

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2024-509743

(P2024-509743A)

(43)公表日 令和6年3月5日(2024.3.5)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード(参考)	
C 1 2 N	15/113(2010.01)	C 1 2 N	15/113	Z	4 B 0 6 5
A 6 1 K	9/51(2006.01)	A 6 1 K	9/51		4 C 0 7 6
A 6 1 K	31/7088(2006.01)	A 6 1 K	31/7088		4 C 0 8 4
A 6 1 K	48/00(2006.01)	A 6 1 K	48/00		4 C 0 8 6
A 6 1 K	47/44(2017.01)	A 6 1 K	47/44		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全23頁) 最終頁に続く

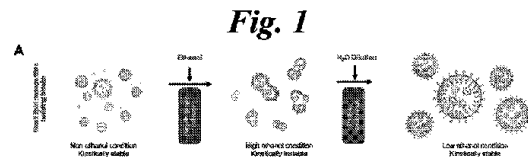
(21)出願番号	特願2023-549081(P2023-549081)	(71)出願人	501335771 ザ・ジョンズ・ホプキンス・ユニバーシ ティ アメリカ合衆国 メリーランド州 2 1 2 1 8 パルティモア・ノース・チャー ズ・ストリート 3 4 0 0
(86)(22)出願日	令和4年2月16日(2022.2.16)	(74)代理人	100147485 弁理士 杉村 憲司
(85)翻訳文提出日	令和5年10月4日(2023.10.4)	(74)代理人	230118913 弁護士 杉村 光嗣
(86)国際出願番号	PCT/US2022/016580	(74)代理人	100195556 弁理士 柿沼 公二
(87)国際公開番号	WO2022/177977	(72)発明者	ハイクアン マオ アメリカ合衆国 メリーランド州 2 1 2 1 8 パルティモア ノース チャールズ
(87)国際公開日	令和4年8月25日(2022.8.25)		最終頁に続く
(31)優先権主張番号	63/149,985		
(32)優先日	令和3年2月16日(2021.2.16)		
(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		

(54)【発明の名称】 *in vitro*および*in vivo*トランスフェクションのための規定サイズのプラスミドDNA / 脂質粒子の調製方法

(57)【要約】

*in vitro*および*in vivo*局所トランスフェクションにおける細胞の効率的なトランスフェクションに最適な粒径の核酸 / 脂質粒子を調製する方法が提供される。本方法は、核酸 / 脂質ナノ粒子集合の動態制御に基づいて、約50 nm ~ 1200 nmの規定サイズの保存安定性がある粒子を調製する。50 nm ~ 1200 nmのサイズ範囲に対する、核酸 / 脂質粒子媒介のトランスフェクションのサイズ依存特性も提供される。

【選択図】 図 1



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

210 nm ~ 1200 nm の平均粒径および 0.05 ~ 0.5 の多分散性指数を有する複数の核酸 / 脂質粒子を調製する方法であって、

(a) 20 ~ 200 nm の第 1 の粒径を有する複数の核酸 / 脂質ナノ粒子を含む第 1 の溶液を調製または提供することと、

(b) 前記第 1 の溶液の極性を約 80 の誘電率から約 45 ~ 60 に減少させ、前記第 1 の粒径を有する複数の核酸 / 脂質ナノ粒子の粒径成長を誘発し、210 nm ~ 1200 nm の範囲にある第 2 の粒径を有する複数の核酸 / 脂質ナノ粒子を含む第 2 の溶液を形成することと、

(c) 約 65 ~ 80 の誘電率の前記第 2 の溶液の極性を反転させ、前記第 2 の粒径を有する複数の核酸 / 脂質ナノ粒子の成長を所定の粒径で停止させ、210 ~ 1200 nm の平均粒径および 0.05 ~ 0.5 の多分散性指数を有する複数の核酸 / 脂質粒子を形成することと

を含む、方法。

【請求項 2】

前記第 1 の粒径は、約 40 nm ~ 約 120 nm の範囲を有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記第 1 の粒径は、約 60 nm である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記第 2 の粒径は、約 210、300、400、500、600、700、800、900、1000、1100、および 1200 nm からなる群から選択される、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

前記第 1 の溶液は、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、および Fe^{3+} からなる群から選択される 1 つまたは複数の多価陽イオンを更に含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

前記第 1 の溶液の極性は、前記第 1 の溶液に水混和性有機溶剤を追加することにより低下する、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

さまざまな濃度の前記水混和性有機溶剤を前記第 1 の溶液に追加し、前記第 1 の粒径を有する複数の核酸 / 脂質ナノ粒子の粒径成長を制御することを含む、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記水混和性有機溶剤は、エタノール、メタノール、ブタノール、イソプロパノール、ジメチルスルホキシド (DMSO)、ジメチルホルムアミド (DMF)、テトラヒドロフラン (THF)、アセトン、およびアセトニトリルからなる群から選択される、請求項 6 または 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記第 2 の溶液の極性は、 H_2O による希釈により反転する、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

前記第 1 の粒径を有する複数の核酸 / 脂質ナノ粒子を含む第 1 の溶液は、継続的なフラッシュナノ複合体形成 (FNCF) 技術により調製される、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

前記第 1 の粒径を有する複数の核酸 / 脂質ナノ粒子を含む第 1 の溶液は、手動のピペット混合およびボルテックス (vortexing) 法により調製される、請求項 1 ~ 9 の

10

20

30

40

50

いずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

約 100 μg/mL の入力核酸濃度を含む、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

前記核酸は、アンチセンスオリゴヌクレオチド、cDNA、ゲノムDNA、ガイドRNA、プラスミドDNA、ベクターDNA、mRNA、miRNA、piRNA、shRNA、およびsiRNAからなる群から選択される、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 14】

前記核酸は、1つまたは複数の異なる種の核酸を含む、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記核酸は、1つまたは複数のプラスミドDNAを含む、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

前記核酸/脂質ナノ粒子は、正電荷脂質、中性脂質、負電荷脂質、ペグ化脂質、およびイオン化脂質からなる群から選択される1つまたは複数の脂質を含む、請求項 1 ~ 15 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 17】

前記核酸/脂質ナノ粒子は、カチオン性脂質を含む、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

前記カチオン性脂質は、N1-[2-(1S)-1-[(3-アミノプロピル)アミノ]-4-[ジ(3-アミノ-プロピル)アミノ]ブチルカルボキサミド)エチル]-3,4-ジ[オレイルオキシ]-ベンズアミド、1,2-ジ-O-オクタデセニル-3-トリメチルアンモニウムプロパン(DOTMA)、O-アルキルホスファチジルコリン、1,2-ジラウロイル-sn-グリセロ-3-エチルホスホコリン(12:0 EPD)、1,2-ジミリストイル-sn-グリセロ-3-エチルホスホコリン(14:0 EPC)、1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-エチルホスホコリン(16:0 EPC)、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-エチルホスホコリン(18:0 EPC)、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-エチルホスホコリン(18:1 EPC)、1-パルミトイル-2-オレオイル-sn-グリセロ-3-エチルホスホコリン(16:0-18:1 EPC)、および1,2-ジミリストレオイル-sn-グリセロ-3-エチルホスホコリン(14:1 EPC)、ジメチルジオクタデシルアンモニウム(DDAB)、N-(4-カルボキシベンジル)-N,N-ジメチル-2,3-ビス(オレオイルオキシ)プロパン-1-アミニウム(DOBAQ)、1,2-ジステアロイル-3-ジメチルアンモニウム-プロパン(18:0 DAP)、1,2-ジパルミトイル-3-ジメチルアンモニウム-プロパン(16:0 DAP)、1,2-ジミリストイル-3-ジメチルアンモニウム-プロパン(14:0 DAP)、1,2-ジオレオイル-3-ジメチルアンモニウム-プロパン(DODAP)(18:1 DAP)、1,2-ジミリストイル-3-トリメチルアンモニウム-プロパン(14:0 TAP)、1,2-ジパルミトイル-3-トリメチルアンモニウム-プロパン(16:0 TAP)、1,2-ステアロイル-3-トリメチルアンモニウム-プロパン(18:0 TAP)、1,2-ジオレオイル-3-トリメチルアンモニウム-プロパン(18:1 TAP(DOTAP))、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン(DOPE)、3-[N-(N',N'-ジメチルアミノエタン)-カルバモイル]コレステロール塩酸塩(DC-コレステロール・HCl)、DC-コレステロール、N4-コレステリル-スペルミン(GL67)、1,2-ジオレイルオキシ-3-ジメチルアミノプロパン(DODMA)、ジミリストイルトリメチルアンモニウムプロパン(DMTAP)、2,3-ジオレイルオキシ-N-[2(スペルミネカルボキサミド)エチル]-N,N-ジメチル-1-プロパントリフルオロアセテート(DOSPA)、N,N-ジオレイル-N,N-ジメチルアンモニウムクロリド(DODAC)、1,2-ジオレオイルカルバミル-3-ジメチルアンモニウム

