567】

ポリマー製剤はまた、限定はしないが、葉酸塩、トランスフェリン、及びN-アセチルガラクトサミン(GalNAc)により例示される通りの、種々のリガンドの発現により、選択的にターゲティングすることもできる(ブノワ(Benoit)ら著、生体高分子(Biomacromolecules)、2011年、第12巻、p.2708~2714;ロゼマ(Rozema)ら著、米国科学アカデミー紀要(Proc Natl Acad Sci U S A.))、2007年、第104巻、p.12982~12887;デイビス(Davis)著、分子薬理学(Mol Pharm.))、2009年、第6巻、p.659~668;デイビス(Davis)著、ネイチャー(Nature)、2010年、第464巻、p.1067~1070;これらの各々は、全体として参照により本明細書に組み込む)。

40

【0568】

本発明のキメラポリヌクレオチドは、ポリマー化合物と一緒に、又はポリマー化合物に製剤化することができる。ポリマーは、限定はしないが、以下に挙げるものなどの少なくとも1種のポリマーを含み得る：ポリエチレン、ポリエチレングリコール(PEG)、ポリ(L-リシン)(PLL)、PLLにグラフト処理したPEG、カチオン性リポポリマー、生分解性カチオン性リポポリマー、ポリエチレンイミン(PEI)、架橋分岐状ポリ

50

(アルキレンイミン)、ポリアミン誘導体、修飾ポロキサマー、生分解性ポリマー、弾性生分解性ポリマー、生分解性ブロックコポリマー、生分解性ランダムコポリマー、生分解性ポリエステルコポリマー、生分解性ポリエステルブロックコポリマー、生分解性ポリエステルブロックランダムコポリマー、マルチブロックコポリマー、線状生分解性コポリマー、ポリ〔 - (4 - アミノブチル) - L - グリコール酸) (P A G A)、生分解性架橋カチオン性マルチブロックコポリマー、ポリカーボネート、ポリ無水物、ポリヒドロキシ酸、ポリプロピルフメレート (polypropylfumerate)、ポリカプロラクトン、ポリアミド、ポリアセタール、ポリエーテル、ポリエステル、ポリ(オルトエステル)、ポリシアノアクリレート、ポリビニルアルコール、ポリウレタン、ポリホスファゼン、ポリアクリレート、ポリメタクリレート、ポリシアノアクリレート、ポリ尿素、ポリスチレン、ポリアミン、ポリリジン、ポリ(エチレンイミン)、ポリ(セリンエステル)、ポリ(L - ラクチド - コ - L - リシン)、ポリ(4 - ヒドロキシ - L - プロリンエステル)、アクリル酸ポリマー、アミン含有ポリマー、デキストランポリマー、デキストラポリマー誘導体又はこれらの組み合わせ。

【0569】

非制限的例として、本発明のキメラポリヌクレオチドは、米国特許第6,177,274号明細書(これは、全体として参照により本明細書に組み込む)に記載される通りに、PLLでグラフト処理したPEGのポリマー化合物と一緒に製剤化することができる。製剤は、in vitroでの細胞のトランスフェクション、又はキメラポリヌクレオチドのin vivo送達のために用いることができる。別の実施例では、米国特許出願公開第20090042829号明細書及び同第20090042825号明細書(これらの各々は、全体として参照により本明細書に組み込む)に記載される通りに、乾燥医薬組成物、又は乾燥させることができる溶液中で、カチオン性ポリマーと一緒にキメラポリヌクレオチドを溶液若しくは媒質中に懸濁させてもよい。

【0570】

別の非制限的例として、本発明のキメラポリヌクレオチドは、PLGA-PEGブロックコポリマー(米国特許出願公開第20120004293号明細書及び米国特許第8,236,330号明細書を参照のこと;これらは、全体として参照により本明細書に組み込む)又はPLGA-PEG-PLGAブロックコポリマー(米国特許第6,004,573号明細書を参照のこと;これは、全体として参照により本明細書に組み込む)と一緒に製剤化することができる。非制限的例として、本発明のキメラポリヌクレオチドは、PEG及びPLA又はPEG及びPLGAのジブロックコポリマーと一緒に製剤化することができる(米国特許第8,246,968号明細書を参照のこと;これは、全体として参照により本明細書に組み込む)。

【0571】

ポリアミン誘導体を用いて、核酸を送達する、又は疾患を治療する及び/又は予防する、又は移植可能若しくは注射可能なデバイスに含有させることができる(例えば、米国特許出願公開第20100260817号明細書(現在、米国特許第8,460,696号明細書);これらの各々の内容は、全体として参照により本明細書に組み込む)。非制限的例として、医薬組成物は、修飾核酸及びキメラポリヌクレオチド並びに米国特許出願公開第20100260817号明細書(現在、米国特許第8,460,696号明細書;これらの各々の内容は、全体として参照により本明細書に組み込む)に記載のポリアミン誘導体を含んでもよい。非制限的例として、本発明のキメラポリヌクレオチドは、ポリアミドポリマー、例えば、限定はしないが、オリゴアミンを含むジルキン単位と炭水化物ジアジドモノマーを組み合わせることにより調製される1,3-双極性付加ポリマーを含むポリマー(米国特許第8,236,280号明細書;これは、全体として参照により本明細書に組み込む)を用いて送達することができる。

【0572】

本発明のキメラポリヌクレオチドは、少なくとも1種のアクリル酸ポリマーと一緒に製剤化することができる。アクリル酸ポリマーとして、限定はしないが、アクリル酸、メタ

10

20

30

40

50

クリル酸、アクリル酸及びメタクリル酸コポリマー、メチルメタクリレートコポリマー、エトキシエチルメタクリレート、シアノエチルメタクリレート、アミノアルキルメタクリレートコポリマー、ポリ(アクリル酸)、ポリ(メタクリル酸)、ポリシアノアクリレート及びこれらの組み合わせが挙げられる。

【0573】

一実施形態では、本発明のキメラポリヌクレオチドは、国際公開第2011115862号パンフレット、同第2012082574号パンフレット及び同第2012068187号パンフレット、並びに米国特許出願公開第20120283427号明細書；これらの各々は、全体として参照により本明細書に組み込む)に記載されている少なくとも1種のポリマー及び/又はその誘導体と一緒に製剤化することができる。別の実施形態では、本発明のキメラポリヌクレオチドは、国際公開第2011115862号パンフレット(これは、全体として参照により本明細書に組み込む)に記載されている通りの、式Zのポリマーと一緒に製剤化することができる。また別の実施形態では、キメラポリヌクレオチドは、国際公開第2012082574号パンフレット又は同第2012068187号パンフレット及び米国特許出願公開第2012028342号明細書；これらの各々は、全体として参照により本明細書に組み込む)に記載されている通りの、式Z、Z'若しくはZ''のポリマーと一緒に製剤化することができる。本発明の修飾RNAと一緒に製剤化されるポリマーは、国際公開第2012082574号パンフレット又は同第2012068187号パンフレット(これらの各々は、全体として参照により本明細書に組み込む)に記載されている方法によって合成することができる。

【0574】

本発明のキメラポリヌクレオチドは、少なくとも1種のアクリル酸ポリマーと一緒に製剤化することができる。アクリル酸ポリマーとして、限定はしないが、アクリル酸、メタクリル酸、アクリル酸及びメタクリル酸コポリマー、メチルメタクリレートコポリマー、エトキシエチルメタクリレート、シアノエチルメタクリレート、アミノアルキルメタクリレートコポリマー、ポリ(アクリル酸)、ポリ(メタクリル酸)、ポリシアノアクリレート及びこれらの組み合わせが挙げられる。

【0575】

本発明のキメラポリヌクレオチドの製剤は、少なくとも1種のアミン含有ポリマー、例えば、限定はしないが、ポリリジン、ポリエチレンジイミン、ポリ(アミドアミン)デンドリマー、ポリ(アミン-コ-エステル)又はこれらの組み合わせを含んでもよい。非制限的例として、ポリ(アミン-コ-エステル)は、国際公開第2013082529号パンフレット(その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む)に記載のポリマーであってもよいし、及び/又はそこに記載されている方法によって製造することができる。

【0576】

例えば、本発明のキメラポリヌクレオチドは、ポリ(アルキレンジイミン)、生分解性カチオン性リポポリマー、生分解性ブロックコポリマー、生分解性ポリマー、又は生分解性ランダムコポリマー、生分解性ポリエステルブロックコポリマー、生分解性ポリエステルポリマー、生分解性ポリエステルランダムコポリマー、線状生分解性コポリマー、PAGA、生分解性架橋カチオン性マルチブロックコポリマー又はこれらの組み合わせを含む医薬化合物に製剤化することができる。生分解性カチオン性リポポリマーは、当技術分野で公知の方法及び/又は米国特許第6,696,038号明細書、米国特許出願公開第20030073619号明細書及び同第20040142474号明細書(これらの各々は、全体として参照により本明細書に組み込む)に記載の方法によって製造することができる。ポリ(アルキレンジイミン)は、当技術分野で公知の方法及び/又は米国特許出願公開第20100004315号明細書(これは、全体として参照により本明細書に組み込む)に記載の方法を用いて製造することができる。生分解性ポリマー、生分解性ブロックコポリマー、生分解性ランダムコポリマー、生分解性ポリエステルブロックコポリマー、生分解性ポリエステルポリマー、又は生分解性ポリエステルランダムコポリマーは、当技術分野で公知の方法及び/又は米国特許第6,517,869号明細書及び同第6,267

、 987号明細書（その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）に記載の方法を用いて製造することができる。線状生分解性コポリマーは、当技術分野で公知の方法及び/又は米国特許第6,652,886号明細書に記載の方法を用いて製造することができる。PAGAポリマーは、当技術分野で公知の方法及び/又は米国特許第6,217,912号明細書（これは、全体として参照により本明細書に組み込む）に記載の方法を用いて製造することができる。限定はしないが、ポリ-L-リジン、ポリアルギニン、ポリオルチニン、ヒストン、アビジン、プロタミン、ポリラクチド及びポリ（ラクチド-コ-グリコリド）などのポリマーとPAGAポリマーを共重合して、コポリマー又はブロックコポリマーを形成してもよい。生分解性架橋カチオン性マルチブロックコポリマーは、当技術分野で公知の方法及び/又は米国特許第8,057,821号明細書、同第8,444,992号明細書又は米国特許出願公開第2012009145号明細書（これらの各々は、全体として参照により本明細書に組み込む）に記載の方法により製造することができる。例えば、マルチブロックコポリマーは、分岐状ポリエチレンイミンと比較して、異なるパターンを有する線状ポリエチレンイミン（LPEI）ブロックを用いて合成することができる。さらに、組成物又は医薬組成物は、当技術分野で公知の方法、本明細書に記載する方法、又は米国特許出願公開第20100004315号明細書若しくは米国特許第6,267,987号明細書及び同第6,217,912号明細書（これらの各々は、全体として参照により本明細書に組み込む）に記載の方法により製造することができる。

10

【0577】

20

本発明のキメラポリヌクレオチドは、ポリカチオン性側鎖を含有し得る少なくとも1種の分解性ポリエステルと一緒に製剤化することができる。分解性ポリエステルとして、限定はしないが、ポリ（セリンエステル）、ポリ（L-ラクチド-コ-L-リシン）、ポリ（4-ヒドロキシ-L-プロリンエステル）、及びこれらの組み合わせが挙げられる。別の実施形態では、分解性ポリエステルは、ペグ化ポリマーを形成するPEG共役を含んでもよい。

【0578】

本発明のキメラポリヌクレオチドは、少なくとも1つの架橋可能なポリエステルと一緒に製剤化することができる。架橋可能なポリエステルとしては、当技術分野で公知のもの及び米国特許出願公開第20120269761号明細書（これは、全体として参照により本明細書に組み込む）に記載のものがある。

30

【0579】

本発明のキメラポリヌクレオチドは、少なくとも1種のシクロデキストリンポリマー中に、又はそれと一緒に製剤化することができる。シクロデキストリンポリマー及びシクロデキストリンポリマーを製造する方法としては、当技術分野で公知のもの及び米国特許出願公開第20130184453号明細書（これは、全体として参照により本明細書に組み込む）に記載のものがある。

【0580】

一実施形態では、本発明のキメラポリヌクレオチドは、少なくとも1種の架橋カチオン結合ポリマー中に、又はそれと一緒に製剤化することができる。架橋カチオン結合ポリマー及び架橋カチオン結合ポリマーを製造する方法としては、当技術分野で公知のもの及び国際公開第2013106072号パンフレット、同第2013106073号パンフレット及び同第2013106086号パンフレット（これらの各々の内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）に記載のものがある。

40

【0581】

一実施形態では、本発明のキメラポリヌクレオチドは、少なくとも1種の分岐状ポリマー中に、又はそれと一緒に製剤化することができる。分岐状ポリマー及び分岐状ポリマーを製造する方法としては、当技術分野で公知のもの及び国際公開第2013113071号パンフレット（これらの各々の内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）に記載のものがある。

50

【0582】

一実施形態では、本発明のキメラポリヌクレオチドは、少なくとも1種のペグ化アルブミンポリマー中に、又はそれと一緒に製剤化することができる。ペグ化アルブミンポリマー及びペグ化アルブミンポリマーを製造する方法としては、当技術分野で公知のもの及び米国特許出願公開第20130231287号明細書（これは、全体として参照により本明細書に組み込む）に記載のものがある。

【0583】

一実施形態では、本明細書に記載のポリマーは、リピド-末端PEGと共役させてもよい。非制限的例として、PLGAをリピド-末端PEGと共役させて、PLGA-DSP E-PEGを形成することができる。別の非制限的例として、本発明で使用するPEGコ

10

【0584】

一実施形態では、本明細書に開示するキメラポリヌクレオチドは、投与の前にPEG又はリン酸ナトリウム及び/若しくは炭酸ナトリウム溶液と混合させることができる。別の実施形態では、目的のタンパク質をコードするキメラポリヌクレオチドをPEGと混合し、さらに、リン酸ナトリウム及び/若しくは炭酸ナトリウム溶液とも混合することができ

20

【0585】

一実施形態では、本明細書に記載するキメラポリヌクレオチドを別の化合物と共役させてもよい。コンジュゲートの非制限的例が、米国特許第7,964,578号明細書及び同第7,833,992号明細書（これらの各々は、全体として参照により本明細書に組み込む）に記載されている。別の実施形態では、本発明の修飾RNAは、米国特許第7,964,578号明細書及び同第7,833,992号明細書（これらの各々は、全体として参照により本明細書に組み込む）に記載されている通りの式1~122のコンジュゲ

30

【0586】

米国特許出願公開第20100004313号明細書（これは、全体として参照により本明細書に組み込む）に記載される通りに、遺伝子送達組成物は、ヌクレオチド配列及びポロキサマーを含んでもよい。例えば、本発明のキメラポリヌクレオチドは、米国特許出願公開第20100004313号明細書に記載のポロキサマーを含む遺伝子送達組成物に用いることができる。

40

【0587】

一実施形態では、本発明のポリマー製剤は、コレステロール及びポリエチレングリコール基に共有結合させることができるカチオン性リポポリマーと、ポリマー製剤（カチオン性担体を含み得る）を接触させることにより、安定化することができる。ポリマー製剤は、米国特許出願公開第20090042829号明細書（これは、全体として参照により

50

本明細書に組み込む)に記載の方法を用いてカチオン性リポポリマーと接触させてもよい。カチオン性担体として、限定はしないが、以下のものが挙げられる：ポリエチレンイミン、ポリ(トリメチレンイミン)、ポリ(テトラメチレンイミン)、ポリプロピレンイミン、アミノグリコシド-ポリアミン、ジデオキシ-ジアミノ-b-シクロデキストリン、スベルミン、スベルミジン、ポリ(2-ジメチルアミノ)エチルメタクリレート、ポリ(リシン)、ポリ(ヒスチジン)、ポリ(アルギニン)、カチオン化ゼラチン、デンドリマー、キトサン、1,2-ジオレオイル-3-トリメチルアンモニウム-プロパン(DOTAP)、N-[1-(2,3-ジオレオイルオキシ)プロピル]-N,N,N-トリメチルアンモニウム塩化物(DOTMA)、1-[2-(オレオイルオキシ)エチル]-2-オレイル-3-(2-ヒドロキシエチル)イミダゾリニウム塩化物(DOTIM)、2,3-ジオレオイルオキシ-N-[2(スベルミンカルボキサミド)エチル]-N,N-ジメチル-1-プロパニウムトリフルオロ酢酸塩(DOSPA)、3B-[N-(N',N'-ジメチルアミノエタン)-カルバモイル]コレステロール塩酸塩(DC-コレステロールHCl)ジヘプタデシルアミドグリシルスベルミジン(DOGS)、N,N-ジステアリル-N,N-ジメチルアンモニウム臭化物(DDAB)、N-(1,2-ジミリスチルオキシプロプ-3-イル)-N,N-ジメチル-N-ヒドロキシエチルアンモニウム臭化物(DMRIE)、N,N-ジオレイル-N,N-ジメチルアンモニウム塩化物(DODAC)及びこれらの組み合わせ。非制限的例として、キメラポリヌクレオチドは、米国特許出願公開第20130065942号明細書(これは、全体として参照により本明細書に組み込む)に記載されているものなどのカチオン性リポポリマーと一緒に製剤化してもよい。

10

20

【0588】

本発明のキメラポリヌクレオチドは、1種又は複数種のポリマーのポリプレックスに製剤化することができる(例えば、米国特許第8,501,478号明細書、米国特許出願公開第20120237565号明細書及び同第20120270927号明細書及び同第20130149783号明細書並びに国際公開第2013090861号パンフレットを参照のこと;これらの各々の内容は、全体として参照により本明細書に組み込む)。非制限的例として、ポリプレックスは、国際公開第2013090861号パンフレット(その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む)に記載されている新規のアミノアミジンポリマーを用いて形成してもよい。別の非制限的例として、ポリプレックスは、米国特許第8,501,478号明細書(その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む)に記載のクリックポリマーを用いて形成することもできる。

30

【0589】

一実施形態では、ポリプレックスは、2種以上のカチオン性ポリマーを含む。カチオン性ポリマーは、線状PEIなどのポリ(エチレンイミン)(PEI)を含んでもよい。別の実施形態では、ポリプレックスは、p(TETA/CBA)、そのペグ化類似体p(TETA/CBA)-g-PEG2k及びこれらの混合物を含む(例えば、米国特許出願公開第20130149783号明細書を参照のこと;その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む)。

【0590】

本発明のキメラポリヌクレオチドはまた、ポリマー、脂質、及び/又は他の生分解性薬剤、例えば限定はしないが、リン酸カルシウムなどの組み合わせを用い、ナノ粒子として製剤化することもできる。構成成分は、コア-シェル、ハイブリッド、及び/又は多層構造に組み合わせてもよく、これによって、ナノ粒子の微調整が可能になり、ひいてはキメラポリヌクレオチドの送達を促進することができる(ワン(Wang)ら著、ネイチャー・マテリアルズ(Nat Mater.)、2006年、第5巻、p.791~796;フラ(Fuller)ら著、バイオマテリアルズ(Biomaterials)、2008年、第29巻、p.1526~1532;デッカー(DeKoker)ら著、アドバンスド・ドラッグ・デリバリー・レビューズ(Adv Drug Deliv Rev.)、2011年、第63巻、p.748~761;エンドレス(Endres)ら著、バ

40

50

イオマテリアルズ (Biomaterials)、2011年、第32巻、p. 7721 ~ 7731; スー (Su) ら著、分子薬理学 (Mol Pharm.)、2011年6月6日、第8巻 (3)、p. 774 ~ 87; これらは、全体として参照により本明細書に組み込む)。非制限的例として、ナノ粒子は、限定はしないが、親水性 - 疎水性ポリマー (例えば、PEG-PLGA)、疎水性ポリマー (例えば、PEG) 及び / 又は親水性ポリマー (国際公開第20120225129号パンフレット; その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む) などの複数のポリマーを含み得る。

【0591】

別の非制限的例として、キメラポリヌクレオチドのための親水性ポリマーを含むナノ粒子は、国際公開第2013119936号パンフレット (その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む) に記載されているものであってもよいし、又はそこに記載の方法によって製造してもよい。

10

【0592】

一実施形態では、本発明で用いることができる生分解性ポリマーは、ポリ (エーテル - 無水物) ブロックコポリマーである。非制限的例として、本明細書で用いる生分解性ポリマーは、国際公開第2006063249号パンフレット (これは、全体として参照により本明細書に組み込む) に記載されているブロックコポリマーであってもよいし、又は国際公開第2006063249号パンフレット (これは、全体として参照により本明細書に組み込む) に記載の方法によって製造してもよい。

【0593】

別の実施形態では、本発明で用いることができる生分解性ポリマーは、アルキル及びシクロアルキル末端生分解性脂質である。非制限的例として、アルキル及びシクロアルキル末端生分解性脂質は、国際公開第2013086322号パンフレットに記載されているものであってもよいし、及び / 又は国際公開第2013086322号パンフレット (その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む) に記載の方法によって製造してもよい。

20

【0594】

また別の実施形態では、本発明で用いることができる生分解性ポリマーは、脂質部分に位置する1つ又は複数の生分解性基を有するカチオン性脂質である。非制限的例として、生分解性脂質は、米国特許出願公開第20130195920号明細書 (その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む) に記載されているものであってもよい。

30

【0595】

脂質及び / 又はポリマーと組み合わせた生分解性リン酸カルシウムナノ粒子は、*in vivo* でキメラポリヌクレオチドを送達することが明らかにされている。一実施形態では、脂質で被覆されたリン酸カルシウムナノ粒子 (これはまたアニスアミドなどのターゲティングリガンドも含有し得る) を使用して、本発明のキメラポリヌクレオチドを送達してもよい。例えば、マウス転移性肺モデルにおいて *siRNA* を有効に送達するために、脂質で被覆されたリン酸カルシウムナノ粒子が使用されている (リー (Li) ら著、ジャーナル・オブ・コントロールド・リリース (J Contr Rel.)、2010年、第142巻、p. 416 ~ 421; リー (Li) ら著、ジャーナル・オブ・コントロールド・リリース (J Contr Rel.)、2012年、第158巻、p. 108 ~ 114; ヤン (Yang) ら著、分子療法 (Mol Ther.)、2012年、第20巻、p. 609 ~ 615; これらは、全体として参照により本明細書に組み込む)。この送達系は、*siRNA* の送達を改善するために、標的化ナノ粒子と、エンドソームエスケープを増強する構成成分であるリン酸カルシウムの両方を組み合わせる。

40

【0596】

一実施形態では、リン酸カルシウムをPEG-ポリアニオンブロックコポリマーと一緒に使用して、キメラポリヌクレオチドを送達してもよい (カジカワ (Kazikawa) ら著、ジャーナル・オブ・コントロールド・リリース (J Contr Rel.)、2004年、第97巻、p. 345 ~ 356; カジカワ (Kazikawa) ら著、ジャー

50

ナル・オブ・コントロールド・リリース (J Contr Rel .)、2006年、第111巻、p. 368 ~ 370 ; これらの内容は、全体として参照により本明細書に組み込む)。

【0597】

一実施形態では、PEG - 電荷変換型ポリマー (ピテラ (Pitella)ら著、バイオマテリアルズ (Biomaterials)、2011年、第32巻、p. 3106 ~ 3114 ; その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む) を用いて、本発明のキメラポリヌクレオチドを送達するナノ粒子を形成してもよい。PEG - 電荷変換型ポリマーは、酸性pHでポリカチオンに切断され、これにより、エンドソームエスケープを増強することによって、PEG - ポリアニオンブロックコポリマーを改善し得る。

10

【0598】

一実施形態では、本発明で用いることができるポリマーは、限定はしないが、国際公開第2013055331号パンフレット (これは、全体として参照により本明細書に組み込む) に記載のペンタブロックポリマーなどのペンタブロックポリマーであってもよい。非制限的例として、ペンタブロックポリマーは、PGA - PCL - PEG - PCL - PGAを含み、ここで、PEGは、ポリエチレングリコールであり、PCLは、ポリ (E - カプロラクトン) であり、PGAは、ポリ (グリコール酸) であり、またPLAは、ポリ (乳酸) である。別の非制限的例として、ペンタブロックポリマーは、PEG - PCL - PLA - PCL - PEGを含み、ここで、PEGは、ポリエチレングリコールであり、PCLは、ポリ (E - カプロラクトン) であり、PGAは、ポリ (グリコール酸) であり、またPLAは、ポリ (乳酸) である。

20

【0599】

一実施形態では、本発明で使用することができるポリマーは、少なくとも1つのジエポキシド及び少なくとも1つのアミノグリコシドを含む (例えば、国際公開第2013055971号パンフレットを参照のこと ; その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む) 。ジエポキシドは、限定はしないが、1, 4ブタンジオールジグリシジルエーテル (1, 4B)、1, 4 - シクロヘキサジメタノールジグリシジルエーテル (1, 4C)、4 - ビニルシクロヘキサジエポキシド (4VCD)、エチレングリコールジグリシジルエーテル (EDGE)、グリセロールジグリシジルエーテル (GDE)、ネオペンチルグリコールジグリシジルエーテル (NPDE)、ポリ (エチレングリコール) ジグリシジルエーテル (PEGDE)、ポリ (プロピレングリコール) ジグリシジルエーテル (PPGDE) 及びレゾルシノールジグリシジルエーテル (RDE) から選択することができる。アミノグリコシドは、限定はしないが、ストレプトマイシン、ネオマイシン、フラマイシン、パロモマイシン、リボスタマイシン、カナマイシン、アミカシン、アルベカシン、ベカナマイシン、ジベカシン、トブラマイシン、スペクチノマイシン、ヒグロマイシン、ゲンタマイシン、ネチルマイシン、シソマイシン、イセパマイシン、ベルダマイシン、アストロマイシン、及びアプラマイシンから選択することができる。非制限的例として、ポリマーは、国際公開第2013055971号パンフレット (その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む) に記載の方法により製造することができる。別の非制限的例として、少なくとも1つのジエポキシド及び少なくとも1つのアミノグリコシドを含有するポリマーのいずれかを含む組成物は、国際公開第2013055971号パンフレット (その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む) に記載の方法により製造することができる。

30

40

【0600】

一実施形態では、本発明で使用することができるポリマーは、架橋ポリマーであってもよい。非制限的例として、架橋ポリマーを用いて、米国特許第8, 414, 927号明細書 (その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む) に記載される通りの粒子を形成することができる。別の非制限的例として、架橋ポリマーは、米国特許出願公開第20130172600号明細書 (その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む) に記載の方法により取得することもできる。

50

【0601】

一実施形態では、本発明で使用することができるポリマーは、米国特許第8,461,132号明細書(その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む)に記載されるものなどの架橋ポリマーであってもよい。非制限的例として、架橋ポリマーは、身体組織の治療のための治療組成物に用いることができる。治療組成物は、注射若しくはカテーテル法などの当技術分野で公知の及び/又は本明細書に記載の様々な方法を用いて、損傷組織に投与することができる。

【0602】

一実施形態では、本発明で使用することができるポリマーは、限定はしないが、国際公開第2013049328号パンフレット(その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む)に記載のものなどの二脂肪置換ペグ化脂質であってもよい。

10

【0603】

一実施形態では、ブロックコポリマーは、PEG-PLGA-PEGである(例えば、以下を参照:感熱性ハイドロゲル(PEG-PLGA-PEG)は、リー(Lee)ら著、「Tgf-1遺伝子送達ビヒクルとしての感熱性ハイドロゲルは、糖尿病性損傷治療を促進する(Thermosensitive Hydrogel as a Tgf-1 Gene Delivery Vehicle Enhances Diabetic Wound Healing)」、薬剤学研究(Pharmaceutical Research)、2003年、第20巻(12)、p.1995~2000では、TFG-遺伝子送達ビヒクルとして;リー(Li)ら著、「感熱性生分解性ハイドロゲルを基材とする制御遺伝子送達系(Controlled Gene Delivery System Based on Thermosensitive Biodegradable Hydrogel)」、薬剤学研究(Pharmaceutical Research)、2003年、第20巻(6)、p.884~888;及びチャン(Chang)ら著、「ノニオン性両親媒性生分解性PEG-PLGA-PEGコポリマーは、ラット骨格筋において遺伝子送達効率を高める(Non-ionic amphiphilic biodegradable PEG-PLGA-PEG copolymer enhances gene delivery efficiency in rat skeletal muscle)」、ジャーナル・オブ・コントロールド・リリース(J Controlled Release)、2007年、第118巻、p.245~253では、制御遺伝子送達系として、使用された;これら文献の各々は、全体として参照により本明細書に組み込む)が本発明において使用され得る。本発明は、限定はしないが、筋肉内及び皮下投与などの投与のために、PEG-PLGA-PEGと一緒に製剤化することができる。

20

30

【0604】

別の実施形態では、PEG-PLGA-PEGブロックコポリマーは、本発明において、生分解性持続放出系を作製するために使用される。一態様では、本発明のキメラポリヌクレオチドは、投与の前に、ブロックコポリマーと混合する。別の態様では、本発明のキメラポリヌクレオチドは、ブロックコポリマーと共投与する。

【0605】

一実施形態では、本発明で用いられるポリマーは、多機能性ポリマー誘導体、例えば、限定はしないが、米国特許第8454946号明細書(その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む)に記載される通りの多機能性N-マレイミジルポリマー誘導体であってもよい。

40

【0606】

コア-シェルナノ粒子の使用はさらに、カチオン性架橋ナノゲルコア及び様々なシェルを合成するハイスループット手法に焦点が置かれてきた(ジークバルト(Siegwart)ら著、米国科学アカデミー紀要(Proc Natl Acad Sci USA)、2011年、第108巻、p.12996~13001;その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む)。ナノ粒子のコア及びシェル構成成分の両方で化学組成を改

50

変することにより、ポリマーナノ粒子の複合体化、送達、及びインターナリゼーションを正確に制御することができる。例えば、コア-シェルナノ粒子は、コレステロールをナノ粒子に共有結合させた後、マウス肝細胞に siRNA を効率的に送達することができる。

【0607】

一実施形態では、中央の PLGA 層と、PEG を含有する外側の中性脂質層とを含む中空脂質コアを用いて、本発明のキメラポリヌクレオチドを送達することができる。非限定的な例として、ルシフェラーゼ発現腫瘍を有するマウスでは、従来のリポブックスと比較して、脂質-ポリマー-脂質ハイブリッドナノ粒子がルシフェラーゼ発現を有意に抑制することが判明した(シャイ(Shi)ら著、アングヴァンテ・ケミー・インターナショナル・エディション(Angew Chem Int Ed)、2011年、第50巻、p.7027~7031;これは、全体として参照により本明細書に組み込む)。

10

【0608】

一実施形態では、脂質ナノ粒子は、本明細書に開示するキメラポリヌクレオチドのコアと、ポリマーシェルとを含んでもよい。ポリマーシェルは、本明細書に記載するポリマーのいずれであってもよく、これらは、当技術分野において公知である。別の実施形態では、ポリマーシェルを用いて、コア内のキメラポリヌクレオチドを保護することができる。

【0609】

本発明のキメラポリヌクレオチドと一緒に使用されるコア-シェルナノ粒子は、米国特許第8,313,777号明細書又は国際公開第2013124867号パンフレット(これらの内容は、全体として参照により本明細書に組み込む)に記載されており、そこに記載される方法により形成することができる。

20

【0610】

一実施形態では、コア-シェルナノ粒子は、本明細書に開示するキメラポリヌクレオチドのコアと、ポリマーシェルとを含んでもよい。ポリマーシェルは、本明細書に記載するポリマーのいずれであってもよく、これらは、当技術分野において公知である。別の実施形態では、ポリマーシェルを用いて、コア内のキメラポリヌクレオチドを保護することができる。

【0611】

一実施形態では、本明細書に記載する製剤と共に用いられるポリマーは、国際公開第2011120053号パンフレット(その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む)に記載される通りの修飾ポリマー(例えば、限定はしないが、修飾ポリアセタールなど)であってもよい。

30

【0612】

一実施形態では、製剤は、ポリマー担体と、少なくとも1つの核酸分子とを含むポリマー担体カーゴ複合体であってもよい。ポリマー担体カーゴ複合体の非制限的例は、国際公開第2013113326号パンフレット、同第2013113501号パンフレット、同第2013113325号パンフレット、同第2013113502号パンフレット及び同第2013113736号パンフレット並びに欧州特許第2623121号明細書(これらの各々の内容は、全体として参照により本明細書に組み込む)に記載されている。一態様では、ポリマー担体カーゴ複合体は、負荷電核酸分子、例えば、限定はしないが、国際公開第2013113325号パンフレット及び同第2013113502号パンフレット(これらの各々の内容は、全体として参照により本明細書に組み込む)に記載されているものなどを含んでもよい。

40

【0613】

一実施形態では、医薬組成物は、本発明のキメラポリヌクレオチドと、ポリマー担体カーゴ複合体を含んでもよい。キメラポリヌクレオチドは、目的のタンパク質、例えば、限定はしないが、感染症に関連する病原体に由来する抗原、アレルギー若しくはアレルギー性疾患に関連する抗原、自己免疫疾患に関連する抗原、又は癌若しくは腫瘍疾患に関連する抗原などをコードし得る(例えば、国際公開第2013113326号パンフレット、同第2013113501号パンフレット、同第2013113325号パンフレット、

50

同第2013113502号パンフレット、及び同第2013113736号パンフレット並びに欧州特許第2623121号明細書に記載されている抗原を参照のこと；これらの文献の各々の内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）。

【0614】

非制限的例として、コア-シェルナノ粒子を用いて、眼病又は障害を治療することができる（例えば、米国特許出願公開第20120321719号明細書を参照のこと；その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）。

【0615】

一実施形態では、本明細書に記載する製剤で用いられるポリマーは、国際公開第2011120053号パンフレット（これらの内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）に記載される通りの修飾ポリマー（例えば、限定はしないが、修飾ポリアセタールなど）であってもよい。

10

【0616】

ペプチド及びタンパク質

本発明のキメラポリヌクレオチドは、キメラポリヌクレオチドによる細胞のトランスフェクションを増大するために、ペプチド及び/又はタンパク質と一緒に製剤化することができる。本発明で用いることができるペプチド及び/又はタンパク質は、同時係属国際公開第2015034928号パンフレット（その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）の параграф [000567] ~ [000570] に記載されている。

20

【0617】

細胞

本発明のキメラポリヌクレオチドは、*ex vivo*で細胞にトランスフェクトすることができ、続いて、その細胞を対象に移植する。非制限的例として、医薬組成物は、修飾RNAを肝臓及び骨髄性細胞に送達するための赤血球、ウイルス様粒子（VLP）中で修飾RNAを送達するためピロソーム、並びに電気穿孔細胞、例えば、限定はしないが、同時係属国際公開第2015034928号パンフレット（その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）の параграф [000571] ~ [000573] に記載されているものなどを含んでもよい。

【0618】

細胞への導入

細胞への核酸の導入のためには、ウイルス媒介性及び非ウイルス媒介性の技術を含め、様々な方法が当技術分野において公知であり、且つ好適である。本発明で用いることができる導入方法の例は、同時係属国際公開第2015034928号パンフレット（その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）の параграф [000574] ~ [000576] に記載されている。

30

【0619】

微小器官 (Micro-Organ)

キメラポリヌクレオチドは、微小器官に含有させてもよく、これが、その後、持続的な治療製剤において目的のコードされたポリペプチドを発現することができる。本発明で用いることができる微小器官は、同時係属国際公開第2015034928号パンフレット（その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）の параграф [000577] ~ [000580] に記載されている。

40

【0620】

ヒアルロニダーゼ

本発明のキメラポリヌクレオチドの筋肉内又は皮下局所注射は、ヒアルロニダーゼの加水分解を触媒するヒアルロニダーゼを含有することができる。ヒアルロニダーゼは、間質バリアの構成要素であるヒアルロニダーゼの加水分解を触媒することによって、ヒアルロニダーゼの粘度を低下させ、これにより組織透過性を高める（フロスト (Frost) 著、エキスパート・オピニオン・オン・ドラッグ・デリバリー (Expert Opin. Drug Deliv.)、2007年、第4巻、p. 427 ~ 440；これは、全体として参照によ

50

り本明細書に組み込む)。ヒアルロニダーゼは、その分散及びトランスフェクト細胞により産生される、コードされたタンパク質の全身分布を速めるのに有用である。あるいは、ヒアルロニダーゼを用いて、筋肉内投与又は皮下投与された本発明のキメラポリヌクレオチドに曝露される細胞の数を増加させることができる。

【0621】

ナノ粒子模倣体

本発明のキメラポリヌクレオチドは、ナノ粒子模倣体に封入してもよいし、及び/又はナノ粒子模倣体に吸収させてもよい。ナノ粒子模倣体は、送達機能生物又は粒子、例えば、限定はしないが、病原体、ウイルス、細菌、真菌、寄生体、プリオン及び細胞を模倣することができる。非制限的例として、本発明のキメラポリヌクレオチドは、ウイルスの送達機能を模倣することができる非プリオン粒子に封入してもよい(国際公開第2012006376号パンフレット及び米国特許出願公開第20130171241号明細書及び同第20130195968号明細書を参照のこと;これらの内容は、それぞれ全体として参照により本明細書に組み込む)。

10

【0622】

ナノチューブ

本発明のキメラポリヌクレオチドは、少なくとも1つのナノチューブ、例えば、限定はしないが、ロゼットナノチューブ、リンカーを含むツインベースを有するロゼットナノチューブ、カーボンナノチューブ及び/又は単層カーボンナノチューブに付着、あるいは、結合させることができる。本発明で用いることができるナノチューブは、同時係属国際公開第2015034928号パンフレット(その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む)のパラグラフ[000583]~[000587]に記載されている。

20

【0623】

コンジュゲート

本発明のキメラポリヌクレオチドは、コンジュゲート、例えば、担体若しくはターゲティング基に共有結合したキメラポリヌクレオチド、あるいは一緒に融合タンパク質(例えば、ターゲティング基と治療用タンパク質若しくはペプチドを有する)を生成する2つのコード領域を含むコンジュゲートを含む。

【0624】

本発明のコンジュゲートとしては、タンパク質(例えば、ヒト血清アルブミン(HSA)、低密度リポタンパク質(LDL)、高密度リポタンパク質(HDL)、又はグロブリン);炭水化物(例えば、デキストラン、プルラン、キチン、キトサン、イヌリン、シクロデキストリン又はヒアルロン酸);又は脂質などの、天然に存在する物質が挙げられる。リガンドはまた、組換え分子又は合成分子、例えば、合成ポリマー、例えば、合成ポリアミノ酸、オリゴヌクレオチド(例えば、アプタマー)であってもよい。ポリアミノ酸の例としては、ポリリジン(PLL)、ポリL-アスパラギン酸、ポリL-グルタミン酸、スチレン-マレイン酸無水物コポリマー、ポリ(L-ラクチド-コ-グリコリド)コポリマー、ジビニルエーテル-マレイン酸無水物コポリマー、N-(2-ヒドロキシプロピル)メタクリルアミドコポリマー(HMPA)、ポリエチレングリコール(PEG)、ポリビニルアルコール(PVA)、ポリウレタン、ポリ(2-エチルアクリル酸)、N-イソプロピルアクリルアミドポリマー、又はポリホスファジンなどの、ポリアミノ酸が挙げられる。ポリアミンの例としては、以下のものが挙げられる:ポリエチレンジアミン、ポリリジン(PLL)、スペルミン、スペルミジン、ポリアミン、偽ペプチド-ポリアミン、ペプチド模倣ポリアミン、 dendrogram-polyamine、アルギニン、アミジン、プロタミン、カチオン性脂質、カチオン性ポルフィリン、ポリアミンの第四級塩、又はヘリックスペプチド。

30

40

【0625】

特にRNAとの、ポリヌクレオチドコンジュゲートの調製を教示する代表的な米国特許としては、限定はしないが、米国特許第4,828,979号明細書;同第4,948,882号明細書;同第5,218,105号明細書;同第5,525,465号明細書;

50

同第5, 541, 313号明細書; 同第5, 545, 730号明細書; 同第5, 552, 538号明細書; 同第5, 578, 717号明細書、同第5, 580, 731号明細書; 同第5, 591, 584号明細書; 同第5, 109, 124号明細書; 同第5, 118, 802号明細書; 同第5, 138, 045号明細書; 同第5, 414, 077号明細書; 同第5, 486, 603号明細書; 同第5, 512, 439号明細書; 同第5, 578, 718号明細書; 同第5, 608, 046号明細書; 同第4, 587, 044号明細書; 同第4, 605, 735号明細書; 同第4, 667, 025号明細書; 同第4, 762, 779号明細書; 同第4, 789, 737号明細書; 同第4, 824, 941号明細書; 同第4, 835, 263号明細書; 同第4, 876, 335号明細書; 同第4, 904, 582号明細書; 同第4, 958, 013号明細書; 同第5, 082, 830号明細書; 同第5, 112, 963号明細書; 同第5, 214, 136号明細書; 同第5, 082, 830号明細書; 同第5, 112, 963号明細書; 同第5, 214, 136号明細書; 同第5, 245, 022号明細書; 同第5, 254, 469号明細書; 同第5, 258, 506号明細書; 同第5, 262, 536号明細書; 同第5, 272, 250号明細書; 同第5, 292, 873号明細書; 同第5, 317, 098号明細書; 同第5, 371, 241号明細書、同第5, 391, 723号明細書; 同第5, 416, 203号明細書、同第5, 451, 463号明細書; 同第5, 510, 475号明細書; 同第5, 512, 667号明細書; 同第5, 514, 785号明細書; 同第5, 565, 552号明細書; 同第5, 567, 810号明細書; 同第5, 574, 142号明細書; 同第5, 585, 481号明細書; 同第5, 587, 371号明細書; 同第5, 595, 726号明細書; 同第5, 597, 696号明細書; 同第5, 599, 923号明細書; 同第5, 599, 928号明細書及び同第5, 688, 941号明細書; 同第6, 294, 664号明細書; 同第6, 320, 017号明細書; 同第6, 576, 752号明細書; 同第6, 783, 931号明細書; 同第6, 900, 297号明細書; 同第7, 037, 646号明細書が挙げられ; これらの各々は、全体として参照により本明細書に組み込むものとする。

【0626】

一実施形態では、本発明のコンジュゲートは、本発明のキメラポリヌクレオチドの担体として機能し得る。コンジュゲートは、カチオン性ポリマー、例えば、限定はしないが、ポリアミン、ポリリジン、ポリアルキレンイミン、及びポリエチレンイミンを含んでもよく、これは、ポリ(エチレングリコール)でグラフト処理してもよい。非制限的例として、コンジュゲートは、米国特許第6, 586, 524号明細書(これは、全体を参照により本明細書に組み込む)に記載されているポリマーコンジュゲート及びポリマーコンジュゲートの合成方法と類似していてもよい。

【0627】

基質との共役の方法の非制限的例が、米国特許出願公開第20130211249号明細書(この内容は、全体を参照により本明細書に組み込む)に記載されている。この方法を用いて、キメラポリヌクレオチドを含む共役ポリマー粒子を製造することができる。

【0628】

コンジュゲートはまた、ターゲティング基、例えば、細胞若しくは組織ターゲティング剤、例えば、腎細胞などの指定細胞型に結合する、レクチン、糖タンパク質、脂質、又はタンパク質、例えば抗体も含むことができる。ターゲティング基は、サイトロピン、メラントロピン、レクチン、糖タンパク質、サーファクタントタンパク質A、ムチン炭水化物、多価ラクトース、多価ガラクトース、N-アセチル-ガラクトサミン、N-アセチル-グルコサミン多価マンノース、多価フコース、グリコシル化ポリアミノ酸、多価ガラクトース、トランスフェリン、ビスホスホネート、ポリグルタメート、ポリアスパルテート、脂質、コレステロール、ステロイド、胆汁酸、葉酸塩、ビタミンB12、ピオチン、RGDペプチド、RGDペプチド模倣体又はアプタマーであってもよい。

【0629】

ターゲティング基は、タンパク質、例えば、糖タンパク質、又はペプチド、例えば、コリガンドに対して特異的な親和性を有する分子、又は抗体、例えば、癌細胞、内皮細胞、

10

20

30

40

50

若しくは骨細胞などの指定細胞型に結合する抗体であってもよい。ターゲティング基はまた、ホルモン及びホルモン受容体も含み得る。ターゲティング基はさらに、脂質、レクチン、炭水化物、ビタミン、補因子、多価ラクトース、多価ガラクトース、N - アセチル - ガラクトサミン、N - アセチル - グルコサミン多価マンノース、多価フコース、又はアプタマーなどの非ペプチド種も含み得る。リガンドは、例えば、リボ多糖、又は p 3 8 M A P キナーゼのアクチベータであってもよい。

【 0 6 3 0 】

ターゲティング基は、特定の受容体をターゲティングすることができる任意のリガンドであってもよい。例としては、限定なしに、葉酸塩、G a l N A c、ガラクトース、マンノース、マンノース - 6 P、アプタマー、インテグリン受容体リガンド、ケモカイン受容体リガンド、トランスフェリン、ビオチン、セロトニン受容体リガンド、P S M A、エンドセリン、G C P I I、ソマトスタチン、L D L、及びH D Lリガンドが挙げられる。具体的な実施形態において、ターゲティング基はアプタマーである。アプタマーは修飾されていなくてもよいし、又は本明細書に開示する修飾の任意の組み合わせを有していてもよい。

10

【 0 6 3 1 】

非制限的例として、ターゲティング基は、血液 - 中枢神経系関門を介した標的送達のためのグルタチオン受容体 (G R) 結合コンジュゲートであってもよい (例えば、米国特許出願公開第 2 0 1 3 0 2 1 6 6 1 0 1 2 号明細書を参照のこと ; その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む) 。

20

【 0 6 3 2 】

一実施形態では、本発明のコンジュゲートは、相乗作用生体分子 - ポリマーコンジュゲートであってもよい。相乗作用生体分子 - ポリマーコンジュゲートは、より大きな治療効果をもたらすように、長時間作用型の連続放出系であってもよい。相乗作用生体分子 - ポリマーコンジュゲートは、米国特許出願公開第 2 0 1 3 0 1 9 5 7 9 9 号明細書 (その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む) に記載されているものであってもよい。

【 0 6 3 3 】

別の実施形態では、本発明で用いることができるコンジュゲートは、アプタマーコンジュゲートであってもよい。アプタマーコンジュゲートの非制限的例は、国際公開第 2 0 1 2 0 4 0 5 2 4 号パンフレット (その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む) に記載されている。アプタマーコンジュゲートを用いて、キメラポリヌクレオチドを含む製剤の標的送達を達成することができる。

30

【 0 6 3 4 】

一実施形態では、本発明で用いることができるコンジュゲートは、アミン含有ポリマーコンジュゲートであってもよい。アミン含有ポリマーコンジュゲートの非制限的例は、米国特許第 8 , 5 0 7 , 6 5 3 号明細書 (その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む) に記載されている。因子 I X 部分ポリマーコンジュゲートは、対象への送達時及び / 又は送達後に、キメラポリヌクレオチドを放出するように、解離性結合を含んでもよい。

40

【 0 6 3 5 】

一実施形態では、本発明の医薬組成物は、限定はしないが、ロックド核酸に類似する修飾などの化学修飾を含んでもよい。

サンタリス (S a n t a r i s) のものなどの、ロックド核酸 (L N A) の調製を教示する代表的な米国特許として、限定はしないが、以下のものが挙げられる : 米国特許第 6 , 2 6 8 , 4 9 0 号明細書 ; 同第 6 , 6 7 0 , 4 6 1 号明細書 ; 同第 6 , 7 9 4 , 4 9 9 号明細書 ; 同第 6 , 9 9 8 , 4 8 4 号明細書 ; 同第 7 , 0 5 3 , 2 0 7 号明細書 ; 同第 7 , 0 8 4 , 1 2 5 号明細書 ; 及び同第 7 , 3 9 9 , 8 4 5 号明細書 ; これらの各々は、全体として参照により本明細書に組み込むものとする。

【 0 6 3 6 】

50

PNA化合物の調製を教示する代表的な米国特許として、限定はしないが、米国特許第5,539,082号明細書；同第5,714,331号明細書；及び同第5,719,262号明細書が挙げられ、これらの各々は、参照により本明細書に組み込むものとする。PNA化合物のさらなる教示は、例えば、ニールセン(Nielson)ら著、サイエンス(Science)、1991年、第254巻、p.1497~1500に見出すことができる。

【0637】

本発明で取り上げる一部の実施形態は、ホスホロチオエート骨格を有するキメラポリヌクレオチド、並びに他の修飾骨格、特に、前文で参照される米国特許第5,489,677号明細書の $-CH_2-NH-CH_2-$ 、 $-CH_2-N(CH_3)-O-CH_2-$ [メチレン(メチルイミノ)又はMMI骨格として知られる]、 $-CH_2-O-N(CH_3)-CH_2-$ 、 $-CH_2-N(CH_3)-N(CH_3)-CH_2-$ 及び $-N(CH_3)-CH_2-CH_2-$ [ここで、ネイティブリン酸ジエステル骨格は、 $-O-P(O)_2-O-CH_2-$ として表される]、並びに前文で参照される米国特許第5,602,240号明細書のアミド骨格を有するオリゴヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、本明細書で取り上げるキメラポリヌクレオチドは、前文で参照される米国特許第5,034,506号明細書のモルホリノ骨格構造を有する。

10

【0638】

2'位の修飾もまた、送達を補助し得る。2'位の修飾は、ポリペプチドコード配列に位置せず、すなわち翻訳可能領域に位置しないのが好ましい。2'位の修飾は、5'UTR、3'UTR及び/又はテイル付加領域に位置してもよい。2'位の修飾は、以下のうちの1つを2'位に含むことができる：H(すなわち、2'-デオキシ)；F；O-、S-、若しくはN-アルキル；O-、S-、若しくはN-アルケニル；O-、S-又はN-アルキニル；又はO-アルキル-O-アルキル、ここで、アルキル、アルケニル及びアルキニルは、置換若しくは非置換 $C_1 \sim C_{10}$ アルキル又は $C_2 \sim C_{10}$ アルケニル及びアルキニルであってよい。好適な例示的修飾としては、 $O[(CH_2)_nO]_mCH_3$ 、 $O(CH_2)_nOCH_3$ 、 $O(CH_2)_nNH_2$ 、 $O(CH_2)_nCH_3$ 、 $O(CH_2)_nOCH_2$ 、及び $O(CH_2)_nON[(CH_2)_nCH_3]_2$ が挙げられ、式中、n及びmは、1~約10である。他の実施形態では、キメラポリヌクレオチドは、以下のうちの1つを2'位に含む： $C_1 \sim C_{10}$ 低級アルキル、置換低級アルキル、アルカリアル、アラルキル、O-アルカリアル又はO-アラルキル、SH、SCH₃、OCN、Cl、Br、CN、CF₃、OCF₃、SOCH₃、SO₂CH₃、ONO₂、NO₂、N₃、NH₂、ヘテロシクロアルキル、ヘテロシクロアルカリアル、アミノアルキルアミノ、ポリアルキルアミノ、置換シリル、RNA開裂基、リポータ基、インターカレータ、薬物動態学的特性を改善する基、又は薬力学的特性を改善する基、及び同様の特性を有する他の置換基。一部の実施形態では、修飾は、2'-メトキシエトキシ(2'-O-CH₂CH₂OCH₃、また、2'-O-(2'-メトキシエチル)又は2'-MOEとしても知られる)(マーチン(Martin)ら著、ヘルベチカ・キミカ・アクタ(Helv.Chim.Acta)、1995年、第78巻、p.486~504)、すなわち、アルコキシ-アルコキシ基を含む。別の例示的修飾は、2'-ジメチルアミノオキシエトキシ、すなわち、本明細書において以下の例に記載する通りの、2'-DMAOEとしても知られる $O(CH_2)_2ON(CH_3)_2$ 基、及び2'-ジメチルアミノエトキシエトキシ(当技術分野において2'-O-ジメチルアミノエトキシエチル又は2'-DMAEOEとしても知られる)、すなわち、同様に本明細書において以下の例に記載する通りの、2'-O-CH₂-O-CH₂-N(CH₂)₂である。他の修飾には、2'-メトキシ(2'-OCH₃)、2'-アミノプロポキシ(2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂)及び2'-フルオロ(2'-F)がある。さらに、他の位置、特に3'末端ヌクレオチド上の糖の3'位又は2'-5'連結dsRNA及び5'末端ヌクレオチドの5'位に、同様の修飾を実施してもよい。本発明のポリヌクレオチドはまた、ペントフラノシル糖の代わりにシクロブチル部分などの糖模倣体を有してもよい。こうした修飾糖構造の調製を教示する代表的

20

30

40

50

な米国特許として、限定はしないが、米国特許第 4, 981, 957 号明細書；同第 5, 118, 800 号明細書；同第 5, 319, 080 号明細書；同第 5, 359, 044 号明細書；同第 5, 393, 878 号明細書；同第 5, 446, 137 号明細書；同第 5, 466, 786 号明細書；同第 5, 514, 785 号明細書；同第 5, 519, 134 号明細書；同第 5, 567, 811 号明細書；同第 5, 576, 427 号明細書；同第 5, 591, 722 号明細書；同第 5, 597, 909 号明細書；同第 5, 610, 300 号明細書；同第 5, 627, 053 号明細書；同第 5, 639, 873 号明細書；同第 5, 646, 265 号明細書；同第 5, 658, 873 号明細書；同第 5, 670, 633 号明細書；及び同第 5, 700, 920 号明細書が挙げられ、これらの各々の内容は、全体として参照により本明細書に組み込むものとする。

10

【0639】

さらに他の実施形態では、キメラポリヌクレオチドを細胞透過性ポリペプチドと共有結合により共役させる。細胞透過性ペプチドはまた、シグナル配列を含んでもよい。本発明のコンジュゲートは、高い安定性；高い細胞トランスフェクション；及び/又は改変された生体分布（例えば、特定の組織若しくは細胞型にターゲティングされる）を有するように設計することができる。

【0640】

一実施形態では、キメラポリヌクレオチドは、送達を促進する薬剤と共役させてもよい。非制限的例として、この薬剤は、モノマー又はポリマー、例えば、国際公開第 2011062965 号パンフレット（これは、全体を参照により本明細書に組み込む）に記載されている通りのターゲティングモノマー又はターゲティングブロックを有するポリマーであってもよい。別の非制限的例では、上記薬剤は、本発明のキメラポリヌクレオチドと共有結合によりカップリングされた輸送剤であってもよい（例えば、米国特許第 6, 835, 393 号明細書及び同第 7, 374, 778 号明細書を参照のこと；これらの各々は、全体を参照により本明細書に組み込む）。また別の非制限的例では、上記薬剤は、米国特許第 7, 737, 108 号明細書及び同第 8, 003, 129 号明細書（これらの各々は、全体を参照により本明細書に組み込む）に記載のものなどの膜障壁輸送促進剤であってもよい。

20

【0641】

別の非制限的例では、キメラポリヌクレオチドは、スマート・ポリマー・テクノロジー（SMARTT POLYMER TECHNOLOGY）（登録商標）（フェーズRX（登録商標）社（PHASERX Inc.）、ワシントン州シアトル）共役させてもよい。

30

【0642】

別の態様では、コンジュゲートは、ナノ粒子を組織又は臓器内でニューロンに選択的に誘導するペプチドであってもよい。非制限的例として、用いられるペプチドは、限定はしないが、米国特許出願公開第 20130129627 号明細書（これは、全体として参照により本明細書に組み込む）に記載されているペプチドであってもよい。

【0643】

また別の態様では、コンジュゲートは、血液脳関門を通過するのを補助することができるペプチドであってもよい。

40

自己集合ナノ粒子

本発明で用いることができる自己集合ナノ粒子（核酸自己集合ナノ粒子、及びポリマーベースの自己集合ナノ粒子など）は、同時係属国際公開第 2015034928 号パンフレット（その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）のパラグラフ [000610] ~ [000619] に記載されている。

【0644】

自己集合高分子

キメラポリヌクレオチドは、送達のために両親媒性高分子（AM）に製剤化することができる。AM は、ポリ（エチレングリコール）に共有結合したアルキル化糖骨格を有する

50

生分解性両親媒性ポリマーを含む。水溶液中で、AMは自己集合して、ミセルを形成する。AMを形成する方法及びAMの非制限的例は、米国特許出願公開第20130217753号明細書（その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）に記載されている。

【0645】

無機ナノ粒子

本発明のキメラポリヌクレオチドは、無機ナノ粒子に製剤化することができる（米国特許第8,257,745号明細書；これは、全体として参照により本明細書に組み込む）。無機ナノ粒子には、限定はしないが、水膨潤性の粘土物質がある。非制限的例として、無機ナノ粒子は、単純なケイ酸塩から製造される合成スメクタイト粘土を含んでもよい（例えば、米国特許第5,585,108号明細書及び同第8,257,745号明細書を参照のこと；これらの各々は、全体として参照により本明細書に組み込む）。

10

【0646】

一実施形態では、無機ナノ粒子は、本明細書に開示するキメラポリヌクレオチドのコアとポリマーシェルを含んでもよい。ポリマーシェルは、本明細書に記載するポリマーのいずれであってもよく、これらは、当技術分野において公知である。別の実施形態では、ポリマーシェルを用いて、コア中のキメラポリヌクレオチドを保護することができる。

【0647】

半導電性及び金属ナノ粒子

本発明のキメラポリヌクレオチドは、半導電性若しくは金属材料を含む水分散性ナノ粒子に製剤化しても（米国特許出願公開第20120228565号明細書；これは、全体として参照により本明細書に組み込む）、又は磁気ナノ粒子に形成してもよい（米国特許出願公開第20120265001号明細書及び同第20120283503号明細書；これらの各々は、全体として参照により本明細書に組み込む）。水分散性ナノ粒子は、疎水性ナノ粒子又は親水性ナノ粒子のいずれであってもよい。

20

【0648】

一実施形態では、半導電性及び/又は金属ナノ粒子は、本明細書に開示するキメラポリヌクレオチドのコアと、ポリマーシェルを含み得る。ポリマーシェルは、本明細書に記載するポリマーのいずれであってもよく、これらは、当技術分野において公知である。別の実施形態では、ポリマーシェルを用いて、コア中のキメラポリヌクレオチドを保護することができる。

30

【0649】

外科密閉剤：ゲル及びハイドロゲル

一実施形態では、本明細書に開示するキメラポリヌクレオチドは、当技術分野で公知の任意のハイドロゲルに封入してもよく、ハイドロゲルは、対象に注射するとゲルを形成し得る。ハイドロゲルは、親水性であるポリマー鎖のネットワークであり、水が分散媒であるコロイドゲルとして存在することもある。ハイドロゲルは、高度に吸収性（99%超の水を含有し得る）の天然又は合成ポリマーである。ハイドロゲルはまた、大きな含水率のために、天然の組織に極めて類似する柔軟度も有する。本明細書に記載するハイドロゲルを用いて、生体適合性、生分解性及び/又は多孔質である脂質ナノ粒子を封入することができる。ハイドロゲルは、注射液から *in situ* で製造することもできるし、又は移植することもできる。本発明で用いることができるゲル及びハイドロゲルは、同時係属国際公開第2015034928号パンフレット（その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）のパラグラフ[000624]～[000663]に記載されている。

40

【0650】

懸濁液製剤

一実施形態では、キメラポリヌクレオチド、不水溶性油デポー剤、界面活性剤及び/若しくは補助界面活性剤並びに/又は共溶剤を含む懸濁液製剤が提供される。油及び界面活性剤の組み合わせは、キメラポリヌクレオチドを含む懸濁液製剤を可能にし得る。不水溶性デポー剤中でのキメラポリヌクレオチドの送達を用いて、デポー剤から周囲の生理

