(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第6782171号
(P6782171)

(45)発行日　令和2年11月11日(2020.11.11)　(24)登録日　令和2年10月21日(2020.10.21)

(51)Int.Cl.		F I		
A61K 31/713	(2006.01)	A61K	31/713	ZNA
A61K 9/51	(2006.01)	A61K	9/51	
A61K 47/24	(2006.01)	A61K	47/24	
A61K 47/28	(2006.01)	A61K	47/28	
A61K 48/00	(2006.01)	A61K	48/00	

請求項の数 35　(全 42 頁)

(21)出願番号　特願2016-573975 (P2016-573975)
(86)(22)出願日　平成27年7月2日(2015.7.2)
(65)公表番号　特表2017-520551 (P2017-520551A)
(43)公表日　平成29年7月27日(2017.7.27)
(86)国際出願番号　PCT/US2015/039004
(87)国際公開番号　WO2016/004318
(87)国際公開日　平成28年1月7日(2016.1.7)
審査請求日　平成30年6月29日(2018.6.29)
(31)優先権主張番号　62/020,163
(32)優先日　平成26年7月2日(2014.7.2)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者　507159304
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
アメリカ合衆国　マサチューセッツ州　０２４２１　レキシントン　シャイアー　ウェイ　３００
(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】メッセンジャーＲＮＡのカプセル化

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）を脂質ナノ粒子内にカプセル化するプロセスであって、８０％以上のカプセル化率での脂質ナノ粒子内のｍＲＮＡのカプセル化をもたらすように、低パルス流ポンプによりｍＲＮＡ溶液と脂質溶液を、混合の間１を超える一定のＮ／Ｐ比で混合するステップを含み、前記ナノ粒子が、１００ｎｍ以下の平均サイズおよび０．１９以下の均質性の尺度（ＰＤＩ）を有する、前記プロセス。

【請求項２】

前記ｍＲＮＡ溶液及び前記脂質溶液が、前記混合の前に別々に所定の温度まで加熱される、請求項１に記載のプロセス。

【請求項３】

前記ポンプが、ギアポンプである、請求項１に記載のプロセス。

【請求項４】

前記ポンプが、渦巻きポンプである、請求項１に記載のプロセス。

【請求項５】

前記ｍＲＮＡ溶液が、約１５０～２５０ｍｌ／分、２５０～５００ｍｌ／分、５００～１０００ｍｌ／分、１０００～２０００ｍｌ／分、２０００～３０００ｍｌ／分、３０００～４０００ｍｌ／分、または４０００～５０００ｍｌ／分の範囲の流速で混合される、請求項１に記載のプロセス。

【請求項６】

前記脂質溶液が、約２５～７５ｍｌ／分、約７５～２００ｍｌ／分、約２００～３５０ｍｌ／分、約３５０～５００ｍｌ／分、約５００～６５０ｍｌ／分、約６５０～８５０ｍｌ／分、または約８５０～１０００ｍｌ／分の範囲の流速で混合される、請求項１に記載のプロセス。

【請求項７】

前記脂質溶液が、１つ以上のカチオン性脂質、１つ以上のヘルパー脂質、１つ以上のコレステロール系脂質及びＰＥＧ脂質をエタノール中に含む、請求項１に記載のプロセス。

【請求項８】

前記脂質溶液が、２０％以下のエタノールを含む、請求項１に記載のプロセス。

【請求項９】

前記脂質ナノ粒子が、タンジェンシャルフローろ過によりさらに精製される、請求項８に記載のプロセス。

【請求項１０】

前記脂質溶液が、Ｃ１２－２００、ＭＣ３、ＤＬｉｎＤＭＡ、ＤＬｉｎｋＣ２ＤＭＡ、ｃＫＫ－Ｅ１２、ＩＣＥ（イミダゾール系）、ＨＧＴ５０００、ＨＧＴ５００１、ＤＤＡＢ、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、及びそれらの組み合わせからなる群より選択される１つ以上のカチオン性脂質を含む、請求項１に記載のプロセス。

【請求項１１】

前記脂質溶液が、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－フォスホチジルコリン）、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）、および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））から選択される１つ以上の非カチオン性脂質を含む、請求項１に記載のプロセス。

【請求項１２】

前記ｍＲＮＡが、１つ以上の修飾されたヌクレオチドを含む、請求項１に記載のプロセス。

【請求項１３】

前記ｍＲＮＡ溶液および／または前記脂質溶液が、２５～７０℃の範囲の所定の温度である、請求項１に記載のプロセス。

【請求項１４】

前記脂質溶液が、ＰＥＧ修飾された脂質を含む、請求項１に記載のプロセス。

【請求項１５】

前記脂質溶液中の総脂質の少なくとも５％が、ＰＥＧ修飾された脂質である、請求項１３に記載のプロセス。

【請求項１６】

前記ｍＲＮＡ溶液および前記脂質溶液が、前記混合の前に別々に３７℃以上の温度まで加熱され、前記脂質ナノ粒子が、０．１２以下のＰＤＩを有する、請求項５に記載のプロセス。

【請求項１７】

前記ｍＲＮＡ溶液および前記脂質溶液が、前記混合の前に別々に６５℃以上の温度まで加熱され、前記脂質ナノ粒子が、０．１０以下のＰＤＩを有する、請求項５に記載のプロセス。

【請求項１８】
前記ｍＲＮＡ溶液および前記脂質溶液が、前記混合の前に別々に６５℃以上の温度まで加熱され、前記脂質ナノ粒子が、９０％を超えるカプセル化率を有する、請求項５に記載のプロセス。
【請求項１９】
前記Ｎ／Ｐ比が約２～約６である、請求項１に記載のプロセス。
【請求項２０】
メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）を脂質ナノ粒子内にカプセル化するプロセスであって、
約２２０ｍｌ／分～約６０００ｍｌ／分の流速で、クエン酸塩緩衝液をｍＲＮＡ原液と混合することにより、ｍＲＮＡ溶液を生成するステップと
低パルス流ポンプによりｍＲＮＡ溶液と脂質溶液を混合するステップであって、前記ｍＲＮＡ溶液および／または前記脂質溶液が、周囲温度を超える所定の温度である、ステップと
を含む、前記プロセス。
【請求項２１】
前記所定の温度が約６５℃である、請求項２０に記載のプロセス。
【請求項２２】
前記ｍＲＮＡ溶液が、約２００ｍｌ／分の流速で混合される、請求項２０に記載のプロセス。
【請求項２３】
前記脂質溶液が、約５０ｍｌ／分の流速で混合される、請求項２０に記載のプロセス。
【請求項２４】
前記ｍＲＮＡ原液が、１ｍｇ／ｍｌ以上の濃度で前記ｍＲＮＡを含む、請求項２０に記載のプロセス。
【請求項２５】
メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）を脂質ナノ粒子内にカプセル化するプロセスであって、
約２０ｍｌ／分～約６００ｍｌ／分の流速で、ｍＲＮＡ原液をクエン酸塩緩衝液と混合することにより、ｍＲＮＡ溶液を生成するステップと
低パルス流ポンプによりｍＲＮＡ溶液と脂質溶液を混合するステップであって、前記ｍＲＮＡ溶液および／または前記脂質溶液が、周囲温度を超える所定の温度である、ステップと
を含む、前記プロセス。
【請求項２６】
前記脂質溶液が、１つ以上のカチオン性脂質、１つ以上のヘルパー脂質、１つ以上のコレステロール系脂質及びＰＥＧ脂質をエタノール中に含む、請求項２０に記載のプロセス。
【請求項２７】
前記ｍＲＮＡ溶液及び前記脂質溶液が、２０％エタノール中へと混合され、脂質ナノ粒子の懸濁液を結果もたらす、請求項２０に記載のプロセス。
【請求項２８】
前記脂質ナノ粒子が、タンジェンシャルフローろ過によりさらに精製される、請求項２７に記載のプロセス。
【請求項２９】
前記所定の温度が約６５℃である、請求項２５に記載のプロセス。
【請求項３０】
前記ｍＲＮＡ溶液が約２００ｍｌ／分の流速で混合される、請求項２５に記載のプロセス。
【請求項３１】

