

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2022-539343

(P2022-539343A)

(43)公表日 令和4年9月8日(2022.9.8)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード(参考)	
C 0 8 G	73/04 (2006.01)	C 0 8 G	73/04		4 B 0 2 9
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/09	Z Z N A	4 B 0 6 3
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	15/09	1 1 0	4 B 0 6 5
C 1 2 N	1/00 (2006.01)	C 1 2 N	5/10		4 J 0 4 3
C 1 2 M	1/00 (2006.01)	C 1 2 N	1/00	Z	
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全71頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2021-576885(P2021-576885)	(71)出願人	593089149 プロメガ コーポレイション Promega Corporation アメリカ合衆国 ウィスコンシン 537 11-5399 マディソン ウッズ ホーロード 2800 番地
(86)(22)出願日	令和2年6月23日(2020.6.23)	(74)代理人	100094569 弁理士 田中 伸一郎
(85)翻訳文提出日	令和4年2月22日(2022.2.22)	(74)代理人	100103610 弁理士 吉 田 和彦
(86)国際出願番号	PCT/US2020/039136	(74)代理人	100109070 弁理士 須田 洋之
(87)国際公開番号	WO2020/263825	(74)代理人	100119013 弁理士 山崎 一夫
(87)国際公開日	令和2年12月30日(2020.12.30)	(74)代理人	100123777
(31)優先権主張番号	62/865,638		
(32)優先日	令和1年6月24日(2019.6.24)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA, ,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA( AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く		最終頁に続く

(54)【発明の名称】 細胞中に生体分子を送達するための修飾ポリアミンポリマー

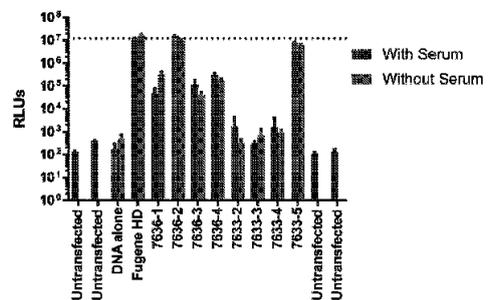
(57)【要約】

本明細書では、細胞に生体分子を送達するための化合物、組成物、及び方法が提供される。特に、本開示は、フッ素置換基を有するポリアミンポリマーを含めた、修飾ポリアミンポリマーを提供する。

【選択図】 図 1 A

FIG. 1A.

Nano-Glo Luminescence for HEK293 Transfections



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

化合物またはその塩であって、前記化合物が、  
 ポリエチレンイミンポリマーと、  
 前記ポリエチレンイミンポリマーのアミノ基に結合した複数の置換基と、を含み、各置換基が独立して、式 (I) を有し、



(I)、

式中、

X が、結合または  $-C(O)-O-$  であり、

n が、0、1、2、3、4、または 5 であり、

Z が、ハロアルキル基、アリール基、置換アリール基、ヘテロアリール基、及び置換ヘテロアリール基から選択される、前記化合物またはその塩。

10

## 【請求項 2】

前記ポリエチレンイミンポリマーが、約 500 Da ~ 約 250000 Da の重量平均分子量を有する、請求項 1 に記載の化合物、またはその塩。

## 【請求項 3】

前記ポリエチレンイミンポリマーが、約 500 Da ~ 約 2000 Da の重量平均分子量を有する、請求項 2 に記載の化合物、またはその塩。

## 【請求項 4】

前記ポリエチレンイミンポリマーが、約 5000 Da ~ 約 250000 Da の重量平均分子量を有する、請求項 2 に記載の化合物、またはその塩。

20

## 【請求項 5】

前記ポリエチレンイミンポリマーが、分岐状ポリエチレンイミンポリマーである、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の化合物、またはその塩。

## 【請求項 6】

前記ポリエチレンイミンポリマーが、直鎖状ポリエチレンイミンポリマーである、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の化合物、またはその塩。

## 【請求項 7】

Z が、以下の式、

$-(CF_2)_m-CF_3$  を有するハロアルキル基であり、式中、m が、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または 10 である、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の化合物、またはその塩。

30

## 【請求項 8】

Z が、ペンタフルオロフェニル基である、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の化合物、またはその塩。

## 【請求項 9】

Z が、非置換ピリジル基である、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の化合物、またはその塩。

## 【請求項 10】

X が、 $-C(O)O-$  であり、

n が、1 または 2 である、

請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の化合物、またはその塩。

40

## 【請求項 11】

Z が、以下の式、

$-(CF_2)_m-CF_3$  を有するハロアルキル基であり、式中、m が、1、2、3、4、または 5 である、請求項 10 に記載の化合物、またはその塩。

## 【請求項 12】

X が、結合であり、

n が、1 または 2 である、

50

請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の化合物、またはその塩。

【請求項 13】

前記ポリエチレンイミンポリマーの前記アミノ基の約 0.1 mol% ~ 約 60 mol% が、式 (I) の置換基に結合している、請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の化合物、またはその塩。

【請求項 14】

前記ポリエチレンイミンポリマーの前記アミノ基の約 5 mol% ~ 約 50 mol% が、式 (I) の置換基に結合している、請求項 13 に記載の化合物、またはその塩。

【請求項 15】

前記ポリエチレンイミンポリマーの前記アミノ基の約 8 mol% ~ 約 40 mol% が、式 (I) の置換基に結合している、請求項 14 に記載の化合物、またはその塩。 10

【請求項 16】

化合物またはその塩であって、前記化合物が、  
ポリ(アミドアミン) dendrimer と、  
前記ポリ(アミドアミン) dendrimer のアミノ基に結合した複数の置換基と、を含み、  
各置換基が独立して、式 (I) を有し、



(I)、

式中、

X が、結合または  $-C(O)-O-$  であり、 20

n が、0、1、または 2 であり、

Z が、ハロアルキル基、アリール基、置換アリール、ヘテロアリール基、及び置換ヘテロアリール基から選択される、前記化合物またはその塩。

【請求項 17】

前記ポリ(アミドアミン) dendrimer が、第 1 世代、第 2 世代、第 3 世代、第 4 世代、第 5 世代、第 6 世代、第 7 世代、第 8 世代、第 9 世代、または第 10 世代ポリ(アミドアミン) dendrimer である、請求項 16 に記載の化合物、またはその塩。

【請求項 18】

前記ポリ(アミドアミン) dendrimer が、第 1 世代、第 2 世代、第 3 世代、または第 4 世代ポリ(アミドアミン) dendrimer である、請求項 17 に記載の化合物、またはその塩。 30

【請求項 19】

Z が、以下の式、

$-(CF_2)_m-CF_3$  を有するハロアルキル基であり、式中、m が、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または 10 である、請求項 16 ~ 18 のいずれか 1 項に記載の化合物、またはその塩。

【請求項 20】

Z が、ペンタフルオロフェニル基である、請求項 16 ~ 19 のいずれか 1 項に記載の化合物、またはその塩。

【請求項 21】

Z が、非置換ピリジル基である、請求項 16 ~ 19 のいずれか 1 項に記載の化合物、またはその塩。 40

【請求項 22】

X が、 $-C(O)O-$  である、請求項 16 ~ 21 のいずれか 1 項に記載の化合物、またはその塩。

【請求項 23】

Z が、以下の式、

$-(CF_2)_m-CF_3$  を有するハロアルキル基であり、式中、m が、1、2、3、4、または 5 である、請求項 22 に記載の化合物、またはその塩。

【請求項 24】

X が、結合であり、

n が、1 である、

請求項 16 ~ 23 のいずれか 1 項に記載の化合物、またはその塩。

【請求項 25】

前記ポリ(アミドアミン) dendrimer の一級アミノ基の約 0.1 mol% ~ 約 80 mol% が、式(I)の置換基に結合している、請求項 16 ~ 24 のいずれか 1 項に記載の化合物、またはその塩。

【請求項 26】

前記ポリ(アミドアミン) dendrimer の前記一級アミノ基の約 10 mol% ~ 約 70 mol% が、式(I)の置換基に結合している、請求項 25 に記載の化合物。

10

【請求項 27】

前記ポリ(アミドアミン) dendrimer の前記一級アミノ基の約 20 mol% ~ 約 70 mol% が、式(I)の置換基に結合している、請求項 26 に記載の化合物。

【請求項 28】

細胞に生体分子を送達する方法であって、

前記細胞を、有効量の請求項 1 ~ 27 のいずれか 1 項に記載の化合物、またはその塩に接触させることと、

前記細胞を前記生体分子に接触させることと、  
を含む、前記方法。

【請求項 29】

前記方法が、前記細胞を、有効量の請求項 1 ~ 27 のいずれか 1 項に記載の 2 つ以上の異なる化合物、またはそれらの塩に接触させることを含む、請求項 28 に記載の方法。

20

【請求項 30】

前記生体分子が、デオキシリボ核酸(DNA)分子、リボ核酸(RNA)分子、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、またはそれらの任意の組み合わせもしくは誘導体のうちの少なくとも 1 つである、請求項 28 または 29 に記載の方法。

【請求項 31】

前記生体分子が、デオキシリボ核酸(DNA)分子またはリボ核酸(RNA)分子である、請求項 28 または 29 に記載の方法。

【請求項 32】

前記生体分子が、発光活性が可能なペプチドまたはポリペプチドである、請求項 28 または 29 に記載の方法。

30

【請求項 33】

前記生体分子が、配列番号 4 のポリペプチド配列を含む、請求項 28 または請求項 29 に記載の方法。

【請求項 34】

前記生体分子が、Cas9 タンパク質を含むリボ核タンパク質複合体である、請求項 28 または 29 に記載の方法。

【請求項 35】

前記リボ核タンパク質複合体が、ガイド RNA(gRNA) 及びドナー DNA テンプレートをさらに含み、前記ドナー DNA テンプレートが、配列番号 3 からのポリペプチドをコードする配列を含む、請求項 34 に記載の方法。

40

【請求項 36】

前記化合物及び前記生体分子を混合して混合物を形成させることと、その後、前記細胞を前記混合物に接触させることと、を含む、請求項 28 ~ 35 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 37】

請求項 1 ~ 27 のいずれか 1 項に記載の化合物、またはその塩を含む、キット。

【請求項 38】

前記キットが、容器中に前記化合物または前記その塩を含む、請求項 37 に記載のキット

50

ト。

【請求項 39】

DNA分子、RNA分子、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、またはそれらの任意の組み合わせもしくは誘導体のうちの少なくとも1つをさらに含む、請求項37または38に記載のキット。

【請求項 40】

前記ペプチドが、Cas9タンパク質を含む、請求項39に記載のキット。

【請求項 41】

前記DNA分子が、配列番号3からのポリペプチドをコードする配列を含むドナーDNAテンプレートである、請求項39に記載のキット。

10

【請求項 42】

生体分子のトランスフェクションのために前記化合物または前記その塩を使用するための説明書をさらに含む、請求項37～41のいずれか1項に記載のキット。

【請求項 43】

細胞において内因性タンパク質の配列を改変する方法であって、前記方法が、Cas9タンパク質、ドナーDNAテンプレート、及びガイドRNAを含むリボ核タンパク質(RNP)複合体を組み立てることと、

請求項1～27のいずれかに記載の化合物を使用して細胞中に前記RNP複合体を送達することと、

を含む、前記方法。

20

【請求項 44】

細胞において内因性タンパク質をタグ付けするための方法であって、前記方法が、

Cas9タンパク質、ドナーDNAテンプレート、及びガイドRNAを含み、前記ドナーDNAテンプレートが、ペプチドまたはポリペプチドタグ配列をコードする配列を含む、リボ核タンパク質(RNP)複合体を組み立てることと、

請求項1～27のいずれかに記載の化合物を使用して細胞中に前記RNP複合体を送達することと、

を含む、前記方法。

【請求項 45】

前記ドナーDNAテンプレートが、配列番号3及び配列番号5から選択されるペプチドタグをコードする配列を含む、請求項44に記載の方法。

30

【請求項 46】

前記ドナーDNAテンプレートが、ペプチドまたはポリペプチドタグ配列をコードする前記配列に隣接するホモロジーアームをさらに含む、請求項44に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本願は、2019年6月24日に出願された米国仮特許出願第62/865,638号の優先権を主張するものであり、同文献の内容全体が参照により本明細書に完全に援用される。

40

【0002】

電子的に提出された資料の参照による援用

本明細書と同時に提出され、以下、すなわち「36754-601\_\_ST25」と名付けられ、2020年6月23日に作成された10,000バイトの1つのASCII(テキスト)ファイルとして特定される、コンピュータ読み取り可能なヌクレオチド/アミノ酸配列表が、参照によりその全体が本明細書に援用される。

【0003】

本明細書では、細胞に生体分子を送達するための化合物、組成物、及び方法が提供される。特に、本開示は、フッ素化置換基を有するポリアミンポリマーを含めた、修飾ポリア

50

ミンポリマーを提供する。

【背景技術】

【0004】

ポリエチレンイミン（PEI）及びポリ（アミドアミン）（PAMAM） dendrimer等のカチオン性ポリマーは、細胞中に外来遺伝子を導入するための担体として広く使用される。これらの材料は、製造が容易であり、ウイルス遺伝子送達と比較して優れた安全性を有する。しかしながら、それらの商用応用及び臨床応用は、トランスフェクションの有効性が比較的低いこと及び細胞生存率が良好でないことにより限定される。

【発明の概要】

【0005】

本明細書では、細胞に生体分子を送達するための化合物、組成物、及び方法が提供される。特に、本開示は、フッ素化置換基を有するポリアミンポリマーを含めた、修飾ポリアミンポリマーを提供する。

【0006】

本開示の実施形態は、化合物またはその塩であって、該化合物が、  
ポリエチレンイミンポリマーと、  
該ポリエチレンイミンポリマーのアミノ基に結合した複数の置換基と、を含み、各置換基が独立して、式（I）を有し、



（I）、

式中、

Xが、結合または-C(O)-O-であり、

nが、0、1、2、3、4、または5であり、

Zが、ハロアルキル基、アリール基、置換アリール基、ヘテロアリール基、及び置換ヘテロアリール基から選択される、該化合物またはその塩を含む。

【0007】

一部の実施形態では、ポリエチレンイミンポリマーは、約500Da～約250000Daの重量平均分子量を有する。一部の実施形態では、ポリエチレンイミンポリマーは、約500Da～約2000Daの重量平均分子量を有する。一部の実施形態では、ポリエチレンイミンポリマーは、約5000Da～約25000Daの重量平均分子量を有する。

【0008】

一部の実施形態では、ポリエチレンイミンポリマーは、分岐状ポリエチレンイミンポリマーである。一部の実施形態では、ポリエチレンイミンポリマーは、直鎖状ポリエチレンイミンポリマーである。

【0009】

一部の実施形態では、Zは、以下の式、-(CF<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-CF<sub>3</sub>を有するハロアルキル基であり、式中、mは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10である。一部の実施形態では、Zは、ペンタフルオロフェニル基である。一部の実施形態では、Zは、非置換ピリジル基である。

【0010】

一部の実施形態では、Xは、-C(O)O-であり、nは、1または2である。

【0011】

一部の実施形態では、Zは、以下の式、-(CF<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-CF<sub>3</sub>を有するハロアルキル基であり、式中、mは、1、2、3、4、または5である。

【0012】

一部の実施形態では、Xは、結合であり、nは、1または2である。

【0013】

一部の実施形態では、ポリエチレンイミンポリマーのアミノ基の約0.1mol%～約60mol%が、式（I）の置換基に結合している。一部の実施形態では、ポリエチレン

10

20

30

40

50

イミンポリマーのアミノ基の約5 mol%～約50 mol%が、式(I)の置換基に結合している。一部の実施形態では、ポリエチレンイミンポリマーのアミノ基の約8 mol%～約40 mol%が、式(I)の置換基に結合している。

【0014】

本開示の実施形態はまた、化合物またはその塩であって、該化合物が、ポリ(アミドアミン) dendrimerと、該ポリ(アミドアミン) dendrimerのアミノ基に結合した複数の置換基と、を含み、各置換基が独立して、式(I)を有し、



(I)、

式中、

Xが、結合または-C(O)-O-であり、

nが、0、1、または2であり、

Zが、ハロアルキル基、アリール基、置換アリール、ヘテロアリール基、及び置換ヘテロアリール基から選択される、該化合物またはその塩を含む。

【0015】

一部の実施形態では、ポリ(アミドアミン) dendrimerは、第1世代、第2世代、第3世代、第4世代、第5世代、第6世代、第7世代、第8世代、第9世代、または第10世代ポリ(アミドアミン) dendrimerである。一部の実施形態では、ポリ(アミドアミン) dendrimerは、第1世代、第2世代、第3世代、または第4世代ポリ(アミドアミン) dendrimerである。

【0016】

一部の実施形態では、Zは、以下の式、-(CF<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-CF<sub>3</sub>を有するハロアルキル基であり、式中、mは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10である。一部の実施形態では、Zは、ペンタフルオロフェニル基である。一部の実施形態では、Zは、非置換ピリジル基である。

【0017】

一部の実施形態では、Xは、-C(O)O-である。一部の実施形態では、Zは、以下の式、-(CF<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-CF<sub>3</sub>を有するハロアルキル基であり、式中、mは、1、2、3、4、または5である。

【0018】

一部の実施形態では、Xは、結合であり、nは、1である。

【0019】

一部の実施形態では、ポリ(アミドアミン) dendrimerの一級アミノ基の約0.1 mol%～約80 mol%が、式(I)の置換基に結合している。一部の実施形態では、ポリ(アミドアミン) dendrimerの一級アミノ基の約10 mol%～約70 mol%が、式(I)の置換基に結合している。一部の実施形態では、ポリ(アミドアミン) dendrimerの一級アミノ基の約20 mol%～約70 mol%が、式(I)の置換基に結合している。

【0020】

本開示の実施形態はまた、細胞に生体分子を送達する方法であって、細胞を、有効量の本明細書に記載の化合物(すなわち、ポリエチレンイミンポリマー及び式(I)の複数の置換基を含む化合物、またはポリ(アミドアミン) dendrimer及び式(I)の複数の置換基を含む化合物)、またはその塩に接触させることと、細胞を生体分子に接触させることと、を含む、該方法を含む。一部の実施形態では、該方法は、細胞を、有効量の2つ以上の異なる化合物またはそれらの塩に接触させることを含む。

【0021】

一部の実施形態では、生体分子は、デオキシリボ核酸(DNA)分子、リボ核酸(RNA)分子、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、またはそれらの任意の組み合わせもしくは誘導体のうちの少なくとも1つである。一部の実施形態では、生体分子は、デオキシ

10

20

30

40

50

リボ核酸 (DNA) 分子またはリボ核酸 (RNA) 分子である。一部の実施形態では、生体分子は、発光活性が可能なペプチドまたはポリペプチドである。一部の実施形態では、生体分子は、配列番号 4 のポリペプチド配列 (L g B i T) を含む。一部の実施形態では、生体分子は、C a s 9 タンパク質を含むリボ核タンパク質複合体である。一部の実施形態では、リボ核タンパク質複合体は、ガイド RNA (gRNA) 及びドナー DNA テンプレートをさらに含み、該ドナー DNA テンプレートが、配列番号 3 からのポリペプチドをコードする配列を含む。

**【0022】**

一部の実施形態では、該方法は、該化合物及び該生体分子を混合して混合物を形成させることと、その後、細胞を該混合物に接触させることとを含む。

10

**【0023】**

本開示の実施形態はまた、化合物またはその塩を含むキットであって、該化合物またはその塩が、本明細書に記載の化合物 (すなわち、ポリエチレンイミンポリマー及び式 (I) の複数の置換基を含む化合物、またはポリ (アミドアミン) デンドリマー及び式 (I) の複数の置換基を含む化合物) である、該キットを含む。

**【0024】**

一部の実施形態では、キットは、容器中に該化合物または該その塩を含む。

**【0025】**

一部の実施形態では、キットは、DNA 分子、RNA 分子、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、またはそれらの任意の組み合わせもしくは誘導体のうちの少なくとも 1 つをさらに含む。一部の実施形態では、生体分子は、発光活性が可能なペプチドまたはポリペプチドである。一部の実施形態では、生体分子は、配列番号 4 のポリペプチド配列 (L g B i T) を含む。一部の実施形態では、ペプチドは、C a s 9 タンパク質を含む。一部の実施形態では、DNA 分子は、配列番号 3 からのポリペプチドをコードする配列を含むドナー DNA テンプレートである。

20

**【0026】**

一部の実施形態では、キットは、生体分子のトランスフェクションのために該化合物または該その塩を使用するための説明書をさらに含む。

**【0027】**

本開示の実施形態はまた、細胞において内因性タンパク質の配列を改変する方法を含み、該方法は、

30

C a s 9 タンパク質、ドナー DNA テンプレート、及びガイド RNA を含むリボ核タンパク質 (RNP) 複合体を組み立てることと、

本明細書に記載の化合物を使用して細胞中に RNP 複合体を送達することと、を含む。

**【0028】**

本開示の実施形態はまた、細胞において内因性タンパク質をタグ付けするための方法を含み、該方法は、

C a s 9 タンパク質、ドナー DNA テンプレート、及びガイド RNA を含み、該ドナー DNA テンプレートが、ペプチドまたはポリペプチドタグ配列をコードする配列を含む、リボ核タンパク質 (RNP) 複合体を組み立てることと、

40

本明細書に記載の化合物を使用して細胞中に RNP 複合体を送達することと、を含む。

**【0029】**

一部の実施形態では、ドナー DNA テンプレートは、配列番号 3 及び配列番号 5 から選択されるペプチドタグをコードする配列を含む。一部の実施形態では、ドナー DNA テンプレートは、ペプチドまたはポリペプチドタグ配列をコードする配列に隣接するホモロジーアームをさらに含む。

**【図面の簡単な説明】****【0030】**

【図 1】 A ~ B は、実施例 2 に記載されるような一定のモル比の修飾 PEI ポリマーによる HEK 293 細胞のトランスフェクションからの結果を図示する。A は、N a n o L u

50

c (登録商標) 発現量によって測定したときの NanoLuc (登録商標) ベクターのトランスフェクション効率を示す。Bは、CellTiter-Glo (登録商標) 発光細胞生存アッセイを使用した細胞生存率の測定値を示す。

【図2】A～Bは、実施例2に記載されるような、修飾PEI化合物によるHEK293細胞のトランスフェクションからの結果を、対照としての未修飾ポリマー及びFuGENE HDと比較して図示する。Aは、対照と比べたNanoLucからの発光シグナルの比率を示す。Bは、トランスフェクション試薬不使用の試料と比較した、CellTiter-Glo (登録商標) 発光細胞生存アッセイを使用した細胞生存率の測定値を示す。

【図3A】実施例2に記載されるような、修飾PEIポリマーのタイトレーション及び一定量のDNAとのインキュベーションに次ぐ、HEK細胞のトランスフェクションからの結果を図示する。血清の存在下で実施したトランスフェクションからのデータを示す。 10

【図3B】実施例2に記載されるような、修飾PEIポリマーのタイトレーション及び一定量のDNAとのインキュベーションに次ぐ、HEK細胞のトランスフェクションからの結果を図示する。血清の不在下で実施したトランスフェクションからのデータを示す。

【図3C】実施例2に記載されるような、修飾PEIポリマーのタイトレーション及び一定量のDNAとのインキュベーションに次ぐ、HEK細胞のトランスフェクションからの結果を図示する。血清の存在下でのトランスフェクション後の、CellTiter-Glo (登録商標) 発光細胞生存アッセイを使用した細胞生存率の測定値を示す。

【図4A】実施例2に記載されるような、修飾PEI及びPAMAMポリマーのタイトレーションならびに一定量のDNAとのインキュベーションに次ぐ、血清の存在下での9つの異なる細胞種のトランスフェクションからの、Nano-Glo (登録商標) 試薬を使用した発光結果を図示する。 20

【図4B】実施例2に記載されるような、修飾PEI及びPAMAMポリマーのタイトレーションならびに一定量のDNAとのインキュベーションに次ぐ、血清の存在下での9つの異なる細胞種のトランスフェクションからの、Nano-Glo (登録商標) 試薬を使用した発光結果を図示する。

【図4C】実施例2に記載されるような、修飾PEI及びPAMAMポリマーのタイトレーションならびに一定量のDNAとのインキュベーションに次ぐ、血清の存在下での9つの異なる細胞種のトランスフェクションからの、Nano-Glo (登録商標) 試薬を使用した発光結果を図示する。 30

【図4D】実施例2に記載されるような、修飾PEI及びPAMAMポリマーのタイトレーションならびに一定量のDNAとのインキュベーションに次ぐ、血清の存在下での9つの異なる細胞種のトランスフェクションからの、Nano-Glo (登録商標) 試薬を使用した発光結果を図示する。

【図4E】実施例2に記載されるような、修飾PEI及びPAMAMポリマーのタイトレーションならびに一定量のDNAとのインキュベーションに次ぐ、血清の存在下での9つの異なる細胞種のトランスフェクションからの、Nano-Glo (登録商標) 試薬を使用した発光結果を図示する。

【図4F】実施例2に記載されるような、修飾PEI及びPAMAMポリマーのタイトレーションならびに一定量のDNAとのインキュベーションに次ぐ、血清の存在下での9つの異なる細胞種のトランスフェクションからの、Nano-Glo (登録商標) 試薬を使用した発光結果を図示する。 40

【図4G】実施例2に記載されるような、修飾PEI及びPAMAMポリマーのタイトレーションならびに一定量のDNAとのインキュベーションに次ぐ、血清の存在下での9つの異なる細胞種のトランスフェクションからの、Nano-Glo (登録商標) 試薬を使用した発光結果を図示する。

【図4H】実施例2に記載されるような、修飾PEI及びPAMAMポリマーのタイトレーションならびに一定量のDNAとのインキュベーションに次ぐ、血清の存在下での9つの異なる細胞種のトランスフェクションからの、Nano-Glo (登録商標) 試薬を使用した発光結果を図示する。 50

【図4I】実施例2に記載されるような、修飾PEI及びPAMAMポリマーのタイトレーションならびに一定量のDNAとのインキュベーションに次ぐ、血清の存在下での9つの異なる細胞種のトランスフェクションからの、Nano-Glo（登録商標）試薬を使用した発光結果を図示する。

【図5A】実施例2に記載されるような、血清の存在下での9つの異なる細胞種における修飾PEI及びPAMAMポリマーを用いたトランスフェクション後の、CellTiter-Glo（登録商標）発光細胞生存アッセイを使用した細胞生存率の測定値を示す。

【図5B】実施例2に記載されるような、血清の存在下での9つの異なる細胞種における修飾PEI及びPAMAMポリマーを用いたトランスフェクション後の、CellTiter-Glo（登録商標）発光細胞生存アッセイを使用した細胞生存率の測定値を示す。

10

【図5C】実施例2に記載されるような、血清の存在下での9つの異なる細胞種における修飾PEI及びPAMAMポリマーを用いたトランスフェクション後の、CellTiter-Glo（登録商標）発光細胞生存アッセイを使用した細胞生存率の測定値を示す。

【図5D】実施例2に記載されるような、血清の存在下での9つの異なる細胞種における修飾PEI及びPAMAMポリマーを用いたトランスフェクション後の、CellTiter-Glo（登録商標）発光細胞生存アッセイを使用した細胞生存率の測定値を示す。

【図5E】実施例2に記載されるような、血清の存在下での9つの異なる細胞種における修飾PEI及びPAMAMポリマーを用いたトランスフェクション後の、CellTiter-Glo（登録商標）発光細胞生存アッセイを使用した細胞生存率の測定値を示す。

【図5F】実施例2に記載されるような、血清の存在下での9つの異なる細胞種における修飾PEI及びPAMAMポリマーを用いたトランスフェクション後の、CellTiter-Glo（登録商標）発光細胞生存アッセイを使用した細胞生存率の測定値を示す。

20

【図5G】実施例2に記載されるような、血清の存在下での9つの異なる細胞種における修飾PEI及びPAMAMポリマーを用いたトランスフェクション後の、CellTiter-Glo（登録商標）発光細胞生存アッセイを使用した細胞生存率の測定値を示す。

【図5H】実施例2に記載されるような、血清の存在下での9つの異なる細胞種における修飾PEI及びPAMAMポリマーを用いたトランスフェクション後の、CellTiter-Glo（登録商標）発光細胞生存アッセイを使用した細胞生存率の測定値を示す。

【図6】A～Eは、実施例2に記載されるような、修飾PEI及びPAMAMポリマーのタイトレーションならびに一定量のDNAとのインキュベーションに次ぐ、血清の存在下での5つの異なる細胞種のトランスフェクションからの結果を図示する。

30

【図7】A～Dは、実施例2に記載されるような、血清の存在下での4つの異なる細胞種における修飾PEI及びPAMAMポリマーを用いたトランスフェクション後の、CellTiter-Glo（登録商標）発光細胞生存アッセイを使用した細胞生存率の測定値を示す。

【図8】A～Eは、実施例2に記載されるような、修飾PEI及びPAMAMポリマーのタイトレーションならびに一定量のDNAとのインキュベーションに次ぐ、血清の存在下での5つの異なる細胞種のトランスフェクションからの結果を図示する。

【図9】A～Dは、実施例2に記載されるような、血清の存在下での5つの異なる細胞種における修飾PEI及びPAMAMポリマーを用いたトランスフェクション後の、CellTiter-Glo（登録商標）発光細胞生存アッセイを使用した細胞生存率の測定値を示す。