10

20

30

40

50

ウム - プロパン (D O C D A P)、1, 2 - ジリネオイル - 3 - ジメチルアンモニウム - プロパン (D L I N D A P)、ジラウリル (C₁₂:0) トリメチルアンモニウムプロパン (D L T A P)、ジオクタデシルアミドグリシルスベルミン (D O G S)、D C - C h o i、1, 2 - ジミリスチルオキシプロピル - 3 - ジメチル - ヒドロキシエチルアンモニウムプロミド (D M R I E)、3 - ジメチルアミノ - 2 - (コレスト - 5 - エン - 3 - ベータ - オキシブタン - 4 - オキシ) - 1 - (シス, シス - 9, 12 - オクタデカジエノキシ) プロパン (C L i n D M A)、2 - [5' - (コレスト - 5 - エン - 3 [ベータ] - オキシ) - 3' - オキサペントキシ) - 3 - ジメチル - 1 - (シス, シス - 9', 12' - オクタデカジエノキシ) プロパン (C p L i n D M A)、および N, N - ジメチル - 3, 4 - ジオレイルオキシベンジルアミン (D M O B A)、および 1, 2 - N, N' - ジオレイルカルバミル - 3 - ジメチルアミノプロパン (D O c a r b D A P)、ならびにそれらの組み合わせおよび薬学的に許容される塩からなる群から選択される、請求項 17 に記載の方法。

10

【請求項 19】

前記カチオン性脂質は、D O T A P である、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

請求項 1 ~ 19 のいずれか一項に記載の方法により調製された、核酸 / 脂質ナノ粒子。

【請求項 21】

血漿 DNA を含む脂質ナノ粒子であって、約 210 nm ~ 約 1,200 nm の範囲を有する平均粒径を有する、ナノ粒子。

20

【請求項 22】

以下の 1 つまたは複数のための、請求項 1 ~ 19 のいずれか一項に記載の方法により調製された複数の核酸 / 脂質ナノ粒子の使用：

- (a) ウイルスベクター生産のための *i n v i t r o* トランスフェクション、
- (b) 治療用細胞および遺伝子編集のための *e x v i v o* トランスフェクション、
- (c) *i n v i v o* トランスフェクション、
- (d) *i n v i v o* 局所投与、および
- (e) 組織特異的送達。

【請求項 23】

前記ウイルスベクター生産のための *i n v i t r o* トランスフェクションは、1 つまたは複数の細胞を前記複数の核酸 / 脂質ナノ粒子に接触させることを含む、請求項 22 に記載の使用。

30

【請求項 24】

前記複数の核酸 / 脂質ナノ粒子を、前記 1 つまたは複数の細胞の単層培養液または前記 1 つまたは複数の細胞の懸濁培養液に投与することを含む、請求項 23 に記載の使用。

【請求項 25】

前記 1 つまたは複数の細胞は、ウイルスパッケージング H E K 2 9 3 細胞を含む、請求項 23 または 24 に記載の方法。

【請求項 26】

前記 1 つまたは複数の細胞は、H E K 2 9 3 S 細胞、H E K 2 9 3 T 細胞、H E K 2 9 3 F 細胞、H E K 2 9 3 F T 細胞、H E K 2 9 3 F T M 細胞、H E K 2 9 3 S G 細胞、H E K 2 9 3 S G G D 細胞、H E K 2 9 3 H 細胞、H E K 2 9 3 E 細胞、H E K 2 9 3 M S R 細胞、または H E K 2 9 3 A 細胞を含む、請求項 25 に記載の方法。

40

【請求項 27】

前記 1 つまたは複数の細胞は、H E K 2 9 3 T 細胞を含む、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

前記 1 つまたは複数の細胞は、懸濁培養液に適した H E K 2 9 3 T 細胞を含む、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

前記 *i n v i v o* 局所投与は、肝内注射、皮内注射、硝子体内注射、筋肉内注射、外

50

耳道内注射、および腫瘍内注射からなる群から選択される、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 30】

前記組織特異的送達は、鼻腔内送達、経口送達、および舌下送達からなる群から選択される、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 31】

肝細胞、ケラチノサイト、成体幹細胞および前駆細胞、多能性幹細胞、T細胞、NK細胞、ならびに腫瘍細胞の1つまたは複数を送達することを含み、請求項 22 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

脂質ナノ粒子(LNP)は、遺伝子治療のため核酸を送達するために広く使用されている。*in vitro*および*in vivo*トランスフェクション効率を増加させるため、脂質および核酸組成、窒素/リン酸塩(N/P)比、ならびにLNPの生分解性などの要因は、広く調査されている。しかしながら、ウイルスベクターを生産するための当該技術分野で現在既知の方法は、低い再現性、一貫性のない収量、ならびに最善ではない*in vitro*および*in vivo*トランスフェクション効率により制限されている。例えば、*in vivo*の全身送達用途のため、凍結乾燥形態の100nm未満の分散ナノ粒子の生成が成功している(Hura, 2019)。これらの小さなナノ粒子は、しかしながら、ウイルスベクター生産細胞株(すなわち、HEK293TまたはHEK293F細胞)および他の細胞型における*in vitro*トランスフェクションにとっては準最適である。肝臓を標的とする治療におけるsiRNAおよびCOVID-19 mRNAワクチンならびにいくつかの脂質NPベースの製品を送達するために使用される3つのLNPベースの製剤(すなわち、肝臓がんを抑制するためのMTL-CEBPA、肝線維症のためのND-L02-s0201/BMS-986263)はすべて、40nm~200nmのサイズ範囲の粒子を有する。200nm~1200nmの範囲のLNPが*in vitro*および*in vivo*の両方のトランスフェクション効率にどのように影響するかについての報告はまだない。この情報の不足は、主に、この範囲内の調節可能なサイズの脂質ナノ粒子の調製を可能にする信頼できる方法または過程の不足に起因する。

【発明の概要】

【0002】

いくつかの態様においては、本開示の保護対象は、210~1200nmの平均粒径および0.05~0.5の多分散性指数を有する複数の核酸/脂質粒子を調製する方法であって、

(a) 20~200nmの第1の粒径を有する複数の核酸/脂質ナノ粒子を含む第1の溶液を調製または提供することと、

(b) 第1の溶液の極性を約80の誘電率から約45~60に減少させ、第1の粒径を有する複数の核酸/脂質ナノ粒子の粒径成長を誘発し、210nm~1200nmの範囲にある第2の粒径を有する複数の核酸/脂質ナノ粒子を含む第2の溶液を形成することと

(c) 約65~80の誘電率の第2の溶液の極性を反転させ、第2の粒径を有する複数の核酸/脂質ナノ粒子の成長を所定の粒径で停止させ、210~1200nmの規定の粒径および0.1~0.3の多分散性指数を有する複数の核酸/脂質粒子を形成することとを含む方法を提供する。

【0003】

態様によっては、第1の粒径は、約40nm~約120nmの範囲を有する。特定の態様においては、第1の粒径は、約60nmである。

【0004】

態様によっては、第2の粒径は、約210nm~約1,200nmの範囲を有する。特定の態様においては、第2の粒径は、約210、300、400、500、600、70

10

20

30

40

50

0、800、900、1000、1100、および1200 nmからなる群から選択される。

【0005】

態様によっては、第1の溶液は、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、および Fe^{3+} からなる群から選択される1つまたは複数の多価陽イオンを更に含む。

【0006】

態様によっては、第1の溶液の極性は、第1の溶液に水混和性有機溶剤を追加することにより低下する。特定の態様においては、本方法は、さまざまな濃度の水混和性有機溶剤を第1の溶液に追加し、第1の粒径を有する複数の核酸/脂質ナノ粒子の粒径成長を制御することを含む。より特定の態様においては、水混和性有機溶剤は、エタノール、メタノール、ブタノール、イソプロパノール、ジメチルスルホキシド(DMSO)、ジメチルホルムアミド(DMF)、テトラヒドロフラン(THF)、アセトン、およびアセトニトリルからなる群から選択される。

10

【0007】

態様によっては、第2の溶液の極性は、 H_2O による希釈により反転する。

【0008】

態様によっては、第1の粒径を有する複数の核酸/脂質ナノ粒子を含む第1の溶液は、継続的なフラッシュナノ複合体形成(FNC)技術により調製される。他の態様においては、第1の粒径を有する複数の核酸/脂質ナノ粒子を含む第1の溶液は、手動のピペット混合およびボルテックス(vertexing)法により調製される。特定の態様においては、本方法は、約100 $\mu g/mL$ の入力核酸濃度を含む。

20

【0009】

態様によっては、核酸は、アンチセンスオリゴヌクレオチド、cDNA、ゲノムDNA、ガイドRNA、プラスミドDNA、ベクターDNA、mRNA、miRNA、piRNA、shRNA、およびsiRNAからなる群から選択される。特定の態様においては、核酸は、プラスミドDNA(pDNA)または異なる種のプラスミドDNAの混合物を含む。更により特定の態様においては、核酸は、血漿DNAを含む。

【0010】

いくつかの態様においては、核酸/脂質ナノ粒子は、正電荷脂質、中性脂質、負電荷脂質、ペグ化脂質、およびイオン化脂質からなる群から選択される1つまたは複数の脂質を含む。

