

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6895892号
(P6895892)

(45) 発行日 令和3年6月30日 (2021.6.30)

(24) 登録日 令和3年6月10日 (2021.6.10)

(51) Int. Cl.

F I

A 6 1 K 48/00 (2006.01)

A 6 1 K 48/00 Z N A

A 6 1 K 31/7088 (2006.01)

A 6 1 K 31/7088

A 6 1 K 31/7115 (2006.01)

A 6 1 K 31/7115

A 6 1 K 9/127 (2006.01)

A 6 1 K 9/127

A 6 1 K 47/22 (2006.01)

A 6 1 K 47/22

請求項の数 63 (全 64 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-548300 (P2017-548300)
 (86) (22) 出願日 平成28年3月17日 (2016.3.17)
 (65) 公表番号 特表2018-511588 (P2018-511588A)
 (43) 公表日 平成30年4月26日 (2018.4.26)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2016/022895
 (87) 国際公開番号 W02016/149508
 (87) 国際公開日 平成28年9月22日 (2016.9.22)
 審査請求日 平成31年3月7日 (2019.3.7)
 (31) 優先権主張番号 62/135,338
 (32) 優先日 平成27年3月19日 (2015.3.19)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)

(73) 特許権者 517316797
 トランスレイト バイオ, インコーポレ
 イテッド
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02
 421, レキシントン, ハートウェル
 アベニュー 29
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (74) 代理人 100181674
 弁理士 飯田 貴敏
 (74) 代理人 100181641
 弁理士 石川 大輔

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ポンベ病のmRNA治療

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ポンベ病の治療のための組成物であって、リボソーム内に封入される酸性αグルコシダーゼ (GAA) をコードするmRNAを含み、前記組成物は、治療を必要とする被験体に有効な用量及び投与間隔で投与され、ポンベ病の少なくとも1つの症状または特徴の強度、重症度、または頻度を低減するか、または発症を遅らせることを特徴とし、前記mRNAが配列番号3と少なくとも90%同一のGAAをコードするコドン最適化ヌクレオチド配列を含み、前記mRNAのG/C含有が最適化されて、可能な限り高いG/C含有を達成し、前記リボソームが、1つ以上のカチオン性脂質、1つ以上の非カチオン性脂質、1つ以上のコレステロール系脂質、及び1つ以上のPEG修飾脂質を含む、前記組成物。

【請求項2】

ポンベ病の治療のための組成物であって、リボソーム内に封入される酸性αグルコシダーゼ (GAA) をコードするmRNAを含み、前記組成物の治療有効量は、治療を必要とする被験体に投与されて、被験体の肥大性心筋症を治療することを特徴とし、前記mRNAが配列番号3と少なくとも90%同一のGAAをコードするコドン最適化ヌクレオチド配列を含み、前記mRNAのG/C含有が最適化されて、可能な限り高いG/C含有を達成し、前記リボソームが、1つ以上のカチオン性脂質、1つ以上の非カチオン性脂質、1つ以上のコレステロール系脂質、及び1つ以上のPEG修飾脂質を含む、前記組成物。

【請求項3】

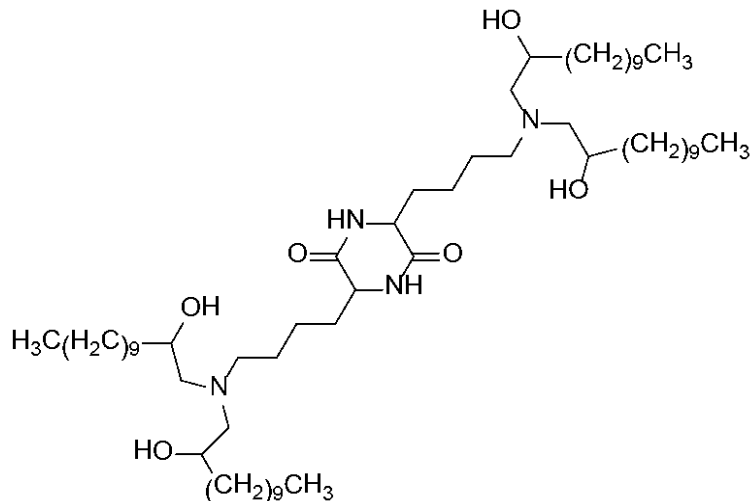
前記1つ以上のカチオン性脂質が、C12-200、MC3、DLi nDMA、DLi

n k C 2 D M A、c K K - E 1 2、I C E（イミダゾール系）、H G T 5 0 0 0、H G T 5 0 0 1、D O D A C、D D A B、D M R I E、D O S P A、D O G S、D O D A P、D O D M A及びD M D M A、D O D A C、D L e n D M A、D M R I E、C L i n D M A、C p L i n D M A、D M O B A、D O c a r b D A P、D L i n D A P、D L i n c a r b D A P、D L i n C D A P、K L i n - K - D M A、D L i n - K - X T C 2 - D M A、H G T 4 0 0 3、ならびにそれらの混合物からなる群から選択されるカチオン性脂質を含む、請求項1または2に記載の組成物。

【請求項4】

前記1つ以上のカチオン性脂質が、c K K - E 1 2：

【化7】



を含む、請求項3に記載の組成物。

【請求項5】

前記1つ以上の非カチオン性脂質が、D S P C（1，2 - ジステアロイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホコリン）、D P P C（1，2 - ジパルミトイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホコリン）、D O P E（1，2 - ジオレイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン）、D O P C（1，2 - ジオレイル - s n - グリセロ - 3 - ホスフォチジルコリン）、D P P E（1，2 - ジパルミトイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン）、D M P E（1，2 - ジミリストイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン）、D O P G（2 - ジオレオイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホ - （1' - r a c - グリセロール））及びそれらの組合せからなる群から選択される、請求項1～4のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項6】

前記1つ以上のコレステロール系脂質が、コレステロール及び／またはPEG化コレステロールである、請求項1～5のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項7】

前記1つ以上のPEG修飾脂質が、鎖長C₆～C₂₀のアルキル鎖（複数可）を有する脂質に共有結合した最大鎖長5 k D aのポリ（エチレン）グリコール鎖を含む、請求項1～6のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項8】

前記カチオン性脂質が、前記リポソームの約30～50重量%を占める、請求項1～7のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項9】

カチオン性脂質が、リポソームの約40重量%を占める、請求項8に記載の組成物。

【請求項10】

カチオン性脂質：非カチオン性脂質：コレステロール：PEG化脂質の比が、モル比でおよそ40：30：20：10である、請求項1～9のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 1 1】

カチオン性脂質：非カチオン性脂質：コレステロール：PEG化脂質の比が、重量比でおよそ40：30：25：5である、請求項1～9のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 1 2】

カチオン性脂質：非カチオン性脂質：コレステロール：PEG化脂質の比が、重量比でおよそ40：32：25：3である、請求項1～9のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 1 3】

前記リポソームが：

c K K - E 1 2、D O P E、コレステロール及びDMG - P E G 2 K；

C 1 2 - 2 0 0、D O P E、コレステロール及びDMG - P E G 2 K；

H G T 4 0 0 3、D O P E、コレステロール及びDMG - P E G 2 K；または、

I C E、D O P E、コレステロール及びDMG - P E G 2 Kから選択される組み合わせを含む、請求項1～12のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 1 4】

前記リポソームが約100nm未満のサイズを有する、請求項1～13のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 1 5】

前記組成物は、前記mRNAが、約0.1～5.0mg/kg体重の範囲の有効用量で投与されるように投与されることを特徴とする、請求項1～14のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 1 6】

前記組成物は、前記mRNAが、約0.1～3.0mg/kg体重の範囲の有効用量で投与されるように投与されることを特徴とする、請求項1～15のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 1 7】

前記組成物は、前記mRNAが、約0.1～1.0mg/kg体重の範囲の有効用量で投与されるように投与されることを特徴とする、請求項1～16のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 1 8】

前記組成物は、前記mRNAが、約1.0mg/kg体重の有効用量で投与されるように投与されることを特徴とする、請求項1～17のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 1 9】

前記組成物は静脈内に投与されることを特徴とする、請求項1～18のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 2 0】

前記組成物は筋肉内に投与されることを特徴とする、請求項1～19のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 2 1】

前記筋肉内投与を、骨格筋、平滑筋、心筋及びそれらの組合せからなる群から選択される筋肉に対して行う、請求項20に記載の組成物。

【請求項 2 2】

前記組成物は週1回投与されることを特徴とする、請求項1～21のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 2 3】

前記組成物は週2回投与されることを特徴とする、請求項1～21のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 2 4】

前記組成物は月2回投与されることを特徴とする、請求項1～21のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 2 5】

前記組成物は月1回投与されることを特徴とする、請求項1～21のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項26】

前記組成物は14日に1回投与されることを特徴とする、請求項1～21のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項27】

前記組成物の前記投与は、肝臓内でのG A Aタンパク質の発現をもたらすことを特徴とする、請求項1～26のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項28】

前記組成物の前記投与は、筋肉組織または筋肉細胞内でのG A Aタンパク質の発現をもたらすことを特徴とする、請求項1～27のいずれか一項に記載の組成物。

10

【請求項29】

前記筋肉組織が、骨格筋、平滑筋、心筋及びそれらの組合せから選択される、請求項28に記載の組成物。

【請求項30】

前記筋肉細胞が、筋細胞、筋管、筋芽細胞、心筋細胞、心筋芽細胞及びそれらの組合せからなる群より選択される、請求項28に記載の組成物。

【請求項31】

前記組成物の投与は、血清中でのG A Aタンパク質発現をもたらすことを特徴とする、請求項1～30のいずれか一項に記載の組成物。

20

【請求項32】

前記組成物の前記投与の結果、前記被験体の尿中G l c 4レベルが、治療前のベースラインの尿中G l c 4レベルに比べて低下することを特徴とする、請求項1～31のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項33】

前記組成物の前記投与の結果、前記被験体の筋グリコーゲンレベルが、治療前のベースラインの筋グリコーゲンレベルに比べて低下することを特徴とする、請求項1～32のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項34】

前記組成物の前記投与の結果、前記被験体の肝グリコーゲンレベルが、治療前のベースラインの肝グリコーゲンレベルに比べて低下することを特徴とする、請求項1～33のいずれか一項に記載の組成物。

30

【請求項35】

前記組成物の前記投与の結果、前記被験体の血清アスパラギン酸トランスアミナーゼレベルが、治療前のベースラインの血清アスパラギン酸トランスアミナーゼレベルに比べて低下することを特徴とする、請求項1～34のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項36】

前記組成物の前記投与の結果、前記被験体の血清アラニントランスアミナーゼレベルが、治療前のベースラインの血清アラニントランスアミナーゼレベルに比べて低下することを特徴とする、請求項1～35のいずれか一項に記載の組成物。

40

【請求項37】

前記組成物の前記投与の結果、前記被験体の血清クレアチンキナーゼレベルが、治療前のベースラインの血清クレアチンキナーゼレベルに比べて低下することを特徴とする、請求項1～36のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項38】

前記組成物の前記投与の結果、前記被験体の血清乳酸デヒドロゲナーゼレベルが、治療前のベースラインの血清乳酸デヒドロゲナーゼレベルに比べて低下することを特徴とする、請求項1～37のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項39】

前記組成物の前記投与の結果、前記被験体由来の生物学的試料中のG A A酵素活性レベ

50

ルが、治療前の生物学的試料中のベースラインのG A A酵素活性レベルに比べて上昇することを特徴とする、請求項1～38のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項40】

前記mRNAが、配列番号8の5'UTR配列をさらに含む、請求項1～39のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項41】

前記mRNAが、配列番号9または配列番号10の3'UTR配列をさらに含む、請求項1～39のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項42】

前記mRNAが、配列番号11または配列番号12を有する、請求項1～41のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項43】

前記mRNAが、1つ以上の修飾ヌクレオチドを含む、請求項1～42のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項44】

前記1つ以上の修飾ヌクレオチドが、プソイドウリジン、N-1-メチル-プソイドウリジン、2-アミノアデノシン、2-チオチミジン、イノシン、ピロロ-ピリミジン、3-メチルアデノシン、5-メチルシチジン、C-5プロピニル-シチジン、C-5プロピニル-ウリジン、2-アミノアデノシン、C5-プロモウリジン、C5-フルオロウリジン、C5-ヨードウリジン、C5-プロピニル-ウリジン、C5-プロピニル-シチジン、C5-メチルシチジン、2-アミノアデノシン、7-デアザアデノシン、7-デアザグアノシン、8-オキソアデノシン、8-オキソグアノシン、O(6)-メチルグアニン及び/または2-チオシチジンを含む、請求項43に記載の組成物。

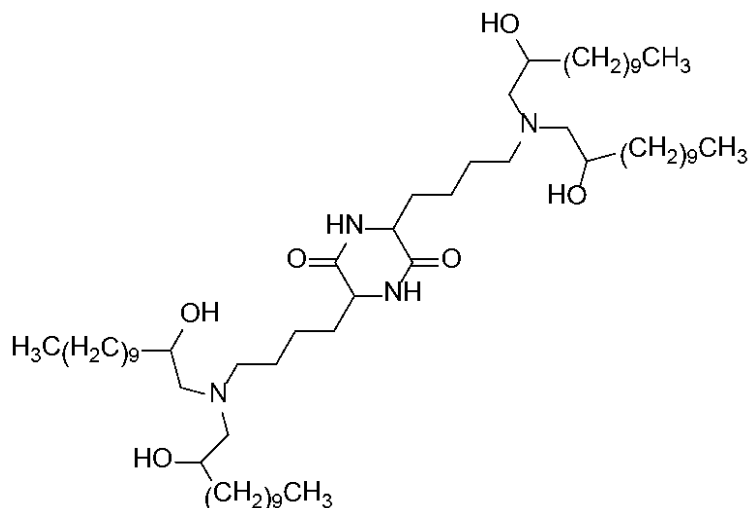
【請求項45】

前記mRNAが未修飾である、請求項1～42のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項46】

酸性αグルコシダーゼ（G A A）をコードする有効量のmRNAをリポソーム内に封入して含むポンペ病の治療用組成物であって、前記mRNAが配列番号3と少なくとも90%同一のG A Aをコードするコドン最適化ヌクレオチド配列を含み、前記mRNAのG/C含有が最適化されて、可能な限り高いG/C含有を達成し、前記リポソームが、カチオン性脂質c K K - E 1 2：

【化8】



、1つ以上の非カチオン性脂質、1つ以上のコレステロール系脂質、及び1つ以上のPEG修飾脂質を含む、前記治療用組成物。

【請求項47】

前記1つ以上の非カチオン性脂質が、DSPC（1，2-ジステアロイル-sn-グリ

セロ - 3 - ホスホコリン)、DPPC (1, 2 - ジパルミトイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン)、DOPE (1, 2 - ジオレイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン)、DOPC (1, 2 - ジオレイル - sn - グリセロ - 3 - ホスフォチジルコリン (phosphatidylcholine)) DPPE (1, 2 - ジパルミトイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン)、DMPE (1, 2 - ジミリストイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン)、DOPG (1, 2 - ジオレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホ - (1' - rac - グリセロール)) 及びそれらの組合せからなる群から選択される、請求項 46 に記載の組成物。

【請求項 48】

前記 1 つ以上のコレステロール系脂質が、コレステロール及び／または PEG 化コレステロールから選択される、請求項 46 または 47 に記載の組成物。

10

【請求項 49】

前記 1 つ以上の PEG 修飾脂質が、鎖長 $C_6 \sim C_{20}$ のアルキル鎖 (複数可) を有する脂質に共有結合している最大鎖長 5 kDa のポリ (エチレン) グリコール鎖を含む、請求項 46 ～ 48 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 50】

前記リボソームが、cKK - E12、DOPE、コレステロール及び DMG - PEG 2 K を含む、請求項 46 ～ 49 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 51】

前記カチオン性脂質が、リボソームの約 30 ～ 50 mol % を占める、請求項 46 ～ 50 のいずれか一項に記載の組成物。

20

【請求項 52】

前記カチオン性脂質が、リボソームの約 40 mol % を占める、請求項 51 に記載の組成物。

【請求項 53】

cKK - E12 : DOPE : コレステロール : DMG - PEG 2 K の比が、モル比でおよそ 40 : 30 : 20 : 10 である、請求項 50 ～ 52 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 54】

cKK - E12 : DOPE : コレステロール : DMG - PEG 2 K の比が、モル比でおよそ 40 : 30 : 25 : 5 である、請求項 50 ～ 52 のいずれか一項に記載の組成物。

30

【請求項 55】

cKK - E12 : DOPE : コレステロール : DMG - PEG 2 K の比が、モル比でおよそ 40 : 32 : 25 : 3 である、請求項 50 ～ 52 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 56】

前記リボソームが約 100 nm 未満のサイズを有する、請求項 46 ～ 55 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 57】

前記組成物を静脈内投与用に製剤化する、請求項 46 ～ 56 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 58】

前記組成物を筋肉内投与用に製剤化する、請求項 46 ～ 56 のいずれか一項に記載の組成物。

40

【請求項 59】

前記 mRNA が、配列番号 8 の 5' UTR 配列をさらに含む、請求項 46 ～ 58 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 60】

前記 mRNA が、配列番号 9 または配列番号 10 の 3' UTR 配列をさらに含む、請求項 46 ～ 58 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 61】

前記 mRNA が、配列番号 11 または配列番号 12 を有する、請求項 46 ～ 60 のい

50

れか一項に記載の組成物。

【請求項62】

ポンペ病の治療用組成物であって、酸性 α グルコシダーゼ（GAA）をコードする有効量のmRNAをリポソーム内に封入して含み、前記mRNAが配列番号3と少なくとも90%同一のGAAをコードするコドン最適化ヌクレオチド配列を有し、前記mRNAのG/C含有が最適化されて、可能な限り高いG/C含有を達成し、及び、

前記リポソームが、カチオン性脂質、非カチオン性脂質、コレステロール系脂質及びPEG修飾脂質をさらに含む、前記治療用組成物。

【請求項63】

ポンペ病の治療用組成物であって、酸性 α グルコシダーゼ（GAA）をコードする有効量のmRNAをリポソーム内に封入して含み、前記mRNAが配列番号3と少なくとも90%同一のGAAをコードするコドン最適化ヌクレオチド配列を有し、前記mRNAのG/C含有が最適化されて、可能な限り高いG/C含有を達成し、前記mRNAが配列番号11または配列番号12を有し、及び、

前記リポソームが、カチオン性脂質、非カチオン性脂質、コレステロール系脂質及びPEG修飾脂質をさらに含む、前記治療用組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本願は、2015年3月19日に出願された米国仮出願第62/135,338号の優先権を主張し、その開示内容を参照として本明細書に援用する。

【0002】

配列表

本明細書は、配列表（2016年3月17日に「SHR_1185WO_SL」という名称の.txtファイルとして電子提出した）を参照する。txtファイルは2016年3月17日に生成したものであって、そのサイズは28,284バイトである。配列表の内容全体を、参照として本明細書に援用する。

【背景技術】

【0003】

ポンペ病（糖原病II型；酸性 α グルコシダーゼ欠乏症；酸マルターゼ欠乏症；GAA欠乏症；GSD II；全身性グリコーゲン症II型の心型；びまん性糖原性心肥大；酸マルターゼ欠損症；AMD；または α -1,4-グルコシダーゼ欠損症）は、リソソーマル（lysosomal）酵素である酸性 α グルコシダーゼ（GAA）（酸性マルターゼとしても知られる）の遺伝子の突然変異を特徴とする常染色体劣性代謝遺伝子障害である。GAA遺伝子の突然変異は、GAA酵素がグリコーゲン、マルトース及びイソマルトースの α -1,4及び α -1,6結合を加水分解する能力を排除または低下させる。結果として、グリコーゲンは体内の細胞中のリソソーム及び細胞質に蓄積し、細胞及び組織の破壊をもたらす。特に影響を受ける組織として、骨格筋及び心筋が挙げられる。蓄積したグリコーゲンは、進行性筋力低下を引き起こし、心肥大、歩行困難及び呼吸不全をもたらす。

【0004】

古典的な乳児発症型疾患、非古典的な乳児発症型疾患及び遅発型疾患を含む、3つの形態のポンペ病が同定されている。古典的な乳児発症型は、筋力の低下、筋緊張の低下、肝腫大、及び心臓欠陥を特徴とする。この疾患の発生率は、およそ14万人に1人である。この種の疾患を有する患者は、生後1年以内に心不全で死亡することが多い。この疾患の非古典的な乳児発症型は、運動習熟の遅延、進行性筋力低下、及び場合によっては心肥大を特徴とする。この種の疾患を有する患者は、呼吸不全のため、その生存が早期幼児期のみに限られることが多い。遅発型の疾患は、若年期、青年期または成人期に発症する場合

10

20

30

40

50

があり、脚及び胴体の進行性筋力低下が特徴である。

【0005】

現在のところ、ポンペ病の治療法はなく、標準治療は、心筋症に対する支持療法を伴う酵素補充療法（ERT）ならびに筋力低下及び呼吸器症状に対する理学療法である。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0006】

発明の概要

本発明は、とりわけ、mRNA療法に基づく改良型のポンペ病治療方法及び組成物を提供する。本発明は、ヒトGAAタンパク質をコードするmRNAをリポソーム内に封入して投与すると、*in vivo*での高効率かつ持続的なタンパク質産生が得られ、例えば、臨床上、関連性の高い疾患マーカーである肝臓及び筋肉におけるグリコーゲンレベルが効果的に低減するという観察を含む。

10

【0007】

一態様では、本発明は、治療を必要とする被験体に、酸性 α グルコシダーゼ（GAA）をコードするmRNAを含む組成物を、有効な用量及び投与間隔で投与し、それによって、ポンペ病の少なくとも1つの症状または特徴の、強度、重症度、または頻度を低減するか、または発症を遅らせることを含む、ポンペ病の治療方法を提供する。いくつかの実施形態では、mRNAをリポソーム内に封入する。

20

【0008】

別の態様では、本発明は、治療を必要とする被験体に、酸性 α グルコシダーゼ（GAA）をコードするmRNAを含む治療有効量の組成物を投与し、それによって被験体の肥大型心筋症を治療することを含む、ポンペ病の治療方法を提供する。いくつかの実施形態では、mRNAをリポソーム内に封入する。

【0009】

別の態様では、本発明は、GAAをコードする有効量のmRNAをリポソーム内に封入して含むポンペ病の治療用組成物を提供する。

【0010】

いくつかの実施形態では、適切なリポソームは、1つ以上のカチオン性脂質、1つ以上の非カチオン性脂質、1つ以上のコレステロール系脂質及び1つ以上のPEG修飾脂質を含む。

30

【0011】

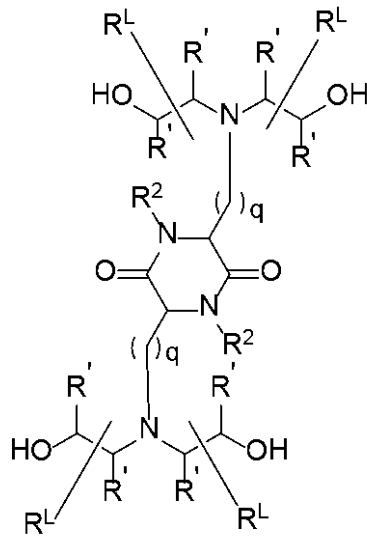
いくつかの実施形態では、1つ以上のカチオン性脂質は、C12-200、MC3、DLinDMA、DLinkC2DMA、cKK-E12、ICE（イミダゾール系）、HGT5000、HGT5001、DODAC、DDAB、DMRIE、DOSPA、DOGS、DODAP、DODMA及びDMDMA、DODAC、DLenDMA、DMRIE、CLinDMA、CpLinDMA、DMOBA、DOcarbDAP、DLinDAP、DLincarbDAP、DLinCDAP、KLin-K-DMA、DLin-K-XTC2-DMA、HGT4003、ならびにその組合せからなる群から選択される。

40

【0012】

いくつかの実施形態において、1つ以上のカチオン性脂質は、式I-c1-aの化合物：

【化 1】



10

、またはその薬学的に許容可能な塩を含み、式中：

各 R^2 は、独立して水素または C_{1-3} アルキルであり；

各 q は、独立して 2～6 であり；

各 R' は、独立して水素または C_{1-3} アルキルであり；

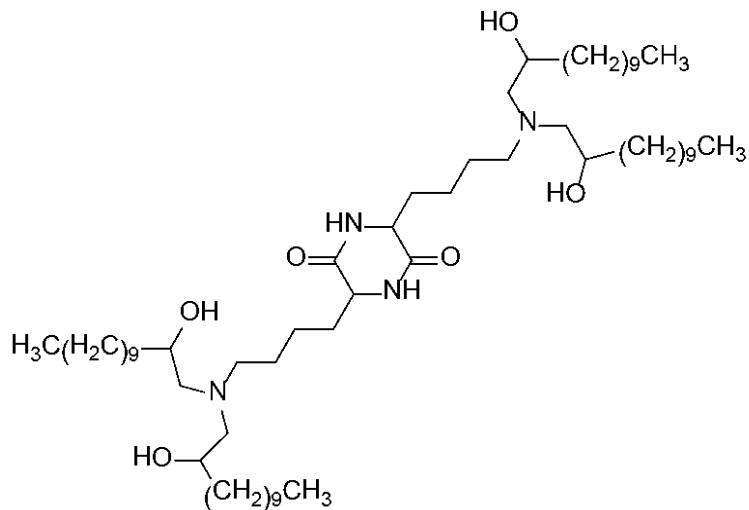
各 R^L は、独立して C_{8-12} アルキルである。

20

【0013】

いくつかの実施形態において、1つ以上のカチオン性脂質は、c K K - E 1 2：

【化 2】



30

を含む。

【0014】

40

いくつかの実施形態では、本発明に適した1つ以上の非カチオン性脂質は、DSPC（1, 2 - ジステアロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン）、DPPC（1, 2 - ジパルミトイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン）、DOPE（1, 2 - ジオレイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン）、DOPC（1, 2 - ジオレイル - sn - グリセロ - 3 - ホスフォチジルコリン（phosphatidylcholine））、DPPE（1, 2 - ジパルミトイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン）、DMPE（1, 2 - ジミリスチル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン）、DOPG（, 2 - ジオレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホ - （1' - rac - グリセロール））、及びそれらの組合せから選択される。

【0015】

50

【 0 0 1 6 】

10

いくつかの実施形態では、適切なリポソームは、c K K - E 1 2、D O P E、コレステロール及びDMG - P E G 2 K；C 1 2 - 2 0 0、D O P E、コレステロール及びDMG - P E G 2 K；H G T 4 0 0 3、D O P E、コレステロール及びDMG - P E G 2 K；またはI C E、D O P E、コレステロール及びDMG - P E G 2 Kから選択される組合せを含む。

いくつかの実施形態では、カチオン性脂質（例えば、c K K - E 1 2、C 1 2 - 2 0 0、I C E 及び／またはH G T 4 0 0 3）は、リポソームの約 3 0 ～ 6 0 %（例えば、約 3 0 ～ 5 5 %、約 3 0 ～ 5 0 %、約 3 0 ～ 4 5 %、約 3 0 ～ 4 0 %、約 3 5 ～ 5 0 %、約 3 5 ～ 4 5 %、または約 3 5 ～ 4 0 %）のモル比を占める。いくつかの実施形態では、カチオン性脂質（例えば、c K K - E 1 2、C 1 2 - 2 0 0、I C E 及び／またはH G T 4 0 0 3）は、リポソームの約 3 0 %、約 3 5 %、約 4 0 %、約 4 5 %、約 5 0 %、約 5 5 %、または約 6 0 %のモル比を占める。