40

【図10】A～Bは、HiBiT融合体を安定に発現したクローンにLgBiTを送達した結果を図示する。Aは、修飾PEI化合物を使用してHeLa細胞のPKC-HiBiTもしくはHDAC6-HiBiTクローンまたはHEK293細胞のCDK6-HiBiTクローンにLgBiTを送達した結果を、未修飾ポリマー及び上記の対応するクローンへのBacMamCMV-LgBiTの直線的な形質導入と比較して図示する。試験された種々のPEI化合物について、LgBiTを送達されたPKC-HiBiTクローン、HDAC6-HiBiT、またはCDK6-HiBiTクローンからの発光シグナルの百分率が、対応するBacMamCMV-LgBiT形質導入HiBiTクロー

50

ンからの発光シグナルと比べて示される。Bは、修飾PEI化合物を使用してHeLa細胞のHDAC2-HiBiTクローンまたはHEK293細胞のCDK12-HiBiTクローンにLgBiTを送達した結果を、未修飾ポリマー及び上記の対応するクローンへのBacMamCMV-LgBiTの直線的な形質導入と比較して図示する。試験された種々のPEI化合物について、LgBiTを送達されたHeLa細胞のHDAC2-HiBiTクローンまたはHEK293細胞のCDK12-HiBiTクローンからの発光シグナルの百分率が、対応するBacMamCMV-LgBiT形質導入HiBiTクローンと比べて示される。

【図11】A~Bは、LgBiTを送達した後の、HeLa細胞及びHEK293細胞に由来するHiBiTクローンの細胞生存率の測定値を図示する。Aは、PKC-HiBiT、HDAC6-HiBiT、及びCDK6-HiBiTを含む。Bは、HDAC2-HiBiT及びCDK12-HiBiTを含む。これらの細胞へのLgBiT送達は、修飾PEI化合物または未修飾ポリマーのいずれかによるものであった。陰性対照は、細胞へのPEI添加なしであった。発光シグナル(RLU)は、CellTiter-Glo(登録商標)発光細胞生存アッセイを使用して測定したときの細胞生存率を表すものである。

10

【図12A】HeLa細胞においてHDAC2-HiBiTまたはHeLa細胞においてHDAC6-HiBiTを安定に発現したクローンに、修飾PEI化合物7666-3によりLgBiTを送達した、生物発光イメージングの結果を図示する。

【図12B】HeLa細胞においてHDAC2-HiBiTまたはHeLa細胞においてHDAC6-HiBiTを安定に発現したクローンに、修飾PEI化合物7668-1によりLgBiTを送達した、生物発光イメージングの結果を図示する。

20

【図12C】HeLa細胞においてHDAC2-HiBiTまたはHeLa細胞においてHDAC6-HiBiTを安定に発現したクローンに、修飾PEI化合物7669-2によりLgBiTを送達した、生物発光イメージングの結果を図示する。

【図13】A~Bは、異なるHiBiT編集細胞へのLgBiTの送達を検査するための修飾PEI化合物及び未修飾PEIのスクリーニングの結果を図示する。Aは、PEIによるLgBiT送達の百分率をBacMam-LgBiT形質導入と比較して図示する。Bは、PEI-LgBiT複合体で24時間処理された細胞の生存率を表す。

【図14A】細胞表面、細胞質、及び核上に局在するHiBiTタグ付きタンパク質にLgBiTを送達した後の、異なる細胞株の生物発光イメージングの結果を図示する。

30

【図14B】細胞表面、細胞質、及び核上に局在するHiBiTタグ付きタンパク質にLgBiTを送達した後の、異なる細胞株の生物発光イメージングの結果を図示する。

【図14C】細胞表面、細胞質、及び核上に局在するHiBiTタグ付きタンパク質にLgBiTを送達した後の、異なる細胞株の生物発光イメージングの結果を図示する。

【図15A】修飾PEIを使用したHaloTag-LgBiT送達後の、HeLa細胞の蛍光イメージングの結果を未修飾PEIと比較して図示する。

【図15B】修飾PEIを使用したHaloTag-LgBiT送達後の、HeLa細胞の蛍光イメージングの結果を未修飾PEIと比較して図示する。

【図15C】修飾PEIを使用したHaloTag-LgBiT送達後の、HeLa細胞の蛍光イメージングの結果を未修飾PEIと比較して図示する。

40

【図16】A~Bは、修飾PEI化合物7667-4を使用した、HEK293細胞におけるGAPDHのC末端上のVS-HiBiTタグのRNP送達からの結果を、対照としてのFuGENEHD、ViaFect(商標)、CRISPRMax、及びヌクレオフェクションと比較して図示する。細胞数に対して正規化された発光シグナル(RLU)は、RNP送達の効率を表すものである。細胞数は、CellTiter-Glo(登録商標)発光細胞生存アッセイによって決定される(A)。PEIの濃度を増加させることで、RNP送達の改善が示されるが、より高い細胞毒性が引き起こされる(B)。

【図17A】CRISPR/Cas9を介してFlucのN末端でHiBiTを挿入するように設計された一定量のリボ核タンパク質(RNP)複合体及び一本鎖オリゴデオキシ

50

ヌクレオチド (ssODN) ドナーテンプレートの、ホタルルシフェラーゼを安定に発現している HEK293 細胞 (HEK293/Fluc 細胞) 中への送達を図示する。列挙される最終濃度での修飾 PEI 及び PAMAM 化合物のタイトレーションを用いて、RNP/ssODN 混合物を細胞中に送達した。2日後、CellTiter-Fluor (CTF) を使用して、生存率に関して細胞を測定した。

【図17B】CRISPR/Cas9を介してFlucのN末端でHiBiTを挿入するように設計された一定量のリボ核タンパク質 (RNP) 複合体及び一本鎖オリゴデオキシヌクレオチド (ssODN) ドナーテンプレートの、ホタルルシフェラーゼを安定に発現している HEK293 細胞 (HEK293/Fluc 細胞) 中への送達を図示する。列挙される最終濃度での修飾 PEI 及び PAMAM 化合物のタイトレーションを用いて、RNP/ssODN 混合物を細胞中に送達した。2日後、ONE-GLO EX を使用して、Fluc 発現量に関して細胞を測定した。

【図17C】CRISPR/Cas9を介してFlucのN末端でHiBiTを挿入するように設計された一定量のリボ核タンパク質 (RNP) 複合体及び一本鎖オリゴデオキシヌクレオチド (ssODN) ドナーテンプレートの、ホタルルシフェラーゼを安定に発現している HEK293 細胞 (HEK293/Fluc 細胞) 中への送達を図示する。列挙される最終濃度での修飾 PEI 及び PAMAM 化合物のタイトレーションを用いて、RNP/ssODN 混合物を細胞中に送達した。2日後、HiBiT NanoDLR アッセイを使用して、HiBiT シグナルに関して細胞を測定した。

【図17D】CRISPR/Cas9を介してFlucのN末端でHiBiTを挿入するように設計された一定量のリボ核タンパク質 (RNP) 複合体及び一本鎖オリゴデオキシヌクレオチド (ssODN) ドナーテンプレートの、ホタルルシフェラーゼを安定に発現している HEK293 細胞 (HEK293/Fluc 細胞) 中への送達を図示する。列挙される最終濃度での修飾 PEI 及び PAMAM 化合物のタイトレーションを用いて、RNP/ssODN 混合物を細胞中に送達した。HiBiT/CTF 比率を使用して、HiBiT シグナルを細胞数に対して正規化した。

【図17E】CRISPR/Cas9を介してFlucのN末端でHiBiTを挿入するように設計された一定量のリボ核タンパク質 (RNP) 複合体及び一本鎖オリゴデオキシヌクレオチド (ssODN) ドナーテンプレートの、ホタルルシフェラーゼを安定に発現している HEK293 細胞 (HEK293/Fluc 細胞) 中への送達を図示する。列挙される最終濃度での修飾 PEI 及び PAMAM 化合物のタイトレーションを用いて、RNP/ssODN 混合物を細胞中に送達した。HiBiT/Fluc 比率を使用して、HiBiT シグナルを Fluc 発現量に対して正規化した。

【図18】A~Bは、ヌクレオフエクシオンまたは修飾 PEI もしくは PAMAM ポリマーのいずれかを使用して CRISPR による HiBiT のノックインのための RNP/ssODN 混合物を送達した、HEK293/Fluc 細胞のプールを図示する。処理中の細胞死による複雑化を排除するために、測定前に細胞プールを数日間増殖させた。Fluc の N 末端での HiBiT のノックイン後、CellTiter-Fluor+HiBiT NanoDLR を使用して、生存率、Fluc 発現量、及び HiBiT シグナルを測定した (A)。ヌクレオフエクシオン細胞についての Fluc/CTF 比率の大幅な低下は、Indel 変異によって引き起こされた発現消失を示し得る。HiBiT/CTF 比率によって示されるように、修飾ポリマーによって媒介された RNP/ssODN 送達は、より高い正規化 Fluc 発現量のみならず、より高い正規化 HiBiT シグナルもまたもたらした。同様に、修飾 PEI ポリマーは、GAPDH の C 末端で HiBiT をノックインするように設計された RNP/ssODN 混合物の送達後に、ヌクレオフエクシオンと比較してより高い正規化 HiBiT シグナルを示す (B)。

【図19】A~Bは、実施例6に記載されるような、本明細書に記載の修飾 PEI ポリマーが細胞中に機能的 LgBiT を送達することを実証するためのタンパク質分解アッセイの結果を示す。

【図20A】実施例7に記載されるような、細胞株 (HEK293) における細胞内発光

10

20

30

40

50

系及び細胞外発光系を識別するアッセイの結果を示す。

【図20B】実施例7に記載されるような、細胞株(A549)における細胞内発光系及び細胞外発光系を識別するアッセイの結果を示す。

【図20C】実施例7に記載されるような、細胞株(H1299)における細胞内発光系及び細胞外発光系を識別するアッセイの結果を示す。

【図20D】実施例7に記載されるような、細胞株(Mia-Paca2)における細胞内発光系及び細胞外発光系を識別するアッセイの結果を示す。

【発明を実施するための形態】

【0031】

本明細書では、細胞に生体分子を送達する際に使用するための修飾ポリエチレンイミンポリマー及び修飾ポリ(アミドアミン)デンドリマーが提供される。

【0032】

この修飾ポリマー及びデンドリマーは、一部の実施形態では、フッ素化置換基を含む。フッ素化合物は、極性環境及び非極性環境の両方で高い相分離傾向を有して、疎水性であると同時に疎油性であり、したがって、フッ素化は、細胞膜に対するポリマーの親和性を改善し得、また細胞膜の脂質二重層ならびにエンドソーム/リソソーム膜を横断する分子の輸送を補助して、ポリマーのエンドソーム脱出を容易にし得る。加えて、フッ素化ポリマーは、低い表面エネルギーを有し、低濃度で互いに優先的に会合することにより、低濃度で核酸またはタンパク質とのポリマー複合体の形成を可能にする。

【0033】

この節及び本開示全体において使用されるような節の見出しは、単に編成目的のものであり、限定することは意図されない。

【0034】

#### 1. 定義

本明細書で別途定義されない限り、本開示に関連して使用される科学用語及び技術用語は、当業者により一般的に理解される意味を有するものとする。例えば、本明細書に記載の細胞及び組織培養、分子生物学、免疫学、微生物学、遺伝学、ならびにタンパク質及び核酸化学、ならびにハイブリダイゼーションに関連して使用される任意の学術用語、及びそれらの技法は、当該技術分野において周知であり、一般的に使用されるものである。用語の意味及び範囲は明確であるはずであるが、何らかの潜在的な曖昧さが存在する場合には、本明細書に提供される定義が、いずれの辞書または外部からの定義に対しても優先される。さらに、文脈上他の解釈を要する場合を除き、単数形用語は複数形を含むものとし、複数形用語は単数形を含むものとする。

【0035】

特定の官能基及び化学用語の定義は、下記により詳細に記載される。本開示の目的において、化学元素は、元素周期表、CAS版(Handbook of Chemistry and Physics, 75th Ed., 見返し)に従って特定され、具体的な官能基は、一般に、同文献に記載されるように定義される。追加として、有機化学の一般原理、ならびに具体的な官能性部分及び反応性は、Sorrell, Organic Chemistry, 2<sup>nd</sup> edition, University Science Books, Sausalito, 2006、Smith, March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanism, and Structure, 7<sup>th</sup> Edition, John Wiley & Sons, Inc., New York, 2013、Larock, Comprehensive Organic Transformations, 3<sup>rd</sup> Edition, John Wiley & Sons, Inc., New York, 2018、Carruthers, Some Modern Methods of Organic Synthesis, 3<sup>rd</sup> Edition, Cambridge University Press, Cambridge, 1987に記載され、同文献の各々の内容全体が参照により本明細書に援用される。

10

20

30

40

50

## 【0036】

本明細書で使用される「アルキル」という用語は、1～30個の炭素原子、例えば、1～16個の炭素原子（ $C_1 \sim C_{16}$ アルキル）、1～14個の炭素原子（ $C_1 \sim C_{14}$ アルキル）、1～12個の炭素原子（ $C_1 \sim C_{12}$ アルキル）、1～10個の炭素原子（ $C_1 \sim C_{10}$ アルキル）、1～8個の炭素原子（ $C_1 \sim C_8$ アルキル）、1～6個の炭素原子（ $C_1 \sim C_6$ アルキル）、または1～4個の炭素原子（ $C_1 \sim C_4$ アルキル）を含有する直鎖状または分岐状の飽和炭化水素鎖を意味する。アルキルの代表的な例としては、メチル、エチル、*n*-プロピル、イソ-プロピル、*n*-ブチル、*sec*-ブチル、イソ-ブチル、*tert*-ブチル、*n*-ペンチル、イソペンチル、ネオペンチル、*n*-ヘキシル、3-メチルヘキシル、2,2-ジメチルペンチル、2,3-ジメチルペンチル、*n*-ヘプチル、*n*-オクチル、*n*-ノニル、*n*-デシル、*n*-ウンデシル、及び*n*-ドデシルが挙げられるが、これらに限定されない。

10

## 【0037】

本明細書で使用される「アリアル」という用語は、フェニル基、または二環式もしくは三環式芳香族縮合環系を指す。二環式縮合環系としては、フェニル基が親分子部分に付加され、フェニル基に縮合されたものが例として挙げられる。三環式縮合環系としては、フェニル基が親分子部分に付加され、2つの他のフェニル基に縮合されたものが例として挙げられる。二環式アリアル基の代表的な例としては、ナフチルが挙げられるが、これに限定されない。三環式アリアル基の代表的な例としては、アントラセニルが挙げられるが、これに限定されない。

20

## 【0038】

本明細書で使用される「シクロアルキル」という用語は、3～10個の炭素原子及び0個のヘテロ原子を含有する飽和炭素環式環系を指す。シクロアルキルは、単環式、二環式、架橋、縮合、またはスピロ環式であり得る。シクロアルキルの代表的な例としては、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、シクロオクチル、シクロノニル、シクロデシル、アダマンチル、ピシクロ[2.2.1]ヘプタニル、ピシクロ[3.2.1]オクタニル、及びピシクロ[5.2.0]ノナニルが挙げられるが、これらに限定されない。

## 【0039】

本明細書で使用される「ハロゲン」または「ハロ」という用語は、F、Cl、Br、またはIを意味する。

30

## 【0040】

本明細書で使用される「ハロアルキル」という用語は、本明細書で定義されるようなアルキル基において、1個または複数の水素原子がハロゲンによって置き換えられているものを意味する。例えば、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、または8個の水素原子がハロゲンによって置き換えられ得る。ハロアルキルの代表的な例としては、フルオロメチル、ジフルオロメチル、トリフルオロメチル、クロロメチル、ジクロロメチル、トリクロロメチル、2-フルオロエチル、2,2-ジフルオロエチル、及び2,2,2-トリフルオロエチルが挙げられるが、これらに限定されない。

## 【0041】

本明細書で使用される「ヘテロアリアル」という用語は、芳香族単環式環または芳香族二環式環系もしくは芳香族三環式環系を指す。芳香族単環式環は、N、O、及びSからなる群から独立して選択される少なくとも1個のヘテロ原子（例えば、O、S、及びNから独立して選択される1個、2個、3個、または4個のヘテロ原子）を含有する5員または6員環である。5員の芳香族単環式環は、2個の二重結合を有し、6員の芳香族単環式環は、3個の二重結合を有する。二環式ヘテロアリアル基としては、単環式ヘテロアリアル環が、本明細書で定義されるような単環式アリアル基または本明細書で定義されるような単環式ヘテロアリアル基に付加され縮合されたものが例として挙げられる。三環式ヘテロアリアル基としては、単環式ヘテロアリアル環が、本明細書で定義されるような単環式アリアル基または本明細書で定義されるような単環式ヘテロアリアル基から独立して選択さ

40

50

れる2つの環に縮合されたものが例として挙げられる。単環式ヘテロアリーの代表的な例としては、ピリジニル(ピリジン-2-イル、ピリジン-3-イル、ピリジン-4-イルを含む)、ピリミジニル、ピラジニル、ピリダジニル、ピロリル、ベンゾピラゾリル、1,2,3-トリアゾリル、1,3,4-チアジアゾリル、1,2,4-チアジアゾリル、1,3,4-オキサジアゾリル、1,2,4-オキサジアゾリル、イミダゾリル、チアゾリル、イソチアゾリル、チエニル、フラニル、オキサゾリル、イソオキサゾリル、1,2,4-トリアジニル、及び1,3,5-トリアジニルが挙げられるが、これらに限定されない。二環式ヘテロアリーの代表的な例としては、ベンズイミダゾリル、ベンゾジオキサソリル、ベンゾフラニル、ベンゾオキサジアゾリル、ベンゾピラゾリル、ベンゾチアゾリル、ベンゾチエニル、ベンゾトリアゾリル、ベンゾオキサジアゾリル、ベンゾオキサゾリル、クロメニル(chromeny1)、イミダゾピリジン、イミダゾチアゾリル、インダゾリル、インドリル、イソベンゾフラニル、イソインドリル、イソキノリニル、ナフチリジニル、プリニル、ピリドイミダゾリル、キナゾリニル、キノリニル、キノキサリニル、チアゾロピリジニル、チアゾロピリミジニル、チエノピロリル、及びチエノチエニルが挙げられるが、これらに限定されない。三環式ヘテロアリーの代表的な例としては、ジベンゾフラニル及びジベンゾチエニルが挙げられるが、これらに限定されない。単環式、二環式、及び三環式ヘテロアリールは、環内に含まれる任意の炭素原子または任意の窒素原子を介して親分子部分につなげられる。

10

#### 【0042】

本明細書で使用される「複素環」または「複素環式」という用語は、単環式複素環、二環式複素環、または三環式複素環を意味する。単環式複素環は、O、N、及びSからなる群から独立して選択される少なくとも1個のヘテロ原子を含有する3員、4員、5員、6員、7員、または8員環である。3員または4員環は、0個または1個の二重結合、ならびにO、N、及びSからなる群から選択される1個のヘテロ原子を含有する。5員環は、0個または1個の二重結合、ならびにO、N、及びSからなる群から選択される1個、2個、または3個のヘテロ原子を含有する。6員環は、0個、1個、または2個の二重結合、ならびにO、N、及びSからなる群から選択される1個、2個、または3個のヘテロ原子を含有する。7員及び8員環は、0個、1個、2個、または3個の二重結合、ならびにO、N、及びSからなる群から選択される1個、2個、または3個のヘテロ原子を含有する。単環式複素環の代表的な例としては、アゼチジニル、アゼパニル、アジリジニル、ジアゼパニル、1,3-ジオキサニル、1,3-ジオキサソラニル、1,3-ジチオラニル、1,3-ジチアニル、イミダゾリニル、イミダゾリジニル、イソチアゾリニル、イソチアゾリジニル、イソオキサゾリニル、イソオキサゾリジニル、モルホリニル、オキサジアゾリニル、オキサジアゾリジニル、オキサゾリニル、オキサゾリジニル、オキセタニル、ペラジニル、ペリジニル、ピラニル、ピラゾリニル、ピラゾリジニル、ピロリニル、ピロリジニル、テトラヒドロフラニル、テトラヒドロピラニル、テトラヒドロピリジニル、テトラヒドロチエニル、チアジアゾリニル、チアジアゾリジニル、1,2-チアジナニル、1,3-チアジナニル、チアゾリニル、チアゾリジニル、チオモルホリニル、1,1-ジオキシドチオモルホリニル(チオモルホリンスルホン)、チオピラニル、及びトリチアニルが挙げられるが、これらに限定されない。二環式複素環は、単環式複素環がフェニル基に縮合されたもの、または単環式複素環が単環式シクロアルキルに縮合されたもの、または単環式複素環が単環式シクロアルケニルに縮合されたもの、または単環式複素環が単環式複素環に縮合されたもの、またはスピロ複素環基、あるいは架橋単環式複素環系において、環の2個の非隣接原子が、1個、2個、3個、もしくは4個の炭素原子のアルキレン架橋、または2個、3個、もしくは4個の炭素原子のアルケニレン架橋によって連結されているものである。二環式複素環の代表的な例としては、ベンゾピラニル、ベンゾチオピラニル、クロマニル、2,3-ジヒドロベンゾフラニル、2,3-ジヒドロベンゾチエニル、2,3-ジヒドロイソキノリン、2-アザスピロ[3.3]ヘプタン-2-イル、アザビシクロ[2.2.1]ヘプチル(2-アザビシクロ[2.2.1]ヘプタ-2-イルを含む)、2,3-ジヒドロ-1H-インドリル、イソインドリニル、オクタヒドロシ

20

30

40

50

クロペンタ [ c ] ピロリル、オクタヒドロピロロピリジニル、及びテトラヒドロイソキノリニルが挙げられるが、これらに限定されない。三環式複素環としては、二環式複素環がフェニル基に縮合されたもの、または二環式複素環が単環式シクロアルキルに縮合されたもの、または二環式複素環が単環式シクロアルケニルに縮合されたもの、または二環式複素環が単環式複素環に縮合されたもの、あるいは二環式複素環において、二環式環の2個の非隣接原子が、1個、2個、3個、もしくは4個の炭素原子のアルキレン架橋、または2個、3個、もしくは4個の炭素原子のアルケニレン架橋によって連結されているものが例として挙げられる。三環式複素環の例としては、オクタヒドロ - 2, 5 - エポキシペンタレン、ヘキサヒドロ - 2 H - 2, 5 - メタノシクロペンタ [ b ] フラン、ヘキサヒドロ - 1 H - 1, 4 - メタノシクロペンタ [ c ] フラン、アザ - アダマンタン ( 1 - アザトリシクロ [ 3 . 3 . 1 . 1<sup>3,7</sup> ] デカン )、及びオキサ - アダマンタン ( 2 - オキサトリシクロ [ 3 . 3 . 1 . 1<sup>3,7</sup> ] デカン ) が挙げられるが、これらに限定されない。単環式、二環式、及び三環式複素環は、環内に含まれる任意の炭素原子または任意の窒素原子を介して親分子部分につながられる。

10

#### 【 0 0 4 3 】

本明細書で使用される「ペルフルオロアルキル」という用語は、アルキル基において、各水素がフッ素と置き換えられているものを指す。ペルフルオロアルキルの代表的な例としては、トリフルオロメチル、ペルフルオロエチル、ペルフルオロプロピル、ペルフルオロブチル、ペルフルオロペンチル、及びペルフルオロヘキシルが挙げられるが、これらに限定されない。

20

#### 【 0 0 4 4 】

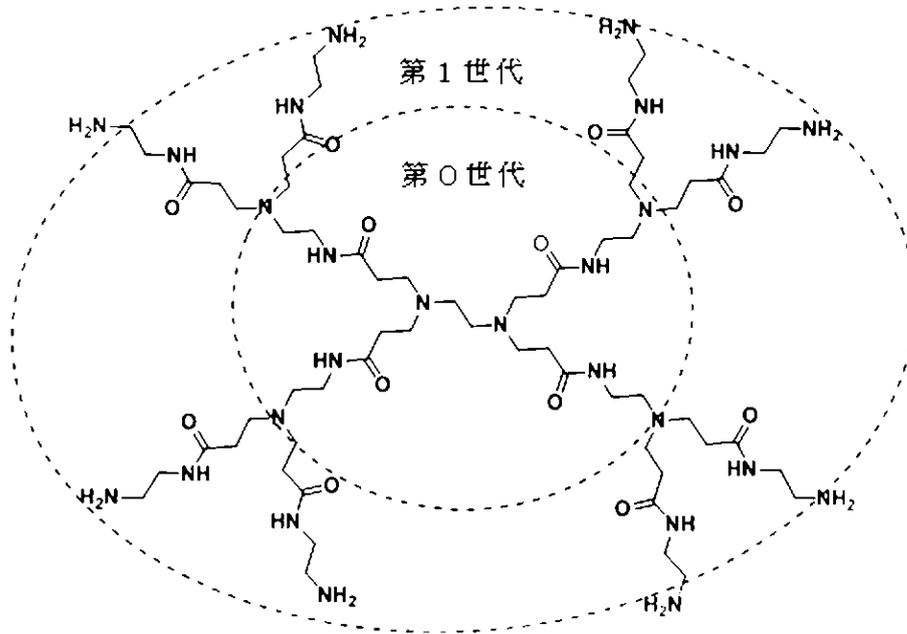
本明細書で使用される「ポリ ( アミドアミン ) 」 ( または「 P A M A M 」 ) という用語は、ジアミンコア、ならびにこのジアミンとアクリル酸メチル及び次いで別のジアミンとの反応によって生成される、アミド及びアミン官能基を有する繰り返し分岐したサブユニットを有する、当該技術分野で認識されるデンドリマーのクラスを指す。これらのデンドリマーは、コアから伸長するアミドアミン基の「層」の数によって定義され、各「層」が「世代」と称される。例えば、エチレンジアミンをアクリル酸メチルと反応させて、3 - [ 2 - [ ビス ( 3 - メトキシ - 3 - オキソプロピル ) アミノ ] エチル - ( 3 - メトキシ - 3 - オキソプロピル ) アミノ ] プロパン酸メチルを生成することができ、次いで、これをさらなるエチレンジアミンと反応させて、「第 0 世代」 P A M A M である、N - ( 2 - アミノエチル ) - 3 - [ [ 3 - ( 2 - アミノエチルアミノ ) - 3 - オキソプロピル ] - [ 2 - [ ビス [ 3 - ( 2 - アミノエチルアミノ ) - 3 - オキソプロピル ] アミノ ] エチル ] アミノ ] プロパンアミドを形成させることができる。同じ反応順序を繰り返して、第 0 世代 P A M A M の各一級アミノ基を同様に官能基化することにより、第 1 世代 P A M A M を形成させることができ、これ以降も同様である。「コア」の第 0 世代 P A M A M 構造が強調された、第 1 世代 P A M A M の化学構造が下記に示される。

30

40

50

## 【化 1】



10

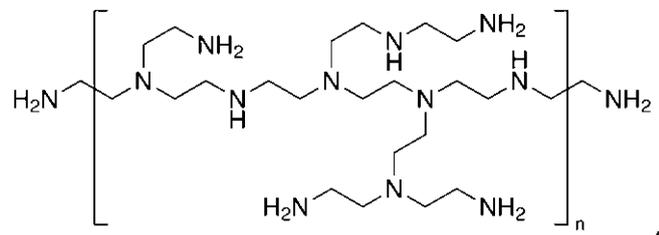
20

## 【0045】

本明細書で使用される「ポリエチレンイミン」(または「PEI」)という用語は、イミノエチレン基の繰り返しに基づくポリマーを指す。「直鎖状ポリエチレンイミン」は、式  $-(CH_2-CH_2-NH)_n-$  を有する直鎖状ポリマーであり、故に、ポリマー鎖内に二級アミノ基のみを含む。「分岐状ポリエチレンイミン」は、アジリジンの開環重合によって合成される分岐状ポリマーであり、一級、二級、及び三級アミノ基を含む。分岐状ポリエチレンイミンは、下記に例示されるように図示される場合が多いが、当業者であれば、分岐状ポリエチレンイミンが、括弧間に示される厳密な種類の繰り返し単位を有するポリマーではなく、むしろ、これが単に、個々の  $-CH_2-CH_2-NH-$  基と一緒に連結され得る様々な方式の実例を提供するものであり、追加の連結及び分岐点が可能であることを理解しよう。

30

## 【化 2】



40

## 【0046】

一部の事例では、基(例えば、アルキル、ハロアルキル、またはシクロアルキル)における炭素原子の数は、「 $C_x \sim C_y-$ 」という接頭辞によって指定され、ここで、 $x$  は、その基における炭素原子の最小数であり、 $y$  は、最大数である。故に、例えば、「 $C_1 \sim C_3-$ アルキル」は、1~3個の炭素原子を含有するアルキル基を指し、「 $C_1 \sim C_6-$ ハロアルキル」は、1~6個の炭素原子を含有するハロアルキル基を指す。

## 【0047】

「置換基」という用語は、指定される基の原子上で置換された基を指す。

## 【0048】

ある基または部分が置換され得る場合、「置換」という用語は、「置換」を使用した表

50

現により指定される基にある1個または複数(例えば、1個、2個、3個、4個、5個、または6個、一部の実施形態では1個、2個、または3個、他の実施形態では1個または2個)の水素が、列挙される指定の基の選択肢、または当該技術分野で既知の好適な基(例えば、下記に列挙される基のうちの一つまたは複数)と置き換えられ得ることを示す。置換基には、ハロゲン、=O、=S、シアノ、ニトロ、フルオロアルキル、アルコキシフルオロアルキル、フルオロアルコキシ、アルキル、アルケニル、アルキニル、ハロアルキル、ハロアルコキシ、ヘテロアルキル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アリール、ヘテロアリール、複素環、シクロアルキル、ヘテロアリールアルキル、アリールアルキル、ヒドロキシ、ヒドロキシアルキル、アルコキシ、アルコキシアルキル、アルキレン、アリールオキシ、フェノキシ、ベンジルオキシ、アミノ、アルキルアミノ、アシルアミノ、アミノアルキル、アリールアミノ、スルホニルアミノ、スルフィニルアミノ、スルホニル、アルキルスルホニル、アリールスルホニル、アミノスルホニル、スルフィニル、-COOH、ケトン、アミド、カルバメート、及びアシルが含まれるが、これらに限定されない。