50

学的環境への mRNA の持続放出により生体利用可能性を改善すると共に、ヌクレアーゼによるキメラポリヌクレオチド分解を阻止することができる。本発明に用いることができる懸濁液製剤は、同時係属国際公開第 2015034928 号パンフレット（その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）のパラグラフ [000664] ~ [000670] に記載されている。

【0651】

カチオン及びアニオン

本明細書に開示するキメラポリヌクレオチドの製剤は、カチオン又はアニオンを含んでもよい。一実施形態では、製剤は、限定はしないが、金属カチオン、例えば、 Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Mg^{+} 及びこれらの組み合わせなどを含む。非制限的例として、製剤は、金属カチオンと複合体化したポリマー及びキメラポリヌクレオチドを含んでもよい（例えば、米国特許第 6,265,389 号明細書及び同第 6,555,525 号明細書を参照のこと；これらの各々は、全体として参照により本明細書に組み込む）。

10

【0652】

一実施形態では、二価及び一価カチオンの組み合わせを有するカチオン性ナノ粒子をキメラポリヌクレオチドと一緒に製剤化することができる。こうしたナノ粒子は、所与の期間（例えば、数時間、数日など）にわたって溶液中に自然に形成され得る。こうしたナノ粒子は、二価カチオンのみの存在下、又は一価カチオンのみの存在下では形成されない。カチオン性ナノ粒子中での、又はカチオン性ナノ粒子を含む 1 種又は複数のデポー剤中でのキメラポリヌクレオチドの送達は、長時間作用デポー剤として作用する、及び/又はヌクレアーゼによる分解の速度を低下させることにより、キメラポリヌクレオチドの生体利用可能性を改善することができる。

20

【0653】

成形ナノ粒子及びマイクロ粒子

本明細書に開示するキメラポリヌクレオチドは、ナノ粒子及び/又はマイクロ粒子に製剤化することができる。これらのナノ粒子及び/又はマイクロ粒子は、任意のサイズ形状及び化学に成形することができる。一例として、ナノ粒子及び/又はマイクロ粒子は、リクィダ・テクノロジーズ (LIUIDA TECHNOLOGIES) (登録商標) (ノースカロライナ州モリスビル) によるプリント (PRINT) (登録商標) 技術を用いて製造することができる（例えば、国際公開第 2007024323 号パンフレットを参照のこと；その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）。

30

【0654】

一実施形態では、成形ナノ粒子は、本明細書に開示するキメラポリヌクレオチドのコアと、ポリマーシェルを含んでもよい。ポリマーシェルは、本明細書に開示の、及び当技術分野で公知のポリマーのいずれであってもよい。別の実施形態では、ポリマーシェルを用いて、コア中のキメラポリヌクレオチドを保護することができる。

【0655】

一実施形態では、本発明のキメラポリヌクレオチドは、マイクロ粒子に製剤化することができる。マイクロ粒子は、キメラポリヌクレオチドのコアと、生体適合性及び/若しくは生分解性ポリマーの皮質を含有し得る。非制限的例として、本発明で用いることができるマイクロ粒子は、米国特許第 8,460,709 号明細書、米国特許出願公開第 20130129830 号明細書及び国際公開第 2013075068 号パンフレット（これらの各々は、全体として参照により本明細書に組み込む）に記載されているものであってよい。別の非制限的例として、マイクロ粒子は、所望の時間にわたって本発明のキメラポリヌクレオチドの放出を持続するように設計してもよい（例えば、米国特許出願公開第 20130129830 号明細書の「治療用タンパク質の徐放 (extended release of a therapeutic protein)」を参照のこと；この文献は、全体として参照により本明細書に組み込む）。

40

【0656】

本発明で使用されるマイクロ粒子は、少なくとも 1 ミクロン ~ 少なくとも 100 ミクロ

50

ン（例えば、少なくとも1ミクロン、少なくとも5ミクロン、少なくとも10ミクロン、少なくとも15ミクロン、少なくとも20ミクロン、少なくとも25ミクロン、少なくとも30ミクロン、少なくとも35ミクロン、少なくとも40ミクロン、少なくとも45ミクロン、少なくとも50ミクロン、少なくとも55ミクロン、少なくとも60ミクロン、少なくとも65ミクロン、少なくとも70ミクロン、少なくとも75ミクロン、少なくとも80ミクロン、少なくとも85ミクロン、少なくとも90ミクロン、少なくとも95ミクロン、少なくとも97ミクロン、少なくとも99ミクロン、及び少なくとも100ミクロン）の直径を有し得る。

【0657】

ナノジャケット (Nano Jacket) 及びナノリポソーム (Nano Liposome)

本明細書に開示するキメラポリヌクレオチドは、キーストーンナノ (Keystone Nano) (ペンシルベニア州ステートカレッジ) により、ナノジャケット及びナノリポソームに製剤化することができる。ナノジャケットは、カルシウム、リン酸塩など、体内に自然に存在する化合物から構成されるが、少量のケイ酸塩を含む場合もある。ナノジャケットは、5～50nmの粒度であってよく、これを用いて、親水性及び疎水性化合物、例えば、限定はしないが、キメラポリヌクレオチドを送達することができる。

【0658】

ナノリポソームは、限定はしないが、体内に自然に存在する脂質などの脂質から構成される。ナノリポソームは、60～80nmの粒度であってよく、これを用いて、親水性及び疎水性化合物、例えば、限定はしないが、キメラポリヌクレオチドを送達することができる。一態様では、本明細書に開示するキメラポリヌクレオチドは、限定はしないが、セラミド・ナノリポソーム (Ceramide Nano Liposome) などのナノリポソームに製剤化される。

【0659】

プソイドビリオン (Pseudovirion)

一実施形態では、本明細書に開示するキメラポリヌクレオチドは、プソイドビリオン（例えば、偽ビリオン）に製剤化することができる。本発明で用いることができるプソイドビリオンは、同時係属国際公開第2015034928号パンフレット（その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）のパラグラフ [000679]～[000684] に記載されている。

【0660】

ミニ細胞

一態様では、キメラポリヌクレオチドを細菌ミニ細胞に製剤化することができる。非制限的例として、細菌ミニ細胞は、国際公開第2013088250号パンフレット及び米国特許出願公開第20130177499号明細書（これらの各々は、全体として参照により本明細書に組み込む）に記載されているものであってよい。本明細書に記載するキメラポリヌクレオチドなどの治療薬を含む細菌ミニ細胞を用いて、治療薬を脳腫瘍に送達することができる。

【0661】

半固体組成物

一実施形態では、キメラポリヌクレオチドは、疎水性マトリックスと一緒に製剤化して、半固体組成物を形成することができる。非制限的例として、半固体組成物又はペースト様組成物は、国際公開第201307604号パンフレット（これは、全体として参照により本明細書に組み込む）に記載の方法により製造することができる。半固体組成物は、国際公開第201307604号パンフレット（これは、全体として参照により本明細書に組み込む）に記載される通りの持続放出製剤であってもよい。

【0662】

別の実施形態では、半固体組成物は、組成物の周囲に形成される微細孔膜又は生分解性ポリマーをさらに有し得る（例えば、国際公開第201307604号パンフレットを参

10

20

30

40

50

照のこと；これは、全体として参照により本明細書に組み込む）。

【0663】

本発明のキメラポリヌクレオチドを用いる半固体組成物は、国際公開第201307604号パンフレット（これは、全体として参照により本明細書に組み込む）に記載される通りの半固体混合物の特徴（例えば、少なくとも $10^{-4} \text{ N} \cdot \text{mm}^{-2}$ の弾性率、及び/又は少なくとも $100 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ の粘度）を有し得る。

【0664】

エキソソーム

一実施形態では、キメラポリヌクレオチドをエキソソームに製剤化してもよい。エキソソームに、少なくとも1つのキメラポリヌクレオチドをロードして、これを細胞、組織及び/又は生物に送達することができる。非制限的例として、キメラポリヌクレオチドは、国際公開第2013084000号パンフレット（これは、全体として参照により本明細書に組み込む）に記載のエキソソームにロードしてもよい。

10

【0665】

絹を用いた送達

一実施形態では、キメラポリヌクレオチドは、絹ベースの持続放出送達系に製剤化することができる。絹ベースの送達系は、絹フィブリン溶液と、治療薬、例えば、限定はしないが、本明細書に記載の及び/又は当技術分野で公知のキメラポリヌクレオチドを接触させることにより、形成することができる。非制限的例として、本発明で用いることができる絹ベースの持続放出送達系及びこうした系を製造する方法は、米国特許出願公開第20130177611号明細書（その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）に記載されている。

20

【0666】

マイクロ粒子

一実施形態では、キメラポリヌクレオチドを含む製剤は、マイクロ粒子を含んでもよい。マイクロ粒子は、本明細書に記載の及び/又は当技術分野で公知のポリマー、例えば、限定はしないが、ポリ（ α -ヒドロキシ酸）、ポリヒドロキシ酪酸塩、ポリカプロラクトン、ポリオルトエステル及びポリ無水物を含んでもよい。マイクロ粒子は、キメラポリヌクレオチドなどの生物活性分子を吸着する吸着性表面を有し得る。本発明で用いられるマイクロ粒子及びマイクロ粒子の製造方法の非制限的例は、米国特許出願公開第2013195923号明細書及び同第20130195898号明細書並びに米国特許第8,309,139号明細書及び同第8,206,749号明細書（これらの各々の内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）に記載されている。

30

【0667】

別の実施形態では、製剤は、マイクロ粒子とキメラポリヌクレオチドを含むマイクロエマルジョンであってもよい。非制限的例として、マイクロ粒子を含むマイクロエマルジョンは、米国特許出願公開第2013195923号明細書及び同第20130195898号明細書並びに米国特許第8,309,139号明細書及び同第8,206,749号明細書（これらの各々の内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）に記載されている。

40

【0668】

アミノ酸脂質

一実施形態では、キメラポリヌクレオチドは、アミノ酸脂質に製剤化することができる。アミノ酸脂質は、アミノ酸残基と、1つ又は複数の親油性テイルを含む親油性化合物である。アミノ酸脂質及びアミノ酸脂質の製造方法の非制限的例は、米国特許第8,501,824号明細書（その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）に記載されている。

【0669】

一実施形態では、アミノ酸脂質は、親水性部分と親油性部分を有する。親水性部分は、アミノ酸残基であってよく、親油性部分は、少なくとも1つの親油性テイルを含んでよい

50

。

【0670】

一実施形態では、アミノ酸脂質製剤を用いて、キメラポリヌクレオチドを対象に送達することができる。

別の実施形態では、アミノ酸脂質製剤は、放出可能な形態で、キメラポリヌクレオチドを送達することができ、この形態は、キメラポリヌクレオチドに結合して、これを放出するアミノ酸脂質を含む。非制限的例として、キメラポリヌクレオチドの放出は、酸不安定性リンカー、例えば、限定はしないが、米国特許第7,098,032号明細書、同第6,897,196号明細書、同第6,426,086号明細書、同第7,138,382号明細書、同第5,563,250号明細書、及び同第5,505,931号明細書（これらの各々の内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）に記載のものなどによって提供され得る。

10

【0671】

微小小胞体

一実施形態では、キメラポリヌクレオチドを微小小胞体に製剤化することができる。微小小胞体の非制限的例としては、米国特許出願公開第20130209544号明細書（その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）に記載されているものがある。

【0672】

一実施形態では、微小小胞体は、ARRDC1媒介性微小小胞体（ARMM）である。ARMM及びARMMの製造方法の非制限的例は、国際公開第2013119602号パンフレット（その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）に記載されている。

20

【0673】

高分子電解質間錯体

一実施形態では、キメラポリヌクレオチドを高分子電解質間錯体（interpolyelectrolyte complex）に製剤化することができる。高分子電解質間錯体は、電荷-動力学的ポリマーを1つ又は複数のアニオン分子と複合体化するとき、形成される。電荷-動力学的ポリマー及び高分子電解質間錯体並びに高分子電解質間錯体の製造方法の非制限的例は、米国特許第8,524,368号明細書（その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）に記載されている。

30

【0674】

結晶性ポリマー系

一実施形態では、キメラポリヌクレオチドを結晶性ポリマー系に製剤化することができる。結晶性ポリマー系は、結晶性部分及び/又は結晶性部分を含む末端単位を含むポリマーである。結晶性部分及び/又は結晶性部分を含む末端単位を有するポリマー（「CYCポリマー」と呼ばれる）、結晶性ポリマー系及びこうしたポリマー及びポリマー系の製造方法の非制限的例は、米国特許第8,524,259号明細書（その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）に記載されている。

【0675】

賦形剤

医薬製剤は、薬学的に許容される賦形剤をさらに含んでもよく、賦形剤は、本明細書で用いられるとき、所望される特定の剤形に適合するように、あらゆる溶媒、分散媒、希釈剤、又は他の液体ビヒクル、分散又は懸濁助剤、界面活性剤、等張剤、増粘剤又は乳化剤、防腐剤、固体結合剤、潤滑剤、香味剤、安定剤、抗酸化剤、容量オスモル濃度調節剤、pH調節剤などを含む。医薬組成物の製剤化に使用される様々な賦形剤及び組成物の調製方法は、当技術分野で公知である（レミングトン（Remington）著、「薬学の科学と実践（The Science and Practice of Pharmacy）」、第21版、A.R.ジェンナロ（A.R. Gennaro）（リップニコット、ウィリアムズ・アンド・ウィルキンス（Lippincott, Williams & Wilkins））、メリーランド州ボルティモア、2006年を参照；これは、全体として参照

40

50

により本明細書に組み込む)。従来の賦形剤媒体が、例えば、何らかの望ましくない生物学的作用を生み出すか、又はそうでなければ、医薬組成物のいずれかの他の成分と有害な形で相互作用するなどによって、物質若しくはその誘導体と不適合性となる場合を除いて、従来の賦形剤媒体の使用は本開示の範囲内で考慮され得る。

【0676】

一部の実施形態では、薬学的に許容される賦形剤は、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%、又は100%純粋であり得る。一部の実施形態では、賦形剤は、ヒトでの使用及び獣医学用途について承認されている。一部の実施形態では、賦形剤は、米国食品医薬品局(United States Food and Drug Administration)によって承認されている。一部の実施形態では、賦形剤は、医薬品グレードのものであってよい。一部の実施形態では、賦形剤は、米国薬局方(United States Pharmacopoeia)(USP)、欧州薬局方(European Pharmacopoeia)(EP)、英国薬局方(British Pharmacopoeia)、及び/又は国際薬局方(International Pharmacopoeia)の基準を満たすものであってよい。

10

【0677】

医薬組成物の製造に使用される薬学的に許容される賦形剤としては、限定はしないが、不活性希釈剤、分散剤及び/又は造粒剤、界面活性剤及び/又は乳化剤、崩壊剤、結合剤、防腐剤、バッファー、潤滑剤、及び/又は油が挙げられる。こうした賦形剤は、任意選択で、医薬組成物中に含有させることができる。組成物はさらに、カカオ脂及び座薬用ワックス、着色剤、コーティング剤、甘味料、香味料、及び/又は芳香剤などの賦形剤を含んでもよい。

20

【0678】

例示的な希釈剤、造粒剤及び/又は分散剤、界面活性剤及び/又は乳化剤、結合剤、防腐剤、バッファー、潤滑剤、油、添加剤、カカオ脂及び座薬用ワックス、着色剤、コーティング剤、甘味料、香味料、及び/又は芳香剤は、同時係属国際公開第2015038892号パンフレット(その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む)において、例えば、限定はしないが、パラグラフ[000828]~[000838]に記載されている。

30

【0679】

mRNAの凍結防止剤

一部の実施形態では、キメラポリヌクレオチド製剤は、凍結防止剤を含んでもよい。本明細書で用いられるとき、用語「凍結防止剤」は、所与の物質と組み合わせると、凍結時に起こる物質への損傷を軽減するのを助けるか、又は損傷を排除する1種又は複数種の薬剤を指す。一部の実施形態では、凍結防止剤をキメラポリヌクレオチドと組み合わせることにより、凍結時にこれらを安定化させる。キメラポリヌクレオチドの長期(例えば、36ヵ月)安定性のためには、-20~-80のmRNAの凍結保存が有利であると考えられる。一部の実施形態では、キメラポリヌクレオチド製剤に凍結防止剤を含有させることにより、凍結/解凍サイクルから、並びに凍結保存条件下でキメラポリヌクレオチドを安定化させる。本発明の凍結防止剤として、限定はしないが、スクロース、トレハロース、ラクトース、グリセロール、デキストロース、ラフィノース及び/又はマンニトールが挙げられる。トレハロースは、米国食品医薬品局(Food and Drug Administration)により一般に安全と認められる(GRAS)ものとして列記されており、商業的医薬製剤で一般的に使用されている。

40

【0680】

充填剤

一部の実施形態では、キメラポリヌクレオチド製剤は、充填剤を含んでもよい。本明細書で用いられるとき、用語「充填剤」は、製剤に所望の粘稠性を、及び/又は製剤成分の安定性を付与するために、製剤に含有させる1種又は複数種の薬剤を指す。一部の実施形

50

態では、凍結乾燥したキメラポリヌクレオチド製剤に充填剤を含有させることにより、「薬学的に洗練された (pharmaceutically elegant)」ケーキを取得し、長期 (例えば、36ヵ月) 保存の間、凍結乾燥したキメラポリヌクレオチドを安定化させる。本発明の充填剤は、限定はしないが、スクロース、トレハロース、マンニトール、グリシン、ラクトース及び/又はラフィノースを含んでもよい。一部の実施形態では、凍結防止剤及び充填剤の組み合わせ (例えば、スクロース/グリシン又はトレハロース/マンニトール) を含有させることにより、凍結中のキメラポリヌクレオチドを安定化すると同時に、凍結乾燥用の充填剤を提供することができる。

【0681】

本発明の製剤及びキメラポリヌクレオチドを製剤化するための方法の非制限的例は、2012年12月14日に出願された国際公開第2013090648号明細書 (その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む) に記載されている。

10

【0682】

不活性成分

一部の実施形態では、キメラポリヌクレオチド製剤は、不活性成分である少なくとも1種の賦形剤を含んでもよい。本明細書で用いられるとき、用語「不活性成分」は、製剤に含有させる1種又は複数種の不活性剤を指す。一部の実施形態では、本発明の製剤に用いることができる不活性成分の全部又は一部は、米国食品医薬品局 (US Food and Drug Administration) (FDA) により承認されていてもよいし、いずれも承認されていなくてもよい。

20

【0683】

製剤化することができる不活性成分の非網羅的リスト及び不活性成分の投与経路は、同時係属国際公開第2014152211号パンフレット (代理人整理番号M030) の表4に記載されている。

【0684】

送達

本開示は、薬物送達の科学において起こり得る進歩を考慮して、任意の適切な経路による治療、製薬、診断又はイメージングのいずれかの用途のキメラポリヌクレオチドの送達を包含する。送達は、裸の (naked) 送達又は製剤化された (formulated) 送達であってよい。

30

【0685】

裸の送達

本発明のキメラポリヌクレオチドは、細胞に裸で送達されてもよい。本明細書で使用される時、「裸の」は、トランスフェクションを促進する薬剤を含まないキメラポリヌクレオチドを送達することを指す。例えば、細胞に送達されるキメラポリヌクレオチドは、修飾を含まなくてもよい。裸のキメラポリヌクレオチドは、当技術分野において公知の、及び本明細書に記載される投与経路を用いて細胞に送達することができる。

【0686】

製剤化された送達

本発明のキメラポリヌクレオチドは、本明細書に記載する方法を用いて製剤化してもよい。製剤は、修飾されていても及び/又は修飾されていなくてもよいキメラポリヌクレオチドを含有し得る。製剤は、限定はしないが、細胞透過剤、薬学的に許容される担体、送達剤、生体侵食性又は生体適合性ポリマー、溶媒、及び持続放出送達デポ剤をさらに含む得る。製剤化されたキメラポリヌクレオチドは、当技術分野において公知の、及び本明細書に記載の投与経路を用いて細胞に送達することができる。

40

【0687】

組成物はまた、限定はしないが、直接浸漬若しくは浴 (bathing)、カテーテルの使用、ゲル、粉末、軟膏、クリーム、ゲル、ローション、及び/又は液滴剤、組成物を被覆若しくは含浸させた布又は生分解性材料等の支持体の使用など、当技術分野で公知の複数の方法のいずれかで臓器又は組織への直接送達のために製剤化することもできる。

50

【0688】

投与

本発明のキメラポリヌクレオチドは、治療に有効な転帰をもたらす任意の経路によって投与することもできる。これらには、限定はしないが、以下に挙げるものが含まれる：腸内（腸の中へ）、胃腸、硬膜外（硬膜の中へ）、経口（口を介して）、経皮、硬膜外、脳内（脳の中へ）、脳室内（脳室の中へ）、皮膚上（皮膚への塗布）、内皮（皮膚自体の中へ）、皮下（皮膚深部）、鼻投与（鼻を介して）、静脈内（静脈の中へ）、静脈内ポラス、静脈内持続注入、動脈内（動脈の中へ）、筋肉内（筋肉の中へ）、心臓内（心臓の中へ）、骨髄内輸液（骨髄の中へ）、髄腔内（脊柱管の中へ）、腹腔内（腹腔中への注入若しくは注射）、膀胱内注入、硝子体内（眼を介して）、空洞内注射（患部空洞の中へ）、腔内（陰茎基部の中へ）、腔内投与、子宮内、羊膜外投与、経皮（全身分布のためにインタクトな皮膚を介した拡散）、経粘膜（粘膜を介した拡散）、経膈、通気（鼻で吸う）、舌下、口唇下、浣腸、点眼剤（結膜上に）、点耳剤、耳介（耳内若しくは耳を介して）、頬（頬に向けて）、結膜、皮膚、歯（1つ又は複数の歯に対して）、電気浸透、子宮頸管内、静脈洞内（*endosinusal*）、気管内、体外、血液透析、浸潤、間質、腹部内、羊膜内、関節内、胆管内、気管支内、滑液嚢内、軟骨内（軟骨内）、尾側内（馬尾内）、槽内（後小脳延髄槽内）、角膜内（角膜内）、歯科イントラコルナル（*dental intracornal*）、冠動脈内（冠動脈内）、体内（*intracorporus*）海綿体（陰茎海綿体の膨張性空間）、椎間板内（椎間板内）、腺管内（腺管内）、十二指腸内（十二指腸内）、硬膜内（硬膜内若しくは硬膜下）、表皮内（表皮に向けて）、食道内（食道に向けて）、胃内（胃内）、歯肉内（歯肉内）、回腸内（小腸の末端部）、病巣内（局所病巣内若しくは病巣への直接導入）、管腔内（管腔内）、リンパ管内（リンパ管内）、髄質内（骨の髄腔内）、髄膜内（髄膜内）、眼球内（眼内）、卵巣内（卵巣内）、心膜内（心膜内）、胸膜内（胸膜内）、前立腺内（前立腺内）、肺内（肺若しくはその気管支内）、洞内（鼻内若しくは眼窩部副鼻腔内）、脊髄内（脊椎内）、髄液嚢内（関節の髄液腔内）、腱内（腱内）、精巣内（精巣内）、髄腔内（脳脊髄軸の任意のレベルの脳脊髄液内）、胸郭内（胸郭内）、細管内（臓器の細管内）、腫瘍内（腫瘍内）、鼓室内（中耳（*aurus*）内）、脈管内（1つ又は複数の脈管内）、心室内（心室内）、イオン導入（電流を用いて、可溶性塩のイオンを身体組織中に移動させる）、灌注（開放性損傷又は体腔を浸すか、若しくは洗い流す）、喉頭（喉頭に直接）、経鼻胃（鼻を介して胃の中へ）、密封包帯法（包帯で覆い、患部を密封する局所投与）、経眼（外眼部へ）、経口咽頭（口腔及び咽頭に直接）、非経口、経皮、関節周囲、硬膜外、神経周囲、歯周、直腸、呼吸器（局所若しくは全身効果のために口若しくは鼻からの吸入により気道内に）、球後（橋の後ろ若しくは眼球の後ろ）、柔組織、クモ膜下、結膜下、粘膜下、局所的、経胎盤（胎盤を介して、若しくは胎盤全体に）、経気管（気管の壁を介して）、経鼓室（鼓室を介して、若しくは鼓室全体に）、尿管（尿管に向けて）、尿道（尿道に向けて）、膈、仙骨ブロック、診断、神経ブロック、胆管灌流、心臓灌流、循環光療法又は脊髄。具体的実施形態では、組成物は、それらが血液脳関門、血管関門、又は他の上皮関門を通過することを可能にする方法で投与してもよい。一実施形態では、投与経路のための製剤は、少なくとも1種の不活性成分を含んでもよい。投与経路並びに特定の投与経路のための製剤に含有させることができる不活性成分の非制限的例は、同時従属国際公開第2015038892号パンフレット（その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）の表9に示されている。

10

20

30

40

【0689】

本発明のキメラポリヌクレオチドの非制限的投与経路を以下に記載する。

非経口及び注射投与

非経口投与の液体剤形として、限定はしないが、薬学的に許容されるエマルション、マイクロエマルション、溶液、懸濁液、シロップ、及び/又はエリキシルが挙げられる。活性成分に加えて、液体剤形は、当技術分野で一般に使用されている不活性希釈剤、例えば、水若しくは他の溶媒、可溶化剤、並びに乳化剤、例えば、エチルアルコール、イソプロ

50

ピルアルコール、炭酸エチル、酢酸エチル、ベンジルアルコール、安息香酸ベンジル、プロピレングリコール、1,3-ブチレングリコール、ジメチルホルムアミド、油（特に、綿実、ピーナッツ、トウモロコシ、胚芽、オリーブ、ヒマシ、及びゴマ油）、グリセロール、テトラヒドロフルフリルアルコール、ポリエチレングリコール及びソルビタンの脂肪酸エステル、並びにこれらの混合物を含んでもよい。不活性希釈剤以外に、経口投与組成物は、補助薬、例えば、湿潤剤、乳化剤及び懸濁剤、甘味料、香味料、及び/又は香料を含み得る。非経口投与のためのいくつかの実施形態では、クレモフォア（CREMOPHR）（登録商標）などの可溶化剤、アルコール、油、変性油、グリコール、ポリソルベート、シクロデキストリン、ポリマー、及び/又はこれらの組み合わせと組成物を混合する。

10

【0690】

非経口投与用の医薬組成物は、少なくとも1種の不活性成分を含んでもよい。使用される不活性成分のいずれかは、米国食品医薬品局（US Food and Drug Administration）（FDA）により承認されていてもよいし、いずれも承認されていなくてもよい。非経口投与用の医薬組成物に使用される不活性成分の非網羅的リストには、塩酸、マンニトール、窒素、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム及び水酸化ナトリウムが含まれる。

【0691】

注射製剤、例えば、滅菌注射水性又は油性懸濁液は、好適な分散剤、湿潤剤、及び/又は懸濁剤を用いて、公知の技術に従い製剤化することができる。滅菌注射製剤は、例えば、1,3-ブタンジオール中の溶液など、非毒性の非経口的に許容可能な希釈剤及び/又は溶媒中の滅菌注射液、懸濁液、及び/又はエマルジョンであってよい。使用することができる許容されるビヒクル及び溶媒として、水、リンガー液、U.S.P.及び等張食塩溶液がある。滅菌の不揮発性油は、溶媒又は懸濁媒として一般的に使用されている。この目的で、合成モノ-又はジグリセリドなど、任意の低刺激性不揮発性油を使用することができる。オレイン酸などの脂肪酸を注射製剤の調製に使用することができる。滅菌製剤はさらに、局部麻酔剤、防腐剤及び緩衝剤などの補助薬を含んでもよい。

20

【0692】

注射製剤は、例えば、細菌保持フィルターを介した濾過により、及び/又は使用前に滅菌水若しくは他の滅菌注射媒体中に溶解若しくは分散させることができる滅菌固体組成物の形態で滅菌剤を含有させることにより、滅菌することができる。

30

【0693】

活性成分の効果を持続させるためには、多くの場合、皮下若しくは筋肉内注射からの活性成分の吸収を緩徐にすることが望ましい。これは、難水溶性の結晶性若しくは非晶質材料の液体懸濁物の使用により、達成することができる。その場合、薬物の吸収速度は、溶解速度に応じて変動するが、溶解速度は、結晶サイズ及び結晶形態に左右され得る。あるいは、非経口投与剤形の吸収遅延は、油性ビヒクル中に薬物を溶解又は懸濁させることにより、達成される。注射デポー剤形態は、ポリアクチド-ポリグリコシドなどの生分解性ポリマー中に薬物のマイクロカプセル化マトリックスを形成することにより製造される。薬物とポリマーの比、及び使用する具体的ポリマーの性質によって、薬物の放出速度を制御することができる。他の生分解性ポリマーの例として、ポリ（オルトエステル）及びポリ（無水物）が挙げられる。デポー注射製剤は、身体組織と適合性のリポソーム又はマイクロエマルジョン中に薬物を封じ込めることにより調製される。

40

【0694】**直腸及び膣投与**

直腸及び膣投与並びに対応する剤形は、同時係属国際公開第2015038892号パンフレット（その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）において、例えば、限定はしないが、パラグラフ[000856]～[000859]に記載されている。

【0695】**経口投与**

50

経口投与及び対応する剤形（例えば、液体剤形）は、同時係属国際公開第2015038892号パンフレット（その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）において、例えば、限定はしないが、パラグラフ[000860]～[000869]に記載されている。

【0696】

局所又は経皮投与

本明細書に記載するように、本発明のキメラポリヌクレオチドを含有する組成物は、局所投与及び／又は経皮投与のために製剤化することができる。皮膚は、容易に接触可能であるため、送達には理想的な部位である。遺伝子発現は、恐らく非特異的毒性を回避しながら、皮膚だけではなく、皮膚内の特定の層及び細胞型にも限定することができる。

10

【0697】

送達される組成物の皮膚発現の部位は、核酸の投与経路に左右され得る。キメラポリヌクレオチドを皮膚に投与するために、一般に、次の3つの経路が考えられる：(i)局所適用（例えば、局所／領域治療及び／又は美容適用）のため；(ii)皮内注射（例えば、局所／領域治療及び／又は美容適用）のため；並びに(iii)全身投与（例えば、皮膚及び皮膚外領域の両方に及ぶ皮膚科疾患の治療のため）。キメラポリヌクレオチドは、当技術分野で公知の複数の様々な手法で皮膚に送達することができる。ほとんどの局所送達の手法が、DNA送達について機能することが証明されており、こうした手法として、限定はしないが、非カチオン性リボソーム-DNA複合体、カチオン性リボソーム-DNA複合体の局所適用、粒子媒介（遺伝子ガン）、穿孔媒介遺伝子トランスフェクション、並びにウイルス送達手法が挙げられる。核酸の送達後、遺伝子産物が、いくつかの異なる皮膚細胞型に検出されており、細胞型として、限定はしないが、基底角化細胞、汗腺細胞、皮膚線維芽細胞及び皮膚マクロファージが挙げられる。

20

【0698】

局所適用のための軟膏、クリーム及びゲルは、例えば、好適な増粘剤及び／又はゲル化剤及び／又は溶媒を添加した水性若しくは油性基材を用いて製剤化することができる。従って、こうした基材の非制限的例は、例えば、水及び／又は液体パラフィンなどの油、又は落花生油若しくはヒマシ油などの植物油、又はポリエチレングリコールなどの溶媒を含み得る。基材の性質に応じて、様々な増粘剤及びゲル化剤を使用することができる。こうした薬剤の非制限的例として、ワセリン、ステアリン酸アルミニウム、セトステアリンアルコール、ポリエチレングリコール、羊毛脂、蜜蝋、カルボキシポリメチレン及びセルロース誘導体、並びに／又はモノステアリン酸塩並びに／又は非イオン性乳化剤が挙げられる。

30

【0699】

局所投与用のローションは、水性若しくは油性基材を用いて製剤化することができ、これはまた、一般に、1種又は複数種の乳化剤、安定化剤、分散剤、懸濁剤若しくは増粘剤も含有し得る。

【0700】

一実施形態では、本発明は、本発明の方法を好都合に及び／又は効果的に実施するための各種包帯（例えば、創傷包帯）又は帯具（例えば、絆創膏）を提供する。典型的には、包帯又は帯具は、ユーザが対象の様々な処置の実施を可能にするのに十分な量で、本明細書に記載する医薬組成物及び／又はキメラポリヌクレオチドを含み得る。

40

【0701】

一実施形態では、本発明は、2回以上の注射で送達されるキメラポリヌクレオチド組成物を提供する。

一実施形態では、局所及び／又は経皮投与の前に、透過性を高め得る装置及び／又は溶液に、少なくとも組織、例えば、皮膚の1部を付してもよい。一実施形態では、皮膚の透過性を高めるために、剥離装置に組織を付してもよい（米国特許出願公開第20080275468号明細書を参照のこと；これは、全体として参照により本明細書に組み込む）。別の実施形態では、超音波強化装置に組織を付してもよい。超音波強化装置として、限

50

定はしないが、米国特許出願公開第20040236268号明細書並びに米国特許第6,491,657号明細書及び同第6,234,990号明細書(これらの各々は、全体として参照により本明細書に組み込む)に記載の装置が挙げられ得る。組織の透過性を高める方法は、米国特許出願公開第20040171980号明細書及び同第20040236268号明細書並びに米国特許第6,190,315号明細書(これらの各々は、全体として参照により本明細書に組み込む)に記載されている。

【0702】

一実施形態では、本明細書に記載するキメラポリヌクレオチドの製剤を送達する前に、組織の透過性を高めるために、装置を使用することができる。皮膚の透過性は、当技術分野で公知の方法及び/又は米国特許第6,190,315号明細書(これは、全体として参照により本明細書に組み込む)に記載の方法によって測定することができる。非制限的例として、修飾mRNA製剤は、米国特許第6,190,315号明細書(これは、全体として参照により本明細書に組み込む)に記載の薬物送達方法によって送達することができる。

10

【0703】

別の非制限的例では、透過性を高め得る装置に組織を付す前、その間及び/又はその後、局所麻酔(EMLA)クリームの共晶混合物で組織を処置してもよい。カツ(Katz)ら(麻酔法及び無痛法(Anesth Analg)、2004年、第98巻、p.371~76;これは、全体として参照により本明細書に組み込む)は、低エネルギーと組み合わせたEMLAクリームを使用すると、表皮の鎮痛の開始が、低エネルギー超音波による前処理から5分後という速さで認められたことを示している。

20

【0704】

一実施形態では、組織の透過性を高めるために組織を処置する前、その間及び/又はその後、促進剤を適用してもよい。促進剤として、限定はしないが、輸送促進剤、物理的吸収促進剤、及び空洞化促進剤などがある。促進剤の非制限的例は、米国特許第6,190,315号明細書(これは、全体として参照により本明細書に組み込む)に記載されている。

【0705】

一実施形態では、組織の透過性を高めるための特定の装置を使用した後、本明細書に記載のキメラポリヌクレオチドの製剤を送達することができ、この製剤は、免疫応答を誘発する物質をさらに含有してもよい。別の非制限的例では、免疫応答を誘発する物質を含有する製剤は、米国特許出願公開第20040171980号明細書及び同第20040236268号明細書(これらの各々は、全体として参照により本明細書に組み込む)に記載の方法により送達することができる。

30

【0706】

組成物の局所及び/又は経皮投与用の剤形としては、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、吸入剤及び/又はパッチが挙げられ得る。概して、活性成分は、必要に応じて薬学的に許容される賦形剤及び/又は必要な防腐剤及び/又は緩衝剤と滅菌条件下で混合する。

【0707】

さらに、本発明は、経皮パッチの使用も考慮し、これは、多くの場合、身体に対する化合物の制御送達をもたらすというさらなる利点を有する。こうした剤形は、例えば、適切な媒体中に化合物を溶解及び/又は分散させることによって調製することができる。上記に代わり又はこれに加えて、律速膜の付与並びに/又はポリマーマトリックス及び/若しくはゲル中への化合物の分散のいずれかによって、速度を制御することもできる。

40

【0708】

局所投与に好適な製剤は、限定はしないが、塗布薬、ローション、水中油形及び/若しくは油中水形エマルジョン、例えば、クリーム、軟膏、及び/若しくはペースト、並びに/又は溶液及び/若しくは懸濁剤などの液体及び/若しくは半液体調製物を含む。

【0709】

50

局所投与可能な製剤は、例えば、約0.1%~約10%(w/w)活性成分を含み得るが、活性成分の濃度は、溶媒中の活性成分の固溶限界と同じくらい高くてもよい。局所投与用の製剤は、本明細書に記載する追加成分の1つ又は複数をさらに含んでもよい。

【0710】

局所、経真皮及び経皮投与及び対応する剤形は、例えば、同時係属国際公開第2015038892号パンフレット(その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む)において、例えば、限定はしないが、パラグラフ[000870]~[000888]に記載されている。

【0711】

デポー剤投与

本明細書に記載するように、一部の実施形態では、組成物は、持続放出のためのデポー剤に製剤化される。一般に、特定の臓器又は組織(「標的組織」)が投与のためにターゲティングされる。

【0712】

本発明の一部の態様では、キメラポリヌクレオチドは、標的組織内又はその近傍に空間的に保持される。組成物、特に組成物の核酸成分が、標的組織内に実質的に維持される、すなわち、組成物の少なくとも10、20、30、40、50、60、70、80、85、90、95、96、97、98、99、99.9、99.99又は99.99%超が、標的組織内に保持される条件下で、標的組織(1つ又は複数の標的細胞を含む)と組成物を接触させることにより、哺乳動物対象の標的組織に組成物を供給する方法が提供される。1つ又は複数の標的細胞に侵入した、組成物中に存在する核酸の量を測定することにより、保持を定量するのが有利である。例えば、対象に投与した核酸の少なくとも1、5、10、20、30、40、50、60、70、80、85、90、95、96、97、98、99、99.9、99.99又は99.99%超が、投与から一定期間にわたって細胞内に存在する。例えば、リボ核酸及びトランスフェクション試薬を含有する水性組成物を用いて、哺乳動物対象に対する筋肉内注射を実施した後、筋肉細胞中に存在するリボ核酸の量を測定することによって組成物の保持を定量する。

【0713】

本発明の態様は、組成物が、標的組織内に実質的に保持される条件下で、標的組織(1つ又は複数の標的細胞を含む)と組成物を接触させることにより、哺乳動物対象の標的組織に組成物を供給する方法に関する。組成物は、目的のポリペプチドが、少なくとも1つの標的組織内で産生されるように、有効量のキメラポリヌクレオチドを含有する。組成物は、一般に、細胞透過剤及び薬学的に許容される担体を含有するが、「裸」の核酸(細胞透過剤若しくは他の薬剤を含まない核酸)も考慮される。

【0714】

特定の状況では、組織内で細胞により産生されるタンパク質の量は増加するのが望ましい。タンパク質産生の増加は、標的組織内の細胞に空間的に限定されるのが好ましい。従って、哺乳動物対象の組織内で目的のタンパク質の産生を増加する方法が提供される。キメラポリヌクレオチドを含有する組成物であって、予め決定した量の標的組織内に含まれる実質的割合の細胞において目的のポリペプチドを産生するように、組成物の単位量が決定されていることを特徴とする組成物が提供される。

【0715】

一部の実施形態では、組成物は、複数の異なるキメラポリヌクレオチドを含み、ここで、キメラポリヌクレオチドの1つ又は2つ以上が、目的のポリペプチドをコードする。任意選択で、組成物はまた、組成物の細胞内送達を補助するための細胞透過剤も含有する。予め決定した量の標的組織内に含まれる実質的割合の細胞において目的のポリペプチドを産生する(一般に、予め決定した量に隣接するか、又は標的組織から離れた組織内で目的のポリペプチドの有意な産生を誘導することなく)のに必要な組成物の用量の決定を実施する。この決定の後、決定された用量を哺乳動物対象の組織に直接導入する。

【0716】

10

20

30

40

50

一実施形態では、本発明は、2回以上の注射又は分割用量の注射で投与されるキメラポリヌクレオチドを提供する。

一実施形態では、本発明は、小型の使い捨て薬物リザーバ、パッチポンプ又は浸透圧ポンプを用いて、標的組織付近に保持することができる。パッチポンプの非制限的例として、BD（登録商標）（ニュージャージー州フランクリンレイクス）、インスレット社（Insulet Corporation）（マサチューセッツ州ベッドフォード）、ステディメド・セラピューティクス（Steady Med Therapeutics）（カリフォルニア州サンフランシスコ）、メドトロニック（Medtronic）（ミネソタ州ミネアポリス）（例えば、ミニメド（Mini Med））、ユニライフ（UniLife）（ペンシルベニア州ヨーク）、バレリタス（Valeritas）（ニュージャージー州ブリッジウォータ）、並びにスプリングリーフ・セラピューティクス（Spring Leaf Therapeutics）（マサチューセッツ州ボストン）により製造及び/又は販売されているものが挙げられる。浸透圧ポンプの非制限的例としては、デュレクト（DURECT）（登録商標）（カリフォルニア州クパーチノ）（例えば、デュロス（DUROS）（登録商標）及びアルゼット（ALZET）（登録商標））が挙げられる。

10

【0717】

肺内投与

医薬組成物は、口腔を介した肺内投与に好適な製剤として調製、パッケージング、及び/又は販売することができる。肺内投与及び対応する剤形は、同時係属国際公開第2015038892号パンフレット（その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）において、例えば、限定はしないが、パラグラフ[000896]～[000901]に記載されている。

20

【0718】

鼻内、鼻及び口腔内投与

肺内投与に有用なものとして本明細書に記載する製剤は、医薬組成物の鼻内送達に有用である。鼻内投与に好適な別の製剤は、活性成分を含む、平均粒度が約 $0.2\mu\text{m}$ ～ $500\mu\text{m}$ の粗い粉末である。こうした製剤は、鼻から吸い込む方法、すなわち、鼻の近傍に保持した粉末の容器から鼻腔を通した急速な吸入により、投与される。鼻内、鼻及び口腔内投与並びに対応する剤形は、同時係属国際公開第2015038892号パンフレット（その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）において、例えば、限定はしないが、パラグラフ[000902]～[000905]に記載されている。

30

【0719】

眼及び耳介（耳性）投与

医薬組成物は、眼への及び/若しくは眼周辺の送達並びに/又は耳への送達（例えば、耳介（耳性）投与）に好適な製剤として調製、パッケージング、及び/又は販売することができる。眼への及び/又は眼周辺の送達のための投与経路の非制限的例として、眼球後方、結膜、角膜内、眼球内、硝子体内、眼及び結膜下が挙げられる。眼及び耳介投与並びに対応する剤形は、同時係属国際公開第2015038892号パンフレット（その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）において、例えば、限定はしないが、パラグラフ[000906]～[000912]に記載されている。

40

【0720】

ペイロード投与：検出可能な薬剤及び治療薬

本明細書に記載するキメラポリヌクレオチドは、生物学標的に対する物質（「ペイロード」）の送達、例えば、標的の検出を目的とした検出可能な物質の送達、又は治療薬の送達が所望されるいくつかの異なるシナリオで用いることができる。検出方法は、限定はしないが、*in vitro*及び*in vivo*双方でのイメージング方法、例えば、免疫組織化学、生物発光イメージング（BLI）、磁気共鳴イメージング（MRI）、ポジトロン断層法（PET）、電子顕微鏡、X線コンピュータ断層法、ラマンイメージング、光干渉断層法、吸収イメージング、サーマルイメージング、蛍光反射イメージング、蛍光顕微鏡検査、蛍光分子トモグラフィーイメージング、核磁気共鳴イメージング、X線イメー

50

ジング、超音波イメージング、光音響イメージング、実験室アッセイ、あるいは、タグ付け / 染色 / イメージングが必要なあらゆる状況におけるものを含み得る。

【0721】

キメラポリヌクレオチドは、リンカー及びペイロードの両方を任意の有用な配向で含有するように設計することができる。例えば、2つの末端を有するリンカーを用いて、一端をペイロードに、他端を核酸塩基に（例えば、デアザ - アデノシン若しくはデアザ - グアノシンのC - 7若しくはC - 8位又はシトシン若しくはウラシルのN - 3若しくはC - 5位に）結合させる。本発明のポリヌクレオチドは、2つ以上のペイロード（例えば、標識及び転写阻害剤）、並びに切断可能なリンカーを含んでもよい。一実施形態では、修飾ヌクレオチドは、修飾7 - デアザ - アデノシン三リン酸であり、ここで、切断可能なリンカーの一端は、7 - デアザ - アデニンのC7位に結合され、リンカーの他端は、阻害剤に（例えば、シチジンの核酸塩基のC5位に）結合され、標識（例えば、Cy5）が、リンカーの中心に結合されている（例えば、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第7,994,304号明細書の図5並びに第9及び10列におけるA* p C p C5 Par g C a p l e s sの化合物1を参照のこと）。コード領域への修飾7 - デアザ - アデノシン三リン酸の組み込み後、標識及び阻害剤（例えば、ポリメラーゼ阻害剤）に結合した切断可能なリンカーを有するポリヌクレオチドが得られる。リンカーが切断されると（例えば、切断可能なジスルフィド部分を有するリンカーを還元する還元条件により）、標識及び阻害剤が放出される。上記以外のリンカー及びペイロード（例えば、治療薬、検出可能な標識、及び細胞透過ペイロード）は、本明細書、並びに2013年3月9日出願の国際出願PCT/US2013/30062号明細書（代理人整理番号M300）（その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）に記載されている。

10

20

【0722】

例えば、本明細書に記載するキメラポリヌクレオチドは、人工多能性幹細胞（iPS細胞）の再プログラミングに使用することができ、これは、クラスター中の全細胞と比較して、トランスフェクトされた細胞を直接追跡することができる。別の事例では、リンカーを介してキメラポリヌクレオチドに結合させることができ、しかも蛍光標識することができる薬物を用いて、in vivoで、例えば、細胞内で薬物を追跡することができる。他の例として、限定はしないが、細胞への可逆的薬物送達におけるキメラポリヌクレオチドの使用がある。

30

【0723】

本明細書に記載するキメラポリヌクレオチドは、特定の細胞小器官に対するペイロード（例えば、検出可能な薬剤若しくは治療薬）の細胞内ターゲティングに使用することができる。例示的細胞内標的は、限定はしないが、進化したmRNAプロセシングのための核局在化、又は阻害剤を含有するmRNAに連結した核局在化配列（NLS）を含み得る。

【0724】

さらに、本明細書に記載するキメラポリヌクレオチドを用いて、例えば、生存動物における細胞若しくは組織に治療薬を送達することができる。例えば、本明細書に記載するキメラポリヌクレオチドを用いて、癌細胞を殺傷するために高極性の化学療法薬を送達することができる。リンカーを介して治療薬に結合したキメラポリヌクレオチドは、膜透過を促進することができ、これにより、治療薬を細胞中に移動させて、細胞内標的に到達させることができる。

40

【0725】

一例では、リンカーをリボース環の2'位並びに / 又はキメラポリヌクレオチドの3'及び / 若しくは5'位に結合させる（例えば、国際公開第2012030683号パンフレットを参照のこと；これは、全体として参照により本明細書に組み込む）。リンカーは、本明細書に開示するリンカー、当技術分野で公知のリンカー及び / 又は国際公開第2012030683号パンフレット（これは、全体として参照により本明細書に組み込む）に開示されるリンカーのいずれであってもよい。

【0726】

50

別の例では、キメラポリヌクレオチドは、切断可能なリンカーを介してキメラポリヌクレオチドウイルス阻害ペプチド（VIP）に結合することができる。切断可能なリンカーは、VIP及び色素を細胞中に放出することができる。別の実施形態では、キメラポリヌクレオチドは、リンカーを介してADP-リボシレートに結合することができ、これは、いくつかの細菌毒素、例えば、コレラ毒素、ジフテリア毒素、及び百日咳毒素などの作用の原因となるものである。これらの毒素タンパク質は、ヒト細胞における標的タンパク質を改変するADP-リボシルトランスフェラーゼである。例えば、コレラ毒素ADP-リボシレートGタンパク質は、小腸の内膜から大量の体液分泌を引き起こすことによりヒト細胞を改変し、これによって生命を脅かす下痢が起こる。

【0727】

一部の実施形態では、ペイロードは、細胞毒、放射性イオン、化学療法薬、又はその他の治療薬などの治療薬であってもよい。細胞毒又は細胞傷害薬は、細胞に対して有害となり得る任意の物質を含む。例として、限定はしないが、以下のものが挙げられる：タキソール、サイトカラシンB、グラミシジンD、エチジウムプロマイド、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テニポシド、ピンクリスチン、ピンブラスチン、コルチシン、ドキシソルピシン、ダウノルピシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、プロマイシン、メイタンシノイド、例えば、メイタンシノール（米国特許第5,208,020号明細書を参照のこと；これは、全体として本明細書に組み込む）、ラケルマイシン（CC-1065、米国特許第5,475,092号明細書、同第5,585,499号明細書、及び同第5,846,545号明細書を参照のこと；これらの全ては、参照により本明細書に組み込む）、並びにそれらの類似体又は相同体。放射性イオンとして、限定はしないが、ヨウ素（例えば、ヨウ素125又はヨウ素131）、ストロンチウム89、リン、パラジウム、セシウム、イリジウム、リン酸塩、コバルト、イットリウム90、サマリウム153、及びプラセオジウムが挙げられる。その他の治療薬として、限定はしないが、以下のものが挙げられる：抗代謝物（例えば、メトトレキサート、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラビン、5-フルオロウラシルデカルバジン）、アルキル化剤（例えば、メクロレタミン、チオテパクロラムブシル、ラケルマイシン（CC-1065）、メルファラン、カルムスチン（BSNU）、ロムスチン（CCNU）、シクロホスファミド、ブスルファン、ジプロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシンC、及びシス-ジクロロジアミン白金（II）（DDP）シスプラチン）、アントラサイクリン（例えば、ダウノルピシン（旧名ダウノマイシン）及びドキシソルピシン）、抗生物質（例えば、ダクチノマイシン（旧名アクチノマイシン）、プレオマイシン、ミトラマイシン、及びアントラマイシン（AMC））、並びに抗菌剤（例えば、ビスクリスチン、ピンブラスチン、タキソール及びメイタンシノイド）。

【0728】

一部の実施形態では、ペイロードは、検出可能な薬剤、例えば、各種有機小分子、無機化合物、ナノ粒子、酵素若しくは酵素基質、蛍光材料、発光材料（例えば、ルミノール）、生物発光材料（例えば、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、及びエクオリン）、化学発光材料、放射性材料（例えば、 ^{18}F 、 ^{67}Ga 、 $^{81\text{m}}\text{Kr}$ 、 ^{82}Rb 、 ^{111}In 、 ^{123}I 、 ^{133}Xe 、 ^{201}Tl 、 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C 、 ^3H 、若しくは $^{99\text{m}}\text{Tc}$ （例えば、過テクネシウム酸塩（例えば、テクネシウム酸塩（VII）、 TcO_4^- ））、並びに造影剤（例えば、金（例えば、金ナノ粒子）、ガドリニウム（例えば、キレート化Gd）、酸化鉄（例えば、超常磁性酸化鉄（SPIO）、単結晶酸化鉄ナノ粒子（MION）、及び極小超常磁性酸化鉄（USPIO））、マンガンキレート（例えば、Mn-DPPD）、硫酸バリウム、ヨウ化造影剤（イオヘキソール）、微小気泡、又はパーフルオロカーボン）であってよい。こうした任意選択で検出可能な標識として、例えば、以下のものが挙げられる：4-アセトアミド-4'-イソチオシアナトスチルベン-2,2'-ジスルホン酸；アクリジン及び誘導体（例えば、アクリジン及びアクリジンイソチオシ

10

20

30

40

50

アネート) ; 5 - (2' - アミノエチル) アミノナフタレン - 1 - スルホン酸 (E D A N S) ; 4 - アミノ - N - [3 - ビニルスルホニル) フェニル] ナフタルイミド - 3 , 5 ジスルホネート ; N - (4 - アミノ - 1 - ナフチル) マレイミド ; アントラニルアミド ; B O D I P Y ; ブリリアントイエロー (B r i l l i a n t Y e l l o w) ; クマリン及び誘導体 (例えば、クマリン、7 - アミノ - 4 - メチルクマリン (A M C 、 クマリン (C o u m a r i n) 1 2 0) 、 及び 7 - アミノ - 4 - トリフルオロメチルクマリン (クマリン (C o u m a r i n) 1 5 1)) ; シアニン染料 ; シアノシン ; 4' 6 - ジアミニジノ - 2 - フェニリンドール (D A P I) ; 5' , 5'' - ジブロモピロガロール - スルホナフタレイン (プロモピロガロールレッド (B r o m o p y r o g a l l o l R e d) ; 7 - ジエチルアミノ - 3 - (4' - イソチオシアナトフェニル) - 4 - メチルクマリン ; ジエチレントリアミン五酢酸塩 ; 4 , 4' - ジイソチオシアナトジヒドロ - スチルベン - 2 , 2' - ジスルホン酸 ; 4 , 4' - ジイソチオシアナトスチルベン - 2 , 2' - ジスルホン酸 ; 5 - [ジメチルアミノ] - ナフタレン - 1 - スルホニル塩化物 (D N S 、 ダンシル塩化物) ; 4 - ジメチルアミノフェニルアゾフェニル - 4' - イソチオシアナト (D A B I T C) ; エオシン及び誘導体 (例えば、エオシン及びエオシンイソチオシアネート ; エリスロシン及び誘導体 (例えば、エリスロシン B 及びエリスロシンイソチオシアネート) ; エチジウム ; フルオレセイン及び誘導体 (例えば、5 - カルボキシフルオレセイン (F A M) 、 5 - (4 , 6 - ジクロロトリアジン - 2 - イル) アミノフルオレセイン (D T A F) 、 2' 7' - ジメトキシ - 4 , 5' - ジクロロ - 6 - カルボキシフルオレセイン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、X - ローダミン - 5 - (及び - 6 -) - イソチオシアネート (Q F I T C 又は X R I T C) 、 及びフルオレスカミン) ; 2 - [2 - [3 - [[1 , 3 - ジヒドロ - 1 , 1 - ジメチル - 3 - (3 - スルホプロピル) - 2 H - ベンズ [e] インドール - 2 - イリデン] エチリデン] - 2 - [4 - (エトキシカルボニル) - 1 - ピペラジニル] - 1 - シクロペンテン - 1 - イル] エテニル] - 1 , 1 - ジメチル - 3 - (3 - スルホプロピル) - 1 H - ベンズ [e] インドリウム水酸化物、分子内塩、n , n - ジエチルエタナミン (1 : 1) を含む化合物 (I R 1 4 4) ; 5 - クロロ - 2 - [2 - [3 - [(5 - クロロ - 3 - エチル - 2 (3 H) - ベンゾチアゾール - イリデン) エチリデン] - 2 - (ジフェニルアミノ) - 1 - シクロペンテン - 1 - イル] エテニル] - 3 - エチルベンゾチアゾリム過塩素酸塩 (I R 1 4 0) ; マラカイト・グリーン (M a l a c h i t e G r e e n) イソチオシアネート ; 4 - メチルウンベリフェロンオルトクレゾールフタレイン ; ニトロチロシン ; パラロサニリン ; フェノール・レッド (P h e n o l R e d) ; B - フィコエリスリン ; o - フタルジアルデヒド ; ピレン及び誘導体 (例えば、ピレン、酪酸ピレン、及びスクシニミジル 1 - ピレン) ; 酪酸塩量子ドット ; リアクティブ・レッド (R e a c t i v e R e d) 4 (シバクロン (C I B A C R O N) (商標) ブリリアント・レッド (B r i l l i a n t R e d) 3 B - A) ; ローダミン及び誘導体 (例えば、6 - カルボキシ - X - ローダミン (R O X) 、 6 - カルボキシローダミン (R 6 G) 、 リッサミンローダミン B 塩化スルホニルローダミン (R h o d) 、 ローダミン B 、 ローダミン 1 2 3 、 ローダミン X イソチオシアネート、スルホローダミン B 、 スルホローダミン 1 0 1 、 スルホローダミン 1 0 1 の塩化スルホニル誘導体 (テキサス・レッド (T e x a s R e d) 、 N , N , N' , N' テトラメチル - 6 - カルボキシローダミン (T A M R A) テトラメチルローダミン、及びテトラメチルローダミンイソチオシアネート (T R I T I C)) ; リボフラビン ; ロソール酸 ; テルピウムキレート誘導体 ; シアニン (C y a n i n e) - 3 (C y 3) ; シアニン (C y a n i n e) - 5 (C y 5) ; シアニン - 5 . 5 (C y 5 . 5) 、 シアニン (C y a n i n e) - 7 (C y 7) ; I R D 7 0 0 ; I R D 8 0 0 ; アレキサ (A l e x a) 6 4 7 ; ラ・ホルタ・ブルー (L a J o l t a B l u e) ; フタロシアニン ; 及びナフトロシアニン。

10

20

30

40

【0729】

一部の実施形態では、検出可能な薬剤は、検出不能の前駆物質であってもよく、これは、活性化すると、検出可能になる (例えば、蛍光発生テトラジン - フルオロフォア構築物

50

(例えば、テトラジン - ボディピー (BODIPIY) FL、テトラジン - オレゴン・グリーン (Oregon Green) 488、若しくはテトラジン - ボディピー (BODIPIY) TMR - X) 又は酵素活性化蛍光発生剤 (例えば、プロセンス (PROSENSE) (登録商標) (ビスエン・メディカル (VisEn Medical)))。酵素標識組成物を使用することができる *in vitro* アッセイとして、限定はしないが、酵素結合イムノソルベントアッセイ (ELISA)、免疫沈降アッセイ、免疫蛍光法、酵素免疫アッセイ (EIA)、放射性免疫アッセイ (RIA)、及びウエスタンブロット分析が挙げられる。

【0730】

組み合わせ

キメラポリヌクレオチドは、1種又は複数種の他の治療薬、予防薬、診断薬、又はイメージング剤と組み合わせで使用することができる。「~と組み合わせる」によって、薬剤を同じ時間に投与すべき、及び/又は送達のために一緒に製剤化すべきであることを意味するわけではないが、こうした送達方法は本開示の範囲に含まれる。組成物は、1種又は複数種の所望の治療薬若しくは医療手順と一緒に、その前若しくはその後に投与することができる。一般に、各薬剤は、当該薬剤について決定された用量及び/又は時間スケジュールで投与される。一部の実施形態では、本開示は、医薬、予防薬、診断薬、又はイメージング組成物の送達であって、その生体利用可能性を改善し、その代謝を低減及び/若しくは改変し、その排出を阻害し、並びに/又はその体内分布を改変し得る薬剤と組み合わせた送達を包含する。非制限的例として、キメラポリヌクレオチドは、癌治療又は過剰増殖性細胞の制御のための医薬剤と組み合わせで使用することができる。米国特許第7,964,571号明細書(全体として参照により本明細書に組み込む)では、リポポリマーと共にインターロイキン12をコードするDNAプラスミドを含む医薬組成物を使用すると共に、さらに少なくとも1種の抗癌剤又は化学療法薬も投与する、固形原発腫瘍又は転移性腫瘍の治療のための併用療法が記載されている。さらに、抗増殖性分子をコードする本発明のキメラポリヌクレオチドは、リポポリマーを含む医薬組成物の形態をしていてもよく(例えば、全体として参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第20110218231号明細書を参照のこと;これは、抗増殖性分子をコードするDNAプラスミドと、リポポリマーを含む医薬組成物を請求する)、この組成物は、少なくとも1種の化学療法薬又は抗癌剤と一緒に投与してもよい。(例えば、米国特許第8,518,907号明細書及び国際公開第201218754号パンフレットにおける「組み合わせ(Combination)」のセクションを参照のこと;これら文献の各々の内容は、全体として参照により本明細書に組み込む)。