20

いくつかの実施形態では、カチオン性脂質（複数可）（例えば、c K K - E 1 2、C 1 2 - 2 0 0、I C E 及び／またはH G T 4 0 0 3）と、非カチオン性脂質（複数可）（例えば、D O P E）と、コレステロール系脂質（複数可）（例えば、コレステロール）と、P E G 化脂質（複数可）（例えば、D M G - P E G 2 K）との比は、それぞれ約30～60：25～35：20～30：1～15の間であってもよい。いくつかの実施形態では、カチオン性脂質（複数可）（例えば、c K K - E 1 2、C 1 2 - 2 0 0、I C E 及び／またはH G T 4 0 0 3）と、非カチオン性脂質（複数可）（例えば、D O P E）と、コレステロール系脂質（複数可）（例えば、コレステロール）と、P E G 化脂質（複数可）（例えば、D M G - P E G 2 K）との比は、それぞれおよそ40：30：20：10である。いくつかの実施形態では、カチオン性脂質（複数可）（例えば、c K K - E 1 2、C 1 2 - 2 0 0、I C E 及び／またはH G T 4 0 0 3）と、非カチオン性脂質（複数可）（例えば、D O P E）と、コレステロール系脂質（複数可）（例えば、コレステロール）と、P E G 化脂質（複数可）（例えば、D M G - P E G 2 K）との比は、それぞれおよそ40：30：25：5である。いくつかの実施形態では、カチオン性脂質（複数可）（例えば、c K K - E 1 2、C 1 2 - 2 0 0、I C E 及び／またはH G T 4 0 0 3）と、非カチオン性脂質（複数可）（例えば、D O P E）と、コレステロール系脂質（複数可）（例えば、コレステロール）と、P E G 化脂質（複数可）（例えば、D M G - P E G 2 K）との比は、それぞれおよそ40：32：25：3である。いくつかの実施形態では、カチオン性脂質（複数可）（例えば、c K K - E 1 2、C 1 2 - 2 0 0、I C E 及び／またはH G T 4 0 0 3）と、非カチオン性脂質（複数可）（例えば、D O P E）と、コレステロール系脂質（複数可）（例えば、コレステロール）と、P E G 化脂質（複数可）（例えば、D M G - P E G 2 K）との比は、およそ50：25：20：5である。

30

40

50

いくつかの実施形態では、リポソームのサイズは、リポソーム粒子の最大直径の長さによって決定される。いくつかの実施形態では、適切なリポソームは、約500nm、400nm、300nm、250nm、200nm、150nm、100nm、75nm、または50nm未満のサイズを有する。いくつかの実施形態では、適切なリポソームは、約100nm、90nm、80nm、70nm、または60nm未満のサイズを有する。特定の実施形態では、リポソームは、約100nm未満のサイズを有する。

【0021】

いくつかの実施形態では、mRNAを、約0.1~5.0mg/kg体重、例えば約0.1~4.5、0.1~4.0、0.1~3.5、0.1~3.0、0.1~2.5、0.1~2.0、0.1~1.5、0.1~1.0、0.1~0.5、0.1~0.3、0.3~5.0、0.3~4.5、0.3~4.0、0.3~3.5、0.3~3.0、0.3~2.5、0.3~2.0、0.3~1.5、0.3~1.0、0.3~0.5、0.5~5.0、0.5~4.5、0.5~4.0、0.5~3.5、0.5~3.0、0.5~2.5、0.5~2.0、0.5~1.5、または0.5~1.0mg/kg体重の範囲の用量で投与する。いくつかの実施形態では、mRNAを、約5.0、4.5、4.0、3.5、3.0、2.5、2.0、1.5、1.0、0.8、0.6、0.5、0.4、0.3、0.2、または0.1mg/kg体重以下の用量で投与する。特定の実施形態では、mRNAを、約1.0mg/kgの用量で投与する。

【0022】

いくつかの実施形態では、提供組成物を静脈内投与する。いくつかの実施形態では、提供組成物を筋肉内投与する。特定の実施形態では、筋肉内投与は、骨格筋、平滑筋及び心筋からなる群から選択される筋肉に対して行う。いくつかの実施形態では、提供組成物を、肺送達を介して投与する。特定の実施形態では、肺送達を、エアロゾル化、吸入、噴霧または点滴注入によって実施する。いくつかの実施形態では、提供組成物を、呼吸可能な粒子、噴霧可能な脂質、または吸入可能な乾燥粉末として製剤化する。

【0023】

いくつかの実施形態では、提供組成物を、1日1回、週1回、週2回、月2回、月1回、投与する。いくつかの実施形態では、提供組成物を、7日に1回、10日に1回、14日に1回、28日に1回、または30日に1回投与する。

【0024】

いくつかの実施形態では、治療有効量の定期的な投与の結果、肝臓内にGAAタンパク質が発現する。いくつかの実施形態では、治療有効量の定期的な投与の結果、筋肉組織または筋肉細胞内にGAAタンパク質が発現する。筋肉組織は、例えば、骨格筋、平滑筋、心筋及びそれらの組合せであり得る。筋肉細胞は、例えば、筋細胞、筋管、筋芽細胞、心筋細胞、心筋芽細胞及びそれらの組合せであり得る。いくつかの実施形態では、治療有効量の定期的な投与の結果、血清中にGAAタンパク質が見出されるようになる。

【0025】

いくつかの実施形態では、提供組成物の治療有効量の定期的な投与の結果、被験体の肝GAAタンパク質レベルが、治療前のベースラインの肝GAAタンパク質レベルに比べて上昇する。いくつかの実施形態では、提供組成物の治療有効量の定期的な投与の結果、被験体の筋GAAタンパク質レベルが、治療前のベースラインの筋GAAタンパク質レベルに比べて上昇する。いくつかの実施形態では、筋肉は、骨格筋（例えば、横紋筋、随意筋）、平滑筋（例えば、内臓筋、不随意筋）または心筋である。いくつかの実施形態では、提供組成物の治療有効量の定期的な投与の結果、被験体の筋グリコーゲンレベルが、治療前のベースラインの筋グリコーゲンレベルに比べて低下する。いくつかの実施形態では、提供組成物の治療有効量の定期的な投与の結果、被験体の肝グリコーゲンレベルが、治療前のベースラインの肝グリコーゲンレベルに比べて低下する。いくつかの実施形態では、提供組成物の治療有効量の定期的な投与の結果、被験体の血清クレアチンキナーゼレベルが、治療前のベースラインの血清クレアチンキナーゼレベルに比べて低下する。いくつかの実施形態では、提供組成物の治療有効量の定期的な投与の結果、被験体の尿グルコース

10

20

30

40

50

四糖（G l c α 1 - 6 G l c α 1 - 4 G l c α 1 - 4 G l c (G l c ₄)）レベルが、治療前のベースラインのG l c ₄ レベルに比べて低下する。いくつかの実施形態では、提供組成物の治療有効量の定期的な投与の結果、被験体の血清アスパラギン酸トランスアミナーゼ（例えば、A S T、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、血清、グルタミン酸オキザロ酢酸トランスアミナーゼ）レベルが、治療前のベースラインのA S Tレベルに比べて低下する。いくつかの実施形態では、提供組成物の治療有効量の定期的な投与の結果、被験体の血清アラニントランスアミナーゼ（例えば、A L T、アラニンアミノトランスフェラーゼ、血清グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ）レベルが、治療前のベースラインのA L Tレベルに比べて低下する。いくつかの実施形態では、提供組成物の治療有効量の定期的な投与の結果、被験体の血清乳酸デヒドロゲナーゼ（例えば、L D H、乳酸デヒドロゲナーゼ）レベルが、治療前のベースラインのL D Hレベルに比べて低下する。いくつかの実施形態では、提供組成物の治療有効量の定期的な投与の結果、生物学的試料中のG A A酵素活性レベルが、治療前のベースラインのG A A酵素活性レベルに比べて上昇する。

10

【0026】

いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、被験体の肝G A Aタンパク質レベルが、治療前のベースラインレベルに比べて上昇する。通常、ベースラインレベルは治療の直前に測定する。いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、肝G A Aタンパク質レベルが、治療前のベースラインレベルに比べて少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または95%上昇する。いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、肝G A Aタンパク質レベルが、未治療の被験体の肝G A Aタンパク質レベルに比べて上昇する。

20

【0027】

いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、被験体の骨格筋のG A Aタンパク質レベルが、治療前のベースラインレベルに比べて上昇する。通常、ベースラインレベルは治療の直前に測定する。いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、骨格筋のG A Aタンパク質レベルが、治療前のベースラインレベルに比べて少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または95%上昇する。いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、骨格筋のG A Aタンパク質レベルが、未治療の被験体の骨格筋のG A Aタンパク質レベルに比べて上昇する。

30

【0028】

いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、被験体の心筋のG A Aタンパク質レベルが、治療前のベースラインレベルに比べて上昇する。通常、ベースラインレベルは治療の直前に測定する。いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、心筋のG A Aタンパク質レベルが、治療前のベースラインレベルに比べて少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または95%上昇する。いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、心筋のG A Aタンパク質レベルが、未治療の被験体の心筋のG A Aタンパク質レベルに比べて上昇する。

【0029】

いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、被験体の平滑筋のG A Aタンパク質レベルが、治療前のベースラインレベルに比べて上昇する。通常、ベースラインレベルは治療の直前に測定する。いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、平滑筋のG A Aタンパク質レベルが、治療前のベースラインレベルに比べて少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または95%上昇する。いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、平滑筋のG A Aタンパク質レベルが、未治療の被験体の平滑筋のG A Aタンパク質レベルに比べて上昇する。

40

【0030】

いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、被験体の筋肉細胞のG A Aタンパク質レベルが、治療前のベースラインレベルに比べて上昇する。通常、ベースラインレベルは治療の直前に測定する。いくつかの実施形態では、筋肉細胞は、筋細胞、筋管、筋芽

50

細胞、心筋細胞または心筋芽細胞である。いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、筋肉細胞のG A Aタンパク質レベルが、治療前のベースラインレベルに比べて少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または95%上昇する。いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、筋肉細胞のG A Aタンパク質レベルが、未治療の被験体の筋肉細胞のG A Aタンパク質レベルに比べて上昇する。

【0031】

いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、被験体の肝臓細胞（例えば、肝細胞、類洞壁細胞）のG A Aタンパク質レベルが、治療前のベースラインレベルに比べて上昇する。通常、ベースラインレベルは治療の直前に測定する。いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、肝臓細胞のG A Aタンパク質レベルが、治療前のベースラインレベルに比べて少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または95%上昇する。いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、肝臓細胞のG A Aタンパク質レベルが、未治療の被験体の肝臓細胞のG A Aタンパク質レベルに比べて上昇する。

10

【0032】

いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、被験体の血漿または血清中のG A Aタンパク質レベルが、治療前のベースラインレベルに比べて上昇する。通常、ベースラインレベルは治療の直前に測定する。いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、血漿または血清中のG A Aタンパク質レベルが、治療前のベースラインレベルに比べて少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または95%上昇する。いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、血漿または血清中のG A Aタンパク質レベルが、未治療の被験体の血漿または血清中のG A Aタンパク質レベルに比べて上昇する。

20

【0033】

いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、被験体の血清クレアチンキナーゼレベルが、治療前のベースラインレベルに比べて低下する。通常、ベースラインレベルは治療の直前に測定する。いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、血清クレアチンキナーゼレベルが、治療直前のベースラインの血清クレアチンキナーゼレベルに比べて少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または95%低下する。いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、血清クレアチンキナーゼレベルが、約2000 IU/L、1500 IU/L、1000 IU/L、750 IU/L、500 IU/L、250 IU/L、100 IU/L、90 IU/L、80 IU/L、70 IU/Lまたは60 IU/L未満にまで低下する。いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、血清クレアチンキナーゼレベルが、未治療の被験体の血清クレアチンキナーゼレベルに比べて低下する。

30

【0034】

いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、被験体の尿中G l c₄レベルが、治療前のベースラインレベルに比べて低下する。通常、ベースラインレベルは治療の直前に測定する。いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、尿中G l c₄レベルが、治療直前のベースラインレベルに比べて少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または95%低下する。いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、尿中G l c₄レベルが、約100 mmol G l c₄/molクレアチニン、90 mmol G l c₄/molクレアチニン、80 mmol G l c₄/molクレアチニン、70 mmol G l c₄/molクレアチニン、60 mmol G l c₄/molクレアチニン、50 mmol G l c₄/molクレアチニン、40 mmol G l c₄/molクレアチニン、30 mmol G l c₄/molクレアチニンまたは20 mmol G l c₄/molクレアチニン未満にまで低下する。いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、尿中G l c₄レベルが、未治療の被験体の尿中G l c₄レベルに比べて低下する。

40

50

【0035】

いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、被験体の筋グリコーゲンレベルが、治療前のベースラインレベルに比べて低下する。通常、ベースラインレベルは治療の直前に測定する。いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、筋グリコーゲンレベルが、治療直前のベースラインレベルに比べて少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または95%低下する。いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、筋グリコーゲンレベルが、未治療の被験体の筋グリコーゲンレベルに比べて低下する。特定の実施形態では、筋肉は、骨格筋、平滑筋または心筋である。

【0036】

10

いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、被験体の肝グリコーゲンレベルが、治療前のベースラインレベルに比べて低下する。通常、ベースラインレベルは治療の直前に測定する。いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、肝グリコーゲンレベルが、治療直前のベースラインレベルに比べて少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または95%低下する。いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、肝グリコーゲンレベルが、未治療の被験体の肝グリコーゲンレベルに比べて低下する。

【0037】

いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、被験体の血清アスパラギン酸トランスアミナーゼ（AST）レベルが、治療前のベースラインレベルに比べて低下する。通常、ベースラインレベルは治療の直前に測定する。いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、血清ASTレベルが、治療直前のベースラインレベルに比べて少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または95%低下する。いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、血清ASTレベルが、約600IU/L、500IU/L、400IU/L、300IU/L、200IU/L、100IU/L、50IU/L、25IU/L、20IU/Lまたは10IU/L未満にまで低下する。いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、血清ASTレベルが、未治療の被験体の血清ASTレベルに比べて低下する。

20

【0038】

いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、被験体の血清アラニントランスアミナーゼ（ALT）レベルが、治療前のベースラインレベルに比べて低下する。通常、ベースラインレベルは治療の直前に測定する。いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、血清ALTレベルが、治療直前のベースラインレベルに比べて少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または95%低下する。いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、血清ALTレベルが、約1000IU/L、900IU/L、800IU/L、700IU/L、600IU/L、500IU/L、400IU/L、300IU/L、200IU/L、100IU/L、50IU/L、25IU/L、20IU/Lまたは10IU/L未満にまで低下する。いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、血清ALTレベルが、未治療の被験体の血清ALTレベルに比べて低下する。

30

40

【0039】

いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、被験体の血清乳酸デヒドロゲナーゼ（LDH）レベルが、治療前のベースラインレベルに比べて低下する。通常、ベースラインレベルは治療の直前に測定する。いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、血清乳酸デヒドロゲナーゼLDHレベルが、治療直前のベースラインレベルに比べて少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または95%低下する。いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、血清LDHレベルが、約2000IU/L、1500IU/L、1000IU/L、900IU/L、800IU/L、700IU/L、600IU/L、500IU/L、400IU/L、300IU/L、200IU/Lまたは100IU/L未満にまで低下する。いくつ

50

かの実施形態では、提供組成物の投与の結果、血清LDHレベルが、未治療の被験体の血清LDHレベルに比べて低下する。

【0040】

いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、被験体由来の生物学的試料中のGAA酵素活性が、治療前のベースラインレベルに比べて上昇する。通常、ベースラインレベルは治療の直前に測定する。生物学的試料として、例えば、全血、血清、血漿、尿及び組織試料（例えば、筋肉、肝臓、皮膚線維芽細胞）が挙げられる。いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、GAA酵素活性が、治療直前のベースラインレベルに比べて少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または95%上昇する。いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、GAA酵素活性が、未治療の被験体のGAA酵素活性に比べて上昇する。

10

【0041】

いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、被験体由来の生物学的試料中のGAA mRNA発現レベルが、治療前のベースライン発現レベルに比べて上昇する。通常、ベースラインレベルは治療の直前に測定する。生物学的試料として、例えば、全血、血清、血漿、尿及び組織試料（例えば、筋肉、肝臓、皮膚線維芽細胞）が挙げられる。いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、GAA mRNA発現レベルが、治療直前のベースラインレベルに比べて少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または95%上昇する。いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、GAA mRNA発現レベルが、未治療の被験体のGAA mRNA発現レベルに比べて上昇する。

20

【0042】

いくつかの実施形態では、mRNAはコドン最適化されている。いくつかの実施形態では、コドン最適化mRNAは、配列番号3（コドン最適化ヒトGAA mRNA配列に相当）を有する。いくつかの実施形態では、mRNAは、配列番号8の5'UTR配列（5'UTR配列Xに相当）を有する。いくつかの実施形態では、mRNAは、配列番号9の3'UTR配列（3'UTR配列Yに相当）を有する。いくつかの実施形態では、mRNAは、配列番号10の3'UTR配列（3'UTR配列Yに相当）を有する。いくつかの実施形態では、コドン最適化mRNAは、配列番号11または配列番号12（5'UTR及び3'UTR配列を有するコドン最適化ヒトGAA mRNA配列に相当）を有する。

30

【0043】

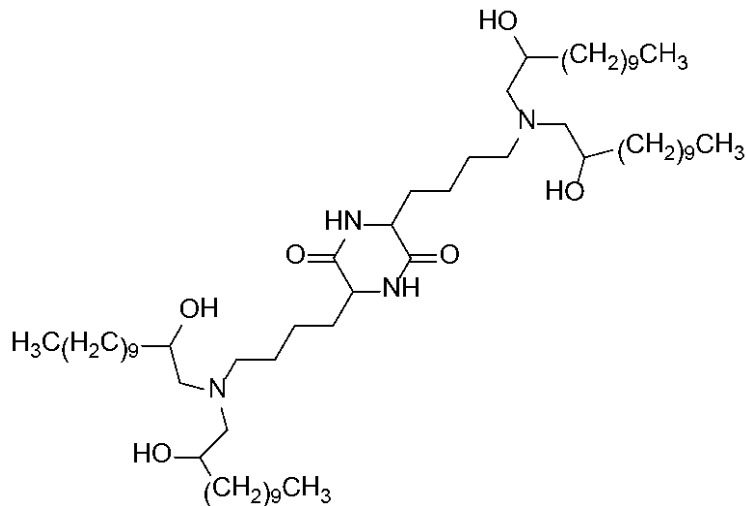
いくつかの実施形態では、mRNAは1つ以上の修飾ヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、1つ以上の修飾ヌクレオチドは、プソイドウリジン、N-1-メチル-プソイドウリジン、2-アミノアデノシン、2-チオチミジン、イノシン、ピロロ-ピリミジン、3-メチルアデノシン、5-メチルシチジン、C-5プロピニルシチジン、C5-プロピニルウリジン、2-アミノアデノシン、C5-プロモウリジン、C5-フルオロウリジン、C5-ヨードウリジン、C5-プロピニル-ウリジン、C5-プロピニル-シチジン、C5-メチルシチジン、2-アミノアデノシン、7-デアザアデノシン、7-デアザグアノシン、8-オキソアデノシン、8-オキソグアノシン、O(6)-メチルグアニン、及び/または2-チオシチジンを含む。いくつかの実施形態では、mRNAは未修飾である。

40

【0044】

一態様では、本発明は、酸性αグルコシダーゼ（GAA）をコードする有効量のmRNAをリポソーム内に封入して含む、ポンペ病の治療用組成物を提供し、ここでリポソームは、カチオン性脂質cKK-E12：

【化 3】



10

を含む。

【0045】

一実施形態では、リポソームは、1つ以上の非カチオン性脂質、1つ以上のコレステロール系脂質、及び1つ以上のPEG修飾脂質をさらに含む。いくつかの実施形態では、1つ以上の非カチオン性脂質は、DSPC（1, 2 - ジステアロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン）、DPPC（1, 2 - ジパルミトイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン）、DOPE（1, 2 - ジオレイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン）、DOPC（1, 2 - ジオレイル - sn - グリセロ - 3 - ホスフォチジルコリン（phosphatidylcholine））、DPPE（1, 2 - ジパルミトイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン）、DMPE（1, 2 - ジミリストイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン）、DOPG（1, 2 - ジオレイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホ - （1' - rac - グリセロール））からなる群から選択される。

20

【0046】

別の実施形態では、1つ以上のコレステロール系脂質は、コレステロール及び／またはPEG化コレステロールから選択される。さらなる実施形態では、1つ以上のPEG修飾脂質は、鎖長 $C_6 \sim C_{20}$ のアルキル鎖（複数可）を有する脂質に共有結合した最大鎖長5 kDaのポリ（エチレン）グリコール鎖を含む。

30

【0047】

別の実施形態では、リポソームは、cKK-E12、DOPE、コレステロール及びDMG-PEG2Kを含む。特定の実施形態では、カチオン性脂質は、リポソームに対して約30～50%のモル比を占める。別の実施形態では、カチオン性脂質は、リポソームに対して約40%のモル比を占める。

【0048】

別の実施形態では、cKK-E12：DOPE：コレステロール：DMG-PEG2Kのモル比は、およそ40：30：20：10である。特定の実施形態では、cKK-E12：DOPE：コレステロール：DMG-PEG2Kのモル比は、およそ40：30：25：5である。さらに別の実施形態では、cKK-E12：DOPE：コレステロール：DMG-PEG2Kのモル比は、およそ40：32：25：3である。一実施形態では、リポソームは、およそ100 nm未満のサイズを有する。

40

【0049】

一実施形態では、組成物を静脈内投与用に製剤化する。別の実施形態では、組成物を筋肉内投与用に製剤化する。別の実施形態では、mRNAは配列番号3を有する。さらなる実施形態では、mRNAはさらに配列番号8の5' UTR配列を含む。さらに別の実施形態では、mRNAはさらに配列番号9または配列番号10の3' UTR配列を含む。特定の実施形態では、mRNAは、配列番号11または配列番号12を有する。

50

【0050】

一態様では、本発明は、酸性 α グルコシダーゼ（GAA）をコードする有効量のmRNAをリポソーム内に封入して含む、ポンペ病の治療用組成物を提供し、ここでmRNAは配列番号3を有し、さらに、リポソームは、カチオン性または非カチオン性脂質、コレステロール系脂質及びPEG修飾脂質を含む。

【0051】

一態様では、本発明は、酸性 α グルコシダーゼ（GAA）をコードする有効量のmRNAをリポソーム内に封入して含む、ポンペ病の治療用組成物を提供し、ここでmRNAは配列番号11または配列番号12を有し、さらに、リポソームは、カチオン性または非カチオン性脂質、コレステロール系脂質及びPEG修飾脂質を含む。

10

【0052】

本発明の他の特徴、目的、及び利点は、以下に記載する発明を実施するための形態、添付の図面及び特許請求の範囲において明らかである。しかしながら、発明を実施するための形態、図面、及び特許請求の範囲は、本発明の実施形態を示してはいるが、これらは単なる例示に過ぎず、限定するものではないことを理解すべきである。本発明の範囲内の様々な変更及び修正は、当業者にとって明らかなものとなるであろう。

特定の実施形態において、例えば、以下が提供される：

（項目1）

ポンペ病の治療方法であって、治療を必要とする被験体に、酸性 α グルコシダーゼ（GAA）をコードするmRNAを含む組成物を、有効な用量及び投与間隔で投与し、ポンペ病の少なくとも1つの症状または特徴の強度、重症度、または頻度を低減するか、または発症を遅らせることを含む、前記治療方法。

20

（項目2）

ポンペ病の治療方法であって、治療を必要とする被験体に、酸性 α グルコシダーゼ（GAA）をコードするmRNAを含む組成物の治療有効量を投与し、被験体の肥大性心筋症を治療することを含む、前記治療方法。

（項目3）

前記mRNAをリポソーム内に封入する、項目1または2に記載の方法。

（項目4）

前記リポソームが、1つ以上のカチオン性脂質、1つ以上の非カチオン性脂質、1つ以上のコレステロール系脂質及び1つ以上のPEG修飾脂質を含む、項目3に記載の方法。

30

（項目5）

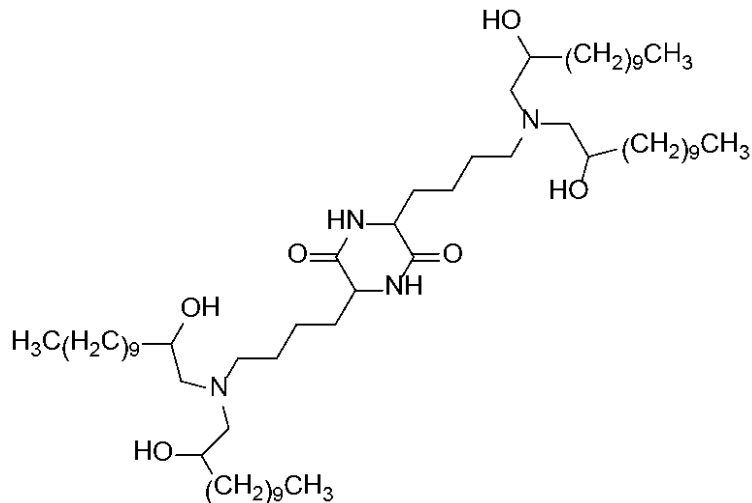
前記1つ以上のカチオン性脂質が、C12-200、MC3、DLinDMA、DLin kC2DMA、cKK-E12、ICE（イミダゾール系）、HGT5000、HGT5001、DODAC、DDAB、DMRIE、DOSPA、DOGS、DODAP、DODMA及びDMDMA、DODAC、DLenDMA、DMRIE、CLinDMA、CpLinDMA、DMOBA、DOcarbDAP、DLinDAP、DLincarbDAP、DLinCDAP、KLin-K-DMA、DLin-K-XTC2-DMA、HGT4003、ならびにそれらの混合物からなる群から選択されるカチオン性脂質を含む、項目4に記載の方法。

40

（項目6）

前記1つ以上のカチオン性脂質が、cKK-E12：

【化 7】



10

を含む、項目 5 に記載の方法。

(項目 7)

前記 1 つ以上の非カチオン性脂質が、D S P C (1, 2 - ジステアロイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホコリン)、D P P C (1, 2 - ジパルミトイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホコリン)、D O P E (1, 2 - ジオレイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン)、D O P C (1, 2 - ジオレイル - s n - グリセロ - 3 - ホスフォチジルコリン)、D P P E (1, 2 - ジパルミトイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン)、D M P E (1, 2 - ジミリストイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン)、D O P G (1, 2 - ジオレオイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホ - (1' - r a c - グリセロール)) 及びそれらの組合せからなる群から選択される、項目 4 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

20

(項目 8)

前記 1 つ以上のコレステロール系脂質が、コレステロール及び／または P E G 化コレステロールである、項目 4 ~ 7 に記載の方法。

30

(項目 9)

前記 1 つ以上の P E G 修飾脂質が、鎖長 $C_6 \sim C_{20}$ のアルキル鎖 (複数可) を有する脂質に共有結合した最大鎖長 5 k D a のポリ (エチレン) グリコール鎖を含む、項目 4 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 10)

前記カチオン性脂質が、前記リポソームの約 30 ~ 50 重量%を占める、先行項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 11)

カチオン性脂質が、リポソームの約 40 重量%を占める、項目 10 に記載の方法。

(項目 12)

カチオン性脂質：非カチオン性脂質：コレステロール：P E G 化脂質の比が、モル比でおよそ 40 : 30 : 20 : 10 である、項目 4 ~ 11 のいずれか一項に記載の方法。

40

(項目 13)

カチオン性脂質：非カチオン性脂質：コレステロール：P E G 化脂質の比が、重量比でおよそ 40 : 30 : 25 : 5 である、項目 4 ~ 11 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 14)