10

#### 【0049】

本明細書で使用されるとき、「Oplophorusルシフェラーゼ」及び「Oplophorus由来ルシフェラーゼ」という用語は、互換的に使用され、野生型、そのバリエーション及び変異体を含めた深海エビOplophorus gracilirostrisから分泌されるルシフェラーゼ(例えば、配列番号1)を指す。例えば、好適なOplophorusルシフェラーゼバリエーションは、米国特許第8,557,970号及び同第8,669,103号に記載され、同文献の各々は参照によりその全体が本明細書に援用される。例となるOplophorus由来ルシフェラーゼには、例えば、配列番号2のルシフェラーゼ(本明細書で互換的に「NanoLuc」、「Nluc」、「Nlucルシフェラーゼ」、及び「Nluc酵素」とも称される)が含まれる。

20

#### 【0050】

本明細書に記載の化合物に関して、その基及び置換基は、その選択及び置換が、例えば、転位、環化、脱離等によるような変換を自発的に経ることのない、安定な化合物をもたらすように、許容される原子及び置換基の原子価に準拠して選択され得る。

#### 【0051】

本明細書で使用される「含む(comprise(s))」、「含む(include(s))」、「有する(having)」、「有する(has)」、「できる(can)」、「含有する(contains)」という用語、及びそれらの変形は、追加の行為または構造の可能性を除外しない開放式の移行句、用語、または単語であることが意図される。単数形「a」、「an」、及び「the」は、文脈上そうでないとする明確な指示がない限り、複数形の指示対象を含む。本明細書における多くの実施形態は、開放形式の「含む(comprising)」という言い回しを使用して記載される。かかる実施形態は、複数の閉鎖式の「からなる(consisting of)」及び/または「から本質的になる(consisting essentially of)」実施形態を包含し、これらは代替として、かかる文言を使用して特許請求または記載され得る。本開示はまた、明示的に定められるか否かにかかわらず、本明細書で提示される実施形態または要素を「含む(comprising)」、「からなる(consisting of)」及び「から本質的になる(consisting essentially of)」他の実施形態も企図する。

30

40

#### 【0052】

本明細書における数値範囲の列挙に関しては、それらの間に介在する同じ精度を有する各数値が明示的に企図される。例えば、6~9の範囲の場合、6及び9に加えて7及び8という数が企図され、6.0~7.0という範囲の場合、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、及び7.0という数が明示的に企図される。

#### 【0053】

50

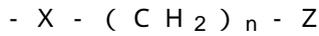
## 2. ポリマー

本開示は、遺伝子、タンパク質、及びリボ核タンパク質、ならびに関連する複合体等の生体分子の細胞中への送達に好適である、修飾ポリアミンポリマーを含む。

### 【0054】

一部の実施形態では、本開示は、  
ポリエチレンイミンポリマーと、

該ポリエチレンイミンポリマーのアミノ基に結合した複数の置換基と、を含み、各置換基が独立して、式(I)を有し、



(I)、

式中、

Xが、結合または-C(O)-O-であり、

nが、0、1、2、3、4、または5であり、

Zが、ハロアルキル基、アリール基、置換アリール基、ヘテロアリール基、及び置換ヘテロアリール基から選択される、化合物を提供する。

### 【0055】

一部の実施形態では、ポリエチレンイミンポリマーは、約500Da~約250000Da、または約500Da~約30000Da、または約500Da~約2000Da、または約5000Da~約25000Daの重量平均分子量を有する。例えば、ポリエチレンイミンポリマーは、約500Da、約600Da、約700Da、約800Da、約900Da、約1000Da、約1200Da、約1400Da、約1600Da、約1800Da、約2000Da、約3000Da、約4000Da、約5000Da、約6000Da、約7000Da、約8000Da、約9000Da、約10000Da、約15000Da、約20000Da、約25000Da、約30000Da、約35000Da、約40000Da、約45000Da、約50000Da、約100000Da、約150000Da、約200000Da、または約250000Daの重量平均分子量を有し得る。特定の実施形態では、ポリエチレンイミンポリマーは、約600Da、約800Da、約1200Da、約1800Da、約5000Da、約10000Da、または約25000Daの重量平均分子量を有する。

### 【0056】

ポリエチレンイミンポリマーは、直鎖状または分岐状であってもよい。一部の実施形態では、ポリエチレンイミンポリマーは、直鎖状ポリエチレンイミンポリマーである。一部の実施形態では、ポリエチレンイミンポリマーは、分岐状ポリエチレンイミンポリマーである。

### 【0057】

一部の実施形態では、ポリエチレンイミンポリマーは、架橋されていてもよい。例えば、ポリエチレンイミンポリマーは、該ポリマーが式(I)の複数の置換基を含むようになる官能基化前または後に、尿素と架橋され得る(すなわち、2つの異なるポリマー上の2つのアミノ基がC=O基によって一緒に連結されるように)。

### 【0058】

式(I)の複数の置換基において、Xは、結合または-C(O)-O-である。一部の実施形態では、Xは、結合である。一部の実施形態では、Xは、-C(O)-O-である。

### 【0059】

式(I)の複数の置換基において、nは、0、1、2、3、4、または5である。一部の実施形態では、nは、0である。一部の実施形態では、nは、1である。一部の実施形態では、nは、2である。一部の実施形態では、nは、3である。一部の実施形態では、nは、4である。一部の実施形態では、nは、5である。一部の実施形態では、nは、0、1、または2である。一部の実施形態では、nは、1または2である。

10

20

30

40

50

## 【0060】

一部の実施形態では、Xは、 $-C(O)-O-$ であり、nは、1または2である。一部の実施形態では、Xは、結合であり、nは、1または2である。

## 【0061】

式(I)の複数の置換基において、Zは、ハロアルキル基、アリアル基、置換アリアル基、ヘテロアリアル基、及び置換ヘテロアリアル基から選択される。一部の実施形態では、Zは、ハロアルキル基、置換アリアル基、及び非置換ヘテロアリアル基から選択される。

## 【0062】

一部の実施形態では、Zは、ハロアルキル基である。一部の実施形態では、ハロアルキル基は、ペルフルオロアルキル基である。一部の実施形態では、Zは、式 $-(CF_2)_m-CF_3$ を有するハロアルキル基であり、式中、mは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10である。例えば、一部の実施形態では、mは、1である。一部の実施形態では、mは、2である。一部の実施形態では、mは、3である。一部の実施形態では、mは、4である。一部の実施形態では、mは、5である。一部の実施形態では、mは、6である。一部の実施形態では、mは、7である。一部の実施形態では、mは、8である。一部の実施形態では、mは、9である。一部の実施形態では、mは、10である。一部の実施形態では、mは、3、4、5、6、または7である。

10

## 【0063】

一部の実施形態では、Zは、アリアル基または置換アリアル基である。一部の実施形態では、Zは、置換アリアル基である。一部の実施形態では、Zは、置換フェニル基である。一部の実施形態では、Zは、ハロから選択される1つ、2つ、3つ、4つ、または5つの置換基で置換されたフェニル基である。一部の実施形態では、Zは、ペントフルオロフェニル基である。

20

## 【0064】

一部の実施形態では、Zは、ヘテロアリアル基または置換ヘテロアリアル基である。一部の実施形態では、Zは、非置換ヘテロアリアル基である。一部の実施形態では、Zは、非置換単環式ヘテロアリアル基である。一部の実施形態では、ヘテロアリアル基は、N、O、及びSから独立して選択される1個、2個、または3個のヘテロ原子を有する単環式ヘテロアリアル基である。一部の実施形態では、Zは、非置換ピリジル基である。

30

## 【0065】

一部の実施形態では、Xは、 $-C(O)O-$ であり、nは、1または2である。一部の実施形態では、Xは、結合であり、nは、1または2である。

## 【0066】

一部の実施形態では、ポリエチレンイミンポリマーのアミノ基の約0.1mol%~約60mol%が、式(I)の置換基に結合している。例えば、ポリエチレンイミンポリマーのアミノ基の約10mol%~約60mol%、約5mol%~約50mol%、または約8mol%~約40mol%が、式(I)の置換基に結合している。一部の実施形態では、ポリエチレンイミンポリマーのアミノ基の約0.1mol%、約0.5mol%、約1mol%、約2mol%、約5mol%、約6mol%、約7mol%、約8mol%、約9mol%、約10mol%、約15mol%、約20mol%、約25mol%、約30mol%、約35mol%、約40mol%、約45mol%、約50mol%、約55mol%、約60mol%、約65mol%、約70mol%、約75mol%、または約80mol%が、式(I)の置換基に結合している。修飾の程度は、例えば、下記でさらに考察されるような異なる量の試薬を使用することによって、調整することができる。修飾の程度は、例えば、 $^1H$  NMR分光法を使用して、決定することができる。

40

## 【0067】

一部の実施形態では、本開示は、

ポリ(アミドアミン) dendrimer と、

該ポリ(アミドアミン) dendrimer のアミノ基に結合した複数の置換基と、を含み、

50

各置換基が独立して、式 ( I ) を有し、



( I )、

式中、

X が、結合または  $- C ( O ) - O -$  であり、

n が、0、1、または2であり、

Z が、ハロアルキル基、アリール基、置換アリール、ヘテロアリール基、及び置換ヘテロアリール基から選択される、化合物を提供する。

【 0 0 6 8 】

一部の実施形態では、ポリ ( アミドアミン ) デンドリマーは第 0 世代、第 1 世代、第 2 世代、第 3 世代、第 4 世代、第 5 世代、第 6 世代、第 7 世代、第 8 世代、第 9 世代、または第 1 0 世代ポリ ( アミドアミン ) デンドリマーである。一部の実施形態では、ポリ ( アミドアミン ) デンドリマーは、第 1 世代、第 2 世代、第 3 世代、第 4 世代、第 5 世代、第 6 世代、第 7 世代、第 8 世代、第 9 世代、または第 1 0 世代ポリ ( アミドアミン ) デンドリマーである。一部の実施形態では、ポリ ( アミドアミン ) デンドリマーは、第 1 世代、第 2 世代、第 3 世代、または第 4 世代ポリ ( アミドアミン ) デンドリマーである。一部の実施形態では、ポリ ( アミドアミン ) デンドリマーは、第 1 世代ポリ ( アミドアミン ) デンドリマーである。一部の実施形態では、ポリ ( アミドアミン ) デンドリマーは、第 2 世代ポリ ( アミドアミン ) デンドリマーである。一部の実施形態では、ポリ ( アミドアミン ) デンドリマーは、第 3 世代ポリ ( アミドアミン ) デンドリマーである。一部の実施形態では、ポリ ( アミドアミン ) デンドリマーは、第 4 世代ポリ ( アミドアミン ) デンドリマーである。

10

20

【 0 0 6 9 】

式 ( I ) の複数の置換基において、X は、結合または  $- C ( O ) - O -$  である。一部の実施形態では、X は、結合である。一部の実施形態では、X は、 $- C ( O ) - O -$  である。

【 0 0 7 0 】

式 ( I ) の複数の置換基において、n は、0、1、2、3、4、または5である。一部の実施形態では、n は、0 である。一部の実施形態では、n は、1 である。一部の実施形態では、n は、2 である。一部の実施形態では、n は、3 である。一部の実施形態では、n は、4 である。一部の実施形態では、n は、5 である。一部の実施形態では、n は、0、1、または2 である。一部の実施形態では、n は、1 または 2 である。

30

【 0 0 7 1 】

一部の実施形態では、X は、結合であり、n は、1 である。

【 0 0 7 2 】

式 ( I ) の複数の置換基において、Z は、ハロアルキル基、アリール基、置換アリール基、ヘテロアリール基、及び置換ヘテロアリール基から選択される。一部の実施形態では、Z は、ハロアルキル基、置換アリール基、及び非置換ヘテロアリール基から選択される。

【 0 0 7 3 】

一部の実施形態では、Z は、ハロアルキル基である。一部の実施形態では、ハロアルキル基は、ペルフルオロアルキル基である。一部の実施形態では、Z は、式  $- ( C F_2 )_m - C F_3$  を有するハロアルキル基であり、式中、m は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10 である。例えば、一部の実施形態では、m は、1 である。一部の実施形態では、m は、2 である。一部の実施形態では、m は、3 である。一部の実施形態では、m は、4 である。一部の実施形態では、m は、5 である。一部の実施形態では、m は、6 である。一部の実施形態では、m は、7 である。一部の実施形態では、m は、8 である。一部の実施形態では、m は、9 である。一部の実施形態では、m は、10 である。一部の実施形態では、m は、3、4、5、6、または7 である。

40

【 0 0 7 4 】

50

一部の実施形態では、Zは、アリール基または置換アリール基である。一部の実施形態では、Zは、置換アリール基である。一部の実施形態では、Zは、置換フェニル基である。一部の実施形態では、Zは、八口から選択される1つ、2つ、3つ、4つ、または5つの置換基で置換されたフェニル基である。一部の実施形態では、Zは、ペンタフルオロフェニル基である。

【0075】

一部の実施形態では、Zは、ヘテロアリール基または置換ヘテロアリール基である。一部の実施形態では、Zは、非置換ヘテロアリール基である。一部の実施形態では、Zは、非置換単環式ヘテロアリール基である。一部の実施形態では、ヘテロアリール基は、N、O、及びSから独立して選択される1個、2個、または3個のヘテロ原子を有する単環式ヘテロアリール基である。一部の実施形態では、Zは、非置換ピリジル基である。

10

【0076】

一部の実施形態では、Xは、 $-C(O)O-$ であり、nは、1または2である。一部の実施形態では、Xは、結合であり、nは、1または2である。

【0077】

一部の実施形態では、ポリ(アミドアミン) dendrimerの一級アミノ基の約0.1 mol% ~ 約80 mol%が、式(I)の置換基に結合している。例えば、ポリ(アミドアミン) dendrimerの一級アミノ基の約10 mol% ~ 約70 mol%、または約20 mol% ~ 約70 mol%が、式(I)の置換基に結合している。一部の実施形態では、ポリ(アミドアミン) dendrimerの一級アミノ基の約0.1 mol%、約0.5 mol%、約1 mol%、約2 mol%、約5 mol%、約6 mol%、約7 mol%、約8 mol%、約9 mol%、約10 mol%、約15 mol%、約20 mol%、約25 mol%、約30 mol%、約35 mol%、約40 mol%、約45 mol%、約50 mol%、約55 mol%、約60 mol%、約65 mol%、約70 mol%、約75 mol%、または約80 mol%が、式(I)の置換基に結合している。修飾の程度は、例えば、下記でさらに考察されるような異なる量の試薬を使用することによって、調整することができる。修飾の程度は、例えば、 $^1H$  NMR分光法を使用して、決定することができる。

20

【0078】

ポリマーは、カチオン性であり得る官能基を含み(例えば、 $-NH_2$ は、 $-NH_3^+$ であり得る)、故に、一部の実施形態では、好適なアニオンと塩が形成され得る。好適な無機アニオンの例としては、以下の無機酸、すなわち、塩酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、硫酸、亜硫酸、硝酸、亜硝酸、リン酸、及び亜リン酸に由来するものが挙げられるが、これらに限定されない。好適な有機アニオンの例としては、以下の有機酸、すなわち、2-アセチオキシ安息香酸(acetyoxybenzoic)、酢酸、アスコルビン酸、アスパラギン酸、安息香酸、樟脳スルホン酸、桂皮酸、クエン酸、エドト酸、エタンジスルホン酸、エタンスルホン酸、フマル酸、グルコヘプトン酸、グルコン酸、グルタミン酸、グリコール酸、ヒドロキシマレイン酸、ヒドロキシナフタレンカルボン酸、イセチオン酸、乳酸、ラクチオン酸、ラウリン酸、マレイン酸、リンゴ酸、メタンスルホン酸、ムチン酸、オレイン酸、シュウ酸、パルミチン酸、パモ酸、パントテン酸、フェニル酢酸、フェニルスルホン酸、プロピオン酸、ピルピン酸、サリチル酸、ステアリン酸、コハク酸、スルファニル酸、酒石酸、トルエンスルホン酸、及び吉草酸に由来するものが挙げられるが、これらに限定されない。一部の実施形態では、該化合物は、塩酸塩である。

30

40

【0079】

該化合物は、様々な方法によって調製される。例えば、カルバメート修飾された直鎖状もしくは分岐状PEIポリマーまたはPAMAM dendrimerは、スキーム1A、1B、及び1Cに例示されるように、フッ素化アルキルp-ニトロベンゼンカーボネート化合物と反応させることによって調製することができる。PEIポリマー及びPAMAM dendrimerはまた、スキーム2に例示されるように、フッ素化アルデヒドと反応させてイミン付加体を形成させ、続いて $NaBH_4$ でイミン還元を行って、所望のアルキル化ポリマー

50

を得ることによっても修飾することができる。アミンの修飾百分率は、異なる量の試薬を添加することによって調整することができる。加えて、スキーム 3 に例示されるように、分岐状 P E I の一級アミンを B O C によってある程度保護し、続いてフッ素化ハロゲン化アルキルでアルキル化し、脱保護して、遊離一級アミンアルキル化 P E I 化合物を生み出すことができる。

【 0 0 8 0 】

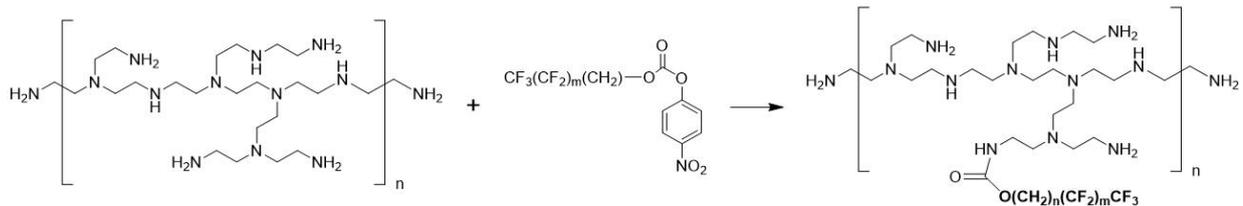
以下のスキームにおいては、以下の略号が使用される：B o c は、t e r t - ブチルオキシカルボニルであり、D C M は、ジクロロメタンであり、T H F は、テトラヒドロフランであり、T F A は、トリフルオロ酢酸であり、T I P S は、トリイソプロピルシランである。

10

スキーム 1 . カルバメート修飾を介した修飾ポリマーの合成

A . カルバメート修飾された分岐状 P E I 化合物の合成

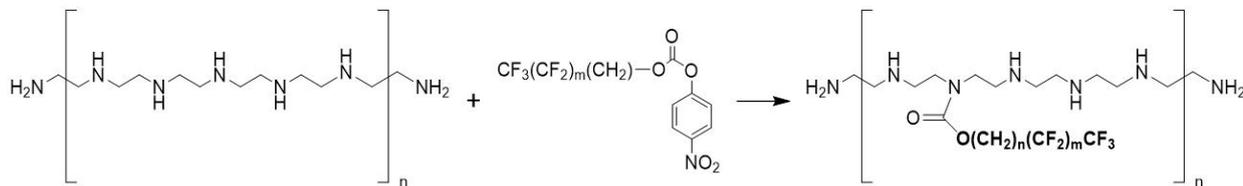
【 化 3 】



B . カルバメート修飾された直鎖状 P E I 化合物の合成

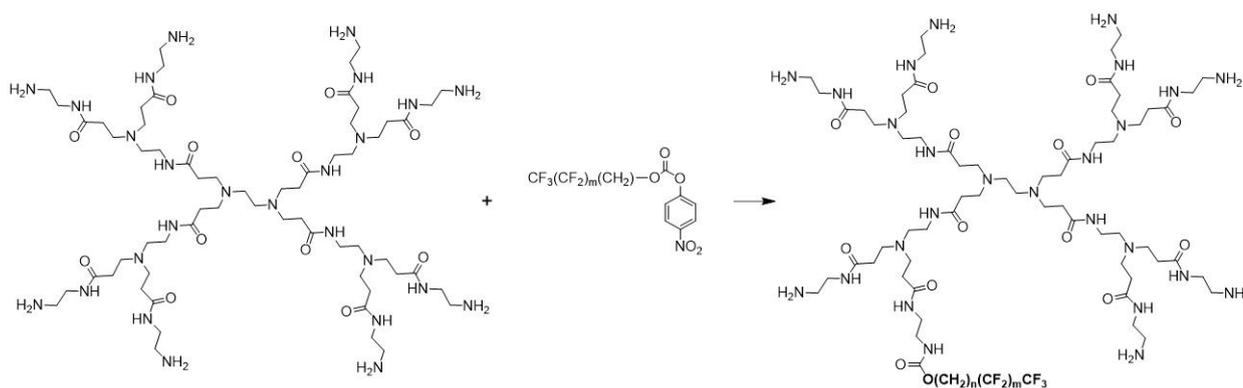
20

【 化 4 】



C . カルバメート修飾された P A M A M 第 1 世代の合成

【 化 5 】



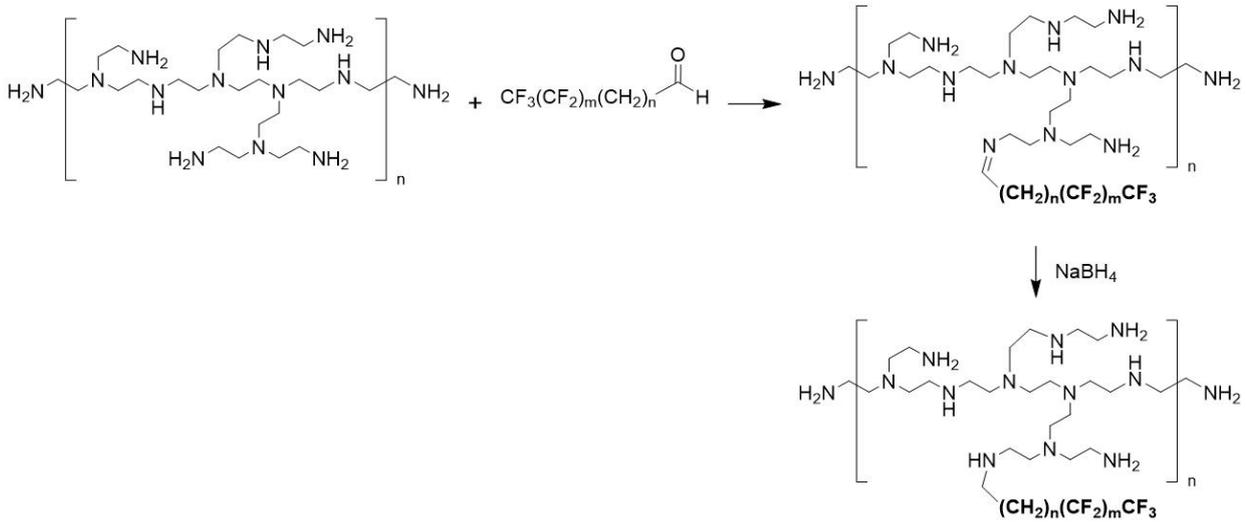
30

40

スキーム 2 . イミン還元による修飾 P E I ポリマーの合成

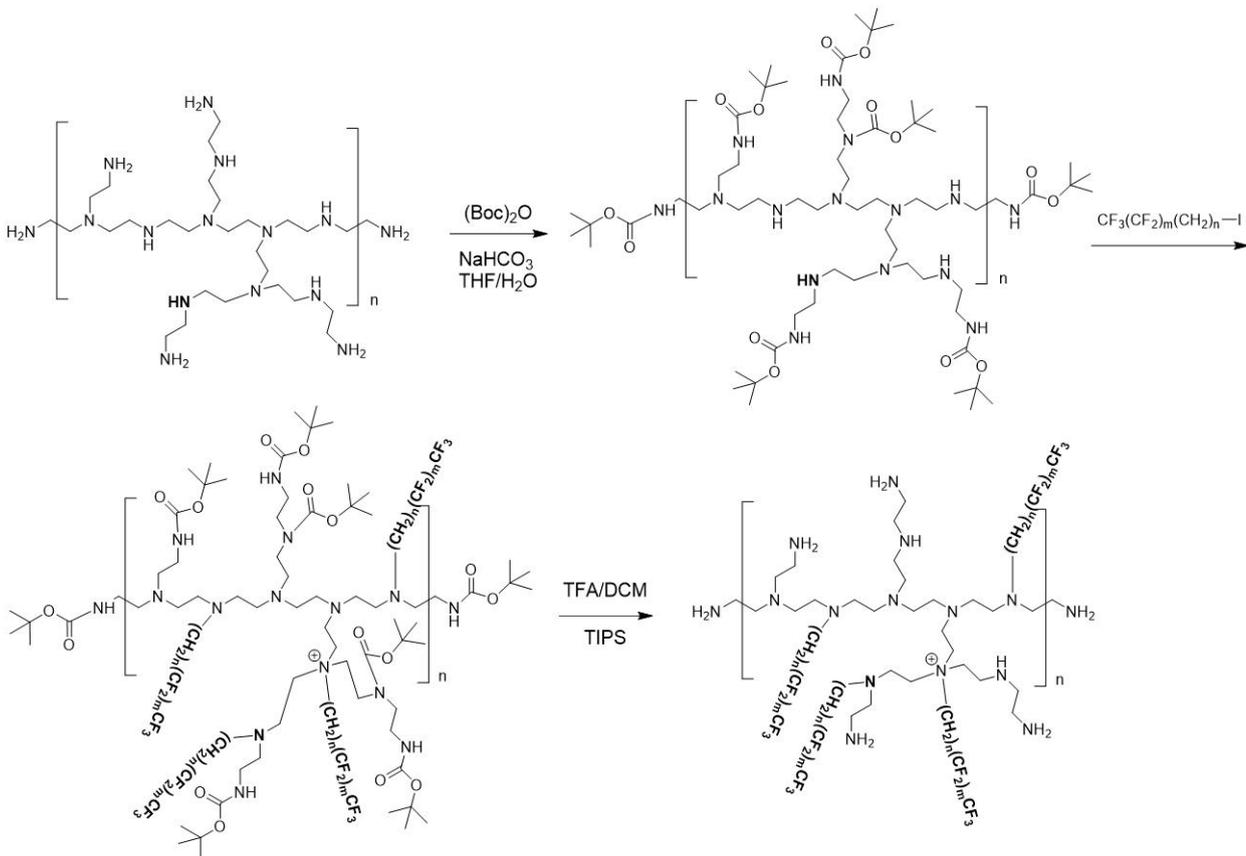
50

## 【化6】



スキーム3．BOC保護、アルキル化、及び脱保護を介した遊離一級アミンを有するアルキル化PEI

## 【化7】



## 【0081】

ここでの化合物及び中間体は、有機合成分野の当業者に周知の方法によって単離及び精製され得る。化合物を単離及び精製するための慣習的な方法の例としては、例えば、「Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry」(5th edition (1989), by Furniss, Hannaford, Smith, and Tatchell, pub. Longman Scientific & Technical, Essex CM20 2JE, England)に記載されるような、アルキルシラン基で誘導体化されたシリカゲル、アルミナ、

またはシリカ等の固体支持体上でのクロマトグラフィー、活性炭での任意選択的な前処理を伴う高温または低温での再結晶によるもの、薄層クロマトグラフィー、種々の圧力での蒸留、真空下での昇華、及びトリチュレーションが挙げられるが、これらに限定されない。

【0082】

個々のステップの各々についての反応条件及び反応時間は、用いられる特定の反応物及び使用される反応物中に存在する置換基に応じて様々であり得る。具体的な手順は、実施例の節に提供される。反応は、慣習的な様態で、例えば、溶媒を残渣から排除することによって後処理し、限定されないが、結晶化、蒸留、抽出、トリチュレーション、及びクロマトグラフィー等の当該技術分野で一般に既知の手法に従ってさらに精製することができる。別途記載されない限り、出発物質及び試薬は、市販ものであるか、または当業者が、化学文献に記載される方法を使用して市販の材料から調製することができるかのいずれかである。出発物質は、市販されていない場合、標準的な有機化学技法、構造的に類似した既知の化合物の合成に類似する技法、または上述のスキームもしくは合成の実施例の節に記載される手順に類似する技法から選択される手順によって調製することができる。

10

【0083】

反応条件、試薬、及び合成経路の順序の適切な操作、反応条件と適合することができない任意の化学官能基の保護、ならびにその方法の反応順序における好適な時点での脱保護を含めた、通例の実験が本発明の範囲に含まれる。好適な保護基、ならびにかかる好適な保護基を使用して異なる置換基を保護及び脱保護するための方法は、当業者に周知であり、その例は、PGM Wutsによる「Greene's Protective Groups in Organic Synthesis」(5th ed.) (John Wiley & Sons, Inc. (2014))と題される論文に見出すことができ、同文献は参照によりその全体が本明細書に援用される。本発明の化合物の合成は、上述の合成スキーム及び具体的な実施例に記載される方法に類似した方法によって遂行することができる。