【0731】

キメラポリヌクレオチド及びその医薬製剤は、単独で対象に投与してもよいし、1種又は複数種の他の治療薬、例えば、抗癌剤と併用するか、又はこれらを含むしてもよい。従って、キメラポリヌクレオチドと他の抗癌剤若しくは化学療法薬との組み合わせは、本発明の範囲内にある。こうした薬剤の例は、V.T.デビタ(V.T.Devita)及びS.ヘルマン(S.Hellman)(編者)による「癌の原理と腫瘍学の実践(Cancer Principles and Practice of Oncology)」、第6版、2001年2月15日、リップニコット・ウィリアムズ・アンド・ウィルキンス(Lippincott Williams & Wilkins)に見出すことができる。当業者は、関連する薬物及び癌の具体的な特徴に基づき、どの薬剤の組み合わせが有用であるかを認識することができよう。こうした抗癌剤として、限定はしないが、以下のものが挙げられる:エストロゲン受容体調節剤、アンドロゲン受容体調節剤、レチノイド受容体調節剤、細胞傷害剤/細胞分裂抑制剤、抗増殖剤、プレニル-タンパク質トランスフェラーゼ阻害剤、HMG-CoAレダクターゼ阻害剤及び他の血管新生阻害剤、細胞増殖及び生存シグナル伝達の阻害剤、アポトーシス促進剤及び細胞周期チェックポイントを妨害する薬剤。キメラポリヌクレオチドはまた、HCCの治療に用いられる任意の治療薬、例えば、限定はしないが、ソラフェニブと組み合わせても有用となり得る。キメラポリ

10

20

30

40

50

ヌクレオチドは、放射性療法と組み合わせると共投与すれば、特に有用となり得る。

【0732】

特定の実施形態では、キメラポリヌクレオチドは、以下に挙げるものなどの公知の抗癌剤と組み合わせると有用となり得る：エストロゲン受容体調節剤、アンドロゲン受容体調節剤、レチノイド受容体調節剤、細胞傷害剤、抗増殖剤、プレニル-タンパク質トランスフェラーゼ阻害剤、HMG-CoAレダクターゼ阻害剤、HIVプロテアーゼ阻害剤、逆転写酵素阻害剤、及び他の血管新生阻害剤。

【0733】

以下：エストロゲン受容体調節剤、アンドロゲン受容体調節剤、レチノイド受容体調節剤、細胞傷害剤、低酸素活性化剤、プロテアソーム阻害剤、微小管阻害剤/微小管安定化剤、トポイソメラーゼ阻害剤、細胞分裂キネシンの阻害剤、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤、細胞分裂進行に関与するキナーゼの阻害剤、抗増殖剤、モノクローナル抗体標的治療薬、HMG-CoAレダクターゼ阻害剤、プレニル-タンパク質トランスフェラーゼ阻害剤、血管新生阻害剤、血管新生を調節若しくは阻害する治療薬、細胞周期チェックポイントを妨害する薬剤、受容体チロシンキナーゼ(RTK)を妨害する薬剤、細胞増殖及び生存シグナル伝達経路の阻害剤、アポトーシス促進剤、選択的COX-2阻害剤であるNSAID、COX-2の阻害剤、COX-2の特異的阻害剤として記載されている化合物、血管新生阻害剤、チロシンキナーゼ阻害剤、抗癌化合物以外の化合物、内因性多剤耐性(MDR)の阻害剤、吐き気若しくは嘔吐を治療する制吐薬、並びにニューロキニン-1受容体アンタゴニストの例は、同時係属国際公開第2015038892号パンフレット(その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む)において、例えば、限定はしないが、パラグラフ[000925]~[000957]に記載されている。

10

20

【0734】

本発明の別の実施形態は、癌の治療のための遺伝子療法と組み合わせたキメラポリヌクレオチドの使用である。癌治療に関する遺伝子戦略の概略については、ホール(Hall)ら著(米国ヒト遺伝子療学会誌(Am J Hum Genet)、第61巻、p.785~789、1997年)及びクフェ(Kufe)ら著(癌医療(Cancer Medicine)、第5版、p.876~889、BCデッカー(BC Decker)、ハミルトン(Hamilton)、2000年)を参照されたい。遺伝子療法を用いて、任意の腫瘍抑制遺伝子を送達することができる。こうした遺伝子の例として、限定は

30

40

【0735】

キメラポリヌクレオチドはまた、ビスホスホネート(ビスホスホネート、ジホスホネート、ビスホスホン酸及びジホスホン酸を含むと理解される)と併用して、骨癌などの癌の治療又は予防にも有用であり得る。ビスホスホネートの例として、限定はしないが、以下のものが挙げられる：エチドロネート(ジドロネル(Didronel))、パミドロネート(アレジア(Aredia))、アレンドロネート(フォサマックス(Fosamax))、リセドロネート(アクトネル(Actonel))、ゾレドロネート(ゾメタ(Zometax))、イバンドロネート(ボニバ(Boniva))、インカドロネート若しくはシマドロネート、クロドロネート、EB-1053、ミノドロネート、ネリドロネート、ピリドロネート及びチルドロネート、並びにこれらのあらゆる薬学的に許容される

50

塩、誘導体、水和物及び混合物。

【0736】

キメラポリヌクレオチドはまた、貧血の治療に有用な薬剤と一緒に投与してもよい。こうした貧血治療薬は、例えば、持続性エリスロポエチン受容体活性化剤（エポエチン など）である。

【0737】

さらに、キメラポリヌクレオチドは、好中球減少症の治療に有用な薬剤と一緒に投与してもよい。こうした好中球減少症の治療薬は、例えば好中球の産生及び機能を制御する造血増殖因子、例えば、ヒト顆粒球コロニー刺激因子、（G-CSF）などである。G-CSFの例として、フィルグラスティム及びPEG-フィルグラスティムが挙げられる。

10

【0738】

さらに、キメラポリヌクレオチドは、免疫増強薬、例えば、レバミソール、イソプリノシン及びザダキシンと一緒に投与してもよい。

キメラポリヌクレオチドはまた、アロマターゼ阻害剤と併用して、乳癌の治療又は予防にも有用となり得る。アロマターゼ阻害剤の例として、限定はしないが、アナストロゾール、レトロゾール及びエキセメスタンが挙げられる。

【0739】

また、キメラポリヌクレオチドは、他の核酸治療薬と併用して、癌の治療又は予防にも有用となり得る。

さらに、キメラポリヌクレオチドは、セクレターゼ阻害剤及び/又はNOTCHシグナル伝達の阻害剤と組み合わせて、投与してもよい。こうした阻害剤として、同時係属国際公開第2015038892号パンフレット（その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）において、例えば、限定はしないが、パラグラフ[000964]に記載されている化合物を含む。

20

【0740】

キメラポリヌクレオチドはまた、PARP阻害剤と併用して、癌の治療又は予防にも有用となり得る。

さらに、キメラポリヌクレオチドは、同時係属国際公開第2015038892号パンフレット（その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）において、例えば、限定はしないが、パラグラフ[000966]に記載の治療薬と併用して、癌の治療にも有用となり得る。

30

【0741】

前述した組み合わせは、医薬製剤の形態での使用のために好都合に提供することができ、従って、薬学的に許容される希釈剤若しくは担体と一緒に前述の組み合わせを含む医薬組成物は、本発明のさらなる態様を呈示する。

【0742】

こうした組み合わせの個々の化合物は、個別の製剤又は併用医薬製剤として、順次又は同時に投与することができる。一実施形態では、個々の化合物は、併用医薬製剤として同時に投与される。

【0743】

さらに、組み合わせて使用される治療、予防、診断、若しくはイメージング活性剤が、単一組成物として一緒に投与してもよいし、又は別々の組成物として個別に投与してもよいことは理解されよう。一般に、組み合わせて使用される薬剤は、それらが個別に使用されるレベルを超えないレベルで使用されることが予想される。一部の実施形態では、組み合わせて使用されるレベルは、個別に使用されるレベルより低くなる。一実施形態では、組み合わせは、各々又は一緒に、本明細書に記載する分割投与計画に従って投与することができる。

40

【0744】

用量決定

本発明は、本発明の修飾mRNA及びそれらのコードされたタンパク質又は複合体をそ

50

れらが必要な対象に投与することを含む方法を提供する。核酸、タンパク質若しくは複合体、又はそれらの医薬、イメージング、診断、若しくは予防組成物は、疾患、障害、及び/又は病状（例えば、ワーキングメモリ障害に関する疾患、障害、及び/又は病状）を予防、治療、診断、若しくはイメージングするのに有効な任意の量及び任意の投与経路を用いて、対象に投与することができる。必要とされる正確な量は、対象の種、年齢及び健康状態、疾患の重症度、具体的組成物、その投与方法、その活性様式などに応じて、対象間で変動し得る。本発明の組成物は、投与しやすさ及び投与量の均一性のために、典型的に単位用量形態で製剤化される。しかし、本発明の組成物の1日総投与量は、信頼できる医学的判断の範囲内で担当医により決定され得ることは理解されよう。いかなる特定の患者についての具体的な治療有効用量、予防有効用量、又は適切なイメージング用量は、以下のものを含む様々な要因にも応じて変動し得る：治療対象の障害及び障害の重症度；使用する具体的な化合物の活性；使用する具体的な組成物；患者の年齢、体重、健康状態、性別及び食事；使用する具体的な化合物の投与時間、投与経路及び排出速度；治療の期間；使用する具体的な化合物と組み合わせ、若しくは同時に使用する薬物；並びに医学分野で周知の同様の要因。

10

20

30

40

50

【0745】

いくつかの実施形態では、本発明の組成物は、所望治療効果、診断効果、予防効果、又はイメージング効果を得るために、1日に1又は複数回、1日につき対象の体重kg当たり約0.0001mg～約100mg、約0.001mg～約0.05mg、約0.005mg～約0.05mg、約0.001mg～約0.005mg、約0.05mg～約0.5mg、約0.01mg～約50mg、約0.1mg～約40mg、約0.5mg～約30mg、約0.01mg～約10mg、約0.1mg～約10mg、約1mg～約25mgを送達するのに十分な投与レベルで投与することができる（例えば、全体として参照により本明細書に組み込まれる国際公開第2013078199号パンフレットに記載される単位用量の範囲を参照のこと）。所望の用量は、1日3回、1日2回、1日1回、1日置き、2日置き、毎週、2週間毎、3週間毎、又は4週間毎に投与することができる。いくつかの実施形態では、所望の用量は、複数回投与（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14回、又は15回以上の投与）を用いて送達することができる。複数回投与を用いる場合、本明細書に記載のものなどの分割投与レジメンを使用することができる。

【0746】

本発明によれば、分割用量レジメンでのキメラポリヌクレオチドの投与によって、哺乳動物対象において、より高レベルのタンパク質が産生されることが見出されている。本明細書で用いられるとき、「分割用量」は、1単位用量又は1日総用量の2つ以上の用量への分割、例えば、1単位用量の2回以上の投与を意味する。本明細書で用いられるとき、「1単位用量」は、1用量/1回/1経路/1接触点、すなわち1回の投与イベントで投与される任意の治療薬の用量である。本明細書で用いられるとき、「1日総用量」は、24時間内に投与又は処方される量である。これは、1単位用量として投与され得る。一実施形態では、本発明のキメラポリヌクレオチドは、分割用量で対象に投与される。キメラポリヌクレオチドは、緩衝剤のみで製剤化してもよいし、又は本明細書に記載の製剤として製剤化してもよい。

【0747】

剤形

本明細書に記載する医薬組成物は、本明細書に記載の剤形、例えば、局所、鼻内、気管内、又は注射可能な（例えば、静脈内、眼内、硝子体内、筋肉内、心臓内、腹腔内、及び皮下）剤形に製剤化することができる。

【0748】

液体剤形

非経口投与用の液体剤形は、同時係属国際公開第2015038892号パンフレット（その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）において、例えば、限定はし

ないが、パラグラフ [0 0 0 1 0 3 7] に記載されている。

【 0 7 4 9 】

注射可能な剤形

注射製剤、例えば、注射用滅菌水性又は油性懸濁液は、公知の技術に従って製剤化することができ、好適な分散剤、湿潤剤、及び/又は懸濁剤を含み得る。滅菌注射製剤は、例えば、1, 3 - ブタンジオール中の溶液など、非毒性の非経口的に許容可能な希釈剤及び/又は溶媒中の滅菌注射溶液、懸濁液、及び/又はエマルジョンであってよい。使用することができる許容可能なビヒクル及び溶媒として、限定はしないが、水、リンガー液、U . S . P . 及び等張食塩溶液がある。滅菌の不揮発性油は、溶媒又は懸濁媒として一般的に使用されている。この目的で、合成モノ - 又はジグリセリドなど、任意の低刺激性不揮発性油を使用することができる。オレイン酸などの脂肪酸を注射製剤の調製に使用することができる。

10

【 0 7 5 0 】

注射製剤は、例えば、細菌保持フィルターを介した濾過により、及び/又は使用前に滅菌水若しくは他の滅菌注射媒体中に溶解若しくは分散させることができる滅菌固体組成物の形態で滅菌剤を含有させることにより、滅菌することができる。

【 0 7 5 1 】

活性成分の効果を持続させるためには、皮下若しくは筋肉内注射からの活性成分の吸収を緩徐にすることが望ましいと考えられる。これは、難水溶性の結晶性若しくは非晶質材料の液体懸濁物の使用により、達成することができる。その場合、キメラポリヌクレオチドの吸収速度は、溶解速度に応じて変動するが、溶解速度は、結晶サイズ及び結晶形態に左右され得る。あるいは、非経口投与されたキメラポリヌクレオチドの吸収遅延は、油性ビヒクル中にキメラポリヌクレオチドを溶解若しくは懸濁させることにより、達成され得る。注射デポー剤形態は、ポリアクチド - ポリグリコシドなどの生分解性ポリマー中にキメラポリヌクレオチドのマイクロカプセル化マトリックスを形成することにより製造される。キメラポリヌクレオチドとポリマーの比、及び使用する具体的ポリマーの性質によって、キメラポリヌクレオチドの放出速度を制御することができる。他の生分解性ポリマーの例として、限定はしないが、ポリ(オルトエステル)及びポリ(無水物)が挙げられる。デポー注射製剤は、身体組織と適合性のリポソーム又はマイクロエマルジョン中にキメラポリヌクレオチドを封じ込めることにより調製され得る。

20

30

【 0 7 5 2 】

肺

送達及び投与のための肺及び鼻内製剤は、同時係属国際公開第 2 0 1 3 1 5 1 6 6 6 号パンフレット(その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む)において、例えば、限定はしないが、パラグラフ [0 0 0 7 6 6] ~ [0 0 0 7 8 1] に記載されている。

【 0 7 5 3 】

コーティング又はシェル

錠剤、糖衣錠、カプセル、ピル、及び顆粒などの固体剤形は、腸溶コーティング及び医薬製剤化の分野で公知の他のコーティングなどのコーティング及びシェルを用いて、調製することができる。これらは、任意選択で、乳白剤を含んでもよく、腸管の特定の部分だけに、若しくはそこに選択的に、任意選択で遅延して、活性成分を放出する組成物から成るものでもよい。使用することができる埋没組成物の例としては、ポリマー物質及びワックスがある。同様のタイプの固体組成物は、ラクトース又は乳糖、並びに高分子ポリエチレングリコールなどの賦形剤を用いた軟質及び硬質充填ゼラチンカプセル中の充填剤として使用することができる。

40

【 0 7 5 4 】

複数回用量及び反復用量投与

一部の実施形態では、本発明の化合物及び/又は組成物は、2回以上の用量で投与することができる(本明細書では、複数回用量投与と呼ぶ)。こうした用量は、同じ成分を含

50

んでもよいし、又は以前の用量には含有されない成分を含んでもよい。こうした用量は、以前の用量と比較して、同じ質量及び/若しくは体積の成分又は変更された質量及び/若しくは体積の成分を含んでもよい。一部の実施形態では、複数回用量投与は、反復用量投与を含んでもよい。本明細書で用いられるとき、用語「反復用量投与」は、連続的に、又は実質的に同じ質量及び/若しくは体積で供給される実質的に同じ成分を含む反復用量のレジメンにおいて、投与される2回以上の用量を指す。一部の実施形態では、対象は、反復用量応答を示し得る。本明細書で用いられるとき、用語「反復用量応答」は、反復用量投与レジメンにおいて投与される別の用量とは異なる反復用量に対する対象の応答を指す。一部の実施形態では、こうした応答は、mRNAを含む反復用量に応答するタンパク質の発現であってもよい。上記の実施形態では、タンパク質発現は、反復用量投与レジメンにおいて投与される別の用量と比較して増大し得るか、又はタンパク質発現は、反復用量投与レジメンにおいて投与される別の用量と比較して低減し得る。タンパク質発現の変化は、約1%~約20%、約5%~約50%、約10%~約60%、約25%~約75%、約40%~約100%及び/又は少なくとも100%であり得る。反復用量レジメンの一環として投与されるmRNAの発現の低減で、投与RNAから翻訳されたタンパク質のレベルが、反復用量レジメンにおいて投与される別の用量と比較して40%超の低減である場合、本明細書ではこれを「反復用量抵抗」と呼ぶ。

10

【0755】

医薬組成物の特性

本明細書に記載の医薬組成物は、以下の特性の1つ又は複数の特徴とし得る：

20

生体利用可能性

キメラポリヌクレオチドは、本明細書に記載の送達剤を含む組成物に製剤化されると、本明細書に記載の送達剤がない組成物と比較して、生体利用可能性に増加を示し得る。本明細書で用いられるとき、用語「生体利用可能性」は、哺乳動物に投与される所与の量のキメラポリヌクレオチドの全身利用可能性を指す。生体利用可能性は、哺乳動物への化合物の投与後の非変化形態の化合物の曲線下面積(AUC)又は最大血清若しくは血漿濃度(C_{max})を測定することにより、評価することができる。AUCは、横座標(X軸)に沿う時間に対して、縦座標(Y軸)に沿う化合物の血清又は血漿濃度をプロットする曲線下の面積を決定したものである。一般に、特定の化合物のAUCは、当業者には周知の方法、並びにG.S.バンカー(G.S. Banker)著、現代製剤、薬物及び薬学(Modern Pharmaceuticals, Drugs and the Pharmaceutical Sciences)、第72巻、マーセル・デッカー、ニューヨーク社(Marcel Dekker, New York, Inc.)、1996年(全体として参照により本明細書に組み込む)に記載される通りの方法を用いて、計算することができる。

30

【0756】

C_{max} 値は、哺乳動物への化合物の投与後に哺乳動物の血清又は血漿中で達成される化合物の最大濃度である。特定の化合物の C_{max} 値は、当業者には周知の方法を用いて測定することができる。語句「生体利用可能性を増大する」、「薬物動態を改善する」は、本明細書で用いられるとき、哺乳動物におけるAUC、 C_{max} 、若しくは C_{min} として測定された最初のキメラポリヌクレオチドの全身利用可能性が、本明細書に記載の送達剤と一緒に共投与したとき、こうした共投与を実施しない場合より高いことを意味する。一部の実施形態では、キメラポリヌクレオチドの生体利用可能性は、少なくとも約2%、少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、又は約100%増大し得る。

40

【0757】

50

一部の実施形態では、キメラポリヌクレオチドの液体製剤は、*in vivo*半減期がまちまちである場合があり、治療効果を達成するために用量の調節が必要となる。これに対処するため、本発明の一部の実施形態では、キメラポリヌクレオチド製剤は、反復投与の間に、生体利用可能性及び/又は治療効果を改善するように設計することができる。こうした製剤は、キメラポリヌクレオチドの持続放出を可能にする、並びに/又はヌクレアーゼによるキメラポリヌクレオチドの分解率を低減することができる。一部の実施形態では、キメラポリヌクレオチド、不水溶性油性デポー剤、界面活性剤及び/又は共界面活性剤及び/又は共溶媒を含む懸濁液が提供される。油と界面活性剤の組み合わせは、キメラポリヌクレオチドを含む懸濁液製剤化を可能にし得る。不水溶性デポー剤中のキメラポリヌクレオチドの送達を用いて、デポー剤から周辺の生理環境へのキメラポリヌクレオチドの持続放出により生体利用可能性を改善し、及び/又はヌクレアーゼによるキメラポリヌクレオチドの分解を阻止することができる。

10

【0758】

一部の実施形態では、キメラポリヌクレオチドと一緒に、二価及び一価カチオンの組み合わせを含むカチオン性ナノ粒子を製剤化することができる。こうしたナノ粒子は、所与の期間（例えば、数時間、数日など）にわたって溶液中に自然に形成され得る。上記のナノ粒子は、二価カチオンのみの存在下で、又は一価カチオンのみの存在下では形成されない。カチオン性ナノ粒子中の又はカチオン性ナノ粒子を含む1種又は複数のデポー剤中のキメラポリヌクレオチドの送達は、長時間作用デポー剤として作用する、及び/又はヌクレアーゼによる分解の速度を低下させることにより、キメラポリヌクレオチドの生体利用可能性を改善することができる。

20

【0759】

治療濃度域

キメラポリヌクレオチドは、本明細書に記載の送達剤を含む組成物に製剤化すると、本明細書に記載の送達剤なしで投与されるキメラポリヌクレオチド組成物の治療濃度域と比較して、投与されるキメラポリヌクレオチド組成物の治療濃度域の増加を呈示し得る。本明細書で用いられるとき、「治療濃度域」は、治療効果を誘発する高い確率を有する血漿濃度の範囲、又は作用部位での治療活性物質レベルの範囲を指す。一部の実施形態では、キメラポリヌクレオチドの治療濃度域は、本明細書に記載の送達剤と一緒に共投与した場合、少なくとも約2%、少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、又は約100%増加し得る。

30

【0760】

分布容積

キメラポリヌクレオチドは、本明細書に記載の送達剤を含む組成物に製剤化すると、本明細書に記載の送達剤のない組成物と比較して、改善された、例えば、減少又は標的化された分布容積 ($V_{d \text{ i s t}}$) を呈示し得る。分布容積 ($V_{d \text{ i s t}}$) は、体内の薬物の量を血液又は血漿中の薬物の濃度に関連させる。本明細書で用いられるとき、「分布容積」という用語は、血液又は血漿中と同じ濃度で、体内に薬物の総量を含むのに必要な液量を指す。すなわち、 $V_{d \text{ i s t}}$ は、体内の薬物の量/血液又は血漿中の薬物の濃度に等しい。例えば、10mgの容量及び10mg/Lの血漿濃度の場合、分布容積は、1リットルである。分布容積は、薬物が血管外組織中に存在する度合いを表す。大きな分布容積は、血漿タンパク質結合と比較して、化合物が組織成分に結合する傾向を示している。臨床の状況では、 $V_{d \text{ i s t}}$ を用いて、定常濃度を達成するためのロード用量を決定することができる。一部の実施形態では、キメラポリヌクレオチドの分布容積は、本明細書に記載の送達剤と一緒に共投与した場合、少なくとも約2%、少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも

40

50

約 30%、少なくとも約 35%、少なくとも約 40%、少なくとも約 45%、少なくとも約 50%、少なくとも約 55%、少なくとも約 60%、少なくとも約 65%、少なくとも約 70% 減少し得る。

【0761】

生物学的効果

一実施形態では、動物に送達される修飾 mRNA の生物学的効果は、動物におけるタンパク質発現を分析することによって分類することができる。タンパク質発現は、本発明の修飾 mRNA を投与された動物から採取した生体サンプルの分析から定量することができる。一実施形態では、動物に投与した修飾 mRNA によりコードされた発現タンパク質は、少なくとも 50 pg/ml が好ましいと考えられる。例えば、哺乳動物に送達した修飾 mRNA によりコードされたタンパク質の場合、50 ~ 200 pg/ml のタンパク質発現が、動物におけるタンパク質の治療有効量とみなすことができる。

10

【0762】

質量分析法によるキメラポリヌクレオチドの検出

質量分析法 (MS) は、イオンへの変換後、分子に関する構造及び分子質量 / 濃度の情報を提供することができる分析技術である。分子をまずイオン化して、正及び負電荷を取得すると、それらは、質量分析装置を通過して、その質量 / 電荷 (m/z) 比に応じて、検出器の異なる箇所 に到達する。ポリヌクレオチドを検出する方法は、同時係属国際公開第 2015038892 号パンフレット (その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む) において、例えば、限定はしないが、パラグラフ [0001055] ~ [0001067] に記載されている。

20

【0763】

V. 本発明のキメラポリヌクレオチドの使用

好ましい実施形態では、本発明のキメラポリヌクレオチドは、免疫応答及び / 若しくは分解経路などの有害な生体応答の回避若しくは忌避、発現の閾値の達成及び / 若しくはタンパク質産生能力の改善、発現速度若しくは翻訳効率の改善、薬物若しくはタンパク質半減期及び / 又はタンパク質濃度の改善、タンパク質局在化の最適化をもたらすように、また、以下：組織中での安定性及び / 若しくはクリアランス、受容体取り込み及び / 若しくは動態、組成物による細胞接触、翻訳機構への関与、分泌効率 (適用可能であれば)、循環への進入可能性、並びに / 又は細胞の状態、機能及び / 若しくは活性の調節の 1 つ又は複数を改善するように設計される。

30

【0764】

治療薬

治療薬

修飾核酸及び修飾 RNA などの、本発明のキメラポリヌクレオチドと、それらから翻訳された本明細書に記載のタンパク質は、治療薬又は予防薬として使用することができる。これらは、医療での使用のために提供される。例えば、本明細書に記載するキメラポリヌクレオチドを対象に投与することができ、ここで、キメラポリヌクレオチドは、*in vivo* で翻訳されて、対象において治療又は予防用ポリペプチドを産生する。ヒト及び他の哺乳動物における疾患又は病状の診断、治療若しくは予防のための組成物、方法及び他の哺乳動物における疾患又は病状の診断、治療若しくは予防のための組成物、方法及び試薬が提供される。本発明の活性治療薬は、キメラポリヌクレオチド、キメラポリヌクレオチドを含有する細胞、又はキメラポリヌクレオチドから翻訳されたポリペプチドを含む。

40

【0765】

いくつかの実施形態では、抗体依存性細胞傷害性を誘導するタンパク質と一緒に、哺乳動物対象の免疫を増強する 1 種又は複数種のタンパク質をコードする翻訳可能な領域を含む 1 つ又は複数のキメラポリヌクレオチドを含有する併用治療薬が本明細書に提供される。例えば、トラスツズマブをコードする 1 つ又は複数の核酸と、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) とを含有する治療薬が本明細書に提供される。特に、こうした併用治療薬は、トラスツズマブに対し誘導された耐性を形成する Her2+ 乳癌患者において有用で

50

ある。(例えば、アルブレヒト(Albrecht)著、免疫療法(Immunotherapy)、第2巻(6)、p.795~8、2010年を参照のこと)。

【0766】

本明細書に記載のキメラポリヌクレオチドを用いて、細胞集団における組換えポリペプチドの翻訳を誘導する方法が本明細書に提供される。こうした翻訳は、*in vivo*、*ex vivo*、*in culture*又は*in vitro*で行うことができる。細胞集団は、少なくとも1つのヌクレオシド修飾及び組換えポリペプチドをコードする翻訳可能な領域を有する核酸を含有する有効量の組成物と接触させる。集団は、核酸が、細胞集団の1つ又は複数に局在化されるような条件下で接触させる。組換えポリペプチドは、細胞において核酸から翻訳される。

10

【0767】

組成物の「有効量」は、少なくとも部分的に、標的組織、標的細胞型、投与手段、核酸(例えば、修飾ヌクレオシドのサイズ、及び範囲)の物理的特徴、並びに他の決定因子に基づいて提供される。一般に、有効量の組成物は、細胞において効率的なタンパク質産生、好ましくは対応する非修飾核酸を含有する組成物よりも効率的な産生をもたらす。効率の増加は、細胞トランスフェクション(すなわち、核酸でトランスフェクトした細胞のパーセンテージ)の増加、核酸からのタンパク質翻訳の増加、核酸分解の低減(例えば、修飾核酸からのタンパク質翻訳の持続増加によって示される通りの)、又は宿主細胞の自然免疫応答の低減によって明らかにすることができる。

【0768】

本発明の態様は、必要とする哺乳動物対象において組換えポリペプチドの*in vivo*翻訳を誘導する方法に関する。この方法では、本明細書に記載する送達方法を用いて、少なくとも1つの構造的修飾又は化学修飾と、組換えポリペプチドをコードする翻訳可能な領域を有する核酸を含有する組成物を有効量で対象に投与する。核酸は、核酸が、対象の細胞に局在化すると共に、組換えポリペプチドが、核酸から細胞に翻訳されるような量及びその他の条件下で実施される。核酸が局在化される細胞、又はその細胞が存在する組織は、1ラウンド又は複数ラウンドの核酸投与によってターゲティングすることができる。

20

【0769】

一部の実施形態では、投与されたキメラポリヌクレオチドは、組換えポリペプチドが翻訳される細胞、組織若しくは生物において実質的に存在しない機能活性を付与する1つ又は複数の組換えポリペプチドの産生を指令する。例えば、欠落している機能活性は、天然の酵素、構造、又は遺伝子調節機能であってよい。関連する実施形態では、投与されたキメラポリヌクレオチドは、組換えポリペプチドが翻訳される細胞に存在するが、実質的に欠失している機能活性を増大する(例えば、相乗的に)1つ又は複数の組換えポリペプチドの産生を指令する。

30

【0770】

別の実施形態では、投与されたキメラポリヌクレオチドは、組換えポリペプチドが翻訳される細胞において実質的に存在しないポリペプチド(若しくは複数のポリペプチド)に代わる1つ又は複数の組換えポリペプチドの産生を指令する。こうした非存在は、コード遺伝子又はその調節経路の遺伝子突然変異に起因し得る。一部の実施形態では、組換えポリペプチドは、細胞内での内因性タンパク質のレベルを望ましいレベルまで増加し;このような増加は、内因性タンパク質のレベルを通常以下のレベルから通常レベルへ又は通常レベルから通常を超えるレベルに上昇させ得る。

40

【0771】

あるいは、組換えポリペプチドは、細胞内、細胞の表面に存在する、又は細胞から分泌される内因性タンパク質の活性に拮抗する機能を果たす。通常、内因性タンパク質の活性は、例えば、改変された活性又は局在化を引き起こす内因性タンパク質の突然変異のために対象にとって有害である。さらに、組換えポリペプチドは、細胞内、細胞の表面に存在する、又は細胞から分泌される生物学的部分の活性を直接若しくは間接的に拮抗する。拮抗対象となる生物学的部分の例として、脂質(例えば、コレステロール)、リポタンパク

50

質（例えば、低密度リポタンパク質）、核酸、炭水化物、志賀毒素及び破傷風毒素などのタンパク質毒素、又はボツリヌス毒素、コレラ毒素及びジフテリア毒素などの小分子毒素が挙げられる。これらに加えて、拮抗対象の生物学的部分は、細胞傷害性又は細胞増殖抑制活性などの望ましくない活性を呈示する内因性タンパク質であり得る。

【0772】

本明細書に記載する組換えタンパク質は、細胞内、恐らく核などの特定のコンパートメント内に局在化するように操作してもよいし、又は細胞からの分泌若しくは細胞の細胞膜への転位のために操作してもよい。

【0773】

一部の実施形態では、修飾 mRNA 及び本発明によるそれらのコードされたポリペプチドは、限定はしないが、以下に挙げるうちの1つ又は複数を含む様々な疾患、障害、及び/又は病状のいずれかの治療のために使用することができる：自己免疫障害（例えば、糖尿病、狼瘡、多発性硬化症、乾癬、慢性関節リウマチ）；炎症性障害（例えば、関節炎、骨盤内炎症性疾患）；感染症（例えば、ウイルス感染（例えば、HIV、HCV、RSV）、細菌感染、真菌感染、敗血症）；神経障害（例えば、アルツハイマー病、ハンチントン病；自閉症；デュシェンヌ型筋ジストロフィー）；心血管障害（例えば、動脈硬化症、高コレステロール血症、血栓症、凝固障害、黄斑変性などの血管新生障害）；増殖性障害（例えば、癌、良性新生物）；呼吸器障害（例えば、慢性閉塞性肺疾患）；消化器障害（例えば、炎症性腸疾患、潰瘍）；筋骨格障害（例えば、線維筋痛、関節炎）；内分泌腺、代謝、及び栄養障害（例えば、糖尿病、骨粗鬆症）；泌尿器障害（例えば、腎臓病）；精神障害（例えば、うつ病、統合失調症）；皮膚障害（例えば、創傷、湿疹）；血液及びリンパ系障害（例えば、貧血、血友病）など。

【0774】

機能不全又は異常タンパク質活性を特徴とする疾患としては、嚢胞性線維症、鎌状赤血球貧血、表皮水疱症、筋萎縮性側索硬化症、及びグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ欠損症が挙げられる。本発明は、本明細書に記載のキメラポリヌクレオチドを含有する核酸又は細胞ベースの治療薬を導入することによって対象におけるこうした病状若しくは疾患を治療する方法を提供し、ここで、キメラポリヌクレオチドは、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、あるいは克服するタンパク質をコードする。機能不全タンパク質の具体的な例は、嚢胞性線維症膜コンダクタンズ調節因子（CFTR）遺伝子のミスセンス変異体であり、これが、CFTRタンパク質の機能不全タンパク質変異体を産生して、嚢胞性線維症を引き起こす。

【0775】

タンパク質活性の欠落（又は実質的に減少した、例えば、適正な（正常若しくは生理的なタンパク質機能が存在しない））を特徴とする疾患は、嚢胞性線維症、ニーマンピック病C型、サラセミア・メジャー、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、ハーラー症候群、ハンター症候群、及び血友病が挙げられる。こうしたタンパク質は、存在しないこともあるし、又はほぼ非機能性である。本発明は、本明細書に記載のキメラポリヌクレオチドを含有する核酸又は細胞ベースの治療薬を導入することによって対象におけるこうした病状若しくは疾患を治療する方法を提供し、ここで、キメラポリヌクレオチドは、対象の標的細胞から欠落しているタンパク質活性に代わるタンパク質をコードする。機能不全タンパク質の具体的な例は、嚢胞性線維症膜コンダクタンズ調節因子（CFTR）遺伝子のナンセンス変異体であり、これが、CFTRタンパク質の非機能性タンパク質変異体を産生して、嚢胞性線維症を引き起こす。

【0776】

このように、細胞内に有効量のCFTRポリペプチドが存在するような条件下で、機能性CFTRポリペプチドをコードする翻訳可能な領域を有するキメラポリヌクレオチドと対象の細胞を接触させることにより、哺乳動物対象の嚢胞性線維症を治療する方法が提供される。好ましい標的細胞は、肺などの上皮、内皮及び中皮細胞であり、投与方法は、標的組織を考慮して決定する：すなわち、肺送達の場合には、吸入による投与のためにRN

10

20

30

40

50

A分子を製剤化する。

【0777】

別の実施形態では、本発明は、対象の細胞集団に、ゲノム研究により近年特性決定されたタンパク質のソートリン(Sortilin)をコードする修飾mRNA分子を導入し、これによって対象の高脂血症を改善することにより、対象の高脂血症を治療する方法を提供する。SORT1遺伝子は、トランスゴルジネットワーク(TGN)膜貫通タンパク質(ソートリンと呼ばれる)をコードする。遺伝子研究から、5人の個体のうち1人は、SORT1遺伝子の1p13遺伝子座に単一のヌクレオチド多型、rs12740374を有し、これによって個体は低レベルの低密度リポタンパク質(LDL)及び超低密度リポタンパク質(VLDL)を有する傾向が高くなることが判明した。約30%の人に存在するマイナー対立遺伝子の各コピーは、LDLコレステロールを8mg/dL改変するのに対し、人口の約5%に存在するマイナー対立遺伝子の2つのコピーは、LDLコレステロールを16mg/dL減少させる。マイナー対立遺伝子の保有者は、心筋梗塞のリスクが40%低いこともわかっている。マウスでの機能性in vivo研究では、マウス肝臓組織におけるSORT1の過剰発現によって、80%減という有意に低いLDLコレステロールレベルが得られたこと、並びにサイレンシングSORT1によって、LDLコレステロールが約200%増加したことが記載されている(Musunuru K (Musunuru K)ら著、「1p13コレステロール遺伝子座でのSORT1により、非コード変異体から表現型へ(From noncoding variant to phenotype via SORT1 at the 1p13 cholesterol locus)」、ネイチャー(Nature)、2010年、第466巻、p.714~721)。

10

20

【0778】

別の実施形態では、本発明は、造血障害、心血管疾患、腫瘍、糖尿病、嚢胞性線維症、神経疾患、先天性代謝異常、皮膚及び全身性障害、及び盲を治療する方法を提供する。これらの特定の疾患を治療するための分子標的のアイデンティティーが、記載されている(テンプレトン(Templeton)編、遺伝子及び細胞療法：治療機序及び戦略(Gene and Cell Therapy: Therapeutic Mechanisms and Strategies)、第3版、フロリダ州ボタ・ラトン(Botat Raton)、CRCプレス(CRC Press;これは、全体として参照により本明細書に組み込む)。

30

【0779】

本明細書には、感染症及び/又は敗血症を発症するリスクがある対象において感染症及び/又は敗血症を予防する方法が提供され、この方法は、そうした予防が必要な対象に、感染症及び/又は敗血症を予防するのに十分な量で、抗微生物ポリペプチド(例えば、抗細菌感染ポリペプチド)をコードするキメラポリヌクレオチド前駆体、又はその部分的若しくは完全にプロセシングされた形態を含む組成物を投与するステップを含む。いくつかの実施形態では、感染症及び/又は敗血症を発症するリスクがある対象は、癌患者であってもよい。いくつかの実施形態では、癌患者は、前処置レジメンを受けている。一部の実施形態では、前処置レジメンは、限定はしないが、化学療法、放射線療法、又はその両方を含み得る。非制限的例として、キメラポリヌクレオチドは、プロテインC、そのチモーゲン若しくはプレプロタンパク質、プロテインCの活性化形態(APC)又は当技術分野において公知のプロテインCの変異体をコードすることができる。キメラポリヌクレオチドは、化学的に修飾した後、細胞に送達してもよい。本発明のキメラ修飾mRNAによりコードされ得るポリペプチドの非制限的例は、米国特許第7,226,999号明細書;同第7,498,305号明細書;同第6,630,138号明細書(これらの各々は、全体として参照により本明細書に組み込む)に教示されているものを含む。上記の特許は、プロテインC様分子、変異体及び誘導体を教示しており、そのいずれも、本発明の化学修飾分子内でコードされ得る。

40

【0780】

50

本明細書には、対象の感染症及び／又は敗血症を治療する方法がさらに提供され、この方法は、そうした治療が必要な対象に、感染症及び／又は敗血症を治療するのに十分な量で、抗微生物ポリペプチド（例えば、抗細菌感染ポリペプチド）、例えば、本明細書に記載の抗微生物ポリペプチドをコードするキメラポリヌクレオチド前駆体、又はその部分的若しくは完全にプロセシングされた形態を含む組成物を投与するステップを含む。いくつかの実施形態では、治療が必要な対象は、癌患者である。いくつかの実施形態では、癌患者は、前処置レジメンを受けている。一部の実施形態では、前処置レジメンは、限定はしないが、化学療法、放射線療法、又はその両方を含み得る。

【0781】

いくつかの実施形態では、対象は、急性又は慢性微生物感染症（例えば、細菌感染症）を呈示し得る。いくつかの実施形態では、対象は、1つの療法を受けたことがあるか、又は受けていてもよい。いくつかの実施形態では、上記の療法は、限定はしないが、放射線療法、化学療法、ステロイド、紫外線照射、又はこれらの組み合わせを含み得る。いくつかの実施形態では、患者は、微小血管障害に罹患していてもよい。一部の実施形態では、微小血管障害は、糖尿病であってもよい。いくつかの実施形態では、患者は、損傷を有し得る。一部の実施形態では、損傷は潰瘍であってもよい。特定の実施形態では、損傷は、糖尿病性足部潰瘍であってもよい。いくつかの実施形態では、対象は、1つ又は複数の熱創傷を有し得る。いくつかの実施形態では、投与は、局所又は全身のいずれでもよい。いくつかの実施形態では、投与は、皮下であってもよい。いくつかの実施形態では、投与は、静脈内であってもよい。いくつかの実施形態では、投与は、経口であってもよい。いくつかの実施形態では、投与は、局所投与所であってもよい。いくつかの実施形態では、投与は、吸入によるものであってもよい。いくつかの実施形態では、投与は、直腸投与であってもよい。いくつかの実施形態では、投与は、膣投与であってもよい。

【0782】

本開示の他の態様は、キメラポリヌクレオチドを含有する細胞の哺乳動物対象への移植に関する。哺乳動物対象への細胞の投与は、当業者には周知であり、限定はしないが、局所移植（例えば、局所若しくは皮下投与）、臓器送達又は全身注射（例えば、静脈内注射若しくは吸入）、並びに薬学的に許容される担体への細胞の製剤化が挙げられる。キメラポリヌクレオチドを含有するこうした組成物は、筋肉内、経動脈、腹腔内、静脈内、鼻内、皮下、内視鏡、経皮、又は髄腔内投与のために製剤化することができる。一部の実施形態では、組成物は、持続放出のために製剤化することができる。

【0783】

治療薬を投与することができる対象は、疾患、障害、又は有害な病状に罹患しているか、又はそれを発症するリスクがある者でよい。これらに基づき、対象を識別、診断、及び分類する方法が提供され、こうした方法として、臨床診断、バイオマーカーレベル、ゲノムレベルの結合試験（GWAS）、及び当技術分野で公知のその他の方法が挙げられる。

【0784】

創傷管理

本発明のキメラポリヌクレオチドは、創傷治療、例えば、治癒の遅延を呈示する創傷の治療に使用することができる。創傷の治療を管理するためにキメラポリヌクレオチドの投与を含む方法が本明細書において提供され、同時係属国際公開第2015038892号パンフレット（その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）において、例えば、限定はしないが、パラグラフ[0001089]～[0001092]に記載されている。

【0785】

抗体の産生

本発明の一実施形態では、キメラポリヌクレオチドは、同時係属国際公開第2015038892号パンフレット（その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）において、例えば、限定はしないが、パラグラフ[0001093]～[0001095]に記載されているものなど、抗体及びそのような抗体をコードすることができる。

【0786】

感染症の管理

一実施形態では、抗微生物ポリペプチドをコードするキメラポリヌクレオチドを投与することにより、対象において微生物感染症（例えば、細菌感染症）及び/又は微生物若しくはウイルス感染に関連する疾患、障害、若しくは病状、又はそれらの症状を治療又は予防する方法が提供される。この投与は、抗微生物剤（例えば、抗細菌剤）、例えば、本明細書に記載する抗微生物ポリペプチド又は小分子抗微生物化合物と組み合わせて行ってもよい。抗微生物剤として、限定はしないが、抗細菌剤、抗ウイルス剤、抗真菌剤、抗原生動物剤、抗寄生体剤、抗プリオン剤が挙げられ、さらには、本明細書に記載のポリヌクレオチドの組成物、その送達及び使用方法は、同時係属国際公開第2015038892号パンフレット（その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）において、例えば、限定はしないが、パラグラフ[0001096]～[0001116]に記載されている。

10

【0787】

免疫応答の調節

免疫応答の回避

本明細書に記載するように、本発明のキメラポリヌクレオチドの有用な特徴は、細胞の自然免疫応答を低下させ、忌避又は回避する能力である。一態様では、基準化合物、例えば、本発明のキメラポリヌクレオチド若しくは本発明の異なるキメラポリヌクレオチドに対応する非修飾ポリヌクレオチドによりトリガーされる応答と比較して、細胞に投与されると、宿主から低下した免疫応答をもたらす、目的のポリペプチドをコードするキメラポリヌクレオチドが本明細書で提供される。本明細書で用いられるとき、「基準化合物」は、哺乳動物に投与されると、既知の程度、レベル若しくは量の免疫刺激を有する自然免疫応答を生じる任意の分子又は物質である。基準化合物は、核酸分子である必要はないし、本発明のキメラポリヌクレオチドである必要もない。従って、キメラポリヌクレオチドの免疫応答トリガーの回避、忌避又は不履行の測定は、そうした応答をトリガーすることができる。

20

【0788】

用語「自然免疫応答」は、一般にウイルス起源又は細菌起源の、外因性一本鎖核酸に対する細胞性応答を含み、これは、サイトカイン、特にインターフェロンの発現及び放出の誘導、並びに細胞死を伴う。本明細書で用いられるとき、自然免疫応答又はインターフェロン応答は、1細胞レベルで作動し、サイトカイン発現、サイトカイン放出、タンパク質合成の全体的阻害、細胞RNAの全体的破壊、主要組織適合性分子の上方制御、及び/又はアポトーシス細胞死の誘導、アポトーシスに関与する遺伝子の遺伝子転写の誘導、抗増殖、並びに自然及び適応免疫細胞活性化を引き起こす。I型IFNにより誘導される遺伝子のいくつかは、PKR、ADAR（RNAに作用するアデノシンデアミナーゼ）、OAS（2',5'-オリゴアデニル酸シンターゼ）、RNaseL、及びMxタンパク質を含む。PKR及びADARは、それぞれ翻訳開始の阻害及びRNA編集を引き起こす。OASは、dsRNA依存性シンターゼであり、エンドリボヌクレアーゼRNaseLを活性化して、ssRNAを分解させる。

30

40

【0789】

一実施形態では、自然免疫応答は、I型又はII型インターフェロンを含み、I型又はII型インターフェロンの発現は、本発明のキメラポリヌクレオチドと接触させていない細胞からの基準と比較して、最大2倍しか増大されない。

【0790】

一実施形態では、自然免疫応答は、1つ又は複数のIFNシグネチャー遺伝子の発現を含み、ここで、1つ又は複数のIFNシグネチャー遺伝子の発現は、本発明のキメラポリヌクレオチドと接触させていない細胞からの標準と比較して、最大3倍しか増大されない。

【0791】

50

特定の状況では、細胞の自然免疫応答を排除するが有利となる場合もあるが、本発明は、インターフェロンシグナル伝達を含む免疫応答を完全には排除することなく、こうした応答を実質的に低下させる（実質的に減少させる）キメラポリヌクレオチドを提供する。

【0792】

一部の実施形態では、免疫応答は、基準化合物により誘導される免疫応答と比較して、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%、99.9%、又は99.9%超低下する。免疫応答自体は、1型インターフェロンの発現若しくは活性レベル又はインターフェロンが調節する遺伝子、例えば、Toll様受容体（例えば、TLR7及びTLR8）などの発現により測定することができる。自然免疫応答の低下はまた、細胞集団に1回又は複数回投与した後の細胞死減少のレベルによって測定することもでき；例えば、細胞死は、基準化合物で観察される細胞死頻度と比べて、10%、25%、50%、75%、85%、90%、95%、又は95%超少ない。さらに、細胞死が影響を及ぼし得るのは、キメラポリヌクレオチドと接触させた細胞の50%未満、40%、30%、20%、10%、5%、1%、0.1%、0.01%又は0.01%未満である。

10

【0793】

別の実施形態では、本発明のキメラポリヌクレオチドは、同じ配列を有するキメラポリヌクレオチド又は基準化合物よりも有意に低免疫原性である。本明細書で用いられるとき、「有意に低免疫原性である」とは、免疫原性の検出可能な減少を指す。別の実施形態では、この用語は、免疫原性の倍率減少を指す。別の実施形態では、この用語は、検出可能な免疫応答をトリガーすることなく、有効量のキメラポリヌクレオチドを投与することができるような減少を指す。別の実施形態では、この用語は、組換えタンパク質の発現を検出可能に低減するのに十分な免疫応答を誘発することなく、キメラポリヌクレオチドを繰り返し投与することを可能にするような減少を指す。別の実施形態では、この減少は、組換えタンパク質の検出可能な発現を排除するほどの免疫応答を誘発することなく、キメラポリヌクレオチドを繰り返し投与することを可能にするような減少である。

20

【0794】

別の実施形態では、キメラポリヌクレオチドは、その非修飾対応物又は標準化合物に比して2倍低免疫原性である。別の実施形態では、免疫原性は、3倍減少する。別の実施形態では、免疫原性は、5倍減少する。別の実施形態では、免疫原性は、7倍減少する。別の実施形態では、免疫原性は、10倍減少する。別の実施形態では、免疫原性は、15倍減少する。別の実施形態では、免疫原性は、1倍減少する。別の実施形態では、免疫原性は、50倍減少する。別の実施形態では、免疫原性は、100倍減少する。別の実施形態では、免疫原性は、200倍減少する。別の実施形態では、免疫原性は、500倍減少する。別の実施形態では、免疫原性は、1000倍減少する。別の実施形態では、免疫原性は、2000倍減少する。別の実施形態では、免疫原性は、別の倍率で減少する。

30

【0795】

免疫原性を決定する方法は、当技術分野で公知であり、例えば、サイトカイン（例えば、IL-12、IFN、TNF、RANTES、MIP-1若しくは、IL-6、IFN、又はIL-8）の分泌の測定、DC活性化マーカー（例えば、CD83、HLA-DR、CD80及びCD86）の発現の測定、又は適応免疫応答のアジュバントとして作用する能力の測定などがある。

40

【0796】

本明細書に教示する修飾の組み合わせを含む本発明のキメラポリヌクレオチドは、これらを治療法としてさらに好適にする優れた特性を有し得る。

当技術分野における「全か無（all or none）」のモデルは、修飾mRNAの治療有用性に関連する生物学的現象を説明する上で非常に不十分であることが判明している。本発明者らは、タンパク質産生を改善するために、修飾、又は修飾の組み合わせの性質、修飾率（%）を考慮して、2つ以上のサイトカイン若しくは測定基準を調べることにより、特定の修飾mRNAの効力及びリスクプロファイルを決定し得ると結論付けた。

50

【0797】

本発明の一態様では、非修飾と比較した修飾 mRNA の効果を決定する方法は、本発明の外性核酸の投与により発現がトリガーされる1つ又は複数のサイトカインの測定及び分析を含む。これらの値を非修飾核酸又は標準的測定基準、例えば、サイトカイン応答、P o l y I C、R - 8 4 8 若しくは当技術分野で公知の他の標準と比較する。

【0798】

本発明で開発される標準的測定基準の一例は、細胞、組織若しくは生物に産生されたコードされたポリペプチド(タンパク質)のレベル若しくは量と、修飾核酸の投与若しくは接触によって細胞、組織若しくは生物での発現がトリガーされたサイトカインの1つ又は複数(若しくは集団)のレベル若しくは量の比を測定することである。こうした比は、タンパク質:サイトカイン比又は「PC」比と呼ぶ。PC比が高いほど、修飾核酸(測定したタンパク質をコードするポリヌクレオチド)は有効である。本発明の好ましいPC比(サイトカインによる)は、1超、10超、100超、1000超、10,000超であってよい。異なる又は非修飾構築物の修飾核酸よりも高いPC比を有する修飾核酸が好ましい。

10

【0799】

PC比は、ポリヌクレオチドに存在する修飾の割合(%)によってさらに定量することができる。例えば、100%修飾核酸に正規化して、サイトカイン(若しくはリスク)又はサイトカインプロフィールの関数としてのタンパク質産生を決定することができる。

【0800】

一実施形態では、本発明は、修飾核酸(キメラポリヌクレオチド)のPC比を比較することにより、化学、サイトカイン又は修飾率に関して、いずれか特定の修飾 c i r c R N A の相対効力を決定する方法を提供する。

20

【0801】

様々なレベルの核酸塩基置換を含むキメラポリヌクレオチドを生成することができ、これらは、高いタンパク質産生と低い免疫刺激能力を維持している。天然に存在するヌクレオチド対応物に対する任意の修飾ヌクレオチドの相対的割合(%)は、I V T 反応中に変動し得る(例えば、シチジンに対して100、50、25、10、5、2.5、1、0.1、0.01%の5メチルシチジン使用頻度;ウリジンに対して100、50、25、10、5、2.5、1、0.1、0.01%のプソイドウリジン若しくはN1-メチル-プソイドウリジン使用頻度)。同じ塩基に対して2つ以上の別のヌクレオチドを用いる異なる比(例えば、異なる比のプソイドウリジンとN1-メチル-プソイドウリジン)を使用するキメラポリヌクレオチドを作製することもできる。5メチルシチジン/シチジン及びプソイドウリジン/N1-メチル-プソイドウリジン/ウリジンの比など、2以上の「塩基」位置での混合比を用いてキメラポリヌクレオチドを作製することもできる。改変された比の修飾ヌクレオチドを有する修飾 mRNA の使用は、化学修飾ヌクレオチドに対する曝露の可能性を低減する上で有益となり得る。最後に、キメラポリヌクレオチドへの修飾ヌクレオチドの位置的導入も可能であり、これは、タンパク質産生若しくは免疫刺激能力のいずれか又はその両方を調節する。こうしたキメラポリヌクレオチドが、これらの改善された特性を示す能力は、i n v i t r o で評価することができ(本明細書に記載するP B M C アッセイなどのアッセイを用いて)、また、キメラポリヌクレオチドにコードされたタンパク質産生及び自然免疫認識のメディエータ(サイトカインなど)双方の測定によっても i n v i v o で評価することもできる。

30

40

【0802】

別の実施形態では、キメラポリヌクレオチドと、その線状対応物の相対免疫原性は、所与の量の非修飾ヌクレオチド又は基準化合物と同じ程度まで前述の応答の1つを誘発するのに必要なキメラポリヌクレオチドの量を測定することにより、決定することができる。例えば、同じ応答を誘発するのに2倍のキメラポリヌクレオチドが必要であれば、キメラポリヌクレオチドは、非修飾ヌクレオチド又は基準化合物より2倍低免疫原性である。

【0803】

50

別の実施形態では、キメラポリヌクレオチドと、その線状対応物の相対免疫原性は、同じ量の非修飾ヌクレオチド又は基準化合物と比較して、キメラポリヌクレオチドの投与に
応答して分泌されたサイトカイン（例えば、IL-12、IFN- γ 、TNF- α 、RANTES、MIP-1
若しくは、IL-6、IFN- β 、又はIL-8）の量を測定することにより、決定される。例えば、半分の量のサイトカインが分泌されれば、キメラポリ
ヌクレオチドは、非修飾ヌクレオチド又は標準化合物より2倍低免疫原性である。別の実施形態では、前述の方法で免疫原性を計算する前に、刺激のバックグラウンドレベルを
差し引く。

【0804】

本明細書には、さらに、細胞又は細胞集団における免疫応答のタイトレーション、低減
又は排除を実施する方法も提供される。一部の実施形態では、様々な用量の同じキメラポリ
ヌクレオチドと細胞を接触させた後、用量応答を評価する。一部の実施形態では、同じ
若しくは異なる用量のいくつかの様々なキメラポリヌクレオチドと細胞を接触させて、所
望の効果を生み出す最適濃度を決定する。免疫応答に関しては、所望の効果は、細胞の免
疫応答を回避、忌避又は低減することであってよい。所望の効果はまた、タンパク質産生
の効率を改変することであってよい。

10

【0805】

国際公開第2013003475号パンフレット（これは、全体として参照により本明
細書に組み込む）に記載の方法を用いて免疫応答を低減するために、本発明のキメラポリ
ヌクレオチドを使用することができる。

20

【0806】

免疫応答の活性化：ワクチン

本発明によれば、本明細書に開示するキメラポリヌクレオチドは、1種又は複数種のワ
クチンをコードすることができる。本明細書で用いられるとき、「ワクチン」は、特定の
疾患又は感染因子に対する免疫を改善する生物製剤である。ワクチンは、対象の組織又は
細胞中に抗原を導入して、免疫応答を誘発することにより、特定の疾患又は病原体感染か
ら対象を保護する。本発明のキメラポリヌクレオチドは、抗原をコードすることができ、
キメラポリヌクレオチドが細胞に発現されたら、所望の免疫応答が達成される。

【0807】

RNAをワクチンとして使用することにより、安全、実現可能性、適応可能性、及び免
疫応答を生じる有効性に関して、細胞へのDNAの組み込みを含む従来の遺伝子ワクチン
接種の問題が解決される。RNA分子は、RNAがより容易に分解されることから、DNA
ワクチンより有意に安全であると考えられる。RNA分子は、生物から迅速に排除され
るため、ゲノムに組み込まれて、細胞の遺伝子発現に制御不能な様式で影響を及ぼすこ
とはできない。また、RNAワクチンは、自己免疫疾患又は抗DNA抗体の発生などの重度
の副作用を引き起こし難い（ブリングマン A. (Bringmann A.) 著、生
物医学及びバイオテクノロジー学会誌 (Journal of Biomedicine
and Biotechnology)、2010年、第2010巻、論文ID623
687)。RNAでのトランスフェクションは、細胞の細胞質に挿入するだけでよく、こ
れは、核への挿入よりも達成するのが容易である。しかし、RNAは、細胞の細胞質にお
いてRNase分解及びその他の自然の分解を被りやすい。RNAワクチンの安定性及び
貯蔵寿命を増加するための様々な試み。フォン・デア・ムルベ (Von Der Mul
be) らは、mRNA分子のG (グアノシン) / C (シトシン) 含量を増加することによ
り、mRNAワクチン組成物の安定性を改善することを開示している。フェルグナー (F
elgner) らの米国特許第5580859号明細書は、mRNAに結合して、その安
定性を調節する調節タンパク質をコードするポリヌクレオチドの組み込みを教示してい
る。特定の理論に拘束されることを意図しないが、本発明のキメラポリヌクレオチドワ
クチンは、少なくとも部分的に、構築物設計の特異性、純度及び選択性によって、安定性及
び治療効果の改善を達成する。

30

40

【0808】

50

さらに、特定の修飾ヌクレオチド、若しくはその組み合わせは、本発明のキメラポリヌクレオチドに導入されると、自然免疫応答を活性化する。こうした活性化分子は、ポリペプチド及び/又は他のワクチンと組み合わせたとき、アジュバントとして有用である。いくつかの実施形態では、活性化分子は、ワクチンとして有用なポリペプチド配列をコードする翻訳可能な領域を含有するため、自己アジュバントとなる能力を付与する。

【0809】

一実施形態では、本発明のキメラポリヌクレオチドは、抗原又は感染因子に起因する疾患及び身体的障害の予防、治療及び診断に使用することができる。本発明のキメラポリヌクレオチドは、少なくとも1つの目的のポリペプチド（例えば、抗体又は抗原）をコードすることができるため、これを個体に供給することにより、免疫系を刺激して病因物質から防御することができる。非制限的例として、抗原又は感染因子に結合してこれらを中和する能力を有する1つ又は複数のキメラポリヌクレオチドを供給することにより、抗原又は感染因子からの生物活性及び/若しくは作用を阻害並びに/又は無効化することができる。