30

【0011】

態様によっては、核酸/脂質ナノ粒子は、カチオン性脂質を含む。特定の態様においては、カチオン性脂質は、N1-[2-(1S)-1-[(3-アミノプロピル)アミノ]-4-[ジ(3-アミノ-プロピル)アミノ]ブチルカルボキサミド)エチル]-3,4-ジ[オレイルオキシ]-ベンズアミド、1,2-ジ-O-オクタデセニル-3-トリメチルアンモニウムプロパン(DOTMA)、O-アルキルホスファチジルコリン、1,2-ジラウロイル-sn-グリセロ-3-エチルホスホコリン(12:0 EPD)、1,2-ジミリストイル-sn-グリセロ-3-エチルホスホコリン(14:0 EPC)、1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-エチルホスホコリン(16:0 EPC)、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-エチルホスホコリン(18:0 EPC)、1,2-ジオレイル-sn-グリセロ-3-エチルホスホコリン(18:1 EPC)、1-パルミトイル-2-オレイル-sn-グリセロ-3-エチルホスホコリン(16:0-18:1 EPC)、および1,2-ジミリストレイル-sn-グリセロ-3-エチルホスホコリン(14:1 EPC)、ジメチルジオクタデシルアンモニウム(DDAB)、N-(4-カルボキシベンジル)-N,N-ジメチル-2,3-ビス(オレイルオキシ)プロパン-1-アミニウム(DOBAQ)、1,2-ジステアロイル-3-ジメチルアンモニウム-プロパン(18:0 DAP)、1,2-ジパルミトイル-3-ジメチルアンモニウム-プロパン(16:0 DAP)、1,2-ジミリストイル-3-ジメチルアンモニウム-プロパン(14:0 DAP)、1,2-ジオレイル-

40

50

3 - ジメチルアンモニウム - プロパン (DODAP) (18 : 1 DAP)、1, 2 - ジミリストイル - 3 - トリメチルアンモニウム - プロパン (14 : 0 TAP)、1, 2 - ジバルミトイル - 3 - トリメチルアンモニウム - プロパン (16 : 0 TAP)、1, 2 - ステアロイル - 3 - トリメチルアンモニウム - プロパン (18 : 0 TAP)、1, 2 - ジオレオイル - 3 - トリメチルアンモニウム - プロパン (18 : 1 TAP (DOTAP))、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン (DOPE)、3 - [N - (N', N' - ジメチルアミノエタン) - カルバモイル] コレステロール塩酸塩 (DC - コレステロール・HCl)、DC - コレステロール、N4 - コレステリル - スペルミン (GL67)、1, 2 - ジオレイルオキシ - 3 - ジメチルアミノプロパン (DODMA)、ジミリストイルトリメチルアンモニウムプロパン (DMTAP)、2, 3, - ジオレイルオキシ - N - [2 (スペルミネカルボキサミド) エチル] - N, N - ジメチル - 1 - プロパントリフルオロアセテート (DOSPA)、N, N - ジオレイル - N, N - ジメチルアンモニウムクロリド (DODAC)、1, 2 - ジオレオイルカルバミル - 3 - ジメチルアンモニウム - プロパン (DOCDAP)、1, 2 - ジリネオイル - 3 - ジメチルアンモニウム - プロパン (DLINDAP)、ジラウリル (C₁₂ : 0) トリメチルアンモニウムプロパン (DLTAP)、ジオクタデシルアミドグリシルスペルミン (DOGS)、DC - Choi、1, 2 - ジミリスチルオキシプロピル - 3 - ジメチル - ヒドロキシエチルアンモニウムブロミド (DMRIE)、3 - ジメチルアミノ - 2 - (コレスト - 5 - エン - 3 - ベータ - オキシブタン - 4 - オキシ) - 1 - (シス, シス - 9, 12 - オクタデカジエノキシ) プロパン (CLINDMA)、2 - [5' - (コレスト - 5 - エン - 3 [ベータ] - オキシ) - 3' - オキサペントキシ) - 3 - ジメチル - 1 - (シス, シス - 9', 12' - オクタデカジエノキシ) プロパン (CpLINDMA)、および N, N - ジメチル - 3, 4 - ジオレイルオキシベンジルアミン (DMOBA)、および 1, 2 - N, N' - ジオレイルカルバミル - 3 - ジメチルアミノプロパン (DocarbDAP)、ならびにそれらの組み合わせおよび薬学的に許容される塩からなる群から選択される。

10

20

30

40

50

【0012】

特定の態様においては、カチオン性脂質は、DOTAPである。

【0013】

他の態様においては、本開示の保護対象は、本明細書に開示された方法により調製された核酸 / 脂質ナノ粒子を提供する。

【0014】

他の態様においては、本開示の保護対象は、血漿DNAを含む脂質ナノ粒子であって、約210nm ~ 約1,200nmの範囲を有する平均粒径を有するナノ粒子を提供する。

【0015】

他の態様においては、本開示の保護対象は、以下の1つまたは複数を含む、本明細書に開示された方法により調製された複数の核酸 / 脂質ナノ粒子の使用を提供する：

- (a) ウイルスベクター生産のための *in vitro* トランスフェクション、
- (b) 治療用細胞および遺伝子編集のための *ex vivo* トランスフェクション、
- (c) *in vivo* トランスフェクション、
- (d) 肝内注射、皮内注射、硝子体内注射、筋肉内注射、外耳道内注射、および腫瘍内注射などの *in vivo* 局所投与、ならびに
- (e) 鼻腔内送達、経口送達、および舌下送達などの組織特異的送達。

【0016】

態様によっては、ウイルスベクター生産のための *in vitro* トランスフェクションは、1つまたは複数の細胞を複数の核酸 / 脂質ナノ粒子に接触させることを含む。態様によっては、本使用は、複数の核酸 / 脂質ナノ粒子を、1つまたは複数の細胞の単層培養液または1つまたは複数の細胞の懸濁培養液に投与することを含む。

【0017】

特定の態様においては、1つまたは複数の細胞は、ウイルスパッキングHEK293細胞を含む。より特定の態様においては、1つまたは複数の細胞は、HEK293S細胞、

HEK 293 T細胞、HEK 293 F細胞、HEK 293 FT細胞、HEK 293 FTM細胞、HEK 293 SG細胞、HEK 293 SGGD細胞、HEK 293 H細胞、HEK 293 E細胞、HEK 293 MSR細胞、またはHEK 293 A細胞を含む。更により特定の態様においては、1つまたは複数の細胞は、HEK 293 T細胞を含む。なお更により特定の態様においては、1つまたは複数の細胞は、懸濁培養液に適したHEK 293 T細胞を含む。

【0018】

いくつかの態様においては、本方法は、肝細胞、ケラチノサイト、成体幹細胞および前駆細胞、多能性幹細胞、T細胞、NK細胞、ならびに腫瘍細胞の1つまたは複数を選択することを含む。

10

【0019】

本開示の保護対象により全体または一部において取り上げられている、本開示の保護対象のいくつかの態様が上述されたが、他の態様は、記載が進むにつれ、以下に最適に記載された添付の実施例および図面に関連して取り上げられたとき、明らかになるであろう。

【0020】

特許または出願ファイルは、少なくとも1つのカラー付きの図面を含む。カラー図面を有する本特許または特許出願文書のコピーは、請求および必要な手数料の支払いに応じて米国特許商標庁より提供される。

【0021】

このように、本開示の保護対象を一般的な用語で記載してきたが、次に、添付の図面を参照する。図面は必ずしも縮尺どおりに記載されていない。

20

【図面の簡単な説明】

【0022】

【図1】図1A、1B、1C、1D、1E、および1Fは、成長動態の制御により、約60nm~約1200nmのサイズを有するpDNA/脂質粒子のサイズ制御を行う本開示の方法を例示する。図1Aは、提案された合成過程の模式図である。図1Bは、小さな脂質ナノ粒子のビルディングブロックとして使用される、設計された脂質ナノ粒子(LNP)の製剤の詳細および特徴付けを示す。図1Cは、異なる極性の溶剤(すなわち、エタノールの濃度)の下、誘発された予測可能なサイズ成長を示す。エラーバーは、3つの独立した実験に由来する平均値の標準誤差を示す。図1Dは、異なる濃度のエタノールにより誘発された異なるNP比のLNPの予測可能なサイズ成長を示す。図1Eは、粒径成長が、55%のエタノールの成長曲線に沿った異なる時点でのH₂Oによる1対1の希釈により停止したことを示す。図1Fは、異なるサイズの一連の安定的な粒子の、DLSにより測定されたz平均直径分布を示す。エラーバーは、図1C、1D、および1Eの3つの独立した実験に由来する平均値の標準誤差を示す。

30

【図2】図2Aおよび2Bは、約60nm~約1200nmの制御されたサイズの安定的な粒子の*in vitro*トランスフェクション効率を示す。HEK 293 T細胞(図2A)またはHe pG2細胞(図2B)に対するレポーターとしてのルシフェラーゼの導入遺伝子発現の効率を示す。(n=4)。

【図3】図3A、3B、および3Cは、肝内注射による制御されたサイズの安定的なpDNA/脂質粒子の*in vivo*局所トランスフェクション効率を示す。図3Aは、肝内注射の代表的なスキームである。図3Bは、マウス1匹あたり3μgのDNAのナノ粒子の肝内注射後48時間の、健康なBALB/cマウスの肝臓における*in vivo*トランスフェクション効率を示す。図3Cは、収集された肝臓組織から更に作成された単細胞懸濁液であり、そのルシフェラーゼ活性が測定された。

40

【発明を実施するための形態】

【0023】

以下、本開示の保護対象について、本発明の全てではないが一部の実施形態が示されている添付の図面を参照して、より詳細に説明する。同一の数字は、全体を通して同一の要素を指す。本開示の保護対象は、多くの異なる形態で具体化されてよく、本明細書に記載