20

【0084】

記載されるような合成スキーム及び具体的な実施例は、例示的なものであり、本発明の範囲は特許請求の範囲で規定されるため、本発明の範囲を限定するものとして閲読されるものではない。合成方法及び具体的な実施例のあらゆる代替形態、修正形態、及び等価物が、特許請求の範囲内に含まれる。

30

【0085】

調製された例となるポリマーには、表1に列挙されるものが含まれる。実際及び/または理論上の修飾百分率を用いた具体的な実施例を含む、これらのポリマーの合成に関するさらなる詳細は、実施例に見出すことができる。

40

50

【表 1 - 1】

表 1. 例となるポリマー

化合物	ポリマー	修飾テール
7668(WZ-0856)	PEI 25000	$-\text{C}(\text{O})\text{O}-(\text{CH}_2)_2(\text{CF}_2)_5\text{CF}_3$
7675(WZ-0857)	PEI 800	$-\text{C}(\text{O})\text{O}-(\text{CH}_2)_2(\text{CF}_2)_5\text{CF}_3$
7666(WZ-0853)	PEI 25000	$-\text{C}(\text{O})\text{O}-(\text{CH}_2)_2(\text{CF}_2)_3\text{CF}_3$
7667(WZ-0852)	PEI 800	$-\text{C}(\text{O})\text{O}-(\text{CH}_2)_2(\text{CF}_2)_3\text{CF}_3$
7729(WZ-0882)	PEI 600	$-\text{C}(\text{O})\text{O}-(\text{CH}_2)_2(\text{CF}_2)_3\text{CF}_3$
7730(WZ-0885)	PEI 1200	$-\text{C}(\text{O})\text{O}-(\text{CH}_2)_2(\text{CF}_2)_3\text{CF}_3$
7731(WZ-0883)	PEI 1800	$-\text{C}(\text{O})\text{O}-(\text{CH}_2)_2(\text{CF}_2)_3\text{CF}_3$
7732(WZ-0884)	PEI 10000	$-\text{C}(\text{O})\text{O}-(\text{CH}_2)_2(\text{CF}_2)_3\text{CF}_3$
7738(wz-0891)	PEI 600	$-\text{C}(\text{O})\text{O}-(\text{CH}_2)_2(\text{CF}_2)_2\text{CF}_3$
7739(wz-0892)	PEI 800	$-\text{C}(\text{O})\text{O}-(\text{CH}_2)_2(\text{CF}_2)_2\text{CF}_3$

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

7740(wz-0893)	PEI 1200	$-\text{C}(\text{O})\text{O}-(\text{CH}_2)_2(\text{CF}_2)_2\text{CF}_3$
7741(wz-0894)	PEI 1800	$-\text{C}(\text{O})\text{O}-(\text{CH}_2)_2(\text{CF}_2)_2\text{CF}_3$
7782(wz-0923)	PEI 10000	$-\text{C}(\text{O})\text{O}-(\text{CH}_2)_2(\text{CF}_2)_2\text{CF}_3$
7783(wz-0924)	PEI 25000	$-\text{C}(\text{O})\text{O}-(\text{CH}_2)_2(\text{CF}_2)_2\text{CF}_3$
7742(wz-0895)	PEI 600	$-\text{C}(\text{O})\text{O}-(\text{CH}_2)_2\text{CF}_2\text{CF}_3$
7743(wz-0896)	PEI 800	$-\text{C}(\text{O})\text{O}-(\text{CH}_2)_2\text{CF}_2\text{CF}_3$
7744(wz-0897)	PEI 1200	$-\text{C}(\text{O})\text{O}-(\text{CH}_2)_2\text{CF}_2\text{CF}_3$
7745(wz-0898)	PEI 1800	$-\text{C}(\text{O})\text{O}-(\text{CH}_2)_2\text{CF}_2\text{CF}_3$
7758(wz-0902)	PEI 600	$-\text{C}(\text{O})\text{O}-\text{CH}_2(\text{CF}_2)_2\text{CF}_3$
7759(wz-0903)	PEI 800	$-\text{C}(\text{O})\text{O}-\text{CH}_2(\text{CF}_2)_2\text{CF}_3$
7760(wz-0904)	PEI 1200	$-\text{C}(\text{O})\text{O}-\text{CH}_2(\text{CF}_2)_2\text{CF}_3$
7766(WZ-0908)	PAMAM G1	$-\text{C}(\text{O})\text{O}-(\text{CH}_2)_2(\text{CF}_2)_2\text{CF}_3$
7767(WZ-0909)	PAMAM G3	$-\text{C}(\text{O})\text{O}-(\text{CH}_2)_2(\text{CF}_2)_2\text{CF}_3$
7768(WZ-0910)	PAMAM G5	$-\text{C}(\text{O})\text{O}-(\text{CH}_2)_2(\text{CF}_2)_2\text{CF}_3$
7825(WZ-0949)	PAMAM G2	$-\text{C}(\text{O})\text{O}-(\text{CH}_2)_2(\text{CF}_2)_2\text{CF}_3$
7826(WZ-0950)	PAMAM G7	$-\text{C}(\text{O})\text{O}-(\text{CH}_2)_2(\text{CF}_2)_2\text{CF}_3$
7829(WZ-0952)	PAMAM G4	$-\text{C}(\text{O})\text{O}-(\text{CH}_2)_2(\text{CF}_2)_2\text{CF}_3$
7830(WZ-0953)	PAMAM G6	$-\text{C}(\text{O})\text{O}-(\text{CH}_2)_2(\text{CF}_2)_2\text{CF}_3$
7838(WZ-0957)	直鎖状 PEI-10K	$-\text{C}(\text{O})\text{O}-(\text{CH}_2)_2(\text{CF}_2)_3\text{CF}_3$
7839(WZ-0958)	直鎖状 PEI-10K	$-\text{C}(\text{O})\text{O}-(\text{CH}_2)_2(\text{CF}_2)_2\text{CF}_3$
7840(WZ-0961)	直鎖状 PEI-25K	$-\text{C}(\text{O})\text{O}-(\text{CH}_2)_2(\text{CF}_2)_3\text{CF}_3$
7841(WZ-0962)	直鎖状 PEI-25K	$-\text{C}(\text{O})\text{O}-(\text{CH}_2)_2(\text{CF}_2)_2\text{CF}_3$
7842(WZ-0963)	直鎖状 PEI-2.5K	$-\text{C}(\text{O})\text{O}-(\text{CH}_2)_2(\text{CF}_2)_3\text{CF}_3$
7843(WZ-0964)	直鎖状 PEI-250K	$-\text{C}(\text{O})\text{O}-(\text{CH}_2)_2(\text{CF}_2)_3\text{CF}_3$
7636(WZ-0867)	PEI 800	$-(\text{CH}_2)_2(\text{CF}_2)_5\text{CF}_3$
7637(WZ-0868)	PEI 25000	$-(\text{CH}_2)_2(\text{CF}_2)_5\text{CF}_3$
7709(WZ-0869)	PEI 800	$-(\text{CH}_2)_2(\text{CF}_2)_7\text{CF}_3$
7710(WZ-0870)	PEI 25000	$-(\text{CH}_2)_2(\text{CF}_2)_7\text{CF}_3$
7669(WZ-0860)	PEI-25K	ペンタフルオロベンジル
7677(WZ-0861)	PEI-800	ペンタフルオロベンジル
7676(WZ-0862)	PEI-25K	$\text{CH}_2\text{Py}$
7827(WZ-0954)	PEI-1200	$-\text{CH}_2(\text{CF}_2)_3\text{CF}_3$
7833(WZ-0955)	PEI-25000	$-\text{CH}_2(\text{CF}_2)_3\text{CF}_3$

10

20

30

40

## 【 0 0 8 6 】

## 3. 方法

本開示の実施形態は、細胞中に目的の生体分子を送達するために使用される種々の組成物及び方法を含む。これらの実施形態によれば、該組成物及び方法は、場合によってはエレクトロポレーションの必要性なしに、細胞中にデオキシリボ核酸 (DNA) 分子、リボ核酸 (RNA) 分子、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、リボ核タンパク質、またはそれらの任意の組み合わせもしくは誘導体のうちの1つまたは複数を送達するための、PEI及びPAMAM dendrimer等の修飾ポリアミンポリマーの使用を含む。

## 【 0 0 8 7 】

50

本明細書に開示されるような P E I もしくは P A M A M デンドリマー、またはそれらの任意の組み合わせを含む組成物を使用して、細胞中に核酸分子を送達することができる（例えば、遺伝子トランスフェクション）。一部の実施形態では、核酸は、DNA、RNA、またはそれらの組み合わせ及び誘導体を含むポリヌクレオチドである。「核酸分子」、「核酸配列」、及び「ポリヌクレオチド」という用語は、同義語であり、一本鎖または二本鎖であり得、非天然または改変ヌクレオチドを含有し得る DNA または RNA のポリマーを包含することが意図される。これらの用語は、等価物として、限定されないが、メチル化及び/またはキャップ付加ポリヌクレオチド等のヌクレオチド類似体及び修飾ポリヌクレオチドから作製される、RNA または DNA のいずれかの類似体を含む。核酸は、典型的には、リン酸結合を介して連結されて、核酸配列またはポリヌクレオチドを形成するが、多くの他の連結が当該技術分野で既知である（例えば、ホスホロチオエート、ボラノホスフェート等）。

10

**【0088】**

1つまたは複数の核酸分子は、DNA、RNA、またはそれらの組み合わせ（例えば、DNA/RNAハイブリッド）であり得る。一部の実施形態では、核酸分子は、プラスミドである。本明細書で使用される「プラスミド」という用語は、染色体DNAから物理的に分離されており、独立して（すなわち「エピソーム」として）複製することができる、細胞内の小さなDNA分子を指す。プラスミドは、細菌、古細菌、及び他の真核生物に天然に存在し、小さな環状二本鎖DNA分子として一般的に存在する。分子クローニングにおけるベクターとして合成プラスミドが当該技術分野で広く使用され、宿主生物内で組換えDNA配列の複製を駆動する。プラスミドDNAは、例えば、Green and Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Fourth Edition), Cold Spring Harbor Laboratory Press (June 15, 2012) に記載される技法等の通例の分子生物学技法を使用して生成されてもよいし、または商業的供給源から得られてもよい。

20

**【0089】**

プラスミドは、インビトロまたはインビボのいずれかで標的細胞に送達されることになる異種核酸配列を含む、任意の好適な組換えDNAまたはRNAプラスミドであってもよい。異種核酸配列は、例えば疾患の治療または予防の目的で、目的の遺伝子産物（例えば、タンパク質）をコードし得、任意選択で、発現カセットの形態であり得る。「組換え」という用語は、天然に存在しないか、または自然界では見出されない配置で別のポリヌクレオチドに連結されているかのいずれかである、半合成または合成起源のポリヌクレオチドを指す。本明細書で使用される「異種」という用語は、それが比較されている残りの実体とは遺伝学的に明確に異なる実体から得られたまたはそれに由来する核酸配列を指す。

30

**【0090】**

一部の実施形態では、本明細書に開示されるような P E I または P A M A M デンドリマーを使用して、細胞中にタンパク質、ペプチド、または抗体を送達することができる。例えば、P E I または P A M A M デンドリマーを使用して、限定されないが、NanoLuc（配列番号2）、HiBiT（配列番号3）、LgBiT（配列番号4）、SmBiT（配列番号5）、DarkBiT（配列番号6）、DarkBiT（配列番号7、配列番号8）、LgTrip 3092（配列番号9）、LgTrip 3546（配列番号10）、LgTrip 2098（配列番号11）、及びSmTrip9（配列番号12）等の、生物発光複合体を形成することができる（例えば、相補的）タンパク質またはペプチド（またはそのポリヌクレオチド）を送達することができる。一部の実施形態では、相補的な生物発光タンパク質またはペプチドを使用して、生物発光（例えば、生物発光複合体の形成）の検出または非検出に基づく後続の評価または監視のために、1つまたは複数の目的のタンパク質または目的のペプチドをタグ付けすることができる。

40

**【0091】**

これらの実施形態によれば、修飾 P E I または P A M A M デンドリマーを使用して送達

50

されたタンパク質またはペプチドを使用して、タンパク質間相互作用、遮断抗体によるタンパク質干渉、細胞内トラフィッキング、及びタンパク質またはペプチドの生物学的機能を研究することができる。例えば、修飾PEIまたはPAMAM dendrimerを使用して送達されたペプチドまたはタンパク質は、生細胞におけるタンパク質の定量のために、他方の断片でタグ付けされた標的タンパク質と相補的タンパク質を形成することができる。一実施形態では、細胞においてLgBiTを直接送達することによって、HiBiTタグ付きタンパク質標的（例えば、HiBiTタグを含む目的のタンパク質）を定量することができ、これにより別個の遺伝子トランスフェクションステップ（例えば、BacMamトランスフェクション、ヌクレオフェクション等）の必要性を取り除く。

#### 【0092】

一部の実施形態では、核酸分子は、標的遺伝子の編集または修飾を媒介する1つまたは複数の核酸配列を含むDNAプラスミドである。例えば、DNAプラスミドは、Cas9遺伝子またはタンパク質を含むがこれらに限定されない、CRISPR/Cas9遺伝子編集系の構成要素を含み得る。CRISPR/Cas9遺伝子編集系は、細胞において目的の特定の遺伝子の標的化された修飾を可能にするために開発されてきた。CRISPR/Cas9遺伝子編集系は、原核生物の規則的な間隔をもってクラスター化された短鎖反復回文配列II型（CRISPR）適応免疫系からのRNA誘導型Cas9ヌクレアーゼに基づく（例えば、Jinek et al., *Science*, 337: 816 (2012)、Gasiunas et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 109, E2579 (2012)、Garneau et al., *Nature*, 468: 67 (2010)、Deveau et al., *Annu. Rev. Microbiol.*, 64: 475 (2010)、Horvath and Barrangou, *Science*, 327: 167 (2010)、Makarova et al., *Nat. Rev. Microbiol.*, 9, 467 (2011)、Bhaya et al., *Annu. Rev. Genet.*, 45, 273 (2011)、Cong et al., *Science*, 339: 819-823 (2013)、ならびに米国特許第8,697,359号、同第8,795,965号、及び同第9,322,037号を参照されたく、これらの文献の全ては参照によりそれらの全体が本明細書に援用される）。

#### 【0093】

一部の実施形態では、核酸は、CRISPR標的化型RNA（crRNA）及びトランス活性化型crRNA（tracrRNA）を含むgRNA等の、CRISPR/Cas9遺伝子編集系と適合性であるガイドRNA（gRNA）である。一部の実施形態では、CRISPR/Cas9系のcrRNA及びtracrRNA構成要素は、ゲノムDNAの特定の配列を標的化するために1つのRNA分子へと融合される（gRNAは自然界で見出されない）。crRNA配列は一般に、所望のゲノムDNAを標的化するために合成される一方で、tracrRNA配列は、Casタンパク質と複合体を形成するために必要とされる細菌配列に由来する。ガイドRNAはまた、シングルガイドRNA（sgRNA）とも称され得る。

#### 【0094】

一部の実施形態では、gRNA及びCas9タンパク質は、リボ核タンパク質（RNP）複合体を構成することができる。RNPは一般に、gRNAと複合体を形成した精製Cas9タンパク質を含む。かかるRNPは、インビトロで組み立てることができ、場合によってはエレクトロポレーションの必要性なしに、本開示のPEI及びPAMAM dendrimer等の修飾ポリアミンポリマーを使用して細胞に直接送達することができる。Cas9 RNPは、Cas9/gRNAのプラスミドベースの発現と比較して類似の効率でゲノム標的を切断することができ、多種多様な細胞種における単一遺伝子または複数遺伝子ノックアウトの生成、相同配列依存的修復（HDR）を使用した遺伝子編集、及び大きなゲノム欠失の生成を含むがこれらに限定されない、ほとんどの現行のCRISPRのゲノム操作用途に使用することができる。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 9 5 】

一部の実施形態では、本明細書にさらに開示されるように、細胞において目的のタンパク質上の発光ペプチドまたはポリペプチドタグの挿入を容易にするために、PEI及びPAMAM dendrimer等の修飾ポリアミンポリマーを使用して、細胞中にCas9 RNPが送達される。一部の実施形態では、細胞中へのかかるRNPの送達は、目的のタンパク質及び発光タグの発現をもたらす（例えば、タグの発光によって測定されるような）、及び/または目的のタンパク質及び発光タグの安定な発現を示すクローンの生産をもたらすことができる。例えば、Cas9 RNPは、Cas9タンパク質、gRNA、及びドナーDNAテンプレートを含有する。ドナーDNAテンプレートは、発光活性が可能なペプチドまたはポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、ならびに目的の内因性タンパク質の近くでのペプチドまたはポリペプチドの挿入を容易にするゲノム配列（例えば、ホモロジーアーム）を含有する。Cas9タンパク質、gRNA、及びドナーDNAテンプレートを含有するRNPは、タンパク質発現（例えば、発光）の一過性の定量及び安定な定量の両方のために、細胞中への送達を容易にするための本開示の修飾ポリアミンポリマーを含む組成物に組み込むことができる。

10

## 【 0 0 9 6 】

一部の実施形態では、ドナーDNAテンプレートは、NanoLucに由来する18 kDaのサブユニット（LgBiT）との高い親和性での相補性により高輝度の定量的発光を生じさせることができる11アミノ酸のポリペプチドである、HiBiT（配列番号3）をコードする配列を含む。これらの実施形態によれば、HiBiTをコードする配列を含有するドナーDNAを有するRNPは、本開示の修飾ポリアミンポリマーを使用して細胞中に送達することができる。一部の実施形態では、発光を生成するために、発光基質及びLgBiT（配列番号4）が細胞溶解物に添加されるか、または本開示の修飾ポリアミンポリマーを使用して細胞中に直接送達される。基質の存在下でのHiBiT及びLgBiTの相補性により、目的のタンパク質の発現に比例する発光シグナルが生成される。場合によっては、本開示の修飾ポリアミンポリマーによる細胞中へのRNP及び/または発光性ペプチドもしくはポリペプチドの送達は、顕著な細胞毒性を引き起こすことなく、エレクトロポレーション等の他の送達方法を使用する必要性を取り除く。

20

## 【 0 0 9 7 】

一部の実施形態では、ドナーDNAテンプレートは、NanoLucに由来する18 kDaのサブユニット（例えば、LgBiT）との高い親和性での相補性により高輝度の定量的発光を生じさせることができる11アミノ酸のポリペプチド（例えば、SmBiT（配列番号5））をコードする配列を含む。これらの実施形態によれば、SmBiTをコードする配列を含有するドナーDNAを有するRNPは、本開示の修飾ポリアミンポリマーを使用して細胞中に送達することができる。一部の実施形態では、発光を生成するために、発光基質及びLgBiT（配列番号4）が細胞溶解物に添加されるか、または本開示の修飾ポリアミンポリマーを使用して細胞中に直接送達される。基質の存在下でのSmBiT及びLgBiTの相補性により、目的のタンパク質の発現に比例する発光シグナルが生成される。場合によっては、本開示の修飾ポリアミンポリマーによる細胞中へのRNP及び/または発光性ペプチドもしくはポリペプチドの送達は、顕著な細胞毒性を引き起こすことなく、エレクトロポレーション等の他の送達方法を使用する必要性を取り除く。

30

40

## 【 0 0 9 8 】

一部の実施形態では、ドナーDNAテンプレートは、米国特許第9,797,890号に開示されるペプチドまたはポリペプチドのうちのいずれかをコードする配列を含み、同文献は参照によりその全体が全目的で本明細書に援用される。例えば、ドナーテンプレートは、MGVTGWRLCERILA（配列番号8）との単一のアミノ酸の相違を含むペプチドまたはポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチドを含有する。一部の実施形態では、ドナーテンプレートは、MGVTGWRLCERILA（配列番号2）との2個以上（例えば、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個等）のアミノ酸の相違を含むペプチドもしくはポリペプチド、または米国特許第9,797,890号に

50

開示される任意の他のペプチドもしくはポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチドを含み得る。

【0099】

一部の実施形態では、ドナーDNAテンプレートは、米国仮特許第62/684,014号に開示されるペプチドまたはポリペプチドのうちのいずれかをコードする配列を含み、同文献は参照によりその全体が全目的で本明細書に援用される。例えば、ドナーテンプレートは、LgTrip 3092 (配列番号9)、LgTrip 3546 (配列番号10)、LgTrip 2098 (配列番号11)、またはSmTrip9 (配列番号12)のアミノ酸との単一のアミノ酸の相違を含むペプチドまたはポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチドを含み得る。一部の実施形態では、ドナーテンプレートは、配列番号9~12との2個以上(例えば、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個等)のアミノ酸の相違を含むペプチドもしくはポリペプチド、または米国仮特許第62/684,014号に開示される任意の他のペプチドもしくはポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチドを含み得る。

10

【0100】

本開示の実施形態はまた、例えば、トランスフェクション効率及び毒性レベルの関連において許容される結果を提供し得る、目的の生体分子に最適な濃度での最適な修飾PEIもしくはPAMAMの濃度、またはそれらの組み合わせを特定することを含む。これらの比率または濃度は、経験的に決定されてもよく、PEI及びPAMAMにおけるアミンの修飾百分率、目的の生体分子(例えば、ポリヌクレオチド、ポリペプチド)、細胞の種類、細胞密度、アッセイの性質等を含むがこれらに限定されない様々な要因に依存しよう。一部の実施形態では、最適な濃度は、nM~µMの範囲である。一部の実施形態では、最適な濃度は、1µM~20µMの範囲である。

20

【0101】

本開示の組成物及び方法と共に使用することができる細胞には、任意の好適な原核または真核細胞が含まれる。好適な細胞には、容易かつ確実に増殖させられる細胞、適度に速い増殖速度を有する細胞、特徴がよく解明されている発現系を有する細胞、及び容易かつ効率的に形質転換またはトランスフェクトされ得る細胞が含まれ得る。好適な原核細胞の例としては、Bacillus属(Bacillus subtilis及びBacillus brevis等)、Escherichia属(E.coli等)、Pseudomonas属、Streptomyces属、Salmonella属、及びErwinia属由来の細胞が挙げられるが、これらに限定されない。特に有用な原核細胞には、Escherichia coliの種々の株(例えば、K12、HB101(ATCC番号33694)、DH5a、DH10、MC1061(ATCC番号53338)、及びCC102)が含まれる。好適な真核細胞は当該技術分野で既知であり、これには、例えば、初代細胞及び形質転換細胞を含めた、酵母細胞、昆虫細胞、及び哺乳類細胞が含まれる。一部の実施形態では、細胞は、哺乳類細胞である。いくつかの好適な哺乳類宿主細胞が当該技術分野で既知であり、多くがAmerican Type Culture Collection(ATCC, Manassas, VA)から入手可能である。好適な哺乳類細胞の例としては、チャニーズハムスター卵巢細胞(CHO)(ATCC番号CCL61)、CHO DHFR細胞(Urlaub et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97:4216-4220(1980))、ヒト胎児腎(HEK)293または293T細胞(ATCC番号CRL1573)、及び3T3細胞(ATCC番号CCL92)が挙げられるが、これらに限定されない。他の好適な哺乳類細胞株は、サルCOS-1(ATCC番号CRL1650)及びCOS-7細胞株(ATCC番号CRL1651)、ならびにCV-1細胞株(ATCC番号CCL70)である。

30

40

【0102】

本開示の実施形態はまた、本明細書に記載の種々の構成要素を含むキットを含む。例えば、キットは、本明細書に記載の修飾ポリアミンポリマー化合物またはその塩のうちのいずれかを、容器及び/または説明書と共に含み得る。キットはまた、DNA分子、RNA

50

分子、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、またはそれらの任意の組み合わせもしくは誘導体のうちの少なくとも1つを含んでもよい。一部の実施形態では、キットは、Cas9タンパク質のペプチドまたはポリペプチドを含む。一部の実施形態では、キットは、発光ペプチドまたはポリペプチド（例えば、HiBiT、LgBiT）をコードする配列を含むドナーDNAテンプレートを含む。一部の実施形態では、キットは、gRNAを含む。一部の実施形態では、キットは、例えば、Cas9タンパク質のペプチドまたはポリペプチド、発光ペプチドまたはポリペプチド（例えば、HiBiT、LgBiT）をコードする配列を含むドナーDNAテンプレート、及びgRNAを含む、RNP複合体を含む。

【実施例】

【0103】

本明細書に記載される本開示の方法の他の好適な修正及び適合が容易に適用可能かつ認識可能であり、本開示の範囲または本明細書に開示される態様及び実施形態を逸脱することなく好適な等価物を使用してなされ得ることが当業者には容易に明らかとなる。以上、本開示を詳細に記載したが、同じことが、以下の実施例を参照することでより明確に理解されることになり、これらの実施例は、単に本開示の一部の態様及び実施形態を例示することのみを意図しており、本開示の範囲を限定するものと見なされるべきではない。本明細書で参照される全ての学術誌参考文献、米国特許、及び刊行物の開示は、参照によりそれらの全体が本明細書に援用される。

【0104】

本開示は、以下の非限定的な実施例により例示される複数の態様を有する。

【0105】

これらの実施例においては、以下の略号が使用される：Bocは、tert-ブチルオキシカルボニルであり、DMEMは、ダルベッコ変法イーグル培地であり、DMFは、N,N-ジメチルホルムアミドであり、EtOHは、エタノールであり、FBSは、ウシ胎児血清であり、MeOHは、メタノールであり、THFは、テトラヒドロフランである。

【0106】

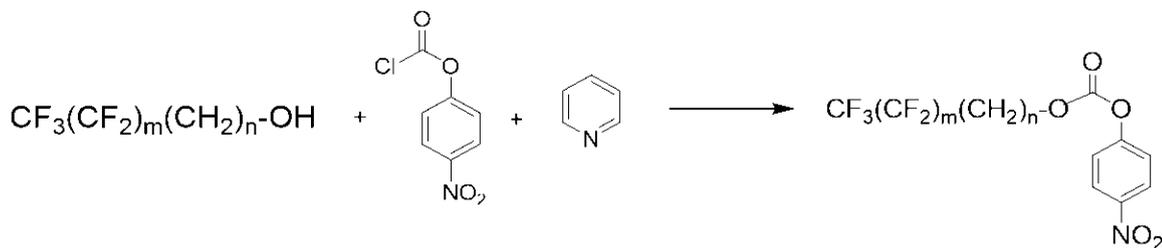
実施例1

化合物合成

I. カルバメート修飾

フッ素化アルキルp-ニトロベンゼンカーボネートの合成。

【化8】



【0107】

脱水THF中のフッ素化アルコール（1当量）及びp-ニトロベンゼンクロロホルメート（1.5当量）の溶液に、脱水ピリジン（3当量）を0で添加した。混合物を室温で一晩攪拌した。白色の固体を濾過によって除去した後、濾液の溶媒を蒸発させ、残渣を、溶離液としてヘプタン/酢酸エチルを使用したシリカカラムによって精製して、80~90%の収率で所望の化合物を得た。

【0108】

4-ニトロフェニル（3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-トリデカフルオロオクチル）カーボネート（WZ-0845）：<sup>1</sup>H NMR（CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>，

10

20

30

40

50

ppm) : 8.31 (d, 2H), 7.46 (d, 2H), 4.62 (t, 2H, CH<sub>2</sub>O), 2.69 (m, 2H, CH<sub>2</sub>). MS (m/e) [M+H] (C<sub>15</sub>H<sub>8</sub>F<sub>13</sub>NO<sub>5</sub>) : 計算値 529.21, 観測値 529.4。

【0109】

4-ニトロフェニル(3,3,4,4,5,5,6,6,6-ノナフルオロヘキシル)カーボネート(WZ-0921)。<sup>1</sup>H NMR (CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, ppm) : 8.33 (d, 2H), 7.47 (d, 2H), 4.64 (t, 2H, CH<sub>2</sub>O), 2.70 (m, 2H, CH<sub>2</sub>)。MS (m/e) [M+H] (C<sub>13</sub>H<sub>8</sub>F<sub>9</sub>NO<sub>5</sub>) : 計算値 429.19, 観測値 430.2。

【0110】

4-ニトロフェニル(2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,6-ウンデカフルオロヘキシル)カーボネート(WZ-0851)。<sup>1</sup>H NMR (CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, ppm) : 8.34 (d, 2H), 7.47 (d, 2H), 4.84 (t, 2H, CH<sub>2</sub>)。MS (m/e) [M+H] (C<sub>13</sub>H<sub>6</sub>F<sub>11</sub>NO<sub>5</sub>) : 計算値 465.18, 観測値 465.2。

【0111】

4-ニトロフェニル(2,2,3,3,4,4,5,5,5-ノナフルオロペンチル)カーボネート(WZ-0886)。<sup>1</sup>H NMR (CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, ppm) : 8.34 (d, 2H), 7.47 (d, 2H), 4.85 (t, 2H, CH<sub>2</sub>)。MS (m/e) [M+H] (C<sub>12</sub>H<sub>6</sub>F<sub>9</sub>NO<sub>5</sub>) : 計算値 415.17, 観測値 415.3。

【0112】

4-ニトロフェニル(3,3,4,4,5,5,5-ヘプタフルオロペンチル)カーボネート(WZ-0887)。<sup>1</sup>H NMR (CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, ppm) : 8.32 (d, 2H), 7.45 (d, 2H), 4.64 (t, 2H, CH<sub>2</sub>O), 2.68 (m, 2H, CH<sub>2</sub>)。MS (m/e) [M+H] (C<sub>12</sub>H<sub>8</sub>F<sub>7</sub>NO<sub>5</sub>) : 計算値 379.19, 観測値 379.2。