10

【0810】

一実施形態では、本発明のキメラポリヌクレオチドは、免疫原をコードすることができる。免疫原をコードするキメラポリヌクレオチドの送達により、免疫応答を活性化することができる。非制限的例として、免疫原をコードするキメラポリヌクレオチドを細胞に送達して、複数の自然免疫応答経路をトリガーすることができる（国際公開第2012006377号パンフレット及び米国特許出願公開第20130177639号明細書を参照のこと；これらは、全体として参照により本明細書に組み込む）。別の非制限的例として、本発明の免疫原をコードするキメラポリヌクレオチドは、脊椎動物に対して免疫原性となるのに十分な用量で脊椎動物に送達することができる（国際公開第2012006372号パンフレット及び同第2012006369号パンフレット並びに米国特許出願公開第20130149375号明細書及び同第20130177640号明細書を参照のこと；これらの各々の内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）。キメラポリヌクレオチドワクチンで治療することができる感染症の非制限的リストは、以下のものを含む：ウイルス感染症、例えば、AIDS（HIV）、A、B若しくはC型肝炎、ヘルペス、帯状疱疹（水痘）、風疹（風疹ウイルス）、黄熱、デング熱など（フラビ（flavi）ウイルス、インフルエンザ（インフルエンザ（influenza）ウイルス）、出血性感染症（マールブルグ（Marburg）若しくはエボラ（Ebola）ウイルス）、細菌感染症、例えば、レジオネラ症（レジオネラ属（Legionella）、胃潰瘍（ヘリコバクター属（Helicobacter）、コレラ（ビブリオ属（Vibrio）、大腸菌（E. coli）感染症、ブドウ球菌感染症、サルモネラ菌感染症若しくはレンサ球菌感染症、破傷風（破傷風菌（Clostridium tetani）、又は原生動物感染症（マラリア、睡眠病、リーシュマニア症、トキソプラズマ症、すなわち、マラリア原虫（plasmodium）、トリパノソーマ（trypanosomes）、リーシュマニア（leishmania）及びトキソプラズマ（toxoplasma）を原因とする感染症）。

20

30

【0811】

一実施形態では、本発明のキメラポリヌクレオチドは、腫瘍抗原をコードして、癌を治療することができる。腫瘍抗原の非制限的リストは、以下に挙げるものを含む：707-AP、AFP、ART-4、BAGE、. . . -カテニン/m、Bcr-abl、CAMEL、CAP-1、CASP-8、CDC27/m、CDK4/m、CEA、CT、Cyp-B、DAM、ELF2M、ETV6-AML1、G250、GAGE、GnT-V、Gp100、HAGE、HER-2/neu、HLA-A*0201-R170I、HPV-E7、HSP70-2M、HAST-2、hTERT（又はhTRT）、iCE、KIAA0205、LAGE、LDLR/FUT、MAGE、MART-1/メラニン-A、MC1R、ミオシン/m、MUC1、MUM-1、-2、-3、NA88-A、NY-ESO-1、p190マイナーbcr-abl、Pml/RAR. . .、PRAME、PS

40

50

A、PSM、RAGE、RU1又はRU2、SAGE、SART-1又はSART-3、TEUAML1、TPI/m、TRP-1、TRP-2、TRP-2/INT2及びWT1。

【0812】

本発明のキメラポリヌクレオチドは、ワクチンのポリペプチド配列をコードすることができ、さらに阻害剤を含んでもよい。阻害剤は、抗原提示を低減し、及び/又は当技術分野で既知の様々な経路を阻害することができる。非制限的例として、本発明のキメラポリヌクレオチドは、抗原提示を低減することができる阻害剤と組み合わせてワクチンに使用することができる（国際公開第2012089225号パンフレット及び同第2012089338号パンフレットを参照のこと；これらの各々は、全体として参照により本明細書に組み込む）。

10

【0813】

一実施形態では、本発明のキメラポリヌクレオチドは、自己複製RNAであってもよい。自己複製RNA分子は、RNA送達の効率及び封入された遺伝子産物の発現を増強することができる。一実施形態では、キメラポリヌクレオチドは、本明細書に記載の及び/又は当技術分野で公知の少なくとも1つの修飾を含んでもよい。一実施形態では、自己複製RNAは、自己複製RNAが、感染性ウイルス粒子の産生を誘導しないように設計することができる。非制限的例として、自己複製RNAは、米国特許出願公開第20110300205号明細書並びに国際公開第2011005799号パンフレット及び同第2013055905号パンフレット（これらの各々の内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）に記載の方法により設計してもよい。

20

【0814】

一実施形態では、本発明の自己複製キメラポリヌクレオチドは、免疫応答を増大し得るタンパク質をコードすることができる。非制限的例として、キメラポリヌクレオチドは、少なくとも1つの抗原をコードすることができる自己複製RNAであってもよい（米国特許出願公開第20110300205号明細書、同第20130171241号明細書、同第20130177640号明細書及び同第20130177639号明細書並びに国際公開第2011005799号パンフレット、同第2012006372号パンフレット、同第2012006377号パンフレット、同第2013006838号パンフレット、同第2013006842号パンフレット、同第2012006369号パンフレット及び同第2013055905号パンフレットを参照のこと；これらの各々の内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）。一態様では、自己複製RNAは、大型哺乳動物において免疫応答を増大するのに十分な量で、哺乳動物に投与することができる（例えば、国際公開第2012006369号パンフレットを参照のこと；これは、全体として参照により本明細書に組み込む）。

30

【0815】

一実施形態では、本発明の自己複製キメラポリヌクレオチドは、本明細書に記載の方法、又は当技術分野で公知の方法を用いて、製剤化することができる。非制限的例として、自己複製RNAは、ギール(Geall)ら（自己増幅RNAワクチンの非ウイルス送達(Nonviral delivery of self-amplifying RNA vaccines)、PNAS、2012年；PMID：22908294；その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）に記載されている方法による送達のために製剤化することができる。

40

【0816】

別の非制限的例では、本発明のキメラポリヌクレオチド（例えば、自己複製RNAなどの免疫原をコードする核酸分子）は、ペグ化リポソーム中に実質的にカプセル化してもよい（国際公開第2013033563号パンフレットを参照のこと；これは、全体として参照により本明細書に組み込む）。また別の非制限的例では、自己複製RNAは、国際公開第2013055905号パンフレット（これは、全体として参照により本明細書に組み込む）に記載される通りに製剤化してもよい。1つの非制限的例では、自己複製RNA

50

は、国際公開第2012006359号パンフレット又は米国特許出願公開第20130183355号明細書（これらの各々の内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）に記載される通りに、生分解性ポリマーを用いて製剤化することもできる。

【0817】

一実施形態では、自己複製RNAは、ビリオン様粒子中に製剤化してもよい。非制限的例として、自己複製RNAは、国際公開第2012006376号パンフレット（これは、全体として参照により本明細書に組み込む）に記載される通りに、ビリオン様粒子中に製剤化される。

【0818】

別の実施形態では、自己複製RNAは、リボソーム中に製剤化してもよい。非制限的例として、自己複製RNAは、国際公開第20120067378号パンフレット（これは、全体として参照により本明細書に組み込む）に記載される通りに、リボソーム中に製剤化される。一態様では、リボソームは、限定はしないが、キメラポリヌクレオチド、例えば、mRNAの送達に有利となり得るpKa値を有する脂質を含んでもよい。別の態様では、リボソームは、生理学的pHでほぼ中性の表面電荷を有し得ることから、免疫に有効となり得る（例えば、国際公開第20120067378号パンフレットに記載のリボソームを参照のこと；この文献は、全体として参照により本明細書に組み込む）。

10

【0819】

また別の実施形態では、自己複製RNAは、カチオン性水中油形エマルジョンに製剤化してもよい。非制限的例として、自己複製RNAは、国際公開第2012006380号パンフレット（これは、全体として参照により本明細書に組み込む）に記載される通りに、カチオン性水中油形エマルジョンに製剤化される。本明細書に記載の自己複製RNA（例えば、キメラポリヌクレオチド）と一緒に使用することができるカチオン性水中油形エマルジョンは、国際公開第2012006380号パンフレット（これは、全体として参照により本明細書に組み込む）に記載の方法により製造することができる。

20

【0820】

一実施形態では、本発明のキメラポリヌクレオチドは、両親媒性及び/又は免疫原性両親媒性ペプチドをコードすることができる。

一実施形態では、本発明のキメラポリヌクレオチドの製剤は、両親媒性及び/又は免疫原性両親媒性ペプチドをさらに含んでもよい。非制限的例として、両親媒性及び/又は免疫原性両親媒性ペプチドを含むキメラポリヌクレオチドは、米国特許出願公開第20110250237号明細書並びに国際公開第2010009277号パンフレット及び同第2010009065号パンフレット（これらの各々の内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）に記載される通りに製剤化することができる。

30

【0821】

一実施形態では、本発明のキメラポリヌクレオチドは、免疫刺激性であってもよい。非制限的例として、キメラポリヌクレオチドは、プラス-センス鎖又はマイナス-センス鎖RNAウイルスゲノムの全部若しくは一部をコードすることができる（国際公開第2012092569号パンフレット及び米国特許出願公開第20120177701号明細書を参照のこと；これらの各々は、全体として参照により本明細書に組み込む）。別の非制限的例では、本発明の免疫刺激性キメラポリヌクレオチドは、本明細書に記載の及び/又は当技術分野で公知の投与用賦形剤と一緒に製剤化することができる（国際公開第2012068295号パンフレット及び米国特許出願公開第20120213812号明細書を参照のこと；これらの各々は、全体として参照により本明細書に組み込む）。キメラポリヌクレオチドはさらに、免疫応答を促進するサイトカイン、例えば、モノカイン、リンホカイン、インターロイキン若しくはケモカイン（例えば、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12、INF-、INF-、GM-CSF、LT-）、又はhGHなどの増殖因子を含んでもよい。

40

【0822】

50

一実施形態では、本明細書に記載の方法により製剤化されるワクチンの応答は、治療効果を誘導する様々な化合物の添加により増強することができる。非制限的例として、ワクチン製剤は、MHC II 結合ペプチド又はMHC II 結合ペプチドと類似の配列を有するペプチドを含んでもよい（国際公開第2012027365号パンフレット、同第2011031298号パンフレット並びに米国特許出願公開第20120070493号明細書、同第20110110965号明細書を参照のこと；これらの各々は、全体として参照により本明細書に組み込む）。別の例として、ワクチン製剤は、対象におけるニコチン残基に対する抗体応答を生み出し得る修飾ニコチン化合物を含んでもよい（国際公開第2012061717号パンフレット及び米国特許出願公開第20120114677号パンフレットを参照のこと；これらの各々は、全体として参照により本明細書に組み込む）。

10

【0823】

一実施形態では、キメラポリヌクレオチドは、少なくとも1つの抗体又はその断片若しくは部分をコードすることができる。抗体は、多種多様な感染因子を阻害し、それらから防御することができる広域中和抗体であってよい。非制限的例として、感染症から対象を防御する、及び/又は疾患を治療するために、少なくとも1つの抗体又はその断片若しくは部分をコードするキメラポリヌクレオチドが提供される。別の非制限的例として、感染症から対象を防御する、及び/又は疾患を治療するために、広範囲の感染因子を中和することができる2種以上の抗体又はその断片若しくは部分をコードするキメラポリヌクレオチドが提供される。

20

【0824】

一実施形態では、キメラポリヌクレオチドは、抗体重鎖又は抗体軽鎖をコードすることができる。抗体重鎖又は抗体軽鎖をコードすることができるキメラポリヌクレオチドの最適な割合を評価することにより、最大量の機能性抗体及び/又は所望の応答を生み出す割合を決定することができる。キメラポリヌクレオチドはまた、抗体の単一s c F v鎖もコードすることができる。

【0825】

本発明によれば、1つ又は複数の広域中和抗体をコードするキメラポリヌクレオチドは、感染ウイルスへの曝露の前に対象に投与してもよい。

一実施形態では、細胞、組織又は対象に供給される有効量のキメラポリヌクレオチドは、免疫予防に十分な量であってよい。

30

【0826】

一部の実施形態では、癌細胞特異的タンパク質をコードするキメラポリヌクレオチドを癌ワクチンとして製剤化することができる。非制限的例として、少なくとも1つの本発明のキメラポリヌクレオチドを含む癌ワクチンは、癌を予防するために予防的に用いることができる。ワクチンは、アジュバント及び/又は防腐剤を含んでもよい。非制限的例として、アジュバントは、スクアレンであってよい。別の非制限的例として、防腐剤はチメロザールであってよい。

【0827】

一実施形態では、本発明は、1種又は複数種の抗体、及び/又は他の抗感染試薬をコードするキメラポリヌクレオチドを含有する免疫原性組成物を提供する。これらの免疫原性組成物は、アジュバント及び/又は防腐剤を含んでもよい。非制限的例として、抗体は、広域中和抗体であってよい。

40

【0828】

別の実施形態では、本発明は、1種又は複数種の抗体、及び/又は他の抗感染試薬をコードするキメラポリヌクレオチドを含有する抗体治療薬を提供する。

一実施形態では、本発明のキメラポリヌクレオチド組成物は、他の予防又は治療化合物と一緒に投与することができる。非制限的例として、予防又は治療化合物は、アジュバント又はブースタであってよい。ワクチンなどの予防組成物に関して、本明細書で用いられるとき、用語「ブースタ」は、組成物の追加投与を指す。ブースタ（又はブースタワク

50

チン)は、これより早期の予防組成物の投与後に投与することができる。予防組成物の最初の投与からブースタ投与までの時間は、限定はしないが、1分、2分、3分、4分、5分、6分、7分、8分、9分、10分、15分、20分、35分、40分、45分、50分、55分、1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、8時間、9時間、10時間、11時間、12時間、13時間、14時間、15時間、16時間、17時間、18時間、19時間、20時間、21時間、22時間、23時間、1日、36時間、2日、3日、4日、5日、6日、1週間、10日、2週間、3週間、1ヵ月、2ヵ月、3ヵ月、4ヵ月、5ヵ月、6ヵ月、7ヵ月、8ヵ月、9ヵ月、10ヵ月、11ヵ月、1年、18ヵ月、2年、3年、4年、5年、6年、7年、8年、9年、10年、11年、12年、13年、14年、15年、16年、17年、18年、19年、20年、25年、30年、35年、40年、45年、50年、55年、60年、65年、70年、75年、80年、85年、90年、95年、又は99年超であってよい。

10

【0829】

一実施形態では、キメラポリヌクレオチドは、生ワクチンの投与と同様に鼻内に投与してもよい。別の態様では、キメラポリヌクレオチドは、当技術分野では公知の不活性化ワクチンの投与と同様に筋肉内又は皮内に投与してもよい。

【0830】

一実施形態では、キメラポリヌクレオチドを用いて、既知若しくは未知の新興の脅威又は操作による脅威の伝染から防御する及び/又は保護することができる。

一実施形態では、キメラポリヌクレオチドは、本明細書に記載の方法により製剤化することができる。製剤は、2種以上の抗体又はワクチン用のキメラポリヌクレオチドを含んでもよい。一態様では、製剤は、2種以上の疾患、障害若しくは病状に対して治療及び/又は予防効果を有し得るキメラポリヌクレオチドを含んでもよい。非制限的例として、製剤は、抗原、抗体又はウイルスタンパク質をコードするキメラポリヌクレオチドを含んでもよい。

20

【0831】

さらに、本発明の組成物は、様々な分野、例えば、限定はしないが、細胞内及び細胞外タンパク質、タンパク質相互作用、シグナル経路及び細胞生物学などでの研究に用いることができる。

【0832】

一実施形態では、キメラポリヌクレオチドは、ワクチン、例えば、限定はしないが、国際公開第2013093629号パンフレット(その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む)に記載のモジュラーワクチンに使用することができる。非制限的例として、キメラポリヌクレオチドは、少なくとも1つの抗原、少なくとも1つ細胞内局在性エレメント及び少なくとも1つのCDヘルパーエレメントをコードする。一態様では、細胞内局在性エレメントは、細胞質ゾルからの抗原の輸出をもたらすタンパク質配列のシグナルペプチドであってもよい。別の態様では、CD4ヘルパーエレメントは、限定はしないが、P30、NEF、P23TT、P32TT、P21TT、PfT3、P2TT、HBVnc、HA、HBsAg及びMTであってよい(国際公開第2013093629号パンフレットを参照のこと;これは、全体として参照により本明細書に組み込む)。

30

40

【0833】

一実施形態では、キメラポリヌクレオチドは、RSV感染の予防若しくは治療又はRSV感染のリスクの軽減に使用することができる。バイシュナウ(Vaishnaw)らは、米国特許出願公開第20131065499号明細書(その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む)において、RSV感染を治療及び/又は予防するために、siRNAを含む組成物の使用を記載している。非制限的例として、キメラポリヌクレオチドは、RSVの予防及び/又は治療を目的とする鼻内投与のために製剤化することができる(例えば、米国特許出願公開第20130165499号明細書を参照のこと;その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む)。

【0834】

50

一実施形態では、キメラポリヌクレオチドは、インフルエンザウイルスの感染、例えば、限定はしないが、病原性の高いトリインフルエンザウイルス（限定はしないが、H5N1サブタイプなど）感染、及びヒトインフルエンザウイルス（限定はしないが、H1N1サブタイプ及びH3N2サブタイプなど）感染のリスクを軽減するか、又はその感染を阻害するために使用することができる。米国特許第8470771号明細書（その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）に記載されるタンパク質配列のいずれかをコードし得る本明細書に記載のキメラポリヌクレオチドは、インフルエンザ感染症の治療又はそのリスクの軽減に用いることができる。

【0835】

一実施形態では、キメラポリヌクレオチドは、寄生体に対するワクチンとして、又は寄生体により産生されるタンパク質に対する免疫応答を調節するために用いることができる。バーグマン-ライトナー（Bergmann-Leitner）らは、米国特許第8470560号明細書（その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）において、マラリア原虫のスポロゾイト表面タンパク質（CSP）に対するDNAワクチンを記載している。非制限的例として、キメラポリヌクレオチドは、C3dのCR2結合モチーフをコードすることができ、マラリア原虫のCSPに対して免疫系を調節するためのワクチン又は治療薬として用いることができる。

【0836】

一実施形態では、キメラポリヌクレオチドは、例えば、限定はしないが、国際公開第2013112778号パンフレット及び同第2013112780号パンフレット（これらの各々の内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）に記載されるものなど、アルキン修飾生体分子で標識することができるウイルスを産生するために使用することができる。標識ウイルスは、ウイルスの感染力を増大させることができるため、ワクチンの製造に有益となり得る。標識ウイルスは、国際公開第2013112778号パンフレット及び同第2013112780号パンフレット（これらの各々の内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）に記載されるものを含む様々な方法によって生産することができる。

【0837】

一実施形態では、キメラポリヌクレオチドは、ワクチンとして使用することができ、これはさらに、ワクチンがより高い免疫応答を誘発するのを可能にし得るアジュバントを含んでもよい。非制限的例として、アジュバントは、ヒト小児集団においてより高い免疫応答を誘発することができるサブミクロン水中油形エマルジョンであってよい（例えば、全体として参照により本明細書に組み込む、米国特許出願公開第20120027813号明細書及び米国特許第8506966号明細書に記載のアジュバント添加ワクチンを参照されたい）。

【0838】

別の実施形態では、キメラポリヌクレオチドは、ワクチンとして使用することができ、これはさらに、ワクチンの安定性を改善すると共に、その発現を高める5'キャップ類似体を含んでもよい。5'キャップ類似体の非制限的例は、米国特許出願公開第20120195917号明細書に記載されており、その内容は、全体として参照により本明細書に組み込むものとする。

【0839】

天然に存在する突然変異体

別の実施形態では、同時係属国際公開第2015038892号パンフレット（その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）において、例えば、限定はしないが、パラグラフ[0001174]～[0001175]に記載される通りに、キメラポリヌクレオチドを使用して、増大した生物活性、改善された患者の転帰、又は防御機能など、改善された疾患改変活性を有する天然に存在するタンパク質の変異体を発現することができる。

【0840】

10

20

30

40

50

病原生物又は疾患細胞のターゲティング

本明細書には、細胞分裂抑制若しくは細胞傷害性ポリペプチドをコードするキメラポリヌクレオチドを用いて、例えば、細菌、酵母、原生動物、蠕虫などの病原微生物、又は癌細胞などの疾患細胞をターゲティングする方法が提供される。好ましくは、導入される mRNA は、修飾ヌクレオチド又は他の核酸配列修飾を含有し、これらは、標的病原生物において排他的又は優先的に翻訳されて、治療薬の起こり得るオフターゲット効果を低減する。こうした方法は、血液、精液、卵などの生体材料、並びに肺、組織、及び臓器などの移植材料に見出される病原生物を除去する、又は疾患細胞を殺傷する上で有用である。

【0841】

バイオプロセッシング

本明細書に提供する方法は、同時係属国際公開第2015038892号パンフレット（その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）において、例えば、限定はしないが、パラグラフ[0001176]～[0001187]に記載される通りに、細胞培養プロセスでのタンパク質産物収率を高める上で有用となり得る。

【0842】

細胞

一実施形態では、細胞は、哺乳動物細胞、細菌細胞、植物、微生物、藻類及び真菌細胞からなる群から選択される。一部の実施形態では、細胞は、例えば、限定はしないが、ヒト、マウス、ラット、ヤギ、ウマ、ウサギ、ハムスター又はウシ細胞などの哺乳動物細胞である。別の実施形態では、細胞は、限定はしないが、ヒーラ(HeLa)、NS0、SP2/0、KEK293T、ベロ(Vero)、Caco、Caco-2、MDCK、COS-1、COS-7、K562、ジャーカット(Jurkat)、CHO-K1、DG44、CHOK1SK、CHO-S、Huvec、CV-1、Huh-7、NIH3T3、HEK293、293、A549、HepG2、IMR-90、MCF-7、U-20S、Per.C6、SF9、SF21又はチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞など、樹立細胞株に由来するものでもよい。

【0843】

特定の実施形態では、細胞は、例えば、限定はしないが、クリソスポリウム属(*Chrysosporium*)細胞、アスペルギルス属(*Aspergillus*)細胞、トリコデルマ属(*Trichoderma*)細胞、ジクチオステリウム属(*Dictyostelium*)細胞、カンジダ属(*Candida*)細胞、サッカロミセス属(*Saccharomyces*)細胞、シゾサッカロミセス属(*Schizosaccharomyces*)細胞、及びペニシリウム属(*Penicillium*)細胞などの真菌細胞である。

【0844】

特定の実施形態では、細胞は、例えば、限定はしないが、大腸菌(*E. coli*)、枯草菌(*B. subtilis*)、又はBL21細胞などの細菌細胞である。本発明の方法によりトランスフェクトされる一次及び二次細胞は、様々な組織から得ることができ、限定はしないが、培地中に維持することができるあらゆる細胞型を含む。例えば、本発明の方法によりトランスフェクトすることができる一次及び二次細胞として、限定はしないが、線維芽細胞、角化細胞、上皮細胞(例えば、哺乳動物上皮細胞、腸上皮細胞)、内皮細胞、グリア細胞、神経細胞、血液の有形成分(例えば、リンパ球、骨髄細胞)、筋肉細胞及びこれらの体細胞型の前駆体が挙げられる。一次細胞はまた、同じ種又は別の種(例えば、マウス、ラット、ウサギ、ネコ、イヌ、ブタ、ウシ、鳥類、ヒツジ、ヤギ、ウマ)のドナーから取得することもできる。

【0845】

精製及び単離

当業者であれば、培養細胞から目的のタンパク質を精製又は単離するのに使用する方法を決定することができる。一般に、これは、親和性結合又は非親和性結合を用いた捕捉方法によって実施される。目的のタンパク質が培養細胞によって分泌されない場合には、精

10

20

30

40

50

製又は単離の前に、培養細胞の溶解を実施すべきである。細胞培養基成分、並びに本明細書に記載する消泡剤及びその他の栄養素及び補充物などの細胞培養添加剤、細胞、細胞残屑、宿主細胞タンパク質、DNA、ウイルスなどと一緒に、目的のタンパク質を含有する非清澄化細胞培養液を使用することができる。このプロセスは、バイオリクター自体において実施してもよい。培養液は、pH、温度若しくはその他の刺激特性などの所望の刺激に対して前処置するか、又はポリマーの添加の際に順化させてもよく、あるいは、培養液にポリマーを溶解させるのに必要な刺激条件について要求されるパラメータに対して適正に順化させた担体液体に、ポリマーを添加することができる。培養液と一緒にポリマーを完全に循環させた後、刺激（pH、温度、塩濃度などの変化）を加えてから、所望のタンパク質及びポリマー沈殿物を溶液から取り出すことができる。ポリマー及び所望のタンパク質を残りの培養液から分離した後、任意選択で1回又は複数回洗浄することにより、捕捉された混入物、又は緩く結合した混入物を除去することができる。次に、例えば、溶離などによって、所望のタンパク質をポリマーから回収することができる。溶離は、ポリマーが、その沈殿した形態を保持すると共に、所望のタンパク質の選択された溶離の工程中にその不純物を全て保持するような一連の条件下で実施するのが好ましい。ポリマー及びタンパク質並びにいずれかの不純物は、水又は緩衝溶液などの新しい液体に溶解させてもよく、ポリマー又は不純物に対してタンパク質への優先及び選択性を有するアフィニティ、イオン交換、疎水性、又は他のタイプのクロマトグラフィーなどの手段によりポリマーを回収することができる。溶離されたタンパク質を回収した後、必要に応じて、バッチ様ステップ又は連続フロースルーステップいずれかの追加処理ステップに付してもよい。

【0846】

別の実施形態では、細胞株又は候補細胞株の集団における特定のポリペプチド、特に、既知の活性を有する標準タンパク質のタンパク質変異体などのポリペプチドの発現を最適化するのが有用となり得る。一実施形態では、複数の標的細胞型を用意し、複数の標的細胞型の各々と、ポリペプチドをコードする修飾mRNAを独立に接触させることにより、標的細胞において目的のポリペプチドの発現を最適化する方法が提供される。さらに、タンパク質産生効率を高めるために、培養条件を改変してもよい。続いて、複数の標的細胞型中の目的のポリペプチドの存在及び/又はレベルを検出及び/又は定量することによって、効率的な標的細胞及びそれに関する細胞培養条件の選択により、目的とするポリペプチドの発現の最適化を可能にする。こうした方法は、目的のポリペプチドが、1つ又は複数の翻訳後修飾を含むか、又は実質的な三次構造（往々にして効率的なタンパク質産生を困難にする）を有する場合に有用となり得る。

【0847】

タンパク質回収

目的のタンパク質は、好ましくは分泌ポリペプチドとして培地から回収するか、又は分泌シグナルなしで発現される場合には、宿主細胞溶解物から回収することができる。目的のタンパク質の実質的に均質な調製物が得られるように、他の組換えタンパク質及び宿主細胞タンパク質から目的のタンパク質を精製することが必要な場合もある。培地又は溶解物から細胞及び/若しくは粒状細胞残屑を除去してもよい。次に、例えば、免疫アフィニティ若しくはイオン交換カラムでの分画、エタノール沈殿、逆相HPLC（RP-HPLC）、セファデックス（SEPHADEX）（登録商標）クロマトグラフィー、シリカ若しくはカチオン交換樹脂（DEAEなど）でのクロマトグラフィーによって、混入物の可溶性タンパク質、ポリペプチド及び核酸から目的の産物を精製することができる。宿主細胞により発現された異種タンパク質を精製する方法は、当技術分野において公知である。

【0848】

本明細書に記載する方法及び組成物を用いて、内因性アゴニスト生体応答を減弱又は阻止する、及び/又は哺乳動物対象における受容体若しくはシグナル伝達分子に拮抗することができるタンパク質を生産することができる。例えば、IL-12及び/又はIL-23受容体シグナル伝達は、例えば、多発性硬化症などの慢性自己免疫障害並びに慢性関節リウマチ、乾癬、エリテマトーデス、強直性脊椎炎及びクローン病などの炎症性疾患にお

10

20

30

40

50

いて増強され得る（キクリー K (K i k l y K)、リュウ L (L i u L)、ナ S (N a S)、セジウィック J D (S e d g w i c h J D) 著、2006年、カレント・オピニオン・イン・免疫学 (Cur. Opin. Immunol.)、第18巻(6)、p. 670~5)。別の実施形態では、核酸は、ケモカイン受容体のアンタゴニストをコードする。ケモカイン受容体 CXCR - 4 及び CCR - 5 は、宿主細胞への HIV 侵入に必要である（アレンザナ - セイスデス F (A r e n z a n a - S e i d e d o s F) ら著、1996年、ネイチャー (Nature)、10月3日、第383巻(6599)、p. 400)。

【0849】

遺伝子サイレンシング

本明細書に記載するキメラポリヌクレオチドは、細胞集団における1つ又は複数の標的遺伝子の発現をサイレンシングする（すなわち、阻止又は実質的に低減する）上で有用である。配列特異的ヒストンH3メチル化を指令することができる目的のポリペプチドをコードするキメラポリヌクレオチドは、ポリペプチドが翻訳されるような条件下で集団中の細胞に導入されると、ヒストンH3メチル化及び続くヘテロクロマチン形成によって標的遺伝子の遺伝子転写を低減する。一部の実施形態では、サイレンシング機構は、哺乳動物対象に存在する細胞集団に対して実施する。非制限的例として、有用な標的遺伝子は、突然変異したヤヌスキナーゼ (J a n u s K i n a s e) 2ファミリーメンバーであり、この場合、哺乳動物対象は、突然変異標的遺伝子を発現すると、異常なキナーゼ活性によって骨髄増殖性疾患に罹患する。

10

20

【0850】

キメラポリヌクレオチドとRNAi薬剤の共投与もまた本明細書に提供される。

生物学的経路の調節

細胞に導入されたキメラポリヌクレオチドの急速な翻訳は、標的生物学的経路を調節する望ましい機構をもたらす。こうした方法調節は、所与の経路の拮抗作用及び活性化作用を含む。一実施形態では、キメラポリヌクレオチドが細胞中に局在化され、ポリペプチドが、細胞においてキメラポリヌクレオチドから翻訳され得るような条件下で、目的のポリペプチドをコードするキメラポリヌクレオチドを含む有効量の組成物と、細胞を接触させることにより、細胞における生物学的経路に拮抗する方法が提供され、ここで、ポリペプチドは、生物学的経路で機能性のポリペプチドの活性を阻害する。生物学的経路の例として、多発性硬化症、慢性関節リウマチ、乾癬、エリテマトーデス、強直性脊椎炎、若しくはクローン病などの自己免疫障害又は炎症性障害において欠損するものがあり；とりわけ、IL - 12 及び IL - 23 シグナル伝達経路の拮抗作用は、特に有用である。（キクリー K (K i k l y K)、リュウ L (L i u L)、ナ S (N a S)、セジウィック J D (S e d g w i c h J D) 著、2006年、カレント・オピニオン・イン・免疫学 (Cur. Opin. Immunol.)、第18巻(6)、p. 670~5を参照のこと）。

30

【0851】

さらに、ケモカイン受容体に対するアンタゴニストをコードするキメラポリヌクレオチドが提供され；ケモカイン受容体 CXCR - 4 及び CCR - 5 は、例えば、宿主細胞への HIV 侵入に必要である。（アレンザナ - セイスデス F (A r e n z a n a - S e i d e d o s F) ら著、1996年、ネイチャー (Nature)、10月3日、第383巻(6599)、p. 400)。

40

【0852】

あるいは、核酸が細胞中に局在化され、組換えポリペプチドが、組換えポリペプチドが細胞において核酸から翻訳され得ると共に、組換えポリペプチドが、生物学的経路において機能性のポリペプチドの活性を誘導するような条件下で、組換えポリペプチドをコードする有効量のキメラポリヌクレオチドと、細胞を接触させることにより、細胞における生物学的経路を活性化する方法が提供される。活性化される生物学的経路の例として、細胞運命決定を調節する経路がある。こうした活性化は、可逆的、又はそうでなければ、不可

50

逆的である。

【0853】

細胞表面でのリガンド又は受容体の発現

本明細書に記載する態様の一部の態様及び実施形態では、本明細書に記載のキメラポリヌクレオチドを用いて、細胞の表面にリガンド又はリガンド受容体（例えば、ホーミング部分）を発現させることができる。細胞表面に結合したリガンド又はリガンド受容体部分は、細胞が、*in vivo*で組織又は物質との所望の生物学的相互作用を達成することを可能にする。リガンドは、抗体、抗体断片、アプタマー、ペプチド、ビタミン、炭水化物、タンパク質若しくはポリペプチド、受容体、例えば、細胞表面受容体、接着分子、糖タンパク質、糖残基、治療薬、薬物、グリコサミノグリカン、又はこれらの任意の組み合わせであってよい。例えば、リガンドは、抗体であってよく、これは、癌細胞特異的抗原を認識して、細胞が腫瘍細胞と優先的に相互作用できるようにし、これによって修飾細胞の腫瘍特異的局在化を可能にする。好ましいリガンドは、治療対象の組織の外側面上の標的分子と相互作用することができるため、リガンドは、細胞組成物が治療対象の組織に蓄積する能力を付与し得る。他の組織に対して限定された架橋反応性を有するリガンドが一般に好ましい。

10

【0854】

ある事例では、リガンドは、細胞が、特定の組織をターゲティングする、又は特定のリガンドと相互作用することを可能にするホーミング部分として作用することができる。こうしたホーミング部分として、限定はしないが、以下のものが挙げられる：特異的結合ペアの任意のメンバー、抗体、モノクローナル抗体、又はその誘導体若しくは類似体、例えば、限定なしで、Fv断片、単鎖Fv (scFv)断片、Fab'断片、F(ab')₂断片、単ドメイン抗体、ラクダ化抗体及び抗体断片、ヒト化抗体及び抗体断片、並びに上記の多価形態；多価結合試薬、例えば、限定なしで、単一特異的若しくは二重特異的抗体断片、例えば、ジスルフィド安定化Fv断片、scFvタンデム((SCFV)₂断片)、ダイアボディ、トリボディ若しくはテトラボディ（これらは、典型的に、共有結合した、あるいは、安定化した（すなわち、ロイシンジッパー若しくはヘリックス安定化）scFV断片；並びに他のホーミング部分として、例えば、アプタマー、受容体、及び融合タンパク質がある。

20

【0855】

一部の実施形態では、ホーミング部分は、表面結合抗体であってもよく、これは、細胞ターゲティング特異性の調整を可能にする。高度に特異的な抗体は、所望のターゲティング部位の目的のエピトープに対して増強され得ることから、ホーミング部分は、特に有用である。一部の実施形態では、複数の抗体を細胞の表面に発現させると、各抗体は、所望の標的に対して異なる特異性を持つことができる。こうした手法は、ホーミング相互作用の結合活性及び特異性を高めることができる。

30

【0856】

当業者は、細胞の要望される局在化又は機能に基づいて、任意のホーミング部分を選択することができる。例えば、タモキシフェンなどのエストロゲン受容体は、細胞表面に多数のエストロゲン受容体を有するエストロゲン依存性乳癌細胞に対して細胞をターゲティングすることができる。リガンド/受容体相互作用の他の非制限的例として、以下のものが挙げられる：CCR1（例えば、慢性関節リウマチにおける炎症関節組織若しくは脳、及び/又は多発性硬化症の治療のため）、CCR7、CCR8（例えば、リンパ節組織へのターゲティング）、CCR6、CCR9、CCR10（例えば、腸組織にターゲティングするため）、CCR4、CCR10（例えば、皮膚にターゲティングするため）、CXCR4（例えば、遊出の全般的増強のため）、HCELL（例えば、炎症及び/又は炎症性障害、骨髄の治療のため）、47（例えば、腸粘膜ターゲティングのため）、VLA-4/VCAM-1（例えば、内皮へのターゲティング）。一般に、本明細書に記載する方法及び組成物で使用するために、ターゲティング（例えば、癌転移）に關与する任意の受容体を利用することができる。

40

50

【0857】

細胞株の修飾

標的哺乳動物細胞の細胞運命に改変を導入する方法が提供される。標的哺乳動物細胞は、前駆細胞であってもよく、改変は、細胞株中への分化の駆動、又はこうした分化の阻止を含み得る。あるいは、標的哺乳動物細胞は、分化細胞であってもよく、細胞運命改変は、多能性前駆細胞中への脱分化の駆動、又はこうした脱分化の阻止、例えば、癌幹細胞中への癌細胞の脱分化などを含む。細胞運命の変化が要望される状況では、細胞運命の改変が誘導される条件下で、細胞運命誘導性ポリペプチドをコードする有効量のmRNAを標的細胞に導入する。一部の実施形態では、修飾mRNAは、細胞の垂集団を第1表現型から第2表現型へと再プログラムする上で有用である。こうした再プログラムは、一過性又は永久的のいずれであってもよい。任意選択で、再プログラムは、標的細胞を誘導して、中間表現型を採用させる。

10

【0858】

さらに、本発明の方法は、高い効率のトランスフェクション、細胞を再トランスフェクトする能力、及び標的細胞に産生される組換えポリペプチドの量の維持可能性によって、人工多能性幹細胞(iPS細胞)を作製する上で特に有用である。さらに、本明細書に記載の方法を用いて作製したiPSCの使用は、奇形腫形成の発生率を低下させると予想される。

【0859】

また、標的細胞集団における細胞分化を抑制する方法も提供される。例えば、ポリペプチドが翻訳されて、前駆細胞の分化を抑制するような条件下で、ポリペプチドをコードする有効量のキメラポリヌクレオチドを含む組成物と、1つ又は複数の前駆細胞型を含有する標的細胞集団を接触させる。非制限的实施形態では、標的細胞集団は、哺乳動物対象の損傷組織又は外科手術の影響を受けた組織を含有する。前駆細胞は、例えば、間質前駆細胞、神経前駆細胞、又は間葉系前駆細胞である。

20

【0860】

特定の実施形態では、1つ又は複数の分化因子Gata4、Mef2c及びTbx4をコードするキメラポリヌクレオチドが提供される。これらのmRNA生成因子は、線維芽細胞に導入されて、心筋細胞への再プログラムを駆動する。こうした再プログラムは、mRNA含有パッチ又は他の材料と損傷心臓組織を接触させて、心臓の再生を促進することにより、in vivoで実施することができる。こうしたプロセスは、線維症とは反対に、心筋発生を促進する。

30

【0861】

細胞死の媒介

一実施形態では、キメラポリヌクレオチドを用いて、細胞死受容体、細胞死受容体リガンド又はその組み合わせの発現を増加させることにより、細胞(例えば、癌細胞)にアポトーシスを誘導することができる。この方法を使用して、任意の所望する細胞に細胞死を誘導ことができ、この方法は、細胞が、自然のアポトーシスシグナルから逃避する癌の治療に特に有用性がある。

【0862】

アポトーシスは、複数の独立したシグナル伝達経路により誘導され得るが、これらの経路は、腫瘍壊死因子(TNF)受容体/リガンドスーパーファミリーに属するいくつかの「細胞死受容体」とそれらのリガンドとの様々な相互作用からなる最終エフェクター機構に集中する。最もよく特性決定されている細胞死受容体は、CD95(「Fas」)、TNFR1(p55)、細胞死受容体3(DR3又はApo3/TRAMPO)、DR4及びDR5(a po2-TRAIL-R2)である。アポトーシスの最終エフェクター機構は、カスパーゼと称される一連のプロテイナーゼの活性化であると考えられる。これらのカスパーゼの活性化によって、一連の重要な細胞タンパク質の切断及び細胞死が起こる。細胞死受容体/リガンド誘導細胞死の分子機構は、当技術分野でよく知られている。例えば、Fas/FasL媒介アポトーシスは、3つのFasL分子が結合して、C末端細胞死

40

50

ドメイン (D D) を介した F a s 受容体の三量体化を誘導し、次にこれが、アダプタータンパク質 F A D D (細胞死ドメインを含む F a s 結合タンパク質) 及びカスパーゼ - 8 をリクルートすることによって、誘導される。この 3 分子複合体、 F a s / F A I D D / カスパーゼ - 8 のオリゴマー化によって、プロ酵素カスパーゼ - 8 の活性カスパーゼ - 8 へのタンパク質分解切断が起こり、これが今度は、タンパク質分解により他の下流カスパーゼ (カスパーゼ - 3 など) を活性化することにより、アポトーシスプロセスを開始する。細胞死リガンドは概して、三量体又はより高次の構造に形成されると、アポトーシス促進性となる。単量体の場合、これらは、細胞死受容体との結合について、三量体と競合することにより、抗アポトーシス因子として役立ち得る。

【 0 8 6 3 】

一実施形態では、キメラポリヌクレオチド組成物は、細胞死受容体 (例えば、 F a s 、 T R A I L 、 T R A M O 、 T N F R 、 T L R など) をコードする。キメラポリヌクレオチドのトランスフェクションによる細胞死受容体を発現させるようにした細胞は、この受容体を活性化するリガンドにより誘導される細胞死に対して感受性になる。同様に、例えば、細胞表面で、細胞死リガンドを発現させるようにした細胞は、トランスフェクトした細胞が標的細胞に接触すると、受容体を有する細胞の死を誘導することになる。別の実施形態では、キメラポリヌクレオチド組成物は、細胞死受容体 (例えば、 F a s L 、 T N F など) をコードする。別の実施形態では、キメラポリヌクレオチド組成物は、カスパーゼ (例えば、カスパーゼ 3 、 カスパーゼ 8 、 カスパーゼ 9 など) をコードする。癌細胞が、非増殖性又は制御された増殖形態へと適正な分化の不履行を往々にして呈示する場合、別の実施形態では、合成キメラポリヌクレオチド組成物は、細胞死受容体及びその適切な活性化リガンドの両方をコードする。別の実施形態では、合成キメラポリヌクレオチド組成物は、分化因子をコードし、これは、癌幹細胞などの癌細胞で発現されると、その細胞を誘導して、非病原性若しくは非自己再生表現型 (例えば、低下した細胞増殖速度、抑制された細胞分裂など) に分化させるか、又は細胞を誘導して、休眠細胞期 (例えば、 G₀ 静止期) に入らせる。

【 0 8 6 4 】

当業者であれば、アポトーシス誘導技術の使用には、不要な広範囲の細胞死を防ぐために、例えば、腫瘍細胞に対してキメラポリヌクレオチドを適正にターゲティングすることが要求され得る。そのため、キメラポリヌクレオチドが、癌細胞だけに発現されるように、癌抗原を認識する送達機構 (例えば、結合リガンド又は抗体、標的リボソームなど) を使用することができる。

【 0 8 6 5 】

美容用途

一実施形態では、キメラポリヌクレオチドは、美容に関する状態の治療、改善又は予防に使用することができる。こうした状態として、ざ瘡 (ニキビ) 、酒さ、瘢痕、シワ、湿疹、帯状疱疹、乾癬、年齢によるシミ、母斑、乾燥肌、皮膚硬結、発疹 (例えば、おむつかぶれ、あせも) 、疥癬、蕁麻疹、疣贅、虫刺され、白斑、ふけ、そばかす、及び加齢の一般的徴候が挙げられる。

【 0 8 6 6 】

V I . キット及びデバイス

キット

本発明は、本発明の方法を好都合に及び / 又は効果的に実施するための様々なキットを提供する。典型的に、キットは、ユーザが、対象の複数の治療を実施する、及び / 又は複数の実験を実施することを可能にするのに十分な量及び / 又は数の成分を含む。

【 0 8 6 7 】

一態様では、本発明は、本発明の分子 (キメラポリヌクレオチド) を含むキットを提供する。一実施形態では、キットは、 1 つ又は複数の機能性抗体又はその機能断片を含む。

キットは、翻訳可能な領域を含む第 1 キメラポリヌクレオチドを含む、タンパク質生産用であってよい。このキットは、さらに、パッケージング並びに製剤組成物を形成するた

10

20

30

40

50

めの指示書及び/又は送達剤を含んでもよい。送達剤は、塩水、緩衝液、リポイド又は本明細書に開示する任意の送達剤を含んでもよい。

【0868】

一実施形態では、バッファー溶液は、塩化ナトリウム、塩化カルシウム、リン酸塩及び/又はEDTAを含んでもよい。別の実施形態では、緩衝溶液は、限定はしないが、塩水、2 mMカルシウムを含む塩水、5%スクロース、2 mMカルシウムを含む5%スクロース、5%マンニトール、2 mMカルシウムを含む5%マンニトール、乳酸リンゲル液、塩化ナトリウム、2 mMカルシウムを含む塩化ナトリウム及びマンノースを含んでもよい(例えば、米国特許出願公開第20120258046号明細書を参照のこと;これは、全体として参照により本明細書に組み込む)。また別の実施形態では、緩衝溶液を沈殿させてもよいし、又は凍結乾燥させてもよい。各成分の量は、一貫した再生可能な高濃度塩水又は単純なバッファー製剤を可能にするように、変動し得る。また、所定の期間にわたって及び/又は様々な条件下で、バッファー溶液中の修飾RNAの安定性を高めるために、成分を変更してもよい。一態様では、本発明は、タンパク質生産のためのキットを提供し、キットは、以下を含む: 標的細胞に導入されると翻訳可能な領域によりコードされる所望の量のタンパク質を産生するのに有効な量で提供される、翻訳可能な領域を含むキメラポリヌクレオチド; 細胞の自然免疫応答を実質的に阻害するのに有効な量で提供される、阻害核酸を含む第2ポリヌクレオチド; 並びにパッケージング及び指示書。

10

【0869】

一態様では、本発明は、タンパク質生産のためのキットを提供し、キットは、翻訳可能な領域を含むキメラポリヌクレオチド(ポリヌクレオチドは、細胞ヌクレアーゼによる分解の低減を示す)、並びにパッケージング及び指示書を含む。

20

【0870】

一態様では、本発明は、タンパク質生産のためのキットを提供し、キットは、翻訳可能な領域を含むキメラポリヌクレオチド(ポリヌクレオチドは、細胞ヌクレアーゼによる分解の低減を示す)、並びに第1核酸の翻訳可能領域の翻訳に好適な哺乳動物細胞を含む。

【0871】

デバイス

本発明は、目的のポリペプチドをコードするキメラポリヌクレオチドを組み込み得るデバイスを提供する。これらのデバイスは、それを必要とする対象、例えば、ヒト対象に直ちに送達するために利用可能な製剤にポリヌクレオチドを合成するための試薬を安定な製剤中に含有する。

30

【0872】

投与用のデバイスを使用して、本明細書に記載する単回、複数回若しくは分割投与レジメンに従って、本発明のキメラポリヌクレオチドを送達することができる。こうしたデバイスは、例えば、2013年3月9日出願された国際出願PCT/US2013/30062号明細書(代理人整理番号M300)(これらの各々の内容は、全体として参照により本明細書に組み込む)に教示されている。

【0873】

細胞、臓器及び組織に対する複数回投与について当技術分野で公知の方法及びデバイスは、本発明の実施形態として本明細書に開示される方法及び組成物と併用することが考慮される。これらの方法として、例えば、マルチプルニードル、例えば、管腔又はカテーテルを使用するハイブリッドデバイス、並びに熱、電流若しくは放射線駆動機構を使用する方法及びデバイスがある。

40

【0874】

本発明によれば、複数回投与デバイスを使用して、本明細書で考慮する単回、複数回若しくは分割用量を送達することができる。こうした装置は、例えば、2013年3月9日出願された国際出願PCT/US2013/30062号明細書(代理人整理番号M300)に教示されており、その内容は、全体として参照により本明細書に組み込むものとする。

50

【0875】

一実施形態では、ポリヌクレオチドは、少なくとも3本の針で、3つの異なる、任意選択で隣接した部位に、同時に、又は60分以内に皮下若しくは筋肉内投与する（例えば、4、5、6、7、8、9、若しくは10の部位への同時又は60分以内の投与）。

【0876】

固体生分解性マイクロニードルを用いて治療薬を送達する方法は、オヘイガン（O'hagan）らにより、米国特許出願公開第20130287832号明細書により記載されており、その内容は、全体として参照により本明細書に組み込むものとする。マイクロニードルは、少なくとも1つの固体賦形剤と組み合わせた治療薬（例えば、インフルエンザワクチン）から製造される。皮膚に貫入した後、マイクロニードルは、*in situ*で溶解し、治療薬を対象に放出する。非制限的例として、マイクロニードルの製造に使用される治療薬は、本明細書に記載のポリヌクレオチドである。

10

【0877】

経皮薬物送達用のマイクロニードルアセンブリは、ロス（Ross）らにより、米国特許第8636696号明細書に記載されており、その内容は、全体として参照により本明細書に組み込むものとする。このアセンブリは、第1面と第2面を有し、支持体の第2面から外側に向かってマイクロニードルが突出している。アセンブリは、流路と開口部を含み、これらが交差を形成して、液体（例えば、治療薬又は薬物）の通過を可能にする。

【0878】

カテーテル及び/又は管腔を用いる方法及びデバイス

20

カテーテル及び管腔を用いる方法及びデバイスを使用して、単回、複数回若しくは分割投与スケジュールで、本発明のキメラポリヌクレオチドを投与することができる。こうした方法及び装置は、2013年3月9日に出願された国際出願PCT/US2013/30062号明細書（代理人整理番号M300）に教示されており、その内容は、全体として参照により本明細書に組み込むものとする。

【0879】

電流を用いる方法及びデバイス

電流を用いる方法及びデバイスを使用して、単回、複数回若しくは分割投与スケジュールで、本発明のキメラポリヌクレオチドを投与することができる。こうした方法及び装置は、2013年3月9日に出願された国際出願PCT/US2013/30062号明細書（代理人整理番号M300）に教示されており、その内容は、全体として参照により本明細書に組み込むものとする。

30

【0880】

VII. 定義

本明細書の様々な箇所で、本開示の化合物の置換基は、群又は範囲で開示される。本開示は、こうした群及び範囲のメンバーの各々及びあらゆる個別の部分組み合わせを包含する。例えば、用語「 C_{1-6} アルキル」は、具体的に、メチル、エチル、 C_3 アルキル、 C_4 アルキル、 C_5 アルキル、及び C_6 アルキルを個別に開示することが意図される。本明細書において、「任意選択で置換されたX」（例えば、任意選択で置換されたアルキル）という形態の語句は、「X（ここで、Xは、任意選択で置換されている）」（例えば、「アルキル（ここで、アルキルは、任意選択で置換されている）」）と同等であることが意図される。特徴「X」（例えば、アルキル）自体が任意であるとは意図しない。

40

【0881】

約：本明細書で使用される時、用語「約」は、記載される値の $\pm 10\%$ を意味する。

組み合わせて投与される：本明細書で使用される時、用語「組み合わせて投与される」又は「併用投与」は、2種以上の薬剤が対象に同時に、又は対象に対する各薬剤の効果の重複が生じ得るような間隔内で投与されることを意味する。一部の実施形態では、これらの薬剤は、互いの約60分、30分、15分、10分、5分、又は1分以内に投与される。一部の実施形態では、薬剤の投与は、併用効果（例えば、相乗効果）が達成されるよ

50

うに、互いに十分に近い間隔が空けられる。

【0882】

アジュバント：本明細書で使用されるとき、用語「アジュバント」は、抗原に対する対象の免疫応答を増強する物質を意味する。

動物：本明細書で使用されるとき、用語「動物」は、動物界の任意のメンバーを指す。一部の実施形態では、「動物」は、任意の発達段階にあるヒトを指す。一部の実施形態では、「動物」は、任意の発達段階にある非ヒト動物を指す。特定の実施形態では、非ヒト動物は、哺乳動物（例えば、げっ歯類、マウス、ラット、ウサギ、サル、イヌ、ネコ、ヒツジ、畜牛、霊長類、又はブタ）である。一部の実施形態では、動物として、限定はしないが、哺乳類、鳥類、爬虫類、両生類、魚類、及び蠕虫が挙げられる。一部の実施形態では、動物は、トランスジェニック動物、遺伝子操作された動物、又はクローンである。

10

【0883】

抗体断片：本明細書で使用されるとき、用語「抗体断片」は、インタクトな抗体、好ましくはインタクトな抗体の抗原結合領域及び/又は可変領域を含む。抗体断片の例として、Fab、Fab'、F(ab')₂及びFv断片；ダイアボディ；線状抗体；ナノボディ；単鎖抗体分子、並びに抗体断片から形成された多重特異性抗体が挙げられる。

【0884】

抗原：本明細書で使用されるとき、用語「抗原」は、それぞれの抗体に特異的に結合する物質を指す。抗原は、本明細書で使用する癌抗原などの身体、又は外部環境、例えば、感染因子のいずれを起源とするものでもよい。

20

【0885】

目的の抗原又は所望の抗原：本明細書で使用されるとき、用語「目的の抗原」又は「所望の抗原」には、明細書に記載の抗体並びにその断片、突然変異体、変異体、及び改変物が免疫特異的に結合した、本明細書に提供するタンパク質及び他の生体分子が含まれる。目的の抗原の例として、限定はしないが、インスリン、インスリン様成長因子、hGH、tPA、サイトカイン、例えばインターロイキン（IL）、例えばIL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、インターフェロン（IFN）、IFN、IFN、IFN又はIFN、腫瘍壊死因子（TNF）、例えばTNF及びTNF、TNF、TRAIL；G-CSF、GM-CSF、M-CSF、MCP-1及びVEGFが挙げられる。

30

【0886】

近似的に（約）：本明細書で使用されるとき、用語「近似的に」又は「約」は、目的とする1つ以上の値に適用される場合、記載される基準値と同程度である値を指す。特定の実施形態では、用語「近似的に」又は「約」は、特に記載のない限り、又はその他文脈上明らかでない限り、記載される基準値のいずれの（より大きい又はより小さい）方向にも25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、又はそれ未満の範囲に含まれる値の範囲を指す（こうした数が、考えられる値の100%を超える場合を除く）。

40

【0887】

～と会合（結合）した：本明細書で使用されるとき、用語「～と会合（結合）した」、「コンジュゲートした」、「連結した」、「付着した」、及び「係留された」は、2つ以上の部分に関して用いられるとき、それらの部分が、直接、若しくは連結剤として働く1つ又は複数の追加部分を介して、互いに物理的に結合される、又はつながることにより、十分に安定した構造を形成し、これによってその構造が用いられる条件下、例えば、生理学的条件下で、それらの部分が物理的に結合したまま保持されることを意味する。「会合」は、厳密に直接共有化学結合によるものである必要はない。これは、イオン若しくは水素結合、又は「会合した」実体が物理的に結合したまま保持されるように十分安定したハイブリダイゼーションに基づく連結性も示し得る。

50

【0888】

二官能性：本明細書で使用されるとき、用語「二官能性」は、少なくとも2つの官能基の能力を有するか、又はそれらを維持することができる任意の物質、分子又は部分を指す。これらの官能基は、同じ結果又は異なる結果のいずれをもたらすものでもよい。官能基をもたらす構造は、同じでも異なってもよい。例えば、本発明の二官能性修飾RNAは、細胞傷害性ペプチド（第1機能）をコードするが、コードRNAを含むヌクレオシドは、それ自体として細胞傷害性である（第2機能）。この例では、二官能性修飾RNAの癌細胞への送達は、癌を緩和又は治療し得るペプチド若しくはタンパク質分子をもたらすだけでなく、万一修飾RNAの翻訳ではなく、分解が必要な場合には、細胞に対するヌクレオシドの細胞傷害性ペイロードの送達も達成し得る。

10

【0889】

生体適合性：本明細書で使用されるとき、用語「生体適合性」とは、損傷、毒性又は免疫系による拒絶のリスクをほとんど若しくは全くもたらしことなく、生存細胞、組織、臓器若しくはシステムと適合性であることを意味する。

【0890】

生分解性：本明細書で使用されるとき、用語「生分解性」とは、生物の作用により無害の産物に分解できることを意味する。

生物活性：本明細書で使用されるとき、語句「生物活性」は、生体系及び/又は生物において活性を有する任意の物質の特徴を指す。例えば、生物に投与されたとき、当該生物に対して生物学的作用を有する物質は、生物活性であるとみなされる。具体的な実施形態において、キメラポリヌクレオチドの一部であっても、それが生物活性であるか、又は生物学的に関連するとみなされる活性を模倣する場合には、本発明のキメラポリヌクレオチドは生物活性であるとみなされる。

20

【0891】

癌幹細胞：本明細書で使用されるとき、「癌幹細胞」は、自己再生並びに/又は異常な増殖及び分化を経て、腫瘍を形成することができる細胞である。

化学用語：以下に、「アシル」から「チオール」まで、様々な化学用語の定義を記載する。

【0892】

本明細書で使用されるとき、用語「アシル」は、本明細書で定義する通りの水素又はアルキル基（例えば、ハロアルキル基）を表し、これは、本明細書で定義する通りのカルボニル基を介して親分子基に結合し、例として、ホルミル（すなわち、カルボキシアルデヒド基）、アセチル、トリフルオロアセチル、プロピオニル、ブタノイルなどが挙げられる。例示的非置換アシル基は、1~7、1~11、又は1~21個の炭素を含む。一部の実施形態では、アルキル基は、本明細書に記載する通りの1、2、3、又は4つの置換基でさらに置換される。

30

【0893】

任意選択で置換されたアシル基の非制限的例として、以下のものが挙げられる：アルコキシカルボニル、アルコキシカルボニルアシル、アリーラルコキシカルボニル、アリーロイル、カルバモイル、カルボキシアルデヒド、（ヘテロシクリル）イミノ、及び（ヘテロシクリル）オイル：

40

本明細書で使用されるとき、「アルコキシカルボニル」基は、カルボニル原子を介して親分子に結合した、本明細書で定義する通りのアルコキシ（例えば、 $-C(O)-OR$ 、ここで、Rは、H又は任意選択で置換された C_{1-6} 、 C_{1-10} 、若しくは C_{1-20} アルキル基である）を表す。例示的非置換アルコキシカルボニルは、1~21個の炭素（例えば、1~11又は1~7個の炭素）を含む。一部の実施形態では、アルコキシ基は、本明細書に記載する通りの1、2、3、又は4つの置換基でさらに置換される。

【0894】

本明細書で使用されるとき、「アルコキシカルボニルアシル」基は、本明細書で定義する通りのアルコキシカルボニル基で置換された、本明細書で定義する通りのアシル基を表

50

す（例えば、 $-C(O)-$ アルキル $-C(O)-OR$ 、ここで、 R は、任意選択で置換された C_{1-6} 、 C_{1-10} 、又は C_{1-20} アルキル基である）。例示的非置換アルコキシカルボニルアシルは、3～41個の炭素（例えば、 C_{1-6} アルコキシカルボニル $-C_{1-6}$ アシル、 C_{1-10} アルコキシカルボニル $-C_{1-10}$ アシル、 C_{1-20} アルコキシカルボニル $-C_{1-20}$ アシルなどのように、例えば、3～10、3～13、3～17、3～21、又は3～31個の炭素）を含む。一部の実施形態では、各アルコキシ及びアルキル基は、各々の基について、本明細書に記載する通りの1、2、3、又は4つの置換基（例えば、ヒドロキシ基）でさらに置換される。

【0895】

本明細書で使用される時、「アリアルアルコキシカルボニル」基は、カルボニルを介して親分子に結合した、本明細書で定義する通りのアリアルアルコキシ基を表す（例えば、 $-C(O)-O-$ アルキル $-$ アリアル）。例示的非置換アリアルアルコキシ基は、8～31個の炭素（例えば、 C_{6-10} アリアル $-C_{1-6}$ アルコキシ $-$ カルボニル、 C_{6-10} アリアル $-C_{1-10}$ アルコキシ $-$ カルボニル、又は C_{6-10} アリアル $-C_{1-20}$ アルコキシ $-$ カルボニルなどのように、例えば、8～17又は8～21個の炭素）を含む。一部の実施形態では、アリアルアルコキシカルボニル基は、本明細書に定義する通りの1、2、3、又は4つの置換基で置換することができる。

10

【0896】

本明細書で使用される時、「アリーロイル」基は、カルボニル基を介して親分子に結合した、本明細書で定義する通りのアリール基を表す。例示的非置換アリーロイルは、炭素数7～11である。一部の実施形態では、アリール基は、本明細書に定義する通りの1、2、3、又は4つの置換基で置換することができる。

20

【0897】

本明細書で使用される時、「カルバモイル」基は、 $-C(O)-N(R^{N1})_2$ を表し、ここで、各 R^{N1} の意味は、本明細書に記載する「アミノ」の定義に見出される。