50

の実施形態に限定して解釈されるべきではない。むしろ、これらの実施形態は、本開示が適用される法的要件を満たすように提供される。実際、本明細書に記載の本開示の保護対象の多くの変更および他の実施形態は、前述の説明および関連図面に示された教示の利益を有する、本開示の保護対象が属する技術分野に精通している者であれば思い浮かぶであろう。そのため、本開示の保護対象は、開示された特定の実施形態に限定されず、変更および他の実施形態は、添付の特許請求の範囲に含まれることが意図されていることを理解されたい。

【0024】

いくつかの実施形態においては、本開示の保護対象は、*in vitro*および*in vivo*局所トランスフェクションにおける細胞の効率的なトランスフェクションに最適な粒径の核酸/脂質粒子を調製する方法を提供する。本方法は、粒子凝集の制御および成長停止を含む、核酸/脂質ナノ粒子集合の動態制御に基づいて、約50nm~1200nmの規定サイズの保存安定性がある粒子を調製する。50nm~1200nmのサイズ範囲の、異なる細胞株における核酸/脂質粒子媒介のトランスフェクションのサイズ依存特性ももたらされる。

10

【0025】

本開示の保護対象は、200nmより大きく、1.2μmまでのサイズ範囲に対する、サイズ依存のトランスフェクションの最初の体系的調査を示す。これまでに、このサイズ範囲内のDNA/脂質粒子は、*in vivo*適用への関心が限られていたため、十分に研究されてこなかった。DNA/脂質粒子のサイズ効果をよく理解するため、本開示の保護対象は、DNA/脂質粒子凝集およびサイズ成長動態の予測可能な性質を示す。本開示の方法は、210~1200nm内でサイズをより高度に制御されたDNA/脂質粒子を生産する拡張可能な方法を提供する。さらに、本方法は、汎用性が高く、さまざまな組成のDNA/脂質粒子を生産するように調整されうる。

20

【0026】

本開示のDNA/脂質粒子は、優れたかつ再現性のあるトランスフェクション活性および保存安定性を生み出し、オフザシェルフ製品として使用されうる。このDNA/脂質粒子製剤は、ウイルス製造過程を含む細胞トランスフェクション過程を大幅に簡略化し、合理化することができる。加えて、本方法は、トランスフェクション剤としてのDNA/脂質粒子の品質管理が向上することにより、細胞およびウイルスベクターの生産品質および一貫性を改善する。本開示のDNA/脂質粒子は、さまざまなスケールのウイルスベクターの生産のためのプロセス工学において、広範囲の用途を見出すと予想される。他の潜在的な有用性としては、再生医療および免疫療法のための細胞の*ex vivo*トランスフェクション、ならびに*in vivo*遺伝子治療が挙げられる。

30

【0027】

本開示のサイズが規定されたナノ粒子は、ウイルス生産または細胞治療のための細胞の*in vitro*および*ex vivo*局所的トランスフェクション、ならびに肝細胞、ケラチノサイト、成体幹細胞および前駆細胞、多能性幹細胞、T細胞、NK細胞、および腫瘍細胞のトランスフェクションを含む、*in vivo*局所的トランスフェクションに対する有用性を潜在的に見出しうる。

40

【0028】

いくつかの実施形態においては、本開示の保護対象は、210~1200nmの平均粒径および0.05~0.5の多分散性指数を有する複数の核酸/脂質粒子を調製する方法であって、

(a) 20~200nmの第1の粒径を有する複数の核酸/脂質ナノ粒子を含む第1の溶液を調製または提供することと、

(b) 第1の溶液の極性を80の誘電率から約45~60に減少させ、第1の粒径を有する複数の核酸/脂質ナノ粒子の粒径成長を誘発し、210nm~1200nmの範囲にある第2の粒径を有する複数の核酸/脂質ナノ粒子を含む第2の溶液を形成することと、

(c) 約65~80の誘電率の第2の溶液の極性を反転させ、第2の粒径を有する複数

50

の核酸/脂質ナノ粒子の成長を所定の粒径で停止させ、210~1200nmの規定の粒径および0.1~0.3の多分散性指数を有する複数の核酸/脂質粒子を形成することを含む方法を提供する。

【0029】

実施形態によっては、第1の粒径は、約40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、および120nmを含む、約40nm~約120nmの範囲を有する。より特定の実施形態においては、第1の粒径は、約60nmである。

【0030】

実施形態によっては、第2の粒径は、約210nm~約1,200nmの範囲を有する。特定の実施形態においては、第2の粒径は、約210、300、400、500、600、700、800、900、1000、1100、および1200nmからなる群から選択される。 10

【0031】

実施形態によっては、第1の溶液は、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、および Fe^{3+} からなる群から選択される1つまたは複数の多価陽イオンを更に含む。

【0032】

実施形態によっては、第1の溶液の極性は、第1の溶液に水混和性有機溶剤を追加することにより低下する。特定の実施形態においては、本方法は、さまざまな濃度の水混和性有機溶剤を第1の溶液に追加し、第1の粒径を有する複数の核酸/脂質ナノ粒子の粒径成長を制御することを含む。より特定の実施形態においては、水混和性有機溶剤は、エタノール、メタノール、ブタノール、イソプロパノール、ジメチルスルホキシド(DMSO)、ジメチルホルムアミド(DMF)、テトラヒドロフラン(THF)、アセトン、およびアセトニトリルからなる群から選択される。 20

【0033】

実施形態によっては、第2の溶液の極性は、 H_2O による希釈により反転する。

【0034】

実施形態によっては、第1の粒径を有する複数の核酸/脂質ナノ粒子を含む第1の溶液は、継続的なフラッシュナノ複合体形成(FNC)技術により調製される。他の実施形態においては、第1の粒径を有する複数の核酸/脂質ナノ粒子を含む第1の溶液は、手動のピペット混合およびボルテックス(vertexing)法により調製される。特定の実施形態においては、本方法は、約100 $\mu g/mL$ の入力核酸濃度を含む。 30

【0035】

実施形態によっては、核酸は、アンチセンスオリゴヌクレオチド、cDNA、ゲノムDNA、ガイドRNA、プラスミドDNA、ベクターDNA、mRNA、miRNA、piRNA、shRNA、およびsiRNAからなる群から選択される。特定の実施形態においては、核酸は、プラスミドDNA(pDNA)または異なる種のプラスミドDNAの混合物を含む。更により特定の実施形態においては、核酸は、血漿DNAを含む。

【0036】

実施形態によっては、本開示の核酸/脂質粒子は、異なる電荷特性の1つまたは複数の脂質により調製される。いくつかの実施形態においては、1つまたは複数の脂質は、正電荷脂質、中性脂質、負電荷脂質、ペグ化脂質、およびイオン化脂質から選択される。 40

【0037】

実施形態によっては、核酸/脂質ナノ粒子は、カチオン性脂質を含む。

【0038】

カチオン性脂質は、DNAまたはRNAなどの、アニオン核酸との凝集複合体を形成する能力を有する。これらの凝集したリポソーム構造は、生理的pHで正の表面電荷を有する。正の電荷を持つ表面は、アニオン核酸と細胞膜との相互作用を仲介し、リポソームを細胞膜と区別することができないため、アニオン核酸の細胞への導入を可能にする。カチオン性脂質媒介のトランスフェクションの利点としては、高い効率性、広範囲の細胞型を 50