【0113】

カルバメート修飾PEI 7667の合成。スキーム4に示されるように、5mlのTHF/1mlのMeOH中のPEI (MW 800)及び150mg (3.49mmol)のモノマー)の溶液を含有する4つのバイアルに、0.1g/mlの4-ニトロフェニル(3,3,4,4,5,5,6,6,6-ノナフルオロヘキシル)カーボネート(WZ-0850)、THF溶液を、それぞれモノマー16% (0.24g、0.56mmol)、27% (0.40g、0.94mmol)、42% (0.63g、1.46mmol)、及び53% (0.79g、1.84mmol)のモル百分率に相当する量で添加した。結果として得られた溶液を2日間にわたって攪拌した。次いで、4つの個々の溶液を4つのFloat-A-Lyzer G2透析デバイス(0.5~1.0kD、10ml)に移し、MeOH中、MeOH中0.02MのHCl、及びH<sub>2</sub>O中0.02MのHClで3日間にわたって順次に透析した。混合物を、t-ブタノール(10ml)を含む4本のチューブにさらに移した。結果として得られた4つの混合物を4つのバイアル中に濾過し、濾液を2日間にわたって凍結乾燥させ、4つの異なる理論上の修飾百分率を有する白色の粉末7667-a-1、7667-a-2、7667-a-3、及び7667-a-4を得た。<sup>1</sup>H NMRによって得られた実際の修飾百分率は、それぞれ10.2%、16.4%、22.0%、及び30.0%であった。

スキーム4.カルバメート修飾された第7667番の合成。

10

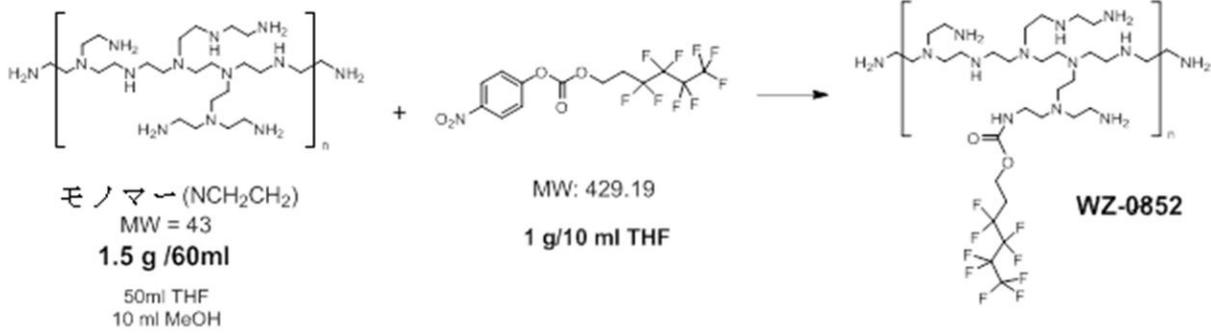
20

30

40

50

## 【化 9】



10

## 【表 2】

第 7667 番	PEI MW=800	モノマー MW 43	4-ニトロベンゼン- カーボネート	理論上の修 飾%	NMR 修飾%
第 7667-a-1 番	150mg	3.49mmol	0.24g、0.56mmol	16%	10.2%
第 7667-a-2 番	150mg	3.49mmol	0.40g、0.94mmol	27%	16.4%
第 7667-a-3 番	150mg	3.49mmol	0.63g、1.46mmol	42%	22.0%
第 7667-a-4 番	150mg	3.49mmol	0.79g、1.84mmol	53%	30.0%

20

## 【 0 1 1 4】

他のカルバメート修飾された分岐状 PEI、直鎖状 PEI、または PAMAM は、7667 について記載した類似の方法を用いることによって調製した。PEI モノマーまたは PAMAM 一級アミンについての理論上及び実際の修飾百分率を表 2 に列挙した。

30

40

50

【表 3 - 1】

表 2. 異なるフッ素化カルバメートによって修飾された、異なるサイズの PEI モノマーまたは異なる世代の PAMAM 遊離アミンの理論上及び実際の修飾百分率。

化合物	ポリマー	修飾テール	理論上の修飾%	NMR%
<b>7668(WZ-0856)-a-1</b>	<b>PEI 25000</b>	<b>-C(O)O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>(CF<sub>2</sub>)<sub>5</sub>CF<sub>3</sub></b>	<b>3%</b>	<b>2%</b>
a-2			6%	4%
a-3			9%	6%
a-4			12%	9%
a-5			17%	12%
a-6			20%	14%
<b>7675(WZ-0857)-a-1</b>	<b>PEI 800</b>	<b>-C(O)O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>(CF<sub>2</sub>)<sub>5</sub>CF<sub>3</sub></b>	<b>9%</b>	<b>18%</b>
a-2			16%	20%
a-3			25%	25%
a-4			32%	25%
<b>7666 (WZ-0853)-a-1</b>	<b>PEI 25000</b>	<b>-C(O)O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>(CF<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CF<sub>3</sub></b>	<b>3%</b>	<b>3%</b>
a-2			6%	6%
a-3			9%	12%
a-4			12%	16%
a-5			17%	21%
a-6			20%	29%
<b>7667 (WZ-0852)-a-1</b>	<b>PEI 800</b>	<b>-C(O)O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>(CF<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CF<sub>3</sub></b>	<b>16%</b>	<b>10%</b>
a-2			27%	16%
a-3			42%	22%
a-4			53%	30%
<b>7729 (WZ-0882)-a-1</b>	<b>PEI 600</b>	<b>-C(O)O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>(CF<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CF<sub>3</sub></b>	<b>20%</b>	<b>22%</b>
a-2			30%	44%
a-3			40%	水不溶性
a-4			50%	水不溶性
<b>7730(WZ-0885)-a-1</b>	<b>PEI 1200</b>	<b>-C(O)O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>(CF<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CF<sub>3</sub></b>	<b>20%</b>	<b>24%</b>
a-2			30%	44%
a-3			40%	水不溶性

10

20

30

40

50

【表 3 - 2】

a-4			50%	水不溶性
7731(WZ-0883)-a-1	PEI 1800	$-\text{C}(\text{O})\text{O}-(\text{CH}_2)_2(\text{CF}_2)_3\text{CF}_3$	20%	21%
a-2			30%	35%
a-3			40%	水不溶性
a-4			50%	水不溶性
7732(WZ-0884)-a-1	PEI 10000	$-\text{C}(\text{O})\text{O}-(\text{CH}_2)_2(\text{CF}_2)_3\text{CF}_3$	15%	20%
a-2			20%	水不溶性
a-3			25%	水不溶性
7738(wz-0891)-a-1	PEI 600	$-\text{C}(\text{O})\text{O}-(\text{CH}_2)_2(\text{CF}_2)_2\text{CF}_3$	20%	15%
a-2			30%	23%
a-3			40%	33%
a-4			50%	41%
7739(wz-0892)-a-1	PEI 800	$-\text{C}(\text{O})\text{O}-(\text{CH}_2)_2(\text{CF}_2)_2\text{CF}_3$	20%	21%
a-2			30%	29%
a-3			40%	34%
a-4			50%	36%
7740(wz-0893)-a-1	PEI 1200	$-\text{C}(\text{O})\text{O}-(\text{CH}_2)_2(\text{CF}_2)_2\text{CF}_3$	20%	17%
a-2			30%	27%
a-3			40%	34%
a-4			50%	部分的に 可溶性
7741(wz-0894)-a-1	PEI 1800	$-\text{C}(\text{O})\text{O}-(\text{CH}_2)_2(\text{CF}_2)_2\text{CF}_3$	20%	17%
a-2			30%	26%
a-3			40%	34%
a-4			50%	部分的に 可溶性
7782(wz-0923)-a-1	PEI 10000	$-\text{C}(\text{O})\text{O}-(\text{CH}_2)_2(\text{CF}_2)_2\text{CF}_3$	8%	
a-2			12%	
a-3			16%	
a-4			20%	
a-5			24%	
7783(wz-0924)-a-1	PEI 25000	$-\text{C}(\text{O})\text{O}-(\text{CH}_2)_2(\text{CF}_2)_2\text{CF}_3$	8%	

10

20

30

40

50

【表 3 - 3】

a-2			12%	
a-3			16%	
a-4			20%	
a-5			24%	
7742(wz-0895)-a-1	PEI 600	$-\text{C}(\text{O})\text{O}-(\text{CH}_2)_2\text{CF}_2\text{CF}_3$	20%	膜漏出
a-2			30%	21%
a-3			40%	29%
a-4			50%	35%
7743(wz-0896)-a-1	PEI 800	$-\text{C}(\text{O})\text{O}-(\text{CH}_2)_2\text{CF}_2\text{CF}_3$	20%	22%
a-2			30%	30%
a-3			40%	37%
a-4			50%	44%
7744(wz-0897)-a-1	PEI 1200	$-\text{C}(\text{O})\text{O}-(\text{CH}_2)_2\text{CF}_2\text{CF}_3$	20%	19%
a-2			30%	24%
a-3			40%	32%
a-4			50%	39%
7745(wz-0898)-a-1	PEI 1800	$-\text{C}(\text{O})\text{O}-(\text{CH}_2)_2\text{CF}_2\text{CF}_3$	20%	18%
a-2			30%	22%
a-3			40%	29%
a-4			50%	39%
7758(wz-0902)-a-1	PEI 600	$-\text{C}(\text{O})\text{O}-\text{CH}_2(\text{CF}_2)_2\text{CF}_3$	20%	NMRで 識別不可
a-2			25%	
a-3			30%	
7759(wz-0903)-a-1	PEI 800	$-\text{C}(\text{O})\text{O}-\text{CH}_2(\text{CF}_2)_2\text{CF}_3$	20%	NMRで 識別不可
a-2			25%	
a-3			30%	
7760(wz-0904)-a-1	PEI 1200	$-\text{C}(\text{O})\text{O}-\text{CH}_2(\text{CF}_2)_2\text{CF}_3$	20%	NMRで 識別不可
a-2			25%	
a-3			30%	
7766(WZ-0908)-a-1	PAMAM G1	$-\text{C}(\text{O})\text{O}-(\text{CH}_2)_2(\text{CF}_2)_2\text{CF}_3$	20%	
a-2			30%	

10

20

30

40

50

【表 3 - 4】

a-3			40%	
a-4			50%	
7767(WZ-0909)-a-1	PAMAM G3	$-\text{C}(\text{O})\text{O}-(\text{CH}_2)_2(\text{CF}_2)_2\text{CF}_3$	20%	
a-2			30%	
a-3			40%	
a-4			50%	
7768(WZ-0910)-a-1	PAMAM G5	$-\text{C}(\text{O})\text{O}-(\text{CH}_2)_2(\text{CF}_2)_2\text{CF}_3$	20%	
a-2			約 100%	
a-3			約 100%	
a-4			約 100%	
b-1			40%	
b-2			50%	
7825(WZ-0949)-a-1	PAMAM G2	$-\text{C}(\text{O})\text{O}-(\text{CH}_2)_2(\text{CF}_2)_2\text{CF}_3$	30%	
a-2			40%	
a-3			50%	
7826(WZ-0950)-a-1	PAMAM G7	$-\text{C}(\text{O})\text{O}-(\text{CH}_2)_2(\text{CF}_2)_2\text{CF}_3$	30%	
a-2			40%	
a-3			50%	
7829(WZ-0952)-a-1	PAMAM G4	$-\text{C}(\text{O})\text{O}-(\text{CH}_2)_2(\text{CF}_2)_2\text{CF}_3$	30%	
a-2			40%	
a-3			50%	
7830(WZ-0953)-a-1	PAMAM G6	$-\text{C}(\text{O})\text{O}-(\text{CH}_2)_2(\text{CF}_2)_2\text{CF}_3$	30%	
a-2			40%	
a-3			50%	
7838(WZ-0957)-a-1	直鎖状 PEI- 10K	$-\text{C}(\text{O})\text{O}-(\text{CH}_2)_2(\text{CF}_2)_2\text{CF}_3$	18%	18%
a-2			26%	29.00%
a-3			35%	40%
a-4			44%	50%
7839(WZ-0958)-a-1	直鎖状 PEI- 10K	$-\text{C}(\text{O})\text{O}-(\text{CH}_2)_2(\text{CF}_2)_2\text{CF}_3$	20%	22%
a-2			30%	33%
a-3			40%	43%

10

20

30

40

50

【表 3 - 5】

a-4			50%	59%
7840(WZ-0961)-a-1	直鎖状 PEI-25K	$-(\text{CO})\text{O}-(\text{CH}_2)_2(\text{CF}_2)_2\text{CF}_3$	18%	23%
a-2			26%	39%
a-3			35%	34%
a-4			44%	部分的に水溶性
7841(WZ-0962)-a-1	直鎖状 PEI-25K	$-(\text{CO})\text{O}-(\text{CH}_2)_2(\text{CF}_2)_2\text{CF}_3$	20%	27%
a-2			30%	48%
a-3			40%	57%
a-4			50%	部分的に水溶性
7842(WZ-0963)-a-1	直鎖状 PEI-25K	$-(\text{CO})\text{O}-(\text{CH}_2)_2(\text{CF}_2)_2\text{CF}_3$	20%	37%
a-2			30%	49%
a-3			40%	水不溶性
7843(WZ-0964)-a-1	直鎖状 PEI-250K	$-(\text{CO})\text{O}-(\text{CH}_2)_2(\text{CF}_2)_2\text{CF}_3$	20%	38%
a-2			30%	水不溶性
a-3			40%	水不溶性

10

20

## 【 0 1 1 5 】

## I I . イミン還元修飾

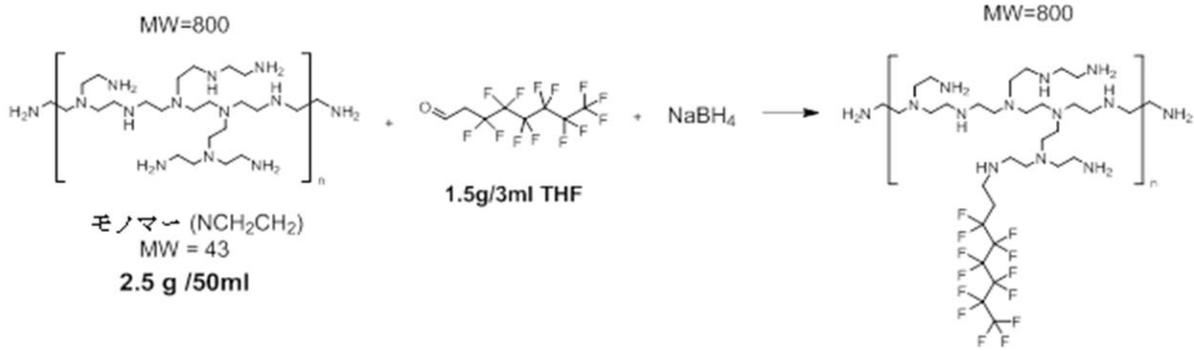
イミン還元によって修飾された PEI 7636 の合成。スキーム 5 に示されるように、2 ml の MeOH 中の PEI (MW 800) 100 mg (2.33 mmol のモノマー) の溶液を含有する 4 つのバイアルに、THF 中の 3, 3, 4, 4, 5, 5, 6, 6, 7, 7, 8, 8, 8 - トリデカフルオロオクタナール (0.5 g/ml) の溶液を、それぞれモノマー 16% (0.135 g、0.37 mmol)、21% (0.181 g、0.50 mmol)、27% (0.226 g、0.62 mmol)、及び 38% (0.315 g、0.87 mmol) のモル百分率に相当する量で添加した。結果として得られた溶液を一晩攪拌した。上記の 4 つの対応する溶液に、それぞれ 43 mg、57 mg、71 mg、85 mg、及び 99 mg の NaBH<sub>4</sub> を 0 でゆっくりと添加した。混合物を、気泡が消失するまで室温で 2 時間攪拌した。次いで、4 つの個々の溶液を 4 つの Float - Analyzer G2 透析デバイス (0.5 ~ 1.0 kD、10 ml) 中に移し、MeOH 中、MeOH 中 0.02 M の HCl、及び H<sub>2</sub>O 中 0.02 M の HCl で 3 日間にわたって順次に透析した。混合物を、t - ブタノール (10 ml) を含む 4 本の異なるチューブに移した。結果として得られた 4 つの混合物を 4 つのバイアル中に濾過し、濾液を 2 日間にわたって凍結乾燥させ、4 つの異なる理論上の修飾百分率を有する淡黄色の粉末 7636 - b - 1、7636 - b - 2、7636 - b - 3、及び 7636 - b - 4 を得た。スキーム 5 . イミン還元を介した修飾 PEI 7636 - b の合成。

30

40

50

## 【化 1 0】



10

【表 4】

化合物	PEI MW 800	モノマー MW 43	3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-トリデカ フルオロオクタナール MW 362.09	NaBH <sub>4</sub> MW 37.83	理論上 の%
7636-b-1	100mg	2.33mmol	0.135g, 0.37mmol	43mg	16%
7636-b-2	100mg	2.33mmol	0.181g, 0.50mmol	57mg	21%
7636-b-3	100mg	2.33mmol	0.226g, 0.62mmol	71mg	27%
7636-b-4	100mg	2.33mmol	0.271g, 0.75mmol	85mg	32%
7636-b-5	100mg	2.33mmol	0.315g, 0.87mmol	99mg	38%

20

## 【 0 1 1 6】

他のイミン還元により修飾された分岐状PEIは、7636について記載した類似の方法を用いることによって調製した。PEIモノマーについての理論上の修飾百分率を表3

30

【表 5 - 1】

表3. イミン還元により異なるフッ素化アルデヒドで修飾された異なるサイズのPEIモノマーの理論上の修飾百分率。

化合物	ポリマー		修飾されたテール	理論上の%
7636(WZ-0867)-b-1	PEI 800	イミン還元	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> (CF <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> CF <sub>3</sub>	16%
b-2				21%
b-3				27%
b-4				32%
b-5				38%
7637(WZ-0868)-b-1	PEI 25000	イミン還元	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> (CF <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> CF <sub>3</sub>	4%

40

50

【表 5 - 2】

b-2				6%
b-3				8%
b-4				10%
b-5				12%
7709(WZ-0869)-a-1	PEI800	イミン還元	$-(CH_2)_2(CF_2)_2CF_3$	16%
a-2				21%
a-3				27%
a-4				32%
a-5				38%
7710(WZ-0870)-a-1	PEI25000	イミン還元	$-(CH_2)_2(CF_2)_2CF_3$	4%
a-2				6%
a-3				8%
a-4				10%
a-5				12%

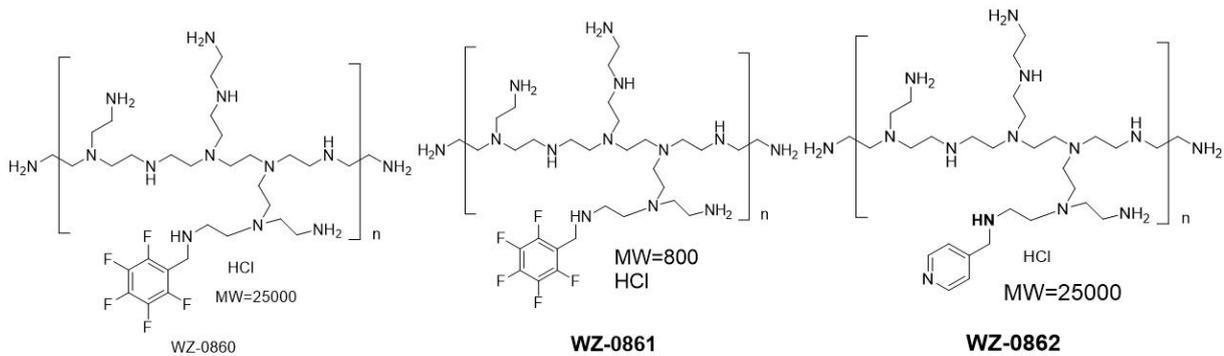
10

## 【0117】

ペンタフルオロベンジル修飾PEI 7669及び7677ならびにピリジンメチル修飾PEI 7676は、類似の方法を用いることによってイミン還元を介して調製することができる。PEIモノマーの理論上及び実際の修飾百分率を表4に列挙した。

20

## 【化11】



30

【表 6 - 1】

表4. イミン還元を介した芳香族環修飾PEI

化合物	PEI	修飾部分	理論上の%	NMR%
7669(WZ-0860)-a-1	PEI-25K	ペンタフルオロベンジル	3%	1%
a-2			6%	3%
a-3			9%	4%
a-4			12%	9%
7677(WZ-0861)-a-1	PEI-800	ペンタフルオロベンジル	16%	7%
a-2			27%	9%
a-3			42%	13%

40

50

【表 6 - 2】

a-4			53%	21%
7676(WZ-0862)-a-1	PEI-25K	PyCH <sub>2</sub>	3%	0.20%
a-2			6%	0.30%
a-3			9%	0.40%
a-4			12%	1.70%
a-5			25%	1.40%

10

## 【0118】

III. BOC保護、アルキル化、及び脱保護を介したアルキル化PEI。

BOC保護されたPEI。2.5g(58.1mmolのモノマー)のPEI 1200またはPEI 25000及びNaHCO<sub>3</sub>を20mlのTHF/40水中に溶解させた。20mlのBOC無水物(5.07g、23.3mmol)の溶液に、THFを0で添加した。混合物を室温で一晩攪拌した。次いで、混合物を65℃まで一晩加熱した。TLCにおいて、ヨウ素染色によってBOC無水物が完全に消失したことが確認された。THFを除去した後、溶液を凍結させ、凍結乾燥によって乾燥させた。BOC保護されたPEIが<sup>1</sup>H NMRによって確認された。

20

## 【0119】

BOC保護されたPEIのアルキル化。BOC-PEI(0.20g、4.65mmol)をEtOHまたはDMF中に懸濁させた。この混合物に、1,1,1,2,2,3,3,4,4-ノナフルオロ-6-ヨードヘキサンを、30%、40%、及び50%のPEIモノマーに相当する量で添加し、結果として得られた混合物を95℃まで48時間加熱した。EtOHを除去した後、各反応の残渣をエーテルでトリチュレーションしたか、またはエーテルを個々の反応DMF溶液の各々に注ぎ、溶媒を遠心分離によって除去した。次いで、各反応からの淡黄色の固体をエーテルで洗浄し、さらに2回遠心分離によって除去し、真空下で乾燥させた。アルキル化BOC-PEIがFNMRによって確認された。

## 【0120】

アルキル化BOC-PEIの脱保護。12mlのTFA/DCM(1:1)をTIPS(0.1ml)の存在下で上記の白色の各固体に添加した。混合物を室温で3時間攪拌した。溶媒を除去した後、残留する固体をエーテルでトリチュレーションし、3回遠心分離し、真空下で乾燥させた。固体を水中に溶解させ、H<sub>2</sub>O中で3回、3日間透析した。溶液を凍結乾燥させ、淡黄色の粉末を得た。修飾百分率を、内部対照としてCF<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OHを使用してHNMR及びFNMRによって算出した(表5)。

30

40

50

## 【表 7】

表 5. BOC保護及び脱保護を介した異なるサイズのPEIモノマーのアルキル化百分率

化合物	PEI	アルキル化：- ICH <sub>2</sub> (CF <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CF <sub>3</sub>	理論上 の%	NMR%	アルキル化 溶媒
7827-(WZ-0954)a-1	PEI-1200	-CH <sub>2</sub> (CF <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CF <sub>3</sub>	30%	3.90%	EtOH
a-2			40%	3.70%	EtOH
a-3			50%	9.70%	EtOH
b-1			40%	15.60%	DMF
b-2			50%	17.40%	DMF
7833(WZ-0955)-a-1	PEI-25000	-CH <sub>2</sub> (CF <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CF <sub>3</sub>	60%	12.10%	DMF
a-2			40%	10%	DMF
a-3			50%	17.80%	DMF

10

## 【0121】

## 実施例 2

## 修飾PEIポリマーによる遺伝子送達

HEK 293 細胞を 100 μl の DMEM / FBS 中  $1.5 \times 10^5$  細胞 / ml でプレートし、翌日、90 ng / ウェルの担体 DNA (Promega カタログ番号 E4881) で希釈した 10 ng / ウェルの TK / NanoLuc (登録商標) 発現構築物 (Promega カタログ番号 N1501) でトランスフェクトした。異なる濃度での種々の修飾 PEI ポリマーを用いて細胞をトランスフェクトし、標準的な 3 : 1 比率での FUGENE HD 陽性対照 (Promega カタログ番号 E2311) 及び緩衝液単独の陰性対照と比較した。これらの条件は、トランスフェクションから 24 時間後に Nano-Glo (登録商標) ルシフェラーゼアッセイ試薬 (Promega カタログ番号 N1110) の添加によってトランスフェクション効率を測定するための、幅広いダイナミックレンジを提供した。場合によっては、血清を欠いた培地中でもトランスフェクションを実施し、トランスフェクションから数時間後に血清を添加し直した。再構成された Cell Titer - Glo (登録商標) 試薬 (Promega カタログ番号 G7570) を反復実験用ウェルに添加することによって、毒性を測定した。

20

30

## 【0122】

重量対重量比を使用するのではなく、9 対 1 比率の PEI モノマー (N 原子) 対 DNA リン原子を初期設定の 1 倍濃度として最初に選定した。この比率によってトランスフェクション効率及び毒性の両方が影響を受ける。標準的な 1 倍モル濃度に対して使用した異なる濃度の PEI を報告する。

## 【0123】

この固定比率のモノマー対 DNA を用いた初期実験は、HEK 293 細胞をトランスフェクトする上で修飾 PEI ポリマーが FUGENE HD と全く同程度に有効な可能性があることを示した。図 1 A に示されるように、NanoLuc (登録商標) 発現量によって測定したときのトランスフェクション効率は、化合物のうちの一部について FUGENE HD と同程度に高い可能性があった一方で、試薬の不在下では DNA の取り込みは見られなかった。ベースポリマーの修飾の程度は、トランスフェクション効率及び毒性の両方に対して顕著な影響を有し、この用途において化学合成を微調整することの重要性が強調される。少なくとも PEI モノマーのこの一定の比率で、800 Da のポリマーに基づく化合物は、25,000 Da のポリマーに基づく化合物よりも有効であり、このうち 7636 - 2 及び 7633 - 5 が特に良好な成績を示した。25,000 Da のポリマーに基づく PEI 化合物は一般に、より低い相対的トランスフェクションを示して、トランスフェクション中の血清の存在に対してより感受性があるように思われた一方で、800 D

40

50

aのポリマーでは、この影響はより低かった。

【0124】

細胞生存率データが図1Bに示される。ほとんどの化合物が良好な耐容性を示した。

【0125】

さらなる実験により、追加の修飾基を使用して、とりわけ、ごくわずかなトランスフェクション及び高い毒性を示したMW800Daのポリマー出発物質と比較して、トランスフェクションの効率を改善するかまたは毒性を減少させることが可能であることが実証された。図2に見られるように、修飾を有しない25,000Daのポリマーは既に、比較的高いトランスフェクション効率及び低い毒性を示す。7669系列の修飾された25,000Daのポリマーも同様に、全ての修飾レベルで非常に有効であった。一方で、7666系列は、修飾のレベルが増加すると共に低減された効率を示した。7666-1の場合、ポリマー対DNAの比率を増加させることで、トランスフェクション効率が減少する。しかしながら、800Daのポリマーに基づく7667-2では、標準的な1倍条件の少なくとも2倍の濃度でのみ効率的なトランスフェクションが見られた。7636-2、7676-3、及び7677-2は全て、1倍濃度で良好な結果をもたらした。

【0126】

種々の化合物の最適な濃度をよりよく決定するために、種々の修飾PEIのタイトレーションを一定量のDNAに添加し、これを使用してHEK293細胞をトランスフェクトした。データが図3に示され、このうち図3Aは、血清の存在下でのデータを示し、図3Bは、血清の不在下でのデータを示す。図3Cは、血清の存在下でCellTiter-Glo(登録商標)発光細胞生存アッセイ(Promegaカタログ番号G7570)を使用して測定したときの細胞生存率を示す。凡例において、MW800及びMW2500は、指定される分子量の未修飾PEIポリマーを指す。この図において、1の相対PEI濃度は、初期設定の9対1比率のPEIモノマー対DNAリンを示す。この実験により、トランスフェクション効率を比較したときの各化合物についてのPEIモノマー対DNAの最適なモル比が特定された。標準比率の2倍では、7636-2及び7667-4の両方が、顕著な毒性を伴わずにFuGENE HDよりも高いトランスフェクション効率を示した。血清の不在下では、7676-1もまたFuGENE HDに匹敵することができた。

【0127】

異なる分子量のPEIポリマー、またはPAMAMポリマーを含むポリマーのパネルを使用して、異なるポリマー濃度で9つの細胞株をトランスフェクトした。HEK293、HeLa、MDA-MB-231、HepG2、A375、HCT116、U2-OS、Jurkat、及びA549細胞を、100µlのDMEM/FBS(HEK293、HeLa、MDA-MB-231、HepG2、A375、HCT116、U2-OS)、RPMI/FBS(Jurkat)、またはF12/FBS(A549)中1.0×10<sup>5</sup>細胞/mlでプレートし、翌日、90ng/ウェルの担体DNA(Promegaカタログ番号E4881)で希釈した10ng/ウェルのTK/NanoLuc(登録商標)発現構築物(Promegaカタログ番号N1501)でトランスフェクトした。異なる濃度での種々の修飾PEIまたはPAMAMポリマーを用いて細胞をトランスフェクトし、3:1比率でのFuGENE HD及びViaFect(商標)陽性対照(Promegaカタログ番号E2311及び番号E4981)ならびに緩衝液単独の陰性対照と比較した。これらの条件は、トランスフェクションから24時間後にNano-Glo(登録商標)ルシフェラーゼアッセイ試薬(Promegaカタログ番号N1110)の添加によってトランスフェクション効率を測定するための、幅広いダイナミックレンジを提供した(図4A~4I)。再構成されたCellTiter-Glo(登録商標)試薬(Promegaカタログ番号G7570)を反復実験用ウェルに添加することによって、毒性を測定した(図5A~5H)。最適な濃度で、第3世代PAMAMポリマーである7767-4は、全ての細胞株についてのNanoLuc(登録商標)発現量に関してViaFect(商標)及びFuGENE HD対照の成績を超えたか、またはそれに事実上匹敵