本明細書で使用される時、「カルボキシアルデヒド」基は、構造 $-CHO$ を有するアシル基を表す。

【0898】

本明細書で使用される時、「(ヘテロシクリル)イミノ」基は、イミノ基を介して親分子に結合した、本明細書で定義する通りのヘテロシクリル基を表す。一部の実施形態では、ヘテロシクリル基は、本明細書に定義する通りの1、2、3、又は4つの置換基で置換することができる。

30

【0899】

本明細書で使用される時、「(ヘテロシクリル)オイル」基は、カルボニル基を介して親分子に結合した、本明細書で定義する通りのヘテロシクリル基を表す。一部の実施形態では、ヘテロシクリル基は、本明細書に定義する通りの1、2、3、又は4つの置換基で置換することができる。

【0900】

本明細書で使用される時、用語「アルキル」は、別に記載のない限り、炭素数1～20（例えば、1～10若しくは1～6）の直鎖及び分岐鎖飽和基の両方を包含する。アルキル基の例として、メチル、エチル、 $n-$ 及びイソ $-$ プロピル、 $n-$ 、 $sec-$ 、イソ $-$ 及び $tert-$ ブチル、ネオペンチルなどが挙げられ、これは、任意選択で、以下のものからなる群から独立に選択される1、2、3、又は炭素数2以上のアルキル基の場合には、4つの置換基で置換することができる：(1) C_{1-6} アルコキシ；(2) C_{1-6} アルキルスルフィニル；(3) 本明細書で定義する通りのアミノ（例えば、非置換アミノ（すなわち、 $-NH_2$ ）又は置換アミノ（すなわち、 $-N(R^{N1})_2$ 、ここで、 R^{N1} は、アミノについて定義する通りである）；(4) C_{6-10} アリアル $-C_{1-6}$ アルコキシ；(5) アジド；(6) ハロ；(7) (C_{2-9} ヘテロシクリル)オキシ；(8) 任意選択で、 $O-$ 保護基で置換されるヒドロキシ；(9) ニトロ；(10) オキソ（例えば、カルボキシアルデヒド又はアシル）；(11) C_{1-7} スピロシクリル；(12) チオア

40

50

ルコキシ; (13) チオール; (14) 任意選択で、O-保護基で置換される $-CO_2R^A$ 、ここで、 R^A は、以下からなる群から選択される: (a) C_{1-20} アルキル (例えば、 C_{1-6} アルキル)、(b) C_{2-20} アルケニル (例えば、 C_{2-6} アルケニル)、(c) C_{6-10} アリール、(d) 水素、(e) C_{1-6} アルク- C_{6-10} アリール、(f) アミノ- C_{1-20} アルキル、(g) $-(CH_2)_{s_2}(OCH_2CH_2)_{s_1}(CH_2)_{s_3}OR'$ のポリエチレングリコール、ここで、 s_1 は、1~10 (例えば、1~6 又は 1~4) の整数であり、 s_2 及び s_3 の各々は、独立に、0~10 (例えば、0~4、0~6、1~4、1~6、又は 1~10) の整数であり、 R' は、H 又は C_{1-20} アルキルである、及び (h) $-NR^N(N^1)(CH_2)_{s_2}(CH_2CH_2O)_{s_1}(CH_2)_{s_3}NR^N(N^1)$ のアミノ-ポリエチレングリコール、ここで、 s_1 は、1~10 (例えば、1~6 又は 1~4) の整数であり、 s_2 及び s_3 の各々は、独立に、0~10 (例えば、0~4、0~6、1~4、1~6、又は 1~10) の整数であり、各 $R^N(N^1)$ は、独立に、水素又は任意選択で置換された C_{1-6} アルキルである; (15) $-C(O)NR^B R^C$ 、ここで、 R^B 及び R^C の各々は、独立に、以下からなる群から選択される: (a) 水素、(b) C_{1-6} アルキル、(c) C_{6-10} アリール、及び (d) C_{1-6} アルク- C_{6-10} アリール; (16) $-SO_2R^D$ 、ここで、 R^D は、以下からなる群から選択される: (a) C_{1-6} アルキル、(b) C_{6-10} アリール、(c) C_{1-6} アルク- C_{6-10} アリール、及び (d) ヒドロキシ; (17) $-SO_2NR^E R^F$ 、ここで、 R^E 及び R^F の各々は、独立に、以下からなる群から選択される: (a) 水素、(b) C_{1-6} アルキル、(c) C_{6-10} アリール、及び (d) C_{1-6} アルク- C_{6-10} アリール; (18) $-C(O)R^G$ 、ここで、 R^G は、以下からなる群から選択される: (a) C_{1-20} アルキル (例えば、 C_{1-6} アルキル)、(b) C_{2-20} アルケニル (例えば、 C_{2-6} アルケニル)、(c) C_{6-10} アリール、(d) 水素、(e) C_{1-6} アルク- C_{6-10} アリール、(f) アミノ- C_{1-20} アルキル、(g) $-(CH_2)_{s_2}(OCH_2CH_2)_{s_1}(CH_2)_{s_3}OR'$ のポリエチレングリコール、ここで、 s_1 は、1~10 (例えば、1~6 又は 1~4) の整数であり、 s_2 及び s_3 の各々は、独立に、0~10 (例えば、0~4、0~6、1~4、1~6、又は 1~10) の整数であり、 R' は、H 又は C_{1-20} アルキルである、及び (h) $-NR^N(N^1)(CH_2)_{s_2}(CH_2CH_2O)_{s_1}(CH_2)_{s_3}NR^N(N^1)$ のアミノ-ポリエチレングリコール、ここで、 s_1 は、1~10 (例えば、1~6 又は 1~4) の整数であり、 s_2 及び s_3 の各々は、独立に、0~10 (例えば、0~4、0~6、1~4、1~6、又は 1~10) の整数であり、各 $R^N(N^1)$ は、独立に、水素又は任意選択で置換された C_{1-6} アルキルである; (19) $-NR^H C(O)R^I$ 、ここで、 R^H は、以下: (a1) 水素及び (b1) C_{1-6} アルキルからなる群から選択され、 R^I は、以下: (a2) C_{1-20} アルキル (例えば、 C_{1-6} アルキル)、(b2) C_{2-20} アルケニル (例えば、 C_{2-6} アルケニル)、(c2) C_{6-10} アリール、(d2) 水素、(e2) C_{1-6} アルク- C_{6-10} アリール、(f2) アミノ- C_{1-20} アルキル、(g2) $-(CH_2)_{s_2}(OCH_2CH_2)_{s_1}(CH_2)_{s_3}OR'$ のポリエチレングリコール、ここで、 s_1 は、1~10 (例えば、1~6 又は 1~4) の整数であり、 s_2 及び s_3 の各々は、独立に、0~10 (例えば、0~4、0~6、1~4、1~6、又は 1~10) の整数であり、 R' は、H 又は C_{1-20} アルキルである、及び (h) $-NR^N(N^1)(CH_2)_{s_2}(CH_2CH_2O)_{s_1}(CH_2)_{s_3}NR^N(N^1)$ のアミノ-ポリエチレングリコール、ここで、 s_1 は、1~10 (例えば、1~6 又は 1~4) の整数であり、 s_2 及び s_3 の各々は、独立に、0~10 (例えば、0~4、0~6、1~4、1~6、又は 1~10) の整数であり、各 $R^N(N^1)$ は、独立に、水素又は任意選択で置換された C_{1-6} アルキルである; (20) $-NR^J C(O)R^K$ 、ここで、 R^J は、以下: (a1) 水素及び (b1) C_{1-6} アルキルからなる群から選択され、 R^K は、以下: (a2) C_{1-20} アルキル (例えば、 C_{1-6} アルキル)、(b2) C_{2-20} アルケニル (例えば、 C_{2-6} アルケニル)、(c2) C_{6-10} アリール、(d2) 水素、(e2) C_{1-6} アルク- C_{6-10} アリール、(f2) アミノ- C_{1-20}

アルキル、 $(g_2) - (CH_2)_{s_2} (OCH_2CH_2)_{s_1} (CH_2)_{s_3} OR'$ のポリエチレングリコール、ここで、 s_1 は、1 ~ 10 (例えば、1 ~ 6 又は 1 ~ 4) の整数であり、 s_2 及び s_3 の各々は、独立に、0 ~ 10 (例えば、0 ~ 4、0 ~ 6、1 ~ 4、1 ~ 6、又は 1 ~ 10) の整数であり、 R' は、H 又は C_{1-20} アルキルである、及び $(h) - NR^{N^1} (CH_2)_{s_2} (CH_2CH_2O)_{s_1} (CH_2)_{s_3} NR^{N^1}$ のアミノ-ポリエチレングリコール、ここで、 s_1 は、1 ~ 10 (例えば、1 ~ 6 又は 1 ~ 4) の整数であり、 s_2 及び s_3 の各々は、独立に、0 ~ 10 (例えば、0 ~ 4、0 ~ 6、1 ~ 4、1 ~ 6、又は 1 ~ 10) の整数であり、各 R^{N^1} は、独立に、水素又は任意選択で置換された C_{1-6} アルキルである；並びに (21) アミジン。一部の実施形態では、これらの基の各々は、本明細書に記載する通り、さらに置換することができる。例えば、 C_1 アルカリールのアルキレン基は、オキソ基でさらに置換することにより、それぞれのアリーロイル置換基を付与することができる。

【0901】

本明細書で使用されるとき、用語「アルキレン」は、直鎖又は分岐鎖飽和炭化水素から2つの水素原子を除去することにより得られる飽和二価炭化水素を表し、例として、メチレン、エチレン、イソプロピレンなどが挙げられる。用語「 C_{x-y} アルキレン」及び接頭辞「 C_{x-y} アルク」は、 $x-y$ 個の炭素を有するアルキレン基を表す。 x の例示的値は、1、2、3、4、5、及び6であり、 y の例示的値は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18、又は20である (例えば、 C_{1-6} 、 C_{1-10} 、 C_{2-20} 、 C_{2-6} 、 C_{2-10} 、又は C_{2-20} アルキレン)。一部の実施形態では、アルキレンは、アルキル基について本明細書に記載する通り、1、2、3、又は4つの置換基でさらに置換することができる。同様に、任意の基に付いた接尾辞「-エン」は、該当する基が二価の基であることを示している。

【0902】

任意選択で置換されたアルキル及びアルキレン基の非制限的例として、アシルアミノアルキル、アシルオキシアルキル、アルコキシアルキル、アルコシカルボニルアルキル、アルキルスルフィニル、アルキルスルフィニルアルキル、アミノアルキル、カルバモイルアルキル、カルボキシアルキル、カルボキシアミノアルキル、ハロアルキル、ヒドロキシアルキル、ペルフルオロアルキル、及びスルホアルキルが挙げられる：

本明細書で使用されるとき、「アシルアミノアルキル」基は、アミノ基に結合されて、これが今度は、本明細書で定義する通りのアルキレン基を介して親分子に結合された、本明細書で定義する通りのアシル基であり (すなわち、 $-アルキル - N(R^{N^1}) - C(O) - R$ 、ここで、 R は、H 又は任意選択で置換された C_{1-6} 、 C_{1-10} 、若しくは C_{1-20} アルキル基 (例えば、ハロアルキル)、 R^{N^1} は、本明細書で定義する通りである) である。例示的非置換アシルアミノアルキル基は、1 ~ 41 個の炭素 (例えば、1 ~ 7、1 ~ 13、1 ~ 21、2 ~ 7、2 ~ 13、2 ~ 21、又は 2 ~ 41 個の炭素) を含む。一部の実施形態では、アルキレン基は、本明細書に記載する通りの1、2、3、又は4つの置換基でさらに置換され、及び/又はアミノ基は、 $-NH_2$ 又は $-NHR^{N^1}$ であり、ここで、 R^{N^1} は、独立に、OH、 NO_2 、 NH_2 、 NR^{N^2} 、 $SO_2OR^{N^2}$ 、 $SO_2R^{N^2}$ 、 SOR^{N^2} 、アルキル、アリール、アシル (例えば、アセチル、トリフルオロアセチル、若しくは本明細書に記載するその他)、又はアルコシカルボニルアルキルであり、各 R^{N^2} は、H、アルキル、又はアリールであってよい。

【0903】

本明細書で使用されるとき、「アシルオキシアルキル」基は、酸素原子に結合されて、これが今度は、アルキレン基を介して親分子に結合された、本明細書で定義する通りのアシル基である (すなわち、 $-アルキル - O - C(O) - R$ 、ここで、 R は、H 又は任意選択で置換された C_{1-6} 、 C_{1-10} 、又は C_{1-20} アルキル基である)。例示的非置換アシルアミノアルキル基は、1 ~ 21 個の炭素 (例えば、1 ~ 7 又は 1 ~ 11 個の炭素) を含む。一部の実施形態では、アルキレン基は、独立に、本明細書に記載する通りの1、2、3、又は4つの置換基でさらに置換される。

10

20

30

40

50

【0904】

本明細書で使用される時、「アルコキシアルキル」基は、アルコキシ基で置換されたアルキル基を表す。例示的非置換アルコキシアルキル基は、2～40個の炭素（例えば、 C_{1-6} アルコキシ- C_{1-6} アルキル、 C_{1-10} アルコキシ- C_{1-10} アルキル、 C_{1-20} アルコキシ- C_{1-20} アルキルなどのように、例えば、2～12、又は2～20個の炭素）を含む。一部の実施形態では、アルキル及びアルコキシは各々、それぞれの基について本明細書で定義する通りの1、2、3、又は4つの置換基でさらに置換することができる。

【0905】

本明細書で使用される時、「アルコキシカルボニルアルキル」基は、本明細書で定義する通りのアルコキシカルボニル基で置換された、本明細書で定義する通りのアルキル基を表す（例えば、-アルキル-C(O)-OR、ここで、Rは、任意選択で置換された C_{1-20} 、 C_{1-10} 、又は C_{1-6} アルキル基である）。例示的非置換アルコキシカルボニルアルキル基は、3～41個の炭素（例えば、 C_{1-6} アルコキシカルボニル- C_{1-6} アルキル、 C_{1-10} アルコキシカルボニル- C_{1-10} アルキル、 C_{1-20} アルコキシカルボニル- C_{1-20} アルキルなどのように、例えば、3～10、3～13、3～17、3～21、又は3～31個の炭素）を含む。一部の実施形態では、各アルキル及びアルコキシ基は、本明細書に記載する通りの1、2、3、又は4つの置換基（例えば、ヒドロキシ基）でさらに置換される。

10

【0906】

本明細書で使用される時、「アルキルスルフィニルアルキル」基は、アルキルスルフィニル基で置換された、本明細書で定義する通りのアルキル基を表す。例示的非置換アルキルスルフィニルアルキル基は、炭素数2～12、2～20、又は2～40である。一部の実施形態では、各アルキル基は、本明細書で定義する通りの1、2、3、又は4つの置換基でさらに置換することができる。

20

【0907】

本明細書で使用される時、「アミノアルキル」基は、本明細書で定義する通りのアミノ基で置換された、本明細書で定義する通りのアルキル基を表す。各アルキル及びアミノ基は、それぞれの基について本明細書に記載する通りの1、2、3、又は4つの置換基（例えば、 $-CO_2R^A$ 、ここで、 R^A は、以下：(a) C_{1-6} アルキル、(b) C_{6-10} アリール、(c) 水素、及び(d) C_{1-6} アルク- C_{6-10} アリール、例えば、カルボキシ、及び/又はN-保護基からなる群から選択される）でさらに置換することができる。

30

【0908】

本明細書で使用される時、「カルバモイルアルキル」基は、本明細書で定義する通りのカルバモイル基で置換された、本明細書で定義する通りのアルキル基を表す。アルキル基は、本明細書に記載する通りの1、2、3、又は4つの置換基でさらに置換することができる。

【0909】

本明細書で使用される時、「カルボキシアルキル」基は、本明細書で定義する通りのカルボキシ基で置換された、本明細書で定義する通りのアルキル基を表す。アルキル基は、本明細書に記載する通りの1、2、3、又は4つの置換基でさらに置換することができる。カルボキシ基は、任意選択で、1つ又は複数のO-保護基で置換することができる。

40

【0910】

本明細書で使用される時、「カルボキシアルキルアルキル」基は、本明細書で定義する通りのカルボキシで置換された、本明細書で定義する通りのアミノアルキル基を表す。カルボキシ、アルキル、及びアミノは各々、それぞれの基について本明細書に記載する通りの1、2、3、又は4つの置換基（例えば、 $-CO_2R^A$ 、ここで、 R^A は、以下：(a) C_{1-6} アルキル、(b) C_{6-10} アリール、(c) 水素、及び(d) C_{1-6} アルク- C_{6-10} アリール、例えば、カルボキシ、及び/又はN-保護基、及び/又は

50

0 - 保護基からなる群から選択される)でさらに置換することができる。

【0911】

本明細書で使用される時、「ハロアルキル」基は、本明細書で定義する通りのハロゲン基(すなわちF、Cl、Br、又はI)で置換された、本明細書で定義する通りのアルキル基を表す。ハロアルキルは、1つ、2つ、3つ、又は、炭素数2以上のアルキル基の場合には、4つのハロゲンで置換してもよい。ハロアルキル基は、ペルフルオロアルキル(例えば、 $-CF_3$)、 $-CHF_2$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CCl_3$ 、 $-CH_2CH_2Br$ 、 $-CH_2CH(CH_2CH_2Br)CH_3$ 、及び $-CHI_3$ を含む。一部の実施形態では、ハロアルキル基は、アルキル基について本明細書に記載する通りの1、2、3、又は4つの置換基でさらに置換することができる。

10

【0912】

本明細書で使用される時、「ヒドロキシアルキル」基は、わずか1つのヒドロキシ基がアルキル基の1炭素原子に結合し得るという条件で、1~3つのヒドロキシ基で置換された、本明細書で定義する通りのアルキル基を表し、例として、ヒドロキシメチル、ジヒドロキシプロピルなどが挙げられる。一部の実施形態では、ヒドロキシアルキル基は、アルキルについて本明細書で定義する通りの1、2、3、又は4つの置換基(例えば、0-保護基)で置換することができる。

【0913】

本明細書で使用される時、「ペルフルオロアルキル」基は、アルキル基に結合した各水素ラジカルが、フッ化物ラジカルで置換されている、本明細書で定義する通りのアルキル基を表す。ペルフルオロアルキル基の例として、トリフルオロメチル、ペンタフルオロエチルなどが挙げられる。

20

【0914】

本明細書で使用される時、「スルホアルキル」基は、 $-SO_3H$ のスルホ基で置換された、本明細書で定義する通りのアルキル基を表す。一部の実施形態では、アルキル基は、本明細書に記載する通りの1、2、3、又は4つの置換基でさらに置換することができる。スルホ基は、1つ又は複数の0-保護基(例えば、本明細書に記載する通りの)で置換することができる。

【0915】

本明細書で使用される時、用語「アルケニル」は、1つ又は複数の炭素-炭素二重結合を含有する、炭素数2~20(例えば、2~6若しくは2~10)の1価直鎖又は分岐鎖の基を表し、例として、エテニル、1-プロペニル、2-プロペニル、2-メチル-1-プロペニル、1-ブテニル、2-ブテニルなどが挙げられる。アルケニルは、シス及びトランス異性体の両方を含む。アルケニル基は、任意選択で、本明細書で定義する通りのアミノ、アリール、シクロアルキル、若しくはヘテロシクリル(例えば、ヘテロアリール)、又は本明細書に記載する例示的アルキル置換基のいずれかから独立に選択される1、2、3、又は4つの置換基で置換することができる。

30

【0916】

任意選択で置換されたアルケニル基の非制限的例として、アルコキシカルボニルアルケニル、アミノアルケニル、及びヒドロキシアルケニルが挙げられる：

40

本明細書で使用される時、「アルコキシカルボニルアルケニル」基は、本明細書で定義する通りのアルコキシカルボニル基で置換された、本明細書で定義する通りのアルケニル基を表す(例えば、 $-アルケニル-C(O)-OR$ 、ここで、Rは、任意選択で置換された C_{1-20} 、 C_{1-10} 、又は C_{1-6} アルキル基である)。例示的非置換アルコキシカルボニルアルケニルは、4~41個の炭素(例えば、 C_{1-6} アルコキシカルボニル- C_{2-6} アルケニル、 C_{1-10} アルコキシカルボニル- C_{2-10} アルケニル、 C_{1-20} アルコキシカルボニル- C_{2-20} アルケニルなどのように、例えば、4~10、4~13、4~17、4~21、又は4~31個の炭素)を含む。一部の実施形態では、各アルキル、アルケニル、及びアルコキシ基は、本明細書に記載する通りの1、2、3、又は4つの置換基(例えば、ヒドロキシ基)でさらに置換される。

50

【0917】

本明細書で使用されるとき、「アミノアルケニル」基は、本明細書で定義する通りのアミノ基で置換された、本明細書で定義する通りのアルケニル基を表す。アルケニル及びアミノ基は各々、それぞれの基について本明細書に記載する通りの1、2、3、又は4つの置換基（例えば、 $-CO_2R^A$ 、ここで、 R^A は、以下：(a) C_{1-6} アルキル、(b) C_{6-10} アリール、(c) 水素、及び(d) C_{1-6} アルク- C_{6-10} アリール、例えば、カルボキシ、及び/又はN-保護基からなる群から選択される）でさらに置換することができる。

【0918】

本明細書で使用されるとき、「ヒドロキシアルケニル」基は、わずか1つのヒドロキシ基がアルキル基の1炭素原子に結合し得るという条件で、1~3つのヒドロキシ基で置換された、本明細書で定義する通りのアルケニル基を表し、例として、ヒドロキシプロペニル、ヒドロキシイソペンテニルなどが挙げられる。一部の実施形態では、ヒドロキシアルケニル基は、アルキルについて本明細書で定義する通りの1、2、3、又は4つの置換基（例えば、O-保護基）で置換することができる。

10

【0919】

本明細書で使用されるとき、用語「アルキニル」は、1つの炭素-炭素三重結合を含有する、炭素数2~20（例えば、2~4、2~6、若しくは2~10）の1価直鎖又は分岐鎖の基を表し、例として、エチニル、1-プロピニルなどが挙げられる。アルキニル基は、任意選択で、本明細書で定義する通りのアリール、シクロアルキル、若しくはヘテロシクリル（例えば、ヘテロアリール）、又は本明細書に記載する例示的アルキル置換基のいずれかから独立に選択される1、2、3、又は4つの置換基で置換することができる。

20

【0920】

任意選択で置換されたアルキニル基の非制限的例として、アルコキシカルボニルアルキニル、アミノアルキニル、及びヒドロキシアルキニルが挙げられる。

本明細書で使用されるとき、「アルコキシカルボニルアルキニル」基は、本明細書で定義する通りのアルコキシカルボニル基で置換された、本明細書で定義する通りのアルキニル基を表す（例えば、 $-アルキニル-C(O)-OR$ 、ここで、Rは、任意選択で置換された C_{1-20} 、 C_{1-10} 、又は C_{1-6} アルキル基である）。例示的非置換アルコキシカルボニルアルキニルは、4~41個の炭素（例えば、 C_{1-6} アルコキシカルボニル- C_{2-6} アルキニル、 C_{1-10} アルコキシカルボニル- C_{2-10} アルキニル、又は C_{1-20} アルコキシカルボニル- C_{2-20} アルキニルなどのように、例えば、4~10、4~13、4~17、4~21、又は4~31個の炭素）を含む。一部の実施形態では、各アルキル、アルキニル、及びアルコキシ基は、本明細書に記載する通りの1、2、3、又は4つの置換基（例えば、ヒドロキシ基）でさらに置換される。

30

【0921】

本明細書で使用されるとき、「アミノアルキニル」基は、本明細書で定義する通りのアミノ基で置換された、本明細書で定義する通りのアルキニル基を表す。アルキニル及びアミノ基は各々、それぞれの基について本明細書に記載する通りの1、2、3、又は4つの置換基（例えば、 $-CO_2R^A$ 、ここで、 R^A は、以下：(a) C_{1-6} アルキル、(b) C_{6-10} アリール、(c) 水素、及び(d) C_{1-6} アルク- C_{6-10} アリール、例えば、カルボキシ、及び/又はN-保護基からなる群から選択される）でさらに置換することができる。

40

【0922】

本明細書で使用されるとき、「ヒドロキシアルキニル」基は、わずか1つのヒドロキシ基がアルキル基の1炭素原子に結合し得るという条件で、1~3つのヒドロキシ基で置換された、本明細書で定義する通りのアルキニル基を表す。一部の実施形態では、ヒドロキシアルキニル基は、アルキルについて本明細書で定義する通りの1、2、3、又は4つの置換基（例えば、O-保護基）で置換することができる。

【0923】

50

本明細書で使用されるとき、「アミノ」は、 $-N(R^{N1})_2$ を表し、ここで、各 R^{N1} は、独立に、H、OH、 NO_2 、 $N(R^{N2})_2$ 、 SO_2OR^{N2} 、 SO_2R^{N2} 、 SOR^{N2} 、N-保護基、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、アリール、アルカリール、シクロアルキル、アルクシクロアルキル、カルボキシアルキル（例えば、任意選択で、O-保護基で置換されたもの、例えば、任意選択で置換されたアリールアルコキシカルボニル基若しくは本明細書に記載するいずれかなど）、スルホアルキル、アシル（例えば、アセチル、トリフルオロアセチル、若しくは本明細書に記載するその他）、アルコキシカルボニルアルキル（例えば、任意選択でO-保護基で置換されたもの、例えば、任意選択で置換されたアリールアルコキシカルボニル基若しくは本明細書に記載するいずれかなど）、ヘテロシクリル（例えば、ヘテロアリール）、又はアルクヘテロシクリル（例えば、アルクヘテロアリール）であり、これらの記載する R^{N1} 基の各々は、各々の基について本明細書で定義する通り、任意選択で置換することができ；又は、2つの R^{N1} は、結合して、ヘテロシクリル若しくはN-保護基を形成し、並びに、各 R^{N2} は、独立に、H、アルキル、又はアリールである。本発明のアミノ基は、非置換アミノ（すなわち、 $-NH_2$ ）又は置換アミノ（すなわち、 $-N(R^{N1})_2$ ）であってよい。好ましい実施形態では、アミノは、 $-NH_2$ 又は $-NHR^{N1}$ であり、ここで、 R^{N1} は、独立に、OH、 NO_2 、 NH_2 、 NR^{N2}_2 、 SO_2OR^{N2} 、 SO_2R^{N2} 、 SOR^{N2} 、アルキル、カルボキシアルキル、スルホアルキル、アリール、アシル（例えば、アセチル、トリフルオロアセチル、若しくは本明細書に記載するその他）、アルコキシカルボニルアルキル（例えば、t-ブトキシカルボニルアルキル）又はアリールであり、各 R^{N2} は、H、 C_{1-20} アルキル（例えば、 C_{1-6} アルキル）、又は C_{6-10} アリールであってよい。

【0924】

任意選択で置換されたアミノ基の非制限的例は、アシルアミノ及びカルバミルである：

本明細書で使用されるとき、「アシルアミノ」基は、本明細書で定義する通りのアミノ基を介して親分子基に結合した、本明細書で定義する通りのアシル基を表す（すなわち $-N(R^{N1})-C(O)-R$ 、ここで、Rは、H又は任意選択で置換された C_{1-6} 、 C_{1-10} 、若しくは C_{1-20} アルキル基（例えば、ハロアルキル）あり、 R^{N1} は、本明細書で定義する通りである）。例示的非置換アシルアミノ基は、1~41個の炭素（例えば、1~7、1~13、1~21、2~7、2~13、2~21、又は2~41個の炭素）を含む。一部の実施形態では、アルキル基は、本明細書に記載する通りの1、2、3、又は4つの置換基でさらに置換され、及び/又はアミノ基は、 $-NH_2$ 又は $-NHR^{N1}$ であり、ここで、 R^{N1} は、独立に、OH、 NO_2 、 NH_2 、 NR^{N2}_2 、 SO_2OR^{N2} 、 SO_2R^{N2} 、 SOR^{N2} 、アルキル、アリール、アシル（例えば、アセチル、トリフルオロアセチル、若しくは本明細書に記載するその他）、又はアルコキシカルボニルアルキルであり、各 R^{N2} は、H、アルキル、又はアリールである。

【0925】

本明細書で使用されるとき、「カルバミル」基は、構造 $-NR^{N1}C(=O)OR$ 又は $-OC(=O)N(R^{N1})_2$ を有するカルバメート基を指し、ここで、各 R^{N1} は、本明細書に記載する「アミノ」の定義に見出され、Rは、本明細書で定義する通りのアルキル、シクロアルキル、アルクシクロアルキル、アリール、アルカリール、ヘテロシクリル（例えば、ヘテロアリール）、又はアルクヘテロシクリル（例えば、アルクヘテロアリール）である。

【0926】

本明細書で使用されるとき、用語「アミノ酸」は、側鎖、アミノ基、及び酸基（例えば、 $-CO_2H$ のカルボキシ基又は $-SO_3H$ のスルホ基）を有する分子を指し、ここで、アミノ酸は、側鎖、アミノ基、若しくは酸基（例えば、側鎖）によって親分子基に結合されている。一部の実施形態では、アミノ酸は、カルボニル基によって親分子基に結合されており、ここで、側鎖又はアミノ基は、カルボニル基に結合されている。例示的側鎖としては、任意選択で置換されたアルキル、アリール、ヘテロシクリル、アルカリール、アル

10

20

30

40

50

クヘテロシクリル、アミノアルキル、カルバモイルアルキル、及びカルボキシアルキルが挙げられる。例示的アミノ酸としては、アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン酸、グルタミン、グリシン、ヒスチジン、ヒドロキシノルバリン、イロソイシン、ロイシン、リシン、メチオニン、ノルバリン、オルニチン、フェニルアラニン、プロリン、ピロリシン、セレノシステイン、セリン、タウリン、スレオニン、トリプトファン、チロシン、及びバリンが挙げられる。アミノ酸基は、任意選択で、以下のものからなる群から独立に選択される1、2、3つの置換基、又は炭素数2以上のアルキル基の場合には、4つの置換基で置換してもよい：(1) C_{1-6} アルコキシ；(2) C_{1-6} アルキルスルフィニル；(3) 本明細書で定義する通りのアミノ（例えば、非置換アミノ（すなわち、 $-NH_2$ ）又は非置換アミノ（すなわち、 $-N(R^{N1})_2$ 、ここで、 R^{N1} は、アミノについて定義する通りである）；(4) C_{6-10} アリール- C_{1-6} アルコキシ；(5) アジド；(6) ハロ；(7) (C_{2-9} ヘテロシクリル) オキシ；(8) ヒドロキシ；(9) ニトロ；(10) オキソ（例えば、カルボキシアルデヒド又はアシル）；(11) C_{1-7} スピロシクリル；(12) チオアルコキシ；(13) チオール；(14) $-CO_2R^A$ 、ここで、 R^A は、以下からなる群から選択される：(a) C_{1-20} アルキル（例えば、 C_{1-6} アルキル）、(b) C_{2-20} アルケニル（例えば、 C_{2-6} アルケニル）、(c) C_{6-10} アリール、(d) 水素、(e) C_{1-6} アルク- C_{6-10} アリール、(f) アミノ- C_{1-20} アルキル、(g) $-(CH_2)_{s2}(OCH_2CH_2)_{s1}(CH_2)_{s3}OR'$ のポリエチレングリコール、ここで、 $s1$ は、1~10（例えば、1~6又は1~4）の整数であり、 $s2$ 及び $s3$ の各々は、独立に、0~10（例えば、0~4、0~6、1~4、1~6、又は1~10）の整数であり、 R' は、H又は C_{1-20} アルキルである、及び(h) $-NR^{N1}(CH_2)_{s2}(CH_2CH_2O)_{s1}(CH_2)_{s3}NR^{N1}$ のアミノ-ポリエチレングリコール、ここで、 $s1$ は、1~10（例えば、1~6又は1~4）の整数であり、 $s2$ 及び $s3$ の各々は、独立に、0~10（例えば、0~4、0~6、1~4、1~6、又は1~10）の整数であり、各 R^{N1} は、独立に、水素又は任意選択で置換された C_{1-6} アルキルである；(15) $-C(O)NR^B R^C$ 、ここで、 R^B 及び R^C の各々は、独立に、以下からなる群から選択される：(a) 水素、(b) C_{1-6} アルキル、(c) C_{6-10} アリール、及び(d) C_{1-6} アルク- C_{6-10} アリール；(16) $-SO_2R^D$ 、ここで、 R^D は、以下からなる群から選択される：(a) C_{1-6} アルキル、(b) C_{6-10} アリール、(c) C_{1-6} アルク- C_{6-10} アリール、及び(d) ヒドロキシ；(17) $-SO_2NR^E R^F$ 、ここで、 R^E 及び R^F の各々は、独立に、以下からなる群から選択される：(a) 水素、(b) C_{1-6} アルキル、(c) C_{6-10} アリール、及び(d) C_{1-6} アルク- C_{6-10} アリール；(18) $-C(O)R^G$ 、ここで、 R^G は、以下からなる群から選択される：(a) C_{1-20} アルキル（例えば、 C_{1-6} アルキル）、(b) C_{2-20} アルケニル（例えば、 C_{2-6} アルケニル）、(c) C_{6-10} アリール、(d) 水素、(e) C_{1-6} アルク- C_{6-10} アリール、(f) アミノ- C_{1-20} アルキル、(g) $-(CH_2)_{s2}(OCH_2CH_2)_{s1}(CH_2)_{s3}OR'$ のポリエチレングリコール、ここで、 $s1$ は、1~10（例えば、1~6又は1~4）の整数であり、 $s2$ 及び $s3$ の各々は、独立に、0~10（例えば、0~4、0~6、1~4、1~6、又は1~10）の整数であり、 R' は、H又は C_{1-20} アルキルである、及び(h) $-NR^{N1}(CH_2)_{s2}(CH_2CH_2O)_{s1}(CH_2)_{s3}NR^{N1}$ のアミノ-ポリエチレングリコール、ここで、 $s1$ は、1~10（例えば、1~6又は1~4）の整数であり、 $s2$ 及び $s3$ の各々は、独立に、0~10（例えば、0~4、0~6、1~4、1~6、又は1~10）の整数であり、各 R^{N1} は、独立に、水素又は任意選択で置換された C_{1-6} アルキルである；(19) $-NR^H C(O)R^I$ 、ここで、 R^H は、以下：(a1) 水素及び(b1) C_{1-6} アルキルからなる群から選択され、 R^I は、以下：(a2) C_{1-20} アルキル（例えば、 C_{1-6} アルキル）、(b2) C_{2-20} アルケニル（例えば、 C_{2-6} アルケニル）、(c2) C_{6-10} アリール、(d2) 水素、(e2) C_{1-6} アルク- C_{6-10} ア

10

20

30

40

50

リール、(f2)アミノ-C₁₋₂₀アルキル、(g2)-(CH₂)_{s2}(OCH₂CH₂)_{s1}(CH₂)_{s3}OR'のポリエチレングリコール、ここで、s1は、1~10(例えば、1~6又は1~4)の整数であり、s2及びs3の各々は、独立に、0~10(例えば、0~4、0~6、1~4、1~6、又は1~10)の整数であり、R'は、H又はC₁₋₂₀アルキルである、及び(h)-NR^{N1}(CH₂)_{s2}(CH₂CH₂O)_{s1}(CH₂)_{s3}NR^{N1}のアミノ-ポリエチレングリコール、ここで、s1は、1~10(例えば、1~6又は1~4)の整数であり、s2及びs3の各々は、独立に、0~10(例えば、0~4、0~6、1~4、1~6、又は1~10)の整数であり、各R^{N1}は、独立に、水素又は任意選択で置換されたC₁₋₆アルキルである；(20)-NR^{J'}C(O)R^{K'}、ここで、R^{J'}は、以下：(a1)水素及び(b1)C₁₋₆アルキルからなる群から選択され、R^{K'}は、以下：(a2)C₁₋₂₀アルキル(例えば、C₁₋₆アルキル)、(b2)C₂₋₂₀アルケニル(例えば、C₂₋₆アルケニル)、(c2)C₆₋₁₀アリール、(d2)水素、(e2)C₁₋₆アルク-C₆₋₁₀アリール、(f2)アミノ-C₁₋₂₀アルキル、(g2)-(CH₂)_{s2}(OCH₂CH₂)_{s1}(CH₂)_{s3}OR'のポリエチレングリコール、ここで、s1は、1~10(例えば、1~6又は1~4)の整数であり、s2及びs3の各々は、独立に、0~10(例えば、0~4、0~6、1~4、1~6、又は1~10)の整数であり、R'は、H又はC₁₋₂₀アルキルである、及び(h2)-NR^{N1}(CH₂)_{s2}(CH₂CH₂O)_{s1}(CH₂)_{s3}NR^{N1}のアミノ-ポリエチレングリコール、ここで、s1は、1~10(例えば、1~6又は1~4)の整数であり、s2及びs3の各々は、独立に、0~10(例えば、0~4、0~6、1~4、1~6、又は1~10)の整数であり、各R^{N1}は、独立に、水素又は任意選択で置換されたC₁₋₆アルキルである；並びに(21)アミジン。一部の実施形態では、これらの基の各々は、本明細書に記載する通りに、さらに置換することができる。

【0927】

本明細書で使用されるとき、用語「アリール」は、1つ又は2つの芳香環を有する単環、二環、又は多環式炭素環系を表し、例として、フェニル、ナフチル、1,2-ジヒドロナフチル、1,2,3,4-テトラヒドロナフチル、アントラセニル、フェナントレニル、フルオレニル、インダニル、インデニルなどが挙げられ、これは、以下のものからなる群から独立に選択される1,2,3,4,若しくは5つの置換基で置換してもよい：(1)C₁₋₇アシル(例えば、カルボキシアルデヒド)；(2)C₁₋₂₀アルキル(例えば、C₁₋₆アルキル、C₁₋₆アルコキシ-C₁₋₆アルキル、C₁₋₆アルキルスルフィニル-C₁₋₆アルキル、アミノ-C₁₋₆アルキル、アジド-C₁₋₆アルキル、(カルボキシアルデヒド)-C₁₋₆アルキル、ハロ-C₁₋₆アルキル(例えば、ペルフルオロアルキル)、ヒドロキシ-C₁₋₆アルキル、ニトロ-C₁₋₆アルキル、又はC₁₋₆チオアルコキシ-C₁₋₆アルキル)；(3)C₁₋₂₀アルコキシ(例えば、ペルフルオロアルコキシなどのC₁₋₆アルコキシ)；(4)C₁₋₆アルキルスルフィニル；(5)C₆₋₁₀アリール；(6)アミノ；(7)C₁₋₆アルク-C₆₋₁₀アリール；(8)アジド；(9)C₃₋₈シクロアルキル；(10)C₁₋₆アルク-C₃₋₈シクロアルキル；(11)ハロ；(12)C₁₋₁₂ヘテロシクリル(例えば、C₁₋₁₂ヘテロアリール)；(13)(C₁₋₁₂ヘテロシクリル)オキシ；(14)ヒドロキシ；(15)ニトロ；(15)C₁₋₂₀チオアルコキシ(例えば、C₁₋₆チオアルコキシ)；(17)-(CH₂)_qCO₂R^{A'}、ここで、qは、0~4の整数であり、R^{A'}は、以下からなる群から選択される：(a)C₁₋₆アルキル、(b)C₆₋₁₀アリール、(c)水素、及び(d)C₁₋₆アルク-C₆₋₁₀アリール；(18)-(CH₂)_qCONR^{B'}R^{C'}、ここで、qは、0~4の整数であり、R^{B'}及びR^{C'}は、独立に、以下からなる群から選択される：(a)水素、(b)C₁₋₆アルキル、(c)C₆₋₁₀アリール、及び(d)C₁₋₆アルク-C₆₋₁₀アリール；(19)-(CH₂)_qSO₂R^{D'}、ここで、qは、0~4の整数であり、R^{D'}は、以下からなる群から選択される：(a)C₁₋₆アルキル、(b)C₆₋₁₀アリール、及び(c)

10

20

30

40

50

) C_{1-6} アルク - C_{6-10} アリール; (20) - $(CH_2)_q SO_2 NR^{E'} R^{F'}$ 、ここで、 q は、0 ~ 4 の整数であり、 $R^{E'}$ 及び $R^{F'}$ の各々は、独立に、以下からなる群から選択される: (a) 水素、(b) C_{1-6} アルキル、(c) C_{6-10} アリール、及び (d) C_{1-6} アルク - C_{6-10} アリール; (21) チオール; (22) C_{6-10} アリールオキシ; (23) C_{3-8} シクロアルコキシ; (24) C_{6-10} アリール - C_{1-6} アルコキシ; (25) C_{1-6} アルク - C_{1-12} ヘテロシクリル (例えば、 C_{1-6} アルク - C_{1-12} ヘテロアリール); (26) C_{2-20} アルケニル; 並びに (27) C_{2-20} アルキニル。一部の実施形態では、これらの基の各々は、本明細書に記載する通り、さらに置換することができる。例えば、 C_1 - アルカリール又は C_1 - アルクヘテロシクリルのアルキレン基は、オキソ基でさらに置換することにより、それぞれのアリーロイル及び (ヘテロシクリル) オイル置換基を付与することができる。

10

【0928】

本明細書で使用されるとき、用語「アリーラルキル」基は、本明細書で定義する通りのアルキレン基を介して親分子基に結合された、本明細書で定義する通りのアリール基を表す。例示的非置換アリーラルキル基は、炭素数 7 ~ 30 (例えば、 C_{1-6} アルク - C_{6-10} アリール、 C_{1-10} アルク - C_{6-10} アリール、若しくは C_{1-20} アルク - C_{6-10} アリール) などのように、炭素数 7 ~ 16 又は 7 ~ 20) である。一部の実施形態では、アルキレン及びアリールは各々、それぞれの基について本明細書で定義する通りの 1、2、3、又は 4 つの置換基でさらに置換することができる。接頭辞「アルク」が前に置かれた他の基も同様に定義され、「アルク」は、別に注記のない限り、 C_{1-6} アルキレンを指し、結合される化学構造は、本明細書に定義する通りである。

20

【0929】

用語「アジド」は、 $-N_3$ 基を表し、これは、 $N=N=N$ と表示することもできる。

本明細書で使用されるとき、用語「二環式」は、2 つの環を有する構造を指し、これらの環は、芳香族又は非芳香族のいずれであってもよい。二環式構造は、本明細書で定義する通りのスピロシクリル基と、1 つ又は複数の架橋を共有する 2 つの環を含み、こうした架橋は、1 個の原子か、又は 2、3 個若しくはそれ以上の原子を含む鎖を含み得る。例示的二環式基としては、以下のものが挙げられる: 第 1 及び第 2 環が、本明細書で定義する通りのカルボシクリル基である二環式カルボシクリル基; 第 1 及び第 2 環が、本明細書で定義する通りのアリール基である、二環式アリール基; 第 1 環がヘテロシクリル基であり、第 2 環がカルボシクリル (例えば、アリール) 若しくはヘテロシクリル (例えば、ヘテロアリール) 基である二環式ヘテロシクリル基; 並びに第 1 環が、ヘテロアリール基であり、第 2 環が、カルボシクリル (例えば、アリール) 若しくはヘテロシクリル (例えば、ヘテロアリール) 基である二環式ヘテロアリール基。一部の実施形態では、二環式基は、シクロアルキル、ヘテロシクリル、及びアリール基について本明細書で定義する通りの 1、2、3、又は 4 つの置換基で置換することができる。

30

【0930】

本明細書で使用されるとき、用語「ボラニル」は、 $-B(R^{B1})_3$ を表し、ここで、各 R^{B1} は、独立に、H 及び任意選択で置換されたアルキルからなる群から選択される。一部の実施形態では、ボラニル基は、アルキルについて本明細書で定義する通りの 1、2、3、又は 4 つの置換基で置換することができる。

40

【0931】

本明細書で使用されるとき、用語「炭素環式」及び「カルボシクリル」は、任意選択で置換された C_{3-12} 単環式、二環式、又は三環式構造を指し、ここで、環は、芳香族又は非芳香族のいずれであってもよく、これらの環は炭素原子により形成されている。炭素環式構造には、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、及びアリール基が含まれる。

【0932】

本明細書で使用されるとき、用語「カルボニル」は、 $C(O)$ 基を表し、これは、 $C=O$ としても表示することができる。

50

本明細書で使用されるとき、用語「カルボキシ」は、 $-CO_2H$ を意味する。

【0933】

本明細書で使用されるとき、用語「シアノ」は、 $-CN$ 基を表す。

本明細書で使用されるとき、用語「シクロアルキル」は、別に記載のない限り、炭素数3～8の一価飽和又は不飽和非芳香族環式炭化水素基を表し、例として、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、二環式ヘプチルなどが挙げられる。上記以外に、シクロアルキル基と考えられるものが、1つ又は複数の炭素-炭素二重結合を含む場合、その基は、「シクロアルケニル」基と呼ばれる。本発明の目的のために、シクロアルケニルは、アリール基を除外する。上記以外に、シクロアルキル基と考えられるものが、1つ又は複数の炭素-炭素三重結合を含む場合、その基は、「シクロアルキニル」基と呼ばれる。例示的シクロアルケニル基として、シクロペンテニル、シクロヘキセニルなどがある。本発明のシクロアルキル基は、任意選択で、以下に挙げるもので置換することができる：(1) C_{1-7} アシル(例えば、カルボキシアルデヒド)；(2) C_{1-20} アルキル(例えば、 C_{1-6} アルキル、 C_{1-6} アルコキシ- C_{1-6} アルキル、 C_{1-6} アルキルスルフィニル- C_{1-6} アルキル、アミノ- C_{1-6} アルキル、アジド- C_{1-6} アルキル、(カルボキシアルデヒド)- C_{1-6} アルキル、ハロ- C_{1-6} アルキル(例えば、ペルフルオロアルキル)、ヒドロキシ- C_{1-6} アルキル、ニトロ- C_{1-6} アルキル、又は C_{1-6} チオアルコキシ- C_{1-6} アルキル)；(3) C_{1-20} アルコキシ(例えば、ペルフルオロアルコキシなどの C_{1-6} アルコキシ)；(4) C_{1-6} アルキルスルフィニル；(5) C_{6-10} アリール；(6) アミノ；(7) C_{1-6} アルク- C_{6-10} アリール；(8) アジド；(9) C_{3-8} シクロアルキル；(10) C_{1-6} アルク- C_{3-8} シクロアルキル；(11) ハロ；(12) C_{1-12} ヘテロシクリル(例えば、 C_{1-12} ヘテロアリール)；(13) (C_{1-12} ヘテロシクリル)オキシ；(14) ヒドロキシ；(15) ニトロ；(15) C_{1-20} チオアルコキシ(例えば、 C_{1-6} チオアルコキシ)；(17) $-(CH_2)_q CO_2 R^A$ 、ここで、 q は、0～4の整数であり、 R^A は、以下からなる群から選択される：(a) C_{1-6} アルキル、(b) C_{6-10} アリール、(c) 水素、及び(d) C_{1-6} アルク- C_{6-10} アリール；(18) $-(CH_2)_q CONR^B R^C$ 、ここで、 q は、0～4の整数であり、 R^B 及び R^C は、独立に、以下からなる群から選択される：(a) 水素、(b) C_{1-6} アルキル、(c) C_{6-10} アリール、及び(d) C_{1-6} アルク- C_{6-10} アリール；(19) $-(CH_2)_q SO_2 R^D$ 、ここで、 q は、0～4の整数であり、 R^D は、以下からなる群から選択される：(a) C_{6-10} アルキル、(b) C_{6-10} アリール、及び(c) C_{1-6} アルク- C_{6-10} アリール；(20) $-(CH_2)_q SO_2 NR^E R^F$ 、ここで、 q は、0～4の整数であり、 R^E 及び R^F の各々は、独立に、以下からなる群から選択される：(a) 水素、(b) C_{6-10} アルキル、(c) C_{6-10} アリール、及び(d) C_{1-6} アルク- C_{6-10} アリール；(21) チオール；(22) C_{1-6} アリールオキシ；(23) C_{3-8} シクロアルコキシ；(24) C_{6-10} アリール- C_{1-6} アルコキシ；(25) C_{1-6} アルク- C_{1-12} ヘテロシクリル(例えば、 C_{1-6} アルク- C_{1-12} ヘテロアリール)；(26) オキソ；(27) C_{2-20} アルケニル；並びに(28) C_{2-20} アルキニル。一部の実施形態では、これらの基の各々は、本明細書に記載する通り、さらに置換することができる。例えば、 C_1 -アルカリール又は C_1 -アルクヘテロシクリルのアルキレン基は、オキソ基でさらに置換することにより、それぞれのアリーロイル及び(ヘテロシクリル)オイル置換基を付与することができる。

【0934】

本明細書で使用されるとき、用語「シクロアルキルアルキル」基は、本明細書で定義する通りのアルキレン基(例えば、炭素数1～4、1～6、1～10、又は1～20のアルキレン基)を介して親分子基に結合された、本明細書で定義する通りのシクロアルキル基を表す。一部の実施形態では、アルキレン及びシクロアルキルは各々、それぞれの基について本明細書で定義する通りの1、2、3、又は4つの置換基でさらに置換することができ

10

20

30

40

50

る。

【0935】

本明細書で使用される時、用語「ジアステレオマー」は、互いに鏡像ではなく、且つ、互いに重ね合わせることができない立体異性体を意味する。

本明細書で使用される時、用語「鏡像体」は各々、少なくとも80%（すなわち、一方の鏡像体の少なくとも90%と他方の鏡像体の最大10%）、好ましくは少なくとも90%、さらに好ましくは少なくとも98%の光学純度又は鏡像体過剰率（当技術分野で標準的方法により決定される通り）を有する本発明の化合物の個別の光学活性形態を意味する。

【0936】

本明細書で使用される時、用語「ハロ」は、臭素、塩素、ヨウ素、又はフッ素から選択されるハロゲンを表す。

本明細書で使用される時、用語「ヘテロアルキル」は、構成炭素原子の1つ又は2つが各々、窒素、酸素、又はイオウで置換されている、本明細書で定義する通りのアルキル基を指す。一部の実施形態では、ヘテロアルキル基は、アルキル基について本明細書で定義する通りの1、2、3、又は4つの置換基でさらに置換することができる。本明細書で使用される時、用語「ヘテロアルケニル」及び「ヘテロアルキニル」は、それぞれ、構成炭素原子の1つ又は2つが各々、窒素、酸素、又はイオウで置換されている、本明細書で定義する通りのアルケニル及びアルキニル基を指す。一部の実施形態では、ヘテロアルケニル及びヘテロアルキニル基は、アルキル基について本明細書で定義する通りの1、2、3、又は4つの置換基でさらに置換することができる。

【0937】

任意選択で置換されたヘテロアルキル、ヘテロアルケニル、及びヘテロアルキニル基の非制限的例として、アシルオキシ、アルケニルオキシ、アルコキシ、アルコキシアルコキシ、アルコキシカルボニルアルコキシ、アルキニルオキシ、アミノアルコキシ、アリーラルコキシ、カルボキシアルコキシ、シクロアルコキシ、ハロアルコキシ、（ヘテロシクリル）オキシ、ペルフルオロアルコキシ、チオアルコキシ、及びチオヘテロシクリルアルキルが挙げられる：

本明細書で使用される時、「アシルオキシ」基は、酸素原子を介して親分子基に結合された、本明細書で定義する通りのアシル基を表す（すなわち、 $-O-C(O)-R$ 、ここで、Rは、H又は任意選択で置換された C_{1-6} 、 C_{1-10} 、又は C_{1-20} アルキル基である）。例示的非置換アシルオキシ基は、1~21個の炭素（例えば、1~7又は1~11個の炭素）を含む。一部の実施形態では、アルキル基は、本明細書に記載する通りの1、2、3、又は4つの置換基でさらに置換される。

【0938】

本明細書で使用される時、「アルケニルオキシ」基は、別に記載のない限り、式 $-OR$ （Rは、 C_{2-20} アルケニル基（例えば、 C_{2-6} 又は C_{2-10} アルケニル）である）の化学置換基を表す。例示的アルケニルオキシ基としては、エテニルオキシ、プロペニルオキシなどがある。一部の実施形態では、アルケニル基は、本明細書に定義する通りの1、2、3、又は4つの置換基（例えば、ヒドロキシ基）でさらに置換することができる。

【0939】

本明細書で使用される時、「アルコキシ」基は、別に記載のない限り、式 $-OR$ （Rは、 C_{1-20} アルキル基（例えば、 C_{1-6} 又は C_{1-10} アルキル）である）の化学置換基を表す。例示的アルコキシ基としては、メトキシ、エトキシ、プロポキシ（例えば、*n*-プロポキシ及びイソプロポキシ）、*t*-ブトキシなどがある。一部の実施形態では、アルキル基は、本明細書に定義する通りの1、2、3、又は4つの置換基（例えば、ヒドロキシ又はアルコキシ）でさらに置換することができる。

【0940】

本明細書で使用される時、「アルコキシアルコキシ」基は、アルコキシ基で置換され

10

20

30

40

50

たアルコキシ基を表す。例示的非置換アルコシアルコキシ基は、2～40個の炭素（ C_{1-6} アルコキシ- C_{1-6} アルコキシ、 C_{1-10} アルコキシ- C_{1-10} アルコキシ、若しくは C_{1-20} アルコキシ- C_{1-20} アルコキシなどのように、例えば、2～12又は2～20個の炭素）を含む。一部の実施形態では、各アルコキシ基は、本明細書で定義する通りの1、2、3、又は4つの置換基でさらに置換することができる。

【0941】

本明細書で使用されるとき、「アルコシカルボニルアルコキシ」基は、本明細書で定義する通りのアルコシカルボニル基で置換されたアルコキシ基を表す（例えば、 $-O-$ アルキル- $C(O)-OR$ 、ここで、Rは、任意選択で置換された C_{1-6} 、 C_{1-10} 、又は C_{1-20} アルキル基である）。例示的非置換アリコシカルボニルアルコキシ基は、3～41個の炭素（ C_{1-6} アルコシカルボニル- C_{1-6} アルコキシ、 C_{1-10} アルコシカルボニル- C_{1-10} アルコキシ、又は C_{1-20} アルコシカルボニル- C_{1-20} アルコキシなどのように、例えば、3～10、3～13、3～17、3～21、又は3～31個の炭素）を含む。一部の実施形態では、各アルコキシ基は、独立して、本明細書に記載する通りの1、2、3、又は4つの置換基（例えば、ヒドロキシ基）でさらに置換される。

10

【0942】

本明細書で使用されるとき、「アルキニルオキシ」基は、別に記載のない限り、式- OR （Rは、 C_{2-20} アルキニル基（例えば、 C_{2-6} 又は C_{2-10} アルキル基）である）の化学置換基を表す。例示的アルキニルオキシ基としては、エチニルオキシ、プロピニルオキシなどがある。一部の実施形態では、アルキニル基は、本明細書に定義する通りの1、2、3、又は4つの置換基（例えば、ヒドロキシ基）でさらに置換することができる。

20

【0943】

本明細書で使用されるとき、「アミノアルコキシ」基は、本明細書で定義する通りのアミノ基で置換されたアルコキシ基を表す。アルキル及びアミノは各々、それぞれの基について本明細書に記載する1、2、3、又は4つの置換基（例えば、 CO_2R^A 、ここで、 R^A は、以下：（a） C_{1-6} アルキル、（b） C_{6-10} アリール、（c）水素、及び（d） C_{1-6} アルク- C_{6-10} アリール、例えば、カルボキシからなる群から選択される）でさらに置換することができる。

30

【0944】

本明細書で使用されるとき、「アリールアルコキシ」基は、酸素原子を介して親分子基に結合された、本明細書で定義する通りのアルカリール基を表す。例示的非置換アリールアルコキシ基は、7～30個の炭素（ C_{6-10} アリール- C_{1-6} アルコキシ、 C_{6-10} アリール- C_{1-10} アルコキシ、若しくは C_{6-10} アリール- C_{1-20} アルコキシなどのように、例えば、7～16又は7～20個の炭素）を含む。一部の実施形態では、アリールアルコキシ基は、本明細書で定義する通りの1、2、3、又は4つの置換基で置換することができる。

【0945】

本明細書で使用されるとき、「アリールオキシ」基は、別に記載のない限り、式- OR' （ R' は、炭素数6～18のアリール基である）の化学置換基を表す。一部の実施形態では、アリール基は、本明細書で定義する通りの1、2、3、又は4つの置換基で置換することができる。

40

【0946】

本明細書で使用されるとき、「カルボキシアルコキシ」基は、本明細書で定義する通りのカルボキシ基で置換された、本明細書で定義する通りのアルコキシ基を表す。アルコキシ基は、アルキル基について本明細書に記載する通りの1、2、3、又は4つの置換基でさらに置換することができ、カルボキシ基は、任意選択で、1つ又は複数のO-保護基で置換することができる。

【0947】

50

本明細書で使用されるとき、「シクロアルコキシ」基は、別に記載のない限り、式 - OR (R は、 $C_3 \sim 8$ シクロアルキル基である) の化学置換基を表す。シクロアルキル基は、本明細書に記載する通りの 1、2、3、又は 4 つの置換基でさらに置換することができる。例示的非置換シクロアルコキシ基は、炭素数 3 ~ 8 である。一部の実施形態では、シクロアルキル基は、本明細書に記載する通りの 1、2、3、又は 4 つの置換基でさらに置換することができる。

【0948】

本明細書で使用されるとき、「ハロアルコキシ」基は、ハロゲン基 (すなわち、F、Cl、Br、又は I) で置換された、本明細書で定義する通りのアルコキシ基を表す。ハロアルコキシは、1 つ、2 つ、3 つ、又は、炭素数 2 以上のアルキル基の場合、4 つのハロゲンで置換してもよい。ハロアルコキシ基は、ペルフルオロアルコキシ (例えば、 $-OCF_3$)、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCH_2CH_2Br$ 、 $-OCH_2CH(CH_2CH_2Br)CH_3$ 、及び $-OCHI(CH_3)$ を含む。一部の実施形態では、ハロアルコキシ基は、アルキル基について本明細書に記載する通りの 1、2、3、又は 4 つの置換基でさらに置換することができる。

10

【0949】

本明細書で使用されるとき、「(ヘテロシクリル)オキシ」基は、酸素原子を介して親分子基に結合した、本明細書で定義する通りのヘテロシクリル基を表す。一部の実施形態では、ヘテロシクリル基は、本明細書で定義する通りの 1、2、3、又は 4 つの置換基で置換することができる。

20

【0950】

本明細書で使用されるとき、「ペルフルオロアルコキシ」基は、アルコキシ基に結合した各水素ラジカルが、フッ化物ラジカルで置換されている、アルコキシ基を表す。ペルフルオロアルコキシ基の例としては、トリフルオロメトキシ、ペンタフルオロエトキシなどが挙げられる。

【0951】

本明細書で使用されるとき、「アルキルスルフィニル」基は、 $-S(O)-$ 基を介して親分子基に結合したアルキル基を表す。例示的非置換アルキルスルフィニル基は、炭素数 1 ~ 6、1 ~ 10、又は 1 ~ 20 である。一部の実施形態では、アルキル基は、本明細書で定義する通りの 1、2、3、又は 4 つの置換基でさらに置換することができる。

30

【0952】

本明細書で使用されるとき、「チオアリールアルキル」基は、式 - SR (R は、アリールアルキル基である) の化学置換基を表す。一部の実施形態では、アリールアルキル基は、本明細書に記載する通りの 1、2、3、又は 4 つの置換基でさらに置換することができる。