前記脂質溶液が約５０ｍｌ／分の流速で混合される、請求項２５に記載のプロセス。
【請求項３２】
前記ｍＲＮＡ原液が、１ｍｇ／ｍｌ以上の濃度で前記ｍＲＮＡを含む、請求項２５に記載のプロセス。
【請求項３３】
前記脂質溶液が、１つ以上のカチオン性脂質、１つ以上のヘルパー脂質、１つ以上のコレステロール系脂質及びＰＥＧ脂質をエタノール中に含む、請求項２５に記載のプロセス。
【請求項３４】
前記ｍＲＮＡ溶液及び前記脂質溶液が、２０％エタノール中へと混合され、脂質ナノ粒子の懸濁液を結果もたらす、請求項２５に記載のプロセス。
【請求項３５】
前記脂質ナノ粒子が、タンジェンシャルフローろ過によりさらに精製される、請求項３４に記載のプロセス。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願の相互参照
本出願は、その開示がその全体において参照により本明細書に組み込まれる、２０１４年７月２日に出願された、米国仮特許出願第６２／０２０，１６３号に対する優先権を主張する。
【背景技術】
【０００２】
メッセンジャーＲＮＡ療法（ＭＲＴ）は、様々な疾患の処置のためのますます重要な手法となっている。ＭＲＴは、患者の体内でのｍＲＮＡによりコードされるタンパク質の産生のためにその治療を必要とする患者へのメッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）の投与を必然的に含む。脂質ナノ粒子は、ｍＲＮＡの効率的なインビボでの送達のためにｍＲＮＡをカプセル化するためによく使用される。しかしながら、ｍＲＮＡ搭載脂質ナノ粒子を産生するための現行の方法は、カプセル化効率が乏しい、低いｍＲＮＡ回収及び／または不均質な粒子サイズという問題を抱える。
【発明の概要】
【課題を解決するための手段】
【０００３】
本発明は、なかでも、脂質ナノ粒子製剤及びｍＲＮＡカプセル化のための改善されたプロセスを提供する。特に、本発明は、混合する前にｍＲＮＡ溶液及び／または脂質溶液を前もって加熱することが、有意に改善されたカプセル化効率、ｍＲＮＡ回収率、及びより均質かつより小さい粒子サイズ（例えば、１００ｎｍ未満）をもたらすという驚くべき発見に基づく。
【０００４】
ゆえに、いくつかの実施形態では、本発明は、メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）を脂質ナノ粒子内にカプセル化するプロセスであって、ｍＲＮＡ溶液と脂質溶液を混合するステップを含み、ｍＲＮＡ溶液及び／または脂質溶液が、周囲温度を超える所定の温度である、前記プロセスを提供する。いくつかの実施形態では、本発明に好適な所定の温度は、約３０℃、３７℃、４０℃、４５℃、５０℃、５５℃、６０℃、６５℃、または７０℃以上である。いくつかの実施形態では、本発明に好適な所定の温度は、約２５～７０℃、約３０～７０℃、約３５～７０℃、約４０～７０℃、約４５～７０℃、約５０～７０℃、または約６０～７０℃の範囲である。特定の実施形態では、本発明に好適な所定の温度は、約６５℃である。
【０００５】
いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡ溶液及び脂質溶液は、混合前に別々に所定の温度ま

で加熱される。いくつかの実施形態では、混合する前に、ｍＲＮＡ溶液は、所定の温度まで加熱され、脂質溶液は、周囲温度である。いくつかの実施形態では、周囲温度のｍＲＮＡ原液を加熱された緩衝液に加えて所定の温度にすることによって、ｍＲＮＡ溶液は所定の温度まで加熱される。いくつかの実施形態では、緩衝液は、約４．５以下（例えば、約４．４、４．２、４．０または３．８以下）のｐＨを有する。

【０００６】

いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡ溶液及び脂質溶液は、低パルス流ポンプにより混合される。いくつかの実施形態では、好適なポンプは、ギアポンプである。いくつかの実施形態では、好適なポンプは、蠕動ポンプである。いくつかの実施形態では、好適なポンプは、渦巻きポンプである。

【０００７】

いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡ溶液は、約１５０～２５０ｍｌ／分、２５０～５００ｍｌ／分、５００～１０００ｍｌ／分、１０００～２０００ｍｌ／分、２０００～３０００ｍｌ／分、３０００～４０００ｍｌ／分、または４０００～５０００ｍｌ／分の範囲の流速で混合される。いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡ溶液は、約２００ｍｌ／分、約５００ｍｌ／分、約１０００ｍｌ／分、約２０００ｍｌ／分、約３０００ｍｌ／分、約４０００ｍｌ／分、または約５０００ｍｌ／分の流速で混合される。

【０００８】

いくつかの実施形態では、脂質溶液は、約２５～７５ｍｌ／分、約７５～２００ｍｌ／分、約２００～３５０ｍｌ／分、約３５０～５００ｍｌ／分、約５００～６５０ｍｌ／分、約６５０～８５０ｍｌ／分、または約８５０～１０００ｍｌ／分の範囲の流速で混合される。いくつかの実施形態では、脂質溶液は、約５０ｍｌ／分、約１００ｍｌ／分、約１５０ｍｌ／分、約２００ｍｌ／分、約２５０ｍｌ／分、約３００ｍｌ／分、約３５０ｍｌ／分、約４００ｍｌ／分、約４５０ｍｌ／分、約５００ｍｌ／分、約５５０ｍｌ／分、約６００ｍｌ／分、約６５０ｍｌ／分、約７００ｍｌ／分、約７５０ｍｌ／分、約８００ｍｌ／分、約８５０ｍｌ／分、約９００ｍｌ／分、約９５０ｍｌ／分、または約１０００ｍｌ／分の流速で混合される。