カチオン性脂質：非カチオン性脂質：コレステロール：P E G 化脂質の比が、重量比でおよそ 40 : 32 : 25 : 3 である、項目 4 ~ 11 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 15)

前記リポソームが：

50

c K K - E 1 2、D O P E、コレステロール及びDMG - P E G 2 K；
C 1 2 - 2 0 0、D O P E、コレステロール及びDMG - P E G 2 K；
H G T 4 0 0 3、D O P E、コレステロール及びDMG - P E G 2 K；または、
I C E、D O P E、コレステロール及びDMG - P E G 2 Kから選択される組み合わせ
を含む、項目3～15のいずれか一項に記載の方法。

(項目16)

前記リポソームが約100nm未満のサイズを有する、項目3～15のいずれか一項に
記載の方法。

(項目17)

前記mRNAを、約0.1～5.0mg/kg体重の範囲の有効用量で投与する、先行
項目のいずれか一項に記載の方法。

10

(項目18)

前記mRNAを、約0.1～3.0mg/kg体重の範囲の有効用量で投与する、先行
項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目19)

前記mRNAを、約0.1～1.0mg/kg体重の範囲の有効用量で投与する、先行
項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目20)

前記mRNAを、約1.0mg/kg体重の有効用量で投与する、先行項目のいずれか
一項に記載の方法。

20

(項目21)

前記組成物を静脈内に投与する、先行項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目22)

前記組成物を筋肉内に投与する、先行項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目23)

前記筋肉内投与を、骨格筋、平滑筋、心筋及びそれらの組合せからなる群から選択され
る筋肉に対して行う、項目22に記載の方法。

(項目24)

前記組成物を週1回投与する、先行項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目25)

前記組成物を週2回投与する、項目1～23のいずれか一項に記載の方法。

30

(項目26)

前記組成物を月2回投与する、項目1～23のいずれか一項に記載の方法。

(項目27)

前記組成物を月1回投与する、項目1～23のいずれか一項に記載の方法。

(項目28)

前記組成物を14日に1回投与する、項目1～23のいずれか一項に記載の方法。

(項目29)

前記組成物の前記投与が、肝臓内でのGAAタンパク質の発現をもたらす、先行項目の
いずれか一項に記載の方法。

40

(項目30)

前記組成物の前記投与が、筋肉組織または筋肉細胞内でのGAAタンパク質の発現をも
たらす、先行項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目31)

前記筋肉組織が、骨格筋、平滑筋、心筋及びそれらの組合せから選択される、項目30
に記載の方法。

(項目32)

前記筋肉細胞が、筋細胞、筋管、筋芽細胞、心筋細胞、心筋芽細胞及びそれらの組合せ
からなる群より選択される、項目30に記載の方法。

(項目33)

50

前記組成物の投与が、血清中でのG A Aタンパク質発現をもたらす、先行項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目34)

前記組成物の前記投与の結果、前記被験体の尿中G l c 4レベルが、治療前のベースラインの尿中G l c 4レベルに比べて低下する、先行項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目35)

前記組成物の前記投与の結果、前記被験体の筋グリコーゲンレベルが、治療前のベースラインの筋グリコーゲンレベルに比べて低下する、先行項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目36)

前記組成物の前記投与の結果、前記被験体の肝グリコーゲンレベルが、治療前のベースラインの肝グリコーゲンレベルに比べて低下する、先行項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目37)

前記組成物の前記投与の結果、前記被験体の血清アスパラギン酸トランスアミナーゼレベルが、治療前のベースラインの血清アスパラギン酸トランスアミナーゼレベルに比べて低下する、先行項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目38)

前記組成物の前記投与の結果、前記被験体の血清アラニントランスアミナーゼレベルが、治療前のベースラインの血清アラニントランスアミナーゼレベルに比べて低下する、先行項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目39)

前記組成物の前記投与の結果、前記被験体の血清クレアチンキナーゼレベルが、治療前のベースラインの血清クレアチンキナーゼレベルに比べて低下する、先行項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目40)

前記組成物の前記投与の結果、前記被験体の血清乳酸デヒドロゲナーゼレベルが、治療前のベースラインの血清乳酸デヒドロゲナーゼレベルに比べて低下する、先行項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目41)

前記組成物の前記投与の結果、前記被験体由来の生物学的試料中のG A A酵素活性レベルが、治療前の生物学的試料中のベースラインのG A A酵素活性レベルに比べて上昇する、先行項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目42)

前記mRNAがコドン最適化されている、先行項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目43)

前記コドン最適化mRNAが配列番号3を有する、項目42に記載の方法。

(項目44)

前記mRNAが、配列番号8の5'UTR配列をさらに含む、項目43に記載の方法。

(項目45)

前記mRNAが、配列番号9または配列番号10の3'UTR配列をさらに含む、項目43に記載の方法。

(項目46)

前記mRNAが、配列番号11または配列番号12を有する、先行項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目47)

前記mRNAが、1つ以上の修飾ヌクレオチドを含む、先行項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目48)

前記1つ以上の修飾ヌクレオチドが、プソイドウリジン、N-1-メチル-プソイドウ

10

20

30

40

50

リジン、2 - アミノアデノシン、2 - チオチミジン、イノシン、ピロロ - ピリミジン、3 - メチルアデノシン、5 - メチルシチジン、C - 5 プロピニル - シチジン、C - 5 プロピニル - ウリジン、2 - アミノアデノシン、C 5 - ブロモウリジン、C 5 - フルオロウリジン、C 5 - ヨードウリジン、C 5 - プロピニル - ウリジン、C 5 - プロピニル - シチジン、C 5 - メチルシチジン、2 - アミノアデノシン、7 - デアザアデノシン、7 - デアザグアノシン、8 - オキソアデノシン、8 - オキソグアノシン、O (6) - メチルグアニン及び／または2 - チオシチジンを含む、項目47に記載の方法。

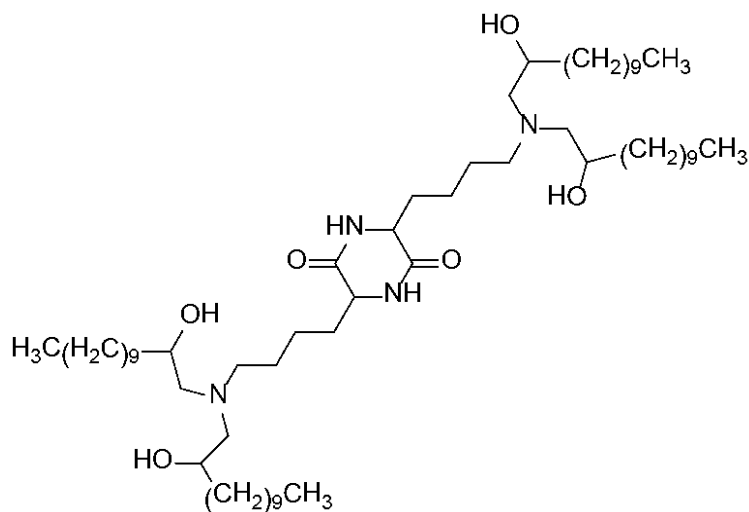
(項目49)

前記mRNAが未修飾である、項目1～46のいずれか一項に記載の方法。

(項目50)

酸性αグルコシダーゼ (G A A) をコードする有効量のmRNAをリポソーム内に封入して含むポンペ病の治療用組成物であって、前記リポソームが、カチオン性脂質 c K K - E 1 2 :

【化8】



を含む、前記治療用組成物。

(項目51)

前記リポソームが、1つ以上の非カチオン性脂質、1つ以上のコレステロール系脂質、及び1つ以上のPEG修飾脂質をさらに含む、項目50に記載の組成物。

(項目52)

前記1つ以上の非カチオン性脂質が、DSPC (1 , 2 - ジステアロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン) 、 DPPC (1 , 2 - ジパルミトイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン) 、 DOPE (1 , 2 - ジオレイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン) 、 DOPC (1 , 2 - ジオレイル - sn - グリセロ - 3 - ホスフォチジルコリン (phosphatidylcholine)) 、 DPPE (1 , 2 - ジパルミトイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン) 、 DMPE (1 , 2 - ジミリストイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン) 、 DOPG (, 2 - ジオレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホ - (1 ' - rac - グリセロール)) 及びそれらの組合せからなる群から選択される、項目51に記載の組成物。

(項目53)

前記1つ以上のコレステロール系脂質が、コレステロール及び／またはPEG化コレステロールから選択される、項目51または52に記載の組成物。

(項目54)

前記1つ以上のPEG修飾脂質が、鎖長C₆～C₂₀のアルキル鎖 (複数可) を有する脂質に共有結合している最大鎖長5kDaのポリ (エチレン) グリコール鎖を含む、項目51～53のいずれか一項に記載の組成物。

(項目 5 5)

前記リポソームが、c K K - E 1 2、D O P E、コレステロール及びD M G - P E G 2 Kを含む、項目 5 0 ～ 5 4 のいずれか一項に記載の組成物。

(項目 5 6)

前記カチオン性脂質が、リポソームの約 3 0 ～ 5 0 m o l % を占める、項目 5 0 ～ 5 5 のいずれか一項に記載の組成物。

(項目 5 7)

前記カチオン性脂質が、リポソームの約 4 0 m o l % を占める、項目 5 6 に記載の組成物。

(項目 5 8)

c K K - E 1 2 : D O P E : コレステロール : D M G - P E G 2 K の比が、モル比でおよそ 4 0 : 3 0 : 2 0 : 1 0 である、項目 5 5 ～ 5 7 のいずれか一項に記載の組成物。

(項目 5 9)

c K K - E 1 2 : D O P E : コレステロール : D M G - P E G 2 K の比が、モル比でおよそ 4 0 : 3 0 : 2 5 : 5 である、項目 5 5 ～ 5 7 のいずれか一項に記載の組成物。

(項目 6 0)

c K K - E 1 2 : D O P E : コレステロール : D M G - P E G 2 K の比が、モル比でおよそ 4 0 : 3 2 : 2 5 : 3 である、項目 5 5 ～ 5 7 のいずれか一項に記載の組成物。

(項目 6 1)

前記リポソームが約 1 0 0 n m 未満のサイズを有する、項目 5 0 ～ 6 0 のいずれか一項に記載の組成物。

(項目 6 2)

前記組成物を静脈内投与用に製剤化する、項目 5 0 ～ 6 1 のいずれか一項に記載の組成物。

(項目 6 3)

前記組成物を筋肉内投与用に製剤化する、項目 5 0 ～ 6 1 のいずれか一項に記載の組成物。

(項目 6 4)

前記m R N A が配列番号 3 を有する、項目 5 0 ～ 6 3 のいずれか一項に記載の組成物。

(項目 6 5)

前記m R N A が、配列番号 8 の 5 ' U T R 配列をさらに含む、項目 6 4 に記載の組成物。

(項目 6 6)

前記m R N A が、配列番号 9 または配列番号 1 0 の 3 ' U T R 配列をさらに含む、項目 6 4 に記載の組成物。

(項目 6 7)

前記m R N A が、配列番号 1 1 または配列番号 1 2 を有する、項目 5 0 ～ 6 6 のいずれか一項に記載の組成物。

(項目 6 8)

ポンベ病の治療用組成物であって、酸性αグルコシダーゼ (G A A) をコードする有効量のm R N A をリポソーム内に封入して含み、前記m R N A が配列番号 3 を有し、及び、前記リポソームが、カチオン性脂質、非カチオン性脂質、コレステロール系脂質及びP E G 修飾脂質をさらに含む、前記治療用組成物。

(項目 6 9)

ポンベ病の治療用組成物であって、酸性αグルコシダーゼ (G A A) をコードする有効量のm R N A をリポソーム内に封入して含み、前記m R N A が配列番号 1 1 または配列番号 1 2 を有し、及び、

前記リポソームが、カチオン性脂質、非カチオン性脂質、コレステロール系脂質及びP E G 修飾脂質をさらに含む、前記治療用組成物。

【 0 0 5 3 】

10

20

30

40

50

図面は説明を目的としたものに過ぎず、限定するものではない。

【図面の簡単な説明】

【0054】

【図1A】GAA mRNAカプセル化脂質ナノ粒子の1.0mg/kg静脈内単回投与による治療の6時間後に、マウス由来筋組織に対して実施したin situハイブリダイゼーションによるGAA mRNA検出の一例を示す。

【図1B】GAA mRNAカプセル化脂質ナノ粒子の1.0mg/kg静脈内単回投与による治療の12時間後に、マウス由来筋組織に対して実施したin situハイブリダイゼーションによるGAA mRNA検出の一例を示す。

【図2A】GAA mRNAカプセル化脂質ナノ粒子の1.0mg/kg静脈内単回投与による治療の24時間後における、GAAノックアウトマウスの肝臓内でのグリコーゲン低下の一例を示す。

10

【図2B】GAA mRNAカプセル化脂質ナノ粒子による治療を実施しなかったGAAノックアウトマウスの肝臓内でのグリコーゲン蓄積の一例を示す。

【図3】GAA mRNAカプセル化脂質ナノ粒子の1.0mg/kg筋肉内単回投与による治療の24時間後に、マウス由来筋組織に対して実施したin situハイブリダイゼーションによるGAA mRNA検出の一例を示す。

【図4A】GAA mRNAカプセル化脂質ナノ粒子の1.0mg/kg筋肉内単回投与による治療の24時間後における、GAAノックアウトマウスの四頭筋内でのグリコーゲン低下の一例を示す。

20

【図4B】GAA mRNAカプセル化脂質ナノ粒子の1.0mg/kg筋肉内単回投与による治療の24時間後における、GAAノックアウトマウスの四頭筋内でのグリコーゲン低下の一例を示す。

【図4C】GAA mRNAカプセル化脂質ナノ粒子による治療を実施しなかったGAAノックアウトマウスの四頭筋内でのグリコーゲンレベルの一例を示す。

【図4D】GAA mRNAカプセル化脂質ナノ粒子による治療を実施しなかったGAAノックアウトマウスの四頭筋内でのグリコーゲンレベルの一例を示す。

【発明を実施するための形態】

【0055】

定義

30

本発明がより容易に理解されるように、初めにいくつかの用語を以下に定義する。以下の用語及び他の用語の追加の定義を、本明細書全体の随所において記載する。本明細書中で参照し、本発明の背景を説明するとともに、その実施に関するさらなる詳細を提供する刊行物及び他の参考資料を、参照として本明細書に援用する。

【0056】

アルキル：本明細書中で使用する場合、「アルキル」とは、1～15個の炭素原子を有する直鎖または分枝鎖飽和炭化水素基（「C₁₋₁₅アルキル」）のラジカルを指す。いくつかの実施形態では、アルキル基は1～3個の炭素原子を有する（「C₁₋₃アルキル」）。C₁₋₃アルキル基の例として、メチル（C₁）、エチル（C₂）、n-プロピル（C₃）、及びイソプロピル（C₃）が挙げられる。いくつかの実施形態では、アルキル基は8～12個の炭素原子（「C₈₋₁₂アルキル」）を有する。C₈₋₁₂アルキルの例として、n-オクチル（C₈）、n-ノニル（C₉）、n-デシル（C₁₀）、n-ウンデシル（C₁₁）、n-ドデシル（C₁₂）などが挙げられるが、必ずしもこれらに限定するものではない。接頭語「n-」（normal）は、非分枝アルキル基を指す。例えば、n-C₈アルキルは-(CH₂)₇CH₃を指し、n-C₁₀アルキルは-(CH₂)₉CH₃を指す、などである。

40

【0057】

アミノ酸：本明細書中で使用する場合、用語「アミノ酸」とは、その最も広い意味で、ポリペプチド鎖に取り込み可能な任意の化合物及び／または物質を指す。いくつかの実施形態では、アミノ酸は一般構造H₂N-C(H)(R)-COOHを有する。いくつかの

50

実施形態では、アミノ酸は天然に存在するアミノ酸である。いくつかの実施形態では、アミノ酸は合成アミノ酸であり；いくつかの実施形態では、アミノ酸は、d - アミノ酸であり；いくつかの実施形態では、アミノ酸はl - アミノ酸である。「標準アミノ酸」とは、天然に存在するペプチドに共通して見出される20種類の標準的なl - アミノ酸のいずれかを指す。「非標準アミノ酸」とは、合成的に調製したものか、または天然源から得たものかどうかに関わらず、標準アミノ酸以外の任意のアミノ酸を意味する。本明細書中で使用する場合、「合成アミノ酸」は、化学的に修飾したアミノ酸を包含し、これには塩類、アミノ酸誘導体（アミド類など）、及び／または置換が含まれるが、必ずしもこれらに限定するものではない。ペプチド内のカルボキシ末端及び／またはアミノ末端のアミノ酸を含むアミノ酸はそれらの活性に悪影響を及ぼすことなくペプチドの循環半減期を変化させることが可能な、メチル化、アミド化、アセチル化、保護基及び／または他の化学基との置換によって修飾することができる。アミノ酸はジスルフィド結合に関与していてもよい。アミノ酸は、1つ以上の化学的実体（例えば、メチル基、アセテート基、アセチル基、リン酸基、ホルミル部分、イソプレノイド基、硫酸基、ポリエチレングリコール部分、脂質部分、炭水化物部分、ビオチン部分など）との会合のような1つまたは翻訳後修飾を含んでいてもよい。用語「アミノ酸」は、「アミノ酸残基」と同じ意味で用いており、さらには遊離アミノ酸及び／またはペプチドのアミノ酸残基を指すことがある。用語が遊離アミノ酸を指すのか、またはペプチドの残基を指すのかは、その用語を用いている文脈から明らかであろう。

10

【0058】

20

動物：本明細書中で使用する場合、用語「動物」とは、動物界の任意のメンバーを指す。いくつかの実施形態では、「動物」は、任意の発達段階のヒトを指す。いくつかの実施形態では、「動物」は、任意の発達段階の非ヒト動物を指す。特定の実施形態では、非ヒト動物は哺乳類（例えば、げっ歯類、マウス、ラット、ウサギ、サル、イヌ、ネコ、ヒツジ、ウシ、霊長類、及び／またはブタ）である。いくつかの実施形態において、動物には、哺乳類、鳥類、爬虫類、両生類、魚類、昆虫類、及び／または虫類が含まれるが、必ずしもこれらに限定するものではない。いくつかの実施形態では、動物は、トランスジェニック動物、遺伝子改変動物、及び／またはクローンであってもよい。

【0059】

30

およそ（Approximately）または約（about）：本明細書中で使用する場合、用語「およそ」または「約」は、それに関心のある1つ以上の値に適用する場合、記載する基準値に類似する値を指す。特定の実施形態において、用語「およそ（approximately）」または「約（about）」は、特段の記載がない限り、または文脈から明らかな場合を除き、記載する値のいずれかの方向（より大きいまたはより小さい）に対して、25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、またはそれ未満に収まる数値範囲を指す（そのような数値が可能値の100%を超える場合を除く）。

【0060】

40

生物学的に活性：本明細書中で使用する場合、語句「生物学的に活性」とは、生物学的系内で、特に生物内で活性を有する任意の薬剤の特性を指す。例えば、生物に投与した場合に、その生物に対して生物学的効果を有する薬剤は、生物学的に活性であると考えられる。

【0061】

送達：本明細書中で使用する場合、用語「送達」は、局所送達及び全身送達の両方を包含する。例えば、mRNAの送達は、mRNAを標的組織に送達し、コードするタンパク質が標的組織内で発現し、及び保持される状況（「局所分配」または「局所送達」とも呼ぶ）、ならびにmRNAを標的組織に送達し、コードするタンパク質が発現し、及び患者の循環系（例えば血清）に分泌されて全身に分配され、他の組織によって取り込まれる（「全身分配」または「全身送達」とも呼ぶ）状況を包含する。

50

【0062】

発現：本明細書中で使用する場合、核酸配列の「発現」とは、mRNAのポリペプチドへの翻訳、複数のポリペプチドからのインタクトなタンパク質（例えば、酵素）への組立て、及び／またはポリペプチドもしくは完全に組み立てられたタンパク質（例えば、酵素）の翻訳後修飾を指す。本願では、用語「発現」及び「産生」、ならびに文法上の同等表現を、同じ意味で用いる。

【0063】

機能性：本明細書中で使用する場合、「機能性」生体分子とは、それを特徴付ける特性及び／または活性を示す形態の生体分子である。

【0064】

半減期：本明細書中で使用する場合、用語「半減期」とは、核酸またはタンパク質の濃度または活性などの量が、ある期間の開始時に測定したその値の半分に低下するのに要する時間のことである。

【0065】

向上する、上昇する、または低下する：本明細書中で使用する場合、用語「向上する」、「上昇する」もしくは「低下する」、または文法上の同等表現は、本明細書に記載の治療の開始前の同じ個体における測定値などのベースライン測定値、または本明細書に記載の治療の非存在下での対照被験体（または複数の対照被験体）における測定値と比較した値を示す。「対照被験体」とは、治療対象の被験体と同じ型の疾患に罹患する、治療対象とほぼ同じ年齢の被験体である。

【0066】

in vitro：本明細書中で使用する場合、用語「*in vitro*」とは、多細胞生物内ではなく、人工環境、例えば、試験管または反応容器内、細胞培養物中などで生じる事象を指す。

【0067】

in vivo：本明細書中で使用する場合、用語「*in vivo*」とは、ヒト及び非ヒト動物のような多細胞生物内で起こる事象を指す。細胞ベースのシステムの文脈において、本用語は、（例えば、*in vitro*系とは対照的に）生細胞内で起こる事象を指すために使用してもよい。

【0068】

単離した：本明細書中で使用する場合、用語「単離した」とは、（１）最初に産生した際に（自然状態で及び／または実験上の設定の下で）、関連する成分の少なくともいくつかから分離した物質及び／または実体、及び／または（２）人の手によって生産、調製、及び／または製造したものを指す。単離した物質及び／または実体は、最初の時点でそれらと関連していた他の成分の、約１０％、約２０％、約３０％、約４０％、約５０％、約６０％、約７０％、約８０％、約９０％、約９１％、約９２％、約９３％、約９４％、約９５％、約９６％、約９７％、約９８％、約９９％、または約９９％超から分離され得る。いくつかの実施形態において、単離した薬剤は、約８０％、約８５％、約９０％、約９１％、約９２％、約９３％、約９４％、約９５％、約９６％、約９７％、約９８％、約９９％、または約９９％超の水準において純粋である。本明細書中で使用する場合、物質が実質的に他の成分を含まない場合、それは「純粋」である。本明細書中で使用する場合、単離した物質及び／または実体のパーセント純度の計算には、賦形剤（例えば、緩衝剤、溶媒、水など）を含めるべきではない。

【0069】

局所分配または送達：本明細書で使用する場合、用語「局所分配」、「局所送達」または文法上の同等表現は、組織特異的送達または分配を指す。一般的には、局所的な分配または送達には、mRNAがコードするタンパク質（例えば、酵素）を、細胞内において翻訳及び発現させるか、または分泌を限定的にとどめて患者の循環器系に入ることを避けることが必要である。

【0070】

メッセンジャーRNA (mRNA) : 本明細書中で使用する場合、用語「メッセンジャーRNA (mRNA)」とは、少なくとも1つのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを指す。本明細書中で用いるmRNAは、修飾RNA及び非修飾RNAの両方を包含する。mRNAは、1つ以上のコード領域及び非コード領域を含み得る。mRNAは、天然資源から精製したり、組換え発現系を用いて産生し、さらに必要に応じて精製したり、化学的に合成したりすることができる。適切には、例えば、化学合成した分子の場合、mRNAに、例えば化学修飾した塩基または糖、骨格修飾などを備えたアナログなどのヌクレオシドアナログを含ませることができる。他に特段の指定がない限り、mRNA配列は5'から3'の方向に提示する。いくつかの実施形態では、mRNAは、天然ヌクレオシド (例えば、アデノシン、グアノシン、シチジン、ウリジン) ; ヌクレオシドアナログ (例えば、2-アミノアデノシン、2-チオチミジン、イノシン、ピロロピリミジン、3-メチルアデノシン、5-メチルシチジン、C-5プロピニル-シチジン、C-5プロピニル-ウリジン、2-アミノアデノシン、C5-ブロモウリジン、C5-フルオロウリジン、C5-ヨードウリジン、C5-プロピニル-ウリジン、C5-プロピニル-シチジン、C5-メチルシチジン、2-アミノアデノシン、7-デアザアデノシン、7-デアザグアノシン、8-オキソアデノシン、8-オキソグアノシン、O(6)-メチルグアニン、及び2-チオシチジン) ; 化学的修飾塩基 ; 生物学的修飾塩基 (例えば、メチル化塩基) ; インターカレート塩基 ; 修飾糖類 (例えば、2'-フルオロリボース、リボース、2'-デオキシリボース、アラビノース、及び六炭糖) ; 及び/または修飾リン酸基 (例えば、ホスホロチオエート及び5'-N-ホスホラミダイト結合) であるか、またはそれらを含む。

10

20

【0071】

筋肉細胞または筋肉組織 : 本明細書中で使用する場合、用語「筋肉細胞」または「筋肉組織」とは、その最も広い意味で、筋肉に由来する細胞または細胞群を指し、必ずしも限定するものではないが、骨格筋 (例えば、横紋筋、随意筋) に由来する細胞及び組織 ; 消化管、膀胱及び血管由来の平滑筋 (例えば、内臓筋、不随意筋) ; 及び心筋を含む。本用語は、*in vivo* 及び *in vitro* での筋肉細胞を指す。本用語には、筋細胞、筋管、筋芽細胞、心筋細胞及び心筋芽細胞などの、分化及び未分化の、または非分化の筋細胞も含まれる。

【0072】

30

核酸 : 本明細書中で使用する場合、用語「核酸」とは、その最も広い意味において、ポリヌクレオチド鎖に組み込まれているか、または組み込まれ得る任意の化合物及び/または物質を指す。いくつかの実施形態では、核酸は、ホスホジエステル結合を介してポリヌクレオチド鎖に組み込まれているか、または組み込まれ得る化合物及び/または物質である。いくつかの実施形態では、「核酸」とは、個々の核酸残基 (例えば、ヌクレオチド及び/またはヌクレオシド) を指す。いくつかの実施形態では、「核酸」は、個々の核酸残基を含むポリヌクレオチド鎖を指す。いくつかの実施形態では、「核酸」は、RNAならびに一本鎖及び/または二本鎖DNA及び/またはcDNAを包含する。

【0073】

患者 : 本明細書中で使用する場合、用語「患者」または「被験体」は、例えば実験、診断、予防、美容、及び/または治療を目的として、提供組成物を投与し得る任意の生物を指す。一般的な患者として、動物 (例えば、マウス、ラット、ウサギ、非ヒト霊長類、及び/またはヒトなどの哺乳類) が挙げられる。いくつかの実施形態では、患者はヒトである。ヒトは、出生前及び出生後の形態を含む。

40

【0074】

薬学的に許容可能な : 本明細書中で使用する用語「薬学的に許容可能な」とは、正常な医学的判断の範囲内で、ヒト及び動物の組織に接触させて使用するのに適した物質であって、過度の毒性、刺激、アレルギー反応、または他の問題もしくは合併症を呈することがなく、合理的なリスク対効果比に見合った物質を指す。