【0953】

本明細書で使用されるとき、「チオアルコキシ」基は、式 - SR (R は、アルキル基である) の化学置換基を表す。一部の実施形態では、アルキル基は、本明細書に記載する通りの 1、2、3、又は 4 つの置換基でさらに置換することができる。

【0954】

本明細書で使用されるとき、「チオヘテロシクリルアルキル」基は、式 - SR (R は、ヘテロシクリルアルキル基である) の化学置換基を表す。一部の実施形態では、ヘテロシクリルアルキル基は、本明細書に記載する通りの 1、2、3、又は 4 つの置換基でさらに置換することができる。

40

【0955】

本明細書で使用されるとき、用語「ヘテロアリール」は、芳香族である (すなわち、単環又は多環式環系内に $4n + 2$ pi 電子を含有する) ヘテロシクリルのサブセットを表す。例示的非置換ヘテロアリール基は、炭素数 1 ~ 12 (例えば、1 ~ 11、1 ~ 10、1 ~ 9、2 ~ 12、2 ~ 11、2 ~ 10、又は 2 ~ 9) である。一部の実施形態では、ヘテロアリール基は、ヘテロシクリル基について本明細書で定義する通りの 1、2、3、又は

50

4つの置換基で置換される。

【0956】

用語「ヘテロアリアルアルキル」は、本明細書で定義する通りのアルキレン基を介して親分子基に結合した、本明細書で定義する通りのヘテロアリアル基を指す。例示的非置換ヘテロアリアル基は、炭素数2～32（例えば、 C_{1-6} アルク- C_{1-12} ヘテロアリアル、 C_{1-10} アルク- C_{1-12} ヘテロアリアル、若しくは C_{1-20} アルク- C_{1-12} ヘテロアリアルのように、2～22、2～18、2～17、2～16、3～15、2～14、2～13、又は2～12）である。一部の実施形態では、アルキレン及びヘテロアリアルは各々、それぞれの基について本明細書で定義する通りの1、2、3、又は4つの置換基でさらに置換することができる。ヘテロアリアルアルキル基は、ヘテロシクリルアルキル基のサブセットである。

10

【0957】

本明細書で使用されるとき、用語「ヘテロシクリル」は、別に記載のない限り、窒素、酸素、及びイオウからなる群から独立に選択される1、2、3、又は4個のヘテロ原子を含有する、5-、6-若しくは7員環を表す。5員環は、0～2つの二重結合を有し、6-及び7員環は、0～3つの二重結合を有する。例示的非置換ヘテロシクリル基は、炭素数1～12（例えば、1～11、1～10、1～9、2～12、2～11、2～10、又は2～9）である。用語「ヘテロシクリル」はまた、架橋した多環式構造を有する複素環式化合物を表し、ここで、1個又は複数個の炭素及び/又はヘテロ原子が、単環、例えば、キヌクリジニル基の2つの非隣接メンバーを架橋する。用語「ヘテロシクリル」は、二環式、三環式、及び四環式基を含み、ここで、前述した複素環のいずれかは、1つ、2つ、又は3つの炭素環、例えば、アリアル環、シクロヘキサン環、シクロヘキセン環、シクロペンタン環、シクロペンテン環、又は別の単環、例えば、インドリル、キノリル、イソキノリル、テトラヒドロキノリル、ベンゾフリル、ベンゾチエニルなどに融合する。融合ヘテロシクリルの例として、トロパン及び1,2,3,5,8,8a-ヘキサヒドロインドリジンが挙げられる。複素環式基としては、以下：ピロリル、ピロリニル、ピロリジニル、ピラゾリル、ピラゾリニル、ピラゾリジニル、イミダゾリル、イミダゾリニル、イミダゾリジニル、ピリジル、ペペリジニル、ホモペペリジニル、ピラジニル、ペペラジニル、ピリミジニル、ピリダジニル、オキサゾリル、オキサゾリジニル、イソキサゾリル、イソキサゾリジニル、モルホリニル、チオモルホリニル、チアゾリル、チアゾリジニル、イソチアゾリル、イソチアゾリジニル、インドリル、インダゾリル、キノリル、イソキノリル、キノキサリニル、ジヒドロキノキサリニル、キナゾリニル、シンノリニル、フタラジニル、ベンズイミダゾリル、ベンゾチアゾリル、ベンゾキサゾリル、ベンゾチアジアゾリル、フリル、チエニル、チアゾリジニル、イソチアゾリル、トリアゾリル、テトラゾリル、オキサジアゾリル（例えば、1,2,3-オキサジアゾリル）、プリニル、チアジアゾリル（例えば、1,2,3-チアジアゾリル）、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、ジヒドロチエニル、ジヒドロインドリル、ジヒドロキノリル、テトラヒドロキノリル、テトラヒドロイソキノリル、ジヒドロイソキノリル、ピラニル、ジヒドロピラニル、ジチアゾリル、ベンゾフラニル、イソベンゾフラニル、ベンゾチエニルなどが挙げられ、1つ又は複数の二重結合が還元又は水素で置換されたジヒドロ及びテトラヒドロ形態を含む。また別の例示的ヘテロシクリルとしては、以下のものが挙げられる：2,3,4,5-テトラヒドロ-2-オキソ-オキサゾリル；2,3-ジヒドロ-2-オキソ-1H-イミダゾリル；2,3,4,5-テトラヒドロ-5-オキソ-1H-ピラゾリル（例えば、2,3,4,5-テトラヒドロ-2-フェニル-5-オキソ-1H-ピラゾリル）；2,3,4,5-テトラヒドロ-2,4-ジオキソ-1H-イミダゾリル（例えば、2,3,4,5-テトラヒドロ-2,4-ジオキソ-5-メチル-5-フェニル-1H-イミダゾリル）；2,3-ジヒドロ-2-チオキソ-1,3,4-オキサジアゾリル（例えば、2,3-ジヒドロ-2-チオキソ-5-フェニル-1,3,4-オキサジアゾリル）；4,5-ジヒドロ-5-オキソ-1H-トリアゾリル（例えば、4,5-ジヒドロ-3-メチル-4-アミノ-5-オキソ-1H-トリアゾリル）；1,2,3,

20

30

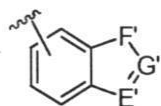
40

50

4 - テトラヒドロ - 2 , 4 - ジオキソピリジニル (例 えば、 1 , 2 , 3 , 4 - テトラヒドロ - 2 , 4 - ジオキソ - 3 , 3 - ジエチルピリジニル) ; 2 , 6 - ジオキソ - ピペリジニル (例 えば、 2 , 6 - ジオキソ - 3 - エチル - 3 - フェニルピペリジニル) ; 1 , 6 - ジヒドロ - 6 - オキソピリジミニル、 1 , 6 - ジヒドロ - 4 - オキソピリミジニル (例 えば、 2 - (メチルチオ) - 1 , 6 - ジヒドロ - 4 - オキソ - 5 - メチルピリミジン - 1 - イル) ; 1 , 2 , 3 , 4 - テトラヒドロ - 2 , 4 - ジオキソピリミジニル (例 えば、 1 , 2 , 3 , 4 - テトラヒドロ - 2 , 4 - ジオキソ - 3 - エチルピリミジニル) ; 1 , 6 - ジヒドロ - 6 - オキソ - ピリダジニル (例 えば、 1 , 6 - ジヒドロ - 6 - オキソ - 3 - エチルピリダジニル) ; 1 , 6 - ジヒドロ - 6 - オキソ - 1 , 2 , 4 - トリアジニル (例 えば、 1 , 6 - ジヒドロ - 5 - イソプロピル - 6 - オキソ - 1 , 2 , 4 - トリアジニル) ; 2 , 3 - ジヒドロ - 2 - オキソ - 1 H - インドリル (例 えば、 3 , 3 - ジメチル - 2 , 3 - ジヒドロ - 2 - オキソ - 1 H - インドリル 及び 2 , 3 - ジヒドロ - 3 , 3 ' - スピロプロパン - 1 H - インドール - 1 - イル) ; 1 , 3 - ジヒドロ - 1 - オキソ - 2 H - イソ - インドリル ; 1 , 3 - ジヒドロ - 1 , 3 - 2 H - イソ - インドリル ; 1 H - ベンゾピラゾリル (例 えば、 1 - (エトキシカルボニル) - 1 H - ベンゾピラゾリル) ; 2 , 3 - ジヒドロ - 2 - オキソ - 1 H - ベンズイミダゾリル (例 えば、 3 - エチル - 2 , 3 - ジヒドロ - 2 - オキソ - 1 H - ベンズイミダゾリル) ; 2 , 3 - ジヒドロ - 2 - オキソ - ベンゾキサゾリル (例 えば、 5 - クロロ - 2 , 3 - ジヒドロ - 2 - オキソ - ベンゾキサゾリル) ; 2 , 3 - ジヒドロ - 2 - オキソ - ベンゾキサゾリル ; 2 - オキソ - 2 H - ベンゾピラニル ; 1 , 4 - ベンゾジオキサニル ; 1 , 3 - ベンゾジオキサニル ; 2 , 3 - ジヒドロ - 3 - オキソ , 4 H - 1 , 3 - ベンゾチアジニル ; 3 , 4 - ジヒドロ - 4 - オキソ - 3 H - キナゾリニル (例 えば、 2 - メチル - 3 , 4 - ジヒドロ - 4 - オキソ - 3 H - キナゾリニル) ; 1 , 2 , 3 , 4 - テトラヒドロ - 2 , 4 - ジオキソ - 3 H - キナゾリル (例 えば、 1 - エチル - 1 , 2 , 3 , 4 - テトラヒドロ - 2 , 4 - ジオキソ - 3 H - キナゾリル) ; 1 , 2 , 3 , 6 - テトラヒドロ - 2 , 6 - ジオキソ - 7 H - プリニル (例 えば、 1 , 2 , 3 , 6 - テトラヒドロ - 1 , 3 - ジメチル - 2 , 6 - ジオキソ - 7 H - プリニル) ; 1 , 2 , 3 , 6 - テトラヒドロ - 2 , 6 - ジオキソ - 1 H - プリニル (例 えば、 1 , 2 , 3 , 6 - テトラヒドロ - 3 , 7 - ジメチル - 2 , 6 - ジオキソ - 1 H - プリニル) ; 2 - オキソベンズ [c , d] インドリル ; 1 , 1 - ジオキソ - 2 H - ナフト [1 , 8 - c , d] イソチアゾリル ; 並びに 1 , 8 - ナフチレンジカルボキサミド。さらなる複素環式基として、 3 , 3 a , 4 , 5 , 6 , 6 a - ヘキサヒドロ - ピロロ [3 , 4 - b] ピロル - (2 H) - イル、並びに 2 , 5 - ジアザピシクロ [2 . 2 . 1] ヘプタン - 2 - イル、ホモペラジニル (又はジアゼパニル)、テトラヒドロピラニル、ジチアゾリル、ベンゾフラニル、ベンゾチエニル、オキセパニル、チエパニル、アゾカニル、オキセカニル、及びチオカニルが挙げられる。複素環式基はまた、下記の式の基も含む :

【 0 9 5 8 】

【 化 5 0 】



式中、

E ' は、 - N - 及び - CH - からなる群から選択され ; F ' は、 - N = CH - 、 - NH - CH₂ - 、 - NH - C (O) - 、 - NH - 、 - CH = N - 、 - CH₂ - NH - 、 - C (O) - NH - 、 - CH = CH - 、 - CH₂ - 、 - CH₂CH₂ - 、 - CH₂O - 、 - OCH₂ - 、 - O - 、 及び - S - からなる群から選択され ; G ' は、 - CH - 及び - N - からなる群から選択される。本明細書に挙げたヘテロシクリル基のいずれも、任意選択で、以下のものからなる群から独立に選択される 1 つ、 2 つ、 3 つ、 4 つ若しくは 5 つの置換基で置換してもよい : (1) C₁ - 7 アシル (例 えば、カルボキシアルデヒド) ; (2) C

10

20

30

40

50

C_{1-6} アルキル (例えば、 C_{1-6} アルキル、 C_{1-6} アルコキシ - C_{1-6} アルキル、 C_{1-6} アルキルスルフィニル - C_{1-6} アルキル、アミノ - C_{1-6} アルキル、アジド - C_{1-6} アルキル、(カルボキシアルデヒド) - C_{1-6} アルキル、ハロ - C_{1-6} アルキル (例えば、ペルフルオロアルキル)、ヒドロキシ - C_{1-6} アルキル、ニトロ - C_{1-6} アルキル、又は C_{1-6} チオアルコキシ - C_{1-6} アルキル); (3) C_{1-20} アルコキシ (例えば、ペルフルオロアルコキシなどの C_{1-6} アルコキシ); (4) C_{1-6} アルキルスルフィニル; (5) C_{6-10} アリール; (6) アミノ; (7) C_{1-6} アルク - C_{6-10} アリール; (8) アジド; (9) C_{3-8} シクロアルキル; (10) C_{1-6} アルク - C_{3-8} シクロアルキル; (11) ハロ; (12) C_{1-12} ヘテロシクリル (例えば、 C_{2-12} ヘテロアリール); (13) (C_{1-12} ヘテロシクリル) オキシ; (14) ヒドロキシ; (15) ニトロ; (16) C_{1-20} チオアルコキシ (例えば、 C_{1-6} チオアルコキシ); (17) - (CH_2)_q CO_2R^A 、ここで、q は、0 ~ 4 の整数であり、 R^A は、以下からなる群から選択される: (a) C_{1-6} アルキル、(b) C_{6-10} アリール、(c) 水素、及び (d) C_{1-6} アルク - C_{6-10} アリール; (18) - (CH_2)_q $CONR^B R^C$ 、ここで、q は、0 ~ 4 の整数であり、 R^B 及び R^C は、独立に、以下からなる群から選択される: (a) 水素、(b) C_{1-6} アルキル、(c) C_{6-10} アリール、及び (d) C_{1-6} アルク - C_{6-10} アリール; (19) - (CH_2)_q SO_2R^D 、ここで、q は、0 ~ 4 の整数であり、 R^D は、以下からなる群から選択される: (a) C_{1-6} アルキル、(b) C_{6-10} アリール、及び (c) C_{1-6} アルク - C_{6-10} アリール; (20) - (CH_2)_q $SO_2NR^E R^F$ 、ここで、q は、0 ~ 4 の整数であり、 R^E 及び R^F の各々は、独立に、以下からなる群から選択される: (a) 水素、(b) C_{1-6} アルキル、(c) C_{6-10} アリール、及び (d) C_{1-6} アルク - C_{6-10} アリール; (21) チオール; (22) C_{1-6} アリールオキシ; (23) C_{3-8} シクロアルコキシ; (24) アリールアルコキシ; (25) C_{1-6} アルク - C_{1-12} ヘテロシクリル (例えば、 C_{1-6} アルク - C_{1-12} ヘテロアリール); (26) オキソ; (27) (C_{1-12} ヘテロシクリル) イミノ; (28) C_{2-20} アルケニル; 並びに (29) C_{2-20} アルキニル。一部の実施形態では、これらの基の各々は、本明細書に記載する通り、さらに置換することができる。例えば、 C_1 - アルカリール又は C_1 - アルクヘテロシクリルのアルキレン基は、オキソ基でさらに置換することにより、それぞれのアリーロイル及び (ヘテロシクリル) オイル置換基を付与することができる。

【0959】

本明細書で使用されるとき、用語「ヘテロシクリルアルキル」基は、本明細書で定義する通りのアルキレン基を介して親分子基に結合された、本明細書で定義する通りのヘテロシクリル基を表す。例示的非置換ヘテロシクリルアルキル基は、炭素数 2 ~ 32 (例えば、 C_{1-6} アルク - C_{1-12} ヘテロシクリル、 C_{1-10} アルク - C_{1-12} ヘテロシクリル、若しくは C_{1-20} アルク - C_{1-12} ヘテロシクリルなどのように、例えば、2 ~ 22、2 ~ 18、2 ~ 17、2 ~ 16、3 ~ 15、2 ~ 14、2 ~ 13、又は 2 ~ 12 個の炭素) を含む。一部の実施形態では、アルキレン及びヘテロシクリルは各々、それぞれの基について本明細書で定義する通りの 1、2、3、又は 4 つの置換基でさらに置換することができる。

【0960】

本明細書で使用されるとき、用語「炭化水素」は、炭素及び水素原子のみから構成される基を表す。

本明細書で使用されるとき、用語「ヒドロキシ」は、-OH 基を表す。

【0961】

本明細書で使用されるとき、用語「異性体」は、本発明の任意の化合物の任意の互変異性体、立体異性体、鏡像体、又はジアステレオマーを意味する。本発明の化合物は、1 つ又は複数のキラル中心及び/又は二重結合を有し得るため、二重結合異性体 (すなわち、幾何 E/Z 異性体) 又はジアステレオマー (例えば、鏡像体 (すなわち、(+)) 若しくはは

(-)) 又はシス/トランス異性体)として存在し得ることが認識される。本発明によれば、本明細書で描かれる化学構造、従って、本発明の化合物は、対応する立体異性体の全て、すなわち、立体異性体的に純粋な(例えば、幾何学的に純粋、鏡像体的に純粋、又はジアステレオマ的に純粋な)形態及び立体異性体混合物、例えば、ラセミ体の両方を包含する。本発明の化合物の鏡像体及び立体異性体の混合物は、典型的に、公知の方法、例えば、キラル相ガスクロマトグラフィー、キラル相高性能液体クロマトグラフィー、キラル塩錯体として化合物を結晶化する方法、又はキラル溶媒中で化合物を結晶化する方法により、それらの成分鏡像体又は立体異性体に分割することができる。鏡像体及び立体異性体はまた、公知の非対称合成方法により、立体異性体的に又は鏡像体的に純粋な中間体、試薬、及び触媒から取得することもできる。

10

【0962】

本明細書で使用されるとき、用語「N-保護アミノ」は、本明細書で定義する通りの1つ又は2つのN-保護基が結合した、本明細書で定義する通りのアミノ基を指す。

本明細書で使用されるとき、用語「N-保護基」は、合成工程中に不要な反応からアミノ基を保護することが意図される基を表す。一般的に使用されているN-保護基は、グリーン(Greene)著、「有機合成における保護基(Protective Groups in Organic Synthesis)」、第3版、ジョン・ワイリー・アンド・サンズ(John Wiley & Sons)、ニューヨーク、1999年(これは、全体として参照により本明細書に組み込む)に開示されている。N-保護基としては、以下のものが挙げられる：アシル、アリーロイル、又はカルバミル基、例えば、ホルミル、アセチル、プロピオニル、ピバロイル、t-ブチルアセチル、2-クロロアセチル、2-ブロモアセチル、トリフルオロアセチル、トリクロロアセチル、フタリル、o-ニトロフェノキシアセチル、-クロロブチリル、ベンゾイル、4-クロロベンゾイル、4-ブロモベンゾイル、4-ニトロベンゾイル、並びにキラル補助剤、例えば、アラニン、ロイシン、フェニルアラニンなどの保護若しくは非保護D、L若しくはD、L-アミノ酸；スルホニル含有基、例えば、ベンゼンスルホニル、p-トルエンスルホニルなど；カルバメート形成基、例えば、ベンジルオキシカルボニル、p-クロロベンジルオキシカルボニル、p-メトキシベンジルオキシカルボニル、p-ニトロベンジルオキシカルボニル、2-ニトロベンジルオキシカルボニル、p-ブロモベンジルオキシカルボニル、3,4-ジメトキシベンジルオキシカルボニル、3,5-ジメトキシベンジルオキシカルボニル、2,4-ジメトキシベンジルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、2-ニトロ-4,5-ジメトキシベンジルオキシカルボニル、3,4,5-トリメトキシベンジルオキシカルボニル、1(p-ピフェニリル)-1-メチルエトキシカルボニル、-ジメチル-3,5-ジメトキシベンジルオキシカルボニル、ベンズヒドロキシカルボニル、t-ブチルオキシカルボニル、ジイソプロピルメトキシカルボニル、イソプロピルオキシカルボニル、エトキシカルボニル、メトキシカルボニル、アリルオキシカルボニル、2,2,2-トリクロロエトキシカルボニル、フェノキシカルボニル、4-ニトロフェノキシカルボニル、フルオレニル-9-メトキシカルボニル、シクロペンチルオキシカルボニル、アダマンチルオキシカルボニル、シクロヘキシルオキシカルボニル、フェニルチオカルボニルなど、アルカリアル基、例えば、ベンジル、トリフェニルメチル、ベンジルオキシメチルなど、並びにシリル基、例えば、トリメチルシリルなど。好ましいN保護基は、ホルミル、アセチル、ベンゾイル、ピバロイル、t-ブチルアセチル、アラニル、フェニルスルホニル、ベンジル、t-ブチルオキシカルボニル(Boc)、及びベンジルオキシカルボニル(Cbz)である。

20

30

40

【0963】

本明細書で使用されるとき、用語「ニトロ」は、-NO₂基を表す。

本明細書で使用されるとき、用語「O-保護基」は、合成工程中に不要な反応から酸素含有(例えば、フェノール、ヒドロキシル、若しくはカルボニル)基を保護することが意図される基を表す。一般的に使用されているO-保護基は、グリーン(Greene)著、「有機合成における保護基(Protective Groups in Organ

50

ic Synthesis)」、第3版、ジョン・ワイリー・アンド・サンズ (John Wiley & Sons)、ニューヨーク、1999年(これは、全体として参照により本明細書に組み込む)に開示されている。O-保護基としては、以下のものが挙げられる：アシル、アリーロイル、又はカルバミル基、例えば、ホルミル、アセチル、プロピオニル、ピバロイル、t-ブチルアセチル、2-クロロアセチル、2-プロモアセチル、トリフルオロアセチル、トリクロロアセチル、フタリル、o-ニトロフェノキシアセチル、-クロロブチリル、ベンゾイル、4-クロロベンゾイル、4-プロモベンゾイル、t-ブチルジメチルシリル、トリ-イソ-プロピルシリルオキシメチル、4,4'-ジメトキシトリチル、イソブチリル、フェノキシアセチル、4-イソプロピルフェノキシアセチル、ジメチルホルムアミジノ、及び4-ニトロベンゾイル；アルキルカルボニル基、例えば、アシル、アセチル、プロピオニル、ピバロイルなど；任意選択で置換されたアリールカルボニル基、例えば、ベンゾイル；シリル基、例えば、トリメチルシリル(TMS)、tert-ブチルジメチルシリル(TBDMS)、トリ-イソ-プロピルシリルオキシメチル(TOM)、トリイソプロピルシリル(TIPS)など；ヒドロキシルを含むエーテル形成基、例えば、メチル、メトキシメチル、テトラヒドロピラニル、ベンジル、p-メトキシベンジル、トリチルなど；アルコキシカルボニル、例えば、メトキシカルボニル、エトキシカルボニル、イソプロポキシカルボニル、n-イソプロポキシカルボニル、n-ブチルオキシカルボニル、イソブチルオキシカルボニル、sec-ブチルオキシカルボニル、t-ブチルオキシカルボニル、2-エチルヘキシルオキシカルボニル、シクロヘキシルオキシカルボニル、メチルオキシカルボニルなど；アルコキシアルコキシカルボニル基、例えば、メトキシメトキシカルボニル、エトキシメトキシカルボニル、2-メトキシエトキシカルボニル、2-エトキシエトキシカルボニル、2-ブトキシエトキシカルボニル、2-メトキシエトキシメトキシカルボニル、アリルオキシカルボニル、プロパルギルオキシカルボニル、2-ブテノキシカルボニル、3-メチル-2-ブテノキシカルボニルなど；ハロアルコキシカルボニル、例えば、2-クロロエトキシカルボニル、2-クロロエトキシカルボニル、2,2,2-トリクロロエトキシカルボニルなど；任意選択で置換されたアリールアルコキシカルボニル基、例えば、ベンジルオキシカルボニル、p-メチルベンジルオキシカルボニル、p-メトキシベンジルカルボニル、p-ニトロベンジルオキシカルボニル、2,4-ジニトロベンジルオキシカルボニル、3,5-ジメチルベンジルオキシカルボニル、p-クロロベンジルオキシカルボニル、p-プロモベンジルオキシカルボニル、フルオレニルメチルオキシカルボニルなど；並びに任意選択で置換されたアリールオキシカルボニル基、例えば、フェノキシカルボニル、p-ニトロフェノキシカルボニル、o-ニトロフェノキシカルボニル、2,4-ジニトロフェノキシカルボニル、p-メチル-フェノキシカルボニル、m-メチルフェノキシカルボニル、o-プロモフェノキシカルボニル、3,5-ジメチルフェノキシカルボニル、p-クロロフェノキシカルボニル、2-クロロ-4-ニトロフェノキシカルボニルなど)；置換されたアルキル、アリール、及びアルカリールエーテル(例えば、トリチル；メチルチオメチル；メトキシメチル；ベンジルオキシメチル；シロキシメチル；2,2,2-トリクロロエトキシメチル；テトラヒドロピラニル；テトラヒドロフラニル；エトキシエチル；1-[2-(トリメチルシリル)エトキシ]エチル；2-トリメチルシリルエチル；t-ブチルエーテル；p-クロロフェニル、p-メトキシフェニル、p-ニトロフェニル、ベンジル、p-メトキシベンジル、及びニトロベンジル)；シリルエーテル(例えば、トリメチルシリル；トリエチルシリル；トリイソプロピルシリル；ジメチルイソプロピルシリル；t-ブチルジメチルシリル；t-ブチルジフェニルシリル；トリベンジルシリル；トリフェニルシリル；及びジフェニルメチルシリル)；カルボン酸塩(例えば、メチル、メトキシメチル、9-フルオレニルメチル；エチル；2,2,2-トリクロロエチル；2-(トリメチルシリル)エチル；ピニル、アリル、ニトロフェニル；ベンジル；メトキシベンジル；3,4-ジメトキシベンジル；及びニトロベンジル)；カルボニル-保護基(例えば、アセタール及びケタール基、例えば、ジメチルアセタール、1,3-ジオキサランなど；アシラル基；並びにジチアン基、例えば、1,3-ジチアン、1,3-ジチオランなど)；カルボン酸-保

10

20

30

40

50

護基（例えば、エステル基、例えば、メチルエステル、ベンジルエステル、*t*-ブチルエステル、オルトエステルなど；並びにオキサゾリン基。

【0964】

本明細書で使用されるとき、用語「オキソ」は、=Oを表す。

本明細書で使用されるとき、接頭辞「ペルフルオロ」は、アルキル基に結合した各水素ラジカルが、フッ化物ラジカルによって置換されている、本明細書で定義する通りのアニル基を指す。例えば、ペルフルオロ基の例としては、トリフルオロメチル、ペンタフルオロエチルなどが挙げられる。

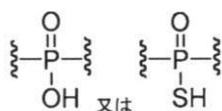
【0965】

本明細書で使用されるとき、用語「ホスホリル」は、

10

【0966】

【化51】



を指す。

【0967】

本明細書で使用されるとき、用語「保護（された）ヒドロキシル」は、O-保護基に結合した酸素原子を指す。

20

本明細書で使用されるとき、用語「スピロシクリル」は、両端が、親基の同じ炭素原子に結合して、スピロ環状基を形成する、 $C_2 - 7$ アルキレンジラジカル、並びに両端が、同じ原子に結合された、 $C_1 - 6$ ヘテロアルキレンジラジカルを表す。スピロシクリル基を形成するヘテロアルキレンラジカルは、窒素、酸素、及びイオウからなる群から独立に選択される、1つ、2つ、3つ、又は4つのヘテロ原子を含有してよい。一部の実施形態では、スピロシクリル基は、ジラジカルが結合する炭素原子を除いて、1~7個の炭素を含む。本発明のスピロシクリル基は、任意選択で、シクロアルキル及び/又はヘテロシクリル基についての任意選択の置換基として本明細書に提供される1、2、3、若しくは4つの置換基で置換してもよい。

30

【0968】

本明細書で使用されるとき、用語「立体異性体」は、化合物（例えば、本明細書に記載する任意の式の化合物）が有し得る、考えられる全ての様々な異性体形態、並びに配座形態、特に、考えられる全ての立体化学及び配座異性体形態、基本的分子構造のあらゆるジアステレオマー、鏡像体及び/又は配座異性体を指す。本発明の一部の化合物は、様々な互変異性体で存在してもよく、その全てが、本発明の範囲に含まれる。

【0969】

本明細書で使用されるとき、用語「スルホニル」は、 $-S(O)_2-$ 基を表す。

本明細書で使用されるとき、用語「チオール」は、 $-SH$ 基を表す。

化合物：本明細書で使用されるとき、用語「化合物」は、記載する構造の立体異性体、幾何異性体、互変異性体、及びアイソトープの全てを包含することを意味する。

40

【0970】

本明細書に記載する化合物は、非対称であってよい（例えば、1つ又は複数のキラル中心を有する）。別に記載のない限り、あらゆる鏡像体及びジアステレオマーなどの立体異性体が意図される。非対称に置換された炭素原子を含む本開示の化合物は、光学活性又はラセミ形態で単離することができる。光学活性出発材料から光学活性形態を調製する方法は、当技術分野で公知であり、例えば、ラセミ混合物の分割又は立体選択的合成によるものがある。オレフィン、 $C=N$ 二重結合などの多くの幾何異性体も、本明細書に記載の化合物に存在する可能性があり、こうした安定異性体は全て本開示において考慮される。本開示の化合物のシス及びトランス異性体が記載され、これらは、異性体の混合物又は分離

50

された異性体形態として単離することができる。

【0971】

本開示の化合物はまた、互変異性体形態も含む。互変異性体形態は、隣接する二重結合による単結合のスイッチングと、それに付随するプロトンの移動により生じる。互変異性体形態は、同じ実験式及び総電荷を有する異性体のプロトン化状態である、プロトン放出互変異性体を含む。プロトン放出互変異性体の例として、ケトン-エノールペア、アミド-イミド酸ペア、ラクタム-ラクチムペア、アミド-イミド酸ペア、エナミン-イミンペア、及び環状形態があり、ここで、プロトンは、1H-及び3H-イミダゾール、1H-、2H-及び4H-1,2,4-トリアゾール、1H-及び2H-イソインドール、及び1H-及び2H-ピラゾールなどの複素環系の2つ以上の位置を占め得る。互変異性体形態は、平衡状態であってもよいし、又は適切な置換によって1つの形態に立体的に固定されていてもよい。

10

【0972】

本開示の化合物はまた、中間又は最終化合物に存在する原子のアイソトープの全てを含む。「アイソトープ」は、同じ原子数を有するが、核内の中性子数が異なるために、異なる質量数を有する原子を指す。例えば、水素のアイソトープとしては、トリチウム及び重水素がある。

【0973】

本開示の化合物及び塩は、常用の方法により、溶媒又は水分子と組み合わせて調製することにより、溶媒和化合物及び水和物を形成することができる。

20

拘束(された)(committed)：本明細書で使用されるとき、用語「拘束(された)(committed)」は、細胞に関して述べる場合、細胞が、分化経路中に十分な程度まで進行している時点の意味し、その際、細胞は、正常な状況下で、別の細胞型にではなく、又はより低い分化細胞型に戻るのではなく、特定の細胞型若しくは細胞型のサブセットに分化し続けることになる。

【0974】

保存された：本明細書で使用されるとき、用語「保存された」は、比較される2つ以上の配列の同じ位置に非改変状態で存在するものである、それぞれポリヌクレオチド配列又はポリペプチド配列のヌクレオチド又はアミノ酸残基を指す。比較的保存されたヌクレオチド又はアミノ酸は、当該配列の他所に出現するヌクレオチド又はアミノ酸より関連性の高い配列の間で保存されているものである。

30

【0975】

一部の実施形態では、2つ以上の配列は、それらが互いに100%同一であれば、「完全に保存されている」と言う。一部の実施形態では、2つ以上の配列は、それらが互いに少なくとも70%同一、少なくとも80%同一、少なくとも90%同一、又は少なくとも95%同一であれば、「高度に保存されている」と言う。一部の実施形態では、2つ以上の配列は、それらが互いに約70%同一、約80%同一、約90%同一、約95%同一、約98%同一、又は約99%同一であれば、「高度に保存されている」と言う。一部の実施形態では、2つ以上の配列は、それらが互いに少なくとも30%同一、少なくとも40%同一、少なくとも50%同一、少なくとも60%同一、少なくとも70%同一、少なくとも80%同一、少なくとも90%同一、又は少なくとも95%同一であれば、「保存されている」と言う。一部の実施形態では、2つ以上の配列は、それらが互いに約30%同一、約40%同一、約50%同一、約60%同一、約70%同一、約80%同一、約90%同一、約95%同一、約98%同一、又は約99%同一であれば、「保存されている」と言う。配列の保存は、ポリヌクレオチド又はポリペプチドの全長に適用してもよいし、又はその一部、領域若しくは特徴に適用することもできる。

40

【0976】

制御放出：本明細書で使用されるとき、用語「制御放出」は、治療成果をもたらすように特定のパターンの放出に適合する医薬組成物又は化合物放出を指す。

環式又は環状化：本明細書で使用されるとき、用語「環状」は、連続的ループの存在を

50

指す。環状分子は、環状でなくてもよく、連結されて、サブユニットの非開裂鎖を有するだけでよい。本発明の操作RNA又はmRNAなどの環状分子は、単一ユニット若しくは多量体であってもよいし、又は複合体又はさらに高次構造の1つ又は複数の成分を含んでもよい。

【0977】

細胞増殖抑制：本明細書で使用されるとき、「細胞増殖抑制」は、細胞（例えば、哺乳動物細胞（例えば、ヒト細胞））、細菌、ウイルス、真菌、原生動物、寄生体、プリオン、又はこれらの組み合わせの成長、分裂、若しくは増殖を阻害、低減、抑制することを指す。

【0978】

細胞傷害性：本明細書で使用されるとき、「細胞傷害性」は、細胞（例えば、哺乳動物細胞（例えば、ヒト細胞））、細菌、ウイルス、真菌、原生動物、寄生体、プリオン、又はこれらの組み合わせを殺傷するか、又はこれらに傷害性、毒性、又は致命的な作用を引き起こすことを指す。

【0979】

送達：本明細書で使用されるとき、「送達」は、化合物、物質、実体、部分、カーゴ若しくはペイロードを送達する作用又は方法を指す。

送達剤：本明細書で使用されるとき、「送達剤」は、標的細胞に対するキメラポリヌクレオチドの *in vivo* 送達を少なくとも部分的に促進する任意の物質を指す。

【0980】

不安定化された：本明細書で使用されるとき、「不安定な」、「不安定化する」、又は「不安定化領域」は、同じ領域又は分子の出発、野生型若しくはネイティブ形態よりも不安定な領域又は分子を意味する。

【0981】

検出可能な標識：本明細書で使用されるとき、「検出可能な標識」は、X線撮影、蛍光、化学発光、酵素活性、吸光度などを含む当技術分野で公知の方法により容易に検出される別の実体と結合した、それに組み込まれた、若しくはそれと会合した、1つ又は複数のマーカ、シグナル、又は部分を指す。検出可能な標識としては、放射性同位体、発蛍光団、発色団、酵素、色素、金属イオン、リガンド、例えば、ビオチン、アビジン、ストレプトアビジン及びハプテン、量子ドットなどが挙げられる。検出可能な標識は、本明細書に開示するペプチド又はタンパク質中の任意の位置に配置してよい。これらは、アミノ酸、ペプチド、若しくはタンパク質内であってもよいし、又はN-若しくはC末端に位置してもよい。

【0982】

ジアステレオマー：本明細書で使用されるとき、用語「ジアステレオマー」は、互いの鏡像ではなく、且つ、互いに重ね合わせることができない立体異性体を意味する。

消化する：本明細書で使用されるとき、用語「消化する」は、より小さい断片又は成分に分解することを意味する。ポリペプチド又はタンパク質に関する場合、消化によって、ペプチドの産生が起こる。

【0983】

分化細胞：本明細書で使用されるとき、用語「分化細胞」は、そのネイティブ形態では多能性ではない任意の体細胞を指す。分化細胞はまた、部分的に分化した細胞も包含する。

【0984】

分化：本明細書で使用されるとき、用語「分化因子」は、所望の細胞型に分化するように、細胞を誘導することができるタンパク質、RNA又は小分子などの発生能改変因子を指す。

【0985】

分化する：本明細書で使用されるとき、用語「分化する」は、非拘束又は低拘束細胞が、拘束細胞の特徴を獲得するプロセスを指す。

10

20

30

40

50

遠位：本明細書で使用されるとき、用語「遠位」は、中心から離れて、又は目的の地点若しくは領域から離れて位置することを意味する。

【0986】

投与レジメン：本明細書で使用されるとき、用語「投与レジメン」は、治療、予防、若しくは緩和医療の投与スケジュール又は医師が決定したレジメンである。

用量分割係数(DSF) - 1日総用量又は1単位用量のPUDで割った用量分割治療のPUDの比。この値は、投与レジメン群の比較から得られる。

【0987】

鏡像体：本明細書で使用されるとき、用語「鏡像体」は各々、少なくとも80%（すなわち、一方の鏡像体の少なくとも90%と他方の鏡像体の最大10%）、好ましくは少なくとも90%、さらに好ましくは少なくとも98%の光学純度又は鏡像体過剰率（当技術分野で標準的方法により決定される通り）を有する本発明の化合物の個別の光学活性形態を意味する。

10

【0988】

封入する：本明細書で使用されるとき、用語「封入する」は、包み込む、取り囲む、又は包むことを意味する。

コードされたタンパク質切断シグナル：本明細書で使用されるとき、「コードされたタンパク質切断シグナル」は、タンパク質切断シグナルをコードするヌクレオチド配列を指す。

【0989】

操作された：本明細書で使用されるとき、本発明の実施形態は、それらが、出発点、野生型若しくはネイティブ分子から変化した特徴又は特性（構造的若しくは化学的にかかわらず）を有するように設計されているとき、「操作されている」。

20

【0990】

有効量：本明細書で使用されるとき、ある薬剤の「有効量」という用語は、有益又は所望の結果、例えば、臨床結果をもたらすのに十分な量であり、従って、「有効量」は、適用される状況に応じて変動する。例えば、癌を治療する薬剤を投与する状況において、薬剤の有効量は、例えば、その薬剤を投与せずに得られた応答と比較して、癌の治療（本明細書で定義する通り）を達成する上で十分な量である。

【0991】

エキソソーム：本明細書で使用されるとき、「エキソソーム」は、哺乳動物細胞により分泌される小胞又はRNA分解に關与する複合体である。

30

発現：本明細書で使用されるとき、核酸配列の「発現」は、下記のイベントの1つ又は複数を指す：(1) DNA配列からのRNA鋳型の生成（例えば、転写による）；(2) RNA転写物のプロセッシング（例えば、スプライシング、編集、5'キャップ形成、及び/又は3'末端プロセッシングによる）；(3) ポリペプチド又はタンパク質へのRNAの翻訳；並びに(4) ポリペプチド又はタンパク質の翻訳後修飾。

【0992】

特徴：本明細書で使用されるとき、「特徴」は、特徴、特性、又は特有の要素を指す。

製剤：本明細書で使用されるとき、「製剤」は、少なくともキメラポリヌクレオチド及び送達剤を含む。

40

【0993】

断片：本明細書で使用されるとき、「断片」は、一部分を指す。例えば、タンパク質の断片は、培養細胞から単離した完全長タンパク質を消化することによって得られるポリペプチドを含み得る。

【0994】

機能性：本明細書で使用されるとき、「機能性」生体分子は、それが特徴とする特性及び/又は活性を呈示する形態の生体分子である。

相同性：本明細書で使用されるとき、「相同性」は、ポリマー分子同士、例えば、核酸分子（例えば、DNA分子及び/若しくはRNA分子）同士並びに/又はポリペプチド分

50

子同士の全体的関連性を指す。一部の実施形態では、ポリマー分子は、それらの配列が、少なくとも25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、若しくは99%同一であるか、又は類似していれば、互いに「相同的」であるとみなされる。用語「相同的」は、必然的に、少なくとも2つの配列（ポリヌクレオチド又はポリペプチド配列）同士の比較を指す。本発明によれば、2つのポリヌクレオチド配列は、それらがコードするポリペプチドが、少なくとも約20アミノ酸の少なくとも1つの区間にわたって、少なくとも約50%、60%、70%、80%、90%、95%、又は99%であれば、相同的であるとみなされる。一部の実施形態では、相同的ポリヌクレオチド配列は、少なくとも4～5個の独自に指定したアミノ酸の区間をコードする能力を特徴とする。60ヌクレオチド長未満のポリヌクレオチド配列の場合、相同性は、少なくとも4～5個の独自に指定したアミノ酸の区間をコードする能力によって決定される。本発明によれば、2つのタンパク質配列は、タンパク質が、少なくとも約20アミノ酸の少なくとも1つの区間にわたって、少なくとも約50%、60%、70%、80%、又は90%同一であれば、相同的であるとみなされる。

10

【0995】

同一性：本明細書で使用されるとき、用語「同一性」は、ポリマー分子同士、例えば、ポリヌクレオチド分子（例えば、DNA分子及び/若しくはRNA分子）同士並びに/又はポリペプチド分子同士の全体的関連性を指す。2つのポリヌクレオチド配列の同一性（%）の計算は、例えば、最適な比較の目的のために2つの配列をアラインメントすることによって実施することができる（例えば、最適アラインメントのために、第1及び第2核酸配列の一方若しくは両方にギャップを導入することができ、非同一配列は、比較目的のために無視することができる）。いくつかの実施形態では、比較目的のためにアラインメントした配列の長さは、基準配列の長さの少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は100%である。次に、対応するヌクレオチド位置のヌクレオチドを比較する。第1配列のある位置が、第2配列における対応する位置と同じヌクレオチドによって占められているとき、これらの分子はその位置で同一である。2つの配列同士の同一性（%）は、2つの配列の最適アラインメントのために導入する必要があるギャップの数、及び各ギャップの長さを考慮に入れて、配列が共通に有する同じ位置の数の関数である。配列の比較及び2つの配列同士の同一性（%）の決定は、数学的アルゴリズムを用いて達成することができる。例えば、ヌクレオチド配列同士の同一性（%）は、以下の文献に記載されているものなどの方法を用いて決定することができる：「分子計算生物学（Computational Molecular Biology）」、レスク、A.M.（Lesk, A.M.）編、オックスフォード・ユニバーシティ・プレス（Oxford University Press）、ニューヨーク州、1988年；「バイオコンピューティング：インフォーマティクス及びゲノムプロジェクト（Biocomputing: Informatics and Genome Projects）」、スミス、D.W.（Smith, D.W.）編、アカデミック・プレス（Academic Press）、ニューヨーク州、1993年；「分子生物学における配列解析（Sequence Analysis in Molecular Biology）」、フォン・ハイネ、G.（von Heinje, G.）著、アカデミック・プレス（Academic Press）、1987年；「配列データのコンピュータ解析（Computer Analysis of Sequence Data）」、第1部、グリフィン、A.M.（Griffin, A.M.）及びグリフィン、H.G.（Griffin, H.G.）編、ヒューマナ・プレス（Humana Press）、ニュージャージー州、1994年；並びに「配列解析プライマー（Sequence Analysis Primer）」、グリブスコフ、M.（Gribnikov, M.）及びデベロー、J.（Devereux, J.）編、M.ストックトン・プレス（M. Stockton Press）、ニューヨーク州、1991年；これらの各々は、全体として参照により本

20

30

40

50

明細書に組み込むものとする。例えば、2つのヌクレオチド配列同士の同一性(%)は、PAM120重み付け残基表、ギャップ長さペナルティ12及びギャップペナルティ4を用い、アライン(ALIGN)プログラム(バージョン2.0)に組み込まれているメイヤーズ(Meyers)及びミラー(Miller)のアルゴリズム(カビオス(CABIOS)、1989年、第4巻:p.11~17)を使用して決定することができる。あるいは、2つのヌクレオチド配列同士の同一性(%)は、NWSgapdna.CMPマトリックスを用いて、GCGソフトウェアパッケージ内のGAPプログラムを用いて、決定することもできる。配列同士の同一性(%)を決定するために一般的に使用されている方法として、限定はしないが、カリロ、H(Carillo、H)及びリップマン、D.(Lipman、D.)著、SIAM応用数学会誌(SIAM J Applied Math.48)、第1073巻、1988年(これは、全体として参照により本明細書に組み込む)に記載の方法がある。同一性を決定する技術は、一般に入手可能なコンピュータプログラムに体系化されている。2つの配列同士の相同性を決定する例示的コンピュータソフトウェアとして、限定はしないが、GCGプログラムパッケージ、デベロー、J.(Devereux、J.)ら著、核酸研究(Nucleic Acids Research)、第12巻(1)、p.387、1984年)、BLASTP、BLASTN、及びFASTA、アルトシエル、S.F.(Altschul、S.F.)ら著、分子生物学会誌(J.Molec.Biol.)、第215巻、p.403、1990年)が挙げられる。

10

【0996】

20

免疫グロビン：本明細書で使用されるとき、用語「免疫グロビン」(Ig)は、「抗体」と置き換え可能に使用することができる。

感染因子：本明細書で使用されるとき、用語「感染因子」は、感染症を引き起こすことができる因子を意味する。

【0997】

遺伝子の発現を阻止する：本明細書で使用されるとき、語句「遺伝子の発現を阻止する」は、遺伝子の発現産物の量の減少を引き起こすことを意味する。発現産物は、遺伝子から転写されたRNA(例えば、mRNA)又は遺伝子から転写されたmRNAから翻訳されたポリペプチドであってよい。典型的に、mRNAのレベルの減少によって、そこから翻訳されるポリペプチドのレベルの減少が起こる。発現のレベルは、mRNA又はタンパク質を測定する標準的技術を用いて決定することができる。

30

【0998】

感染因子：本明細書で使用されるとき、「感染因子」は、いずれかの微生物、ウイルス、感染物質、若しくは生物工学の結果として操作され得るバイオ製品、又はこうした微生物、ウイルス、感染物質、若しくはバイオ製品のいずれかの天然に存在する若しくは生物工学で作製された成分を指し、これらは、ヒト、動物、植物若しくは別の生物において、新興感染症及び接触伝染病、死亡若しくは他の生物学的機能不全を引き起こし得る。

【0999】

インフルエンザ：本明細書で使用されるとき、「インフルエンザ」又は「フルー(インフルエンザ)」は、インフルエンザウイルスである、オルトミクソウイルス科(Orthomyxoviridae)のRNAウイルスを原因とする鳥類及び哺乳動物の感染症である。

40

【1000】

異性体：本明細書で使用されるとき、用語「異性体」は、本発明の任意の化合物の任意の互変異性体、立体異性体、鏡像体、又はジアステレオマーを意味する。本発明の化合物は、1つ又は複数のキラル中心及び/又は二重結合を有し得るため、二重結合異性体(すなわち、幾何E/Z異性体)又はジアステレオマー(例えば、鏡像体(すなわち、(+))若しくは(-))又はシス/トランス異性体)として存在し得ることが認識される。本発明によれば、本明細書で描かれる化学構造、従って、本発明の化合物は、対応する立体異性体の全て、すなわち、立体異性体的に純粋な(例えば、幾何学的に純粋、鏡像体的に純

50

粹、又はジアステレオマー的に純粋な)形態並びに鏡像体及び立体異性体混合物、例えば、ラセミ体の両方を包含する。本発明の化合物の鏡像体及び立体異性体の混合物は、典型的に、公知の方法、例えば、キラル相ガスクロマトグラフィー、キラル相高性能液体クロマトグラフィー、キラル塩錯体として化合物を結晶化する方法、又はキラル溶媒中で化合物を結晶化する方法により、それらの成分鏡像体又は立体異性体に分割することができる。鏡像体及び立体異性体はまた、公知の非対称合成方法により、立体異性体的に又は鏡像体的に純粋な中間体、試薬、及び触媒から取得することもできる。

【1001】

in vitro : 本明細書で使用されるとき、用語「*in vitro*」は、生物(例えば、動物、植物、若しくは微生物)ではなく、人工環境、例えば、試験管若しくは反応槽内、細胞培養下、ペトリ皿内などで起こるイベントを指す。

10

【1002】

in vivo : 本明細書で使用されるとき、用語「*in vivo*」は、生物(例えば、動物、植物、若しくは微生物)において起こるイベントを指す。

単離された : 本明細書で使用されるとき、用語「単離された」は、(天然であれ、又は実験状況であれ)それが結合していた構成成分の少なくとも一部から分離されている物質又は実体を指す。単離された物質は、それらが結合していた物質に対して変化したレベルの純度を有し得る。単離された物質及び/又は実体は、それらが当初結合していた他の構成成分の少なくとも約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、又はそれ以上から分離されていてもよい。一部の実施形態では、単離された薬剤は、約80%超、約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、又は約99%超純粋である。本明細書で使用されるとき、物質は、それが実質的に他の構成成分を含まない場合、「純粋」である。

20

【1003】

実質的に単離された : 本明細書で使用されるとき、用語「実質的に単離された」は、それが形成又は検出された環境から実質的に分離されていることを意味する。部分的分離は、例えば、本開示の化合物が濃縮された組成物を含む。実質的分離は、本開示の化合物、又はその塩の重量当たり少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約97%、又は少なくとも約99%を含有する組成物を含み得る。組成物及びその塩を単離する方法は当技術分野で常用的である。

30

【1004】

リンカー : 本明細書で使用されるとき、リンカーは、原子、例えば、10~1,000原子の1団を指し、限定はしないが、炭素、アミノ、アルキルアミノ、酸素、イオウ、スルホキシド、スルホニル、カルボニル、及びイミンなどの原子又は原子団を含み得る。リンカーは、第1端で、核酸塩基又は糖部分上の修飾ヌクレオシド若しくはヌクレオチドに結合させると共に、第2端で、ペイロード、例えば、検出可能な薬剤又は治療薬に結合させることができる。リンカーは、核酸配列への組み込みを妨害しないように、十分な長さのものであってよい。リンカーは、例えばキメラポリヌクレオチド多量体(例えば、2つ以上のキメラポリヌクレオチド分子の連結を介して)又はキメラポリヌクレオチドコンジュゲートを形成するため、並びに本明細書に記載する通りのペイロードを投与するためなどの、あらゆる有用な目的のために使用することができる。リンカーに組み込むことができる化学基の例として、限定はしないが、アルキル、アルケニル、アルキニル、アミド、アミノ、エーテル、チオエーテル、エステル、アルキレン、ヘテロアルキレン、アリール、又はヘテロシクリルが挙げられ、これらの各々は、本明細書に記載する通り、任意選択で置換することができる。リンカーの例として、限定はしないが、不飽和アルカン、ポリエチレングリコール(例えば、エチレン又はプロピレングリコールモノマー単位、例えば、ジエチレングリコール、ジプロピレングリコール、トリエチレングリコール、トリプロピレングリコール、テトラエチレングリコール、又はテトラエチレングリコール)、及び

40

50

デキストランポリマー及びこれらの誘導体が挙げられる。その他の例として、限定はしないが、リンカー内で切断可能な部分、例えば、還元剤又は光分解を用いて切断することができるジスルフィド結合(-S-S-)又はアゾ結合(-N=N-)が挙げられる。選択的に切断可能な結合の非制限的例として、例えば、トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン(TCEP)、若しくはその他の還元剤、及び/又は光分解の使用により切断することができるアミド結合、並びに例えば、酸性若しくは塩基性加水分解により切断することができるエステル結合が挙げられる。

【1005】

マイクロRNA(miRNA)結合部位：本明細書で使用されるとき、マイクロRNA(miRNA)結合部位は、miRNAの少なくとも「シード」領域が結合する核酸転写物のヌクレオチド位置又は領域を表す。

10

【1006】

修飾された：本明細書で使用されるとき「修飾された」は、本発明の分子の変化した状態又は構造を指す。分子は、化学的、構造的、及び機的方法を含め、様々な方法で修飾され得る。一実施形態では、本発明のmRNA分子は、例えば、それが天然のリボヌクレオチドA、U、G、及びCに関連するとき、非天然のヌクレオチド及び/又はヌクレオチドの導入により修飾される。キャップ構造などの非標準のヌクレオチドは、A、C、G、Uリボヌクレオチドの化学構造とは異なるものの、「修飾された」ものとはみなされない。

【1007】

モノクローナル抗体：本明細書で使用されるとき、用語「モノクローナル抗体」は、実質的に均質な抗体の集団から得られる抗体を指す。すなわち、集団を構成する個々の抗体は、自然に起こり得る突然変異及び/又は翻訳後修飾(例えば、異性体化、アミド化)(わずかな量で存在し得る)を除いて、同一である。モノクローナル抗体は、単一の抗原部位に対して指令され、高度に特異的である。

20

【1008】

粘液：本明細書で使用されるとき、「粘液」は、粘性であり、且つムチン糖タンパク質を含む天然の物質を指す。

天然に存在する：本明細書で使用されるとき、「天然に存在する」は、人工的な補助なしに自然中に存在することを意味する。

30

【1009】

中和抗体：本明細書で使用されるとき、「中和抗体」は、その抗原に結合して、抗原若しくは感染因子が有するいずれかの生体活性を中和又は無効化することによって、抗原若しくは感染因子から細胞を防御する抗体を指す。

【1010】

非ヒト脊椎動物：本明細書に記載されるとき、「非ヒト脊椎動物」には、野生種及び家畜化された種を含め、ヒト(Homo sapiens)を除くあらゆる脊椎動物が含まれる。非ヒト脊椎動物の例として、限定はしないが、哺乳類、例えば、アルパカ、バンテン、バイソン、ラクダ、ネコ、畜牛、シカ、イヌ、ロバ、ガヤル、ヤギ、モルモット、ウマ、ラマ、ラバ、ブタ、ウサギ、トナカイ、ヒツジ、水牛、及びヤクが挙げられる。

40

【1011】

オフターゲット：本明細書で使用されるとき、「オフターゲット」は、いずれか1つ又は複数の標的、遺伝子、又は細胞転写物に対する何らかの意図しない効果を指す。

オープンリーディングフレーム：本明細書で使用されるとき、「オープンリーディングフレーム」又は「ORF」は、所与のリーディングフレームに終止コドンを含まない配列を指す。

【1012】

作動可能に連結された：本明細書で使用されるとき、語句「作動可能に連結された」は、2つ以上の分子、構築物、転写物、実体、部分などの間の機能性連結を指す。

任意選択で置換された：本明細書において、「任意選択で置換されたX」(例えば、任

50

意選択で置換されたアルキル)という形態の語句は、「X(ここで、Xは任意選択で置換される)」（例えば、「アルキル(ここで、アルキルは、任意選択で置換される)）」と同等であるものとする。特徴「X」（例えば、アルキル)自体が任意選択であることを意味するわけではない。

【1013】

ペプチド：本明細書で使用されるとき、「ペプチド」は、50アミノ酸長以下、例えば、約5、10、15、20、25、30、35、40、45、又は50アミノ酸長である。

【1014】

パラトープ：本明細書で使用されるとき、「パラトープ」は、抗体の抗原結合部位を指す。

患者：本明細書で使用されるとき、「患者」は、治療を求める若しくは必要とし得る、治療を必要とする、治療を受けている、治療を受けようとする対象、又は特定の疾患又は条件について専門家によるケアを受けている対象を指す。

【1015】

薬学的に許容される：語句「薬学的に許容される」は、本明細書において、信頼できる医学的判断の範囲内で、過剰な毒性、刺激作用、アレルギー反応、又は他の問題若しくは合併症を起こすことなく、妥当なベネフィット/リスク比に相応する、ヒト及び動物の組織との接触での使用に好適な化合物、材料、組成物、及び/又は剤形を指して用いられる。

【1016】

薬学的に許容される賦形剤：語句「薬学的に許容される賦形剤」は、本明細書で使用されるとき、本明細書に記載する化合物以外の任意の成分（例えば、活性化化合物を懸濁又は溶解可能なビヒクル）であって、患者において実質的に非毒性且つ非炎症性の特性を有する任意の成分を指す。賦形剤としては、例えば、以下のものが挙げられる：抗接着剤、抗酸化剤、結合剤、コーティング剤、圧縮助剤、崩壊剤、色素（着色剤）、皮膚軟化剤、乳化剤、充填剤（希釈剤）、塗膜形成剤又はコーティング剤、香味料、芳香剤、滑剤（流動促進剤）、潤滑剤、防腐剤、印刷インク、吸着剤、懸濁剤又は分散剤、甘味料、及び水和水。例示的な賦形剤として、限定はしないが、以下のものが挙げられる：ブチル化ヒドロキシトルエン（BHT）、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム（二塩基性）、ステアリン酸カルシウム、クロスカルメロース、架橋ポリビニルピロリドン、クエン酸、クロスボビドン、システイン、エチルセルロース、ゼラチン、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ラクトース、ステアリン酸マグネシウム、マルチトール、マンニトール、メチオニン、メチルセルロース、メチルパラベン、微結晶性セルロース、ポリエチレングリコール、ポリビニルピロリドン、ポビドン、アルファ化デンプン、プロピルパラベン、パルミチン酸レチニル、シェラック、二酸化ケイ素、カルボキシメチルセルロースナトリウム、クエン酸ナトリウム、デンプングリコール酸ナトリウム、ソルビトール、デンプン（トウモロコシ）、ステアリン酸、スクロース、タルク、二酸化チタン、ビタミンA、ビタミンE、ビタミンC、及びキシリトール。

【1017】

薬学的に許容される塩：本開示はまた、本明細書に記載される化合物の薬学的に許容される塩も含む。本明細書で使用されるとき、「薬学的に許容される塩」は、開示する化合物の誘導体を指し、ここで、親化合物は、既存の酸部分又は塩基部分をその塩形態に（例えば、遊離塩基を好適な有機酸と反応させて）変換することによって修飾されている。薬学的に許容される塩の例としては、限定はしないが、アミンなどの塩基性残基の無機塩又は有機酸塩；カルボン酸などの酸性残基のアルカリ塩又は有機塩などが挙げられる。代表的な酸付加塩としては、酢酸塩、酢酸、アジピン酸塩、アルギン酸塩、アスコルビン酸塩、アスパラギン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸、安息香酸塩、重硫酸塩、ホウ酸塩、酪酸塩、ショウノウ酸塩、カンファースルホン酸塩、クエン酸塩、シクロペンタンプロピオン酸塩、ジグルコン酸塩、ドデシル硫酸塩、エタンズルホン酸塩、フ