【０００９】

いくつかの実施形態では、本発明に係るプロセスは、クエン酸塩緩衝液をｍＲＮＡ原液と混合することによりｍＲＮＡ溶液をまず生成するステップを含む。ある特定の実施形態では、好適なクエン酸塩緩衝液は、約１０ｍＭクエン酸塩、約１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、約４．５のｐＨを含有する。いくつかの実施形態では、好適なｍＲＮＡ原液は、ｍＲＮＡを、約０．１０ｍｇ／ｍｌ、１ｍｇ／ｍｌ、約１０ｍｇ／ｍｌ、約５０ｍｇ／ｍｌ、または約１００ｍｇ／ｍｌ以上の濃度で含有する。

【００１０】

いくつかの実施形態では、クエン酸塩緩衝液は、約１００～３００ｍｌ／分、３００～６００ｍｌ／分、６００～１２００ｍｌ／分、１２００～２４００ｍｌ／分、２４００～３６００ｍｌ／分、３６００～４８００ｍｌ／分、または４８００～６０００ｍｌ／分の間の範囲の流速で混合される。いくつかの実施形態では、クエン酸塩緩衝液は、約２２０ｍｌ／分、約６００ｍｌ／分、約１２００ｍｌ／分、約２４００ｍｌ／分、約３６００ｍｌ／分、約４８００ｍｌ／分、または約６０００ｍｌ／分の流速で混合される。

【００１１】

いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡ原液は、約１０～３０ｍｌ／分、約３０～６０ｍｌ／分、約６０～１２０ｍｌ／分、約１２０～２４０ｍｌ／分、約２４０～３６０ｍｌ／分、約３６０～４８０ｍｌ／分、または約４８０～６００ｍｌ／分の間の範囲の流速で混合される。いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡ原液は、約２０ｍｌ／分、約４０ｍｌ／分、約６０ｍｌ／分、約８０ｍｌ／分、約１００ｍｌ／分、約２００ｍｌ／分、約３００ｍｌ／分、約４００ｍｌ／分、約５００ｍｌ／分、または約６００ｍｌ／分の流速で混合される。

【００１２】

いくつかの実施形態では、脂質溶液は、１つ以上のカチオン性脂質、１つ以上のヘルパー脂質、１つ以上のコレステロール系脂質及びＰＥＧ脂質をエタノール中に含有する。いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡ溶液及び脂質溶液が２０％エタノール中へと混合され、脂質ナノ粒子の懸濁液を結果もたらす。いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子は、タンジェンシャルフローろ過によりさらに精製される。

【００１３】

いくつかの実施形態では、精製されたナノ粒子の約５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％超が、約１００ｎｍ未満（例えば、約９５ｎｍ、約９０ｎｍ、約８５ｎｍ、約８０ｎｍ、約７５ｎｍ、約７０ｎｍ、約６５ｎｍ、約６０ｎｍ、約５５ｎｍ、または約５０ｎｍ未満）のサイズを有する。いくつかの実施形態では、実質的に全ての精製されたナノ粒子が、１００ｎｍ未満（例えば、約９５ｎｍ、約９０ｎｍ、約８５ｎｍ、約８０ｎｍ、約７５ｎｍ、約７０ｎｍ、約６５ｎｍ、約６０ｎｍ、約５５ｎｍ、または約５０ｎｍ未満）のサイズを有する。

【００１４】

いくつかの実施形態では、精製されたナノ粒子の約７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％超が、約４０～９０ｎｍ（例えば、約４０～８５ｎｍ、約４０～８０ｎｍ、約４０～７５ｎｍ、約４０～７０ｎｍ、約４０～６５ｎｍ、または約４０～６０ｎｍ）の範囲のサイズを有する。いくつかの実施形態では、実質的に全ての精製されたナノ粒子が、約４０～９０ｎｍ（例えば、約４０～８５ｎｍ、約４０～８０ｎｍ、約４０～７５ｎｍ、約４０～７０ｎｍ、約４０～６５ｎｍ、または約４０～６０ｎｍ）の範囲のサイズを有する。

【００１５】

いくつかの実施形態では、精製されたナノ粒子は、約８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％を超えるカプセル化効率を有する。いくつかの実施形態では、本発明に係るプロセスは、約６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％を超えるｍＲＮＡの回収をもたらす。

【００１６】

いくつかの実施形態では、本発明は、メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）を脂質ナノ粒子内にカプセル化するプロセスであって、（ａ）ｍＲＮＡ溶液及び／または脂質溶液を、周囲温度を超える所定の温度まで別々に加熱すること；（ｂ）脂質ナノ粒子の懸濁液を生成するために加熱したｍＲＮＡ溶液及び／または加熱した脂質溶液を混合すること；及び（ｃ）脂質ナノ粒子を精製することを含む、前記プロセスを提供する。

【００１７】

別の態様では、本発明は、本明細書に記載のプロセスによって生成される脂質ナノ粒子の組成物を提供する。いくつかの実施形態では、本発明は、精製された脂質ナノ粒子を含む組成物であって、精製された脂質ナノ粒子の約９０％超が、約１００ｎｍ未満（例えば、約９５ｎｍ、約９０ｎｍ、約８５ｎｍ、約８０ｎｍ、約７５ｎｍ、約７０ｎｍ、約６５ｎｍ、約６０ｎｍ、約５５ｎｍ、または約５０ｎｍ未満）の個別の粒子サイズを有し、精製された脂質ナノ粒子の約７０％超が、各個別の粒子内にｍＲＮＡをカプセル化する、前記組成物を提供する。いくつかの実施形態では、精製された脂質ナノ粒子の約９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％超が、約１００ｎｍ未満（例えば、約９５ｎｍ、約９０ｎｍ、約８５ｎｍ、約８０ｎｍ、約７５ｎｍ、約７０ｎｍ、約６５ｎｍ、約６０ｎｍ、約５５ｎｍ、または約５０ｎｍ未満）の個別の粒子サイズを有する。いくつかの実施形態では、実質的に全ての精製された脂質ナノ粒子が、約１００ｎｍ未満（例えば、約９５ｎｍ、約９０ｎｍ、約８５ｎｍ、約８０ｎｍ、約７５ｎｍ、約７０ｎｍ、約６５ｎｍ、約６０ｎｍ、約５５ｎｍ、または約５０ｎｍ未満）の個別の粒子サイズを有する。いくつかの実施形態では、精製された脂質ナノ粒子の約７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％超が、各個別の粒子内にｍＲＮＡをカプセル化

する。いくつかの実施形態では、実質的に全ての精製された脂質ナノ粒子が、各個別の粒子内にｍＲＮＡをカプセル化する。いくつかの実施形態では、本発明に係る組成物は、少なくとも約１ｍｇ、５ｍｇ、１０ｍｇ、１００ｍｇ、５００ｍｇ、または１０００ｍｇのカプセル化されたｍＲＮＡを含有する。

【００１８】

いくつかの実施形態では、各個別の脂質ナノ粒子は、１つ以上のカチオン性脂質、１つ以上のヘルパー脂質、１つ以上のコレステロール系脂質及びＰＥＧ脂質を含む。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、及びそれらの組み合わせからなる群より選択される。

【００１９】

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－フォスホチジルコリン）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））から選択される。