していた。

【0128】

多種多様な細胞種をトランスフェクトするPAMAMポリマーの能力をさらに調査するために、異なるサイズ及び修飾レベルのPAMAMポリマーのタイトレーションを使用して、5つの異なる細胞株をトランスフェクトした(図6~9)。HEK293、HeLa、MDA-MB-231、HepG2、及びJurkat細胞を、100 $\mu$ lのDMEM/FBS中(RPMI/FBS中にプレートしたJurkatを除く全ての細胞種)1.5 $\times$ 10<sup>5</sup>細胞/mlでプレートし、翌日、90ng/ウェルの担体DNA(Promegaカタログ番号E4881)で希釈した10ng/ウェルのTK/NanoLuc(登録商標)発現構築物(Promegaカタログ番号N1501)でトランスフェクトした。細胞を、7766(-1~-4)、7767(-1~-4)、及び7768-1b(図6及び7)、ならびに7768(-2~-4)、7825(-1~-4)、及び7826(-1~-4)(図8及び9)の種々のPAMAMポリマーのタイトレーションを用いてトランスフェクトした。FuGENE HD及びViaFect(商標)(Promegaカタログ番号E2311及び番号E4981)を陽性対照として3:1比率で使用し、緩衝液単独を陰性対照として使用した。トランスフェクションから24時間後にNano-Glo(登録商標)ルシフェラーゼアッセイ(Promegaカタログ番号N1110)を使用して、トランスフェクション効率を測定した(図6A~6E及び8A~8E)。再構成されたCellTiter-Glo(登録商標)試薬(Promegaカタログ番号G7570)を、HeLaを除く全ての細胞の反復実験用ウェルに添加することによって、毒性を測定した(図7A~7D及び9A~9D)。ポリマーの修飾の程度は、最適な濃度及びトランスフェクション効率に対して影響を有した。7767-4が再び、広範な濃度にわたって全ての細胞種の有効なトランスフェクションを示した一方で、修飾のより少ないバージョンである7767-2及び7767-3は、より高い濃度を必要としたが、そのようなより高い濃度では7767-4と類似の、またはさらにはそれよりも高い量のDNAを送達することが可能であった。

10

20

【0129】

実施例3

LgBiT送達

この実施例は、Schwinnらの「CRISPR-Mediated Tagging of Endogenous Proteins with a Luminescent Peptide」(ACS Chem. Biol. 2018, 13, 467-474)に全般的に記載されるようなCRISPR媒介性のタグ付けを伴った。HiBiT編集細胞をCRISPRによって生成し、クローンをシングルセルソーティングによって単離した。クローンを96ウェルプレート中、1ウェル当たり10,000細胞でプレートした。24時間後、細胞を修飾PEI(1 $\mu$ g/ml)とLgBiTタンパク質(170nM)の異なる複合体でトランスフェクトした。複合体は、Opti-MEM I低血清培地中で修飾PEI(100 $\mu$ g/ml)をLgBiT(17 $\mu$ M)と室温で30分間インキュベートすることによって調製した。CMV/LgBiT発現構築物を形質導入するように10%BacMam-LgBiTで処理した細胞が、ベンチマーク対照としての役目を果たした。24時間後、LgBiTに対して高い親和性を有するペプチドであるDarkBiT(配列番号6または配列番号7)で細胞を処理して(LgBiT/DarkBiT複合体は、発光をほとんどまたは全く生じさせない)(1 $\mu$ M)、細胞外LgBiTの発光活性を消光させた。1時間後、Nano-Glo(登録商標)生細胞アッセイ系(Promegaカタログ番号N2011)及びCellTiter-Glo(登録商標)2.0アッセイ(Promegaカタログ番号G7570)を使用して、細胞をアッセイした。発光は、GloMax(登録商標)Discoverで測定した。データをPrism 5.0ソフトウェア(GraphPad)で分析した。結果が図10~11に示される。

30

40

【0130】

50

発光シグナルの輝度は、送達されている細胞内 L g B i T の量に比例し、この量はタンパク質取り込みの効率と相関し得る。一般に、修飾の有無にかかわらず、大きなサイズの P E I ( M W = 2 5 , 0 0 0 ) が、L g B i T 送達において、それらのそれぞれ対応する小さなサイズの P E I ( M W = 8 0 0 ) よりも良好な成績を示した。修飾された大きなサイズの P E I は、未修飾 P E I よりも良好であった。上位のヒットの中でも、7 6 6 6 - 3、7 6 6 8 - 1、7 6 6 9 - 2、7 6 7 5 - 1、及び 7 7 0 9 - 3 が、5 つの異なる H i B i T クローンにわたって L g B i T 取り込みを容易にする上で最も良好に働いた ( 図 1 0 及び 1 1 ) 。6 つの最良候補のうち、7 6 6 9 - 2 及び 7 6 7 5 - 1 は、わずかな細胞毒性を引き起こした。7 6 6 6 - 3、7 6 6 8 - 1、7 7 0 9 - 3 では、毒性は観察されなかった ( 図 1 1 A 及び 1 1 B ) 。

10

## 【 0 1 3 1 】

H e L a 細胞の H D A C 2 - H i B i T 及び H D A C 6 - H i B i T クローンを 8 ウェルのチャンバースライド中、1 ウェル当たり 2 5 , 0 0 0 細胞でプレートした。2 4 時間後、細胞を P E I ( 1  $\mu$ g / m l ) 及び L g B i T タンパク質 ( 1 7 0 n M ) の異なる複合体でトランスフェクトした。複合体は、O p t i - M E M I 低血清培地中で 1 7  $\mu$ M の L g B i T を 1 0 0  $\mu$ g / m l の 7 6 6 6 - 4、7 6 6 8 - 1、または 7 6 6 9 - 2 と室温で 3 0 分間インキュベートすることによって調製した。2 4 時間後、細胞を C O <sub>2</sub> 非依存性培地に切り替え、N a n o - G l o ( 登録商標 ) 生細胞基質を添加した。細胞を生物発光撮像装置で撮像した ( 図 1 2 A ~ 1 2 C ) 。

20

## 【 0 1 3 2 】

H i B i T 編集 H e L a または H E K 2 9 3 細胞を 9 6 ウェルプレートのウェル中、1 0 , 0 0 0 細胞 / ウェルでプレートした。2 4 時間後、細胞を P E I ( 修飾及び未修飾、5  $\mu$ g / m l ) 及び L g B i T タンパク質 ( 2 0 0 n M ) の異なる複合体でトランスフェクトした。複合体は、O p t i - M E M I 低血清培地中で P E I を L g B i T と室温で 3 0 分間インキュベートすることによって調製した。C M V - L g B i T 発現構築物を形質導入するように 1 0 % B a c M a m - L g B i T で処理した細胞が、対照としての役目を果たした。2 4 時間後、細胞培地を交換し、N a n o G l o ( 登録商標 ) 生細胞アッセイ系 ( P r o m e g a カタログ番号 N 2 0 1 1 ) 及び C e l l T i t e r - G l o ( 登録商標 ) 2 . 0 アッセイ ( P r o m e g a カタログ番号 G 7 5 7 0 ) を使用して、細胞をアッセイした。発光を G l o M a x ( 登録商標 ) D i s c o v e r で測定した。図 1 3 A は、送達された L g B i T タンパク質のパーセントを、B a c M a m 形質導入を介して送達された L g B i T タンパク質と比較して図示する。発光シグナルの輝度は、細胞に送達されている細胞内 L g B i T の量に比例し、この量はタンパク質取り込みの効率と相関し得る。図 1 3 B は、未処理の細胞と比べた生細胞の百分率を図示する。

30

## 【 0 1 3 3 】

H i B i T 編集 H e L a または H E K 2 9 3 細胞を 8 チャンバースライド中 4 0 0  $\mu$ L で、2 5 , 0 0 0 細胞 / ウェルでプレートした。2 4 時間後、細胞を P B I - 7 6 6 6 - 3  $\cdot$  L g B i T 複合体でトランスフェクトした。複合体は、O p t i - M E M I 低血清培地中で 2  $\mu$ M の L g B i T を 1 0 0  $\mu$ g / m l の P B I - 7 6 6 6 - 3 と室温で 3 0 分間インキュベートすることによって調製した。4 0 マイクロリットルの複合体を各ウェルに添加した。2 4 時間後、細胞を C O <sub>2</sub> 非依存性培地に切り替え、N a n o G l o ( 登録商標 ) 生細胞基質 ( P r o m e g a カタログ番号 N 2 0 1 1 ) を添加した。細胞を生物発光撮像装置で撮像した。C M V - L g B i T 発現構築物を形質導入するように 1 0 % B a c M a m - L g B i T で処理した細胞が、対照としての役目を果たした。図 1 4 A は、H e L a 細胞の C A S P 3 - H i B i T 及び E G F R - H i B i T クローンの画像を示す。図 1 4 B は、H e L a 細胞の G S K 3 b - H i B i T 及び H D A C 6 - H i B i T クローンの画像を示す。図 1 4 C は、H e L a 細胞の H D A C 2 - H i B i T クローン及び H E K 2 9 3 細胞の C D K 1 1 - H i B i T クローンの画像を示す。

40

## 【 0 1 3 4 】

実施例 4

50

## HaloTag - LgBiT送達

HeLa細胞を8ウェルのチャンバースライド中、1ウェル当たり25,000細胞でプレートした。24時間後、細胞をPEI(1 $\mu$ g/ml)及びHaloTag - LgBiTタンパク質(200nM)の異なる複合体でトランスフェクトした。複合体は、Opti-MEM I低血清培地中でPEI(100 $\mu$ g/ml)をHaloTag - LgBiT(20 $\mu$ M)と室温で30分間インキュベートすることによって調製した。24時間後、細胞をOpti-MEM I低血清培地に切り替え、次いで、HaloTag(登録商標)Oregon Green(登録商標)リガンド(1 $\mu$ M)と30分間インキュベートした。細胞をOpti-MEM I低血清培地で3回洗浄した。最後の洗浄は、細胞を培地中、5%(v/v)CO<sub>2</sub>(g)下で、37 $^{\circ}$ Cで30分間インキュベートすることによって行った。最後の5分間、細胞を核プローブNucBlue(登録商標)Live Ready Probes(登録商標)試薬により37 $^{\circ}$ Cで対比染色した。細胞をC2レーザー走査型共焦点顕微鏡(Nikon)で撮像した。

10

## 【0135】

緑色の蛍光強度は、送達されている細胞内HaloTag - LgBiTの量に比例し、この量はタンパク質取り込みの効率と相関し得る。修飾された大きなサイズのPEI(MW=25000)は、HaloTag - LgBiTの送達において、未修飾PEIよりも良好であった。上位のヒットの中でも、7636-2、7637-3、7666-3、7668-1、及び7676-5が最も良好に働いた(図15A~15C)。これらのうち、3つはまた、LgBiT送達のための最良候補でもあり(7666-3及び7668-1)、このことは、カーゴのサイズが取り込み効率に影響を及ぼすことを示唆している。

20

## 【0136】

全ての処理において点状染色が観察され、このことは、HaloTag - LgBiTタンパク質の大部分がエンドソームに常在することを示している。エンドソームにおける輝度は、サイトゾルに放出されているタンパク質の部分を定量することの技術的困難を生み出した。

## 【0137】

## 実施例5

## RNP送達

HEK293細胞におけるGAPDHのC末端へのHiBiTノックイン。RNP複合体のアセンブリの調製及び細胞中への複合体のエレクトロポレーションを以前に記載されたように実施した(Schwinnらの「CRISPR-Mediated Tagging of Endogenous Proteins with a Luminescent Peptide」(ACS Chem. Biol. 2018, 13, 467-474))。簡潔に述べると、5 $\mu$ lの反応量で、トレーサーRNA及びガイドRNAの二本鎖(24 $\mu$ Mまで)を調製し、その後、5 $\mu$ lのCas9(20 $\mu$ M)と合わせて、室温で10分間さらにインキュベートした。HEK293については、細胞(2 $\times$ 10<sup>5</sup>)を20 $\mu$ lの4D Nucleofector溶液SF中に再懸濁させた。次いで、RNP複合体(10 $\mu$ l)及びドナーDNA(100 $\mu$ Mの一本鎖オリゴデオキシヌクレオチド(ssODN)を含む1 $\mu$ l)を細胞に添加した。ドナーDNAは、VS-HiBiT配列をGAPDH遺伝子のC末端に付加するように設計されていた。細胞に4D Nucleofector系でエレクトロポレーションを行った。次いで、細胞を室温で5分間インキュベートし、培養のために6ウェルプレートに移した。

30

40

## 【0138】

修飾PEIを使用した初期RNP送達実験のために、類似の手順を使用した。簡潔に述べると、RNP混合物(12 $\mu$ Mの二本鎖ガイドRNA及び10 $\mu$ MのCas9を含む10 $\mu$ l)を上述したように調製した。ドナーDNA(100 $\mu$ Mを含む1 $\mu$ l)をRNP混合物に添加した後、混合物をOpti-MEM I低血清培地により98 $\mu$ lにした。次いで、修飾PEI 7667-4(10mg/mlを含む2 $\mu$ l)をRNP反応物に添加し、室温で30分間インキュベートした。次いで、複合体(100 $\mu$ l)を細胞(1.

50

9 mlの無血清培地中 $2 \times 10^5$ )に添加し、培養のために6ウェルプレートに移した。細胞を無血清培地中で1時間おいた。その後、増殖及びアッセイのために細胞にFBS(10%)を補充した。24~48時間後、Nano-Glo(登録商標)HiBiT溶解性試薬及びCellTiter-Glo(登録商標)2.0を使用して、編集細胞をアッセイした。CellTiter-Glo(登録商標)発光細胞生存アッセイ(Promegaカタログ番号G7570)を使用して、生細胞の百分率を未処理の細胞と比べて算出した(図16B)。

#### 【0139】

生存細胞の数に対して正規化されたHiBiT発光シグナルは、GAPDH遺伝子座におけるHiBiT挿入の効率に比例するはずであり、これはRNP送達の効率と相関し得る。ヌクレオフェクションは、最も効率的なRNP/ssODN送達を提供することが予想された。図16Aに示されるように、ヌクレオフェクションは、初期条件でFuGENE HD、ViaFect(商標)、CRISPRMax、または7667-4よりも高いノックイン効率を示した。しかしながら、修飾PEI化合物または送達条件を最適化しなくても、7667-4は、FuGENE HD及びViaFect(商標)よりもはるかに良好なRNP送達効率を生み出し、CRISPRmaxよりもほんのわずかに低かった。

10

#### 【0140】

同じ試料中でのHiBiTノックイン、標的発現量、及び生存率を測定するためのモデル系。多くの化合物及び送達条件をスクリーニングするためには、より情報伝達的なプレートベースの系が必要とされた。HEK293/CMV-Fluc安定細胞株においてHiBiTをホタルルシフェラーゼ(Fluc)遺伝子のN末端でノックインした。非相同末端結合(NHEJ)による修復が、発現をノックアウトする挿入/欠失(Indel)変異を生じさせる傾向を持つ一方で、相同配列依存的修復(HDR)が、HiBiTシグナルを生み出すと共にFlucシグナルを保持するように、開始メチオニンコドン内に二本鎖切断を生成したgRNAを設計した(ダイアグラム1A)。CellTiter-Fluor(Promegaカタログ番号G6080)は、細胞生存率を測定するために、Flucシグナル及びHiBiTシグナルの両方が生存細胞の蛍光に対して正規化されるように多重化される。Flucシグナル及びHiBiTシグナルについての正規化された比率を使用して、Indel変異によるFlucノックアウト及びHDRによるHiBiTノックインの程度を推定することが可能であった。

20

30

#### 【0141】

修飾PEI及びPAMAMポリマーを使用して細胞へのRNP/ssODNの送達のための条件を最適化させる場合、様々な濃度のRNP、ssODN、及びポリマーを使用した。頻繁に、1.25  $\mu$ MのCas9を1.5  $\mu$ MのgRNAと室温で10分間インキュベートして、RNPを生成した。次いで、ドナーssODN及び修飾PEIまたはPAMAMポリマーを添加して、250 nMのRNP、1  $\mu$ MのssODN、及び22~110  $\mu$ g/mlのポリマーで11倍溶液を生成した。室温で30分間のインキュベーション後、複合体を細胞に添加して、それらを培地(例えば、96ウェルプレート中10  $\mu$ l + 100  $\mu$ lの培地)中で11倍希釈する。2日後、ウェル中の生存細胞の数を測定するために、細胞培地を、CellTiter-Fluor試薬(Promegaカタログ番号G6080)を含有するOptiMEM-Iと交換することによって、HEK293/Fluc細胞を分析した(図17A)。ONE-Glo EXを使用してFluc発現量を測定し(図17B)、HiBiT NanoDLRアッセイを使用してHiBiTシグナルを測定した(図17C)。HiBiT/CTF比率を使用して、HiBiTシグナルを細胞数に対して正規化した(図17D)。次いで、Nano-Glo(登録商標)HiBiT Dual-Luciferase(登録商標)Reporter系(HiBiT NanoDLR(商標))を使用して、ウェル中のFluc及びHiBiTシグナルを定量した(図17E)。

40

#### 【0142】

50

図18A~18Bは、ヌクレオフェクションまたは修飾PEIもしくはPAMAMポリマーのいずれかを使用してCRISPRによるHiBiTのノックインのためのRNP/ssODN混合物を送達した、HEK293/Fluc細胞のプールを図示する。処理中の細胞死による複雑化を排除するために、測定前に細胞プールを数日間増殖させた。FlucのN末端でのHiBiTのノックイン後、CellTiter-Fluor及びHiBiT NanoDLRを使用して、生存率、Fluc発現量、及びHiBiTシグナルを測定した(図18A)。ヌクレオフェクション細胞についてのFluc/CTF比率の大幅な低下は、InDel変異によって引き起こされた発現消失を示し得る。HiBiT/CTF比率によって示されるように、修飾ポリマーによって媒介されたRNP/ssODN送達は、より高い正規化Fluc発現量のみならず、より高い正規化HiBiTシグナルもまたもたらした。同様に、修飾PEIポリマーは、GAPDHのC末端でHiBiTをノックインするように設計されたRNP/ssODN混合物の送達後に、ヌクレオフェクションと比較してより高い正規化HiBiTシグナルを示す(図18B)。

10

【0143】

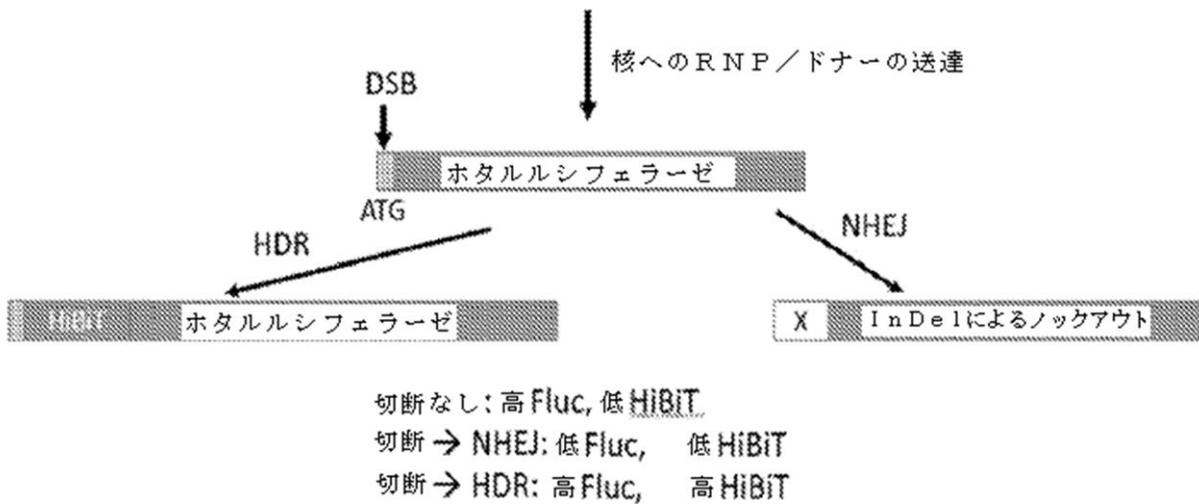
他の細胞種については、Nano-Glo(登録商標)HiBiT溶解性アッセイを使用して、HiBiT挿入の程度を測定し、同じウェル中でのCellTiter-Fluor、または反復実験用ウェル中でのCellTiter-Glo(登録商標)試薬(Promegaカタログ番号G7570)のいずれかを使用して、生存率を測定した。

【0144】

ダイアグラム1A.HiBiTノックイン及びFlucノックアウトを測定するためのハイスループットモデル系。

20

【化12】



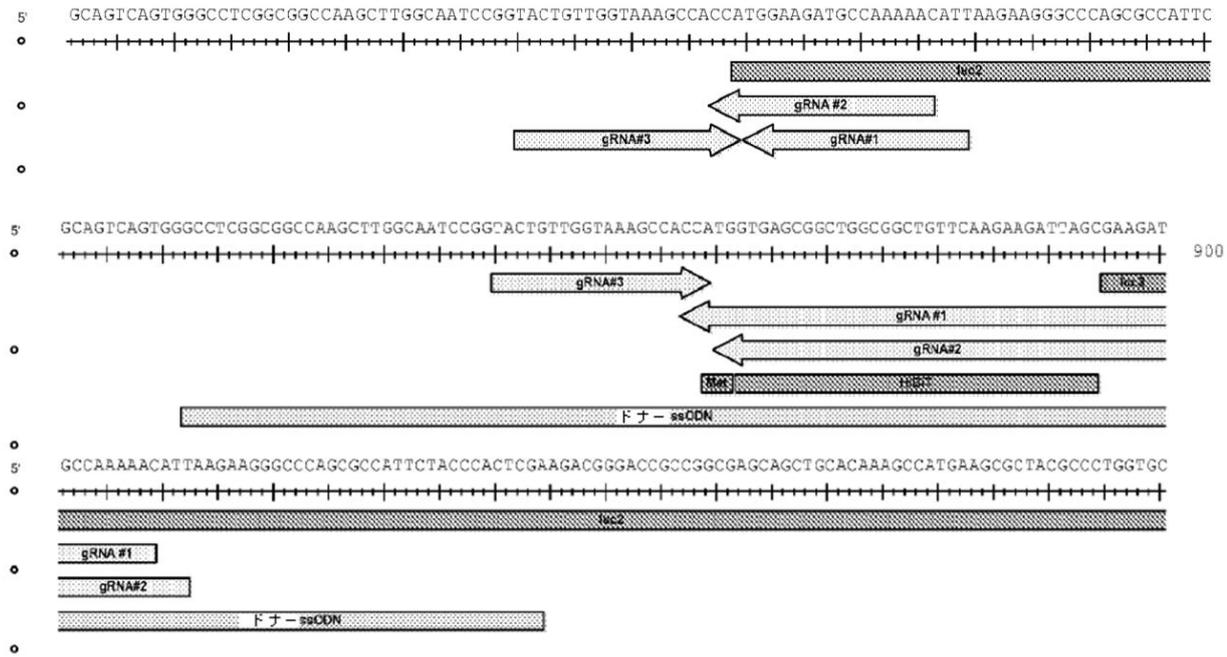
30

【0145】

ダイアグラム1B.HEK293/CMV-Fluc安定細胞株におけるHiBiTノックインのためのgRNA及びssODN設計。

40

【化 1 3】



10

20

【表 8】

表5. *F l u c* 遺伝子座または *G A P D H* 遺伝子座のいずれかで *H i B i T* がノックインされた *H E K 2 9 3 / F l u c* 細胞のプールのシングルセルソーティング後に顕著な *F l u c* 及び *H i B i T* シグナルを有するクローンの百分率。NHEJ 媒介性修復によって生成される *I n D e l* 変異は、gRNA が *F l u c* を標的とするが *G A P D H* を標的としない場合、*F l u c* 発現を妨害することが予想されよう。

	高 <i>F l u c</i> /CTF%	高 <i>H i B i T</i> /CTF%	コロニー数
ヌクレオフェクションを用いた <i>F l u c</i>	12.93	6.61	234
7740-2 を用いた <i>F l u c</i>	16.28	14.73	129
7740-1 を用いた <i>F l u c</i>	17.44	18.02	172
7666-5 を用いた <i>F l u c</i>	69.39	7.48	147
ヌクレオフェクションを用いた <i>G A P D H</i>	98.88	2.79	179
7741-2 を用いた <i>G A P D H</i>	99.51	6.34	205
7759-3 を用いた <i>G A P D H</i>	98.96	7.81	192

30

40

【 0 1 4 6】

実施例 6

*P R O T A C* による *H i B i T - B R D 4* の分解

*P E I* が細胞中に機能的 *L g B i T* を送達することを実証するために、タンパク質分解アッセイを使用した。*H i B i T - B R D 4* *H E K 2 9 3* 細胞を 96 ウェルプレートのウェル中に 10,000 細胞/ウェルでプレートした。24 時間後、細胞を *P B I - 7 6 6 6 - 3* (10  $\mu$ g/ml) 及び *L g B i T* タンパク質 (200 nM) の複合体でトランスフェクトした。複合体は、*O p t i - M E M* 低血清培地中で *P E I* を *L g B i T* と室温で 30 分間インキュベートすることによって調製した。*C M V - L g B i T* 発現構築物を形質導入するように 10% *B a c M a m - L g B i T* で処理した細胞が、対照としての役

50

目を果たした。21時間後、細胞培地を、NanoGlo（登録商標）Endurazine基質（Promegaカタログ番号N2571）を含有する新鮮な培地と交換し、3時間インキュベートした。次に、分解に向けてBRD4を標的化するために、細胞をプロモドメインBET阻害剤であるMZ1のタイトレーションで処理した。Clariostar機器を使用して、反応速度測定を24時間行った。図19Aは、BacMam及びPEIの2つの送達方法の間の応答の類似性を示すようにプロットした、分解されたBRD4のパーセントを図示する。図19Bは、MZ1の24時間の処置後の分解されたBRD4のパーセントを図示し、それは用量依存的様態で応答した。

#### 【0147】

##### 実施例7

##### 細胞外LgBiTの除去

4つの異なる細胞バックグラウンド（HEK293、A549、H1299、またはMiaPaCa-2）に由来するHiBiT-KRASクローンを、96ウェルプレートのウェル中に10,000細胞/ウェルでプレートした。24時間後、細胞をPBI-7666-3（5ug/ml）及びLgBiTタンパク質（200nM）の複合体でトランスフェクトした。複合体は、Opti-MEM低血清培地中でPEIをLgBiTと室温で30分間インキュベートすることによって調製した。CMV-LgBiT発現構築物を形質導入するように10% BacMam-LgBiTで処理した細胞が、対照としての役目を果たした。細胞をジギトニン（50ug/ml）及びLgBiTタンパク質（200nM）で処理した。細胞内対細胞外の発光シグナルを識別するために、4つの条件を検査した。「交換なし条件」は、細胞をLgBiT・7666-3により4時間または24時間のいずれかで処理し、培地交換なしで所与の時間に発光を測定する場合である。「交換条件」は、LgBiT送達後に、細胞をDarkBiT（配列番号6）（1uM）の不在下または存在下のいずれかで、新鮮な培地と交換した場合である。細胞非透過性ペプチドであるDarkBiTペプチドは、細胞外LgBiTを不活性化するために必要とされる。「洗浄条件」は、LgBiT送達後に細胞を新鮮な培地で1回洗浄し、新鮮な培地と交換し、続いて発光測定を行った場合である。洗浄条件は、NanoBiTの細胞内測定値を反映する。交換条件は、全てではないが一部の細胞外LgBiTを除去し、故に、発光シグナルは、交換なし条件よりも低かったが、洗浄条件よりは高かった。所与の時間で、NanoGlo（登録商標）生細胞アッセイ系（Promegaカタログ番号N2011）及びCellTiter-Glo（登録商標）2.0アッセイ（Promegaカタログ番号G7570）を使用して、細胞をアッセイした。発光は、GloMax（登録商標）Discoverで測定した。結果が図20A～20Dに示される。

#### 【0148】

PEIベースの系は、細胞中に機能的LgBiTを送達する。PEI法から得られた細胞内シグナルは、4時間及び24時間のインキュベーション時間の間で類似しており、このことは、この方法がその飽和シグナルに達するために最低4時間のインキュベーション時間を必要とすることを示唆している。対照的に、BacMam形質導入は、核酸を送達する。試験された細胞株の各々について、4時間のインキュベーション時間後に、BacMamに由来するシグナルは、PEI法のシグナルよりもはるかに低かった。24時間のインキュベーション後には、HEK293細胞の場合において、シグナルは、PEI法及びBacMam形質導入の間で同等であった。その他の3つの場合のうち、BacMam形質導入は、LgBiTを送達する上で、修飾PEI化合物よりも良好であった。