10

20

30

40

50

マル酸塩、グルコヘプトン酸塩、グリセロリン酸塩、ヘミ硫酸塩、ヘプトン酸塩、ヘキサン酸塩、臭化水素酸塩、塩酸塩、ヨウ化水素酸塩、2-ヒドロキシ-エタンスルホン酸塩、ラクチオン酸塩、乳酸塩、ラウリン酸塩、ラウリル硫酸塩、リンゴ酸塩、マレイン酸塩、マロン酸塩、メタンスルホン酸塩、2-ナフタレンスルホン酸塩、ニコチン酸塩、硝酸塩、オレイン酸塩、シュウ酸塩、パルミチン酸塩、パモ酸塩、ペクチン酸塩、過硫酸塩、3-フェニルプロピオン酸塩、リン酸塩、ピクリン酸塩、ピバル酸塩、プロピオン酸塩、ステアリン酸塩、コハク酸塩、硫酸塩、酒石酸塩、チオシアン酸塩、トルエンスルホン酸塩、ウンデカン酸塩、吉草酸塩などが挙げられる。代表的なアルカリ塩又はアルカリ土類金属塩としては、ナトリウム、リチウム、カリウム、カルシウム、マグネシウムなど、並びに非毒性アンモニウム、第4級アンモニウム、及びアミンカチオン、例えば、限定はしないが、アンモニウム、テトラメチルアンモニウム、テトラエチルアンモニウム、メチルアミン、ジメチルアミン、トリメチルアミン、トリエチルアミン、エチルアミンなどが挙げられる。本開示の薬学的に許容される塩としては、例えば、非毒性の無機酸又は有機酸から形成される親化合物の従来非毒性塩がある。本開示の薬学的に許容可能な塩は、塩基部分又は酸部分を含む親化合物から従来化学的方法によって合成することができる。概して、こうした塩は、これらの化合物の遊離酸又は塩基形態と、水中若しくは有機溶媒中、又は両者の混合物中の適切な塩基若しくは酸の化学量論量とを反応させることによって調製することができ；一般に、非水性媒体、例えば、エーテル、酢酸エチル、エタノール、イソプロパノール、又はアセトニトリルが好ましい。好適な塩のリストは、「レミントン製薬科学 (Remington's Pharmaceutical Sciences)」、第17版、マック・パブリッシング・カンパニー (Mack Publishing Company)、ペンシルベニア州イーストン、1985年、p. 1418、「製薬用塩：特性、選択、及び使用」、P. H. シュタール (P. H. Stahl) 及び C. G. ウェルムート (C. G. Wermuth) (編)、ワイリー-VCH (Wiley-VCH)、2008年、及びベルゲ (Berger) 著、薬剤学会誌 (Journal of Pharmaceutical Science)、第66巻、p. 1~19、1977年に見出され、これらの各々は、全体として参照により本明細書に組み込むものとする。

10

20

【1018】

薬学的に許容される溶媒和物：用語「薬学的に許容される溶媒和物」は、本明細書で使用されるとき、好適な溶媒の分子が結晶格子に取り込まれている本発明の化合物を意味する。好適な溶媒は、投与される用量で生理学的に許容可能である。例えば、溶媒和物は、有機溶媒、水、又はその混合物を含む溶液から結晶化、再結晶化、又は沈殿により調製され得る。好適な溶媒の例は、エタノール、水（例えば、一水和物、二水和物、及び三水和物）、N-メチルピロリジノン (NMP)、ジメチルスルホキシド (DMSO)、N, N'-ジメチルホルムアミド (DMF)、N, N'-ジメチルアセトアミド (DMAC)、1, 3-ジメチル-2-イミダゾリジノン (DMEU)、1, 3-ジメチル-3, 4, 5, 6-テトラヒドロ-2-(1H)-ピリミジノン (DMPU)、アセトニトリル (ACN)、プロピレングリコール、酢酸エチル、ベンジルアルコール、2-ピロリドン、安息香酸ベンジルなどである。水が溶媒である場合、溶媒和物は「水和物」と称される。

30

40

【1019】

薬物動態：本明細書で使用されるとき、「薬物動態」は、それが、生存生物に投与される物質の運命の決定に関する場合、分子又は化合物のいずれか1つ又は複数の特性を指す。薬物動態は、吸収、分布、代謝及び排出の程度及び速度を含む、いくつかの分野に分けられる。これは、一般にADMEと呼ばれ、ここで、(A)吸収 (Absorption) は、血液循環に侵入する物質のプロセスであり；(D)分布 (Distribution) は、体液及び身体組織全体にわたる物質の分散又は播種であり；(M)代謝 (Metabolism) (若しくは生体内変化) は、親化合物から娘代謝物への不可逆的变化であり；並びに(E)排出 (若しくは排除) は、身体からの物質の排除を指す。稀に、一部の薬物は、身体組織内に不可逆的に蓄積する場合がある。

50

【1020】

物理化学的：本明細書で使用されるとき、「物理化学的」は、物理的及び／又は化学的特性、又はそれに関するものを意味する。

単位薬物当たりのポリペプチド（PUD）：本明細書で使用されるとき、PUD又は単位薬物当たりの産物は、体液若しくは組織中で測定される産物（例えば、ポリペプチド）の総1日量（通常、1mg、pg、kgなど）の細分された部分として定義され、通常、体液中の測定基準で割った濃度、例えば、pモル/mL、mモル/mLなどで決定される。

【1021】

予防する：本明細書で使用されるとき、用語「予防する」は、感染、疾患、障害及び／若しくは病状の発症を部分的又は完全に遅延させること；特定の感染、疾患、障害、及び／若しくは病状の1つ又は複数の症状、特徴、若しくは臨床徴候の発症を部分的又は完全に遅延させること；特定の感染、疾患、障害、及び／若しくは病状の1つ又は複数の症状、特徴、若しくは徴候の発症を部分的又は完全に遅延させること；特定の疾患、障害及び／若しくは病状からの進行を部分的又は完全に遅延させること；並びに／又は感染、疾患、障害、及び／若しくは病状に関連する疾病が発生するリスクを低下させることを指す。

10

【1022】

プロドラッグ：本開示はまた、本明細書に記載する化合物のプロドラッグも含む。本明細書で使用されるとき、「プロドラッグ」は、物質、分子又は実体が、化学的若しくは物理的改変時に治療薬として作用することを示す形態である任意の物質、分子又は実体を指す。プロドラッグは、何らの方法で共有結合又は隔離してもよく、これは、哺乳動物対象への投与前、投与时若しくは投与後に放出されるか、又は活性薬物部分に変換される。プロドラッグは、親化合物に対して、常用の操作又はin vivoで、修飾が切断されるように、化合物中に存在する官能基を修飾することによって調製することができる。プロドラッグは、ヒドロキシル、アミノ、スルフヒドリル、又はカルボキシル基が、任意の基に結合し、これが、哺乳動物対象に投与されると、切断して、それぞれ、遊離ヒドロキシル、アミノ、スルフヒドリル、又はカルボキシル基を形成する化合物を含む。プロドラッグの調製及び使用は、T.ヒグチ（T. Higuchi）及びV.ステラ（V. Stella）著、「新規送達系としてのプロドラッグ（Pro-drugs as Novel Delivery Systems）」、第14巻、A.C.S.シンポジウムシリーズ（A.C.S. Symposium Series）、及び「薬物設計における生物可逆性担体（Bioreversible Carriers in Drug Design）」エドワードB.ロッシュ（Edward B. Roche）編、米国製剤協会及びパーガモン・プレス（American Pharmaceutical Association and Pergamon Press）、1987年に論述されており、これらはいずれも、全体として参照により本明細書に組み込むものとする。

20

30

【1023】

増殖する：本明細書で使用されるとき、用語「増殖する」は、成長、拡張若しくは増加する、又は急速に成長、拡張若しくは増加することを意味する。「増殖性」は、増殖する能力を有することを意味する。「抗増殖性」は、増殖特性に対抗するか、又はそれに不適切な特性を有することを意味する。

40

【1024】

前駆細胞：本明細書で使用されるとき、用語「前駆細胞」は、それが分化によってもたらし得る細胞に関して、より大きな発生能を有する細胞を指す。

予防的：本明細書で使用されるとき、「予防的」は、疾患の広がりを予防するために使用される治療又は処置の過程を指す。

【1025】

予防：本明細書で使用されるとき、「予防」は、健康を維持し、疾患の広がりを予防するために取られる措置を指す。「免疫予防」は、疾患の広がりを予防するために能動又は受動免疫を生成させる処置を指す。

50

【1026】

タンパク質切断部位：本明細書で使用されるとき、「タンパク質切断部位」は、アミノ酸鎖の制御された切断が、化学的、酵素的、又は光化学的手段によって達成され得る部位を指す。

【1027】

タンパク質切断シグナル：本明細書で使用されるとき、「タンパク質切断シグナル」は、切断のためのポリペプチドを示す又はマークする少なくとも1つのアミノ酸を指す。

目的のタンパク質：本明細書で使用されるとき、「目的のタンパク質」又は「所望のタンパク質」には、本明細書に提供されるもの並びにその断片、突然変異体、変異体、及び改変物が含まれる。

10

【1028】

近位：本明細書で使用されるとき、用語「近位」は、中心又は目的の地点若しくは領域に対し、より近傍に位置することを意味する。

プソイドウリジン：本明細書で使用されるとき、プソイドウリジンは、ヌクレオシドウリジンのC-グリコシド異性体を指す。「プソイドウリジン類似体」は、プソイドウリジンの任意の修飾物、変異体、アイソフォーム又は誘導体である。例えば、プソイドウリジン類似体として、限定はしないが、以下のものが挙げられる：1-カルボキシメチル-プソイドウリジン、1-プロピル-プソイドウリジン、1-タウリノメチル-プソイドウリジン、1-タウリノメチル-4-チオ-プソイドウリジン、1-メチルプソイドウリジン (m^1)、1-メチル-4-チオ-プソイドウリジン ($m^1 s^4$)、4-チオ-1-メチル-プソイドウリジン、3-メチル-プソイドウリジン (m^3)、2-チオ-1-メチル-プソイドウリジン、1-メチル-1-デアザ-プソイドウリジン、2-チオ-1-メチル-1-デアザ-プソイドウリジン、ジヒドロプソイドウリジン、2-チオ-ジヒドロプソイドウリジン、2-メトキシウリジン、2-メトキシ-4-チオ-ウリジン、4-メトキシ-プソイドウリジン、4-メトキシ-2-チオ-プソイドウリジン、N1-メチル-プソイドウリジン、1-メチル-3-(3-アミノ-3-カルボキシプロピル)プソイドウリジン (acp^3)、及び2'-O-メチル-プソイドウリジン (m)。

20

【1029】

精製された：本明細書で使用されるとき、「精製する」、「精製された」、「精製」は、不要な成分、材料不純物、混合物若しくは不完全物から実質的に純粋に、又は清浄にすることを意味する。

30

【1030】

反復トランスフェクション：本明細書で使用されるとき、用語「反復トランスフェクション」は、キメラポリヌクレオチドによる同じ細胞培養物の複数回のトランスフェクションを指す。細胞培養物は、少なくとも2回、少なくとも3回、少なくとも4回、少なくとも5回、少なくとも6回、少なくとも7回、少なくとも8回、少なくとも9回、少なくとも10回、少なくとも11回、少なくとも12回、少なくとも13回、少なくとも14回、少なくとも15回、少なくとも16回、少なくとも17回、少なくとも18回、少なくとも19回、少なくとも20回、少なくとも25回、少なくとも30回、少なくとも35回、少なくとも40回、少なくとも45回、少なくとも50回以上トランスフェクトすることができる。

40

【1031】

サンプル：本明細書で使用されるとき、用語「サンプル」又は「生体サンプル」は、その組織、細胞又は構成部分（例えば、限定はしないが、血液、粘液、リンパ液、滑液、脳脊髄液、唾液、羊水、羊膜臍帯血、尿、腔液及び精液を含む体液）のサブセットを指す。サンプルには、全生物、又はその組織、細胞若しくは構成部分のサブセット、あるいは、その画分若しくは部分、限定はしないが、例えば、血漿、血清、髄液、リンパ液、皮膚の外側切片、気道、腸管、及び尿生殖路、涙液、唾液、乳汁、血球、腫瘍、臓器から調製されるホモジネート、ライセート又は抽出物がさらに含まれ得る。サンプルはさらに、タンパク質又は核酸分子などの細胞成分を含有し得る栄養ブイヨン又はゲルなどの媒体を指す

50

。

【1032】

シグナル配列：本明細書で使用されるとき、語句「シグナル配列」は、タンパク質の輸送又は局在化を指令することができる配列を指す。

1単位用量：本明細書で使用されるとき、「1単位用量」は、1用量/1回/1経路/1接触点、すなわち1回の投与イベントで投与される任意の治療薬の用量である。

【1033】

類似性：本明細書で使用されるとき、用語「類似性」は、ポリマー分子同士、例えば、核酸分子同士（例えばDNA分子及び/若しくはRNA分子間）並びに/又はポリペプチド分子同士の全体的な関連性を指す。ポリマー分子同士の類似性（%）の計算は、同一性（%）の計算と同様に実施することができるが、但し、類似性（%）の計算は、当技術分野において理解される通り、保存的置換を考慮する。

10

【1034】

分割用量：本明細書で使用されるとき、「分割用量」は、1単位用量又は1日総用量の2つ以上の用量への分割である。

安定した：本明細書で使用されるとき、「安定した」は、反応混合物から有用な純度までの単離に耐えるほど十分に頑健な化合物を指し、これは、有効な治療薬への製剤化が可能であることが好ましい。

【1035】

安定化された：本明細書で使用されるとき、「安定化する」、「安定化された」、「安定化領域」は、安定にする、又は安定になることを意味する。

20

立体異性体：本明細書で使用されるとき、用語「立体異性体」は、化合物（例えば、本明細書に記載する任意の式の化合物）が有し得る、考えられる全ての様々な異性体形態、並びに配座形態、特に、考えられる全ての立体化学及び配座異性体形態、基本的分子構造のあらゆるジアステレオマー、鏡像体及び/又は配座異性体を指す。本発明の一部の化合物は、様々な互変異性体で存在してもよく、その全てが、本発明の範囲に含まれる。

【1036】

対象：本明細書で使用されるとき、用語「対象」又は「患者」は、本発明の組成物が、例えば、実験、診断、予防、及び/又は治療目的で投与され得る任意の生物を指す。典型的な対象としては、動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、非ヒト霊長類などの哺乳動物）及び/又は植物が挙げられる。

30

【1037】

実質的に：本明細書で使用されるとき、用語「実質的に」は、目的の特徴又は特性の全て若しくはほぼ全ての範囲又は程度を示す定性的条件を指す。生物学分野の当業者は、生物学的及び化学的現象が完結する、及び/又は完全性に至る又は絶対的な結果を達成若しくは回避することは、あるにしても、稀であることを理解するであろう。従って、用語「実質的に」は、本明細書では、多くの生物学的及び化学的現象に特有の、完全性の欠如の可能性を捕捉するために使用される。

【1038】

実質的に等しい：用量間の時間差に関して本明細書で使用されるとき、この用語は、プラス/マイナス2%を意味する。

40

実質的に同時に：複数の用量に関して本明細書で使用されるとき、この用語は、2秒以内を意味する。

【1039】

～に罹患している：疾患、障害、及び/又は病状「に罹患している」個体は、疾患、障害、及び/又は病状を有すると診断されているか、又はその1つ又は複数の症状を呈示する。

【1040】

～に罹患しやすい：疾患、障害、及び/又は病状「に罹患しやすい」個体は、疾患、障害、及び/又は病状を有すると診断されていない、並びに/又はその症状を呈示しないこ

50

ともあるが、疾患若しくはその症状を発生する傾向を有する。一部の実施形態では、疾患、障害、及び／又は病状（例えば、癌）に罹患しやすい個体は、以下の1つ又は複数の特徴とし得る：（1）疾患、障害、及び／又は病状の発生に関連する遺伝子突然変異；（2）疾患、障害、及び／又は病状の発生に関連する遺伝子多型；（3）疾患、障害、及び／又は病状に関連するタンパク質及び／又は核酸の発現及び／又は活性の増大及び／又は低減；（4）疾患、障害、及び／又は病状の発生に関連する習慣及び／又は生活様式；（5）疾患、障害、及び／又は病状の家族歴；並びに（6）疾患、障害、及び／又は病状の発生に関連する微生物への曝露及び／又は感染。一部の実施形態では、疾患、障害、及び／又は病状に罹患しやすい個体は、疾患、障害、及び／又は病状を発生することになる。一部の実施形態では、疾患、障害、及び／又は病状に罹患しやすい個体は、疾患、障害、及び／又は病状を発生しない。

10

【1041】

持続放出：本明細書で使用されるとき、用語「持続放出」は、特定の期間にわたって特定の放出速度に従う医薬組成物又は化合物放出プロフィールを指す。

合成：用語「合成」は、人の手で生成、調製、及び／又は製造されることを意味する。本発明のポリヌクレオチド若しくはポリペプチド又は他の分子の合成は、化学又は酵素的であってよい。

【1042】

標的細胞：本明細書で使用されるとき、「標的細胞」は、目的の1つ又は複数の細胞を指す。細胞は、*in vitro*、*in vivo*、*in situ*で又は生物の組織若しくは臓器中に見出され得る。生物は、動物、好ましくは哺乳動物、より好ましくはヒト、最も好ましくは患者であってよい。

20

【1043】

治療薬：用語「治療薬」は、対象に投与されると、治療的、診断的、及び／若しくは予防的効果を及ぼし、並びに／又は所望の生物学的及び／若しくは薬理学的効果を誘発する任意の薬剤を指す。

【1044】

治療有効量：本明細書で使用されるとき、用語「治療有効量」は、感染、疾患、障害、及び／若しくは病状に罹患しているか、又はそれに罹患しやすい対象に投与されたとき、感染、疾患、障害、及び／若しくは病状を治療し、その症状を改善し、それを診断し、予防し、並びに／又はその発症を遅延させるのに十分な、送達される薬剤（例えば、核酸、薬物、治療薬、診断薬、予防薬など）の量を意味する。

30

【1045】

治療上有効な転帰：本明細書で使用されるとき、用語「治療上有効な転帰」は、感染、疾患、障害、及び／若しくは病状に罹患しているか、又はそれに罹患しやすい対象において、感染、疾患、障害、及び／若しくは病状を治療し、その症状を改善し、それを診断し、予防し、並びに／又はその発症を遅延させるのに十分である転帰を意味する。

【1046】

1日総用量：本明細書で使用されるとき、「1日総用量」は、24時間で投与される、又は処方される量である。これは、1単位用量として投与してもよい。

40

分化全能性：本明細書で使用されるとき、「分化全能性」は、成人身体に見出される細胞の全て、並びに胎盤を含む胚外組織を生成する発生能を備えた細胞を指す。

【1047】

転写因子：本明細書で使用されるとき、用語「転写因子」は、例えば、転写の活性化又は抑制により、DNAのRNAへの転写を調節するDNA結合タンパク質を指す。ある転写因子は、転写だけの調節を実施するが、他の転写因子は、他のタンパク質と共同して作用する。ある転写因子は、特定の条件下で、転写の活性化及び抑制の両方が可能である。一般に、転写因子は、標的遺伝子の調節領域内の特定の共通配列に酷似する1つ又は複数の特定の標的配列に結合する。転写因子は、単独で、又は他の分子との複合体として、標的遺伝子の転写を調節し得る。

50

【1048】

転写：本明細書で使用されるとき、用語「転写」は、外性核酸を細胞中に導入する方法を指す。トランスフェクションの方法として、限定はしないが、化学的方法、物理的処理及びカチオン性脂質又は混合物などが挙げられる。

【1049】

分化転換：本明細書で使用されるとき、「分化転換」は、1細胞型の分化細胞が、固有の特徴を喪失して、その表現型を他の完全に分化した細胞のものに変化させる能力を指す。

【1050】

治療する：本明細書で使用されるとき、用語「治療する」は、特定の感染症、疾患、障害、及び/若しくは病状の1つ又は複数の症状又は特徴を部分的若しくは完全に軽減し、寛解させ、改善し、緩和し、その発症を遅延させ、その進行を阻止し、その重症度を低下させ、並びに/又はその発生率を低下させることを指す。例えば、癌を「治療する」とは、腫瘍の生存、成長、及び/又は広がりを阻止することを指し得る。治療は、疾患、障害、及び/若しくは病状に関連する疾病が発生するリスクを低減することを目的として、疾患、障害、及び/若しくは病状の徴候を呈していない対象、並びに/又は疾患、障害、及び/若しくは病状の初期徴候のみを呈する対象に投与することができる。

10

【1051】

非修飾：本明細書で使用されるとき、「非修飾」は、何らかの方法で変更される前のあらゆる物質、化合物又は分子を指す。非修飾は、常にではないが、生体分子の野生型若しくはネイティブ形態を指す場合もある。分子は、一連の修飾を受けることができ、その際、各修飾分子は、次の修飾のための「非修飾」出発分子として役立ち得る。

20

【1052】

単能性：本明細書で使用されるとき、「単能性」は、細胞に関して述べる場合、単一の細胞株を生み出す細胞を意味する。

ワクチン：本明細書で使用されるとき、語句「ワクチン」は、特定の疾患に対する免疫を向上させる生物製剤を指す。

【1053】

ウイルスタンパク質：本明細書で使用されるとき、語句「ウイルスタンパク質」は、ウイルスを起源とするあらゆるタンパク質を意味する。

30

同等物及び範囲

当業者は、本明細書に記載する本発明の具体的な実施形態の様々な同等物を認識するか、又は常用の実験を用いるだけでそれらを確認することができるだろう。本発明の範囲は、以上の説明に限定することは意図されず、添付の特許請求の範囲に示される通りである。

【1054】

特許請求の範囲において、「1つの(a)」、「1つの(an)」、及び「その(the)」などの冠詞は、文脈から反対又はその他の解釈が明らかでない限り、1つ又は複数の意味し得る。ある群の1つ又は複数のメンバー間に「又は」を含むクレーム若しくは記載は、文脈から反対又はその他の解釈が明らかでない限り、群メンバーの1つ、2つ以上、若しくは全てが、所与の製品又は方法に存在する、そこで使用される、あるいは、それに関連する場合に満たされると考えられる。本発明は、その群の厳密に1つのメンバーが所与の製品又は方法に存在する、そこで使用される、あるいは、それに関連する実施形態を含む。本発明は、群メンバーの2つ以上、又は全てが所与の製品又は方法に存在する、そこで使用される、あるいは、それに関連する実施形態を含む。

40

【1055】

また、用語「含む」は、開放型であることが意図され、さらなる要素又はステップの包含を可能にする(しかし要求するわけではない)ことも注記される。従って、用語「含む」が本明細書で使用されるとき、用語「~から構成される」も包含され、開示される。

【1056】

50

別に定義されない限り、本明細書で使用する技術及び科学用語は全て、本発明が属する技術分野の当業者に一般に理解されるものと同じ意味を有する。本開示で使用する方法及び材料は、本明細書に記載されており；当技術分野で公知の他の好適な方法及び材料を使用することもできる。

【1057】

範囲が与えられる場合、端点が含まれる。さらに、特に指示のない限り、又はその他の解釈が文脈及び当業者の理解から明らかでない限り、範囲として表される値が、文脈から明らかに指示されるのでない限り、その範囲の下限値の単位の10分の1までの、本発明の種々の実施形態記載する範囲内のいずれかの具体的な値又は部分範囲を想定し得ることは理解されるべきである。

10

【1058】

加えて、先行技術の範囲に含まれる本発明のいずれかの具体的な実施形態は、クレームのいずれか1つ又は複数から明示的に除外され得ることは理解されるべきである。こうした実施形態は、当業者に公知であるとみなされることから、それらは、その除外が本明細書に明示的に記載されない場合であっても除外され得る。本発明の組成物のいずれかの具体的な実施形態（例えば、任意の核酸又はそれによりコードされるタンパク質；任意の生成方法；任意の使用方法など）は、先行技術の存在と関連するか否かにかかわらず、何らかの理由でいずれか1つ又は複数のクレームから除外され得る。

【1059】

引用出典、例えば、本明細書に引用される参照文献、刊行物、データベース、データベースエントリ、及び技術は、引用が明示的に記載されていない場合であっても、参照により本願に組み込むものとする。引用出典と本願との記載の間に矛盾が生じた場合、本願の記載が優先されるものとする。

20

【1060】

セクション及び表の見出しは、限定的であることを意図しない。

（実施例）

実施例1．キメラポリヌクレオチドの製造

本発明によれば、キメラポリヌクレオチド及び又はその部分若しくは領域の製造は、「RNA転写物生成のための製造方法（Manufacturing Methods for Production of RNA Transcripts）」と題する国際公開第2014152027号パンフレット（代理人整理番号M500）（その内容は、全体として参照により本明細書に組み込む）に教示されている方法を使用して達成することができる。

30

【1061】

精製方法として、「mRNA生成におけるDNA断片の除去方法（Methods of removing DNA fragments in mRNA production）」と題する国際公開第2014152030号パンフレット（代理人整理番号M501）；「リボ核酸精製（Ribonucleic acid purification）」と題する国際公開第2014152031号パンフレット（代理人整理番号M502）（これらの各々は、全体として参照により本明細書に組み込む）に教示されているものがある。

40

【1062】

ポリヌクレオチドの検出及び特性決定方法は、「mRNA分子の特性決定（Characterization of mRNA Molecules）」と題する国際公開第2014144039号パンフレット（代理人整理番号M505）（これらの各々は、全体として参照により本明細書に組み込む）に教示される通りに実施することができる。

【1063】

本発明のキメラポリヌクレオチドの特性決定は、ポリヌクレオチドマッピング、逆転写酵素配列決定、電荷分布分析、及びRNA不純物の検出からなる群から選択される方法を用いて達成することができ、ここで、特性決定は、RNA転写物配列の決定、RNA転写

50

物の純度の決定、又はRNA転写物の電荷不均質性の決定を含む。こうした方法は、例えば、「mRNA不均質性及び安定性の分析 (Analysis of mRNA Heterogeneity and Stability)」と題する国際公開第2014144039号パンフレット(代理人整理番号M506)及び「mRNAのイオン交換精製 (Ion Exchange Purification of mRNA)」と題する国際公開第2014144767号パンフレット(代理人整理番号M507)(これらの各々は、全体として参照により本明細書に組み込む)に教示される通りに実施することができる。

【1064】

実施例2. キメラポリヌクレオチド合成：三リン酸経路

概論

本発明によれば、三リン酸ケミストリーを用いて、キメラポリヌクレオチドの2つの領域若しくは部分を結合又は連結することができる。

【1065】

本発明によれば、100ヌクレオチド以下の第1の領域は、5'-リン酸及び末端3'-deSOH又は遮断OHと化学的に合成される。この領域が、80ヌクレオチドより長ければ、2つの鎖として合成し、連結してもよい。

【1066】

in vitro転写 (IVT) を用いて、非位置的に修飾された領域又は部分として第1の領域又は部分を合成する場合、次に、5'-リン酸の変換、続いて3'末端のキャッピングを実施してもよい。

【1067】

リン酸保護基は、当技術分野で公知の保護基のいずれかから選択してよい。

キメラポリヌクレオチドの第2の領域又は部分は、化学的合成又はIVT法のいずれを用いて実施してもよい。IVT法は、RNAポリメラーゼを含んでもよく、その場合、修飾キャップを含むプライマーを使用することができる。あるいは、最大130ヌクレオチドのキャップを化学的に合成した後、IVT領域又は部分にカップリングしてもよい。

【1068】

連結方法の場合、DNAseでの処理後にDNA T4リガーゼと連結すれば、コンカテマー化が容易に回避されることに留意されたい。

キメラポリヌクレオチド全体をリン酸-糖骨格で製造する必要はない。領域又は部分の1つが、ポリペプチドをコードする場合、こうした領域又は部分は、リン酸-糖骨格を含むことが好ましい。

【1069】

次に、いずれか公知のクリックケミストリー、オルトクリックケミストリー、ソルリンク (solulink)、又は当業者には周知の他のバイオコンジュゲートケミストリーを用いて、連結を実施する。

【1070】

合成経路

キメラポリヌクレオチドは、一連の出発セグメントを用いて作製する。こうしたセグメントとして、以下のものが挙げられる：

- (a) 通常の3'-OHを含む、キャップ付加且つ保護された5'セグメント (SEG. 1)
- (b) ポリペプチドのコード領域を含み得ると共に、通常の3'-OHを含む5'三リン酸セグメント (SEG. 2)
- (c) コルジセピンを含むか、又は3'-OHを含まないキメラポリヌクレオチドの3'末端(例えば、テイル)の5'-リン酸セグメント (SEG. 3)

合成(化学的又はIVT)の後、セグメント3 (SEG. 3) をコルジセピン、次にピロホスファターゼで処理することにより、5'-リン酸を形成する。

【1071】

10

20

30

40

50

次に、RNAリガーゼを用いて、セグメント2 (SEG. 2) をSEG. 3 と連結させる。続いて、連結したポリヌクレオチドを精製してから、ピロホスファターゼで処理することにより、ニリン酸を切断する。その後、処理済SEG. 2 - SEG. 3 構築物を精製した後、SEG. 1 を5'末端に連結させる。キメラポリヌクレオチドのさらなる精製ステップを実施してもよい。

【1072】

キメラポリヌクレオチドが、ポリペプチドをコードする場合、リガンド又は結合セグメントは、次のように表わされる：5' UTR (SEG. 1)、オープンリーディングフレーム又はORF (SEG. 2) 及び3' UTR + ポリA (SEG. 3)。

【1073】

各ステップの収率は、90 ~ 95%にもなり得る。

実施例3：cDNA生成のためのPCR

cDNA調製のためのPCR手順は、カパ・バイオシステムズ (Kapa Biosystems) (マサチューセッツ州ウォバーン) による2xカパ・ハイファイ (KAPA HIFI) (商標) ホットスタート・レディミックス (Hot Start Ready Mix) を使用して実施する。このシステムは、2xカパ・レディミックス (KAPA Ready Mix) 12.5 µl; フォワードプライマー (10 µM) 0.75 µl; リバースプライマー (10 µM) 0.75 µl; 鋳型cDNA 100 ng; 及び25.0 µl に希釈されたdH₂Oを含む。反応条件は、95 °Cで5分間、98 °Cで20秒間を25サイクル、次いで58 °Cで15秒間、続いて72 °Cで45秒間、続いて72 °Cで5分間、次に終了まで4 °Cである。

【1074】

本発明のリバースプライマーは、mRNAのポリA₁₂₀ (配列番号21) のためのポリT₁₂₀ (配列番号24) を組み込んでいる。より長い又はより短いポリ(T)トラクトを含む他のリバースプライマーを用いて、mRNAのポリ(A)テイルの長さを調節することができる。

【1075】

インビトロゲン (Invitrogen) のピュアリンク (PURE LINK) (商標) PCRマイクロキット (PCR Micro Kit) (カリフォルニア州カールズバッド) を製造者の指示に従い使用して (最大5 µg)、反応物をクリーンアップする。より規模の大きい精製は、より大きな容量を備える製品を用いたクリーンアップが必要になるだろう。クリーンアップ後、ナノドロップ (NANODROP) (商標) を用いて、cDNAを定量し、アガロースゲル電気泳動を用いた分析により、cDNAが予想されたサイズであることを確認する。次に、cDNAを配列解析に供してから、in vitro 転写反応に進む。

【1076】

実施例4 . in vitro 転写 (IVT)

in vitro 転写反応によって、均質に修飾されたポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドが産生される。こうした均質に修飾されたポリヌクレオチドは、本発明のキメラポリヌクレオチドの1領域又は部分を含み得る。投入されるヌクレオチド三リン酸 (NTP) 混合物は、天然及び非天然のNTPを用いて、所内で作製する。

【1077】

典型的な in vitro 転写反応は、以下のものを含む：

- 1 鋳型cDNA 1.0 µg
- 2 10x転写バッファー (400 mM トリス - HCl pH 8.0、190 mM MgCl₂、50 mM DTT、10 mM スペルミジン (Spermidine)) 2.0 µl
- 3 カスタムNTP (各25 mM) 7.2 µl
- 4 RNase 阻害剤 20 U
- 5 T7 RNAポリメラーゼ 3000 U

10

20

30

40

50

- 6 dH₂O最大20.0μl、及び
7 37 で3時間～5時間のインキュベーション。

【1078】

翌日にクリーンアップするために、粗IVT混合物を4 で一晩保存してもよい。次に1UのRNase不含DNaseを用いて元の鑄型を消化する。37 で15分間インキュベートした後、アンピオン(Ambion)のメガクリア(MEGACLEAR)(商標)キット(テキサス州オースティン)を製造者の指示に従い使用して、mRNAを精製する。このキットは、最大500μgのRNAを精製することができる。クリーンアップ後、ナノドロップ(NanoDrop)を使用してRNAを定量し、アガロースゲル電気泳動により分析して、RNAが適切なサイズであること、並びにRNAの分解が起こらなかったことを確認する。

10

【1079】

実施例5．酵素的キャッピング

ポリヌクレオチドのキャッピングを以下の通りに実施し、その際、混合物は、IVT RNA 60μg～180μg及びdH₂O最大72μlを含む。混合物を65 で5分間インキュベートしてRNAを変性させた後、直ちに氷に移す。

【1080】

次に、プロトコルは、10×キャッピングバッファー(0.5M トリス-HCl(pH 8.0)、60mM KCl、12.5mM MgCl₂)(10.0μl); 20mM GTP(5.0μl); 20mM S-アデノシルメチオニン(2.5μl); RNase阻害剤(100U); 2'-O-メシルトランスフェラーゼ(400U); ワクシニアキャッピング酵素(グアニリルトランスフェラーゼ)(40U); dH₂O(28μlまで)の混合; 及び60μgのRNAに対して30分間又は180μgのRNAに対して最大2時間の37 でのインキュベーションを含む。

20

【1081】

続いて、アンピオン(Ambion)のメガクリア(MEGACLEAR)(商標)キット(テキサス州オースティン)を製造者の指示に従い使用して、ポリヌクレオチドを精製する。クリーンアップ後、ナノドロップ(NANODROP)(商標)(サーモフィッシャー(ThermoFisher)、マサチューセッツ州ウォルサム)を使用してRNAを定量し、アガロースゲル電気泳動により分析して、RNAが適切なサイズであること、並びにRNAの分解が起こらなかったことを確認する。RNA産物はまた、配列決定用のcDNAを作製する逆転写PCRを実行することにより、配列決定してもよい。

30

【1082】

実施例6．ポリAテイル付加反応

cDNAにポリTがない場合、最終産物をクリーニングする前にポリAテイル付加反応を実施しなければならない。これは、キャップ付きIVT RNA(100μl); RNase阻害剤(20U); 10×テイル付加バッファー(0.5M トリス-HCl(pH 8.0)、2.5M NaCl、100mM MgCl₂)(12.0μl); 20mM ATP(6.0μl); ポリAポリメラーゼ(20U); dH₂O最大123.5μlを混合し、37 で30分間インキュベートすることにより実施される。ポリAテイルが既に転写物にある場合には、テイル付加反応は省いて、アンピオン(Ambion)のメガクリア(MEGACLEAR)(商標)キット(テキサス州オースティン)(最大500μg)によるクリーンアップに直接進んでもよい。ポリAポリメラーゼは、酵母に発現する組換え酵素であるのが好ましい。

40

【1083】

ポリAテイル付加反応の処理能力又は完全性から必ずしも正確なサイズのポリAテイルが得られない場合もあることは理解すべきである。従って、約40～200ヌクレオチド、例えば、約40、50、60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、150～165、155、156、157、158、1

50

59、160、161、162、163、164又は165ヌクレオチドのポリAテイルは本発明の範囲内にある。

【1084】

実施例7．天然5'キャップ及び5'キャップ類似体

ポリヌクレオチドの5'-キャッピングは、製造者のプロトコルに従い、5'-グアノシンキャップ構造を生成する以下の化学的RNAキャップ類似体を使用して、*in vitro*転写反応中に同時に完了することができる：3'-O-Me-m7G(5')ppp(5')G[ARCAキャップ]；G(5')ppp(5')A；G(5')ppp(5')G；m7G(5')ppp(5')A；m7G(5')ppp(5')G（ニューイングランド・バイオラボ（New England BioLabs）、マサチューセッツ州イプスウィッチ）。修飾RNAの5'-キャッピングは、「キャップ0」構造：m7G(5')ppp(5')Gを生成するワクシニアウイルスキャッピング酵素（ニューイングランド・バイオラボ（New England BioLabs）、マサチューセッツ州イプスウィッチ）を使用して、転写後に完了することもできる。ワクシニアウイルスキャッピング酵素及び2'-Oメチル-トランスフェラーゼの両方を用いて、キャップ1構造を生成してもよく、これによって、m7G(5')ppp(5')G-2'-Oメチルが得られる。キャップ1構造と、これに続く2'-Oメチル-トランスフェラーゼを用いた5'側の終わりから3番目のヌクレオチドの2'-Oメチル化から、キャップ2構造を生成することもできる。キャップ2構造と、これに続く2'-Oメチル-トランスフェラーゼを用いた5'側の終わりから4番目のヌクレオチドの2'-Oメチル化から、キャップ3構造を生成することもできる。酵素は、組換え供給源に由来するのが好ましい。

10

20

【1085】

哺乳動物細胞にトランスフェクトされると、修飾mRNAは、12～18時間又は18時間超、例えば、24、36、48、60、72時間若しくは72時間超の安定性を有する。

【1086】

実施例8．キャッピングアッセイ

A．タンパク質発現アッセイ

本明細書に教示するキャップのいずれかを含み、ポリペプチドをコードするキメラポリヌクレオチドは、同じ濃度で細胞にトランスフェクトすることができる。トランスフェクション後6、12、24及び36時間の時点で、培地中に分泌されたタンパク質の量をELISAによりアッセイすることができる。より高レベルのタンパク質を培地中に分泌する合成キメラポリヌクレオチドは、より高度の翻訳コンピテントキャップ（Cap）構造を有する合成キメラポリヌクレオチドに対応すると考えられる。

30

【1087】

B．純度分析合成

本明細書に教示するキャップのいずれかを含み、ポリペプチドをコードするキメラポリヌクレオチドは、変性アガロース-尿素ゲル電気泳動又はHPLC分析を用いて、純度について比較することができる。電気泳動による単一の連結バンドを有するキメラポリヌクレオチドは、複数のバンド又は線状のバンドを有するキメラポリヌクレオチドと比較して、より高純度の産物に対応する。単一のHPLCピークを有する合成キメラポリヌクレオチドもまた、より高純度の産物に対応する。より高い効率のキャッピング反応は、より高純度のポリヌクレオチド集団を提供すると考えられる。

40

【1088】

C．サイトカイン分析

本明細書に教示するキャップのいずれかを含み、ポリペプチドをコードするキメラポリヌクレオチドは、様々な濃度で細胞にトランスフェクトすることができる。トランスフェクション後6、12、24及び36時間の時点で、培地中に分泌されたTNF-及びINF-などの炎症促進性サイトカインの量をELISAによりアッセイすることができ

50

る。より高レベルの炎症促進性サイトカインを培地中に分泌するキメラポリヌクレオチドは、免疫活性化キャップ構造を含有するキメラポリヌクレオチドに対応すると考えられる。

【1089】

D. キャッピング反応効率

本明細書に教示するキャップのいずれかを含み、ポリペプチドをコードするキメラポリヌクレオチドは、ヌクレアーゼ処理後、LC-MSによりキャッピング反応効率について分析することができる。キャップ付加キメラポリヌクレオチドのヌクレアーゼ処理によって、遊離ヌクレオチドと、LC-MSにより検出可能なキャップ付加5'-5'-三リン酸キャップ構造との混合物が得られる。LC-MSスペクトルによるキャップ付加産物の量は、反応からの全キメラポリヌクレオチドの割合(%)として表すことができ、キャッピング反応効率に対応すると考えられる。より高いキャッピング反応効率を有するキャップ構造は、LC-MSによるより多量のキャップ付加産物を有すると考えられる。

10

【1090】

実施例9. 修飾RNA又はRT-PCR産物のアガロースゲル電気泳動

個別のキメラポリヌクレオチド(20 μ lの体積中200~400ng)又は逆転写PCR産物(200~400ng)をウェル中の非変性1.2%アガロースE-ゲル(インビトロゲン(Invitrogen)、カリフォルニア州カールスバッド)上にロードし、製造者のプロトコルに従い12~15分泳動させた。

20

【1091】

実施例10. ナノドロップ(NanoDrop)修飾RNAの定量及びUVスペクトルデータ

ナノドロップ(NanoDrop)UV吸光度読み取りのためにTEバッファ(1 μ l)中の修飾キメラポリヌクレオチドを使用して、化学的合成又は*in vitro*転写反応からの各キメラポリヌクレオチドの収率を定量した。

【1092】

実施例11. リピドイドを用いた修飾mRNAの製剤化

細胞への添加の前に、キメラポリヌクレオチドをリピドイドと設定比で混合することにより、キメラポリヌクレオチドを*in vitro*実験のために製剤化する。*in vivo*製剤化は、全身にわたる循環を促進するために、さらに別の成分の添加が必要となる場合がある。これらのリピドイドが、*in vivo*での作用に好適な粒子を形成する能力を試験するために、siRNA-リピドイド製剤化に用いられる標準的製剤化プロセスを出発点として使用してもよい。粒子の形成後、キメラポリヌクレオチドを添加して、複合体と一体化させる。標準的色素排除アッセイを用いて、カプセル化効率を決定する。

30

【1093】

実施例12. タンパク質発現についてのスクリーニング方法

A. エレクトロスプレーイオン化

対象に投与したキメラポリペプチドによりコードされたタンパク質を含有し得る生体サンプルを調製し、1、2、3又は4台の質量分析計を用いて、エレクトロスプレーイオン化(ESI)についての製造者のプロトコルに従い分析する。生体サンプルは、タンデムESI質量分析システムを用いて分析してもよい。

40

【1094】

タンパク質断片、又は全タンパク質のパターンを所与のタンパク質の既知の対照と比較し、比較により同一性を決定する。

B. マトリックス支援レーザー脱離/イオン化

対象に投与した1つ又は複数のキメラポリペプチドによりコードされたタンパク質を含有し得る生体サンプルを調製し、マトリックス支援レーザー脱離/イオン化(MALDI)についての製造者のプロトコルに従い分析する。

【1095】

タンパク質断片、又は全タンパク質のパターンを所与のタンパク質の既知の対照と比較

50

し、比較により同一性を決定する。

C. 液体クロマトグラフィー - 質量分析 - 質量分析

1つ又は複数のキメラポリペプチドによりコードされたタンパク質を含有し得る生体サンプルは、トリプシン酵素で処理して、そこに含まれるタンパク質を消化してもよい。得られるペプチドは、液体クロマトグラフィー - 質量分析 - 質量分析 (LC/MS/MS) により分析する。ペプチドを質量分析計で断片化して、コンピュータアルゴリズムによりタンパク質配列データベースとマッチし得る診断パターンを取得する。所与のタンパク質について1 ng 以下の出発材料を取得するために、消化されたサンプルを希釈してもよい。単純なバッファバックグラウンド (例えば、水又は揮発性塩) を含有する生体サンプルは、直接的溶液中消化を被りやすい; より複雑なバックグラウンド (例えば、洗剤、非揮発性塩、グリセロール) は、サンプル分析を促進するために、追加のクリーンアップステップが必要である。

10

【1096】

タンパク質断片、又は全タンパク質のパターンを所与のタンパク質の既知の対照と比較し、比較により同一性を決定する。

実施例13. 環状化及び/又はコンカテマー化

本発明によれば、ポリA結合タンパク質及び5'末端結合タンパク質同士の相互作用を補助するために、キメラポリヌクレオチドを環状化、又はコンカテマー化して、翻訳コンピテント分子を作製してもよい。環状化又はコンカテマー化の機構は、少なくとも3つの異なる経路: 1) 化学的、2) 酵素的、及び3) リボザイム触媒によって起こり得る。新しく形成した5'/3'結合は、分子内又は分子間のいずれであってもよい。

20

【1097】

第1の経路では、核酸の5'末端及び3'末端は、化学的に反応性の基を含有し、これらは、互いに接近すると、分子の5'末端と3'末端との間に新たな共有結合を形成する。有機溶媒中で、合成mRNAの3'末端の3'アミノ末端ヌクレオチドが、5'-NH₂-エステル部分で求核攻撃を受けて、新たな5'/3'アミド結合を形成するように、5'末端は、NH₂-エステル反応性基を含有し、3'末端は、3'アミノ末端ヌクレオチドを含有し得る。

【1098】

第2の経路では、T4RNAリガーゼを用いて、5'-リン酸化核酸分子を核酸の3'-ヒドロキシル基に酵素的に連結することにより、新たなホスホロジエステル結合を形成することができる。一例の反応では、製造者のプロトコルに従い、1~10単位のT4RNAリガーゼ (ニューイングランド・バイオラボ (New England Biolabs)、マサチューセッツ州イプスウィッチ) と1 µgの核酸分子を37 °Cで1時間インキュベートする。酵素的連結反応を補助するために、連結反応は、並列の5'-及び3'-領域の両方と塩基対合が可能な分断ポリヌクレオチドの存在下で行ってもよい。

30

【1099】

第3の経路では、in vitro転写中に、得られる核酸分子が、核酸分子の5'末端を核酸分子の3'末端に連結することができる活性リボザイム配列を含有できるように、cDNA鋳型の5'末端又は3'末端のいずれかが、リガーゼリボザイム配列をコードする。リガーゼリボザイムは、グループイントロン、グループイントロン、D型肝炎ウイルス (Hepatitis delta virus)、ヘアピン (Hairpin) リボザイムに由来するものでもよいし、又はセレックス (SELEX) (Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment) により選択してもよい。リボザイムリガーゼ反応は、0~37 °Cの温度で1~24時間を要し得る。

40

【1100】

実施例14. mRNA構築物の合成

プラスミドの制限消化

DNAプラスミド (50 ng / µL)、BSA (1x)、1xNEバッファ (NEB

50

uffer) 4 (50 mM 酢酸カリウム、20 mM トリス - 酢酸塩、10 mM 酢酸マグネシウム、1 mM DTT、pH 7.9)、及び XbaI (400 U/mL) (ニュー・イングランド・バイオラボ (New England Biolabs) を含有する 50 μ L の反応物において、37 で 2 時間のインキュベーションにより DNA プラスミドを消化した。1% アガロースゲルにより制限消化物を分析し、PCR に直接使用した。

【1101】

DNA 鋳型増幅

線状化プラスミド (20 ng)、dNTP (各 0.2 μ M)、フォワードプライマー (0.2 μ M)、リバースプライマー (0.2 μ M)、1x Q5 反応バッファー、及び Q5 高忠実度 DNA ポリメラーゼ (20 U/mL) (ニュー・イングランド・バイオラボ (New England Biolabs) を用いた 100 μ L 反応物中での PCR により、所望の DNA 鋳型を増幅した。全ての成分は、サーモサイクラーに添加するまで氷上に保持した。表 7 に示す以下のサーモサイクラー法を実施した。

10

【1102】

【表 7】

表 7. サーマサイクラー法

ステップ	温度	時間
初期変性	98°C	4 分
30 サイクル	98°C	15 秒
	72°C	45 秒
	72°C	kb 当たり 20 秒
最終伸長	72°C	5 分
保持	4°C	

20

線状化プラスミドの DNA 配列を表 8 に掲載し、プライマー配列を表 9 に掲載する。

【1103】

【表 8 - 1】

表 8. PCR増幅(5'から3')に用いられる線状化プラスミドのDNA配列

mCherry	配列番号
TCAAGCTTTTGGACCCTCGTACAGAAGCTAATACGA CTCACTATAGGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTA AGAAGAAATATAAGAGCCACCATGGTATCCAAGGGG GAGGAGGACAACATGGCGATCATCAAGGAGTTCATG CGATTCAAGGTGCACATGGAAGGTTTCGGTCAACGGA CACGAATTTGAAATCGAAGGAGAGGGTGAAGGAAG GCCCTATGAAGGGACACAGACCGCGAAACTCAAGG TCACGAAAGGGGGGACCACTTCCTTTTCGCCTGGGACA TTCTTTTCGCCCCAGTTTATGTACGGGTCCAAAGCATA TGTGAAGCATCCCGCCGATATTCCTGACTATCTGAAA CTCAGCTTTCCCGAGGGATTCAAGTGGGAGCGGGTC ATGAACTTTGAGGACGGGGGTGTAGTCACCGTAACC CAAGACTCAAGCCTCCAAGACGGCGAGTTCATCTAC AAGGTCAAACCTGCGGGGGACTAACTTTCCGTCCGAT GGGCCGGTGATGCAGAAGAAAACGATGGGATGGGA AGCGTCATCGGAGAGGATGTACCCAGAAGATGGTGC ATTGAAGGGGGAGATCAAGCAGAGACTGAAGTTGA AAGATGGGGGACATTATGATGCCGAGGTGAAAACGA CATACAAAGCGAAAAAGCCGGTGCAGCTTCCCGGA GCGTATAATGTGAATATCAAGTTGGATATTACTIONCAC ACAATGAGGACTACACAATTGTTCGAACAGTACGAAC GCGCTGAGGGTAGACACTCGACGGGAGGCATGGAC GAGTTGTACAAATGATAATAGGCTGGAGCCTCGGTG GCCATGCTTCTTGCCCCTTGGGCCTCCCCCAGCCC CTCCTCCCCTTCTGCACCCGTACCCCGTGGTCTTT GAATAAAGTCTGAGTGGGCGGCT	4
NanoLuc	
TCAAGCTTTTGGACCCTCGTACAGAAGCTAATACGA CTCACTATAGGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTA AGAAGAAATATAAGAGCCACCATGGTTTTTACCCTC GAAGATTTTGTTCGGAGATTGGAGACAGACTGCCGGA TACAACCTTGACCAAGTCCTCGAGCAAGGCGGTGTG TCGTCACTCTTCCAAAACCTGGGTGTGTCCGTGACT CCCATCCAGCGCATCGTCCTGAGCGGCGAAAATGGG TTGAAGATCGACATCCATGTGATCATTCCATACGAGG GACTGTCCGGGGACCAGATGGGTTCAGATCGAAAAG ATTTTCAAAGTGGTGTACCCGGTCGACGATCATCACT TCAAGGTGATCCTGCACTACGGAACGCTGGTGATCG ATGGGGTGACCCCGAACATGATTGACTATTTTCGGAC GGCCTTACGAGGGCATCGCAGTGTTTCGACGGAAAG AAGATCACCGTGACCGGCACTCTGTGGAATGGAAC AAAATCATCGACGAACGCCTGATCAATCCGGATGGC TCGCTGTTGTTCCGGGTGACCATTAACGGAGTCACT GGATGGAGGCTCTGCGAGCGCATCCTTTCGTGATAA TAGGCTGGAGCCTCGGTGGCCATGCTTCTTGCCCCT	5

10

20

30

40

【表 9】

表 9. PCR増幅 (5'から3')に用いられるプライマー配列

説明	配列	配列番号
フォワードプライマー	TAATACGACTCACTATAGGG	7
テイルなしリバープライマー	GCCGCCCACTCAGACTTTATTCA AAGACCAC	8
T80 リバープライマー	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT TTTTTGCCGCCCACTCAGACTTTA TTCAAAGACCAC	9
T140 リバープライマー	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT TTTTTTTTTTTTTTTTTGCCGCCAC TCAGACTTTATTCAAAGACCAC	10

10

20

PCR産物は、キャピラリー電気泳動 (CE) (アジレント (Agilent) 2100 バイオアナライザ (Bioanalyzer)) により分析し、限外濾過 (アミコン (Amicon)) により脱塩した。

【1106】

in vitro 転写

in vitro 転写 (IVT) 反応は、DNA 鋳型 (25 ng/μL)、NTP (各 7.6 mM)、1×T7 IVT 反応バッファー、RNase 阻害剤 (1 U/μL)、ピロリン酸塩 (1 U/μL)、及び T7 RNA ポリメラーゼ (7 U/μL) (NEB) を含有する 50 μL 中で実施した。一般に、構築物当たり 24 の 50 μL 反応物を使用した。5 - メチル - CTP 及び 1 - メチル - プソイド UTP を用いて、修飾 mRNA を作製した。IVT 反応物を 37 °C で 4 時間インキュベートした後、2.5 μL の DNase I (2000 U/mL) (NEB) を添加して、反応物をさらに 45 分間インキュベートした。反応物を一緒にした後、メガクリア (MEGAClear) スピンカラム (アンピオン (Ambion)) を用いて精製し、250 μL の水中に溶離させた。IVT 産物を CE (アジレント (Agilent) 2100 バイオアナライザ (Bioanalyzer)) により分析した。表 10 は、RNA 転写物の配列を示す。5' - アジ化物を含有する mRNA については、1 : 16 比の GTP : 5' - アジド - 5' - デオキシグアノシン (DM SO に溶解させたカーボシンス (Carbosynth)) をそれぞれ 0.45 mM 及び 7.15 mM の最終濃度で使用して、転写を実施した。この性質の構築物は、酵素的キャッピングには付さなかった。

30

40

【1107】

【表 10 - 1】

表 10. mRNA構築物1~7の配列(U = 1-メチルI-プソイドウリジン及びC = 5-メチル-シチジン)

説明	配列	配列番号
RNA 1 (mCherry, 874 nt) , ポリ(A)テ イルなし 太字の5' UTR, 斜体 の3'UTR	GGGAAAUAAGAGAGAAAAGAAGAGUAAG AAGAAAUAUAAGAGCCACCAUGGUAUCCA AGGGGGAGGAGGACAACAUGGCGAUCauc AAGGAGUUCAUGCGAUUCAAGGUGCACAu GGAAGGUUCGGUCAACGGACACGAAUUUG AAAUCGAAGGAGAGGGUGAAGGAAGGCC UAUGAAGGGACACAGACCGCGAAACUCA GGUCACGAAAGGGGGACCACUCCUUUCG CUGGGACAUCUUUCGCCCCAGUUUAUGU ACGGGUCCAAGCAUAUGUGAAGCAUCCC GCCGAUAUUCUGACUAUCUGAAACUCAGC UUUCCCGAGGGAUUCAAGUGGGAGCGGGU CAUGAACUUUGAGGACGGGGGUGUAGUCA CCGUAACCCAAGACUCAAGCCUCCAAGACG GCGAGUUCAUCUACAAGGUCAAACUGCGG GGGACUAACUUUCGUCGGAUGGGCCGGU GAUGCAGAAGAAAACGAUGGGAUGGGAAG CGUCAUCGGAGAGGAUGUACCCAGAAGAU GGUGCAUUGAAGGGGGAGAUCAAGCAGAG ACUGAAGUUGAAAGAUGGGGGACAUAUUG AUGCCGAGGUGAAAACGACAUAACAAGCG AAAAAGCCGGUGCAGCUUCCCGGAGCGUA UAAUGUGAAUAUCAAGUUGGAUAUUACUU CACACAAUGAGGACUACACAAUUGUCGAA CAGUACGAACGCGCUGAGGGUAGACACUC GACGGGAGGCAUGGACGAGUUGUACAAAU GAUAAUAGGCUGGAGCCUCGGUGGCAUGC UUCUUGCCCCUUGGGCCUCCCCCAGCCCC UCCUCCCCUUCUGCACCCGUACCCCCGUG GUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC	11
RNA 2 (NanoLuc, 679 nt) , ポリ(A)テ イルなし 太字の5' UTR, 斜体 の3'UTR	GGGAAAUAAGAGAGAAAAGAAGAGUAAG AAGAAAUAUAAGAGCCACCAUGGUUUUUA CCUCGAAGAUUUUGUCGGAGAUUGGAGA CAGACUGCCGGAUACAACCUUGACCAAGUC CUCGAGCAAGGCGGUGUGUCGUCACUCUUC CAAAACCUGGGUGUGUCCGUGACUCCCAUC CAGCGCAUCGUCCUGAGCGGCGAAAAUGG GUUGAAGAUCGACAUCAUGUGAUCAUUC CAUACGAGGGACUGUCCGGGGACCAGAUG GGUCAGAUCGAAAAGAUUUUCAAGUGGU	12

10

20

30

40

【表 10 - 2】

	<p>GUACCCGGUCGACGAUCAUCACUUCAAGGU GAUCCUGCACUACGGAACGCUGGUGAUCG AUGGGGUGACCCCGAACAUUGAUUGACU UUCGGACGGCCUACGAGGGCAUCGCAGU GUUCGACGGAAAGAAGAUCACCGUGACCG GCACUCUGUGGAAUGGAAACAAAUAUC GACGAACGCCUGAUCAAUCCGGAUGGCUCG CUGUUGUUCGGGUGACCAUUAACGGAGU CACUGGAUGGAGGCUCUGCGAGCGCAUCCU UGCGUGAUAAUAGGCUGGAGCCUCGGUGGC CAUGCUCUUGCCCCUUGGGCCUCCCCCA GCCCCUCCUCCCCUUCUGCACCCGUACCCC CGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCG GC</p>		
<p>RNA 3 (GCSF, 778 nt), ポ リ(A)テイ ルなし, 太 字の5' UTR, 斜体 の3'UTR</p>	<p>GGGAAAUAAGAGAGAAAAGAAGAGUAAG AAGAAAUAUAAGAGCCACCAUGGCCGGUC CCGCGACCCAAAGCCCCAUGAAACUUAUGG CCCUGCAGUUGCUGCUUUGGCACUCGGCCC UCUGGACAGUCCAAGAAGCGACUCCUCUCG GACCUGCCUCAUCGUUGCCGCAGUCAUUC UUUUGAAGUGUCUGGAGCAGGUGCGAAAG AUUCAGGGCGAUGGAGCCGCACUCCAAGAG AAGCUCUGCGCGACAUACAAACUUGCCAU CCCGAGGAGCUCGUACUGCUCGGGCACAGC UUGGGGAUUCCCUGGGCUCCUCUCUGUCC UGUCCGUCGCAGGCUUUGCAGUUGGCAGG GUGCCUUUCCCAGCUCACUCCGGUUUGUU CUUGUAUCAGGGACUGCUGCAAGCCCUUGA GGGAAUCUCGCCAGAAUUGGGCCCGACGCU GGACACGUUGCAGCUCGACGUGGCGGAUU UCGCAACAACCAUCUGGCAGCAGAUGGAGG AACUGGGGAUGGCACCCGCGCUGCAGCCCA CGCAGGGGGCAAUGCCGGCCUUUGCUGUCCG CGUUUCAGCGCAGGGCGGGUGGAGUCCUCG UAGCGAGCCACCUUCAAUCAUUUUUGGAA GUCUCGUACCGGGUGCUGAGACAUCUUGCG CAGCCGUGAUAAUAGGCUGGAGCCUCGGUG GCCAUGCUCUUGCCCCUUGGGCCUCCCC CAGCCCCUCCUCCCCUUCUGCACCCGUACC CCCGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGG CGGC</p>	13	10 20 30 40
<p>RNA 4 (mCherry, 80 nt ポリ (A)テイ ルなし, 954 nt), 太字 の5'UTR, 斜体の</p>	<p>GGGAAAUAAGAGAGAAAAGAAGAGUAAG AAGAAAUAUAAGAGCCACCAUGGUAUCCA AGGGGGAGGAGGACAACAUGGCGAUCAUC AAGGAGUUCAUGCGAUUCAAGGUGCACA GGAAGGUUCGGUCAACGGACACGAAUUUG AAAUCGAAGGAGAGGGUGAAGGAAGGCC UAUGAAGGGACACAGACCGCGAAACUCAA GGUCACGAAAGGGGGACCACUCCUUUCGC</p>	14	