【００２０】

いくつかの実施形態では、１つ以上のコレステロール系脂質は、コレステロールまたはＰＥＧ化コレステロールである。いくつかの実施形態では、１つ以上のＰＥＧ修飾された脂質は、C_6－C_{20}長さのアルキル鎖（複数可）を有する脂質に共有付着した最大で５ｋＤａまでの長さのポリ（エチレン）グリコール鎖を含有する。

【００２１】

いくつかの実施形態では、本発明は、１つ以上の修飾されたヌクレオチドを含有するｍＲＮＡをカプセル化するために使用される。いくつかの実施形態では、本発明は、未修飾であるｍＲＮＡをカプセル化するために使用される。

本発明は、例えば、以下の項目を提供する。

（項目１）

メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）を脂質ナノ粒子内にカプセル化するプロセスであって、ｍＲＮＡ溶液と脂質溶液を混合するステップを含み、前記ｍＲＮＡ溶液及び／または前記脂質溶液が、周囲温度を超える所定の温度である、前記プロセス。

（項目２）

前記所定の温度が、約３０℃、３７℃、４０℃、４５℃、５０℃、５５℃、６０℃、６５℃、または７０℃であるかそれを超える、項目１に記載のプロセス。

（項目３）

前記所定の温度が、約２５～７０℃、約３０～７０℃、約３５～７０℃、約４０～７０℃、約４５～７０℃、約５０～７０℃、または約６０～７０℃の範囲である、項目１または２に記載のプロセス。

（項目４）

前記所定の温度が、約６５℃である、先行項目のいずれか一項に記載のプロセス。

（項目５）

前記ｍＲＮＡ溶液及び前記脂質溶液が、前記混合の前に別々に前記所定の温度まで加熱される、先行項目のいずれか一項に記載のプロセス。

（項目６）

前記混合の前に、前記ｍＲＮＡ溶液が前記所定の温度まで加熱され、前記脂質溶液が周囲温度である、項目１～４のいずれか一項に記載のプロセス。

（項目７）

周囲温度のｍＲＮＡ原液を加熱された緩衝液に加えて前記所定の温度にすることによって、前記ｍＲＮＡ溶液が前記所定の温度まで加熱される、先行項目のいずれか一項に記載のプロセス。

（項目８）

前記緩衝液が、約４．５以下のｐＨを有する、項目７に記載のプロセス。

（項目９）

前記ｍＲＮＡ溶液及び前記脂質溶液が、低パルス流ポンプにより混合される、先行項目のいずれか一項に記載のプロセス。

（項目１０）

前記ポンプが、ギアポンプである、項目９に記載のプロセス。

（項目１１）

前記ポンプが、渦巻きポンプである、項目９に記載のプロセス。

（項目１２）

前記ｍＲＮＡ溶液が、約１５０～２５０ｍｌ／分、２５０～５００ｍｌ／分、５００～１０００ｍｌ／分、１０００～２０００ｍｌ／分、２０００～３０００ｍｌ／分、３０００～４０００ｍｌ／分、または４０００～５０００ｍｌ／分の範囲の流速で混合される、先行項目のいずれか一項に記載のプロセス。

（項目１３）

前記ｍＲＮＡ溶液が、約２００ｍｌ／分、約５００ｍｌ／分、約１０００ｍｌ／分、約２０００ｍｌ／分、約３０００ｍｌ／分、約４０００ｍｌ／分、または約５０００ｍｌ／分の流速で混合される、先行項目のいずれか一項に記載のプロセス。

（項目１４）

前記脂質溶液が、約２５～７５ｍｌ／分、約７５～２００ｍｌ／分、約２００～３５０ｍｌ／分、約３５０～５００ｍｌ／分、約５００～６５０ｍｌ／分、約６５０～８５０ｍｌ／分、または約８５０～１０００ｍｌ／分の範囲の流速で混合される、先行項目のいずれか一項に記載のプロセス。

（項目１５）

前記脂質溶液が、約５０ｍｌ／分、約１００ｍｌ／分、約１５０ｍｌ／分、約２００ｍｌ／分、約２５０ｍｌ／分、約３００ｍｌ／分、約３５０ｍｌ／分、約４００ｍｌ／分、約４５０ｍｌ／分、約５００ｍｌ／分、約５５０ｍｌ／分、約６００ｍｌ／分、約６５０ｍｌ／分、約７００ｍｌ／分、約７５０ｍｌ／分、約８００ｍｌ／分、約８５０ｍｌ／分、約９００ｍｌ／分、約９５０ｍｌ／分、または約１０００ｍｌ／分の流速で混合される、先行項目のいずれか一項に記載のプロセス。

（項目１６）

前記プロセスが、クエン酸塩緩衝液をｍＲＮＡ原液と混合することにより前記ｍＲＮＡ溶液をまず生成するステップを含む、先行項目のいずれか一項に記載のプロセス。

（項目１７）

前記クエン酸塩緩衝液が、約１０ｍＭクエン酸塩、約１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、約４．５のｐＨを含む、項目１６に記載のプロセス。

（項目１８）

前記ｍＲＮＡ原液が、前記ｍＲＮＡを、約１ｍｇ／ｍｌ、約１０ｍｇ／ｍｌ、約５０ｍｇ／ｍｌ、約１００ｍｇ／ｍｌ以上の濃度で含む、項目１６または１７に記載のプロセス。

（項目１９）

前記クエン酸塩緩衝液が、約１００～３００ｍｌ／分、３００～６００ｍｌ／分、６００～１２００ｍｌ／分、１２００～２４００ｍｌ／分、２４００～３６００ｍｌ／分、３６００～４８００ｍｌ／分、または４８００～６０００ｍｌ／分の間の範囲の流速で混合

される、項目１６～１８のいずれか一項に記載のプロセス。
（項目２０）
前記クエン酸塩緩衝液が、約２２０ｍｌ／分、約６００ｍｌ／分、約１２００ｍｌ／分、約２４００ｍｌ／分、約３６００ｍｌ／分、約４８００ｍｌ／分、または約６０００ｍｌ／分の流速で混合される、項目１６～１９のいずれか一項に記載のプロセス。
（項目２１）
前記ｍＲＮＡ原液が、約１０～３０ｍｌ／分、約３０～６０ｍｌ／分、約６０～１２０ｍｌ／分、約１２０～２４０ｍｌ／分、約２４０～３６０ｍｌ／分、約３６０～４８０ｍｌ／分、または約４８０～６００ｍｌ／分の間の範囲の流速で混合される、項目１６～２０のいずれか一項に記載のプロセス。
（項目２２）
前記ｍＲＮＡ原液が、約２０ｍｌ／分、約４０ｍｌ／分、約６０ｍｌ／分、約８０ｍｌ／分、約１００ｍｌ／分、約２００ｍｌ／分、約３００ｍｌ／分、約４００ｍｌ／分、約５００ｍｌ／分、または約６００ｍｌ／分の流速で混合される、項目１６～２１のいずれか一項に記載のプロセス。
（項目２３）
前記脂質溶液が、１つ以上のカチオン性脂質、１つ以上のヘルパー脂質、１つ以上のコレステロール系脂質及びＰＥＧ脂質をエタノール中に含む、先行項目のいずれか一項に記載のプロセス。
（項目２４）
前記ｍＲＮＡ溶液及び前記脂質溶液が、２０％エタノール中へと混合され、脂質ナノ粒子の懸濁液を結果もたらす、先行項目のいずれか一項に記載のプロセス。
（項目２５）
前記脂質ナノ粒子が、タンジェンシャルフローろ過によりさらに精製される、項目２４に記載のプロセス。
（項目２６）
前記精製されたナノ粒子の約５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％超が、１００ｎｍ未満のサイズを有する、項目２５に記載のプロセス。
（項目２７）
実質的に全ての前記精製されたナノ粒子が、１００ｎｍ未満のサイズを有する、項目２６に記載のプロセス。
（項目２８）
前記精製されたナノ粒子の約７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％超が５０～８０ｎｍの範囲のサイズを有する、項目２５～２７のいずれか一項に記載のプロセス。
（項目２９）
実質的に全ての前記精製されたナノ粒子が、５０～８０ｎｍの範囲のサイズを有する、項目２５～２８のいずれか一項に記載のプロセス。
（項目３０）
前記精製されたナノ粒子が、約８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％を超えるカプセル化率を有する、項目２５～２９のいずれか一項に記載のプロセス。
（項目３１）
前記プロセスが、約６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％を超えるｍＲＮＡの回収をもたらす、先行項目のいずれか一項に記載のプロセス。
（項目３２）
脂質ナノ粒子内にメッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）をカプセル化するプロセスであって、ａ．ｍＲＮＡ溶液及び／または脂質溶液を、周囲温度を超える所定の温度まで別々に