【0075】

50

薬学的に許容可能な塩：薬学的に許容可能な塩は、当該技術分野で周知である。例えば、S. M. Bergeらは、J. Pharmaceutical Sciences (1977) 66: 1 - 19において、薬学的に許容可能な塩を詳細に記載している。本発明の化合物の薬学的に許容可能な塩は、適切な無機及び有機の酸及び塩基に由来するものを含む。薬学的に許容可能な非毒性の酸付加塩の例として、以下のような無機酸、例えば塩酸、臭化水素酸、リン酸、硫酸及び過塩素酸、または以下のような有機酸、例えば酢酸、シュウ酸、マレイン酸、酒石酸、クエン酸、コハク酸もしくはルナロニック酸 (rnalonic acid) を用いて、またはイオン交換のような当該技術分野で用いられる他の方法を用いて形成したアミノ基の塩が挙げられる。他の薬学的に許容可能な塩の例として、アジピン酸塩、アルギン酸塩、アスコルビン酸塩、アスパラギン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、安息香酸塩、硫酸水素塩、ホウ酸塩、酪酸塩、樟脳酸塩、樟脳スルホン酸塩、クエン酸塩、シクロペンタンプロピオン酸塩、ジグルコン酸塩、ドデシル硫酸塩、エタンスルホン酸塩、ギ酸塩、フマル酸塩、グルコヘプトン酸塩、グリセロリン酸塩、グルコン酸塩、ヘミ硫酸塩、ヘプタン酸塩、ヘキササン酸塩、ヨウ化水素酸塩、2 - ヒドロキシ - エタンスルホン酸塩、ラクトビオン酸塩、乳酸塩、ラウリン酸塩、ラウリル硫酸塩、リンゴ酸塩、マレイン酸塩、マロン酸塩、メタンスルホン酸塩、2 - ナフタレンスルホン酸塩、ニコチン酸塩、硝酸塩、オレイン酸塩、シュウ酸塩、パルミチン酸塩、パモ酸塩、ペクチン酸塩、過硫酸塩、3 - フェニルプロピオン酸塩、リン酸塩、ピクリン酸塩、ピバリン酸塩、プロピオン酸塩、ステアリン酸塩、コハク酸塩、硫酸塩、酒石酸塩、チオシアン酸塩、p - トルエンスルホン酸塩、ウンデカン酸塩、吉草酸塩などが挙げられる。適切な塩基から誘導される塩として、アルカリ金属、アルカリ土類金属、アンモニウム及び N^+ (C_{1-4} アルキル)₄ 塩が挙げられる。代表的なアルカリまたはアルカリ土類金属塩として、ナトリウム、リチウム、カリウム、カルシウム、マグネシウムなどが挙げられる。適切な場合には、さらなる薬学的に許容可能な塩として、無毒性のアンモニウム、第四級アンモニウム、ならびにハロゲン化物、水酸化物、カルボン酸塩、硫酸塩、リン酸塩、硝酸塩、スルホン酸塩、及びアリアルスルホン酸塩などの対イオンを用いて形成したアミンカチオンが挙げられる。さらなる薬学的に許容可能な塩として、例えばハロゲン化アルキルなどの適切な求電子剤を用いてアミンを四級化して第四級アルキル化アミノ塩を形成する塩が挙げられる。

【0076】

全身分配または送達：本明細書中で使用する場合、用語「全身分配」、「全身送達」または文法上の同等表現は、身体全体または生物全体に影響を及ぼす送達または分配の機構またはアプローチを指す。通常、全身分配または送達は、体の循環系、例えば血流を介して達成される。「局所分配または送達」の定義と比較されたい。

【0077】

被験体：本明細書中で使用する場合、用語「被験体」とは、ヒトまたは任意の非ヒト動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ウシ、ブタ、ヒツジ、ウマまたは霊長類）を指す。ヒトには、出生前と出生後の両方の形態が含まれる。多くの実施形態では、被験体はヒトである。被験体は、患者であることができ、すなわち、疾患の診断または治療のために医療提供者を訪れるヒトを指す。用語「被験体」は、本明細書では「個体」または「患者」と同じ意味で用いる。被験体は、疾患または障害に罹患しているかまたは罹患しやすい状況にある可能性が高いが、疾患または障害の症状を示していても、示していなくてもよい。

【0078】

実質的に：本明細書中で使用する場合、用語「実質的に」とは、関心対象の特徴または特性が、全体またはほぼ全体の範囲または程度にわたっていることを示す定性的状態を指す。生物学的技術分野の当業者であれば、生物学的及び化学的現象が完了すること、及び／または完全性を達成すること、または絶対的結果を達成もしくは回避することは、あるにしても極めて稀であることを理解するだろう。したがって、本明細書中では、用語「実質的に」を、多くの生物学的及び化学的現象に固有の完全性の潜在的な欠如を捕捉するた

めに用いる。

【0079】

標的組織：本明細書中で使用する場合、用語「標的組織」とは、治療しようとする疾患が影響を及ぼしている任意の組織を指す。いくつかの実施形態では、標的組織には、疾患に関連する病徴、症状または特徴を示す組織が含まれる。

【0080】

治療有効量：本明細書中で使用する場合、治療薬の「治療有効量」という用語は、疾患、障害、及び／または病態に罹患しているかまたは罹患しやすい状態にある被験体に投与した場合に、疾患、障害、及び／または病態の症状（複数可）を治療、診断、予防及び／またはその発症を遅延させるのに十分な量を意味する。通常、治療有効量を、少なくとも1つの単位用量を含む投与レジメンを介して投与することは、当業者であれば理解するであろう。

【0081】

治療：本明細書中で使用する場合、用語「治療する（treat）」、「治療（treatment）」または「治療すること（treating）」とは、被験体の特定の疾患、障害及び／または病態の1つ以上の症状または特徴を、部分的または完全に、緩和し、寛解し、軽減し、阻害し、防止し、発症を遅延させ、重症度を低減し、及び／または発症率を低下させるために用いる任意の方法を指す。疾患に関連する病徴の発症リスクを低減するために、治療は、疾患の症状を示していない及び／または疾患の早期症状のみを示す被験体に対して投与してもよい。

【0082】

詳細な説明

本発明は、とりわけ、mRNA療法に基づくポンペ病の治療方法及び組成物を提供する。特に、本発明は、治療を必要とする被験体に、酸性αグルコシダーゼ（GAA）をコードするmRNAを含有する組成物を、有効な用量及び投与間隔で投与し、それによってポンペ病の少なくとも1つの症状または特徴の、強度、重症度、もしくは頻度を低下させるか、または発症を遅らせることによってポンペ病を治療する方法を提供する。本発明はさらに、治療を必要とする被験体に、酸性αグルコシダーゼ（GAA）をコードするmRNAを含有する組成物の治療有効量を投与し、それによって被験体の肥大性心筋症を治療することを含む、ポンペ病の治療方法を提供する。いくつかの実施形態では、mRNAを1つ以上のリポソーム内に封入する。本明細書中で使用する場合、用語「リポソーム」とは、任意の層状、多層状、または固体のナノ粒子小胞を指す。一般的には、本明細書中で使用するリポソームは、1種以上の脂質を混合することによって、または1種以上の脂質と1種以上のポリマー（複数可）とを混合することによって形成することができる。したがって、本明細書で使用する用語「リポソーム」は、脂質系及びポリマー系ナノ粒子の両方を包含する。いくつかの実施形態では、本発明に適したリポソームは、カチオン性または非カチオン性脂質（複数可）、コレステロール系脂質（複数可）及びPEG修飾脂質（複数可）を含有する。

【0083】

ポンペ病

本発明を、ポンペ病に罹患しているか、または罹患しやすい被験体を治療するために使用してもよい。ポンペ病は、酸性αグルコシダーゼ（GAA）酵素の遺伝子中の変異を特徴とする常染色体劣性代謝遺伝性障害である。GAA酵素は：酸性マルターゼ、マルターゼ、マルターゼ-グルコアミラーゼ、グルオインベルターゼ（glucoinvertase）、グルコシドスクラーゼ、αグルコシダーゼα、α-1, 4-グルコシダーゼ、アミログルコシダーゼ、グルコアミラーゼ、LYAG、LYAG_HUMAN、リソソームαグルコシダーゼ及びαグルコシダーゼ、酸としても知られている。GAA遺伝子（グルコシダーゼα；酸）は：酸性マルターゼ、α-1, 4-グルコシダーゼ及びαグルコシダーゼ、酸としても知られている。ポンペ病を引き起こす200種以上の突然変異がGAA遺伝子において同定されている。これらの突然変異のほとんどは、単一のアミノ酸置換及び

小さな挿入または欠失を含んでいる。G A A 遺伝子の突然変異の多くは、得られるタンパク質の構造に影響を与え、その活性を低下させている可能性がある。G A A 遺伝子の突然変異のうちのいくつかは、異常に短くなった酵素の産生をもたらし、そのような酵素はグリコーゲンの加水分解においてその役割を効果的に果たすことができない。

【0084】

酸性 α グルコシダーゼ酵素の欠損は、グリコーゲンを加水分解する細胞の能力を低下させ、その結果、細胞及び組織、特に肝臓及び筋肉にグリコーゲンが蓄積する。グリコーゲンの蓄積は細胞死をもたらし、それは進行性筋力低下、心筋症及び呼吸不全として現れる。

【0085】

本明細書に記載の組成物及び方法は、ポンペ病の少なくとも1つの症状または特徴を治療するために使用し得る。特に、本明細書に記載の組成物及び方法は、肥大性心筋症を治療するために使用し得る。

【0086】

酸性 α グルコシダーゼ (G A A)

いくつかの実施形態において、本発明は、ポンペ病の治療のための、G A A をコードする m R N A の被験体への送達方法及び組成物を提供する。適切な G A A m R N A は、天然の G A A タンパク質の活性を置き換えることができ、及び／またはポンペ病に関連する1つ以上の症状の強度、重症度、及び／または頻度を低下させることができる G A A タンパク質の全長、断片または部分のいずれかをコードしている。

【0087】

いくつかの実施形態では、適切な m R N A 配列は、ヒト G A A タンパク質をコードする m R N A 配列である。天然に存在するヒト G A A m R N A コード配列及び対応するアミノ酸配列を表1に示す：

10

20

【表 1 - 1】

表 1. ヒト GAA

ヒト GAA (mRNA コード配 列)	(配列番号 1)
	AUGGGAGUGAGGCACCCGCCCUGCUCCACCGGCUCCUGGCCGUCUGCGCCCUCGUGUCCUUGGCAAC CGCUGCACUCCUGGGGCACAUCCUACUCCAUGAUUCCUGCUGGUUCCCCGAGAGCUGAGUGGCUCU CCCCAGUCCUGGAGGAGACUACCCAGCUCACCAGCAGGGAGCCAGCAGACCAGGGCCCCGGGAUGCC CAGGCACACCCCGGCCGUCCAGAGCAGUGCCCACACAGUGCGACGUCCCCCAACAGCCGCUUGCA UUGCGCCCCUGACAAGGCCAUCACCCAGGAACAGUGCGAGGCCCGCGGCUGUUGCUACAUCCUGCAA AGCAGGGGCGCAGGGAGCCCAGAUGGGGCGAGCCUUGGUGCUUCUCCCCACCCAGCUACCCAGCUAC AAGCUGGAGAACCUGAGCUCCUCUGAAAUGGGCUACACGGCCACCCUGACCCGUACCCACCCACCUU CUUCCCCAAGGACAUCCUGACCCUGCGGCUGGACGUGAUGGAGACUGAGAACCGCCUCCACUUA CGAUCAAAGAUCCAGCUAACAGGCGCUACGAGGUGCCCUUGGAGACCCCGCAUGUCCACAGCCGGGCA CCGUCCCCACUCUACAGCGUGGAGUUCUCCGAGGAGCCCUUCGGGGUGAUCGUGCGCCGGCAGCUGGA CGGCCGCGUGCUGCUGAACACGACGGUGGCGCCCUUGUUCUUGCGGACCAGUCCUUCAGCUGUCCA CCUCGCGUCCCUCCAGUAUAUACAGGCCUCGCCGAGCACCUCAGUCCCUUGAUGCUCAGCACCAGC UGGACCAGGAUCACCCUGUGGAACCGGGACCUUGCGCCACGCCCGGUGCGAACCUCUACGGGUCUA CCCUUUCUACCUGGCGUGGAGGACGGCGGGUCGGCACACGGGGUGUCCUGCUAAACAGCAAUGCCA UGGAUGUGGUCCUGCAGCCGAGCCUGCCCUUAGCUGGAGGUCGACAGGUGGGAUCCUGGAUGUCUAC AUCUCCUGGGCCAGAGCCCAAGAGCGUGGUGCAGCAGUACCUGGACGUUGUGGGAUACCCGUUCAU GCCGCCAUACUGGGGCCUGGGCUUCCACCUGUGCCGUGGGGCUACUCCUCCACCGCUAUCACCCGCC AGGUGGUGGAGAACAUAGACCAGGGCCACUCCCCUGGACGUCCAGUGGAACGACCUGGACUACAUG GACUCCCGGAGGGACUUCACGUUAACAAGGAUGGUUCCGGGACUUCCCGGCAUGGUGCAGGAGCU GCACCAGGGCGGCCGGCGCUACAUGAUGAUCGUGGAUCCUGCCAUCAGCAGCUCGGGCCUGCCGGGA GCUACAGGCCUACGACGAGGGUCUGCGGAGGGGGUUUUAUCACCAACGAGACCGGCCAGCCGUG AUUGGGAAGGUAUGGCCCGGGUCCACUGCCUCCCCGACUUCACCAACCCACAGCCUGGCCUGGUG GGAGGACAUGGUGGCUGAGUCCAUGACCAGGUGCCCUUCGACGGCAUGUGGAUUGACAUGAACGAGC CUUCCAACUUAUCAGGGGCUUGAGGACGGCUGCCCCAACAAUGAGCUGGAGAACCACCCUACGUG CCUGGGGUGGUUGGGGGACCCUCCAGGCGGCCACCAUCUGUGCCUCCAGCCACCAGUUCUCUCCAC ACACUACAACCUGCACAACCUCUACGGCCUGACCGAAGCCAUCGCCUCCACAGGGCGCUGGUGAAGG CUCGGGGGACACGCCCAUUUGUGAUCUCCCGCUCGACCUUUGCUGGCCACGGCCGAUACGCCGGCCAC UGGACGGGGGACGUGUGGAGCUCCUGGAGCAGCUCGCCUCCUCCGUGCCAGAAAUCUGCAGUUUAA CCUGCUGGGGGUGCCUCUGGUCGGGGCCGACGUCUGCGGCUUCCUGGGCAACACCUCAGAGGAGCUGU GUGUGCGCUGGACCCAGCUGGGGGCCUUCUACCCCUUAUGCGGAACCACAACAGCCUGCUCAGUCUG CCCCAGGAGCCGUACAGCUUCAGCGAGCCGGCCAGCAGGCCAUGAGGAAGGCCUACCCUGCGCUA CGCACUCCUCCCCACCUCUACACUGUCCACCAGGCCACGUCGCGGGGAGACCGUGGCCCGGC

10

20

30

40

【表 1-2】

	CCCUCUCCUGGAGUCCCCAAGGACUCUAGCACCUGGACUGUGGACCACCAGCUCCUGUGGGGGGAG GCCCUGCUCAUCACCCCAGUGCUCCAGGCCGGAAGGCCGAAGUGACUGGCUACUCCCCUUGGGCAC AUGGUACGACCUGCAGACGGUGCCAGUAGAGGCCCUUGGCAGCCUCCACCCCCACCUGCAGCUCCCC GUGAGCCAGCCAUCCACAGCGAGGGGCAGUGGGUGACGUGCCGGCCCCCUGGACACCAUCAACGUC CACCUCGGGGCUGGGUACAUAUCCCCUGCAGGGGCCUGGCCUCACAACCACAGAGUCCCGCCAGCA GCCCAUGGCCUGGCUGUGGCCUGACCAAGGGUGGGGAGGCCGAGGGGAGCUGUUCUGGGACGAUG GAGAGAGCCUGGAAGUGCUGGAGCGAGGGGCCUACACACAGGUCAUCUUCUGGCCAGGAAUAACAG AUCGUGAAUGAGCUGGUACGUGUGACCAGUGAGGGAGCUGGCCUGCAGCUGCAGAAGGUGACUGUCCU GGGCGUGGCCACGGCGCCCCAGCAGGUCCUCUCCAACGGUGUCCUGUCUCCAACUUCACCUACAGCC CCGACACCAAGGUCCUGGACAUCUGUGUCUCGCUGUUGAUGGGAGAGCAGUUUCUGCAGCUGGUGU UAG	10
ヒト GAA (アミノ酸 配列)	(配列番号 2) MGVRHPPCSHRLAVCALVSLATAALLGHILLHDFLLVPRELSGSSPVLEETHPAHQQASRPGRDA QAHPGRPRAVPTQCDVPPNSRFDCAPKAITQEQCEARGCCYIPAKQGLQGAQMGPWCFFPPSYPSY KLENLSSSEMGYTATLTRTPTFFPKDILTLRLDVMETENRLHFTIKDPANRRYEVPLETPHVSRA PSPLYSVFESEEPFGVIVRRQLDGRVLLNTTVAPLFFADQLQLSTSLPSQYITGLAEHLSPLMLSTS WTRITLWNRDLAPTGANLYGSHPFYLALEDGGSAGHVFLNLSNAMDVVLQPSALSWRSTGGILDVY IFLGPEPKSVVQQYLDVVGYPFMPYPWGLGFHLCRWGYSSATAITRQVVENMTRAHFPLDVQWNDLDYM DSRRDFTFNKDGFRDFPAMVQELHQGGRYMMIVDPAISSSGPAGSYRPYDEGLRRGVFITNETGQPL IGKVPWGSTAFPDFTNPTALAWWEDMVAEFHDQVPFDGMWIDMNEPSNFIGRSEDGCPNNELENPPYV PGVVGGTLQAATICASSHQFLSTHYNLHNLGLTEAIAASHRALVKARGTRPFVISRSTFAGHGRYAGH WTGDVWSSWEQLASSVPEILQFNLLGVPLVGADVCGFLGNTSEELCVRWTQLGAFYFPMRHNHLSLSL PQEPYSFSEPAQQAMRKALTLYALLPHLYTLFHQAHVAGETVARPLFLEFPKDSSTWTVDHQLLWGE ALLITPVLQAGKAEVTGYFPLGTWYDLQTVPEALGSLPPPPAAPREPAIHSEGGVWTLPAPLDTINV HLRAGYIIPLQGPGLTTTESRQQMALAVALTKGGEARGELFWDDGESLEVLERGAYTQVIFLARNT IVNELVRVTSEGAGLQLQKVTVLGVATAPQQVLSNGVPVSNFTYSPDTKVLDICVSLLMGEQFLVSWC	20
		30

【 0 0 8 8 】

いくつかの実施形態では、適切な mRNA は、配列の野生型ヒト G A A mRNA（配列番号 1）である。いくつかの実施形態では、適切な mRNA は、以下に示す配列のようなコドン最適化 h G A A 配列であってもよい：

【 0 0 8 9 】

コドン最適化ヒト G A Aコード配列（配列番号 3）：

AUGGGGAGUCAGACACCCGCGCGUGCUCGACACAGGCUUCUG	40
GCCGUGUGCGCACUCGUGAGUCUGGCGACUGCUGCGUUGC	
UGGGGACACAUUCUUCUCCACGACUUUCUUCUUGGUGCCCCG	
AGAAUUGUCGGGCUUCGUCGCCGGUACUGGAAGAAACCCAC	
CCCGCACAUUCAGCAGGGCGCGUCGCGGCCUUGGUCCGAGGG	
AUGCCCAGGCACAUCCCGGAAGGCCACGAGCCGUCCCGAC	
UCAAUGUGACGUACCUC CCAAUUC CCGGUUCGACUGUGCG	
CCAGACAAGGCAAUCA CGCAAGAGCAGUGCGAAGCCCGUG	
GAUGCUGCUAUAAUUC CCGCGAAGCAGGGACUUCAGGGAGC	
CCAGAUGGGGCGAGCCCUGGUGUUUCUUC CCGCCUUCCUAU	
CCCUCAUAUAAGCUGGAGAAUUGUGUCGUCCUCGGAAAUUGG	50

GGUAUACCGCUACUCUUACGAGAACCACCCCCACA UUCUU
UCCGAAGGACAUCUUCUACUCUGCGGCUCGACGUGAUGAUG
GAGACAGAAAAUAGGCUGCAUUUCACGAUCAAGACCCGG
CGAACCCGGAGAU AUGAGGUUCCGCUUGAGACUCCCCACGU
UCACUCUCUGUGCGCCUUCACCCUUGUACUCGUGGAGUUC
UCGGAAGAACC GUUCGGGGUGAUCGUCAGACGUC AACUUG
AUGGUAGGGUAUUGCUGAACACAACGGUCGCCCCCUUGUU
UUUCGCCGACCAGUUUCUGCAGCUUUUCGACAUCGCGUGCCG
UCCCAGUAUAUCACAGGGGCUCGCGGGAGCAUCUUUCACCCC
UCAUGCUGAGCACGAGCUGGACACGGAUUACGCUCUGGAA
CAGGGAUUCUCGCGCCGACGCCCCGGAGCGAAUUUGUAUGGG
UCGCAUCCCUUCUACCUUCGCAUUGGAAGACGGGGGUUCCG
CGCACGGAGUAUUCUGCUUA AUUCUAAUGCGAUGGACGU
UGUCUUGCAGCCCUCCCCUGCUUUUGUCGUGGCGUUC CACG
GGGGGCAUUUUGGACGUUUACAUCUUUUUGGGACCCGAGC
CAAAGAGCGUAGUGCAGCAGUAUUUGGAUGUAGUGGGCUA
CCCCUUCAUGCCGCCUUAUUGGGGACUGGGGUUCCAUCUC
UGCCGCUUGGGGGUACUCUUCGACCCGCGAUCACCCGCCAGG
UGGUCGAGAACAU GACCCAGAGCACAUUUCCCUUUGGACGU
GCAGUGGA AUGAUUUGGAUUACAUGGAUAGCCGAAGAGAC
UUCACGUUCAAU AAGGACGGGUUUAGAGAUUUUCCCGCGA
UGGUGCAAGAAUUGCACCCAGGGUGGGCGCAGAUACAUGAU
GAUCGUCGAUCCCGCCAU CAGCAGCUCGGGACCAGCGGGG
AGUUACCGGCCUUA CGAUGAGGGACUUAGGAGAGGCGUCU
UUAUCACGAACGA AACAGGU CAGCCGCUCAUUGGUAAAGU
GUGGCCUGGAUCAACGGCCU UUCCCGACUUCACGA AUCCC
ACAGCCCUCGCCUGGUUGGGAAGACAUGGUGGCGGAGUUUC
ACGACCAAGUA CCGUUUGAUGGGGAUGUGGAUUGAU AUGAA
CGAACCCUCA AACUUUAUUCGCGGCUCGGAAGAUGGAUGC
CCGA AUAAUGAGCUUGAGAAUCCCCCGUAUGUGCCAGGGG
UGGUAGGUGGGACGCUCCAGGCCGCUACGAUCUGUGCGUC
AUCACAUCAGUUUCUUGUCAACGCACUACAACUUGCACAAU
CUUUACGGUUUGACUGAAGCCAUCGCUUCGCAUCGCGCGC
UGGUC AAAGCGCGUGGUACGCGACCCUUCGUUAUUUCUCG
GUCCACA UUGCCGGGCA CCGGUCGGUAUGCCGGACACUGG
ACGGGAGAU GUCUGGUCUAGCUGGGAGCAGCUCGCGUCGA
GCGUACCGGAGAUCCUCCAGUUC AAUCUUUUUGGGAGUUC C
GCUCGUCGGCGCUGACGUGUGCGGUUUUCUCGGAAACACA
UCAGAAGAGCUUU GCGUACGCGUGGACACAGCUCGGUGCGU
UUUACCCCUUUAUGAGAAACCAUAACUCGUUGCUCUCACU
CCCUCAAGAGCCGUACAGUUUUUCGGAGCCUGCGCAACAG
GCGAUGCGGAAGGCAUUGACACUUCGCUAUGCACUGCUC C
CGCAUCUCUAUAUCUCUGUUC CAUCAGGCCCAUGUGGCUGG
AGAAACGGUGGCGAGGCCCCUGUUCUUGGAGUUC CCAA
GAUAGUUC CACAUGGACCCGUGGAUCACCAGUUGCUGUGGG
GAGAGGCGCUUCUGAUCACUCCGGUACUUCAGGCCGGGUAA
AGCGGAAGUCACUGGGUAUUUCCCGCUUGGGACCUGGUAC
GACCUUCAGACUGUCC CAGUAGAAGCCUCGGAAGCCUGC
CACCUCCCCCUGCUGCACCCCGCGAGCCUGCAAUCCA UAG
CGAGGGCCAGUGGGUAACGUUGCCAGCCCCACUGGAUACC

10

20

30

40

50

A U C A A U G U C C A C C U C A G G G C G G G U U A C A U U A U C C C U C U C C
A A G G C C C U G G G U U G A C C A C C A C A G A G U C G C G C C A G C A G C C
A A U G G C A C U U G C G G U C G C A U U G A C G A A A G G G G G U G A A G C C
C G A G G G G A A C U G U U U U G G G A U G A C G G G G A A A G C C U U G A G G
U G C U G G A A C G G G G A G C G U A C A C A C A A G U C A U U U U C U U G G C
C A G G A A C A A C A C U A U U G U C A A C G A G U U G G U G C G C G U G A C C
U C U G A G G G U G C C G G A C U G C A A C U G C A G A A G G U C A C G G U C C
U C G G A G U G G C G A C A G C A C C C C A A C A G G U C C U U A G U A A C G G
A G U A C C U G U C U C G A A C U U U A C A U A C U C C C C G G A C A C G A A G
G U G C U C G A C A U C U G U G U G U C G C U G C U U A U G G G G G A A C A G U
U U C U C G U G A G C U G G U G C U A G

10

【0090】

さらなるmRNA配列の例を、以下の実施例のセクションに記載し、例えば、配列番号11及び配列番号12は、コドン最適化GAAコードmRNAを囲む5'及び3'非翻訳領域を含む。

【0091】

いくつかの実施形態において、適切なmRNA配列は、ヒトGAAタンパク質のホモログまたはアナログのmRNA配列であってもよい。例えば、ヒトGAAタンパク質のホモログまたはアナログは、野生型すなわち天然に存在するヒトGAAタンパク質に比べて、1つ以上のアミノ酸置換、欠失及び／または挿入を含むが、その一方でGAAタンパク質活性を実質的に保持している改変ヒトGAAタンパク質であってもよい。いくつかの実施形態では、本発明に適したmRNAは、少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上の割合で配列番号2に相同であるアミノ酸配列をコードする。いくつかの実施形態では、本発明に適したmRNAは、ヒトGAAタンパク質に実質的に同一のタンパク質をコードする。いくつかの実施形態では、本発明に適したmRNAは、少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上の割合で配列番号2と同一であるアミノ酸配列をコードする。いくつかの実施形態では、本発明に適したmRNAは、ヒトGAAタンパク質の断片または部分をコードする。いくつかの実施形態では、本発明に適したmRNAは、ヒトGAAタンパク質の断片または部分をコードし、ここで、タンパク質の断片または部分は、野生型タンパク質と同様のGAA活性をなお維持している。いくつかの実施形態では、本発明に適したmRNAは、少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上の割合で、配列番号1、配列番号3、配列番号11または配列番号12と同一のヌクレオチド配列を有する。

20

30

【0092】

いくつかの実施形態では、適切なmRNAは、別のタンパク質に融合させた（例えば、NまたはC末端融合体）GAAタンパク質の全長、断片または部分を含む融合タンパク質をコードする。いくつかの実施形態では、GAAタンパク質の全長、断片または一部をコードするmRNAに融合させたタンパク質は、シグナル配列または細胞標的化配列をコードする。

40

【0093】**送達媒体**

本発明によれば、本明細書に記載のGAAタンパク質（例えば、GAAタンパク質の全長、断片または一部）をコードするmRNAは、裸のRNA（パッケージされていない）として、または送達媒体を介して送達してもよい。本明細書中で使用する用語「送達媒体」、「輸送媒体」、「ナノ粒子」または文法上の同等表現は、同じ意味で用いる。