トランスフェクトする能力、再現性、低毒性、および単純さが挙げられる。

【0039】

好適なカチオン性脂質としては、多価カチオン性脂質、例えば、N1 - [2 - ((1 S) - 1 - [(3 - アミノプロピル) アミノ] - 4 - [ジ (3 - アミノ - プロピル) アミノ] ブチルカルボキサミド) エチル] - 3 , 4 - ジ [オレイルオキシ] - ベンズアミド、1 , 2 - ジ - O - オクタデセニル - 3 - トリメチルアンモニウムプロパン (DOTMA)、O - アルキルホスファチジルコリン、例えば、以下を含むエチルホスホコリン (EPC) : 1 , 2 - ジラウロイル - sn - グリセロ - 3 - エチルホスホコリン (12 : 0 EPD)、1 , 2 - ジミリストイル - sn - グリセロ - 3 - エチルホスホコリン (14 : 0 EPC)、1 , 2 - ジパルミトイル - sn - グリセロ - 3 - エチルホスホコリン (16 : 0 EPC)、1 , 2 - ジステアロイル - sn - グリセロ - 3 - エチルホスホコリン (18 : 0 EPC)、1 , 2 - ジオレオイル - sn - グリセロ - 3 - エチルホスホコリン (18 : 1 EPC)、1 - パルミトイル - 2 - オレオイル - sn - グリセロ - 3 - エチルホスホコリン (16 : 0 - 18 : 1 EPC)、および 1 , 2 - ジミリストレオイル - sn - グリセロ - 3 - エチルホスホコリン (14 : 1 EPC)、ジメチルジオクタデシルアンモニウム (DDAB)、pH感受性カチオン性脂質、例えば、N - (4 - カルボキシベンジル) - N , N - ジメチル - 2 , 3 - ビス (オレオイルオキシ) プロパン - 1 - アミニウム (DOBAQ)、1 , 2 - ジステアロイル - 3 - ジメチルアンモニウム - プロパン (18 : 0 DAP)、1 , 2 - ジパルミトイル - 3 - ジメチルアンモニウム - プロパン (16 : 0 DAP)、1 , 2 - ジミリストイル - 3 - ジメチルアンモニウム - プロパン (14 : 0 DAP)、1 , 2 - ジオレオイル - 3 - ジメチルアンモニウム - プロパン (DO DAP) (18 : 1 DAP)、1 , 2 - ジミリストイル - 3 - トリメチルアンモニウム - プロパン (14 : 0 TAP)、1 , 2 - ジパルミトイル - 3 - トリメチルアンモニウム - プロパン (16 : 0 TAP)、1 , 2 - ステアロイル - 3 - トリメチルアンモニウム - プロパン (18 : 0 TAP)、1 , 2 - ジオレオイル - 3 - トリメチルアンモニウム - プロパン (18 : 1 TAP (DOTAP))、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン (DOPE)、3 - [N - (N ' , N ' - ジメチルアミノエタン) - カルバモイル] コレステロール塩酸塩 (DC - コレステロール・HCl)、DC - コレステロール、N4 - コレステリル - スペルミン (GL67)、1 , 2 - ジオレイルオキシ - 3 - ジメチルアミノプロパン (DODMA)、ジミリストイルトリメチルアンモニウムプロパン (DM TAP)、2 , 3 , - ジオレイルオキシ - N - [2 (スペルミネカルボキサミド) エチル] - N , N - ジメチル - 1 - プロパントリフルオロアセテート (DOSPA)、N , N - ジオレイル - N , N - ジメチルアンモニウムクロリド (DODAC)、1 , 2 - ジオレオイルカルバミル - 3 - ジメチルアンモニウム - プロパン (DOCDAP)、1 , 2 - ジリネオイル - 3 - ジメチルアンモニウム - プロパン (DLINDAP)、ジラウリル (C_{12:0}) トリメチルアンモニウムプロパン (DL TAP)、ジオクタデシルアミドグリシルスペルミン (DOGS)、DC - Choi、1 , 2 - ジミリスチルオキシプロピル - 3 - ジメチル - ヒドロキシエチルアンモニウムプロミド (DMRIE)、3 - ジメチルアミノ - 2 - (コレスト - 5 - エン - 3 - ベータ - オキシブタン - 4 - オキシ) - 1 - (シス , シス - 9 , 12 - オクタデカジエノキシ) プロパン (CLINDMA)、2 - [5 ' - (コレスト - 5 - エン - 3 [ベータ] - オキシ) - 3 ' - オキサベントキシ) - 3 - ジメチル - 1 - (シス , シス - 9 ' , 12 ' - オクタデカジエノキシ) プロパン (CpLINDMA)、および N , N - ジメチル - 3 , 4 - ジオレイルオキシベンジルアミン (DMOBA)、および 1 , 2 - N , N ' - ジオレイルカルバミル - 3 - ジメチルアミノプロパン (DOcarbDAP)、ならびにそれらの薬学的に許容される塩が挙げられるが、これらに限定されない。特定の実施形態においては、カチオン性脂質は、DOTAPである。

【0040】

本明細書において使用されるとき、用語「塩 (salt)」または「塩 (salts)」は、本発明の化合物の酸添加を指す。「塩」は、特に「薬学的に許容される塩」を含む。用語「薬学的に許容される塩」は、生物学的効果およびカチオン性脂質の特性を保持し

、典型的に、生物学的にまたはその他の点で望ましくないことはない塩を指す。多くの場合、カチオン性脂質は、アミノ基および/もしくはカルボキシル基またはそれらに類似した基の存在により、酸性塩および/または塩基塩を形成することができる。

【0041】

薬学的に許容される酸付加塩は、無機酸および有機酸、例えば、酢酸塩、アスパラギン酸塩、安息香酸塩、ベシル酸塩、臭化物/臭化水素酸塩、炭酸水素塩/炭酸塩、重硫酸塩/硫酸塩、カンファースルホン酸塩、塩化物/塩酸塩、クロルテオフィロン酸塩、クエン酸塩、エタンジスルホン酸塩、フマル酸塩、グルセプト酸塩、グルコン酸塩、グルクロン酸塩、馬尿酸塩、ヨウ化水素酸塩/ヨウ化物、イセチオン酸塩、乳酸塩、ラクトピオン酸塩、ラウリル硫酸塩、リンゴ酸塩、マレイン酸塩、マロン酸塩、マンデル酸塩、メシル酸塩、メチル硫酸塩、ナフトエ酸塩、ナプシル酸塩、ニコチン酸塩、硝酸塩、オクタデカン酸塩、オレイン酸塩、シュウ酸塩、パルミチン酸塩、パモ酸塩、リン酸塩/リン酸水素塩/リン酸二水素塩、ポリガラクツロン酸塩、プロピオン酸塩、ステアリン酸塩、コハク酸塩、スルホサリチル酸塩、酒石酸塩、トシル化物、およびトリフルオロ酢酸塩により形成されうる。

10

【0042】

塩が得られる無機酸としては、例えば、塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸、等が挙げられる。塩が得られる有機酸としては、例えば、酢酸、プロピオン酸、グリコール酸、シュウ酸、マレイン酸、マロン酸、コハク酸、フマル酸、酒石酸、クエン酸、安息香酸、マンデル酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、トルエンスルホン酸、スルホサリチル酸、等が挙げられる。

20

【0043】

薬学的に許容される塩基付加塩は、無機塩基および有機塩基により形成されうる。

【0044】

塩が得られる無機塩基としては、例えば、アンモニウム塩および周期表の列I~XIIの金属が挙げられる。実施形態によっては、塩は、ナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、マグネシウム、鉄、銀、亜鉛、および銅に由来する。特に好適な塩としては、アンモニウム塩、カリウム塩、ナトリウム塩、カルシウム塩、およびマグネシウム塩が挙げられる。塩が得られる有機塩基としては、例えば、一級、二級、および三級アミン、自然発生の置換アミンを含む置換アミン、環状アミン、塩基イオン交換樹脂、等が挙げられる。特定の有機アミンとしては、イソプロピルアミン、ベンザチン、コリネート(c h o l i n a t e)、ジエタノールアミン、ジエチルアミン、リジン、メグルミン、ピペラジン、およびトロメタミンが挙げられる。

30

【0045】

追加的な好適な塩の一覧は、例えば、「Remington's Pharmaceutical Sciences」、第20版、Mack Publishing Company、Easton、Pa.、(1985)；ならびにStahlおよびWermuthによる「Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use」(Wiley-VCH、Weinheim、ドイツ、2002)に見出すことができる。代表的な薬学的に許容される塩としては、塩化物、臭化物、トリフレート(トリフルオロメタンスルホン酸)、メチル硫酸塩、塩酸塩、トリフルオロ酢酸塩、等が挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0046】

他の実施形態においては、本開示の保護対象は、本明細書に開示された方法により調製された核酸/脂質ナノ粒子を提供する。

【0047】

他の実施形態においては、本開示の保護対象は、血漿DNAを含む脂質ナノ粒子であって、約210nm~約1,200nmの範囲を有する平均粒径を有するナノ粒子を提供する。

50

【0048】

他の実施形態においては、本開示の保護対象は、以下の1つまたは複数を含む、本明細書に開示された方法により調製された複数の核酸/脂質ナノ粒子の使用を提供する：

- (a) ウイルスベクター生産のための *in vitro* トランスフェクション、
- (b) 治療用細胞および遺伝子編集のための *ex vivo* トランスフェクション、
- (c) *in vivo* トランスフェクション、
- (d) 肝内注射、皮内注射、硝子体内注射、筋肉内注射、外耳道内注射、および腫瘍内注射などの *in vivo* 局所投与、ならびに
- (e) 鼻腔内送達、経口送達、および舌下送達などの組織特異的送達。

【0049】

実施形態によっては、ウイルスベクター生産のための *in vitro* トランスフェクションは、1つまたは複数の細胞を複数の核酸/脂質ナノ粒子に接触させることを含む。実施形態によっては、本使用は、複数の核酸/脂質ナノ粒子を、1つまたは複数の細胞の単層培養液または1つまたは複数の細胞の懸濁培養液に投与することを含む。

【0050】

本明細書において検討されるナノ粒子によるトランスフェクションに適した細胞の実例としては、CHO細胞、BHK細胞、MDCK細胞、C3H 10T1/2細胞、FLY細胞、Psi-2細胞、BOSC 23細胞、PA317細胞、WEHI細胞、COS細胞、BSC 1細胞、BSC 40細胞、BMT 10細胞、VERO細胞、W138細胞、MRC5細胞、A549細胞、HT1080細胞、293細胞、B-50細胞、3T3細胞、NIH3T3細胞、HepG2細胞、Saos-2細胞、Huh7細胞、HeLa細胞、W163細胞、211細胞、211A細胞、またはそれらの誘導体が挙げられるが、これらに限定されない。

【0051】

特定の実施形態においては、1つまたは複数の細胞は、ウイルスパッケージングHEK 293細胞を含む。より特定の実施形態においては、1つまたは複数の細胞は、HEK 293S細胞、HEK 293T細胞、HEK 293F細胞、HEK 293FT細胞、HEK 293FTM細胞、HEK 293SG細胞、HEK 293SGGD細胞、HEK 293H細胞、HEK 293E細胞、HEK 293MSR細胞、またはHEK 293A細胞を含む。更により特定の実施形態においては、1つまたは複数の細胞は、HEK 293T細胞を含む。なお更により特定の実施形態においては、1つまたは複数の細胞は、懸濁培養液に適したHEK 293T細胞を含む。