加熱すること；
ｂ．脂質ナノ粒子の懸濁液を生成するために前記加熱したｍＲＮＡ溶液及び／または前記加熱した脂質溶液を混合すること；及び
ｃ．前記脂質ナノ粒子を精製することを含む、前記プロセス。
（項目３４）
先行項目のいずれか一項に記載のプロセスにより生成された脂質ナノ粒子の組成物。
（項目３５）
精製された脂質ナノ粒子を含む組成物であって、前記精製された脂質ナノ粒子の約９０％超が約１００ｎｍ未満のサイズの個別の粒子を有し、前記精製された脂質ナノ粒子の約７０％超が各個別の粒子内にｍＲＮＡをカプセル化している、前記組成物。
（項目３６）
前記精製された脂質ナノ粒子の約９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％超が、約１００ｎｍ未満の個別粒子サイズを有する、項目３５に記載の組成物。
（項目３７）
実質的に全ての前記精製された脂質ナノ粒子が、約１００ｎｍ未満の個別の粒子サイズを有する、項目３５または３６のいずれか一項に記載の組成物。
（項目３８）
前記精製された脂質ナノ粒子の約７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％超が、各個別の粒子内にｍＲＮＡをカプセル化する、項目３５～３７のいずれか一項に記載の組成物。
（項目３９）
実質的に全ての前記精製された脂質ナノ粒子が、各個別の粒子内にｍＲＮＡをカプセル化する、項目３５～３８のいずれか一項に記載の組成物。
（項目４０）
前記組成物が、少なくとも１ｍｇ、５ｍｇ、１０ｍｇ、１００ｍｇ、５００ｍｇ、または１０００ｍｇのカプセル化されたｍＲＮＡを含む、項目３５～３９のいずれか一項に記載の組成物。
（項目４１）
各個別の脂質ナノ粒子が、１つ以上のカチオン性脂質、１つ以上のヘルパー脂質、１つ以上のコレステロール系脂質及びＰＥＧ脂質を含む、項目３５～４０のいずれか一項に記載の組成物。
（項目４２）
前記１つ以上のカチオン性脂質が、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、及びそれらの組み合わせからなる群より選択される、項目２４に記載のプロセスまたは項目４１に記載の組成物。
（項目４３）
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－フォスホチジルコリン）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））から選択される、項目２４に記載のプロセスまたは項目４１に記載の組成物。

（項目４４）
前記１つ以上のコレステロール系脂質が、コレステロールまたはＰＥＧ化コレステロールである、項目２４に記載のプロセスまたは項目４１に記載の組成物。
（項目４５）
１つ以上のＰＥＧ修飾された脂質が、C_{6}－C_{20}長さのアルキル鎖（複数可）を有する脂質に共有付着した最大で５ｋＤａまでの長さのポリ（エチレン）グリコール鎖を含む、項目２４に記載のプロセスまたは項目４１に記載の組成物。
（項目４６）
前記ｍＲＮＡが、１つ以上の修飾されたヌクレオチドを含む、先行項目のいずれか一項に記載のプロセスまたは組成物。
（項目４７）
前記ｍＲＮＡが、未修飾である、先行項目のいずれか一項に記載のプロセスまたは組成物。
【００２２】
本発明の他の特性、目的、及び利点は、以下の発明を実施するための形態、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す一方で、制限ではなく、例示としてのみ与えられることが理解されるべきである。本発明の範囲内で種々の変更及び修正が、当業者には明らかになるだろう。
【００２３】
図面は、例示のみを目的とし、制限を目的としない。
【図面の簡単な説明】
【００２４】
【図１】均質流ポンプを用いた例示的な規模を大きくした脂質ナノ粒子カプセル化ｍＲＮＡの製剤プロセスの概略図を示す。
【図２】脂質ナノ粒子の例示的な精製及び緩衝液交換システムを示す。
【図３】蠕動ポンプを用いた例示的な規模を大きくした脂質ナノ粒子カプセル化ｍＲＮＡ製剤プロセスの概略図を示す。
【図４】精製及び緩衝液交換のための代替の例示的なタンジェンシャルフローろ過システムを示す。
【図５】蠕動ポンプを用いた例示的な規模を大きくした脂質ナノ粒子カプセル化ｍＲＮＡ製剤プロセスの代替的な概略図を示す。
【００２５】
定義
本発明がより容易に理解されるために、ある特定の用語を最初に以下に定義する。以下の用語及び他の用語に対する追加の定義は、本明細書全体を通して明記する。
【００２６】
おおよそまたは約：本明細書で用いるとき、「おおよそ」または「約」という用語は、対象となる１つ以上の値に適用されるとき、記された基準値に類似する値を指す。ある特定の実施形態では、「おおよそ」または「約」という用語は、別段の記述がない限り、または文脈からそうでないと明確でない限り、（かかる数字が可能な値の１００％を超える場合を除いて）記された基準値のいずれかの方向（より大きいまたはより小さい）で、２５％、２０％、１９％、１８％、１７％、１６％、１５％、１４％、１３％、１２％、１１％、１０％、９％、８％、７％、６％、５％、４％、３％、２％、１％またはそれ未満に入る値の範囲を指す
【００２７】
カプセル化：本明細書で用いるとき、「カプセル化」という用語または文法的等価物は、個別のｍＲＮＡ分子をナノ粒子内に閉じ込めるプロセスを指す。
【００２８】
改善する、増加させる、または低下させる：本明細書で用いるとき、「改善する」「増