【0094】

50

いくつかの実施形態において、G A Aタンパク質をコードするm R N Aを、単一の送達媒体を介して送達してもよい。いくつかの実施形態では、G A Aタンパク質をコードするm R N Aを、それぞれ異なる組成の1つ以上の送達媒体を介して送達してもよい。様々な実施形態によれば、適切な送達媒体として、ポリエチレンイミン（P E I）などのポリマー系担体、脂質ナノ粒子及びリポソーム、ナノリポソーム、セラミド含有ナノリポソーム、プロテオリポソーム、天然及び合成の両方に由来するエキソソーム、天然、合成及び半合成ラメラ体、ナノ微粒子、リン酸カルシウム-ケイ酸ナノ粒子、リン酸カルシウムナノ粒子、二酸化ケイ素ナノ粒子、ナノ結晶微粒子、半導体ナノ微粒子、ポリ（D-アルギニン）、ゾル-ゲル、ナノデンドリマー、デンプンベースの送達システム、ミセル、乳剤、ニオソーム、マルチドメインブロックポリマー（ビニルポリマー、ポリプロピルアクリル酸ポリマー、dynamic polyconjugate）、乾燥粉末製剤、プラスミド、ウイルス、リン酸カルシウムヌクレオチド、アプタマー、ペプチド及び他のベクタータグが挙げられるが、必ずしもこれらに限定するものではない。

10

【0095】

リポソーム送達媒体

いくつかの実施形態において、適切な送達媒体は、リポソーム送達媒体、例えば脂質ナノ粒子である。本明細書中で使用する場合、脂質ナノ粒子などのリポソーム送達媒体は、通常、1つ以上の二重層の膜によって外部媒質から隔離された内部水性空間を備えた極小の小胞として特徴付けられる。リポソームの二重層膜は、通常、空間的に分離した親水性及び疎水性ドメインを有する合成または天然起源の脂質などの両親媒性分子によって形成される（Lasic, Trends Biotechnol., 16:307-321, 1998）。リポソームの二重層膜は、両親媒性ポリマー及び界面活性剤（例えば、ポリメロソーム（polymerosome）、ニオソームなど）によって形成することもできる。本発明の文脈において、リポソーム送達媒体は、一般的には、所望のm R N Aを標的細胞または組織に輸送するのに役立つ。

20

【0096】

カチオン性脂質

いくつかの実施形態において、リポソームは、1つ以上のカチオン性脂質を含み得る。本明細書中で使用する語句「カチオン性脂質」とは、選択したp H、例えば生理学的p Hなどにおいて、正味の正電荷を有する多くの脂質種のいずれかを指す。いくつかのカチオン性脂質が文献に記載されており、その多くは市販されている。本発明の組成物及び方法における使用に特に適したカチオン性脂質として、国際特許公開W O 2 0 1 0 / 0 5 3 5 7 2（特に、段落[00225]に記載されているC I 2 - 2 0 0）及びW O 2 0 1 2 / 1 7 0 9 3 0に記載されているものが挙げられ、これらの文献は、参照として本明細書に援用する。特定の実施形態では、本発明の組成物及び方法は、2012年3月29日に出願された米国仮特許出願第61/617,468号（本明細書中に参照として援用する）に記載のイオン化可能なカチオン性脂質、例えば（15Z, 18Z）-N, N-ジメチル-6-（9Z, 12Z）-オクタデカ-9, 12-ジエン-1-イル）テトラコサ-15, 18-ジエン-1-アミン（HGT5000）、（15Z, 18Z）-N, N-ジメチル-6-（（9Z, 12Z）-オクタデカ-9, 12-ジエン-1-イル）テトラコサ-4, 15, 18-トリエン-1-アミン（HGT5001）、及び（15Z, 18Z）-N, N-ジメチル-6-（（9Z, 12Z）-オクタデカ-9, 12-ジエン-1-イル）テトラコサ-5, 15, 18-トリエン-1-アミン（HGT5002）などを含む脂質ナノ粒子を利用する。

30

40

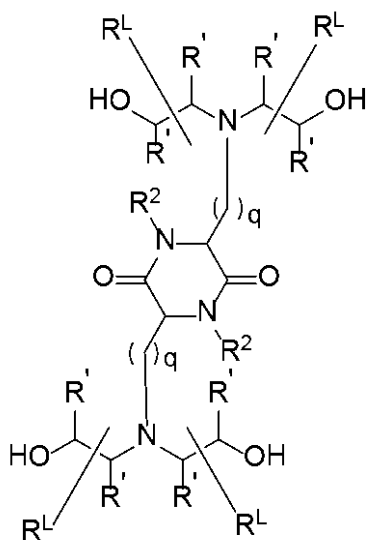
【0097】

いくつかの実施形態では、提供するリポソームは、W O 2 0 1 3 / 0 6 3 4 6 8、及び本出願と同時に提出された「メッセンジャーRNAの送達のための脂質製剤」と題する米国仮出願に記載されているカチオン性脂質を含み、これら両方の文献は、参照として本明細書に援用する。

【0098】

50

いくつかの実施形態では、カチオン性脂質は、式 I - c 1 - a :
【化 4】



I - c 1 - a

、の化合物、またはその薬学的に許容可能な塩を含み、式中：

各 R^2 は独立して水素または C_{1-3} アルキルであり；

各 q は独立して 2～6 であり；

各 R' は独立して水素または C_{1-3} アルキルであり；

及び、各 R^L は独立して C_{8-12} アルキルである。

【0099】

いくつかの実施形態では、各 R^2 は独立して水素、メチルまたはエチルである。いくつかの実施形態では、各 R^2 は独立して水素またはメチルである。いくつかの実施形態では、各 R^2 は水素である。

【0100】

いくつかの実施形態では、各 q は独立して 3～6 である。いくつかの実施形態では、各 q は独立して 3～5 である。いくつかの実施形態では、各 q は 4 である。

【0101】

いくつかの実施形態では、各 R' は独立して水素、メチルまたはエチルである。いくつかの実施形態では、各 R' は独立して水素またはメチルである。いくつかの実施形態では、各 R' は独立して水素である。

【0102】

いくつかの実施形態では、各 R^L は独立して C_{8-12} アルキルである。いくつかの実施形態では、各 R^L は独立して $n - C_{8-12}$ アルキルである。いくつかの実施形態では、各 R^L は独立して C_{9-11} アルキルである。いくつかの実施形態では、各 R^L は独立して $n - C_{9-11}$ アルキルである。いくつかの実施形態では、各 R^L は独立して C_{10} アルキルである。いくつかの実施形態では、各 R^L は独立して $n - C_{10}$ アルキルである。

【0103】

いくつかの実施形態では、各 R^2 は、独立して水素またはメチルであり；各 q は、独立して 3～5 であり；各 R' は、独立して水素またはメチルであり；各 R^L は、独立して C_{8-12} アルキルである。

【0104】

いくつかの実施形態では、各 R^2 は水素であり；各 q は独立して 3～5 であり；各 R' は水素であり；及び各 R^L は独立して C_{8-12} アルキルである。

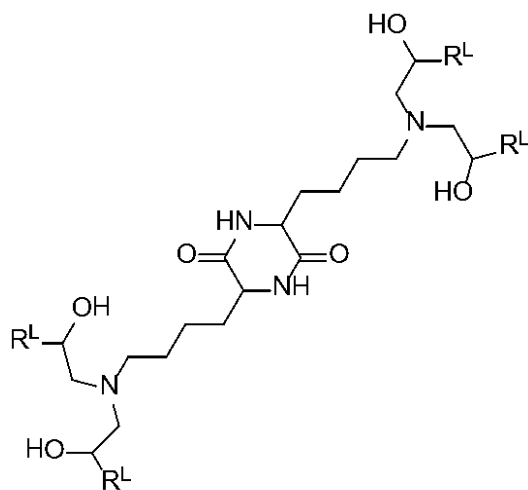
【0105】

いくつかの実施形態では、各 R^2 は水素であり；各 q は 4 であり；各 R' は水素であり；各 R^L は独立して C_{8-12} アルキルである。

【0106】

いくつかの実施形態では、カチオン性脂質は、式 I - g :

【化5】



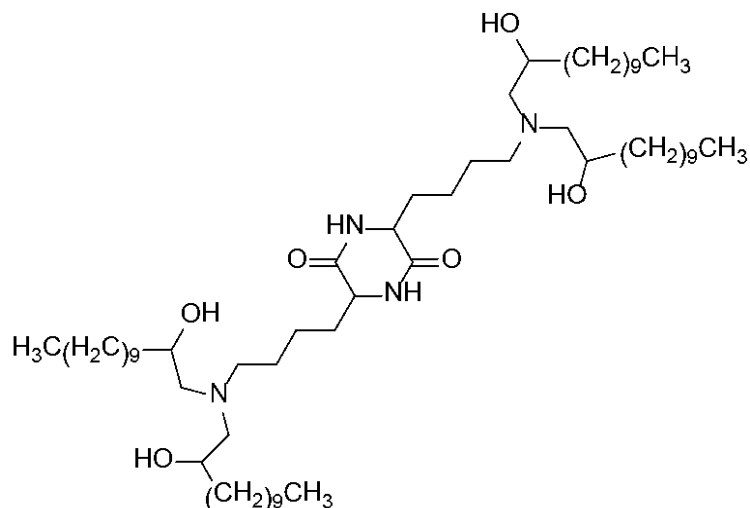
I - g

、の化合物またはその薬学的に許容可能な塩を含み、式中、各 R^L は独立して C_{8-12} アルキルである。いくつかの実施形態では、各 R^L は独立して $n-C_{8-12}$ アルキルである。いくつかの実施形態では、各 R^L は独立して C_{9-11} アルキルである。いくつかの実施形態では、各 R^L は独立して $n-C_{9-11}$ アルキルである。いくつかの実施形態では、各 R^L は独立して C_{10} アルキルである。いくつかの実施形態では、各 R^L は $n-C_{10}$ アルキルである。

【0107】

特定の実施形態において、提供するリポソームは、カチオン性脂質 cKK-E12、すなわち (3, 6 - ビス (4 - (ビス (2 - ヒドロキシドデシル) アミノ) ブチル) ピペラジン - 2, 5 - ジオン) を含む。cKK-E12 の構造を以下に示す：

【化6】



【0108】

いくつかの実施形態において、1つ以上のカチオン性脂質は、N - [1 - (2, 3 - ジオレイルオキシ) プロピル] - N, N, N - トリメチルアンモニウムクロライドすなわち「DOTMA」であり得る (Feigner et al. (Proc. Nat'l Acad. Sci. 84, 7413 (1987); U. S. Pat. No. 4, 897, 355)。DOTMAは、単独で製剤化することができるか、または中性脂質、ジオレイルホスファチジルエタノールアミンすなわち「DOPE」もしくは他のカチオン性もしくは非カチオン性脂質と組み合わせて、リポソーム輸送小胞または脂質ナノ粒子内に入れる

ことができ、そのようなリポソームを用いて標的細胞への核酸の送達を増強することができる。他の適切なカチオン性脂質として、例えば5 - カルボキシスペルミルグリシンジオクタデシルアミドすなわち「DOGS」、2, 3 - ジオレイルオキシ - N - [2 (スペルミン - カルボキサミド) エチル] - N, N - ジメチル - 1 - プロパンアミニウムすなわち「DOSPA」(Behr et al. Proc. Nat. 'l Acad. Sci. 86, 6982 (1989); U. S. Pat. No. 5, 171, 678; U. S. Pat. No. 5, 334, 761)、1, 2 - ジオレオイル - 3 - ジメチルアンモニウム - プロパンすなわち「DODAP」、1, 2 - ジオレオイル - 3 - トリメチルアンモニウム - プロパンすなわち「DOTAP」が挙げられるが、必ずしもこれらに限定するものではない。

10

【0109】

さらなるカチオン性脂質の例として、1, 2 - ジステアリルオキシ - N, N - ジメチル - 3 - アミノプロパンすなわち「DSDMA」、1, 2 - ジオレイルオキシ - N, N - ジメチル - 3 - アミノプロパンすなわち「DODMA」、1, 2 - ジリノレイオキシ - N, N - ジメチル - 3 - アミノプロパンすなわち「DLinDMA」、1, 2 - ジリノレニルオキシ - N, N - ジメチル - 3 - アミノプロパンすなわち「DLenDMA」、N - ジオレイル - N, N - ジメチルアンモニウムクロライドすなわち「DODAC」、N, N - ジステアリル - N, N - ジメチルアンモニウムブロマイドすなわち「DDAB」、N - (1, 2 - ジミリスチルオキシプロパ - 3 - イル) - N, N - ジメチル - N - ヒドロキシエチルアンモニウムブロマイドすなわち「DMRIE」、3 - ジメチルアミノ - 2 - (コレスタ - 5 - エン - 3 - β - オキシブタン - 4 - オキシ) - 1 - (cis, cis - 9, 12 - オクタデカジエンオキシ) プロパンすなわち「CLinDMA」、2 - [5' - (コレスタ - 5 - エン - 3 - β - オキシ) - 3' - オキサペントキシ) - 3 - ジメチル - 1 - 1 - (cis, cis - 9', 1 - 2' - オクタデカジエンオキシ) プロパンまたは「CpLinDMA」、N, N - ジメチル - 3, 4 - ジオレイルオキシベンジルアミンすなわち「DMOBA」、1, 2 - N, N' - ジオレイルカルバミル - 3 - ジメチルアミノプロパンすなわち「DOcarbDAP」、2, 3 - ジリノレオイルオキシ - N, N - ジメチルプロピルアミンすなわち「DLinDAP」、1, 2 - N, N' - ジリノレイルカルバミル - 3 - ジメチルアミノプロパンすなわち「DLincarbDAP」、1, 2 - ジリノレオイルカルバミル - 3 - ジメチルアミノプロパンすなわち「DLinCDAP」、2, 2 - ジリノレイル - 4 - ジメチルアミノメチル - [1, 3] - ジオキソランすなわち「DLin - DMA」、2, 2 - ジリノレイル - 4 - ジメチルアミノエチル - [1, 3] - ジオキソランすなわち「DLin - K - XTC2 - DMA」、及び2 - (2, 2 - ジ((9Z, 12Z) - オクタデカ - 9, 11 - ジエン - 1 - イル) - 1, 3 - ジオキソラン - 4 - イル) - N, N - ジメチルエタンアミン(DLin - KC2 - DMA)) (WO2010/042877; Semple et al., Nature Biotech. 28:172 - 176 (2010) 参照)、またはそれらの混合物が挙げられる。(Heyes, J., et al., J Controlled Release 107:276 - 287 (2005); Morrissey, DV., et al., Nat. Biotechnol. 23(8):1003 - 1007 (2005); PCT Publication WO2005/121348A1)。いくつかの実施形態において、カチオン性脂質の1つ以上は、イミダゾール、ジアルキルアミノ、またはグアニジニウム部分のうちの少なくとも1つを含む。

20

30

40

【0110】

いくつかの実施形態では、1つ以上のカチオン性脂質は、XTC(2, 2 - ジリノレイ(Dilinoley) 1 - 4 - ジメチルアミノエチル - 1 - [1, 3] - ジオキソラン)、MC3((6Z, 9Z, 28Z, 31Z) - ヘプタトリアコンタ - 6, 9, 28, 31 - テトラエン - 19 - イル 4 - (ジメチルアミノ) ブタノエート)、ALNY - 100((3aR, 5s, 6aS) - N, N - ジメチル - 2, 2 - ジ((9Z, 12Z) - オクタデカ - 9, 12 - ジエニル) テトラヒドロ - 3aH - シクロペンタ [d] [1, 3

50

〕ジオキソール-5-アミン))、NC98-5(4, 7, 13-トリス(3-オキソ-3-(ウンデシルアミノ)プロピル)-N1, N16-ジウンデシル-4, 7, 10, 13-テトラアザヘキサデカン-1, 16-ジアミド)、DODAP(1, 2-ジオイル-3-ジメチルアンモニウムプロパン)、HGT4003(WO2012/170889、この文献の内容は、その全体を参照として本明細書に援用する)、ICE(WO2011/068810、この文献の内容は、その全体を参照として本明細書に援用する)、HGT5000(米国仮特許出願第61/617, 468号、この文献の内容は、その全体を参照として本明細書に援用する)またはHGT5001(cisまたはtrans)(仮特許出願第61/617, 468号)、WO2010/053572に開示されているようなアミノアルコールリポイド、DOTAP(1, 2-ジオレイル-3-トリメチルアンモニウムプロパン)、DOTMA(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)、DLinDMA(Heyes, J.; Palmer, L.; Bremner, K.; MacLachlan, I. "Cationic lipid saturation influences intracellular delivery of encapsulated nucleic acids" J. Contr. Rel. 2005, 107, 276-287)、DLin-KC2-DMA(Semple, S. C. et al. "Rational Design of Cationic Lipids for siRNA Delivery" Nature Biotech. 2010, 28, 172-176)、C12-200(Love, K. T. et al. "Lipid-like materials for low-dose in vivo gene silencing" PNAS 2010, 107, 1864-1869)から選択してもよい。

【0111】

いくつかの実施形態では、リポソーム中のカチオン性脂質の割合は、10%超、20%超、30%超、40%超、50%超、60%超、または70%超であってもよい。いくつかの実施形態では、カチオン性脂質(複数可)は、重量比でリポソームの約30~50%(例えば、約30~45%、約30~40%、約35~50%、約35~45%、または約35~40%)を占める。いくつかの実施形態では、カチオン性脂質(例えば、cKK-E12)は、モル比でリポソームの約30%、約35%、約40%、約45%、または約50%を占める。

【0112】

非カチオン性／ヘルパー脂質

いくつかの実施形態において、提供するリポソームは、1つ以上の非カチオン性(「ヘルパー」)脂質を含有する。本明細書中で使用する場合、語句「非カチオン性脂質」とは、任意の中性、双性イオン性または陰イオン性の脂質を指す。本明細書中で使用する場合、語句「アニオン性脂質」とは、選択したH、例えば生理学的pHなどにおいて正味の負電荷を有する多数の脂質種のいずれかを指す。非カチオン性脂質として、ジステアロイルホスファチジルコリン(DSPC)、ジオレオイルホスファチジルコリン(DOPC)、ジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)、ジオレオイルホスファチジルグリセロール(DOPG)、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール(DPPG)、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン(DOPE)、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン(POPC)、パルミトイルオレオイル-ホスファチジルエタノールアミン(POPE)、ジオレオイル-ホスファチジルエタノールアミン4-(N-マレイミドメチル)-シクロヘキサン-1-カルボキシレート(DOPE-mal)、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン(DPPE)、ジミリストイルホスホエタノールアミン(DMPE)、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン(DSPE)、16-O-モノメチルPE、16-O-ジメチルPE、18-1-trans-PE、1-ステアロイル-2-オレオイル-ホスファチジルエタノールアミン(SOPE)、またはそれらの混合物が挙げられるが、必ずしもこれらに限定するものではない。

【0113】

いくつかの実施形態では、このような非カチオン性脂質は単独で使用し得るが、好ましくは他の賦形剤、例えばカチオン性脂質と組み合わせて使用する。いくつかの実施形態では、非カチオン性脂質は、リポソーム中に存在する総脂質の約5%～約90%、または約10%～約70%のモル比を含み得る。いくつかの実施形態では、非カチオン性脂質は、中性脂質、すなわち、組成物を製剤化及び／または投与する条件下で正味の電荷を有さない脂質である。いくつかの実施形態では、リポソーム中の非カチオン性脂質の割合は、5%超、10%超、20%超、30%超、または40%超であってもよい。

【0114】

コレステロール系脂質

いくつかの実施形態では、提供するリポソームは、1つ以上のコレステロール系脂質を含む。例えば、適切なコレステロール系カチオン性脂質として、例えばDC-Choi (N, N - ジメチル - N - エチルカルボキシアミドコレステロール)、1, 4 - ビス (3 - N - オレイルアミノ - プロピル) ピペラジン (Gao, et al. Biochem. Biophys. Res. Comm. 179, 280 (1991); Wolf et al. BioTechniques 23, 139 (1997); U. S. Pat. No. 5, 744, 335)、またはICEが挙げられる。いくつかの実施形態では、コレステロール系脂質は、リポソーム中に存在する全脂質の約2%～約30%、または約5%～約20%のモル比を含み得る。いくつかの実施形態において、脂質ナノ粒子中のコレステロール系脂質の割合は、5%超、10%、20%超、30%超、または40%超であってもよい。

【0115】

PEG化脂質

いくつかの実施形態において、提供するリポソームは、1種以上のPEG化脂質を含む。例えば、N - オクタノイル - スフィンゴシン - 1 - [スクシニル (メトキシポリエチレングリコール) - 2000] (C8 PEG - 2000セラミド) をはじめとするポリエチレングリコール (PEG) 修飾リン脂質、及び誘導体化セラミド (PEG - CER) などの誘導体化脂質を、1種以上のカチオン性の脂質、及びいくつかの実施形態においては他の脂質と組み合わせて用いて、共にリポソームを構成することも本発明は想定している。想定されるPEG修飾脂質として、鎖長C₆～C₂₀のアルキル鎖 (複数可) を有し、脂質に共有結合した最大鎖長5 kDaのポリエチレングリコール鎖が挙げられるが、必ずしもこれに限定するものではない。いくつかの実施形態では、PEG修飾またはPEG化脂質は、PEG化コレステロールまたはPEG - 2Kである。このような成分の添加は、複雑な凝集を防止する可能性があり、循環寿命を引き延ばし、標的細胞への脂質 - 核酸組成物の送達を高める手段を提供し得るが (Klibanov et al. (1990) FEBS Letters, 268 (1): 235 - 237)、またはin vivoで製剤から速やかに交換されるように成分を選択してもよい (米国特許第5, 885, 613号参照)。

【0116】

いくつかの実施形態では、特に有用な交換可能な脂質は、より短いアシル鎖 (例えば、C₁₄またはC₁₈) を有するPEG - セラミドである。本発明のPEG修飾リン脂質及び誘導体化脂質は、リポソーム中に存在する全脂質の約0%～約15%、約0.5%～約15%、約1%～約15%、約4%～約10%または約2%のモル比を有してもよい。

【0117】

様々な実施形態によれば、脂質ナノ粒子を含むカチオン性脂質、非カチオン性脂質及び／またはPEG修飾脂質の選択ならびにこれらの脂質同士の相対モル比は、選択した脂質 (複数可) の特徴、目的の標的細胞の性質、送達しようとするmRNAの特徴に応じたものとなる。さらなる考慮事項として、例えば、アルキル鎖の飽和度、ならびに選択した脂質 (複数可) のサイズ、電荷、pH、pKa、膜融合性及び毒性が挙げられる。したがって、これらに応じてモル比を調整してもよい。

【0118】

ポリマー

いくつかの実施形態において、ポリマーを担体として単独で、または本明細書に記載の様々な脂質を含む他の担体と組み合わせて用いて、適切な送達媒体を製剤化する。したがって、いくつかの実施形態では、本明細書中で用いるリポソーム送達媒体は、ポリマーを含有するナノ粒子も包含する。適切なポリマーとして、例えば、ポリアクリレート、ポリアルキルシアノアクリレート、ポリラクチド、ポリラクチド-ポリグリコリドコポリマー、ポリカプロラクトン、デキストラン、アルブミン、ゼラチン、アルギン酸、コラーゲン、キトサン、シクロデキストリン、プロタミン、PEG化プロタミン、PLL、PEG化PLL及びポリエチレンイミン（PEI）を挙げてもよい。PEIが存在する場合、それは10～40 kDaの範囲の分子量の分枝PEI、例えば25 kDa分枝PEI（シグマ#408727）などであってもよい。

10

【0119】

本発明に好適なりポソームには、本明細書に記載のカチオン性脂質、非カチオン性脂質、コレステロール脂質、PEG化脂質及び／またはポリマーのいずれか1つ以上を様々な比率で含めてもよい。非限定的な例として、好適なりポソーム製剤には、cKK-E12、DOPE、コレステロール及びDMG-PEG2K；C12-200、DOPE、コレステロール及びDMG-PEG2K；HGT4003、DOPE、コレステロール及びDMG-PEG2K；またはICE、DOPE、コレステロール及びDMG-PEG2Kから選択される組合せを含めてもよい。

【0120】

20

様々な実施形態において、カチオン性脂質（例えば、cKK-E12、C12-200、ICE、及び／またはHGT4003）は、リポソームの約30～60%（例えば、約30～55%、約30～50%、約30～約45%、約30～40%、約35～50%、約35～45%、または約35～40%）のモル比を占める。いくつかの実施形態では、カチオン性脂質（例えば、cKK-E12、C12-200、ICE、及び／またはHGT4003）の割合は、リポソームの約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約55%、または約60%以上のモル比を占める。

【0121】

いくつかの実施形態では、カチオン性脂質（複数可）と、非カチオン性脂質（複数可）と、コレステロール系脂質（複数可）と、PEG化脂質（複数可）との比は、それぞれ約30～60：25～35：20～30：1～15であってもよい。いくつかの実施形態では、カチオン性脂質（複数可）と、非カチオン性脂質（複数可）と、コレステロール系脂質（複数可）と、PEG化脂質（複数可）との比は、それぞれおよそ40：30：20：10であってもよい。いくつかの実施形態では、カチオン性脂質（複数可）と、非カチオン性脂質（複数可）と、コレステロール系脂質（複数可）と、PEG化脂質（複数可）との比は、それぞれおよそ40：30：25：5であってもよい。いくつかの実施形態では、カチオン性脂質（複数可）と、非カチオン性脂質（複数可）と、コレステロール系脂質（複数可）と、PEG化脂質（複数可）との比は、それぞれおよそ40：32：25：3であってもよい。いくつかの実施形態では、カチオン性脂質（複数可）と、非カチオン性脂質（複数可）と、コレステロール系脂質（複数可）と、PEG化脂質（複数可）との比は、それぞれおよそ50：25：20：5であってもよい。

30

40

【0122】

mRNAの合成

本発明によるmRNAは、様々な公知の方法のいずれかに従って合成してもよい。例えば、本発明によるmRNAを、in vitro転写法（IVT）によって合成してもよい。簡単に説明すると、IVTは通常、プロモーターを含む直鎖または環状DNA鋳型、リボヌクレオチド三リン酸のプール、DTT及びマグネシウムイオンを含んでもよい緩衝系、ならびに、適切な、RNAポリメラーゼ（例えば、T3、T7またはSP6 RNAポリメラーゼ）、DNase I、ピロホスファターゼ、及び／またはRNase阻害剤を用いて実施する。その正確な条件は、具体的用途に応じて異なる。

50

【0123】

いくつかの実施形態では、本発明によるmRNAの調製のために、DNA鋳型をin vitroで転写する。適切なDNA鋳型は通常、in vitro転写用のプロモーター、例えばT3、T7またはSP6プロモーターを備え、その下流に所望のmRNAの所望のヌクレオチド配列、及び終止シグナルを有する。

【0124】

本発明による所望のmRNA配列（複数可）は、標準的な方法を用いて決定し、DNA鋳型に組み込んでよい。例えば、所望のアミノ酸配列（例えば、酵素配列）から開始し、縮重遺伝暗号に基づいて仮想逆翻訳を実施する。次いで、最適化アルゴリズムを用いて適切なコドンを選択してもよい。一般的には、G/C含量を最適化して、一方では可能な限り高いG/C含量を達成し、他方ではコドン使用頻度に応じてtRNAの頻度を可能な限り考慮することができる。最適化RNA配列は、例えば、適切なディスプレイ装置を利用して確立及び表示し、元の（野生型）配列と比較することができる。二次構造を解析して、RNAの安定化特性及び不安定化特性、またはそれぞれに該当する領域を計算することもできる。