【0052】

いくつかの実施形態においては、ウイルスベクターは、レトロウイルスベクターである。本明細書において検討される、特定の実施形態での使用に適したレトロウイルスベクターの実例としては、モロニー Maus 白血病ウイルス (M-MuLV)、モロニー Maus 肉腫ウイルス (MoMSV)、ハーベイ Maus 肉腫ウイルス (HaMuSV)、マウス乳癌ウイルス (MuMTV)、テナガザル白血病ウイルス (GaLV)、ネコ白血病ウイルス (FLV)、スプーマウイルス、フレンド Maus 白血病ウイルス、マウス幹細胞ウイルス (MSCV)、およびラウス肉腫ウイルス (RSV)、ならびにレンチウイルスに由来するベクターが挙げられるが、これらに限定されない。

【0053】

好適な実施形態においては、ウイルスベクターは、レンチウイルスベクターである。本明細書において検討される、特定の実施形態での使用に適したレンチウイルスベクターの実例としては、HIV (ヒト免疫不全ウイルス; 1型HIVおよび2型HIVを含む)、ビスナマエディウイルス (VMV)、ヤギ関節炎脳炎ウイルス (CAEV)、ウマ伝染性貧血ウイルス (EIAV)、ネコ免疫不全ウイルス (FIV)、ウシ免疫不全ウイルス (BIV)、およびサル免疫不全ウイルス (SIV) に由来するベクターが挙げられるが、これらに限定されない。

【0054】

10

20

30

40

50

より好適な実施形態においては、レンチウイルスベクターは、1型HIVまたは2型HIVに由来する。

【0055】

特定の実施形態においては、トランスファープラスミドは、左(5')レンチウイルスLTRと、Psiパッケージ配列(+)と、セントラルポリプリントラクト/DNAフラップ(cPPT/FLAP)と、Rev応答配列(RRE)と、治療導入遺伝子をコードするポリヌクレオチドに操作可能に連結されたプロモーターと、右(3')レンチウイルスLTRとを含むレンチウイルスベクターをコードする。レンチウイルスベクターは、ポリアデニル化配列、インシュレーター、ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント(WPRE)、B型肝炎ウイルス(HPRE)、等を含むがこれらに限定されるものではない転写後調節エレメントを任意に含んでよい。

10

【0056】

特定の実施形態においては、トランスファープラスミドは、異種プロモーターを含む修飾左(5')レンチウイルスLTRと、Psiパッケージ配列(+)と、セントラルポリプリントラクト/DNAフラップ(cPPT/FLAP)と、Rev応答配列(RRE)と、治療導入遺伝子をコードするポリヌクレオチドに操作可能に連結されたプロモーターと、修飾(3')レンチウイルスLTRとを含むレンチウイルスベクターをコードする。

【0057】

特定の実施形態においては、トランスファープラスミドは、修飾5'LTRを含むレンチウイルスベクターをコードし、ここで、5'LTRのU3領域は、異種プロモーターに置き換えられ、ウイルス粒子の生産中にウイルスゲノムの転写を推進する。使用されうる異種プロモーターの例としては、例えば、ウイルスサルウイルス40(SV40)(例えば、初期または後期)、サイトメガロウイルス(CMV)(例えば、前初期)、モロニー Maus 白血病ウイルス(MoMLV)、ラウス肉腫ウイルス(RSV)、および単純ヘルペスウイルス(HSV)(チミジンキナーゼ)プロモーターが挙げられる。

20

【0058】

特定の実施形態においては、トランスファープラスミドは、ウイルスベクター複製を不完全にする修飾自己不活型(SIN)3'LTRを含むレンチウイルスベクターをコードする。SINベクターは、3'LTRのU3領域の1つまたは複数の修正を含み、1回目のウイルス複製より後のウイルス転写を防止する。これは、右(3')LTR U3領域が、ウイルス複製中に左(5')LTR U3領域のテンプレートとして使用されるため、ウイルス転写物がU3エンハンサー-プロモーターなしでは作成できないからである。特定の実施形態においては、3'LTRは、U3領域が削除され、Rおよび/またはU5領域が、例えば、異種または合成ポリ(A)配列、1つまたは複数のインシュレーターエレメント、および/または誘導性プロモーターにより置き換えられるように修飾される。

30

【0059】

特定の実施形態においては、1つまたは複数のpDNAは、パッケージ可能なウイルスベクターゲノムと、gag、pol、env、tat、rev、vif、vpr、vpu、vpx、およびnefからなる群から選択されるウイルス構造/アクセサリタンパク質の1つまたは複数とを含むトランスファープラスミドをコードする。好適な実施形態においては、ウイルス構造/アクセサリタンパク質は、gag、pol、env、tat、およびrevからなる群から選択される。より好適な実施形態においては、ウイルス構造/アクセサリタンパク質は、gag、pol、env、およびrev、またはgag、pol、およびenvからなる群から選択される。

40

【0060】

ウイルスエンベロープタンパク質(env)は、最終的に細胞株から生成された組換えレトロウイルスに感染して形質転換されうる宿主細胞の範囲を判定する。1型HIV、2型HIV、SIV、FIV、およびEIVなどのレンチウイルスの場合、Envタンパク質は、gp41およびgp120を含む。

【0061】

50

本発明において用いられうる Env 遺伝子の実例としては、MLVエンベロープ、10
 A1エンベロープ、BAEV、FeLV-B、RD114、SSAV、Ebola、Sendai、FPV（家禽ペストウイルス）、およびインフルエンザウイルスエンベロープ
 が挙げられるが、これらに限定されない。同様に、RNAウイルス（例えば、ピコルナウ
 イルス科、カリシウイルス科（Calciviridae）、アストロウイルス科、トガ
 ウイルス科、フラビウイルス科、コロナウイルス科、パラミクソウイルス科、ラブドウイ
 ルス科、フィロウイルス科、オルトミクソウイルス科、ブニヤウイルス科、アレナウイ
 ルス科、レオウイルス科、ビルナウイルス科、レトロウイルス科のRNAウイルスファミリ
 ー）のエンベロープ、およびDNAウイルス（ヘパドナウイルス科、サーコウイルス科、
 パルボウイルス科、パポバウイルス科、アデノウイルス科、ヘルペスウイルス科、ポック
 スウイルス科（Poxviridae）、およびイリドウイルス科のファミリー）のエン
 ベロープをコードする遺伝子が利用されてよい。代表的な例としては、FeLV、VEE
 、HFVW、WDSV、SFV、狂犬病、ALV、BIV、BLV、EBV、CAEV、
 SNV、ChTLV、STLV、MPMV、SMRV、RAV、FUSV、MH2、AE
 V、AMV、CT10、およびEIAVが挙げられる。

10

【0062】

他の実施形態においては、特定の実施形態での使用に適したEnvタンパク質としては
 、以下のウイルスのいずれか：A型インフルエンザ、例えば、H1N1、H1N2、H3
 N2、およびH5N1（鳥インフルエンザ）、B型インフルエンザ、C型インフルエンザ
 ウイルス、A型肝炎ウイルス、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、D型肝炎ウイルス
 、E型肝炎ウイルス、ロタウイルス、ノーウォークウイルス群のいずれかのウイルス、腸
 管アデノウイルス、パルボウイルス、デング熱ウイルス、サル痘、モノネガウイルス目、
 リッサウイルス、例えば、狂犬病ウイルス、ラゴスコウモリウイルス、モコラウイルス、
 デュベンヘイジウイルス、ヨーロッパコウモリウイルス1&2、およびオーストラリアコ
 ウモリウイルス、エフェメロウイルス、ベジクロウイルス、水疱性口内炎ウイルス（VSV）
 、ヘルペスウイルス、例えば、1型および2型単純ヘルペスウイルス、水痘帯状疱疹
 、サイトメガロウイルス、エプスタインバーウイルス（EBV）、ヒトヘルペスウイルス
 （HHV）、6型および8型ヒトヘルペスウイルス、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、
 パピローマウイルス、マウスガンマヘルペスウイルス、アレナウイルス、例えば、アルゼ
 ンチン出血熱ウイルス、ポリビア出血熱ウイルス、サビア関連出血熱ウイルス、ベネズエ
 ラ出血熱ウイルス、ラッサ熱ウイルス、マチュポウイルス、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイル
 ス（LCMV）、ブニヤウイルス科（Bunyaviridae）、例えば、クリミア
 コンゴ出血熱ウイルス、ハンタウイルス、腎症候性出血熱ウイルス、リフトバレー熱ウイ
 ルス、エボラ出血熱およびマールブルグ出血熱を含むフィロウイルス科（フィロウイルス
 ）、キャサヌル森林病ウイルス、オムスク出血熱ウイルス、ダニ媒介脳炎ウイルスを含む
 フラビウイルス科、およびパラミクソウイルス科、例えば、ヘンドラウイルスおよびニパ
 ウイルス、大痘瘡および小痘瘡（天然痘）、アルファウイルス、例えば、ベネズエラウマ
 脳炎ウイルス、東部ウマ脳炎ウイルス、西部ウマ脳炎ウイルス、SARS関連コロナウイ
 ルス（SARS-CoV）、ウエストナイルウイルス、いずれかの脳炎（encephal
 ilitis）ウイルスが挙げられるが、これらに限定されない。