加させる」または「低下させる」という用語または文法的等価物は、本明細書に記載の処置の開始前の同じ個体での測定値、または本明細書に記載の処置の不在下での対照対象（または複数の対照対象）における測定値などの、ベースライン測定値に対する値を示す。「対照対象」は、処置される対象と大体同じ年齢の、処置される対象と同じ形態の疾患に罹患している対象である。

【００２９】

不純物：本明細書で用いるとき、「不純物」という用語は、標的材料または化合物の化学組成とは異なる、限られた量の液体、気体、または固体の内部物質を指す。不純物は、混入物とも称される。

【００３０】

インビトロ：本明細書で用いるとき、「インビトロ」という用語は、多細胞生物内よりむしろ人工的環境下、例えば、試験管または反応槽内、細胞培養物内等で生じる事象を指す。

【００３１】

インビボ：本明細書で用いるとき、「インビボ」という用語は、ヒト及び非ヒト動物などの多細胞生物内で生じる事象を指す。細胞をベースとするシステムの文脈において、本用語は、（例えば、インビトロシステムと反対に）生存細胞内で生じる事象を指すように使用されてよい。

【００３２】

単離された：本明細書で用いるとき、「単離された」という用語は、（１）（天然及び／または実験設定のいずれかで）最初に産生された時にそれが会合していた成分の少なくともいくつかから分離されている、ならびに／または（２）人の手により産生された、調製された、及び／または製造されている、物質及び／または実体を指す。単離された物質及び／または実体は、それらが最初は会合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％超から分離されてよい。いくつかの実施形態では、単離された薬剤は、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％を超えて純粋である。本明細書で用いるとき、物質は、実質的に他の成分を含まない場合に「純粋」である。本明細書で用いるとき、単離された物質及び／または実体の純度率（％）の算出は、賦形剤（例えば、緩衝液、溶媒、水等）を含むべきでない。

【００３３】

メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）：本明細書で用いるとき、「メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）」という用語は、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。ｍＲＮＡは、本明細書で用いるとき、修飾及び未修飾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有してよい。

【００３４】

核酸：本明細書で用いるとき、「核酸」という用語は、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または組み込まれることができ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または組み込まれることができる化合物及び／または物質である。いくつかの実施形態では、「核酸」は、個別の核酸残基（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、個別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ならびに単鎖及び／または二重鎖ＤＮＡ及び／またはｃＤＮＡを包含する。さらには、「核酸」、「ＤＮＡ」、「ＲＮＡ」という用語及び／または同様の用語は、核酸類似体、すなわち、ホスホジエステル主鎖以外を有する類似体を含む。例えば、いわゆる「ペプチド核酸」は、当該分野で既知であり、主鎖にてホスホジエステル結合の代わりにペプチド結合を有し、本発明の範囲内であると考えられる。「アミノ酸配列をコードするヌク

レオチド配列」という用語は、互いの変性したものである及び／または同じアミノ酸配列をコードする全てのヌクレオチド配列を含む。タンパク質及び／またはＲＮＡをコードするヌクレオチド配列は、イントロンを含んでよい。核酸は、天然源から精製されることができる、組み換え発現システムを使用して産生されることができる、及び任意選択で精製される、化学的に合成されること等ができる。適切な場合、例えば、化学的に合成された分子の場合、核酸は、化学的に修飾された塩基または糖、主鎖修飾等を有する類似体などのヌクレオシド類似体を含むことができる。核酸配列は、別段の指定がない限り、５’から３’方向で存在する。いくつかの実施形態では、核酸は、天然ヌクレオシド（例えば、アデノシン、チミジン、グアノシン、シチジン、ウリジン、デオキシアデノシン、デオキシチミジン、デオキシグアノシン、及びデオキシシチジン）；ヌクレオシド類似体（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）；化学的に修飾された塩基；生物学的に修飾された塩基（例えば、メチル化塩基）；挿入された塩基；修飾された糖（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、及びヘキソース）；及び／または修飾されたリン酸基（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、これを含む。いくつかの実施形態では、本発明は、送達を促進するまたは達成するために化学的に修飾されていない核酸（例えば、ヌクレオチド及び／またはヌクレオシドを含む、ポリヌクレオチド及び残基）を意味する「未修飾核酸」に特異的に関連する。

【００３５】

塩：本明細書で用いるとき、「塩」という用語は、酸と塩基間の中和反応から結果生じるまたは生じ得るイオン性化合物を指す。

【００３６】

実質的に：本明細書で用いるとき、「実質的に」という用語は、全てまたはほぼ全ての程度または度合いの対象となる特徴または特性を呈する定性的状態を指す。生物学分野の当業者は、生物学的及び化学的現象が、もしあっても、完成する及び／または完成へと進むもしくは絶対的結果を達成するまたは回避することがめったにないことを理解するだろう。「実質的に」という用語は、それゆえ、本明細書で、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らえるように使用される。

【００３７】

収率：本明細書で用いるとき、「収率」という用語は、出発物質としての総ｍＲＮＡと比較してカプセル化後に回収されたｍＲＮＡの割合（％）を指す。いくつかの実施形態では、「回収」という用語は、「収率」という用語と互換可能に使用される。

【発明を実施するための形態】

【００３８】

本発明は、脂質ナノ粒子を製剤する及びｍＲＮＡをカプセル化するための改善されたプロセスを提供する。いくつかの実施形態では、本発明は、メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）を脂質ナノ粒子内にカプセル化するプロセスであって、ｍＲＮＡ溶液と脂質溶液を混合するステップを含み、ｍＲＮＡ溶液及び／または脂質溶液が、周囲温度を超える所定の温度である、前記プロセスを提供する。

【００３９】

本発明の様々な態様は、以下の項において詳細に記載される。項の使用は、本発明を制限することを意図しない。各項は、本発明の任意の態様に適用することができる。本出願では、「または」の使用は、別段の記述がない限り、「及び／または」を意味する。

【００４０】

ｍＲＮＡ

本発明は、任意のｍＲＮＡをカプセル化するために使用されてよい。ｍＲＮＡは、典型的には、ＤＮＡからリボソームへと情報を運ぶＲＮＡのタイプであると考えられる。ｍＲＮＡの存在は、典型的には、非常に短く、プロセシング及び翻訳を含み、それに分解が続く。典型的には、真核生物では、ｍＲＮＡプロセシングは、Ｎ末端（５’）端への「キャップ」の付加、及びＣ末端（３’）端への「尾部」の付加を含む。典型的なキャップは、７－メチルグアノシンキャップであり、これは、５’－５’－三リン酸結合を通して第一の転写されたヌクレオチドに結合するグアノシンである。キャップの存在は、ほとんどの真核細胞において見いだされるヌクレアーゼに対する耐性の提供において重要である。尾部は、典型的には、ポリアデニル化事象であり、それによりポリアデニル部分はｍＲＮＡ分子の３’末端に付加される。この「尾部」の存在は、エクソヌクレアーゼ分解からｍＲＮＡを保護する役割を果たす。メッセンジャーＲＮＡは、リボソームによりタンパク質を構成する一連のアミノ酸へと翻訳される。