【0125】

修飾mRNA

いくつかの実施形態では、本発明によるmRNAは、未修飾mRNAまたは修飾mRNAとして合成してもよい。一般的には、mRNAを修飾して安定性を高める。mRNAの修飾は、例えば、RNAのヌクレオチドの修飾を含み得る。したがって、本発明による修飾mRNAは、例えば、骨格修飾、糖修飾または塩基修飾を含み得る。いくつかの実施形態では、mRNAは、天然のヌクレオチド及び／またはヌクレオチドアナログ（修飾ヌクレオチド）から合成してもよく、これらの一例として、プリン（アデニン（A）、グアニン（G））またはピリミジン（チミン（T）、シトシン（C）、ウラシル（U））、ならびにプリン及びピリミジンの修飾ヌクレオチドアナログまたは誘導体として、例えば、1-メチルアデニン、2-メチルアデニン、2-メチルチオ-N-6-イソペンテニルアデニン、N6-メチル-アデニン、N6-イソペンテニル-アデニン、2-チオ-シトシン、3-メチル-シトシン、4-アセチル-シトシン、5-メチル-シトシン、2,6-ジアミノプリン、1-メチル-グアニン、2-メチル-グアニン、2,2-ジメチル-グアニン、7-メチル-グアニン、イノシン、1-メチル-イノシン、プソイドウラシル（5-ウラシル）、ジヒドロ-ウラシル、2-チオ-ウラシル、4-チオ-ウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオ-ウラシル、5-（カルボキシヒドロキシメチル）-ウラシル、5-フルオロ-ウラシル、5-プロモ-ウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-ウラシル、5-メチル-2-チオ-ウラシル、5-メチル-ウラシル、N-ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、5-メチルアミノメチル-ウラシル、5-メトキシアミノメチル-2-チオ-ウラシル、5'-メトキシカルボニルメチル-ウラシル、5-メトキシ-ウラシル、ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル-5-オキシ酢酸（v）、1-メチル-プソイドウラシル、キューオシン（queosine）、β-D-マンノシルキューオシン（mannosyl-queosine）、ワイプトキソシン、及びホスホルアミド酸、チオリン酸エステル、ペプチド・ヌクレオチド、メチルホスホン酸、7-デアザグアノシン、5-メチルシトシン並びにイノシンが挙げられるが、必ずしもこれらに限定するものではない。そのようなアナログの調製は、例えば、米国特許第4,373,071号、米国特許第4,401,796号、米国特許第4,415,732号、米国特許第4,458,066号、米国特許第4,500,707号、米国特許第4,668,777号、米国特許第4,973,679号、米国特許第5,047,524号、米国特許第5,132,418号、米国特許第5,153,319号、米国特許第5,262,530号及び同第5,700,642号の記載から、当業者には公知であり、これらの開示内容は、参照としてその全体を本明細書に援用する。

【0126】

いくつかの実施形態において、mRNA（例えば、GAAをコードするmRNA）には

、RNA骨格修飾を含めてもよい。一般的には、骨格修飾は、RNAに含まれるヌクレオチドの骨格のリン酸を化学的に修飾する改変である。一般的な骨格修飾として、以下に限定するものではないが、メチルホスホン酸基、メチルホスホルアミド酸基、ホスホルアミド酸基、ホスホロチオエート基（例えば、シチジン5'-O-(1-チオホスフェート)）、ボラノホスフェート、正に帯電したグアニジニウム基などからなる群からの修飾が挙げられ、これはホスホジエステル結合を他のアニオン性基、カチオン性基または中性基で置換することを意味する。

【0127】

いくつかの実施形態において、mRNA（例えば、GAAをコードするmRNA）には、糖修飾を含めてもよい。一般的な糖修飾は、ヌクレオチドの糖の化学修飾であり、以下に限定するものではないが、2'-デオキシ-2'-フルオロ-オリゴリボヌクレオチド（2'-フルオロ-2'-デオキシシチジン5'-三リン酸、2'-フルオロ-2'-デオキシウリジン5'-三リン酸）、2'-デオキシ-2'-デアミン（deamine）-オリゴリボヌクレオチド（2'-アミノ-2'-デオキシシチジン5'-三リン酸、2'-アミノ-2'-デオキシウリジン5'-三リン酸）、2'-O-アルキルオリゴリボヌクレオチド、2'-デオキシ-2'-C-アルキルオリゴリボヌクレオチド（2'-O-メチルシチジン5'-三リン酸、2'-メチルウリジン5'-三リン酸）、2'-C-アルキルオリゴリボヌクレオチド、及びそれらの異性体（2'-アラシチジン5'-三リン酸、2'-アラウリジン5'-三リン酸）、または三リン酸アジド（2'-アジド-2'-デオキシシチジン5'-三リン酸、2'-アジド-2'-デオキシウリジン5'-三リン酸）からなる群から選ばれる糖修飾を含む。

【0128】

いくつかの実施形態では、mRNA（例えば、GAAをコードするmRNA）には、ヌクレオチドの塩基の修飾（塩基修飾）を含めてもよい。塩基修飾を含む修飾ヌクレオチドは、塩基修飾ヌクレオチドとも呼ばれる。そのような塩基修飾ヌクレオチドの例として、2-アミノ-6-クロロプリンリボシド5'-三リン酸、2-アミノアデノシン5'-三リン酸、2-チオシチジン5'-三リン酸、2-チオウリジン5'-三リン酸、4-チオウリジン5'-三リン酸、5-アミノアシルシチジン5'-三リン酸、5-アミノアシルウリジン5'-三リン酸、5-ブロモシチジン5'-三リン酸、5-ブロモウリジン5'-三リン酸、5-ヨードシチジン5'-三リン酸、5-ヨードウリジン5'-三リン酸、5-メチルシチジン5'-三リン酸、5-メチルウリジン5'-三リン酸、6-アザシチジン5'-三リン酸、6-アザウリジン5'-三リン酸、6-クロロプリンリボシド5'-三リン酸、7-デアザアデノシン5'-三リン酸、7-デアザグアノシン5'-三リン酸、8-アザアデノシン5'-三リン酸、8-アジドアデノシン5'-三リン酸、ベンゾイミダゾールリボシド5'-三リン酸、N1-メチルアデノシン5'-三リン酸、N1-メチルグアノシン5'-三リン酸、N6-メチルアデノシン5'-三リン酸、O6-メチルグアノシン5'-三リン酸、プソイドウリジン5'-三リン酸、ピューロマイシン5'-三リン酸またはキサントシン5'-三リン酸が挙げられるが、必ずしもこれらに限定するものではない。

【0129】

一般的に、mRNA合成には、N末端（5'）への「キャップ」付加、及びC末端（3'）への「テール」付加が含まれる。キャップの存在は、多くの真核細胞に認められるヌクレアーゼに対する耐性を与える上で重要である。「テール」の存在は、mRNAをエキソヌクレアーゼによる分解から保護するのに役立つ。

【0130】

したがって、いくつかの実施形態では、mRNA（例えば、GAAをコードするmRNA）は5'末端キャップ構造を含む。5'末端キャップは一般的に、以下のように付加される：まず、RNA末端ホスファターゼが、5'ヌクレオチドから末端リン酸基のうちの1つを除去し、2つの末端リン酸基を残し；次いで、グアニリルトランスフェラーゼが、グアノシン三リン酸（GTP）を末端リン酸基に付加し、5'5'5三リン酸エステル結

10

20

30

40

50

合を生成し；そして、グアニンの7位の窒素を、メチルトランスフェラーゼがメチル化する。キャップ構造の例として、 $m^7G(5')ppp(5')(A, G(5')ppp(5'))A$ 及び $G(5')ppp(5')G$ が挙げられるが、必ずしもこれらに限定するものではない。

【0131】

いくつかの実施形態では、mRNA（例えば、GAAをコードするmRNA）は、3'ポリ（A）テール構造を含む。mRNAの3'末端にあるポリAテールは、一般的に、約10～300アデノシンヌクレオチド（配列番号4）（例えば、約10～200アデノシンヌクレオチド、約10～150アデノシンヌクレオチド、約10～100アデノシンヌクレオチド、約20～70アデノシンヌクレオチド、または約20～60アデノシンヌクレオチド）を含む。いくつかの実施形態では、mRNAは、3'ポリ（C）テール構造を含む。mRNAの3'末端の好適なポリCテールは、一般的に、約10～200シトシンヌクレオチド（配列番号5）（例えば、約10～150シトシンヌクレオチド、約10～100シトシンヌクレオチド、約20～70シトシンヌクレオチド、約20～60シトシンヌクレオチド、または約10～40シトシンヌクレオチド）を含む。ポリCテールを、ポリAテールに付加してもよく、または、ポリAテールと置き換えてもよい。

10

【0132】

いくつかの実施形態では、mRNAは、5'及び／または3'非翻訳領域を含む。いくつかの実施形態では、5'非翻訳領域は、mRNAの安定性または翻訳に影響を与える1種以上のエレメント、例えば、鉄応答性エレメントを含む。いくつかの実施形態では、5'非翻訳領域は、約50～500ヌクレオチドの鎖長であってもよい。

20

【0133】

いくつかの実施形態では、3'非翻訳領域は、1つ以上のポリアデニル化シグナル、mRNAの細胞内位置安定性に影響を与えるタンパク質の結合部位、または1つ以上のmiRNA結合部位を含む。いくつかの実施形態では、3'非翻訳領域は、50～500ヌクレオチド以上の鎖長であってもよい。

【0134】

キャップ構造

いくつかの実施形態では、mRNAは、5'末端キャップ構造を含む。5'末端キャップは、一般的に、以下のように付加される：まず、RNA末端ホスファターゼが、5'ヌクレオチドから末端リン酸基の1つを除去し、2つの末端リン酸基を残す；次いで、グアニリルトランスフェラーゼが、グアノシン三リン酸（GTP）を末端リン酸基に付加し、5'5'5三リン酸エステル結合を生成する；そして、グアニンの7位の窒素を、メチルトランスフェラーゼがメチル化する。キャップ構造の例として、 $m^7G(5')ppp(5')(A, G(5')ppp(5'))A$ 及び $G(5')ppp(5')G$ が挙げられるが、必ずしもこれらに限定するものではない。

30

【0135】

天然のキャップ構造は、一次転写ヌクレオチドの5'末端に三リン酸架橋により結合している7-メチルグアノシンを含み、これが、 $m^7G(5')ppp(5')N$ （Nは任意のヌクレオチド）のジヌクレオチドキャップとなる。in vivoでは、酵素がキャップ付加を行う。キャップは、細胞核内で付加され、酵素グアニリルトランスフェラーゼが、これを触媒する。RNAの5'末端へのキャップ付加は、転写開始直後に起こる。末端のヌクレオチドは通常、グアノシンであり、他の全ヌクレオチドに対し逆方向、すなわち、 $G(5')ppp(5')GpNpNp$ となっている。

40

【0136】

in vitro転写で生成する一般的なmRNAのキャップは $m^7G(5')ppp(5')G$ であり、これは、in vitroでのT7またはSP6 RNAポリメラーゼによる転写において、5'末端にキャップ構造を有するRNAを得るためにジヌクレオチドキャップとして用いられてきた。キャップ付加したmRNAをin vitroで合成する最も一般的な方法では、予め形成した $m^7G(5')ppp(5')G$ （「 m^7G

50

pppG」)型のジヌクレオチドを転写開始因子として使用する。

【0137】

これまで、*in vitro* 翻訳実験で用いる合成ジヌクレオチドキャップの通常型は、アンチリバースキャップアナログ(「ARCA」)または修飾ARCAであり、一般的に、2'位または3'位のOH基が-OCH₃で置換されている修飾キャップアナログである。

【0138】

さらなるキャップアナログとして、m⁷GpppG、m⁷GpppA、m⁷GpppCからなる群から選択される化学構造；非メチル化キャップアナログ(例えば、GpppG)；ジメチル化キャップアナログ(例えば、m²,⁷GpppG)、トリメチル化キャップアナログ(例えば、m²,²,⁷GpppG)、左右対称ジメチル化キャップアナログ(例えば、m⁷Gpppm⁷G)、またはアンチリバースキャップアナログ(例えば、ARCA；m⁷,²'⁰meGpppG、m⁷²'^dGpppG、m⁷,³'⁰meGpppG、m⁷,³'^dGpppG及びそれらの四リン酸誘導体)(例えば、Jemielity, J. et al., "Novel 'anti-reverse' cap analogs with superior translational properties", RNA, 9:1108-1122 (2003) 参照)が挙げられるが、必ずしもこれらに限定するものではない。

【0139】

いくつかの実施形態では、好適なキャップは、一次転写ヌクレオチドの5'末端に三リン酸架橋により結合している7-メチルグアニル酸(「m⁷G」)であり、これが、m⁷G(5')ppp(5')N(Nは任意のヌクレオシド)となる。本発明の実施形態において用いるm⁷Gキャップの好ましい実施形態はm⁷G(5')ppp(5')Gである。

【0140】

いくつかの実施形態では、キャップはCap0構造である。Cap0構造には、塩基1及び2に結合しているリボースの2'-O-メチル残基がない。いくつかの実施形態では、キャップはCap1構造である。Cap1構造は、塩基2に2'-O-メチル残基を有する。いくつかの実施形態では、キャップはCap2構造である。Cap2構造は、塩基2と3の両方に結合した2'-O-メチル残基を有する。

【0141】

多種多様なm⁷Gキャップアナログが当該技術分野で公知であり、その多くが市販されている。これらには、上記のm⁷GpppG、ならびに、ARCA 3'-OCH₃及び2'-OCH₃キャップアナログが含まれる(Jemielity, J. et al., RNA, 9:1108-1122 (2003))。本発明の実施形態に用いるさらなるキャップアナログとして、N7-ベンジル化ジヌクレオシド四リン酸アナログ(Grudzien, E. et al., RNA, 10:1479-1487 (2004)に記載)、チオリン酸エステルキャップアナログ(Grudzien-Nogalska, E., et al., RNA, 13:1745-1755 (2007)に記載)、ならびに米国特許第8,093,367号及び第8,304,529号に記載のキャップアナログ(ビオチン化キャップアナログを含む)が挙げられ、これらの文献は参照として本明細書に援用する。

【0142】

テール構造

一般的に、「テール」の存在はmRNAをエキソヌクレアーゼによる分解から保護するのに役立つ。ポリAテールは、天然のメッセンジャー及び合成のセンスRNAを安定化させると考えられている。したがって、ある実施形態では、長いポリAテールをmRNA分子に付加し、それによりRNAをより安定化することができる。ポリAテールは、当該技術分野で認められている多種多様な技術を用いて付加することができる。例えば、合成RNAまたは*in vitro*転写したRNAに、ポリAポリメラーゼを用いて長いポリA

10

20

30

40

50

テールを付加することができる (Yokoe, et al. Nature Biotechnology. 1996; 14: 1252 - 1256)。転写ベクターに長いポリAテールをコードすることもできる。さらに、ポリAテールは、PCR産物から直接転写することによって付加することができる。RNAリガーゼを用いて、ポリAをセンスRNAの3'末端に連結してもよい (例えば、Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2nd Ed., ed. by Sambrook, Fritsch and Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1991 edition) 参照)。

【0143】

いくつかの実施形態では、mRNAは、3'ポリ(A)テール構造を含む。一般的に、ポリAテールの鎖長は、少なくとも約10、50、100、200、300、400、少なくとも500ヌクレオチドであり得る (配列番号6)。いくつかの実施形態では、mRNAの3'末端にあるポリAテールは、一般的に、約10~300アデノシンヌクレオチド (配列番号4) (例えば、約10~200アデノシンヌクレオチド、約10~150アデノシンヌクレオチド、約10~100アデノシンヌクレオチド、約20~70アデノシンヌクレオチド、または約20~60アデノシンヌクレオチド) を含む。いくつかの実施形態では、mRNAは、3'ポリ(C)テール構造を含む。mRNAの3'末端にある好適なポリCテールは、一般的に、約10~200シトシンヌクレオチド (配列番号5) (例えば、約10~150シトシンヌクレオチド、約10~100シトシンヌクレオチド、約20~70シトシンヌクレオチド、約20~60シトシンヌクレオチド、または約10~40シトシンヌクレオチド) を含む。ポリCテールは、ポリAテールに付加してもよく、または、ポリAテールと置き換えてもよい。

【0144】

いくつかの実施形態では、ポリAテールまたはポリCテールの長さを調整して、本発明の修飾センスmRNA分子の安定性を制御し、これにより、タンパク質の転写を制御する。例えば、ポリAテールの鎖長はセンスmRNA分子の半減期に影響を与えるため、ポリAテールの長さを調整してmRNAのヌクレアーゼ耐性を改変し、それによって、標的細胞におけるポリヌクレオチド発現及び／またはポリペプチド産生の経時変化を制御することができる。

【0145】

5'及び3'非翻訳領域

いくつかの実施形態では、mRNAは、5'及び／または3'の非翻訳領域を含む。いくつかの実施形態では、5'非翻訳領域は、mRNAの安定性または翻訳に影響を与える1種以上のエレメント、例えば、鉄応答性エレメントを含む。いくつかの実施形態では、5'非翻訳領域は、約50~500ヌクレオチドの鎖長であってもよい。

【0146】

いくつかの実施形態では、3'非翻訳領域は、1つ以上のポリアデニル化シグナル、mRNAの細胞内位置安定性に影響を与えるタンパク質の結合部位、または1つ以上のmiRNA結合部位を含む。いくつかの実施形態では、3'非翻訳領域は、50~500ヌクレオチド以上の鎖長であってもよい。

【0147】

例示的な3'及び／または5'UTR配列は、安定なmRNA分子 (例えば、グロビン、アクチン、GAPDH、チューブリン、ヒストン、またはクエン酸回路の酵素) に由来し、センスmRNA分子の安定性を高めることができる。例えば、ヌクレアーゼ耐性の向上及び／またはポリヌクレオチドの半減期の改善のために、5'UTR配列にCMV最初期1 (IE1) 遺伝子の部分配列、またはその断片を含めてもよい。さらに意図するのは、ポリヌクレオチドのさらなる安定化のために、ヒト成長ホルモン (hGH) をコードする配列、またはその断片を、ポリヌクレオチド (例えば、mRNA) の3'末端または非翻訳領域に含めることである。一般的に、これらの修飾により、ポリヌクレオチドの安定性及び／または薬物動態特性 (例えば、半減期) は、非修飾ポリヌクレオチドに比べて向

上し、これらの修飾はまた、例えば、そのようなポリヌクレオチドの *in vivo* ヌクレアーゼによる消化に対する耐性向上のためになされる修飾を含む。

【0148】

リポソームの形成

本発明の組成物に使用するためのリポソーム輸送媒体は、現在、当該技術分野で公知の様々な技術により調製することができる。提供組成物に使用するためのリポソームは、現在、当該技術分野で公知の様々な技術により調製することができる。例えば、適切な溶媒に選択脂質を溶解させてその脂質を好適な容器または器の内壁に付着させ、その後、溶媒を蒸発乾燥させて容器内側に薄膜を残すか、または噴霧乾燥させるなどの従来技術に従って多重層リポソーム (MLV) を調製してもよい。次いで、容器に、ボルテックス攪拌と

10

【0149】

ある実施形態では、提供組成物はリポソームを含み、ここで、mRNAはそのリポソームの両面で会合するとともに、その同一リポソーム内に封入されている。例えば、本発明の組成物の調製中に、カチオン性リポソームを静電相互作用によってmRNAと会合させてもよい。例えば、本発明の組成物の調製中に、カチオン性リポソームを静電相互作用によってmRNAと会合させてもよい。

20

【0150】

いくつかの実施形態では、本発明の組成物及び方法は、mRNAをリポソーム内に封入して含む。いくつかの実施形態では、同一のリポソーム内に1種以上のmRNA種を封入してもよい。いくつかの実施形態では、異なる複数のリポソーム内に1種以上のmRNA種を封入してもよい。いくつかの実施形態では、脂質組成、脂質成分のモル比、サイズ、電荷 (ゼータ電位)、標的リガンド及び／またはこれらの組合せが異なる1個以上のリポソーム内にmRNAを封入する。いくつかの実施形態では、1個以上のリポソームは、カチオン性脂質、中性脂質、PEG修飾脂質及び／またはその組合せからなる組成が異なっている。いくつかの実施形態では、1種以上のリポソームは、リポソーム作製に用いるカチオン性脂質、中性脂質、コレステロール及びPEG修飾脂質のモル比が異なっている。

30

【0151】

所望のmRNAをリポソームに組み込む方法はしばしば「充填」と呼ばれる。方法の一例は、Lasic, et al., FEBS Lett., 312:255-258, 1992に記載されており、この文献は参照として本明細書に援用する。リポソームに組み込んだ核酸は、完全または部分的に、リポソームの内部空間に位置するか、リポソーム二重膜内に位置するか、またはリポソーム膜の外面に会合してもよい。核酸をリポソーム内に組み込むことを本明細書中では「封入」とも呼び、ここで、核酸はその全体がリポソームの内部空間内に含有されている。リポソームのような輸送媒体にmRNAを組み込む目的は、核酸を分解する酵素もしくは化学薬品、及び／または核酸を短時間で排泄させる系

40

【0152】

リポソームのサイズ

本発明の好適なリポソームは、様々なサイズで生成してもよい。いくつかの実施形態では、提供リポソームは、これまでに公知のmRNA封入リポソームより小さい場合がある。いくつかの実施形態では、リポソームのサイズ縮小は、mRNA送達の高効率性に関連している。リポソームの適切なサイズの選択には、標的とする細胞または組織の部位、及び、ある程度、リポソーム作製の用途を考慮に入れてもよい。

50

【0153】

いくつかの実施形態では、適切なサイズのリポソームを選択して、mRNAがコードする抗体の全身分配を促進する。いくつかの実施形態では、特定の細胞または組織へのmRNAの形質移入を制限することが望ましい場合がある。例えば、肝細胞を標的にするには、リポソームを、その大きさが肝臓の肝類洞内膜の内皮細胞層の小孔より小さくなるようなサイズにすることがあるが、そのような場合には、リポソームは、このような内皮細胞の小孔を容易に通抜け、標的とする肝細胞に到達することができると考えられる。

【0154】

別法または追加として、リポソームを、特定の細胞または組織への分配を制限するかまたは明白に回避するのに十分な直径を有する大きさのリポソームとなるようにサイズ調整してもよい。例えば、リポソームの大きさを肝類洞内膜の内皮細胞層の小孔より大きくして、肝細胞へのリポソーム分配を制限するようなサイズにしてもよい。

10

【0155】

いくつかの実施形態では、リポソームのサイズはリポソーム粒子の最長直径によって決定する。いくつかの実施形態では、好適なリポソームは、サイズが約250 nm以下（例えば、約225 nm、200 nm、175 nm、150 nm、125 nm、100 nm、75 nm、または50 nm以下）である。いくつかの実施形態では、好適なリポソームのサイズは、約10～250 nmの範囲（例えば、約10～225 nm、10～200 nm、10～175 nm、10～150 nm、10～125 nm、10～100 nm、10～75 nm、または10～50 nmの範囲）である。いくつかの実施形態では、好適なリポソームのサイズは、約100～250 nmの範囲（例えば、約100～225 nm、100～200 nm、100～175 nm、100～150 nmの範囲）である。いくつかの実施形態では、好適なリポソームのサイズは、約10～100 nmの範囲（例えば、約10～90 nm、10～80 nm、10～70 nm、10～60 nm、または10～50 nmの範囲）である。特定の実施形態では、好適なリポソームは、約100 nm未満のサイズを有する。

20

【0156】

リポソーム集団のサイズ制御には当該技術分野で公知の様々な別法が利用可能である。そのようなサイズの制御方法は、米国特許第4,737,323号に記載されており、前記文献を参照として本明細書に援用する。リポソーム懸濁液をバス型またはプローブ型超音波処理で超音波処理すると、段階的にサイズが縮小し、直径約0.05 μm未満の小さなULVを生成する。均一化法は、せん断エネルギーを利用して大きなリポソームを小さくするもう一つの方法である。一般的な均一化の手順では、MLVを標準的なエマルジョン・ホモジナイザーに通し、選択したサイズ、一般的には、約0.1～0.5 μmのリポソームが得られるまで再循環させる。リポソームのサイズは、Bloomfield, Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 10:421-150 (1981)に記載のような準弾性光散乱法(QELS)によって測定してもよく、前記文献を参照として本明細書に援用する。形成したリポソームを超音波処理することによって平均リポソーム径は小さくなり得る。間欠的な超音波処理サイクルとQELS評価とを交互に行い、効率的にリポソームを合成してもよい。

30

40

【0157】

医薬組成物

in vivoでのmRNAの発現を促進するために、リポソームなどの送達媒体を、1種以上の追加の核酸、担体、標的リガンドもしくは安定化剤と組み合わせて、または適切な賦形剤とともに混合した医薬組成物中に製剤化することができる。薬物の製剤化及び投与方法についての手法は、“Remington's Pharmaceutical Sciences,” Mack Publishing Co., Easton, Pa., latest editionに記載されている。

【0158】

提供するリポソームに封入または会合させたmRNA、及びそれを含有する組成物は、

50

被験体の臨床状態、投与部位と投与方法、投与計画、被験体の年齢、性別、体重などの当業臨床医に関連する要因を考慮に入れ、現在の医療に従って投与及び服用させてもよい。本明細書の目的に対する「有効量」は、試験的臨床研究、薬理学、臨床及び医療分野の当業者に周知の関連要因を考慮して決定してもよい。いくつかの実施形態では、投与量は、疾患の進行、退縮または改善の適切な測定値として当業者が選択する症状及び他の指標に対して、少なくとも何らかの安定化、改善または消失を達成するのに有効である。例えば、好適な量及び投与レジメンは、少なくとも一過性にタンパク質（例えば、酵素）を産生させるレジメンである。

【0159】

適切な投与経路として、例えば、経口、経腸、経膈、経粘膜、気管内もしくは吸入を含む経肺、または経腸による投与；皮内、経皮（局所）、筋肉内、皮下、髄内注射による非経口送達、ならびに、くも膜下腔内、脳室内直接、静脈内、腹腔内、または経鼻の非経口送達が挙げられる。特定の実施形態では、筋肉内投与は、骨格筋、平滑筋及び心筋からなる群から選択される筋肉に対して行われる。いくつかの実施形態では、投与は、筋肉細胞へのmRNAの送達をもたらす。いくつかの実施形態では、投与は、肝細胞（すなわち、肝臓細胞）へのmRNAの送達をもたらす。特定の実施形態では、筋肉内投与は、筋肉細胞へのmRNAの送達をもたらす。

【0160】

別法または追加として、リボソームに封入したmRNA及び本発明の組成物を、全身ではなく局所的に、例えば、標的組織内へ医薬組成物を直接注入して、好ましくは徐放性製剤として投与してもよい。局所送達は、その標的とする組織に応じて異なる様々な様式で影響を受ける。例えば、本発明の組成物を含有するエアロゾルは、吸入可能であり（経鼻、経気管、または気管支送達）；本発明の組成物は、例えば、損傷部位、疾患症状発現部位、または疼痛部位に注入可能であり；組成物は、経口、気管、または食道への塗布に対しては薬用ドロップで提供可能であり；組成物は、胃または腸への投与に対しては、液体、錠剤またはカプセルの形態で供給可能であり、直腸または膈への塗布に対しては坐剤形態で供給可能であり；または、組成物は、眼への送達さえも可能であり、この場合、クリーム、点眼薬、もしくは注射の使用によっても送達できる。治療用分子またはリガンドと複合体化させた提供組成物含有製剤は、外科的処置によっても投与可能であり、例えば、組成物が移植部位から周辺細胞へ拡散することができるようにするポリマーまたは他の構造体もしくは物質に会合させて投与することができる。あるいは、それらを、ポリマーまたは支持体を使用せずに外科的処置で塗布することができる。