20

30

40

【0063】

好適な実施形態においては、Env遺伝子は、VSV-Gエンベロープ糖タンパク質を
 コードする。

【0064】

いくつかの好適な実施形態においては、本明細書において検討されるpDNA/PEI
 複合体は、異種プロモーターを含む修飾左（5'）レンチウイルスLTRと、Psiパッ
 ケージ配列（+）と、cPPT/FLAPと、RREと、治療導入遺伝子をコードする
 ポリヌクレオチドに操作可能に連結されたプロモーターと、修飾SIN（3'）レンチウ
 イルスLTRとを含むレンチウイルスベクターをコードするトランスファープラスミド；
 レンチウイルスgag/polをコードするプラスミド、revをコードするプラスミド

50

、およびEnv遺伝子をコードするプラスミド、好ましくはVSV-Gエンベロープ糖タンパク質を含む。

【0065】

長年の特許法の慣例に従い、「a」、「an」、および「the」という用語は、特許請求の範囲を含めて、本願において使用されるとき、「1つまたは複数」を指す。従って、例えば、「対象(a subject)」への言及は、文脈が明らかに反対の場合(例えば、複数の対象(a plurality of subjects))等を除き、複数の対象を含む。

【0066】

多くの実施形態において本開示の方法によって処置される「対象」は、望ましくはヒト対象であるが、本明細書に記載の方法は、「対象」という用語に含まれることが意図されている全ての脊椎動物種に関して有効であることを理解されたい。従って、「対象」には、既存の病態もしくは疾患の治療、または病態もしくは疾患の発症を予防するための予防的治療など、医療目的のヒト対象、または医療目的、獣医学目的、もしくは開発目的の動物対象を含みうる。好適な動物対象としては、霊長類、例えば、ヒト、サル、類人猿、等；ウシ(bovine)、例えば、ウシ(cattle)、雄ウシ(oxen)、等；ヒツジ(ovine)、例えば、ヒツジ(sheep)等；ヤギ(caprine)、例えば、ヤギ(goat)等；ブタ(porcine)、例えば、ブタ(pig)、雄ブタ(hog)、等；ウマ(equine)、例えば、ウマ(horse)、ロバ、シマウマ、等；野生のネコ(cat)および飼いネコ(cat)を含むネコ(feline)；イヌ(dog)を含むイヌ(canine)；ウサギ(rabbit)、ノウサギ(hare)、等を含むウサギ類(lagomorph)；およびマウス、ラット、等を含むげっ歯類を含むがこれらに限定されるものではない哺乳類が挙げられる。動物は、遺伝子導入動物であってよい。いくつかの実施形態においては、対象は、胎児、新生児、乳児、若年、および成人対象を含むがこれらに限定されるものではないヒトである。さらに、「対象」には、病態もしくは疾患に罹患している、または罹患している疑いのある患者を含みうる。したがって、本明細書では、「対象」および「患者」という用語は互換的に使用される。「対象」という用語は、対象の生物、組織、細胞、または細胞の集合体も指す。

【0067】

概して、活性薬剤または薬物送達デバイスの「有効な量」とは、所望の生物学的反応を誘発するのに必要な量を指す。当業者には理解されるように、薬剤またはデバイスの有効な量は、所望の生物学的エンドポイント、送達される薬剤、医薬組成物の構成、標的組織などの因子に応じて変化しうる。

【0068】

本明細書および特許請求の範囲全体を通して、「含む(comprise)」、「含む(comprises)」、および「含む(comprising)」という用語は、文脈上別段の意味を有する場合を除き、非排他的な意味で使用される。同様に、「含む(include)」という用語およびその文法的変形は、非限定的であることを意図しており、リスト内の項目の列記は、リスト化された項目に置換または追加されうる他の同様の項目を排除するものではない。

【0069】

本明細書および添付の特許請求の範囲において、別段の指示がない限り、本明細書および特許請求の範囲において使用される量、サイズ、寸法、比率、形状、公式化、パラメーター、パーセンテージ、数量、特性、および他の数値を表す全ての数は、「約」という用語が値、量、または範囲とともに明示的に表示されなくても、全ての場合において「約」という用語によって修飾されるものと理解される。従って、反対の指示がない限り、以下の明細書および添付の特許請求の範囲に記載される数値パラメーターは、正確ではなく、正確である必要はないが、本開示の保護対象により得ようとする所望の特性に応じて、公差、換算係数、四捨五入、測定誤差など、および当業者に公知の他の要因を反映して、近似値とするおよび/または所望により大きくまたは小さくすることができる。例えば、値

10

20

30

40

50

について言及するとき、「約」という用語は、開示される方法を実施するため、または開示される組成を使用するために適切であるような、いくつかの実施形態においては $\pm 10\%$ 、いくつかの実施形態においては $\pm 50\%$ 、いくつかの実施形態においては $\pm 20\%$ 、いくつかの実施形態においては $\pm 10\%$ 、いくつかの実施形態においては $\pm 5\%$ 、いくつかの実施形態においては $\pm 1\%$ 、いくつかの実施形態においては $\pm 0.5\%$ 、およびいくつかの実施形態においては $\pm 0.1\%$ の規定量からの変動を包含することを意味する。

【0070】

さらに、1つまたは複数の数または数値範囲に関連して使用されるとき、用語「約」は、範囲内の全ての数を含む、そのような全ての数値を指すと理解されるべきであり、記載された数値の上下に境界を拡張することによってその範囲を修正する。端点による数値範囲の記載には、その範囲に組み込まれる全ての数、例えば、その分数を含む全整数（例えば、1~5という記載には、1、2、3、4、および5、ならびにその分数、例えば、1.5、2.25、3.75、4.1、等が含まれる）、およびその範囲内の任意の範囲が含まれる。

10

【実施例】

【0071】

以下の実施例は、本開示の保護対象の代表的な実施形態を実施するための指針を当業者に提供するために含まれる。本開示および当該技術分野における一般的な技術水準に照らして、当業者であれば、以下の実施例は例示的なものであることのみを意図しており、本開示の保護対象の範囲から逸脱することなく、多数の変更、修正、および改変が採用されることが理解できる。以下の総合的な説明および具体例は、例示を目的としたものであり、他の方法によって本開示の化合物を製造することを任意の方法で限定するものと解釈されるものではない。

20

【0072】

（実施例1）

1.1 概要

本開示の保護対象は、ビルディングブロックである60nmのLNPを使用してサイズが制御され、安定的なpDNA/脂質粒子(200nm~1200nm)を生成する動力学的に制御されたアプローチを提供する。これらの粒子の平均サイズが、*in vitro*および*in vivo*の両方の高いトランスフェクション効率を達成する際の決定要素であることが特定されている。*in vitro*トランスフェクションの場合、60nmのLNPと比較して、1200nmのLNPのトランスフェクション効率は、HEK293T細胞およびHepG2肝臓がん細胞に対して、それぞれ、111倍および44倍高い。加えて、pDNA/脂質粒子のサイズが、肝内注射による*in vivo*局所トランスフェクションの効率に対する主要な決定要因として特定された。本開示のサイズが制御されたLNPは、ウイルスベクターの生産および遺伝子治療の両方のプロセス工学において、広範囲の用途を見出すであろう。

30

【0073】

1.2 代表的な結果

40

1.2.1 40~1000nmの範囲に制御されたサイズの安定的なpDNA/PEI粒子の生産

いくつかの実施形態においては、本開示の保護対象は、pDNA/脂質粒子系の動態成長の特徴に基づくボトムアップの集合戦略を提供する(図1A)。第1に、均一で小さなLNPが調製された。これらのLNPは、疎水性効果により、安定的で、凝縮されていた。均一で小さなLNPは、続いて、より大きな粒子に対するビルディングブロックとして使用された。第2に、水混和性有機溶剤、例えば、エタノール、メタノール、ブタノール、イソプロパノール、DMSO、DMF、THF、アセトン、アセトニトリル、等を追加して溶液の極性を調整することにより、pDNA/脂質粒子表面の動態安定性は、十分に除かれることになる。この時点で、粒子会合および凝集が可能になり、粒子はゆ

50

っくりと成長した。この過程は、例えば、 H_2O による希釈で溶液の極性を反転させることにより、所望の粒径に達したときに効果的に停止させることができる。

【0074】

第1のステップ中、高流量の乱流混合を誘発する閉じ込め衝突ジェット(CIJ)ミキサーを使用したフラッシュナノ複合体形成(FNC)技術を使用して、均一で小さなpDNA/脂質ナノ粒子が合成された。フラッシュナノ複合体形成技術は、アニオン核酸溶液、例えば、pDNA溶液と、カチオン性脂質溶液との混合を加速させ、マイクロチェンバ内の乱流混合によりPEC集合動態を一致させるために使用されうる動力学的に制御された混合過程である。これにより、ナノ粒子サイズ、組成、およびpDNAペイロードの同調性により示されるような、pDNA/脂質ナノ粒子集合に対する動態条件の明示制御が成し遂げられる。Heら(2018)、および2020年11月5日に公開された、Compositionally Defined Plasmid DNA/Polycation Nanoparticles and Methods for Making the Sameと題する国際PCT特許出願公開第WO2020223323号(Maora)を参照のこと。これらは、それぞれ、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