【００４１】

ｍＲＮＡは、任意の様々な既知の方法に従って合成されてよい。例えば、本発明に係るｍＲＮＡは、インビトロ転写（ＩＶＴ）を介して合成されてよい。簡潔には、ＩＶＴは、典型的には、プロモーターを含有する線状または環状の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み得る緩衝系と、適切なＲＮＡポリメラーゼ（例えば、Ｔ３、Ｔ７、またはＳＰ６ＲＮＡポリメラーゼ）、デオキシリボヌクレアーゼＩ、ピロホスファターゼ、及び／またはリボヌクレアーゼ阻害薬とで実行する。厳密な条件は、具体的な用途に従って変動するだろう。

【００４２】

いくつかの実施形態では、インビトロで合成されたｍＲＮＡは、ｍＲＮＡ合成中に使用される様々な酵素及び他の試薬を含む望ましくない不純物を除去するために製剤及びカプセル化の前に精製されてよい。

【００４３】

本発明は、様々な長さのｍＲＮＡを製剤及びカプセル化するために使用してよい。いくつかの実施形態では、本発明は、約１ｋｂ、１．５ｋｂ、２ｋｂ、２．５ｋｂ、３ｋｂ、３．５ｋｂ、４ｋｂ、４．５ｋｂ、５ｋｂ、６ｋｂ、７ｋｂ、８ｋｂ、９ｋｂ、１０ｋｂ、１１ｋｂ、１２ｋｂ、１３ｋｂ、１４ｋｂ、１５ｋｂ、または２０ｋｂ以上の長さのインビトロで合成されたｍＲＮＡを製剤及びカプセル化するために使用してよい。いくつかの実施形態では、本発明は、約１～２０ｋｂ、約１～１５ｋｂ、約１～１０ｋｂ、約５～２０ｋｂ、約５～１５ｋｂ、約５～１２ｋｂ、約５～１０ｋｂ、約８～２０ｋｂ、または約８～１５ｋｂの範囲の長さのインビトロで合成されたｍＲＮＡを製剤及びカプセル化するために使用してよい。

【００４４】

本発明は、未修飾であるｍＲＮＡまたは典型的に安定性を向上させる１つ以上の修飾を含有するｍＲＮＡを製剤する及びカプセル化するために使用してよい。いくつかの実施形態では、修飾は、修飾されたヌクレオチド、修飾された糖リン酸塩主鎖、５’及び／または３’非翻訳領域から選択される。

【００４５】

いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡの修飾は、ＲＮＡのヌクレオチドの修飾を含んでよい。本発明に係る修飾されたｍＲＮＡは、例えば、主鎖修飾、糖修飾または塩基修飾を含むことができる。いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡは、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））を、ならびにプリン及びピリミジンの修飾されたヌクレオチド類似体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、シュー

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－ブロモ－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－シュードウラシル、キューオシン、．ベータ．－Ｄ－マンノシル－キューオシン、ワイブトキソシン、及びホスホロアミド酸、ホスホロチオエート、ペプチドヌクレオチド、メチルホスホネート、７－デアザグアノシン、５－メチルシトシン及びイノシンを含むがこれらに限定されない、天然に生じるヌクレオチド及び／またはヌクレオチド類似体（修飾されたヌクレオチド）から合成されてよい。そのような類似体の調製は、例えば、その開示が参照によりその全範囲において本明細書に含まれる米国特許第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号から当業者に既知である。

【００４６】

典型的に、ｍＲＮＡ合成は、Ｎ末端（５’）端への「キャップ」の付加、及びＣ末端（３’）端への「尾部」の付加を含む。キャップの存在は、ほとんどの真核細胞において見いだされるヌクレアーゼに対する耐性の提供において重要である。「尾部」の存在は、エクソヌクレアーゼ分解からｍＲＮＡを保護する役割を果たす。

【００４７】

ゆえに、いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡは、５’キャップ構造を含む。５’キャップは、典型的には以下のように付加される：まず、ＲＮＡ末端ホスファターゼが末端リン酸基の１つを５’ヌクレオチドから取り除き、末端リン酸を２つ残し；次いで、グアノシン三リン酸（ＧＴＰ）がグアニリルトランスフェラーゼを介して末端リン酸に付加され、５’５’５三リン酸結合を生じさせ：次いで、グアニンの７－窒素がメチルトランスフェラーゼによってメチル化される。２’－Ｏ－メチル化は、７－メチルグアノシン三リン酸残基後の第一塩基及び／または第二塩基でも生じ得る。キャップ構造に例には、ｍ７ＧｐｐＮｐ－ＲＮＡ、ｍ７ＧｐｐｐＮｍｐ－ＲＮＡ及びｍ７ＧｐｐｐＮｍｐＮｍｐ－ＲＮＡ（ｍは、２’－Ｏメチル残基を指す）が含まれるが、これらに限定されない。

【００４８】

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する１つ以上のエレメント、例えば、鉄応答エレメントを含む。いくつかの実施形態では、５’非翻訳領域は、約５０～５００ヌクレオチドの長さであってよい。

【００４９】

いくつかの実施形態では、３’非翻訳領域は、ポリアデニル化シグナル、細胞内のｍＲＮＡの位置の安定性に影響するタンパク質に対する結合部位、またはｍｉＲＮＡに対する１つ以上の結合部位の１つ以上を含む。いくつかの実施形態では、３’非翻訳領域は、５０～５００ヌクレオチドの長さまたはそれより長くてよい。

【００５０】

インビトロ転写反応から提供されるｍＲＮＡがいくつかの実施形態で望ましくあり得る一方で、ｍＲＮＡの他の源が、本発明の範囲内であると企図され、それには細菌、真菌類、植物、及び／または動物から産生されたｍＲＮＡを含む。

【００５１】

本発明は、様々なタンパク質をコードするｍＲＮＡを製剤する及びカプセル化するため

に使用してよい。本発明に好適なｍＲＮＡの非限定的な例には、脊髄運動ニューロン１（ＳＭＮ）、アルファ－ガラクトシダーゼ（ＧＬＡ）、アルギニノコハク酸合成酵素（ＡＳＳ１）、ホタルルシフェラーゼ、第ＩＸ因子（ＦＩＸ）、フェニルアラニンヒドロキシラーゼ（ＰＡＨ）、及び嚢胞性線維症膜コンダクタンス受容体（ＣＦＴＲ）をコードするｍＲＮＡが挙げられる。例示的なｍＲＮＡ配列は、実施例の項において詳述される。