#### 【0149】

上述の発明を実施するための形態及び付随する実施例は単に例示的なものであり、添付の特許請求の範囲及びそれらの等価物によってのみ規定される本開示の範囲に対する限定と見なされるべきではないことが理解される。

#### 【0150】

開示される実施形態に対する種々の変更及び修正が当業者には明らかであろう。限定されるものではないが、本開示の化学構造、置換基、誘導體、中間体、合成、組成物、製剤

10

20

30

40

50

、または使用方法に関するものを含めて、かかる変更及び修正が、本開示の趣旨及び範囲を逸脱することなくなされてもよい。

【0151】

下記に提供される配列は、本明細書で参照されるものであり、添付の配列表及び配列表に関する陳述の一部として提供される。

【0152】

W T O g L u c (配列番号1)

【0153】

MFTLADFVGDWQQTAGYNQDQVLEQGGSSLFQALGVSVTPIQKVVLSGENGLKAD  
IHVIIPYEGLSGFQMGLIEMIFKVVYPVDDHHFKIILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRP  
YPGIAVFDGKQITVTGTLWNGNKIYDERLINPDGSLLFRVTINGVTGWRLCENILA 10

【0154】

N a n o L u c (配列番号2)

【0155】

MVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKID  
IHVIIPYEGLSGDQMGQIEKIFKVVYPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRP  
YEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLLFRVTINGVTGWRLCERILA

【0156】

H i B i T (配列番号3)

【0157】

VSGWRLFKKIS 20

【0158】

L g B i T (配列番号4)

【0159】

MVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKID  
IHVIIPYEGLSGDQMGQIEKIFKVVYPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRP  
YEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLLFRVTIN

【0160】

S m B i T (配列番号5)

【0161】

VTGYRLFEEIL 30

【0162】

D a r k B i T (配列番号6)

【0163】

VSGWALFKKIS

【0164】

D a r k B i T (配列番号7)

【0165】

MVSGWALFKKIS

【0166】

D a r k B i T (配列番号8) 40

【0167】

MGVTDGWRLCERILA

【0168】

L g T r i p 3 0 9 2 (配列番号9)

【0169】

VFTLDDFVGDWEQTAAYNLDQVLEQGGVSSLLQNLAVSVTPIMRIVRSGENALKIDI  
HVIIPYEGLSADQMAQIEEVFKVVYPVDDHHFKVILPYGTLVIDGVTPNKLNYFGRP  
YEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLITPD

【0170】

50

L g T r i p 3 5 4 6 ( 配列番号 1 0 )

【 0 1 7 1 】

VFTLDDFVGDWEQTAAYNLDQVLEQGGVSSLLQNLAVSVTPIMRIVRSGENALKIDI  
HVIIPEGLSADQMAQIEEVFKVVYPVDDHDFKVLIPYGTGLVIDGVTPNKLNYFGRP  
YEGIAVFDGKKITTTGTLWNGNKIIDERLITPD

【 0 1 7 2 】

L g T r i p 2 0 9 8 ( 配列番号 1 1 )

【 0 1 7 3 】

VFTLDDFVGDWEQTAAYNLDQVLEQGGVSSLLQNLAVSVTPIMRIVRSGENALKIDI  
HVIIPEGLSADQMAQIEEVFKVVYPVDDHDFKVLIPYGTGLVIDGVTPNKLNYFGRP  
YEGIAVFDGKKITTTGTLWNGNKIIDERLITPD

10

【 0 1 7 4 】

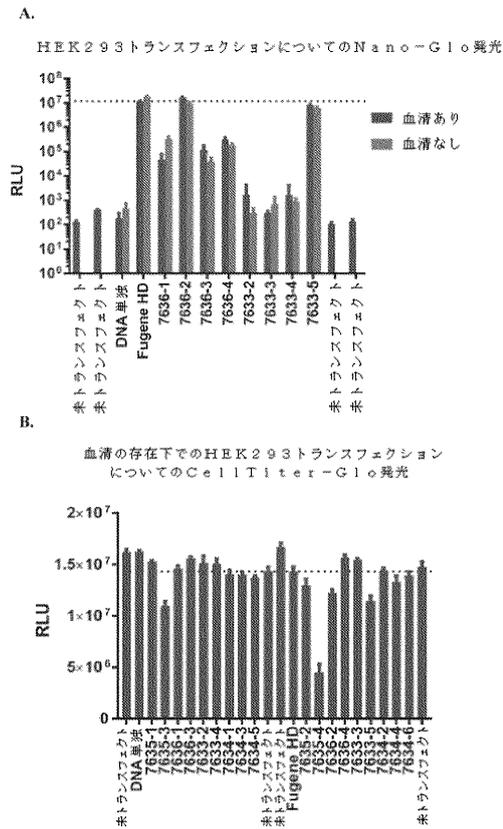
S m T r i p 9 ( 配列番号 1 2 )

【 0 1 7 5 】

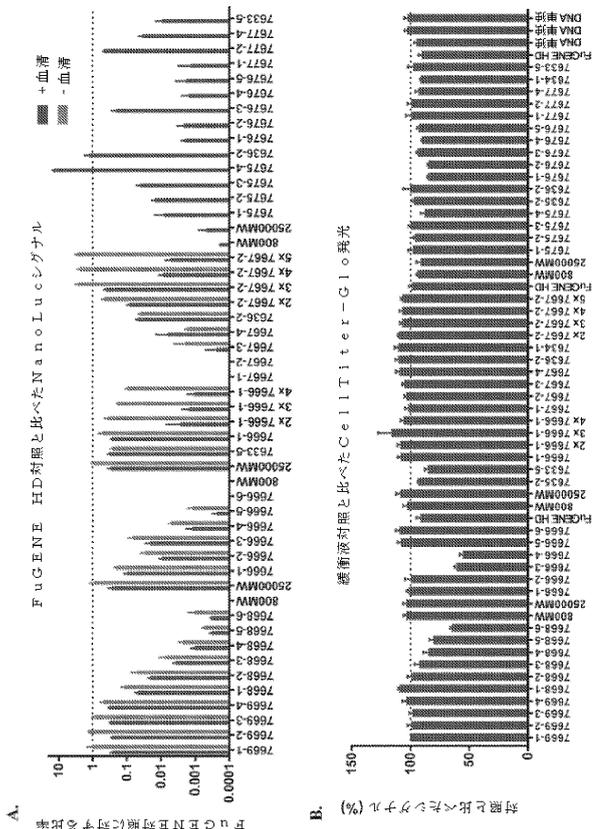
GSMLFRVTINS

【 図 面 】

【 図 1 】



【 図 2 】



20

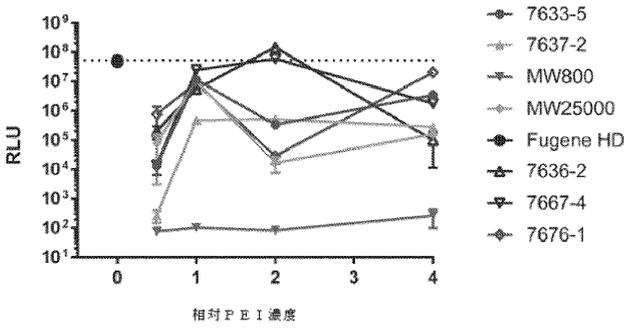
30

40

50

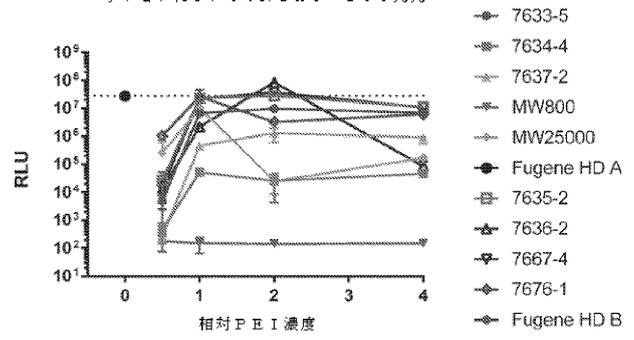
【図 3 A】

血清の存在下でのHEK293トランスフェクションについてのNano-Gloの発光



【図 3 B】

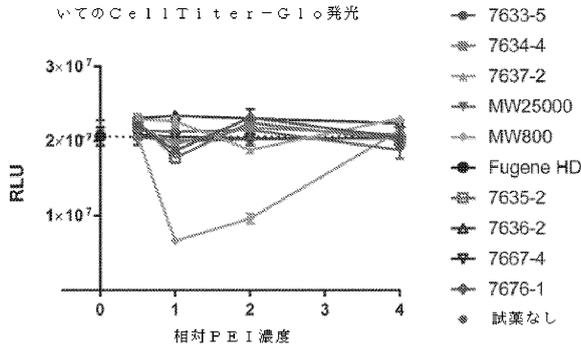
血清の不在下でのHEK293トランスフェクションについてのNano-Gloの発光