【表 10 - 3】

3'UTR	<p>CUGGGACAUCUUCUUCGCCCCAGUUUAUGU ACGGGUCCAAAGCAUAUGUGAAGCAUCCC GCCGAUAUUCUGACUAUCUGAAACUCAGC UUUCCCGAGGGAUUCAAGUGGGAGCGGGU CAUGAACUUUGAGGACGGGGGUGUAGUCA CCGUAACCCAAGACUCAAGCCUCCAAGACG GCGAGUUCAUCUACAAGGUCAAACUGCGG GGGACUAACUUUCGUCGGAUGGGCCGGU GAUGCAGAAGAAAACGAUGGGGAUGGGAAAG CGUCAUCGGAGAGGAUGUACCCAGAAGAU GGUGCAUUGAAGGGGGGAGAUAAGCAGAG ACUGAAGUUGAAAGAUGGGGGACAUAUUG AUGCCGAGGUGAAAACGACAUACAAAGCG AAAAAGCCGGUGCAGCUUCCCGGAGCGUA UAAUGUGAAUAUCAAGUUGGAUAUUACUU CACACAAUGAGGACUACACAAUUGUCGAA CAGUACGAACGCGCUGAGGGUAGACACUC GACGGGAGGCAUGGACGAGUUGUACAAAU <i>GAUAAUAGGCUGGAGCCUCGGUGGCCAUGC</i> <i>UUCUUGCCCCUUGGGCCUCCCCCAGCCCC</i> <i>UCCUCCCUUCCUGCACCCGUACCCCGUG</i> <i>GUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGCAA</i> AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA</p>	
<p>RNA 5 (mCherry, 140 nt ポ リ(A)テイ ル, 1014 nt), 太字の 5' UTR, 斜体の 3'UTR</p>	<p>GGGAAAUAAGAGAGAAAAGAAGAGUAAG AAGAAAUAUAAGAGCCACCAUGGUAUCCA AGGGGGAGGAGGACAACAUGGCGAUCAUC AAGGAGUUCAUGCGAUUCAAGGUGCACAU GGAAGGUUCGGUCAACGGACACGAAUUUG AAAUCGAAGGAGAGGGUGAAGGAAGGCC UAUGAAGGGACACAGACCGCGAAACUCAA GGUCACGAAAGGGGGACCACUCCUUUCGC CUGGGACAUCUUCUUCGCCCCAGUUUAUGU ACGGGUCCAAAGCAUAUGUGAAGCAUCCC GCCGAUAUUCUGACUAUCUGAAACUCAGC UUUCCCGAGGGAUUCAAGUGGGAGCGGGU CAUGAACUUUGAGGACGGGGGUGUAGUCA CCGUAACCCAAGACUCAAGCCUCCAAGACG GCGAGUUCAUCUACAAGGUCAAACUGCGG GGGACUAACUUUCGUCGGAUGGGCCGGU GAUGCAGAAGAAAACGAUGGGGAUGGGAAAG CGUCAUCGGAGAGGAUGUACCCAGAAGAU GGUGCAUUGAAGGGGGGAGAUAAGCAGAG ACUGAAGUUGAAAGAUGGGGGACAUAUUG AUGCCGAGGUGAAAACGACAUACAAAGCG AAAAAGCCGGUGCAGCUUCCCGGAGCGUA UAAUGUGAAUAUCAAGUUGGAUAUUACUU CACACAAUGAGGACUACACAAUUGUCGAA CAGUACGAACGCGCUGAGGGUAGACACUC</p>	<p>15</p> <p>30</p> <p>40</p>

10

20

30

40

【表 10 - 4】

	<p>GACGGGAGGCAUGGACGAGUUGUACAAAU GAUAAUAGGCUGGAGCCUCGGUGGCCAUGC UUCUUGCCCCUUGGGCCUCCCCCAGCCCC UCCUCCCCUCCUGCACCCGUACCCCGUG GUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGCAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA</p>		10
<p>RNA 6 (NanoLuc, 140 nt ポ リ(A)テイ ル, 819 nt), 太字の5' UTR, 斜体 の3'UTR</p>	<p>GGGAAUAAGAGAGAAAAGAAGAGUAAG AAGAAUAUAAGAGCCACCAUGGUUUUA CCCUCGAAGAUUUUGUCGGAGAUUGGAGA CAGACUGCCGGAUACAACCUUGACCAAGUC CUCGAGCAAGGCGGUGUGUCGUCACUCUUC CAAACCUGGGUGUGUCCGUGACUCCCAUC CAGCGCAUCGUCCUGAGCGGCGAAAUGGG UUGAAGAUCGACAUCAUGUGAUCAUCC AUACGAGGGACUGUCCGGGGACCAGAUGG GUCAGAUCGAAAAGAUUUUCAAGUGGUG UACCCGGUCGACGAUCAUCACUUAAGGUG AUCCUGCACUACGGAACGCUGGUGAUCGAU GGGUGACCCCGAACAUGAUUGACUAUUU CGGACGGCCUACGAGGGCAUCGCAGUGUU CGACGGAAAGAAGAUCACCGUGACCGGCAC UCUGUGGAAUGGAAACAAAUCAUCGACG AACGCCUGAUCAAUCCGGAUGGCUCGCUGU UGUUCGGGUGACCAUUAACGGAGUCACU GGAUGGAGGCUCUGCGAGCGCAUCCUUGCG UGAUAUAGGCUGGAGCCUCGGUGGCCAUG CUUCUUGCCCCUUGGGCCUCCCCCAGCCC CUCUCCCCUCCUGCACCCGUACCCCGUG GUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGCAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA</p>	16	20
<p>RNA 7 (GCSF, 140 nt ポ リ(A)テイ ル, 918 nt), 太字の5' UTR, 斜 体の3'UTR</p>	<p>GGGAAUAAGAGAGAAAAGAAGAGUAAG AAGAAUAUAAGAGCCACCAUGGCCGGUC CCGCGACCCAAAGCCCAUGAAACUUAUGG CCCUGCAGUUGCUGCUUUGGCACUCGCCCC UCUGGACAGUCCAAGAAGCGACUCCUCUCG GACCUGCCUCAUCGUUGCCGCAGUCAUUC UUUGAAGUGUCUGGAGCAGGUGCGAAAG AUUCAGGGCGAUGGAGCCGCACUCCAAGAG AAGCUCUGCGCGACAUACAAACUUUGCCAU CCCGAGGAGCUCGUACUCGCGGGCACAGC UUGGGGAUUCCUGGGCUCUCUCUGUCC</p>	17	40

【表 10 - 5】

	UGUCCGUCGCAGGCUUUGCAGUUGGCAGG GUGCCUUUCCCAGCUCCACUCCGGUUUGUU CUUGUAUCAGGGACUGCUGCAAGCCCUUGA GGGAAUCUCGCCAGAAUUGGGCCCGACGCU GGACACGUUGCAGCUCGACGUGGGCGGAUU UCGCAACAACCAUCUGGCAGCAGAUGGAGG AACUGGGGAUGGCACCCGCGCUGCAGCCCA CGCAGGGGGCAAUGCCGGCCUUUGCGUCCG CGUUUCAGCGCAGGGCGGGUGGAGUCCUCG UAGCGAGCCACCUUCAAUCAUUUUUGGAA GUCUCGUACCGGGUGCUGAGACAUCUUGCG CAGCCGUGAUAUAGGCUGGAGCCUCGGUG GCCAUGCUCUUGCCCCUUGGGCCUCCCCC CAGCCCCUCCUCCCCUCCUGCACCCGUACC CCCGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGG CGGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	
--	--	--

10

20

キャッピング

最後のIVTステップから溶離したRNA (220 μL) は、65 °Cまで15分間加熱した後、少なくとも2分間冷却することにより、変性させた。キャッピング反応は、変性RNA (220 μL)、GTP (1 mM)、SAM (0.5 mM)、RNase阻害剤 (1 U/μL)、1×キャッピングバッファー、及びワクシニアキャッピング複合体 (0.4 U/μL) (NEB) を含む300 μL中で実施した。これらの反応物はサーモミキサー上で、37 °Cで2時間インキュベートした。メガクリア (MEGAclear) スピニングカラム (アンピオン (Ambion)) を用いて反応物を精製した後、250 μL中に溶離させた。溶離したmRNAをCE (アジレント (Agilent) 2100 バイオアナライザ (Bioanalyzer)) により分析し、UV吸光度により定量した。

30

【1112】

実施例 15. 3'-アジド-2', 3'-ジデオキシアデノシン-5'-三リン酸 (3'-アジド-ddATP) の組み込み

スキーム 1 に描く通りに、酵母ポリ (A) ポリメラーゼを用いて、3'-アジド-ddATPをテイルなしのRNA 1~3 (表 10) の3'末端に組み込んだ。100 μLの反応物中で、RNA転写物 (0.2 μM)、3'-アジド-ddATP (500 μM)、マウスRNase阻害剤 (NEB) (1 U/μL)、1×反応バッファー (20 mM トリス-HCl、pH 7.0、0.6 mM MnCl₂、20 μM EDTA、0.2 mM DTT、100 μg/mLのアセチル化BSA、10%グリセロール)、及び酵母ポリ (A) ポリメラーゼ (2400 U、アフィメトリックス (Affymetrix)) を37 °Cで1時間インキュベートした後、エタノール沈殿を実施した。RNAを100 μLのDEPC処理H₂Oに溶解させてから、イラストラ・ニック (illustra NICK) カラム又はイラストラ・マイクロスピニング (illustra MicroSpin) G-25カラム (GEヘルスケア (GE Healthcare)) を用いたゲル濾過によりさらに精製した。必要であれば、アミコン・ウルトラ (Amicon Ultra) - 0.5遠心分離装置 (100 K NMWL) を用いた限外濾過によりRNAを濃縮し、UV吸光度により定量して、キャピラリー電気泳動 (CE) (アジレント (Agilent) 2100 バイオアナライザ (Bioanalyzer)) により分析した (図 13)。こ

40

50

の時点で得られたRNAは、CEにより識別することができない非修飾及び3'-アジドRNAの混合物であり、この混合物は、これ以上精製せずに、後の反応に使用した。

【1113】

【化52】



10

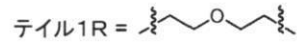
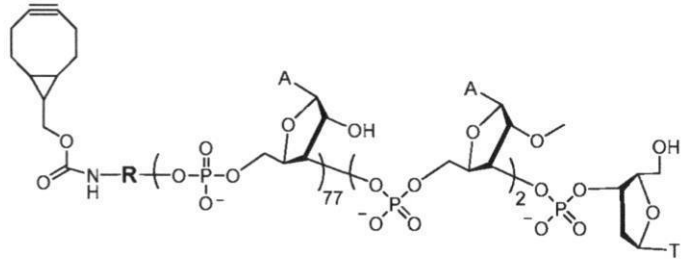
スキーム1．酵母ポリ(A)ポリメラーゼを用いたRNAの3'末端への3'-アジドdATPの組み込みによる3'-アジドRNAの一般的合成

歪促進アジド-アルキン環状付加(SPAAC)ケミストリーを用いて、RNA-ポリ(A)テイルコンジュゲートを作製するために、5'-ビシクロ[6.1.0]ノニン(BCN)ポリ(A)テイル1~6を合成した。テイル1及び4は、固相ホスホロアミダイトオリゴマー化技術により直接合成することができたが、テイル2、3、5、及び6は、

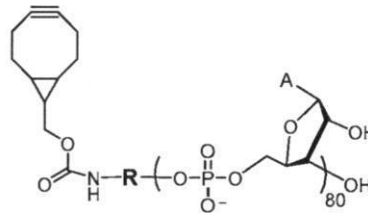
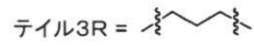
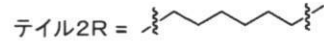
20

【1114】

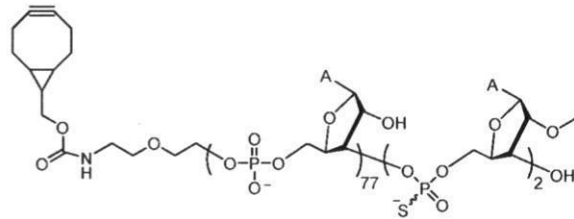
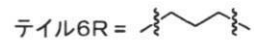
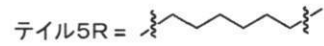
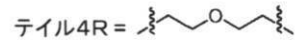
【化53-1】



10

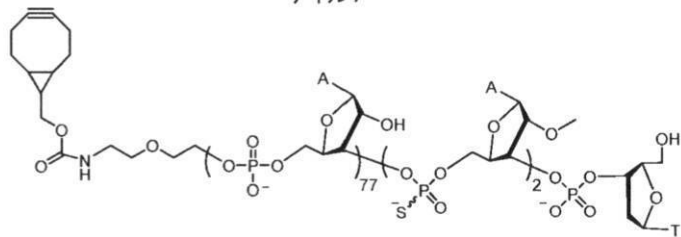


20



30

テイル7

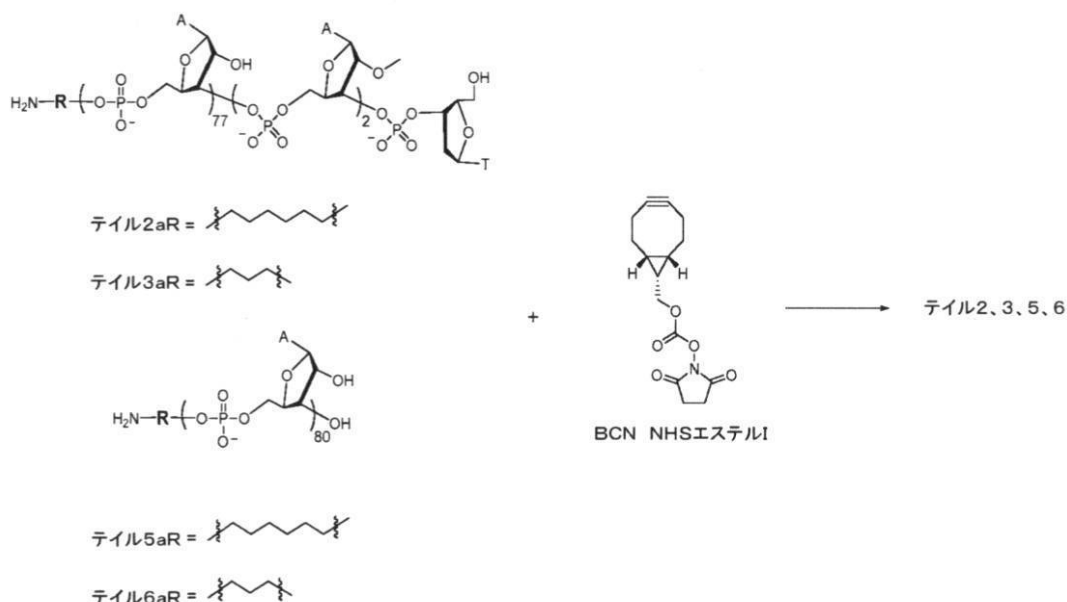


40

テイル8

【1115】

【化53-2】



10

スキーム2. テイル2、3、5、及び6の合成は、対応する5'-アミノオリゴリボヌクレオチドをBCN N-ヒドロキシスクシンイミドエステルIにカップリングすることにより達成した。

20

【1116】

テイル1、2a、3a、4、5a、6a、7及び8は、固相ホスホロアミダイトオリゴマー化技術を用いて、エクスペディテ (Expedite) 8909 DNA/RNA シンセサイザー (パースペクティブ (Perspective)) 上にアセンブリした。合成は、多孔性ガラス (CPG、1000) 製の固体支持体上で、3'末端に3'-3'-結合を生成する31 μmol/gのロード量の固定化3'-O-ジメトキシトリチル-チミジン (プライム・シンセシス (Prime Synthesis)、米国、ペンシルベニア州アストンから入手) か、又は32 μmol/gでロードされる固定化5'-O-ジメトキシトリチル-アデノシン (ケムジェネズ (Chemgenes)、マサチューセッツ州ウィルミントン; 米国) のいずれかで開始した。意図する配列の合成のために、以下のホスホロアミダイトを使用した: (5'-O-ジメトキシトリチル-N6-(ベンゾイル)-2'-O-t-ブチルジメチルシリル-アデノシン-3'-O-(2-シアノエチル-N,N-ジイソプロピルアミノ)ホスホロアミダイト、(5'-O-ジメトキシトリチル-N6-(ベンゾイル)-2'-O-メチル-アデノシン-3'-O-(2-シアノエチル-N,N-ジイソプロピルアミノ)ホスホロアミダイト (SAFCプロリゴ (SAFC ProliGo)、ドイツ、ハンブルク) 及び5'-クリック-イージー (5'-Click-easy) (登録商標) BCN CEP II (ベリー・アンド・アソシエイツ社 (Berry & Associates, Inc.)、米国ミシガン州デクスター)。

5'末端にアミノ-リンカーを導入するために、トリフルオロアセチル (TFA) 保護アミノヘキシルホスホロアミダイト (SAFCプロリゴ (SAFC ProliGo)、ドイツ、ハンブルク) のいずれかを使用した。3'-アミノリンカーは、プライム・シンセシス (Prime synthesis) から入手可能なフタルイミジル保護アミノヘキシル誘導体化CPG又はグレン・リサーチ (Glen Research) (米国バージニア州スターリング) から入手可能なフタルイミジル保護アミノプロピル誘導体化CPGを用いて作製した。アミダイトを全て無水アセトニトリル (100 mM) に溶解させ、分子篩 (3) を添加した。5-エチルチオテトラゾール (ETT、アセトニトリル中500 mM) を活性化剤溶液として使用した。カップリング時間は、ヌクレオシドホスホロアミダイトの場合5分、リンカーアミダイトの場合12分であった。ホスホロチオエート結

30

40

50

合を導入するために、無水アセトニトリル/ピリジン(1:1 v/v)中の50 mM溶液の3-(ジメチルアミノ-メチリデン)アミノ)-3H-1,2,4-ジチアゾール-3-チオン(DDTT、ケムジーンズ(Chemgenes)から入手)を使用した。RNA合成のためのアンシラリー(Ancillary)試薬(デブロック(Deblock)、オキシダイザー(Oxidizer)、キャップ(Cap)A及びキャップ(Cap)B)は、SAFCプロリゴ(SAFC Proligo)(ドイツ、ハンブルク)から購入した。固相合成の完結後、乾燥させた固体支持体を15 mLのポリプロピレンチューブに移し、RNAを固体支持体から切断した後、当技術分野で公知の方法(ウィンコットF.(Wincott F.)ら著、核酸研究(Nucleic Acid Res.), 1995年、第23巻、p.2677~84)により脱保護した。

10

【1117】

AKTAエクスプローラ(AKTA Explorer)システム(GEヘルスケア(GE Healthcare)、ドイツ、フライブルク)上で、Xブリッジ(XBridge)C18 19x50 mmカラム(ウォーターズ(Waters)、ドイツ、エシュボルン)を用いたRP HPLCにより、粗オリゴマーを精製した。バッファーAは、100 mM酢酸トリエチルアンモニウム(バイオソルブ(Biosolve)、オランダ、ファルケンスワルト)であり、バッファーBは、バッファーA中に95%アセトニトリルを含有した。15 mL/分の流量を使用した。260及び280でのUVトレースを記録した。57カラム容量内の5%Bから45%Bへの勾配を使用した。適切な画分をプールし、3M NaOAc、pH=5.2及び70%エタノールで沈殿させた。ペレットを遠心分離により単離し、水に溶解させた後、溶液の濃度をUV光度計(エッペンドルフ(Eppendorf)、ドイツ)を用いた260 nmでの吸光度測定により決定した。あるいは、オートサンブラA905及びFrac950(GEヘルスケア(GE Healthcare)、ドイツ、フライブルク)を備えたAKTAピュリファイア(AKTA Purifier)上で、ダイオネクス(Dionex)DNA Pac PA200カラム(9x250 mm)を用いたアニオン交換HPLCにより粗オリゴマーを精製した。10 mM NaClO₄、20 mMトリス、100 mM EDTA、20%アセトニトリルを含有するバッファーAと、バッファーA中に500 mM NaClO₄を含有するバッファーBから構成されるバッファー系を用いて、修飾RNA配列を溶離した。15カラム容量(CV)内で5 mL/分の流量及び5%バッファーBから95%バッファーBへの勾配を使用した。溶離を280 nmで記録し、適切なサイズの画分を採取した。所望の配列を含む画分をプールし、3M NaOAc、pH=5.2及び70%エタノールで沈殿させた。ペレットを遠心分離により単離し、85%エタノールで洗浄してから、水に溶解させた後、UV光度計(エッペンドルフ(Eppendorf)、ドイツ)を用いた260 nmでの吸光度測定により、溶液の濃度を決定した。

20

30

【1118】

上記のスキーム2に描く通りのNHSケミストリーによりテイル2、3、5、及び6を生成するカップリングステップのために、それぞれのアミン修飾オリゴリボヌクレオチドは、500 µMの濃度をもたらすように、100 mMホウ酸ナトリウム/KClバッファー(pH 8.5)に溶解させた。クリック-イージー(Click-easy)(登録商標)BCN N-ヒドロキシスクシンイミドエステルI(5 mg、ベリー・アンド・アソシエイツ社(Berry & Associates, Inc.))、米国ミシガン州デクスター)を50 µLのDMSOに溶解させた。3当量のBCN誘導体をRNA溶液に添加することにより、反応を開始した。反応の進行は、アニオン交換HPLCカラム(ダイオネクス(Dionex)DNA Pac PA200、4x250 mm、ダイオネクス(Dionex)、ドイツ、イトシュタイン)上の保持時間の変化によりモニターした。反応の完了後、3M NaOAc(pH 5.2)/EtOHを用いて、オリゴリボヌクレオチドコンジュゲートを沈殿させてから、C18 Xブリッジ(XBridge)逆相HPLCカラム(ウォーターズ(Waters)、ドイツ、エシュボルン)上で精製した。オリゴリボヌクレオチドの分析を表11に示す。表11において、「a」は、RP-HPL

40

50

Cにより決定した純度を指し、「b」は、AEX-HPLCにより決定した純度を指す。

【1119】

【表11】

表 11. テイル1~8のESI-MS及び純度分析

	分子量 (計算値)	分子量 (観測値)	RPによる純度(%)
テイル 1	26951.2	26950.5	92.6 ^a
テイル 4	26619.2	26618.7	97.0 ^a
テイル 2	26961.1	26962.8	91.1 ^a
テイル 3	26921.2	26920.4	97.1 ^a
テイル 5	26631.1	26632.9	93.4 ^a
テイル 6	26589.1	26588.2	98.3 ^a
テイル 7	26618.2	26622.4	86.6 ^b
テイル 8	26630.1	26631.2	85.4 ^b

実施例 16 . 5' - 三リン酸、3' - シクロオクチンオリゴ合成

5' - 三リン酸及び3' - シクロオクチンを含むTPオリゴ1及び2の構造及び配列を以下に示す。5' - 三リン酸は、エクシュタイン (Eckstein) (有機化学会誌 (J. Org. Chem)、1989年、第54巻、p. 631~635) により考案された手法から改変されたブラウンリー (Brownlee) ら (核酸研究 (Nucleic Acid Res)、1995年、第14巻、p. 2641~2647) により公開された方法に従い、若干の変更を加えて合成した。手短には、前述の方法に従って、最終DMT基の除去 (「DMTオフ」合成) を備えたフタルイミジル保護アミノプロピル誘導体化多孔性ガラス (CPG) により、1 μモルスケールで対応するRNA配列を合成した。自動化合成の完了後、合成カラムを5 mLアセトニトリルで洗浄し、アルゴンフラッシュで洗浄した。続いて、2つの注射器を用いて、アセトニトリル中の125 mM 2 - クロロ - 4 H - 1, 3, 2 - ベンゾジオキサホスホリン - 4 - オン (サリチルホスホクロリダイト、TCIヨーロッパ (TCI Europe)、ドイツ、エシュボルンから入手) 及びアセトニトリル中の50% 2, 6 - ルチジンの1:1混合物2 mLで、合成カラム内のCPG結合RNAを室温で5分間処理した。次に、試薬混合物を除去し、アセトニトリル (10 mL) でCPGを入念に洗浄した後、アセトニトリル中の125 mMトリブチルアンモニウムピロリン酸塩2 mLと一緒に室温で15分のインキュベーションを実施した。ピロリン酸塩は、公開された手順 (核酸化学における最新プロトコル (Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry)、1.28.1~1.28.16) に従って調製した。アセトニトリル (10 mL) でこの試薬を洗い流した後、固相RNA合成で使用されている酸化剤溶液 (水/ピリジン10/90 v/v中100 mMヨウ素) を用いて、酸化 (5分) を達成した。最後に、再度アセトニトリルで酸化剤溶液を洗い流した後、40%アセトニトリル中の100 mMトリエチルアンモニウム重炭酸塩2 mLで、CPGを室温で2時間処理した。CPGをアセトニトリルで洗浄し、真空を適用して15分間乾燥させた後、前述の標準的RNA脱保護に従って脱保護した。

【1120】

オートサンブラA905及びFrac950 (GEヘルスケア (GE Healthcare)、ドイツ、フライブルク) を備えたAKTAピュリファイア (AKTA Purifier) 上で、ダイオネクス (Dionex) DNA PAC PA200カラム (9 x 250 mm) を用いたアニオン交換HPLCにより、粗5' - 三リン酸RNA配列を精製した。10 mM NaClO₄、20 mMトリス、100 mM EDTA、20%アセトニトリルを含有するバッファーAと、バッファーA中に500 mM NaClO₄を

10

20

30

40

50

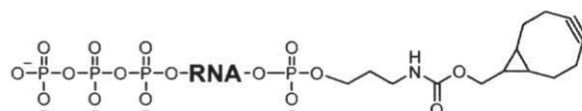
含有するバッファー B から構成されるバッファー系を用いて、修飾 RNA 配列を溶離した。15 カラム容量 (CV) 内での 5 mL / 分の流量及び 5 % バッファー B から 75 % バッファー B への勾配を使用した。溶離を 280 nm で記録し、適切なサイズの画分を採取した。所望の配列を含む画分をプールし、3 M NaOAc、pH = 5.2 及び 70 % エタノールで沈殿させた。

【1121】

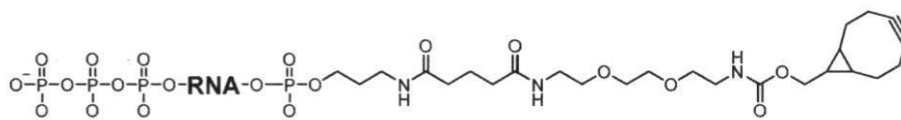
3'-アミノプロピル誘導体化三リン酸 RNA を含有するペレットを 100 mM ホウ酸ナトリウム / KCl バッファー (pH 8.5) に溶解させて、約 500 μM の濃度を得た。以下の表に示す配列を生成するために、クリック - イージー (CLICK - EASY) (登録商標) BCN N - ヒドロキシスクシンイミドエステル I 又はクリック - イージー (CLICK - EASY) (登録商標) BCN N - ヒドロキシスクシンイミドエステル II (いずれも、ベリー・アンド・アソシエイツ社 (Berry & Associates, Inc.)、米国ミシガン州デクスターから入手可能である) のいずれかと、前述の手順に従い反応させた。

【1122】

【化54】



TPオリゴ1



TPオリゴ2

TPオリゴ1及びTPオリゴ2の配列を表12に示す。表12において、Aは、RNA - Aを表し；Cは、RNA - Cを表し；Gは、RNA - Gを表し；(C3NH)は、アミノプロピルであり；(BCN1)は、クリック - イージー (CLICK - EASY) (登録商標) BCN N - ヒドロキシスクシンイミドエステル I であり；(COM - NHS)は、クリック - イージー (CLICK - EASY) (登録商標) BCN N - ヒドロキシスクシンイミドエステル II であり；(ppp)は、三リン酸を表す。

【1123】

【表12】

表 12. TP オリゴ配列

	配列(5'—3')	配列番号
TPオリゴ1	(ppp)GGACAACAACAACAACAACAA(C3NH)(BCN1-NHS)	18
TPオリゴ2	(ppp)GGACAACAACAACAACAACAA(C3NH)(COM-NHS)	19

表 13 は、EMI - MS 並びに TPオリゴ1 及び 2 の純度分析を示す。

【1124】

【表 13】

表 13. TPオリゴ1及び2のESI-MS及び純度分析

	純度 (%AEX)	MW (計算値)	MW (測定値)
TPオリゴ1	83.6	7292.5	7292.4
TPオリゴ2	80.4	7458.6	7455.7

実施例 17 . 歪促進アジド - アルキン環状付加 (SPAAC) を用いたポリ (A) テイル共役 10

歪促進アジド - アルキン環状付加 (SPAAC) を用いて、3'末端が3'-アジド-ddATPで修飾されたRNA転写物を80nt5'-BCNポリ(A)テイルに連結することにより、スキーム3に示す一般的形態のRNA-ポリ(A)テイルコンジュゲートを取得した。3'-アジドRNA1~3とテイル1を少なくとも1:50モル比で水中に混合してから、70%エタノールの最終濃度に達するまで、エタノールで希釈した。一般に、3'-アジドRNAの濃度は、反応混合物中150~400nMであった。反応物を室温で1時間振盪させ、必要であれば200μLまで水で希釈し、エタノール沈殿させた後、DEPC処理水に溶解させる。あるいは、メガクリア(MEGAClear)キット(アンピオン(Ambion))により反応物を精製した後、水中に溶離させた。RNA反応混合物は、図14に示すように、CE(アジレント(Agilent)2100バイオアナライザ(Bioanalyzer))により分析した。レーン3、5、及び7のシフトしたバンドは、それぞれ、スキーム3に描く形態のコンジュゲートRNA1-テイル1、RNA2-テイル1、及びRNA3-テイル1を表す。CEから決定されたRNA-テイル1コンジュゲートの変換収率は、RNA1が71%、RNA2が80%、RNA3が75%であった。 20

【1125】

また、上記と同様に、T7RNAポリメラーゼによる転写を介したポリ(A)テイルを既に含むRNA4及びRNA5と、テイル1及び4とを用いてコンジュゲートを作製した。これらの反応(CE)からの変換収率は、全て約95%であった。6M塩酸グアニジンの存在下での変性限外濾過を使用して、余剰の非反応5'-BCNテイルを除去した。水によるUFバッファー交換により塩類を除去した後、テイルの除去をCEにより確認した。 30

【1126】

【表 14】

表 14.オリゴ(T)精製後のRNA-テイルコンジュゲートの収率及び純度

	% 収率	% 純度(CE)
RNA 1-テイル 1	36	78
RNA 1-テイル 2	32	76
RNA 1-テイル 3	33	75
RNA 1-テイル 4	38	80
RNA 1-テイル 5	30	76
RNA 1-テイル 6	36	70
RNA 1-テイル 7	39	66
RNA 1-テイル 8	36	67
RNA 2-テイル 1	45	92
RNA 2-テイル 4	46	90
RNA 3-テイル 1	43	95
RNA 3-テイル 4	44	97

10

20

30

実施例 19 . S P A A C を用いた D N A スプリント 鑄型化 5' - オリゴ 共役

ワクシニアキャッピング複合体 (N E B) を用いて、 T P オリゴ 1 及び 2 を酵素的にキャッピングした。反応の前に、 65 °C で 10 分間加熱することにより、 R N A オリゴを変性させた後、氷上で冷却した。キャッピング反応は、変性 R N A (15 μ L)、 G T P (1 m M)、 S A M (0 . 5 m M)、 R N a s e 阻害剤 (1 U / μ L)、 1 × キャッピングバッファー、及びワクシニアキャッピング複合体 (0 . 4 U / μ L) を含む 100 μ L 中で実施する。これらの反応物は、サーモミキサ上で 37 °C にて 1 時間加熱し、フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール (25 : 24 : 1) で 2 回抽出した後、エタノールで沈殿させた。キャップ付加したオリゴは、図 17 に示すように、変性 P A G E により

40

【 1 1 2 8 】

配列 5' - A C T C T T C T T T T C T C T C T T A T T T C C C T T G T T G T T G T T G T T G T T G T C C - 3' (配列番号 22) を有するスプリントを用いた以外は、前述と同様に、キャップ付加 T P オリゴ 1 及び 2、並びに 5' - アジド R N A 5 を用いて、 D N A スプリント 鑄型環状付加を実施した。非キャップ付加 T P オリゴ 1 及び 2 とのクリック反応も対照として実施した。 5' - アジド R N A 5 は、 m R N A 構築物の合成 (s y n t h e s i s o f m R N A C o n s t r u c t s) のセクションに記載する通りに作製した。前述したように、 70 % エタノール中の 5' - B C N テイルとの S P A A

50

C反応を実施することにより、5'-アジドRNA5及びキャップ付加TPオリゴ-RNA5コンジュゲートを分析した。図18に示すように、クリック及び非クリック5'-アジドRNA5の比を決定し、5'-アジ化物の完全反応を仮定することにより、RNA5への5'-アジドGの組み込みが75%であることが判明した。図18において、レーン1はラダー、レーン2は5'-アジドRNA5、レーン3は、非キャップ付加TPオリゴ1-RNA5コンジュゲート、レーン4は、キャップ付加TPオリゴ1-RNA5コンジュゲート、レーン5は、非キャップ付加TPオリゴ2-RNA5コンジュゲート、レーン6は、キャップ付加TPオリゴ1-RNA5コンジュゲートである。レーン7~11は、5'-BCNテイルとのSPAAC反応後の前述のサンプルである。

【1129】

しかしながら、キャップ付加TPオリゴ-RNA5コンジュゲートは、5'-BCNテイルとの反応を示さなかったが、これは、5'-アジドRNA5が全て反応したことを示している。キャップ付加TPオリゴ-RNA5コンジュゲート反応混合物の約25%が5'-三リン酸RNA5を含有するものの、これらのコンジュゲートは、それ以上精製せずに、トランスフェクション実験に進めた。

【1130】

実施例20. 3'-アジド-ddATP組み込みの分析

70%エタノール中でのSPAAC反応後、RNA種の混合物が生成されるが、これは、恐らく、非修飾RNA、非処理3'-アジドRNA、及び所望のRNA-テイル1コンジュゲートを含有している。しかし、非修飾RNAと3'-アジドRNAは識別不能であるため、これは、CE電気泳動図の2つの明瞭なピークに対応するに過ぎない。3'-アジドRNA及びRNA-テイル1コンジュゲートは、ポリ(A)ポリメラーゼによるポリ(A)伸長のために3'-末端でブロックされることから、非修飾RNAだけが酵素的テイル付加のための基質である。図19に示すように、非修飾RNA、従って、3'-アジドRNAの割合(%)は、非修飾RNAの除去及びRNA-テイル1コンジュゲートピークの面積への正規化後の非修飾RNA及び3'-アジドRNA混合物に対応するピークの間面積の差(%)を計算することによって決定することができる。多くの事例で、クリック反応は、記載の条件下で完了まで進行するため、単純にRNA-テイル1コンジュゲートの収率(%)を決定するだけでアジ化物組み込みの定量が可能である。

【1131】

10µLにおいて、70%エタノール中でのSPAAC反応後のRNA混合物は、RNA反応混合物(300~400ng/µL)、ATP(1mM)、及び1x反応バッファー(50mMトリス-HCl、pH7.9、250mM NaCl、10mM MgCl₂)を含有する反応物において、大腸菌(E. coli)ポリ(A)ポリメラーゼ(NEB)(5U)で処理した。酵素を一切含まない反応物も、比較対照のために使用した。全ての非修飾RNAがテイル付加されていることを確認するために、非修飾RNAをテイル1と混合した後、ポリ(A)ポリメラーゼで処理した対照も実施した。限外濾過により反応物から塩類を除去した後、CEにより反応物を分析した。図20は、このようにして分析したRNA1、2、及び3のCEゲルイメージを示す。対照反応物では、PAPでの処理により、全ての非修飾RNAが延伸された。これらの全事例で、SPAAC反応及びPAPによる処理後、非修飾RNA及び3'-アジドRNAの推定混合物を示すピーク中にRNAは一切残っておらず、これは、クリック反応が完了に達し、アジ化物の組み込みが、RNA-テイルコンジュゲートの収率(%)から決定することができることを示している。これらの実施例の場合、アジ化物の組み込みは、RNA1が60%、RNA2が60%、及びRNA3が75%であった。

【1132】

実施例21. mチェリー(mCherry)蛍光の曲線下総面積

リポフェクタミン(Lipofectamine)2000(商標)を用いて、表示のmRNA(50ng)をヒラ細胞にトランスフェクトした。細胞をインキュサイト(Incyte)動態イメージングシステム(エッセン・バイオサイエンス(Essen

10

20

30

40

50

Bioscience)) 内に配置し、そこで、142時間にわたって2時間毎にmCherry蛍光を測定した。各トランスフェクションは3回反復して実施した。グラフパッド・プリズム(GraphPad Prism)を用いて、曲線下総面積を統合した。表15及び16は、RNA1-テイルコンジュゲート及び適切な対照のmCherry蛍光のAUCを示し、ここで、RNA4及びRNA5は、それぞれ、80-mer及び140-merポリ(A)テイルを含むT7RNAポリメラーゼ転写構築物である。表17は、RNA4-テイルコンジュゲート及びRNA5-テイルコンジュゲートのAUCを示す。表18は、キャップ付加TPオリゴ-RNA5コンジュゲートのAUCを示す。

【1133】

【表15】

10

表 15. RNA 1-テイルコンジュゲートのmCherry蛍光についてのAUC

	平均 AUC (蛍光*hr)	標準偏差
テイルなし RNA 1	2.4E+04	1.2E+04
RNA 4	2.0E+07	0.0E+00
RNA 5	1.3E+07	6.1E+06
RNA 1-テイル1	5.7E+07	1.2E+07
RNA 1-テイル4	9.3E+06	1.2E+06
RNA 1-テイル7	4.0E+07	0.0E+00
RNA 1-テイル8	4.3E+07	1.2E+07

20

【1134】

【表16】

表 16. RNA 1-テイルコンジュゲートのmCherry蛍光についてのAUC

	平均AUC (蛍光*hr)	標準偏差
テイルなし RNA 1	1.5E+06	2.9E+05
RNA 4	7.4E+07	1.8E+07
RNA 5	1.4E+08	2.8E+07
RNA 1-テイル 2	8.3E+07	7.8E+06
RNA 1-テイル 3	8.4E+07	1.5E+07
RNA 1-テイル 5	2.8E+07	2.9E+06
RNA 1-テイル 6	3.7E+07	4.3E+06

30

【1135】

【表 17】

表 17. RNA 4-テイル及びRNA 5-テイルコンジュゲートのmCherry蛍光についての
AUC

	平均AUC (蛍光 *hr)	標準偏差
RNA 4	2.7E+08	5.8E+07
RNA 5	3.0E+08	1.0E+08
RNA 4-テイル 1	3.3E+08	1.5E+08
RNA 4-テイル 4	3.3E+08	5.8E+07
RNA 5-テイル 1	2.7E+08	5.8E+07
RNA 5-テイル 4	3.0E+08	0.0E+00

10

【 1 1 3 6 】

【表 18】

表 18. キャップ付加TPオリゴ-RNA 5コンジュゲートのmCherry蛍光についての
AUC

	平均AUC (蛍光 *hr)	標準偏差
5'-アジドRNA 5	1.0E+06	0.0E+00
RNA 5	6.7E+07	3.3E+07
非キャップ付加TPオリゴ 1- RNA 5	4.3E+06	2.2E+06
キャップ付加TPオリゴ 1- RNA 5	8.7E+07	2.0E+07
非キャップ付加TPオリゴ 2- RNA 5	2.3E+06	1.3E+06
キャップ付加TPオリゴ 2- RNA 5	5.7E+07	2.1E+07

20

30

実施例 22 . ヒーラ細胞におけるナノルシフェラーゼ (Nano Luciferase) 活性

表示の mRNA (25 ng) は、リポフェクタミン (Lipofectamine) 2000 (商標) を用いて、ヒーラ細胞に3回反復してトランスフェクトした。一晚のインキュベーション後、GLO溶解バッファー (プロメガ (Promega)) 中に細胞を溶解させた。NanoGlo基質を添加し、シナジー・マイクロプレート・リーダー (Synergy Microplate Reader) (バイオテック (BioTek)) を用いて、発光シグナルを定量した。表 19 は、RNA 2 - テイルコンジュゲート及び適切な対照のナノルシフェラーゼ (nano Luciferase) 活性を示し、ここで、RNA 6 は、140 - mer ポリ (A) テイルを含む T7 RNA ポリメラーゼ転写構築物である。

40

【 1 1 3 7 】

【表 19】

表 19. RNA 2-テイルコンジュゲートのナノルシフェラーゼ(NanoLuciferase)活性

	平均 (RLU)	標準偏差
テイルなし RNA 2	7.0E+05	2.4E+05
RNA 6	6.7E+06	6.2E+05
RNA 2-テイル 1	2.9E+07	4.6E+06
RNA 2-テイル 4	2.2E+07	2.1E+06

10

実施例 23 . ヒーラ細胞におけるヒト G C S F 発現

表示の mRNA (250 ng) は、リポフェクタミン (Lipofectamine) 2000 (商標) を用いて、ヒーラ細胞に3回反復してトランスフェクトした。一晚のインキュベーション後、上清を回収し、これを用いて、ヒト G C S F のレベルを測定した (R & D システムズ (R & D Systems))。表 20 は、RNA 3 - テイルコンジュゲート及び適切な対照の発現レベルを示し、ここで、RNA 7 は、140 - mer ポリ (A) テイルを含む T7 RNA ポリメラーゼ転写構築物である。

【1138】

【表 20】

20

表 20. RNA 3-テイルコンジュゲートのヒト GCSF 発現

	平均 (pg/mL)	標準偏差
テイルなし RNA 3	6.8E+03	2.2E+02
RNA 7	4.0E+05	9.5E+04
RNA 3-テイル 1	1.9E+05	2.8E+04
RNA 3-テイル 4	2.1E+05	2.2E+04

30

実施例 24 . mRNA でトランスフェクトした B J 線維芽細胞の上清中の I F N レベル

表示の mRNA (500 ng) は、リポフェクタミン (Lipofectamine) 2000 (商標) を用いて、B J 線維芽細胞に3回反復してトランスフェクトした。48 時間のインキュベーション後、上清を回収し、これを用いて、ヒトインターフェロンのレベルを測定した (R & D システムズ (R & D Systems))。表 21 は、RNA 2 - テイルコンジュゲート及び適切な対照について検出された I F N の量を示し、ここで、RNA 6 は、140 - mer ポリ (A) テイルを含む T7 RNA ポリメラーゼ転写構築物であり、野生型 RNA 6 は、修飾ヌクレオチドなしで転写される。

【1139】

40

【表 2 1】

表21. RNA 2-テイルコンジュゲートのINF β 誘導性発現

	平均 (pg/mL)	標準偏差
テイルなしRNA 2	450	29
野生型RNA 6	2700	50.0
RNA 6	13	0.3
RNA 2-テイル1	67	4.2
RNA 2-テイル4	140	11

10

その他の実施形態

使用してきた語句は、限定ではなく説明の語句であること、その広範な態様において、本発明の範囲及び精神を逸脱することなく添付の特許請求の範囲の範囲内で変更が為され得ることは理解すべきである。

【1140】

本発明は、いくつかの記載した実施形態に関してある程度の長さで、ある程度の具体性をもって説明してきたが、いずれかのこうした具体的事項若しくは実施形態、又はいずれかの具体的実施形態に本発明を限定することを意図するものではなく、従来技術を考慮して、特許請求の範囲の考えられる最も広義の解釈をもたらすように、従って、本発明の意図される範囲を実質的に包含するように、添付の特許請求の範囲を参照して解釈すべきである。

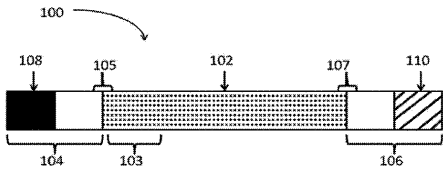
20

【1141】

本明細書に挙げる全ての刊行物、特許出願、特許、及び他の参照文献は、全体として参照により本明細書に組み込むものとする。矛盾が生じる場合には、定義を含む本明細書が優先される。加えて、セクションの見出し、材料、方法、及び実施例は、例示的であるに過ぎず、限定的であることを意図するものではない。

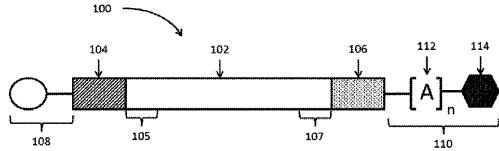
【 図 1 A 】

A.

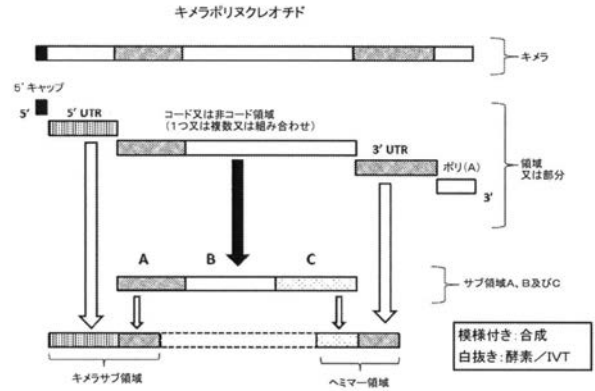


【 図 1 B 】

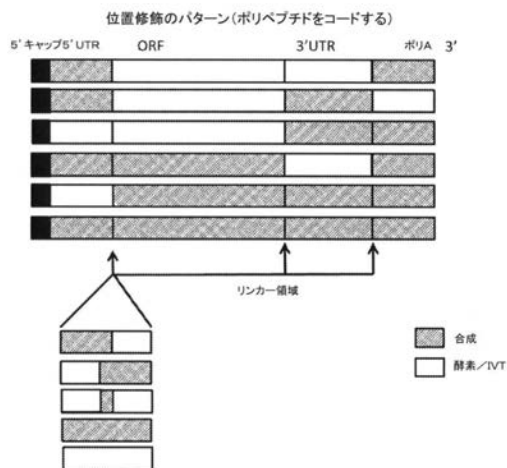
B.



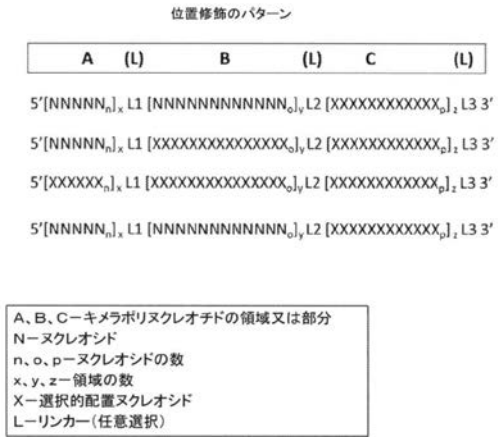
【 図 2 】



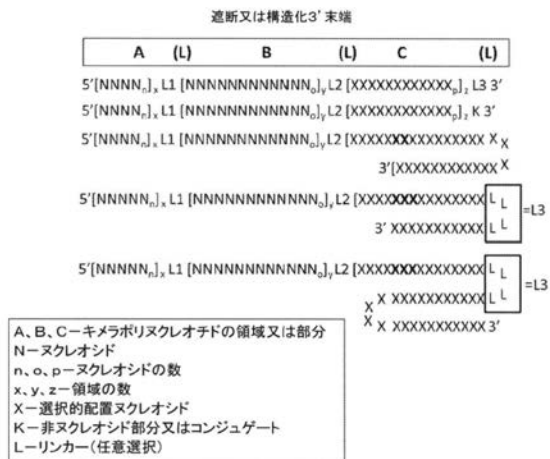
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】

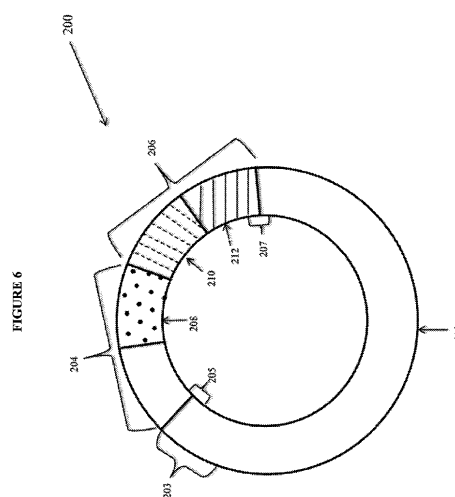


FIGURE 6

【 図 7 】

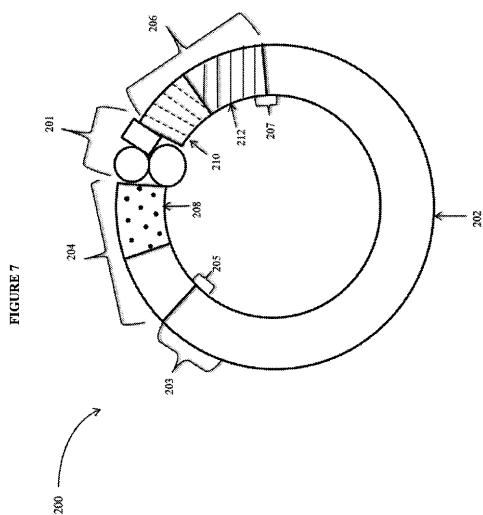


FIGURE 7

【 図 8 】

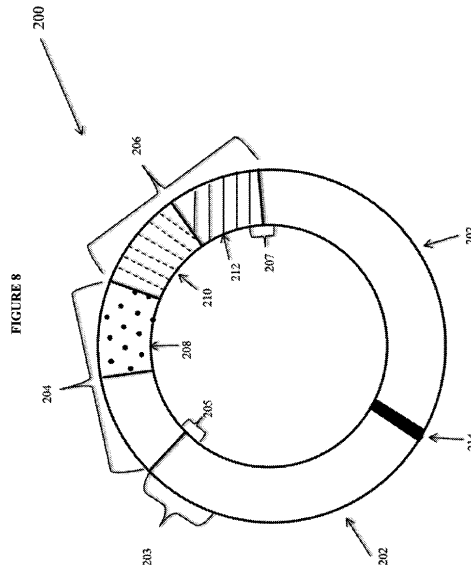
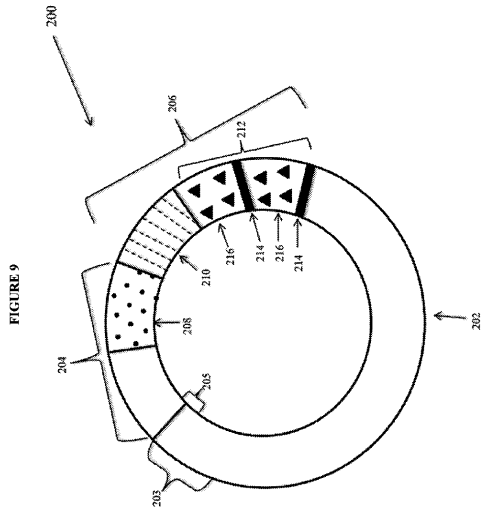
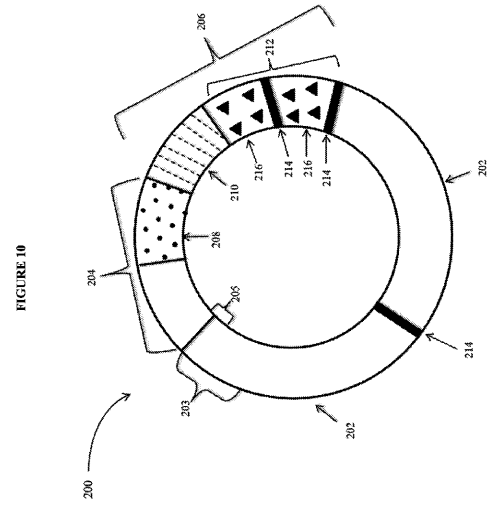


FIGURE 8

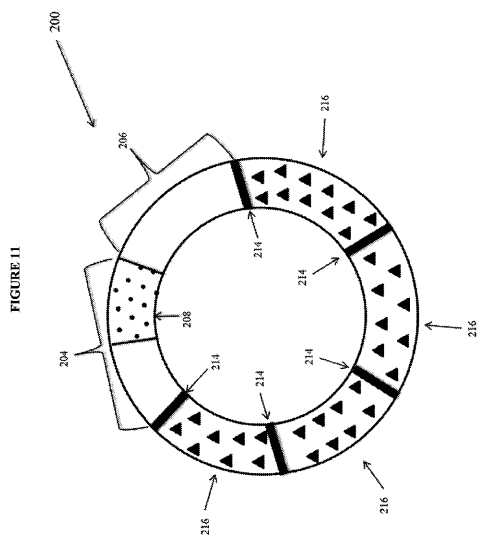
【 図 9 】



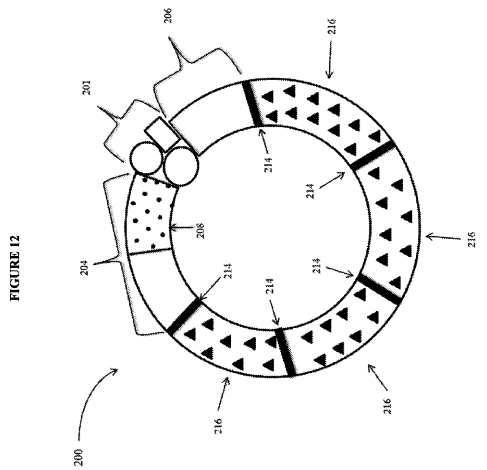
【 図 10 】



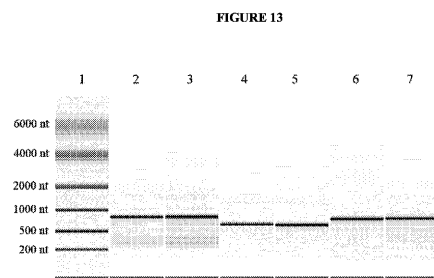
【 図 11 】



【 図 12 】

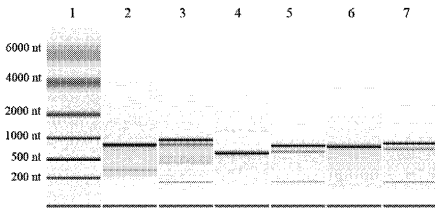


【 図 13 】

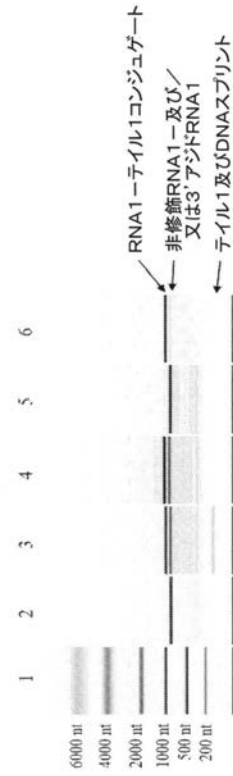


【 図 1 4 】

FIGURE 14

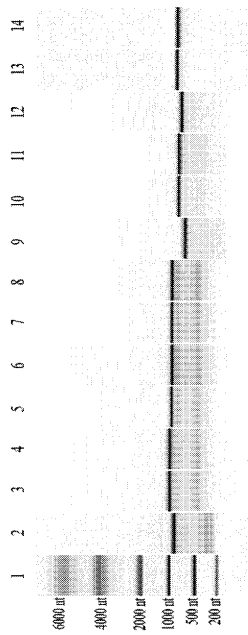


【 図 1 5 】



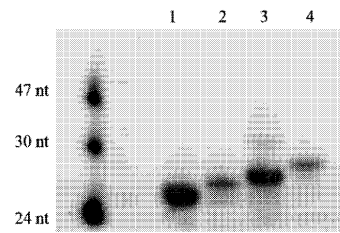
【 図 1 6 】

FIGURE 16



【 図 1 7 】

FIGURE 17



【 図 18 】

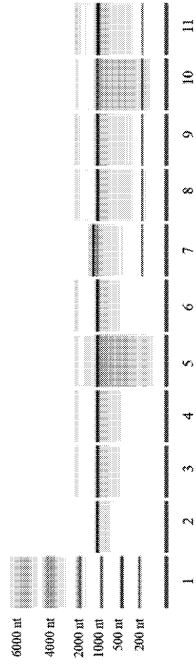
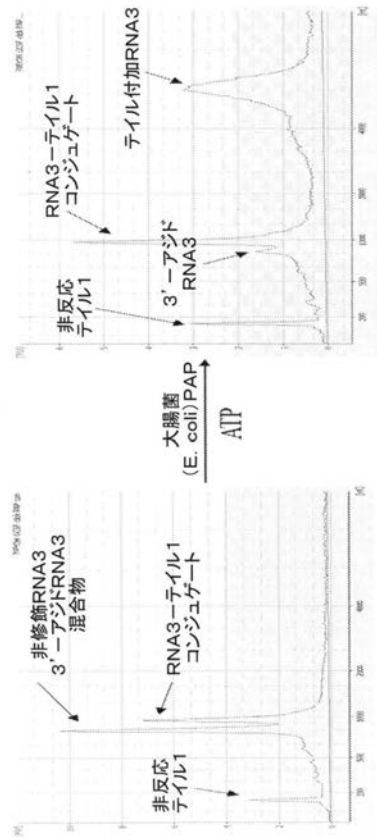


FIGURE 18

【 図 19 】



【 図 20 】

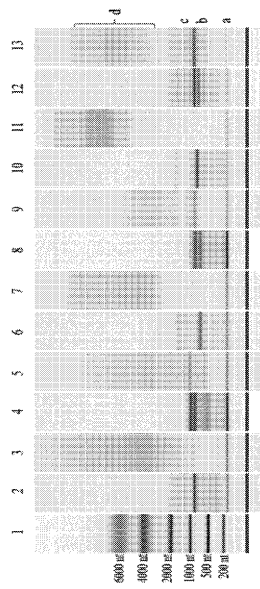


FIGURE 20

【配列表】

2017524357000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 15/40699

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC(8) - C07H 21/02 (2015.01) CPC - C07H 21/02; C07H 19/14; C07H 19/12; C07D 201/02 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) IPC(8): C07H 21/02 (2015.01) CPC: C07H 21/02; C07H 19/14; C07H 19/12; C07D 201/02		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC: 536/23.1; 536/25.3		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatBase, Google Scholar, PubWEST chimeric polynucleotides/oligonucleotides, synthesis, thiophosphoramidate, phosphorodithiolate, click chemistry, azide-alkyne cycloaddition		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2002/0164635 A1 (SALERNO) 07 November 2002 (07.11.2002) para [0010], [0016], [0018], [0021]	1-9, 28-34
Y	WO 2013/090186 A1 (DE FOUGEROLLES et al.) 20 June 2013 (20.06.2013) para [0006]-[0008], [0135], [0220], [0372], [0376]	1-9, 28-30
Y	US 2013/0046083 A1 (BROWN et al.) 21 February 2013 (21.02.2013) para [0012], [0022], Fig 9	30-32
Y	US 2007/0037770 A1 (GRAYAZNOV et al.) 15 February 2007 (15.02.2007) para [0008]-[0009], [0017], [0037]-[0040], Fig 1C	2-9, 29
Y	OLESIAK et al. 'The synthesis of di- and oligonucleotides containing a phosphorodithioate internucleotide linkage with one of the sulfur atoms in a 5'bridging position', Organic & Biomolecular Chemistry, 2009, Vol.7, pp. 2162-2169. abstract, scheme	28
Y	WO 2014/081507 A1 (CHAKRABORTY et al.) 30 May 2014 (30.05.2014) para [0003], [0962]-[0964], Table 19	33-34
Y	US 5,034,506 A (SUMMERTON et al.) 23 July 1991 (23.07.1991) col 1, ln 40-56; Fig 1; Fig 3G; Fig 4G-G; col 7, ln 61 to col 8, ln 16; Fig 5; Fig 6	33-34
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T"
"E"	earlier application or patent but published on or after the international filing date	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
"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)	"X"
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	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
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"Y"
		document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
		"&"
		document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
07 September 2015 (07.09.2015)	01 OCT 2015	
Name and mailing address of the ISA/US	Authorized officer:	
Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Lee W. Young	
	PCT Helpdesk: 671-272-4300 PCT OSP: 571-272-1774	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 15/40699

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.: 10-27
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:

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.:

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.

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(72)発明者 ネルソン、ジェニファー アン

アメリカ合衆国 02445 マサチューセッツ州 ブルックリン ワシントン ストリート 4
4 ナンバー416

(72)発明者 フラレー、アンドリュー

アメリカ合衆国 02474 マサチューセッツ州 アーリントン ライト ストリート 81

(72)発明者 ローデン、スミス エイミー

アメリカ合衆国 02143 マサチューセッツ州 サマービル エルム ストリート 23
ユニット 103

Fターム(参考) 4H045 AA10 AA30 BA10 BA17 EA20 FA74