【0161】

本発明が提供する方法は、本明細書に記載する治療薬（例えば、GAAタンパク質をコードするmRNA）の治療有効量を単回ならびに複数回投与することを想定している。治療薬は、被験体の病態（例えば、ポンペ病）の性質、重症度及び程度に応じて、一定の間隔で投与可能である。いくつかの実施形態では、本発明の治療薬（例えば、GAAタンパク質をコードするmRNA）の治療有効量を、くも膜下腔内に一定の間隔で定期的に投与してもよい（例えば、年1回、6か月に1回、5か月に1回、3か月に1回、隔月（2か月に1回）、毎月（月1回）、隔週（2週間に1回）、月2回、30日に1回、28日に1回、14日に1回、10日に1回、7日に1回、毎週、週2回、連日または継続的に）。

【0162】

いくつかの実施形態では、提供するリボソーム及び／または組成物を、それが含有するmRNAの徐放性が好適となるように製剤化する。そのような徐放性組成物は、投与間隔を引き延ばして、被験体への投与の利便性を高め得る。例えば、一実施形態では、本発明の組成物を1日2回、連日または隔日で被験体に投与する。好ましい実施形態では、本発明の組成物を、週2回、週1回、7日に1回、10日に1回、14日に1回、28日に1回、30日に1回、2週間に1回、3週間に1回、または、さらに好ましくは、4週間に1回、月1回、月2回、6週間に1回、8週間に1回、2か月に1回、3か月に1回、4

か月に1回、6か月に1回、8か月に1回、9か月に1回、もしくは毎年、被験体に投与する。長期間にわたってmRNAを送達または放出させるためにデポー投与（例えば、筋肉内、皮下、硝子体内）用に製剤化した組成物及びリポソームも意図される。好ましくは、使用する徐放性手段を、mRNAの安定性を高めるために行う修飾と組み合わせる。

【0163】

本明細書中で使用する場合、用語「治療有効量」は、主として、本発明の医薬組成物が含有する治療薬の総量に基づいて決定する。一般的に、治療有効量は、被験体にとって意義のある利益（例えば、ポンペ病の治療、調節、治癒、予防及び／または寛解）を達成するのに十分である。例えば、治療有効量は、所望の治療的及び／または予防的効果を達成するのに十分な量であってもよい。一般的に、治療を必要とする被験体へ投与する治療薬（例えば、GAAタンパク質をコードするmRNA）の量は、その被験体の特徴に応じて異なる。このような特徴として、被験体の病態、疾患の重症度、全体的健康状態、年齢、性別及び体重が挙げられる。当業者であれば、これら及び他の関連要因に応じて適切な用量を容易に決定できるであろう。さらに、客観的評価法及び主観的評価法を任意選択で用いて至適用量範囲を同定してもよい。

10

【0164】

治療有効量は、一般的に、複数の単位用量を含み得る投与レジメンにおいて投与する。任意の特定の治療タンパク質の場合、治療有効量（及び／または効果的投与レジメンの範囲内の適切な単位用量）は、例えば、投与経路、他の医薬製剤との組合せに応じて様々に異なる場合がある。また、任意の特定の患者に対する具体的な治療有効量（及び／または単位用量）は、治療する障害及びその障害の重症度；使用する特定の製剤の活性；使用する特定の組成物；患者の年齢、体重、全体的健康状態、性別及び食事；使用する特定のタンパク質の投与時間、投与経路、及び／または排泄速度もしくは代謝速度；治療期間；ならびに、医療分野において周知の同様の要因を含む、様々な要因に応じたものとなる。

20

【0165】

いくつかの実施形態では、治療有効量は、約0.005mg/kg体重～500mg/kg体重の範囲、例えば、約0.005mg/kg体重～400mg/kg体重、約0.005mg/kg体重～300mg/kg体重、約0.005mg/kg体重～200mg/kg体重、約0.005mg/kg体重～100mg/kg体重、約0.005mg/kg体重～90mg/kg体重、約0.005mg/kg体重～80mg/kg体重、約0.005mg/kg体重～70mg/kg体重、約0.005mg/kg体重～60mg/kg体重、約0.005mg/kg体重～50mg/kg体重、約0.005mg/kg体重～40mg/kg体重、約0.005mg/kg体重～30mg/kg体重、約0.005mg/kg体重～25mg/kg体重、約0.005mg/kg体重～20mg/kg体重、約0.005mg/kg体重～15mg/kg体重、約0.005mg/kg体重～10mg/kg体重の範囲にある。

30

【0166】

いくつかの実施形態では、治療有効量は、約0.1mg/kg体重超、約0.5mg/kg体重超、約1.0mg/kg体重超、約3mg/kg体重超、約5mg/kg体重超、約10mg/kg体重超、約15mg/kg体重超、約20mg/kg体重超、約30mg/kg体重超、約40mg/kg体重超、約50mg/kg体重超、約60mg/kg体重超、約70mg/kg体重超、約80mg/kg体重超、約90mg/kg体重超、約100mg/kg体重超、約150mg/kg体重超、約200mg/kg体重超、約250mg/kg体重超、約300mg/kg体重超、約350mg/kg体重超、約400mg/kg体重超、約450mg/kg体重超、約500mg/kg体重超である。特定の実施形態では、治療有効量は1.0mg/kgである。いくつかの実施形態では、治療有効量1.0mg/kgを、筋肉内または静脈内に投与する。

40

【0167】

本明細書では、本明細書に開示する1種以上のリポソームを含む凍結乾燥医薬組成物、及び、そのような組成物の使用に関連する、例えば、2011年6月8日出願の米国仮出

50

願第61/494, 882号に開示されているような方法も意図しており、前記文献の記載は、その全体を参照として本明細書に援用する。例えば、本発明の凍結乾燥医薬組成物は、投与前に再構成してもよく、または *in vivo* で再構成することができる。例えば、凍結乾燥医薬組成物を適切な剤形（例えば、ディスク、ロッドまたは膜のような皮内投与剤形）に製剤化して投与し、個人の体液によってその剤形を *in vivo* で経時的に再水和させることができる。

【0168】

提供するリポソーム及び組成物は、任意の所望の組織に投与してもよい。いくつかの実施形態では、提供するリポソームまたは組成物で送達した G A A m R N A は、そのリポソーム及び／または組成物を投与した組織において発現する。いくつかの実施形態では、送達した m R N A は、リポソーム及び／または組成物を投与した組織とは異なる組織において発現する。送達対象の m R N A が送達及び／または発現し得る例示的な組織には、肝臓、腎臓、心臓、脾臓、血清、脳、骨格筋、リンパ節、皮膚、及び／または脳脊髄液が挙げられるが、必ずしもこれらに限定するものではない。

【0169】

いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、被験体由来の生物学的試料中の G A A m R N A 発現レベルは、治療前のベースラインの発現レベルに比べて上昇する。通常、ベースラインレベルは治療の直前に測定する。生物学的試料の例として、全血、血清、血漿、尿及び組織試料（例えば、筋肉、肝臓、皮膚線維芽細胞）が挙げられる。いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、G A A m R N A の発現レベルは、治療直前のベースラインの発現レベルに比べて、少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または95%上昇する。いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、G A A m R N A の発現レベルは、未治療の被験体の G A A m R N A 発現レベルに比べて上昇する。

【0170】

本発明によれば、提供組成物の治療有効量を定期的に投与した場合、被験体の肝 G A A タンパク質レベルは、治療前のベースラインの肝 G A A タンパク質レベルに比べて上昇する。いくつかの実施形態では、提供組成物の治療有効量を定期的に投与した場合、被験体の筋 G A A タンパク質レベルは、治療前のベースラインの筋 G A A タンパク質レベルに比べて上昇する。いくつかの実施形態では、筋肉は、骨格筋（例えば、横紋筋、随意筋）、平滑筋（例えば、内臓筋、不随意筋）または心筋である。いくつかの実施形態では、提供組成物の治療有効量を定期的に投与した場合、被験体の血清クレアチンキナーゼレベルは、治療前のベースラインのクレアチンキナーゼレベルに比べて低下する。いくつかの実施形態では、提供組成物の治療有効量を定期的に投与した場合、被験体の尿中グルコース四糖（G l c α 1 - 6 G l c α 1 - 4 G l c α 1 - 4 G l c または G l c₄）レベルは、治療前のベースラインの G l c₄ レベルに比べて低下する。いくつかの実施形態では、提供組成物の治療有効量を定期的に投与した場合、被験体の血清アスパラギン酸トランスアミナーゼ（例えば、A S T、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、血清、グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ）レベルは、治療前のベースラインの A S T レベルに比べて低下する。いくつかの実施形態では、提供組成物の治療有効量を定期的に投与した場合、被験体の血清アラニントランスアミナーゼ（例えば、A L T、アラニンアミノトランスフェラーゼ、血清グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ）レベルは、治療前のベースラインの A L T レベルに比べて低下する。いくつかの実施形態では、提供組成物の治療有効量を定期的に投与した場合、被験体の血清乳酸デヒドロゲナーゼ（例えば、L D H、乳酸デヒドロゲナーゼ）レベルは、治療前のベースラインの L D H レベルに比べて低下する。いくつかの実施形態では、提供組成物の治療有効量を定期的に投与した場合、被験体由来の生物学的試料中の G A A 酵素活性レベルは、治療前のベースラインの G A A 酵素活性レベルに比べて上昇する。

【0171】

いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、被験体の肝 G A A タンパク質レベ

ルが、治療前のベースラインレベルに比べて上昇する。通常、ベースラインレベルは治療の直前に測定する。いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、肝G A Aタンパク質レベルは、治療前のベースラインレベルに比べて、少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または95%上昇する。いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、肝G A Aタンパク質レベルが、未治療の被験体の肝G A Aタンパク質レベルに比べて上昇する。

【0172】

いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、被験体の骨格筋G A Aタンパク質レベルが、治療前のベースラインレベルに比べて上昇する。通常、ベースラインレベルは治療の直前に測定する。いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、骨格筋G A Aタンパク質レベルが、治療前のベースラインレベルに比べて、少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または95%上昇する。いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、骨格筋G A Aタンパク質レベルが、未治療の被験体の骨格筋G A Aタンパク質レベルに比べて上昇する。

10

【0173】

いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、被験体の心筋G A Aタンパク質レベルが、治療前のベースラインレベルに比べて上昇する。通常、ベースラインレベルは治療の直前に測定する。いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、心筋G A Aタンパク質レベルが、治療前のベースラインレベルに比べて、少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または95%上昇する。いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、心筋G A Aタンパク質レベルが、未治療の被験体の心筋G A Aタンパク質レベルに比べて上昇する。

20

【0174】

いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、被験体の平滑筋G A Aタンパク質レベルが、治療前のベースラインレベルに比べて上昇する。通常、ベースラインレベルは治療の直前に測定する。いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、平滑筋G A Aタンパク質レベルが、治療前のベースラインレベルに比べて、少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または95%上昇する。いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、平滑筋G A Aタンパク質レベルが、未治療の被験体の平滑筋G A Aタンパク質レベルに比べて上昇する。

30

【0175】

いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、被験体の筋肉細胞内G A Aタンパク質レベルが、治療前のベースラインレベルに比べて上昇する。通常、ベースラインレベルは治療の直前に測定する。いくつかの実施形態では、筋肉細胞は、筋細胞、筋管、筋芽細胞、心筋細胞または心筋芽細胞である。いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、筋肉細胞内G A Aタンパク質レベルが、治療前のベースラインレベルに比べて、少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または95%上昇する。いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、筋肉細胞内G A Aタンパク質レベルが、未治療の被験体の筋肉細胞内G A Aタンパク質レベルに比べて上昇する。

40

【0176】

いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、被験体の肝臓細胞（例えば、肝細胞）内G A Aタンパク質レベルが、治療前のベースラインレベルに比べて上昇する。通常、ベースラインレベルは治療の直前に測定する。いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、肝細胞内G A Aタンパク質レベルが、治療前のベースラインレベルに比べて、少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または95%上昇する。いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、肝臓細胞内G A Aタンパク質レベルが、未治療の被験体の肝臓細胞内G A Aタンパク質レベルに比べて上昇する。

【0177】

50

いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、被験体の血漿または血清中のG A Aタンパク質レベルが、治療前のベースラインレベルに比べて上昇する。通常、ベースラインレベルは治療の直前に測定する。いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、血漿または血清中のG A Aタンパク質レベルが、治療前のベースラインレベルに比べて、少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または95%上昇する。いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、血漿または血清中のG A Aタンパク質レベルが、未治療の被験体の血漿または血清中のG A Aタンパク質レベルに比べて上昇する。

【0178】

いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、被験体の血清クレアチンキナーゼレベルが、治療前のベースラインレベルに比べて低下する。通常、ベースラインレベルは治療の直前に測定する。いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、血清クレアチンキナーゼレベルが、治療直前のベースラインの血清クレアチンキナーゼレベルに比べて、少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または95%低下する。いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、血清クレアチンキナーゼレベルが、約2000IU/L、1500IU/L、1000IU/L、750IU/L、500IU/L、250IU/L、100IU/L、90IU/L、80IU/L、70IU/L、または60IU/L未満にまで低下する。いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、血清クレアチンキナーゼレベルが、未治療の被験体の血清クレアチンキナーゼレベルに比べて低下する。

【0179】

いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、被験体の尿中G l c₄レベルが、治療前のベースラインレベルに比べて低下する。通常、ベースラインレベルは治療の直前に測定する。いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、尿中G l c₄レベルが、治療直前のベースラインレベルに比べて、少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または95%低下する。いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、尿中G l c₄レベルが、約100mmol G l c₄/molクレアチニン、90mmol G l c₄/molクレアチニン、80mmol G l c₄/molクレアチニン、70mmol G l c₄/molクレアチニン、60mmol G l c₄/molクレアチニン、50mmol G l c₄/molクレアチニン、40mmol G l c₄/molクレアチニン、30mmol G l c₄/molクレアチニンまたは20mmol G l c₄/molクレアチニン未満にまで低下する。いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、尿中G l c₄レベルが、未治療の被験体の尿中G l c₄レベルに比べて低下する。

【0180】

いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、被験体の筋グリコーゲンレベルが、治療前のベースラインレベルに比べて低下する。通常、治療の直前にベースラインレベルを測定する。いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、筋グリコーゲンレベルが、治療直前のベースラインレベルに比べて、少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または95%低下する。いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、筋グリコーゲンレベルが、未治療の被験体の筋グリコーゲンレベルに比べて低下する。特定の実施形態では、筋肉は、骨格筋、平滑筋または心筋である。

【0181】

いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、被験体の肝グリコーゲンレベルが、治療前のベースラインレベルに比べて低下する。通常、ベースラインレベルは治療の直前に測定する。いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、肝グリコーゲンレベルが、治療直前のベースラインレベルに比べて、少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または95%低下する。いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、肝グリコーゲンレベルが、未治療の被験体の肝

グリコーゲンレベルに比べて低下する。

【0182】

いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、被験体の血清アスパラギン酸トランスアミナーゼ（AST）レベルが、治療前のベースラインレベルに比べて低下する。通常、ベースラインレベルは治療の直前に測定する。いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、血清ASTレベルが、治療直前のベースラインレベルに比べて、少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または95%低下する。いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、血清ASTレベルが、約600IU/L、500IU/L、400IU/L、300IU/L、200IU/L、100IU/L、50IU/L、25IU/L、20IU/Lまたは10IU/L未満にまで低下する。いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、血清ASTレベルが、未治療の被験体の血清ASTレベルに比べて低下する。

10

【0183】

いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、被験体の血清アラニントランスアミナーゼ（ALT）レベルが、治療前のベースラインレベルに比べて低下する。通常、ベースラインレベルは治療の直前に測定する。いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、血清ALTレベルが、治療直前のベースラインレベルに比べて、少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または95%低下する。いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、血清ALTレベルが、約1000IU/L、900IU/L、800IU/L、700IU/L、600IU/L、500IU/L、400IU/L、300IU/L、200IU/L、100IU/L、50IU/L、25IU/L、20IU/Lまたは10IU/L未満にまで低下する。いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、血清ALTレベルが、未治療の被験体の血清ALTレベルに比べて低下する。

20

【0184】

いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、被験体の血清乳酸デヒドロゲナーゼ（LDH）レベルが、治療前のベースラインレベルに比べて低下する。通常、ベースラインレベルは治療の直前に測定する。いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、血清乳酸デヒドロゲナーゼLDHレベルが、治療直前のベースラインレベルに比べて、少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または95%低下する。いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、血清LDHレベルが、約2000IU/L、1500IU/L、1000IU/L、900IU/L、800IU/L、700IU/L、600IU/L、500IU/L、400IU/L、300IU/L、200IU/Lまたは100IU/L未満にまで低下する。いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、血清LDHレベルが、未治療の被験体の血清LDHレベルに比べて低下する。

30

【0185】

いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、被験体由来の生物学的試料中のGAA酵素活性が、治療前のベースラインレベルに比べて上昇する。通常、ベースラインレベルは治療の直前に測定する。生物学的試料の例として、例えば、全血、血清、血漿、尿及び組織試料（例えば、筋肉、肝臓、皮膚線維芽細胞）が挙げられる。いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、GAA酵素活性が、治療直前のベースラインレベルに比べて、少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または95%上昇する。いくつかの実施形態では、提供組成物の投与の結果、GAA酵素活性が、未治療の被験体のGAA酵素活性に比べて上昇する。

40

【0186】

様々な実施形態によれば、送達するmRNAの発現のタイミングは、特定の医学的必要性に適合するように調整することができる。いくつかの実施形態において、提供するmRNAがコードするタンパク質の発現は、提供するリポソーム及び／または組成物の投与の1、2、3、6、12、24、48、72及び／または96時間後に検出可能である。い

50

くつかの実施形態では、送達するmRNAがコードするタンパク質の発現は、投与の1週間後、2週間後、及び／または1か月後に検出可能である。

【実施例】

【0187】

本発明の特定の化合物、組成物及び方法を、特定の実施形態に従って具体的に記載してきたが、以下の実施例は、本発明の化合物を例示するためにのみ機能し、それらを限定することを意図するものではない。

【0188】

実施例1. GAA mRNAの送達及び発現のための例示的なリポソーム製剤

本実施例は、*in vivo*でのGAA mRNAの効果的な送達及び発現のための例示的なリポソーム製剤を提示する。

脂質材料

本明細書に記載の製剤は、GAAタンパク質をコードするmRNAをカプセル化するように設計され、1つ以上のカチオン性脂質、ヘルパー脂質（例えば、非カチオン性脂質及び／またはコレステロール系脂質）及びPEG化脂質を様々な割合で用いる多成分脂質混合物を含有する。カチオン性脂質として、DOTAP（1, 2 - ジオレイル - 3 - トリメチルアンモニウムプロパン）、DODAP（1, 2 - ジオレイル - 3 - ジメチルアンモニウムプロパン）、DOTMA（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）、DLinDMA（Heyes, J. ; Palmer, L. ; Bremner, K. ; MacLachlan, I. “Cationic lipid saturation influences intracellular delivery of encapsulated nucleic acids” J. Contr. Rel. 2005, 107, 276 - 287）、DLin-KC2-DMA（Semple, S. C. et al. “Rational Design of Cationic Lipids for siRNA Delivery” Nature Biotech. 2010, 28, 172 - 176）、C12-200（Love, K. T. et al. “Lipid-like materials for low-dose *in vivo* gene silencing” PNAS 2010, 107, 1864 - 1869）、cKK-E12（3, 6 - ビス（4 - （ビス（2 - ヒドロキシドデシル）アミノ）ブチル）ピペラジン - 2, 5 - ジオン）、HGT5000、HGT5001、HGT4003、ICE、ジアルキルアミノ系、イミダゾール系、グアニジニウム系などを挙げることができる（しかし、これらだけに限るものではない）。ヘルパー脂質として、DSPC（1, 2 - ジステアロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン）、DPPC（1, 2 - ジパルミトイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン）、DOPE（1, 2 - ジオレイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン）、DOPC（1, 2 - ジオレイル - sn - グリセロ - 3 - ホスフォチジルコリン（phosphatidylcholine））、DPPE（1, 2 - ジパルミトイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン）、DMPE（1, 2 - ジミリストイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン）、DOPG（, 2 - ジオレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホ - （1' - rac - グリセロール））、コレステロールなどを挙げることができる（しかし、これらだけに限るものではない）。PEG化脂質として、鎖長C₆〜C₂₀のアルキル鎖（複数可）を有する脂質に共有結合した最大鎖長5 kDaのポリ（エチレン）グリコール鎖を挙げることができる（しかし、これらだけに限るものではない）。

【0189】

遺伝子をコードするプラスミドDNA鋳型から*in vitro*転写によってコドン最適化ヒト酸性αグルコシダーゼ（GAA）メッセンジャーRNAを合成し、続いて5'キャップ構造（Cap1）（Fechter, P. ; Brownlee, G. G. “Recognition of mRNA cap structures by viral and cellular proteins” J. Gen. Virology 2005, 86, 1239 - 1249）、及びゲル電気泳動で測定した鎖長がおよそ250ヌ

10

20

30

40

50

クレオチドの3'ポリ(A)テール(配列番号7)を付加した。各mRNA産物中に存在する5'及び3'非翻訳領域を、それぞれX及びYとして表すとともに、記載のように定義する(下記参照)。

例示的なコドン最適化ヒト酸性αグルコシダーゼ(GAA)mRNA

構築物の設計:

X - 配列番号3 - Y

5'及び3'UTR配列

X(5'UTR配列) =

GGACAGAUCCGCGGAGACGCCAUCCACGCUGUUUUGAC
CUCCAUAGAAGACACCGGGACCGAUCCAGCCUCCGCGGGCC
GGGAACGGUGCAUUGGAACGCGGGAUUC CCGUGCCAAGAG
UGACUACCCGUC CUUGACACG [配列番号8]

10

Y(3'UTR配列) =

CGGGUGGCAUCCCUUGUGACCCCUCCCCAGUGCCUCUCCU
GGCCCUUGGAAGUUGCCACUCCAGUGCCCAACAGCCUUGUC
CUAAUAAAAUUAAGUUGCAUCAAGCU [配列番号9]

または

GGGUGGCAUCCCUUGUGACCCCUCCCCAGUGCCUCUCCU
GCCCUUGGAAGUUGCCACUCCAGUGCCCAACAGCCUUGUCC
UAAUAAAAUUAAGUUGCAUCAAGCU [配列番号10]

20

【0190】

例示的なコドン最適化ヒトGAA mRNA配列は、詳細な説明の節に記載した配列番号3を有する。

【0191】

例示的な完全長コドン最適化ヒト酸性αグルコシダーゼ(GAA)メッセンジャーRNA配列を以下に示す:

GGACAGAUCCGCGGAGACGCCAUCCACGCUGUUUUGAC
CUCCAUAGAAGACACCGGGACCGAUCCAGCCUCCGCGGGCC
GGGAACGGUGCAUUGGAACGCGGGAUUC CCGUGCCAAGAG
UGACUACCCGUC CUUGACACGAUGGGAGUCAGACACCCGCG
CGUGCUCGCACAGGCUUCUGGCCGUGUGCGCACUCGUGAG
UCUGGCGGACUGCUGCGUUGCUGGGGCAUAUUCUUCUCCAC
GACUUUCUUCUUGGUGCCCCGAGAAUUGUCGGGCUUCGUCGC
CGGUACUGGAAGAAACCCACCCCGCACAUAGCAGGGGCGC
GUCGCGGGCCUGGUCCGAGGGGAUGCCCAAGGCACAUCCCGGA
AGGCCACGAGCCGUC CCGACUCAAUGUGACGUACCUCCCA
AUUCCCGGUUCGACUGUGCGGCCAGACAAAGGCAAUCACGCA
AGAGCAGUGCGAAGCCCGUGGAUGCUGCUAUUAUUCGGCG
AAGCAGGGACUUCAGGGAGCCCAAGUUGGGGAGCCCUUGGU
GUUUCUUC CCGCCUUCCUAUCCCUCAUAUAAGCUGGAGAA
UUUGUCGUC CUUGGAAAUUGGGGUUAUACCGCUACUCUUAAG
AGAACCAACCCCAUAUUCUUC CCGAAGGACAUC CUUAUCUC
UGCGGCUUCGACGUGAUGAUGGAGACAGAAAAUAGGCUGCA
UUUCACGAUCAAAAGACCCGGCGGAACCGGAGAUUAUGAGGUU
CCGCUUGAGACUCCCCACGUUCACUCUCGUGCGCCUUCAC
CCUUGUACUCCGUGGAGUUCUCGGGAAGAACCGUUCGGGGU
GAUCGUCAGACGUC AACUUGAUGGUAGGGUAUUGCUGAAC
ACAACGGUCGCCCCCUUGUUUUUCGCCGACCAAGUUUCUGC
AGCUUUCGACAUCGCUUGCCGUC CCAAGUAUAUCACAGGGCU
CGCGGAGCAUCUUUCACCCCUCAUGCUGAGCACGAGCUGG

30

40

50

ACACGGGAUUACGCUUCUGGAACAGGGGAUCUCGCGCCGACGCG
CCGGAGCGAAUUUGUAUGGGGUCGCAUCCCUUCUACCUUCGCG
AUUGGAAGACGGGGGUUCCGCGCACGGAGUAUUCUUGCUU
AAUUCUAAUGCGGAUGGACGUUGUCUUGCAGCCCUCCCUUG
CUUUGUCGUGGCGUUCACGCGGGGGGCAUUUUGGACGUUUA
CAUCUUUUUGGGACCCGAGGCCAAAGAGCGUAGUGCAGCAG
UAUUUGGAUGUAUGUGGGCUACCCCUUCAUGCCGCCUUAUU
GGGGACUGGGGGUUCACUCUCUGCCGCGUGGGGGUACUCUUC
GACCGCGGAUCACCCGCGCAGGUGGGUCGAGAACAUAGACCAGA
GCACAUUUCCCUUUGGACGUGCAGUGGAUAUAUUUGGAUU
ACAUGGAUAAGCCGAAGAGACUUCACGUUCAUAAGGACGG
GUUUAGAGAUUUUCCCGCGAUGGUGCAAGAAUUGCACCCAG
GGUGGGCGCAGAUACAUGAUGAUCGUCGAUCCCGCCAUCA
GCAGCUCGGGACCAAGCGGGGAGUUACCGGCCUUAACGAUGA
GGGACUUAAGGAGAGGCGUCUUUAUCACGAACGAAACAGGU
CAGCCGCGUCAUUGGUAAAGUGUGGGCCUGGAUCAACGGCCU
UUCCCGACUUCACGA AUCCCAACAGCCCUUGCCUGGUGGGA
AGACAUGGUGGGCGGAGUUUCACGACCAAGUACCGUUGAU
GGGAUGUGGAUUGAUUAUGAACGAACCCUCAAAACUUUAUUC
GCGGCUUCGGAAGAUGGAUGCCCGAAUA AUGAGCUUGAGAA
UCCCCCGUAUGUGCCAGGGGUGGUAGGUGGGACGCUCCAG
GCCGCUACGAUCUGUGCGUCAUCAUCAGUUCUUGUCA
CGCACUACAACUUGCACAAUCUUUACGGUUUGACUGAAGC
CAUCGCUUCGCAUCGCGCGCGUGGUCAAAGCGCGUGGUACG
CGACCCUUCGUUAUUUCUCGGUCCACA UUUGCCGGGGCACG
GUCGGUAUGCCGGACACUGGACGGGAGAUUCUGGUUCUAG
CUGGGAGCAGCUCGCGUCGAGCGUACCGGAGAUCCUCCAG
UUCAAUCUUUUGGGAGUUCCGCGUCGUCGGCGCUGACGUGU
GCGGUUUUCUCGGA AACACAUCAGAAGAGCUUUGCGUACG
CUGGACACAGCUCGGUGCGUUUUACCCCUUAUGAGAAAC
CAUAACUCGUUGCUCUCACUCCCUCAAAGAGCCGUACAGUU
UUUCGGAGCCUGCGCAACAGGCGAUGCGGAAGGCAUUGAC
ACUUCGCUAUGCACUGCUC CCGCAUCUCUAUACUCUGUUC
CAUCAGGCCCAUGUGGCUGGAGAAACGGUGGCAGGGCCCC
UGUUCUUGGAGUUC CCCC AAAGAUAGUUC CACAUGGACCGU
GGAUCACCAGUUGCUGUGGGGAGAGGCGCUUCUGAUCACU
CCGGUACUUCAGGCGGGUAAGCGGAAGUCACUGGGGUUU
UCCCGCUUGGGACCUUGGUACGACCUUCAGACUGUCC CAGU
AGAAGCCCUUCGGAAGCCUGCCACCUC CCGUGCUGCACCC
CGCGAGCCUGCAAUCCAUAAGCGAGGGCCAGUGGGUAACGU
UGCCAGCCCCACUGGAUA CCAUCA AUGUCCACCUCAGGGC
GGGUUACAUAUAUCCCUUC CCAAGGCCCUUGGGUUGACCAAC
ACAGAGUCGCGCCAGCAGCCAAUGGCACUUGCGGUUCGCAU
UGACGAAAGGGGGUGAAGCCCGAGGGGAACUGUUUUUGGGA
UGACGGGGAAAGCCUUGAGGUGCUGGAACGGGGAGCGUAC
ACACAAGUCAUUUUUCUUGGCCAGGAACAACACUAUUGUCA
ACGAGUUGGUGCGCGUGACCUUGAGGGUGCCGGACUGCA
ACUGCAGAAGGUCACGGUCCUCGGAGUGGCAGACAGCACCC
CAACAGGUCCUUAAGUAACGGAGUACCUUGUCUGAACUUUA
CAUACUCCCCGGACACGAAGGUGCUCGACAUCUGUGUGUC