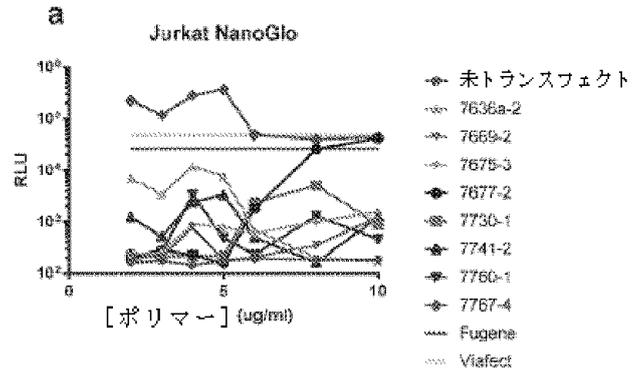
10

【図 3 C】

血清の存在下でのHEK293トランスフェクションについてのCellTiter-Gloの発光



【図 4 A】



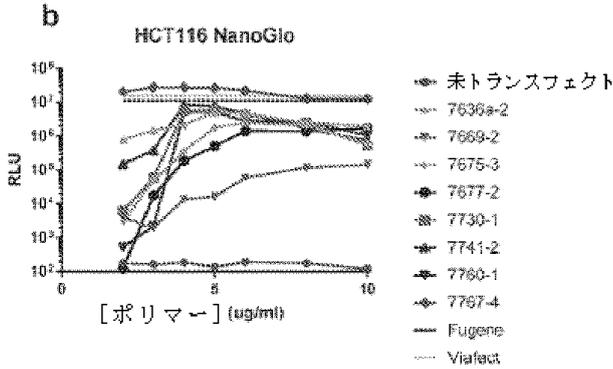
20

30

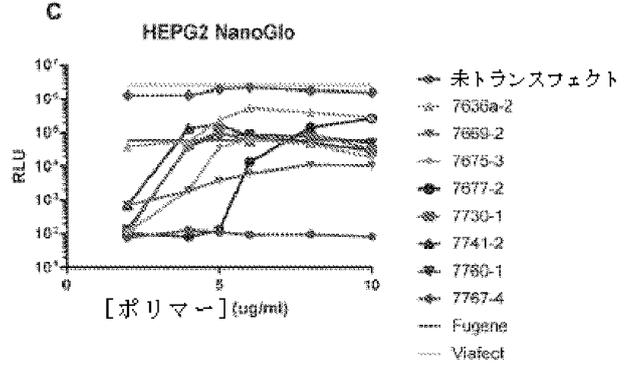
40

50

【 図 4 B 】

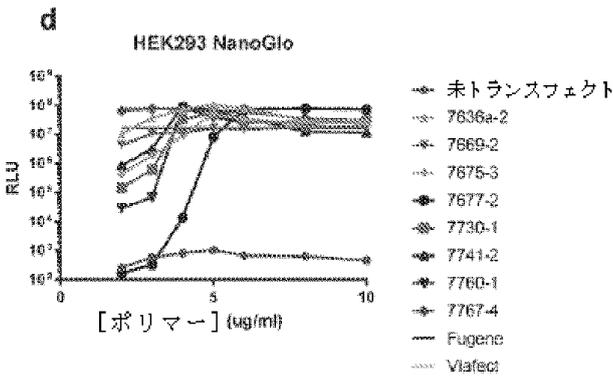


【 図 4 C 】

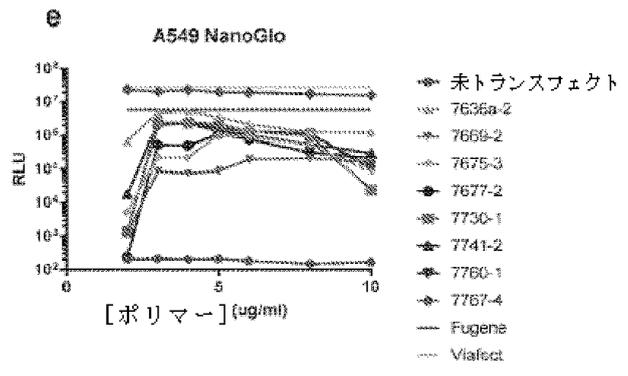


10

【 図 4 D 】

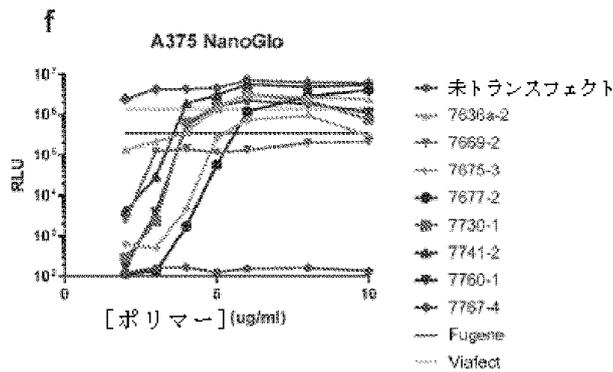


【 図 4 E 】

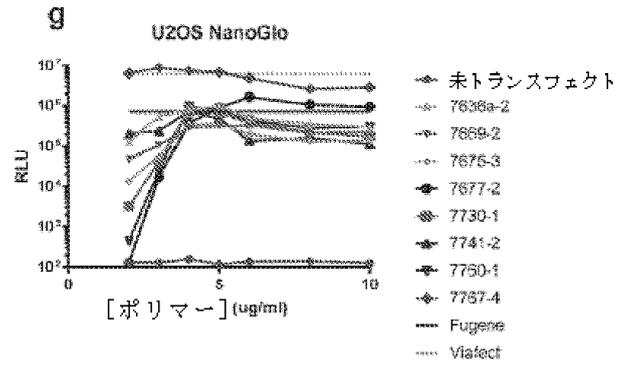


20

【 図 4 F 】



【 図 4 G 】

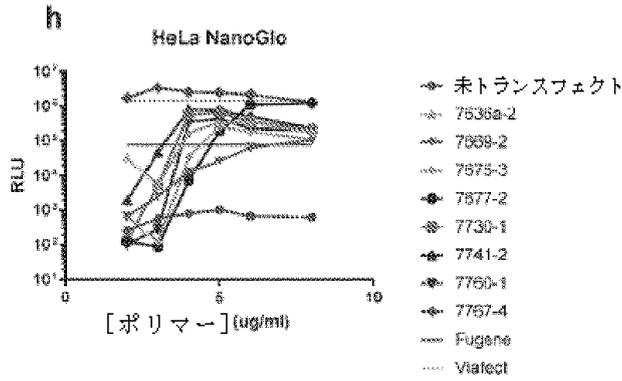


30

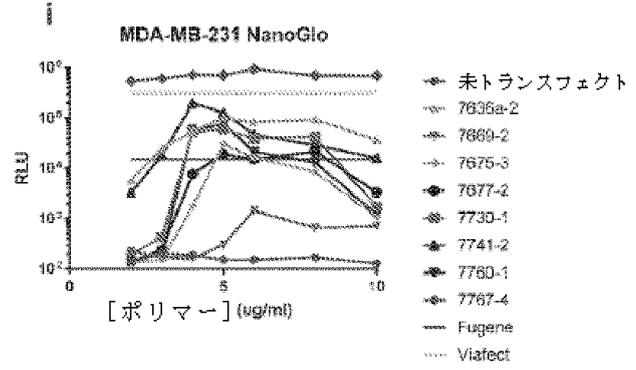
40

50

【 図 4 H 】

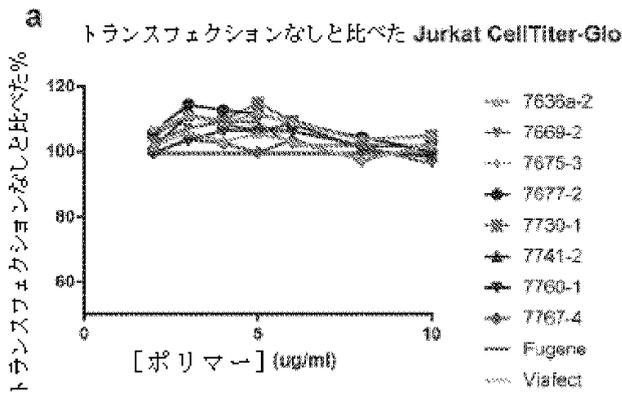


【 図 4 I 】

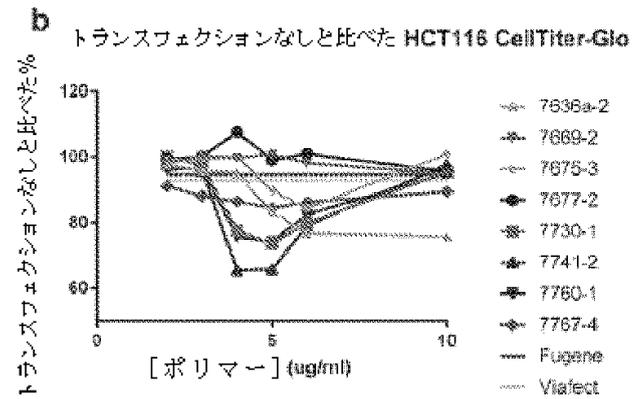


10

【 図 5 A 】

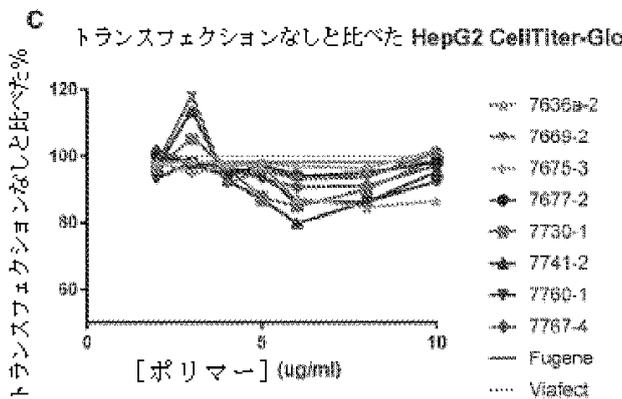


【 図 5 B 】

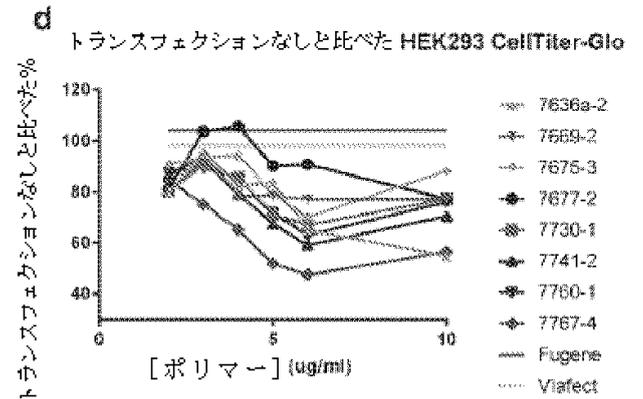


20

【 図 5 C 】



【 図 5 D 】

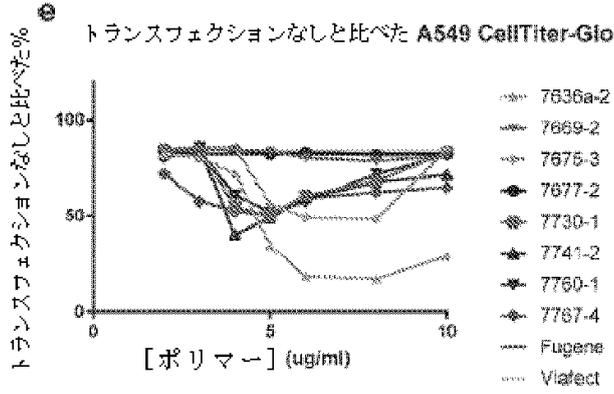


30

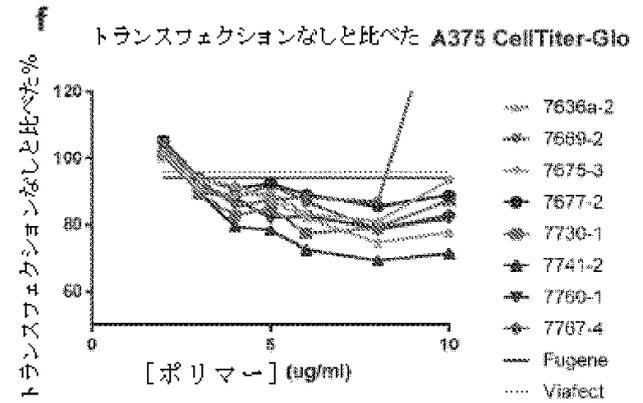
40

50

【 図 5 E 】

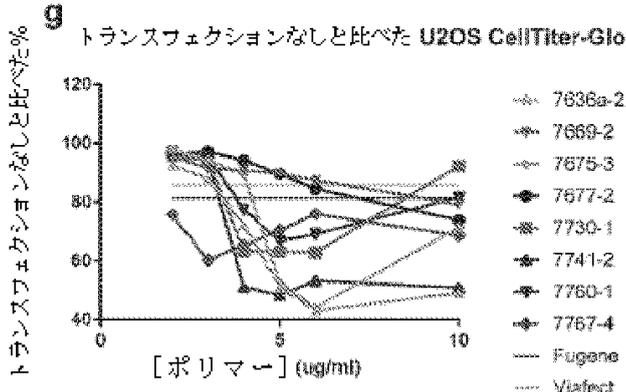


【 図 5 F 】

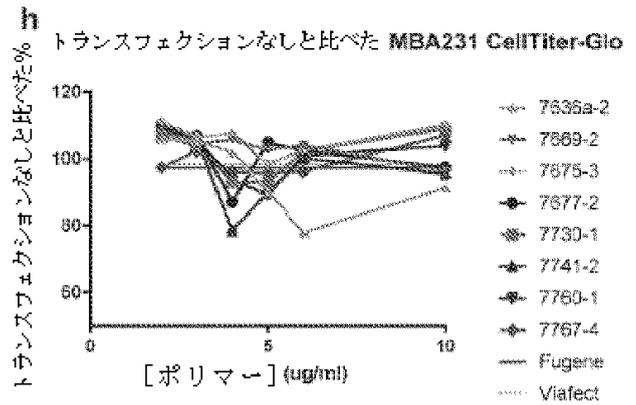


10

【 図 5 G 】



【 図 5 H 】



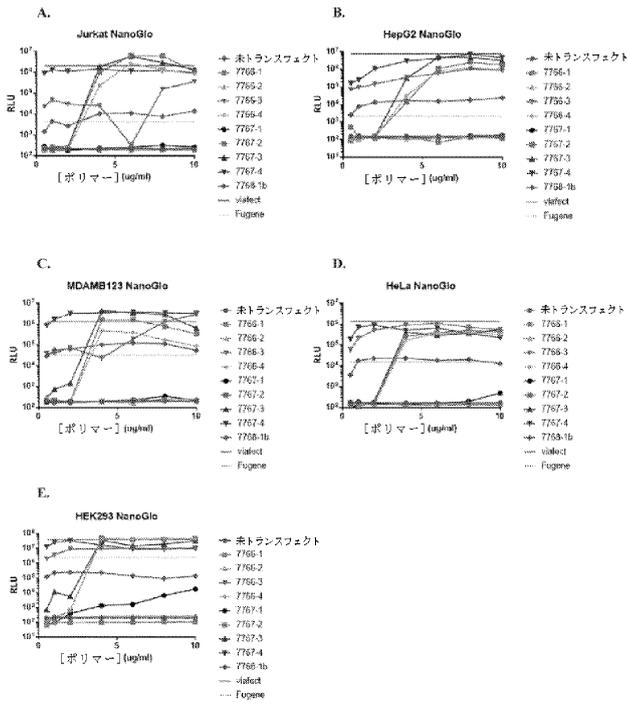
20

30

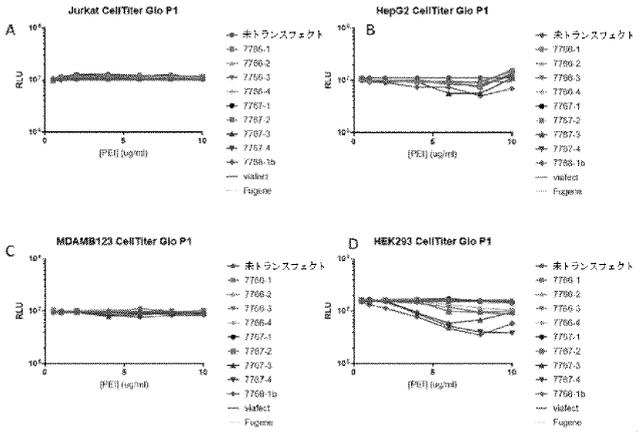
40

50

【 図 6 】



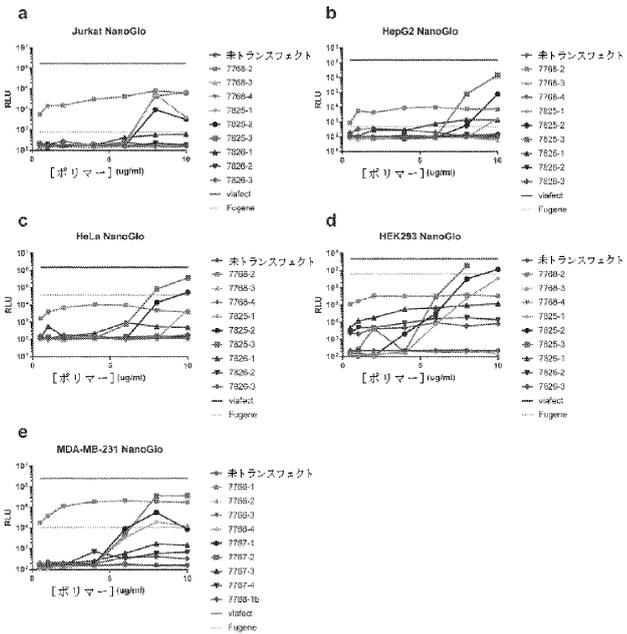
【 図 7 】



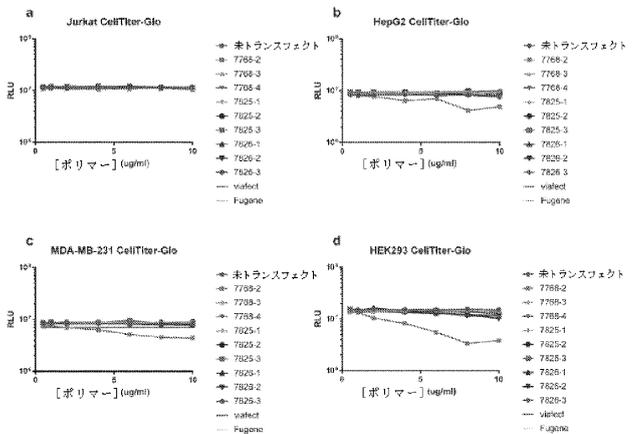
10

20

【 図 8 】



【 図 9 】

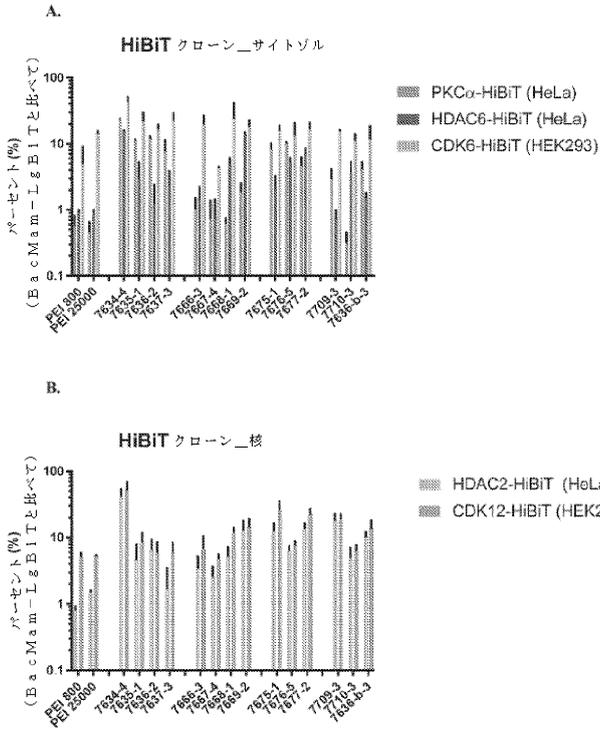


30

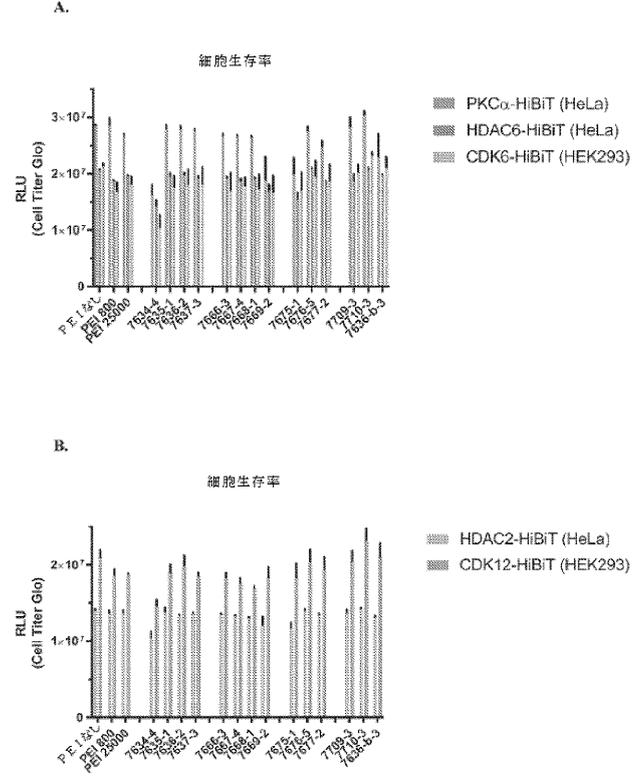
40

50

【 1 0 】



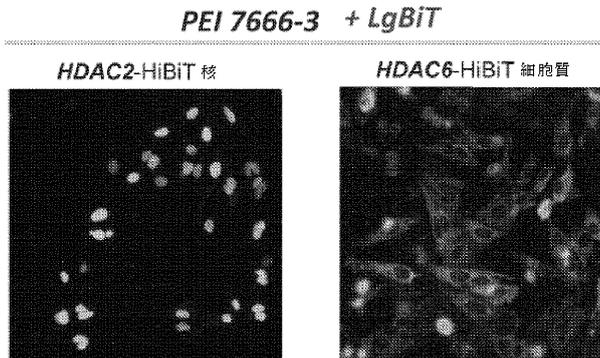
【 1 1 】



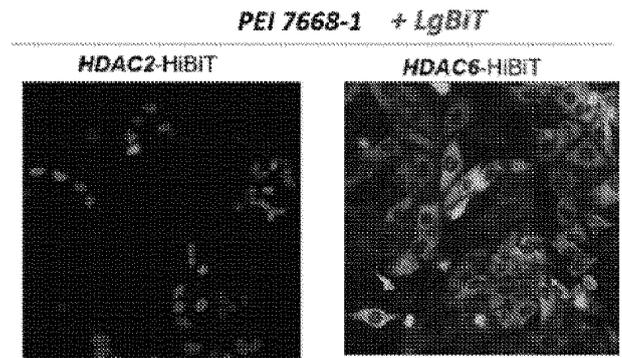
10

20

【 1 2 A 】



【 1 2 B 】

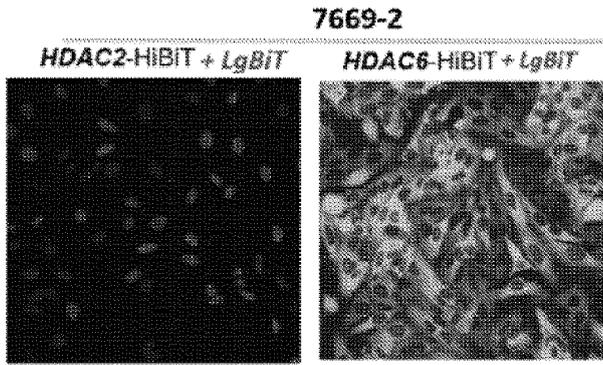


30

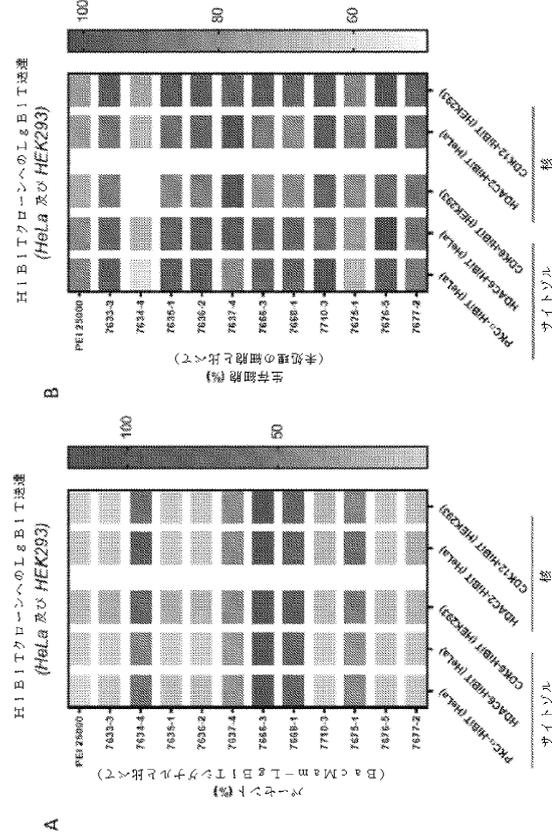
40

50

【 図 1 2 C 】



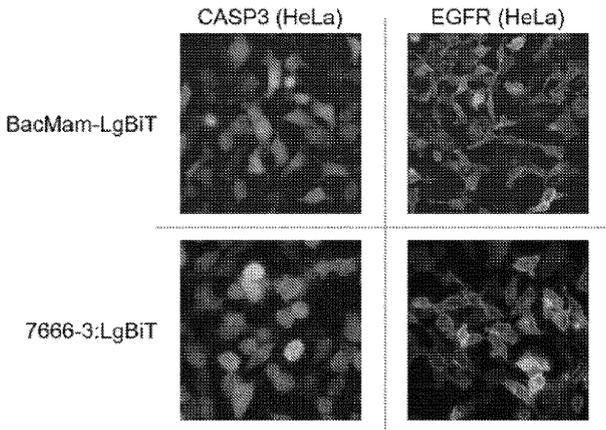
【 図 1 3 】



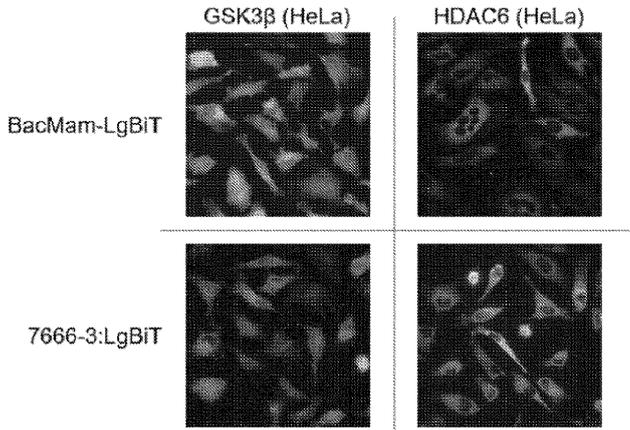
10

20

【 図 1 4 A 】



【 図 1 4 B 】

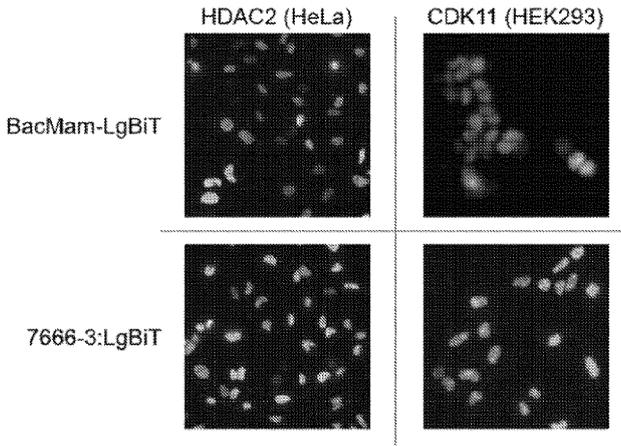


30

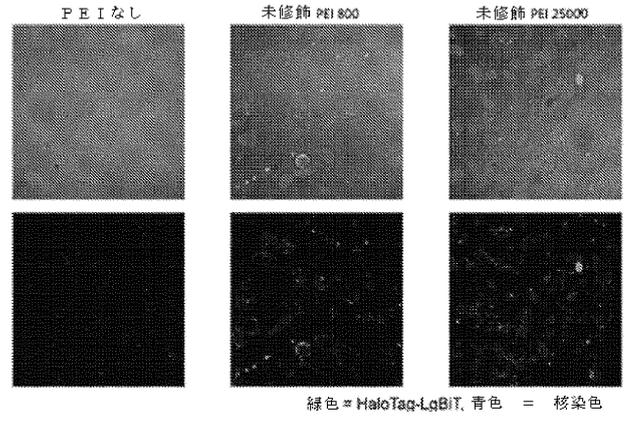
40

50

【 図 1 4 C 】

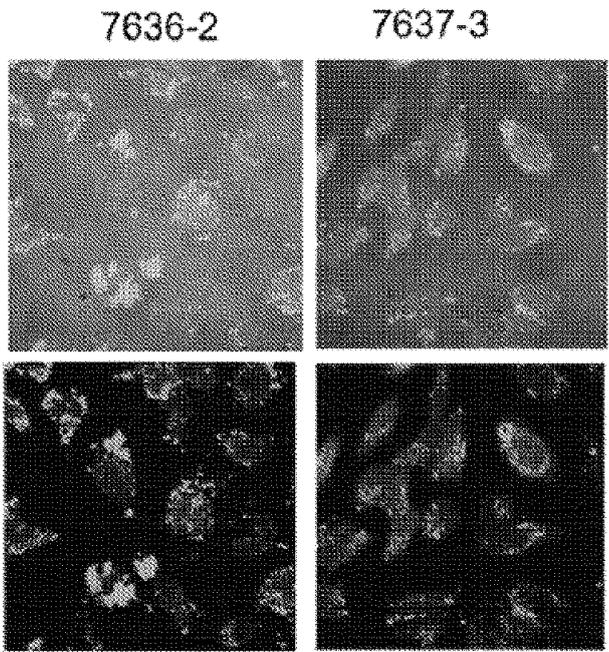


【 図 1 5 A 】



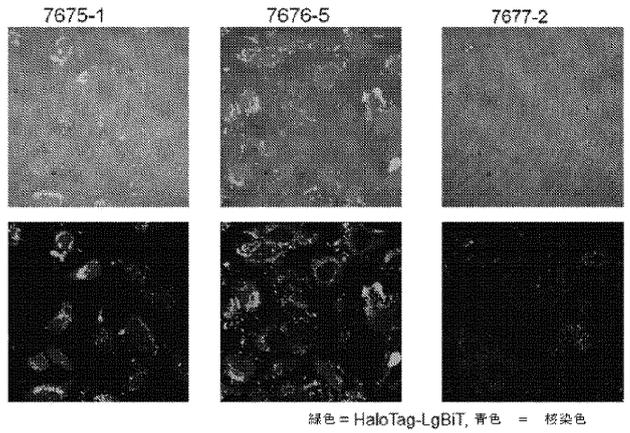
10

【 図 1 5 B 】



緑色 = HaloTag-LgBiT, 青色 = 核染色

【 図 1 5 C 】



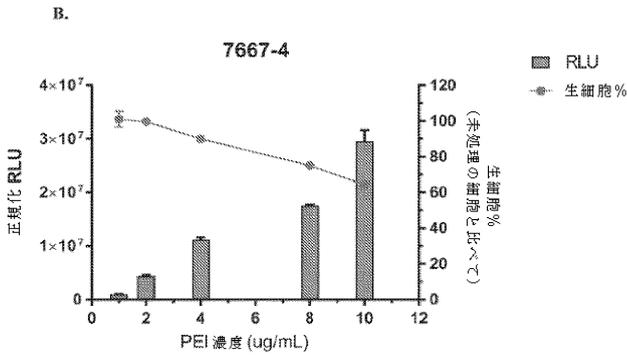
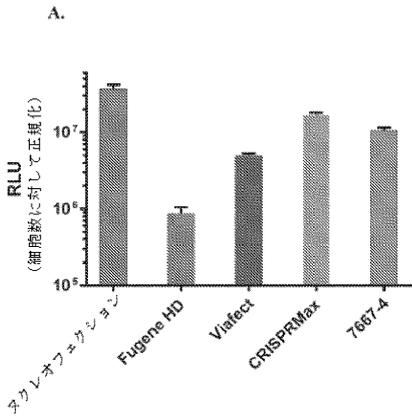
20

30

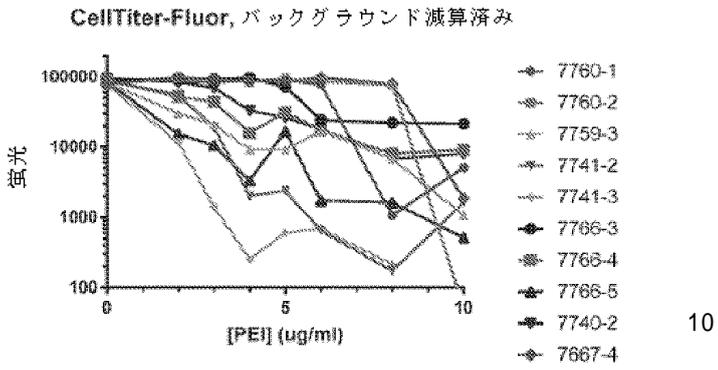
40

50

【 図 1 6 】



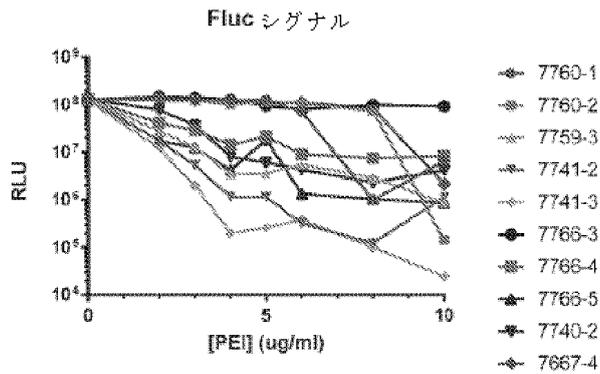
【 図 1 7 A 】



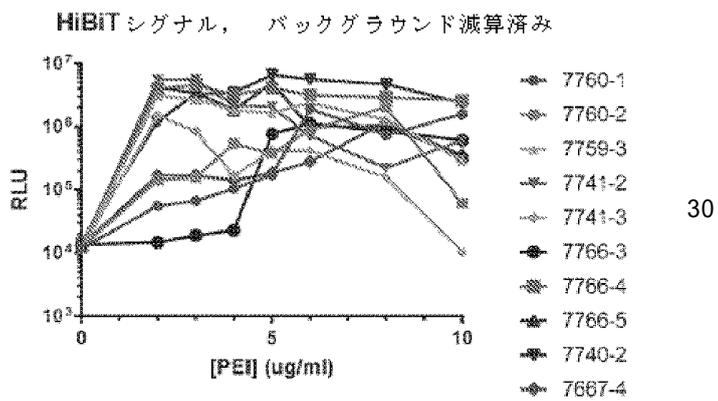
10

20

【 図 1 7 B 】



【 図 1 7 C 】

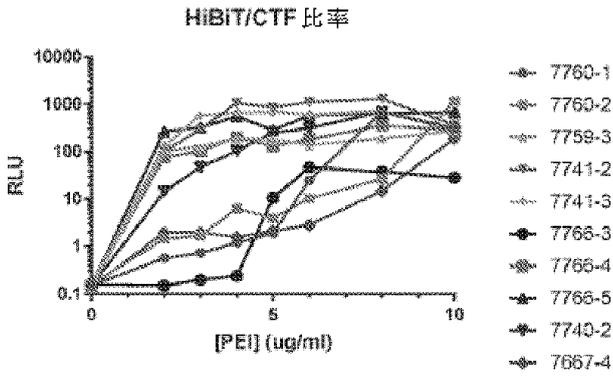


30

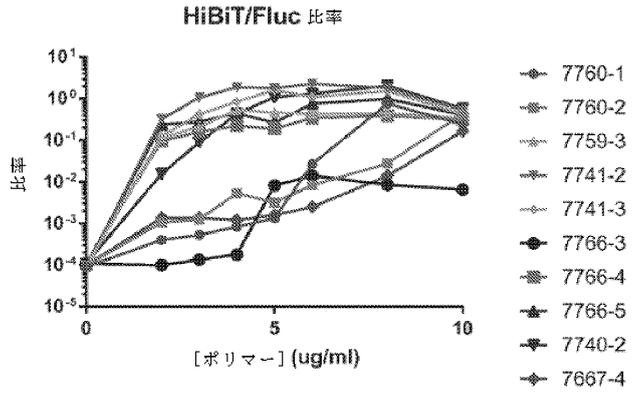
40

50

【 図 17 D 】

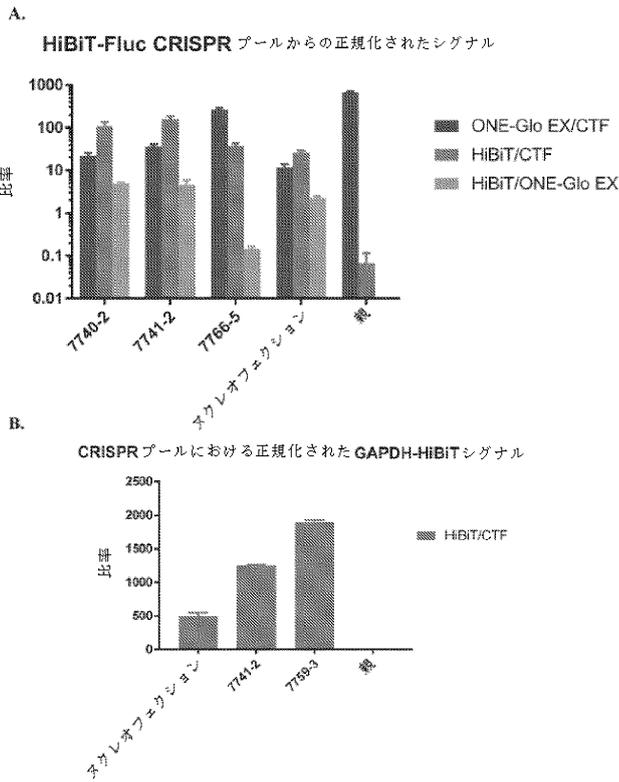


【 図 17 E 】

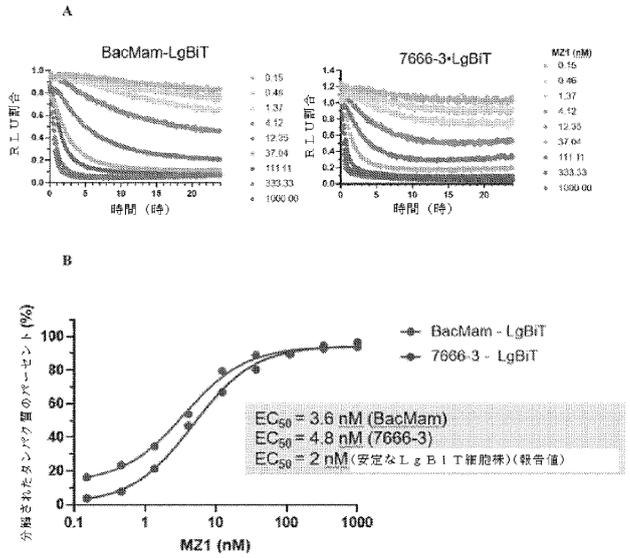


10

【 図 18 】



【 図 19 】



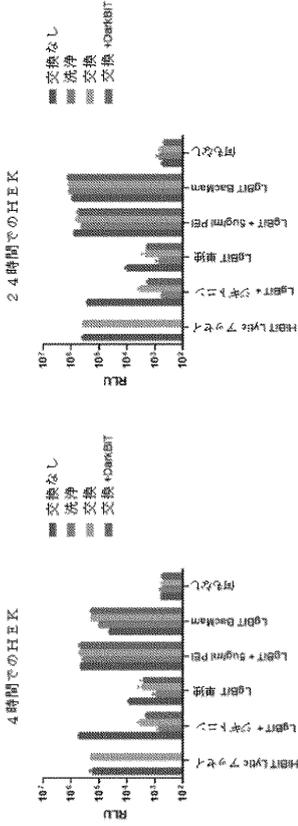
20

30

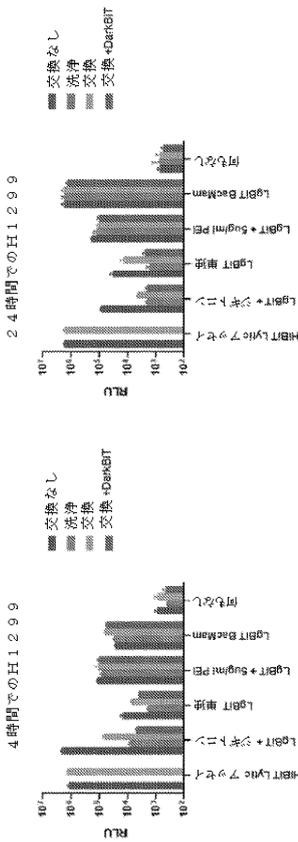
40

50

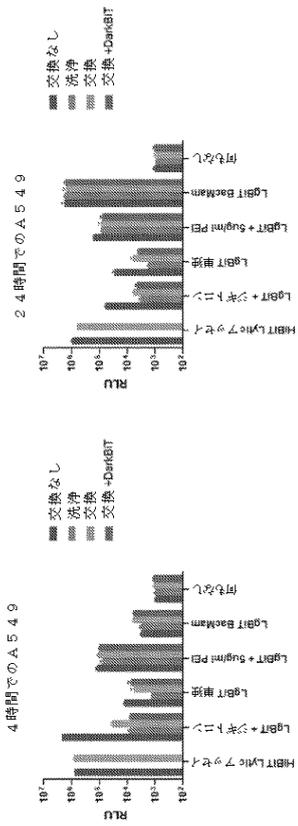
【図 20 A】



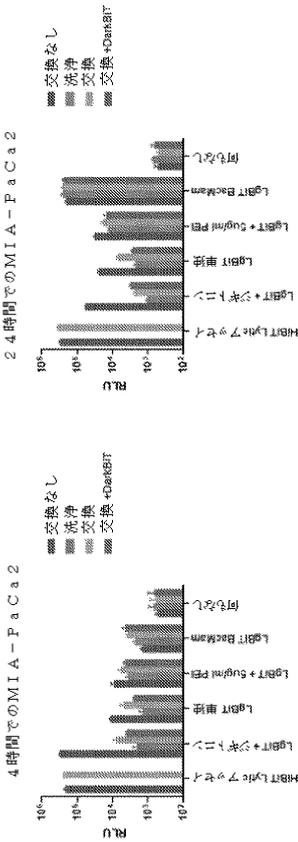
【図 20 C】



【図 20 B】



【図 20 D】



10

20

30

40

50

【配列表】

2022539343000001.app

10

20

30

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US2020/039136

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

- 1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
- 2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
- 3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

10

20

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

- 1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
  
- 2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
  
- 3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
- 4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

30

40

1-15(completely); 28-46(partially)

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2020/039136
---

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. C08G73/02 A61K47/34 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C08G A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2016/030793 A1 (XIE YUAN [US]) 4 February 2016 (2016-02-04)	1,2,4,5, 7,12-15, 37,38 8-11
A	example 1 paragraph [0070]	
X	JP 4 026662 B1 (DAINIPPON INK & CHEMICALS) 26 December 2007 (2007-12-26)	1,6,7, 37,38 8-11
A	paragraph [0023]	
X	US 2003/199687 A1 (YALPANI MANSSUR [US]) 23 October 2003 (2003-10-23)	1,2,4,5, 37,38 8-11
A	example 15	
X	CN 105 542 158 A (UNIV HUAQIAO) 4 May 2016 (2016-05-04)	1,3,5,6, 37,38 8-11
A	paragraph [0004] paragraph [0011] - paragraph [0015]	
	----- -/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents :		
*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier application or patent but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *&* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search <b>4 December 2020</b>		Date of mailing of the international search report <b>11/12/2020</b>
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer <b>Barrère, Matthieu</b>

2

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

page 1 of 2

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2020/039136

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 3 399 251 A (ROBERT MILLER ET AL) 27 August 1968 (1968-08-27)  column 3, lines 31-42 example 1	1,2,4, 12-15, 37,38
X	US 2011/091407 A1 (CHERADAME HERVE [FR] ET AL) 21 April 2011 (2011-04-21)  claims 1,28 example 1 paragraph [0007] paragraph [0064] - paragraph [0068]	1,2,4,6, 12-15, 28-46 8-11

10

20

30

40

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/US2020/039136

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
US 2016030793	A1	04-02-2016	AU 2014236292 A1	05-11-2015
			AU 2018220143 A1	13-09-2018
			CA 2910174 A1	25-09-2014
			EP 2967785 A1	20-01-2016
			US 2016030793 A1	04-02-2016
			WO 2014153122 A1	25-09-2014
-----				
JP 4026662	B1	26-12-2007	JP 4026662 B1	26-12-2007
			JP 2008037884 A	21-02-2008
-----				
US 2003199687	A1	23-10-2003	AU 2003228489 A1	27-10-2003
			JP 2005531648 A	20-10-2005
			US 2003199687 A1	23-10-2003
			US 2006235193 A1	19-10-2006
			WO 03087165 A2	23-10-2003
-----				
CN 105542158	A	04-05-2016	NONE	
-----				
US 3399251	A	27-08-1968	BE 693301 A	03-07-1967
			DE 1719264 A1	05-08-1971
			GB 1118685 A	03-07-1968
			LU 52906 A1	30-03-1967
			US 3399251 A	27-08-1968
-----				
US 2011091407	A1	21-04-2011	CA 2717778 A1	17-09-2009
			DK 2257587 T3	26-08-2019
			EP 2257587 A1	08-12-2010
			ES 2744827 T3	26-02-2020
			FR 2928373 A1	11-09-2009
			IL 207975 A	31-12-2014
			PL 2257587 T3	31-01-2020
			US 2011091407 A1	21-04-2011
			WO 2009112402 A1	17-09-2009
			-----	

10

20

30

40

50

International Application No. PCT/ US2020/ 039136

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-15(completely); 28-46(partially)

Substituted polyethyleneimine

1.1. claims: 7, 11(completely); 1-6, 10, 12-15, 28-46(partially)

comprising a substituent of Formula (1) wherein Z is a haloalkyl group.

1.2. claims: 8(completely); 1-6, 10, 12-15, 28-46(partially)

comprising a substituent of Formula (1) wherein Z is an aryl group or substituted aryl group.

1.3. claims: 9(completely); 1-6, 10, 12-15, 28-46(partially)

comprising a substituent of Formula (1) wherein Z is a heteroaryl group or substituted heteroaryl group.

---

2. claims: 16-27(completely); 28-46(partially)

Substituted poly(amidoamine) dendrimer

---

10

20

30

40

50

## フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 M 1/34 (2006.01)	C 1 2 M 1/00	A
C 1 2 M 3/00 (2006.01)	C 1 2 M 1/34	Z
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 M 1/34	E
	C 1 2 M 3/00	Z
	C 1 2 Q 1/02	

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,N  
E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,  
CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JO,JP,KE,K  
G,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,N  
I,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,  
TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

弁理士 市川 さつき

(74)代理人 100111796

弁理士 服部 博信

(74)代理人 100218578

弁理士 河井 愛美

(72)発明者 チョウ ウェンファイ

アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 5 3 7 1 1 - 5 3 9 9 マディソン ウッズ ホロー ロード 2  
8 0 0 プロメガ コーポレーション内

(72)発明者 ホアン トリシュ

アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 5 3 7 1 1 - 5 3 9 9 マディソン ウッズ ホロー ロード 2  
8 0 0 プロメガ コーポレーション内

(72)発明者 エガース クリストファー トッド

アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 5 3 7 1 1 - 5 3 9 9 マディソン ウッズ ホロー ロード 2  
8 0 0 プロメガ コーポレーション内

(72)発明者 ワン ファイ

アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 5 3 7 1 1 - 5 3 9 9 マディソン ウッズ ホロー ロード 2  
8 0 0 プロメガ コーポレーション内

(72)発明者 マヒライド トーマス

アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 5 3 7 1 1 - 5 3 9 9 マディソン ウッズ ホロー ロード 2  
8 0 0 プロメガ コーポレーション内

(72)発明者 ピンコフスキー ブロック

アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 5 3 7 1 1 - 5 3 9 9 マディソン ウッズ ホロー ロード 2  
8 0 0 プロメガ コーポレーション内

(72)発明者 マイゼンハイマー ポンチョ

アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 5 3 7 1 1 - 5 3 9 9 マディソン ウッズ ホロー ロード 2  
8 0 0 プロメガ コーポレーション内

(72)発明者 ファン フランク

アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 5 3 7 1 1 - 5 3 9 9 マディソン ウッズ ホロー ロード 2  
8 0 0 プロメガ コーポレーション内

(72)発明者 ウッド キース

アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 5 3 7 1 1 - 5 3 9 9 マディソン ウッズ ホロー ロード 2  
8 0 0 プロメガ コーポレーション内

F ターム (参考) 4B029 AA07 AA23 BB11 CC01 FA01 FA15 GA01 GA08 GB06

4B063 QA18 QQ08 QQ42 QR32 QR66 QR77 QS03 QS28 QS36 QX02

4B065 AA93X AB01 AC14 AC20 BA02 CA24 CA46

4J043 PA02 PB08 PC136 PC146 PC166 QA04 RA08 SA33 XA11 YA13

YB07 YB08 YB21 YB31 ZA60 ZB60