10

【0075】

100 $\mu g/mL$ の入力pDNA濃度を有し、設計されたナノ粒子は、DLSにより測定された60 nmの平均サイズを有した(図1B)。このアプローチは、ピペット混合およびボルテックス(vertexing)による小さなバッチスケールにおいて試験された。異なる量のエタノールによるチャレンジにより、ゆっくりとしたサイズ成長過程が引き起こされ、エタノールの最終濃度により、成長率が判定された(図1C)。エタノールの濃度を調整することにより、負の電荷を持つ核酸リン酸(P)基に対する正の電荷を持つポリマーアミン(N=窒素)基の比率(N/P比)が異なるLNPが、同様のサイズ成長動態プロファイルを有する(図1D)。室温で40~70%のエタノール(60~40程度の混合物の誘電率)により開始し、成長経路に沿った異なる時点で懸濁液を同量の H_2O と混合することにより成長を停止させることにより、高い一貫性を有して(図1F)、平均粒径を200 nm、300 nm、400 nm、500 nm、600 nm、800 nm、および1200 nmで(図1E)安定化させることに成功した。これらの特定の粒径は、原理の証明として意図的に選択された。任意の他の所望のサイズも、異なる時点で成長を停止させることにより容易に得られる。

20

30

【0076】

このアプローチの包括的性質に基づいて、異なる所望のサイズで異なる組成を有するpDNA/脂質粒子が得られる。

【0077】

1.2.2 制御されたサイズの安定的なpDNA/脂質粒子の*in vitro*トランスフェクション効率

安定的な粒子が、HEK293T細胞およびHepG2細胞の単層培養液に投与され、レポーターとしてのルシフェラーゼをコードするpDNAを使用して、トランスフェクション効率が試験された。投与溶液は希釈され、トランスフェクション実験のための1 μg pDNA/mLの作業濃度が得られた。ルシフェラーゼ活性読み出し(図2A、図2B)により、60 nmのLNPと比較して、1200 nmのLNPのトランスフェクション効率は、HEK293T細胞およびHepG2肝臓がん細胞に対して、それぞれ111倍および44倍高いことが検証された。

40

【0078】

1.2.3 肝内注射による制御されたサイズの安定的なpDNA/脂質粒子の*in vivo*局所トランスフェクション効率

異なるサイズ(100 nm、600 nm、および1000 nm)の安定的な粒子が、肝臓に直接注入され、レポーターとしてのルシフェラーゼをコードするpDNA(マウスあたり3 μg)を使用して、トランスフェクション効率が試験された(図3A)。図3Bに

50

示すように、pDNA / 脂質粒子のサイズは、肝内注射による *in vivo* 局所トランスフェクションの効率に対する主要な決定要因としても作用する。100nmまたは1000nmのLNPと比較して、600nmのサイズのpDNA / 脂質粒子は、最も高いトランスフェクション効率を生み出した。600nmのLNPの際立って高い導入遺伝子レベルは、48時間後に収集された肝臓の単細胞懸濁液のルシフェラーゼ活性読み出しにより更に確認された(図3C)。

[参照]

【 0079 】

本明細書に記載の全ての出版物、特許出願、特許、および他の参照文献は、本開示の保護対象が属する技術分野に精通している者のレベルを示すものである。本明細書に記載の全ての出版物、特許出願、特許、および他の参照文献(例えば、ウェブサイト、データベース、等)は、個々の出版物、特許出願、特許、および他の参照文献が具体的にかつ個々に参照により組み込まれる場合と同一の程度まで、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。多数の特許出願、特許、および他の参照文献が本明細書で参照されているが、このような参照は、これらの文書のいずれかが当技術分野における一般的な知識の一部を形成していることを認めるものではないことが理解されよう。本明細書と組み込まれた参考文献との間に矛盾がある場合は、本明細書(組み込まれた参考文献に基づく場合がある、その修正を含む)が優先するものとする。本明細書では、特に断りのない限り、標準的な技術上認められた用語の意味を使用する。本明細書では、さまざまな用語の標準的な略語を使用する。

【 0080 】

He, Z.; Hu, Y.; Nie, T.; Tang, H.; Zhu, J.; Chen, K.; Liu, L.; Leong, K.W.; Chen, Y.; Mao, H.-Q., Size controlled lipid nanoparticle production using turbulent mixing to enhance oral DNA delivery. *Acta Biomaterialia* 2018, 81, 195 - 207.

International PCT Patent Application Publication No. WO2020223323 for Compositionally Defined Plasmid DNA / Polycation Nanoparticles and Methods for Making the Same, to Mao et al., published November 5, 2020.

【 0081 】

前述の保護対象は、理解を明瞭にする目的で、図示および例示によってある程度詳細に説明されたが、当業者には、添付の特許請求の範囲内で特定の変更および修正を実施できることが理解されよう。

10

20

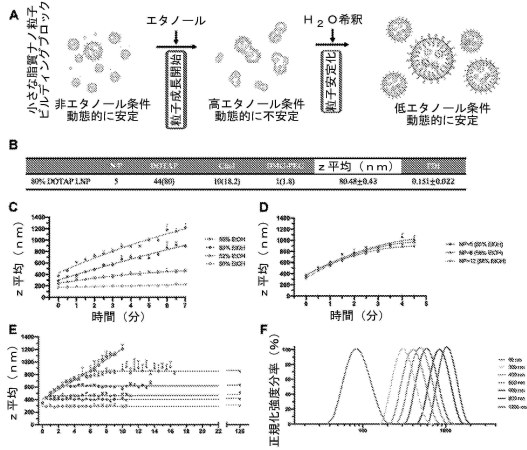
30

40

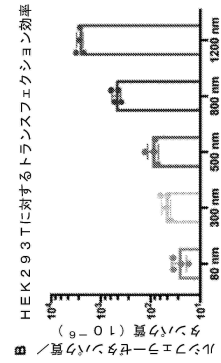
50

【 図 面 】

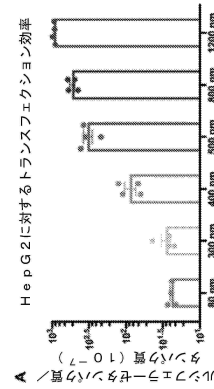
【 図 1 】



【 図 2 】

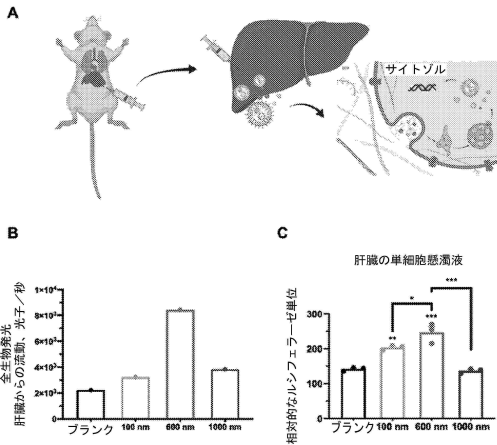


10



20

【 図 3 】



30

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US22/16580

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC - A61K 47/61; A61K 47/64; A61K 9/51; A61K 47/69 (2021.01)
 CPC - A61K 47/61; A61K 47/64; A61K 9/51; A61K 47/6929

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

10

B. FIELDS SEARCHED

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

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

20

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y — A	WO 2017/218704 A1 (MODERNATX, INC.) 21 December 2017; paragraphs [00408], [00420], [00421], [00450]	21 — 1-4
Y	KORABECNA. "Cell free DNA in plasma as an essential immune system regulator" 1-10. Nature. Web. 15 October 2020; Page 6; DOI: 10.1038/s41598-020-74288-2	21
A	WO 2020/104970 A2 (SPHERA ENCAPSULATION SRL et. al) 28 May 2020; paragraphs [006], [023], [0102], [0107], [0114], [0180]	1-4
A	RU 2014122432 A (NITTO DENKO KORPOREJSHN et. al) 10 December 2015; Page 4, 10	1-4
A	WO 2021/016430 A1 (TRANSLATE BIO, INC.) 28 January 2021; paragraph [0214]	1-4

30

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

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"D" document cited by the applicant in the international application	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

40

Date of the actual completion of the international search 09 May 2022 (09.05.2022)	Date of mailing of the international search report MAY 23 2022
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Shane Thomas Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US22/16580

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

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

- 1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
- 2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
- 3. Claims Nos.: 5-20, 22-31
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:

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

30

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.

40

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/713 (2006.01)	A 6 1 K 31/713	
A 6 1 K 47/18 (2017.01)	A 6 1 K 47/18	
A 6 1 K 47/24 (2006.01)	A 6 1 K 47/24	
A 6 1 K 47/28 (2006.01)	A 6 1 K 47/28	
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63	Z
C 1 2 N 15/86 (2006.01)	C 1 2 N 15/86	Z
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	

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,IT,JM,JO,J
P,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,N
A,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,
TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

ストリート 3 4 0 0 ザ ジョンズ ホプキンス ユニバーシティ内

(72)発明者 イニン チョウ

アメリカ合衆国 メリーランド州 2 1 2 1 8 バルティモア ノース チャールズ ストリート 3 4
0 0 ザ ジョンズ ホプキンス ユニバーシティ内

(72)発明者 イチョン フー

アメリカ合衆国 メリーランド州 2 1 2 1 8 バルティモア ノース チャールズ ストリート 3 4
0 0 ザ ジョンズ ホプキンス ユニバーシティ内

F ターム (参考)

4B065 AA90X AB01 AC14 BA02 CA44
4C076 AA65 AA95 BB01 BB11 BB15 BB25 CC29 DD49 DD63 DD70
GG12
4C084 AA13 MA38 NA13 NA20
4C086 AA01 AA10 EA16 MA02 MA05 MA38 MA52 MA66 MA70 NA13