10

20

30

40

50

GCUGCUUAUGGGGGAACAGUUUCUCGUGAGCUGGUGCUAG
CGGGUGGGCAUCCCUUGUGACCCCUCCCCAGUGCCUCUCCUG
GCCCUGGAAGUUGCCACUCCAGUGCCCAACAGCCUUGUCC
UAAUAAAAUUAAGUUGCAUCAAGCU [配列番号11]

【0192】

別の実施例における、完全長コドン最適化ヒト酸性 α グルコシダーゼ（GAA）メッセンジャーRNA配列を以下に示す：

GGACAGAUCGCCUGGAGACGCCAUCCACGCUGUUUUUGAC
CUCCAUAAGAACACACCGGGACCGAUCCAGCCUCCGCGGGCC
GGGAACGGUGCAUUGGAACGCGGGAUUCCCCGUGCCAAGAG
UGACUCACCGUCCUUGACACGAUGGGAGUCAGACACCCGCG
CGUGCUCGCACAGGCUUCUGGCCGUGUGCGCACUCGUGAG
UCUGGGCGACUGCUGCGUUGCUGGGGGCAUAUUCUUCUCCAC
GACUUUUCUCUUGGUGCCCCCGAGAAUUGUCGGGCUUCGUCGC
CGGUACUGGAAGAAACCCACCCCGCACAUACAGCAGGGCGCG
GUCGCGGGCCUGGUCCGAGGGGAUGCCCAGGGCACAUCCCGGA
AGGCCACGAGCCGUCGCCGACUCAAUUGUGACGUACCUCCCA
AUUCCCGGUUCGACUGUGCGGCCAGACAAGGCCAAUCACGCA
AGAGCAGUGCGAAGCCCGUGGAUGCUCUAUAUUCGCGCG
AAGCAGGGACUUCAGGGAGCCCAAGAUGGGGCAGCCCUUGGU
GUUUCUUCCCGCCUUCUUAUCCCUCAUAUAAGCUGGAGAA
UUUGUCGUCUCCUGGAAAUGGGGUUAACCGCUACUCUUAACG
AGAACCAACCCCCACAUAUCUUCGGAAGGACAUCUUAACUC
UGCGGCUUCGACGUGAUGAUGGAGACAGAAAAUAGGCUGCA
UUUCACGAUCAAGACCCGGCGGAACCGGAGAUUAUGAGGUU
CCGCUUGAGACUCCCCACGUUCACUCUCGUGCGCCUUCAC
CCUUGUACUCCGUGGAGUUCUCGGAAGAACCGUUCGGGGU
GAUCGUCAGACGUC AACUUGAUGGUAGGGUAUUGCUGAAC
ACAACGGUUCGCCCCCUUGUUUUUCGCCGACCAAGUUUCUGC
AGCUUUCGACAUCGCUUGCCGUC CAGUAUAUCACAGGGCU
CGCGGAGCAUCUUUCACCCCUCAUGCUGAGCACGAGCUGG
ACACGGGAUUACGCUUCUGGAACAGGGAUUCGCGCGCCGACGC
CCGGAGCGAAUUUGUAUGGGGUCGCAUCCCUUCUACCUCGC
AUUGGAAGACGGGGGUUCCGCGCACGGAGUAUUCUUGCUU
AAUUCUAAUGCGAUGGACGUUGUCUUGCAGCCCUCCCCUG
CUUUGUCGUGGCGUUCACGGGGGGCAUUUUGGACGUUUA
CAUCUUUUUGGGACCCGAGCCAAAGAGCGUAGUGCAGCAG
UAUUUGGAUGUAGUGGGCUACCCCUUCAUGCCGCCUUAUU
GGGGACUGGGGUUCCAUCUCUGCCGCGUGGGGGUACUCUUC
GACCGCGAUCACCCGCCAGGUGGUCGAGAACAUAGACCAGA
GCACAUUUCCCUUUGGACGUGCAGUGGAUUAUUGGAUU
ACAUGGAUAAGCCGAAGAGACUUCACGUUCAUAAGGACGG
GUUUAGAGAUUUUCCCGCGAUGGUGCAAGAAUUGCACCCAG
GGUGGGCGCAGAUACAUGAUGAUCGUCGAUCCCGCCAUCA
GCAGCUCGGGACCAAGCGGGGAGUUACCGGCCUUAACGAUGA
GGGACUUAGGAGAGGCGUCUUUAUCAACGAACGAAACAGGU
CAGCCGCUCAUUGGUAAAGUGUGGCCUGGAUCAACGGGCCU
UUC CCGACUUCACGA AUCCCAACAGCCCU CGCCUGGUGGGA
AGACAUGGUGGCGGAGUUUCACGACCAAGUACCGUUUGAU
GGGAUGUGGAUUGAUUAUGAACGAACCCUCAAAACUUUAUUC

G C G G C U C G G A A G A U G G A U G C C C G A A U A A U G A G C U U G A G A A
 U C C C C C G U A U G U G C C A G G G G U G G U A G G U G G G A C G C U C C A G
 G C C G C U A C G A U C U G U G C G U C A U C A C A U C A G U U C U U G U C A A
 C G C A C U A C A A C U U G C A C A A U C U U U A C G G U U U G A C U G A A G C
 C A U C G C U U C G C A U C G C G C G C U G G U C A A A G C G C G U G G U A C G
 C G A C C C U U C G U U A U U U C U C G G U C C A C A U U U G C C G G G C A C G
 G U C G G U A U G C C G G A C A C U G G A C G G G A G A U G U C U G G U C U A G
 C U G G G A G C A G C U C G C G U C G A G C G U A C C G G A G A U C C U C C A G
 U U C A A U C U U U U G G G A G U U C C G C U C G U C G G C G C U G A C G U G U
 G C G G U U U U C U C G G A A A C A C A U C A G A A G A G C U U U G C G U A C G 10
 C U G G A C A C A G C U C G G U G C G U U U U A C C C C U U U A U G A G A A A C
 C A U A A C U C G U U G C U C U C A C U C C C U C A A G A G C C G U A C A G U U
 U U U C G G A G C C U G C G C A A C A G G C G A U G C G G A A G G C A U U G A C
 A C U U C G C U A U G C A C U G C U C C C G C A U C U C U A U A C U C U G U U C
 C A U C A G G C C C A U G U G G C U G G A G A A A C G G U G G C G A G G C C C C
 U G U U C U U G G A G U U C C C C A A A G A U A G U U C C A C A U G G A C C G U
 G G A U C A C C A G U U G C U G U G G G G A G A G G C G C U U C U G A U C A C U
 C C G G U A C U U C A G G C G G G U A A A G C G G A A G U C A C U G G G U A U U
 U C C C G C U U G G G A C C U G G U A C G A C C U U C A G A C U G U C C C A G U
 A G A A G C C C U C G G A A G C C U G C C A C C U C C C C C U G C U G C A C C C 20
 C G C G A G C C U G C A A U C C A U A G C G A G G G C C A G U G G G U A A C G U
 U G C C A G C C C C A C U G G A U A C C A U C A A U G U C C A C C U C A G G G C
 G G G U U A C A U U A U C C C U C U C C A A G G C C C U G G G U U G A C C A C C
 A C A G A G U C G C G C C A G C A G C C A A U G G C A C U U G C G G U C G C A U
 U G A C G A A A G G G G G U G A A G C C C G A G G G G A A C U G U U U U G G G A
 U G A C G G G G A A A G C C U U G A G G U G C U G G A A C G G G G A G C G U A C
 A C A C A A G U C A U U U U C U U G G C C A G G A A C A A C A C U A U U G U C A
 A C G A G U U G G U G C G C G U G A C C U C U G A G G G U G C C G G A C U G C A
 A C U G C A G A A G G U C A C G G U C C U C G G A G U G G C G A C A G C A C C C
 C A A C A G G U C C U U A G U A A C G G A G U A C C U G U C U C G A A C U U U A 30
 C A U A C U C C C C G G A C A C G A A G G U G C U C G A C A U C U G U G U G U C
 G C U G C U U A U G G G G G A A C A G U U U C U C G U G A G C U G G U G C U A G
 G G G U G G C A U C C C U G U G A C C C C U C C C C A G U G C C U C U C C U G G
 C C C U G G A A G U U G C C A C U C C A G U G C C C A C C A G C C U U G U C C U
 A A U A A A A U U A A G U U G C A U C A A A G C U [配列番号12]

【0193】

例示的な製剤プロトコール

A. c K K - E 1 2

c K K - E 1 2、D O P E、コレステロール及びDMG - P E G 2 Kの50 mg/mL
 エタノール溶液のアリコートを混合し、最終体積3 mLまでエタノールで希釈した。これ
 とは別に、G A A mRNAの緩衝水溶液（10 mMクエン酸／150 mM NaCl、
 pH 4.5）を1 mg/mLのストックから調製した。脂質溶液をmRNA水溶液に急速
 に注入し、振盪して20%エタノール中の最終懸濁液を得た。得られたナノ粒子懸濁液を
 濾過し、1×PBS（pH 7.4）でダイアフィルトレーションし、濃縮し、2～8℃で
 保存した。最終濃度＝0.64 mg/mL G A A mRNA（カプセル化）であった。
 $Z_{ave} = 80 \text{ nm}$ ； $PDI = 0.17$ であった。封入率＝85%；収率＝89%であっ
 た。

【0194】

B. C 1 2 - 2 0 0

C 1 2 - 2 0 0、D O P E、コレステロール及びDMG - P E G 2 Kの50 mg/mL

エタノール溶液のアリコートを混合し、最終体積 3 mL までエタノールで希釈する。これとは別に、GAA mRNA の緩衝水溶液 (10 mM クエン酸 / 150 mM NaCl、pH 4.5) を 1 mg/mL のストックから調製する。脂質溶液を mRNA 水溶液に急速に注入し、振盪して 20 % エタノール中の最終懸濁液を得る。得られるナノ粒子懸濁液を濾過し、1 × PBS (pH 7.4) でダイアフィルトレーションし、濃縮し、2 ~ 8 °C で保存する。GAA カプセル化 mRNA の最終濃度、 Z_{ave} 、 $Dv(50)$ 及び $Dv(90)$ を測定する。

【0195】

C. HGT4003

HGT4003、DOPE、コレステロール及び DMG-PEG2K の 50 mg/mL エタノール溶液のアリコートを混合し、最終体積 3 mL までエタノールで希釈する。これとは別に、GAA mRNA の緩衝水溶液 (10 mM クエン酸 / 150 mM NaCl、pH 4.5) を 1 mg/mL のストックから調製する。脂質溶液を mRNA 水溶液に急速に注入し、振盪して 20 % エタノール中の最終懸濁液を得る。得られるナノ粒子懸濁液を濾過し、1 × PBS (pH 7.4) でダイアフィルトレーションし、濃縮し、2 ~ 8 °C で保存する。GAA カプセル化 mRNA の最終濃度、 Z_{ave} 、 $Dv(50)$ 及び $Dv(90)$ を測定する。

【0196】

D. ICE

ICE、DOPE、コレステロール及び DMG-PEG2K の 50 mg/mL エタノール溶液のアリコートを混合し、最終体積 3 mL までエタノールで希釈する。これとは別に、GAA mRNA の緩衝水溶液 (10 mM クエン酸 / 150 mM NaCl、pH 4.5) を 1 mg/mL のストックから調製する。脂質溶液を mRNA 水溶液に急速に注入し、振盪して 20 % エタノール中の最終懸濁液を得る。得られるナノ粒子懸濁液を濾過し、1 × PBS (pH 7.4) でダイアフィルトレーションし、濃縮し、2 ~ 8 °C で保存する。GAA カプセル化 mRNA の最終濃度、 Z_{ave} 、 $Dv(50)$ 及び $Dv(90)$ を測定する。

【0197】

E. HGT5001

HGT5001、DOPE、コレステロール及び DMG-PEG2K の 50 mg/mL エタノール溶液のアリコートを混合し、最終体積 3 mL までエタノールで希釈する。これとは別に、GAA mRNA の緩衝水溶液 (10 mM クエン酸 / 150 mM NaCl、pH 4.5) を 1 mg/mL のストックから調製する。脂質溶液を mRNA 水溶液に急速に注入し、振盪して 20 % エタノール中の最終懸濁液を得る。得られるナノ粒子懸濁液を濾過し、1 × PBS (pH 7.4) でダイアフィルトレーションし、濃縮し、2 ~ 8 °C で保存する。GAA カプセル化 mRNA の最終濃度、 Z_{ave} 、 $Dv(50)$ 及び $Dv(90)$ を測定する。

【0198】

F. HGT5000

HGT5000、DOPE、コレステロール及び DMG-PEG2K の 50 mg/mL エタノール溶液のアリコートを混合し、最終体積 3 mL までエタノールで希釈する。これとは別に、GAA mRNA の緩衝水溶液 (10 mM クエン酸 / 150 mM NaCl、pH 4.5) を 1 mg/mL のストックから調製する。脂質溶液を mRNA 水溶液に急速に注入し、振盪して 20 % エタノール中の最終懸濁液を得る。得られるナノ粒子懸濁液を濾過し、1 × PBS (pH 7.4) でダイアフィルトレーションし、濃縮し、2 ~ 8 °C で保存する。GAA カプセル化 mRNA の最終濃度、 Z_{ave} 、 $Dv(50)$ 及び $Dv(90)$ を測定する。

【0199】

G. DLinKC2DMA

DLinKC2DMA、DOPE、コレステロール及び DMG-PEG2K の 50 mg

10

20

30

40

50

／mLエタノール溶液のアリコートを混合し、最終体積3 mLまでエタノールで希釈する。これとは別に、GAA mRNAの緩衝水溶液（10 mMクエン酸／150 mM NaCl、pH 4.5）を1 mg/mLのストックから調製する。脂質溶液をmRNA水溶液に急速に注入し、振盪して20 %エタノール中の最終懸濁液を得る。得られるナノ粒子懸濁液を濾過し、1×PBS（pH 7.4）でダイアフィルトレーションし、濃縮し、2～8℃で保存する。GAAカプセル化mRNAの最終濃度、 Z_{ave} 、 $Dv(50)$ 及び $Dv(90)$ を測定する。

【0200】

H. DODAP

DODAP、DOPE、コレステロール及びDMG-PEG2Kの50 mg/mLエタノール溶液のアリコートを混合し、最終体積3 mLまでエタノールで希釈する。これとは別に、GAA mRNAの緩衝水溶液（10 mMクエン酸／150 mM NaCl、pH 4.5）を1 mg/mLのストックから調製する。脂質溶液をmRNA水溶液に急速に注入し、振盪して20 %エタノール中の最終懸濁液を得る。得られるナノ粒子懸濁液を濾過し、1×PBS（pH 7.4）でダイアフィルトレーションし、濃縮し、2～8℃で保存する。GAAカプセル化mRNAの最終濃度、 Z_{ave} 、 $Dv(50)$ 及び $Dv(90)$ を測定する。

10

【0201】

I. DODMA

DODMA、DOPE、コレステロール及びDMG-PEG2Kの50 mg/mLエタノール溶液のアリコートを混合し、最終体積3 mLまでエタノールで希釈する。これとは別に、GAA mRNAの緩衝水溶液（10 mMクエン酸／150 mM NaCl、pH 4.5）を1 mg/mLのストックから調製する。脂質溶液をmRNA水溶液に急速に注入し、振盪して20 %エタノール中の最終懸濁液を得る。得られるナノ粒子懸濁液を濾過し、1×PBS（pH 7.4）でダイアフィルトレーションし、濃縮し、2～8℃で保存する。GAAカプセル化mRNAの最終濃度、 Z_{ave} 、 $Dv(50)$ 及び $Dv(90)$ を測定する。

20

【0202】

実施例2. GAA mRNAを充填したリボソームナノ粒子の静脈内投与

本実施例は、GAA mRNAを充填したリボソームナノ粒子を投与する例示的な方法、及び*in vivo*で様々な標的組織中のGAA mRNA及びグリコーゲン进行分析する方法を説明する。

30

【0203】

全ての研究は、GAAノックアウトマウスを用いて行った。マウスを、1.0 mg/kg用量の単回ボーラス尾静脈注射により、ヒトGAA mRNAを充填したcKK-E12に基づく脂質ナノ粒子で処置した。マウスを殺処分し、30分、3時間、6時間、12時間、24時間、48時間、72時間及び7日目に生理食塩水で灌流した。

【0204】

各マウスの肝臓及び筋肉などの組織を採取し、別々の部分に配分し、10 %中性緩衝ホルマリンまたは急速凍結保存し、分析のために-80℃で保存した。

40

【0205】

処理したマウスの筋肉内での活性医薬成分（GAA mRNA）の直接検出を、*insitu*ハイブリダイゼーション（ISH）に基づく方法を用いて達成した。図1A及び1Bに示すように、6時間及び12時間目に、外来性ヒトGAAメッセンジャーRNAを検出した。

【0206】

GAA mRNA脂質ナノ粒子の投与後、肝グリコーゲンレベル（図2A）は、未処理GAAノックアウトマウスの肝グリコーゲンレベル（図2B）に比べて低下した。

【0207】

実施例3. GAA mRNAを充填したリボソームナノ粒子の筋肉内投与

50

本実施例は、G A A m R N Aを充填したリポソームナノ粒子を投与する例示的な方法、及び *i n v i v o*での様々な標的組織におけるG A A m R N A及びグリコーゲンの分析方法を例示する。

【0208】

全ての研究は、G A Aノックアウトマウスを用いて行った。マウスを、 1.0 mg/kg 用量の単回筋肉内注射によって、ヒトG A A m R N Aを充填したc K K - E 1 2に基づく脂質ナノ粒子で処置した。マウスを殺処分し、24時間目に生理食塩水で灌流した。

【0209】

各マウスの肝臓及び筋肉などの組織を採取し、別々の部分に配分し、10%中性緩衝ホルマリンまたは急速凍結保存して、分析のために -80°C で保存した。

10

【0210】

処理したマウスの筋肉内での活性医薬成分(G A A m R N A)の直接検出を、*i n s i t u*ハイブリダイゼーション(I S H)に基づく方法を用いて達成した。図3に示すように、24時間目に、外来性ヒトG A AメッセンジャーR N Aを高レベルで検出した。

【0211】

G A A m R N A脂質ナノ粒子の投与後に、四頭筋グリコーゲンレベル(図4 A及び4 B)は、未処理のG A Aノックアウトマウスの四頭筋グリコーゲンレベル(図4 C及び4 D)に比べて低下していた。

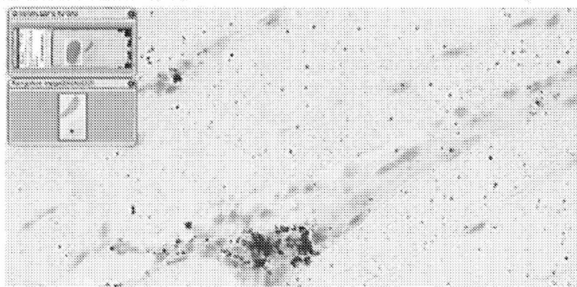
【0212】

均等物

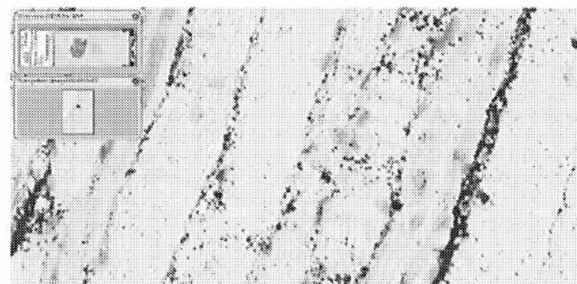
20

当業者であれば、本明細書に記載する本発明の特定の実施形態に対する多くの均等物を認識し、または日常的な実験を用いて確認するであろう。本発明の範囲は、上記の説明に限定することを意図するものではなく、添付の特許請求の範囲にこれを記載する。

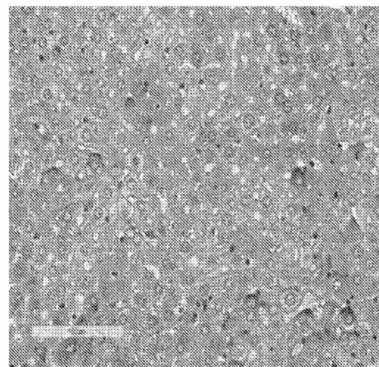
【図1 A】



【図1 B】

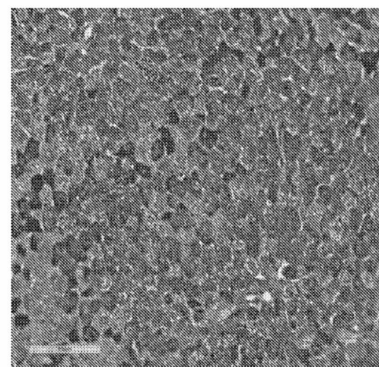


【図2 A】



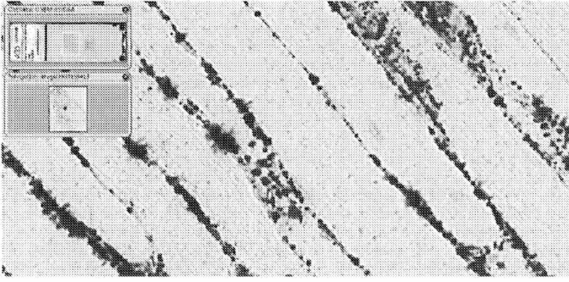
20x

【図2 B】

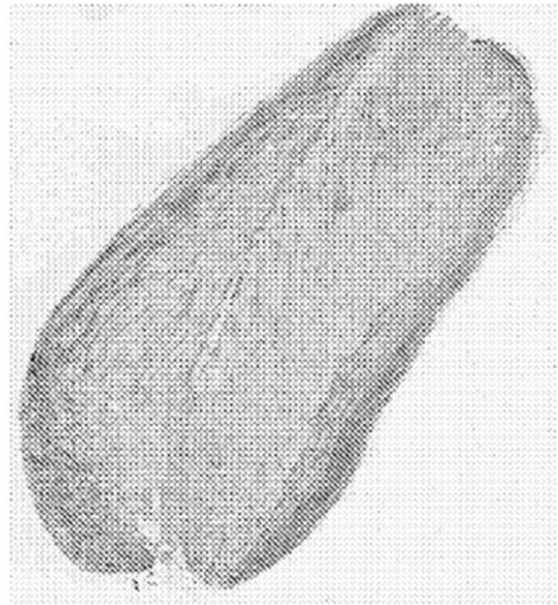


20x

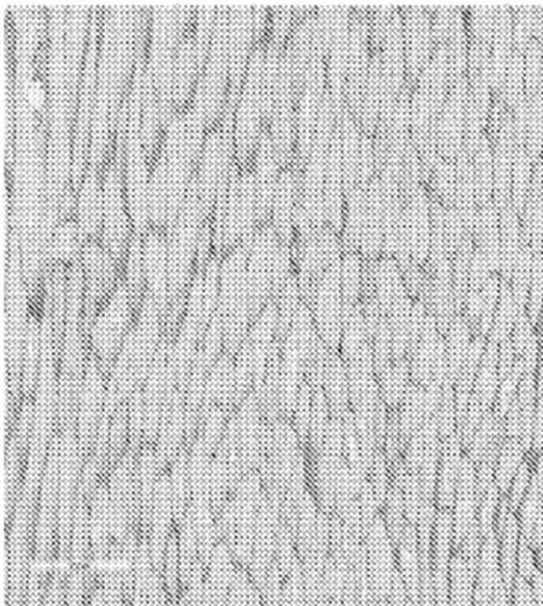
【図 3】



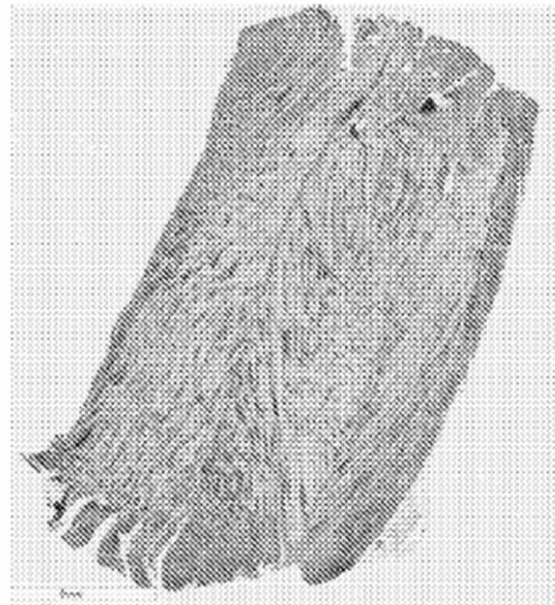
【図 4 A】



【図 4 B】

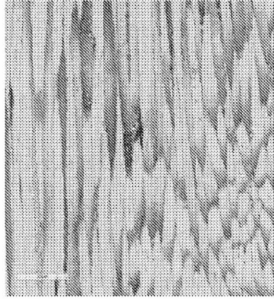


【図 4 C】



10x

【図 4 D】



10x

【配列表】

0006895892000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
A 6 1 K 47/16	(2006.01)	A 6 1 K 47/16
A 6 1 K 47/24	(2006.01)	A 6 1 K 47/24
A 6 1 K 47/14	(2006.01)	A 6 1 K 47/14
A 6 1 P 21/00	(2006.01)	A 6 1 P 21/00
A 6 1 P 39/02	(2006.01)	A 6 1 P 39/02
A 6 1 K 47/28	(2006.01)	A 6 1 K 47/28
A 6 1 K 47/34	(2017.01)	A 6 1 K 47/34
A 6 1 K 38/47	(2006.01)	A 6 1 K 38/47

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 デローサ, フランク

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02421, レキシントン, シャイアー ウェイ 300, シャイアー ヒューマン ジェネティック セラピーズ インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 ハートレイン, マイケル

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02421, レキシントン, シャイアー ウェイ 300, シャイアー ヒューマン ジェネティック セラピーズ インコーポレイテッド 気付

審査官 柴原 直司

(56)参考文献 国際公開第2014/089486 (WO, A1)

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (2014), 111, [11], p.3955-3960

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 48/00

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)