【００５２】

ｍＲＮＡ溶液

ｍＲＮＡは、ｍＲＮＡが脂質ナノ粒子内にカプセル化され得るように脂質溶液と混合される溶液中で提供されてよい。好適なｍＲＮＡ溶液は、様々な濃度でカプセル化されるｍＲＮＡを含有する任意の水溶液であってよい。例えば、好適なｍＲＮＡ溶液は、ｍＲＮＡを、約０．０１ｍｇ／ｍｌ、０．０５ｍｇ／ｍｌ、０．０６ｍｇ／ｍｌ、０．０７ｍｇ／ｍｌ、０．０８ｍｇ／ｍｌ、０．０９ｍｇ／ｍｌ、０．１ｍｇ／ｍｌ、０．１５ｍｇ／ｍｌ、０．２ｍｇ／ｍｌ、０．３ｍｇ／ｍｌ、０．４ｍｇ／ｍｌ、０．５ｍｇ／ｍｌ、０．６ｍｇ／ｍｌ、０．７ｍｇ／ｍｌ、０．８ｍｇ／ｍｌ、０．９ｍｇ／ｍｌ、または１．０ｍｇ／ｍｌ以上の濃度で含有してよい。いくつかの実施形態では、好適なｍＲＮＡ溶液は、ｍＲＮＡを、約０．０１～１．０ｍｇ／ｍｌ、０．０１～０．９ｍｇ／ｍｌ、０．０１～０．８ｍｇ／ｍｌ、０．０１～０．７ｍｇ／ｍｌ、０．０１～０．６ｍｇ／ｍｌ、０．０１～０．５ｍｇ／ｍｌ、０．０１～０．４ｍｇ／ｍｌ、０．０１～０．３ｍｇ／ｍｌ、０．０１～０．２ｍｇ／ｍｌ、０．０１～０．１ｍｇ／ｍｌ、０．０５～１．０ｍｇ／ｍｌ、０．０５～０．９ｍｇ／ｍｌ、０．０５～０．８ｍｇ／ｍｌ、０．０５～０．７ｍｇ／ｍｌ、０．０５～０．６ｍｇ／ｍｌ、０．０５～０．５ｍｇ／ｍｌ、０．０５～０．４ｍｇ／ｍｌ、０．０５～０．３ｍｇ／ｍｌ、０．０５～０．２ｍｇ／ｍｌ、０．０５～０．１ｍｇ／ｍｌ、０．１～１．０ｍｇ／ｍｌ、０．２～０．９ｍｇ／ｍｌ、０．３～０．８ｍｇ／ｍｌ、０．４～０．７ｍｇ／ｍｌ、または０．５～０．６ｍｇ／ｍｌの範囲の濃度で含有してよい。いくつかの実施形態では、好適なｍＲＮＡ溶液は、ｍＲＮＡを、最大で約５．０ｍｇ／ｍｌ、４．０ｍｇ／ｍｌ、３．０ｍｇ／ｍｌ、２．０ｍｇ／ｍｌ、１．０ｍｇ／ｍｌ、．０９ｍｇ／ｍｌ、０．０８ｍｇ／ｍｌ、０．０７ｍｇ／ｍｌ、０．０６ｍｇ／ｍｌ、または０．０５ｍｇ／ｍｌまでの濃度で含有してよい。

【００５３】

典型的には、好適なｍＲＮＡ溶液は、緩衝剤及び／または塩も含有してよい。通常、緩衝剤は、ＨＥＰＥＳ、硫酸アンモニウム、炭酸水素ナトリウム、クエン酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、リン酸カリウム及びリン酸ナトリウムを含むことができる。いくつかの実施形態では、緩衝剤の好適な濃度は、約０．１ｍＭ～１００ｍＭ、０．５ｍＭ～９０ｍＭ、１．０ｍＭ～８０ｍＭ、２ｍＭ～７０ｍＭ、３ｍＭ～６０ｍＭ、４ｍＭ～５０ｍＭ、５ｍＭ～４０ｍＭ、６ｍＭ～３０ｍＭ、７ｍＭ～２０ｍＭ、８ｍＭ～１５ｍＭ、または９～１２ｍＭの範囲であってよい。いくつかの実施形態では、緩衝剤の好適な濃度は、約０．１ｍＭ、０．５ｍＭ、１ｍＭ、２ｍＭ、４ｍＭ、６ｍＭ、８ｍＭ、１０ｍＭ、１５ｍＭ、２０ｍＭ、２５ｍＭ、３０ｍＭ、３５ｍＭ、４０ｍＭ、４５ｍＭ、または５０ｍＭ以上である。

【００５４】

例示的な塩は、塩化ナトリウム、塩化マグネシウム、及び塩化カリウムを含むことができる。いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡ溶液中の塩の好適な濃度は、約１ｍＭ～５００ｍＭ、５ｍＭ～４００ｍＭ、１０ｍＭ～３５０ｍＭ、１５ｍＭ～３００ｍＭ、２０ｍＭ～２５０ｍＭ、３０ｍＭ～２００ｍＭ、４０ｍＭ～１９０ｍＭ、５０ｍＭ～１８０ｍＭ、５０ｍＭ～１７０ｍＭ、５０ｍＭ～１６０ｍＭ、５０ｍＭ～１５０ｍＭ、または５０ｍＭ～１００ｍＭの範囲であってよい。好適なｍＲＮＡ溶液中の塩濃度は、約１ｍＭ、５ｍＭ、１０ｍＭ、２０ｍＭ、３０ｍＭ、４０ｍＭ、５０ｍＭ、６０ｍＭ、７０ｍＭ、８０ｍＭ、９０ｍＭ、または１００ｍＭ以上である。

【００５５】

いくつかの実施形態では、好適なｍＲＮＡ溶液は、約３．５～６．５、３．５～６．０

、３．５～５．５．、３．５～５．０、３．５～４．５、４．０～５．５、４．０～５．０、４．０～４．９、４．０～４．８、４．０～４．７、４．０～４．６、または４．０～４．５の範囲のｐＨを有してよい。いくつかの実施形態では、好適なｍＲＮＡ溶液は、約３．５、４．０、４．１、４．２、４．３、４．４、４．５、４．６、４．７、４．８、４．９、５．０、５．２、５．４、５．６、５．８、６．０、６．１、６．３、及び６．５以下のｐＨを有してよい。

【００５６】

様々な方法を使用して本発明に好適なｍＲＮＡ溶液を調製してよい。いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡは、本明細書に記載の緩衝液に直接溶解してよい。いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡ溶液は、ｍＲＮＡ原液をカプセル化のために脂質溶液と混合する前に、緩衝液と混合することによって生成されてよい。いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡ溶液は、ｍＲＮＡ原液をカプセル化のために脂質溶液と混合する直前に、緩衝液と混合することによって生成してよい。いくつかの実施形態では、好適なｍＲＮＡ原液は、約０．２ｍｇ／ｍｌ、０．４ｍｇ／ｍｌ、０．５ｍｇ／ｍｌ、０．６ｍｇ／ｍｌ、０．８ｍｇ／ｍｌ、１．０ｍｇ／ｍｌ、１．２ｍｇ／ｍｌ、１．４ｍｇ／ｍｌ、１．５ｍｇ／ｍｌ、または１．６ｍｇ／ｍｌ、２．０ｍｇ／ｍｌ、２．５ｍｇ／ｍｌ、３．０ｍｇ／ｍｌ、３．５ｍｇ／ｍｌ、４．０ｍｇ／ｍｌ、４．５ｍｇ／ｍｌ、または５．０ｍｇ／ｍｌ以上の濃度で水中にｍＲＮＡを含有してよい。

【００５７】

いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡ原液は、ポンプを使用して緩衝液と混合される。例示的なポンプには、限定されないが、ギアポンプ、蠕動ポンプ及び渦巻きポンプが挙げられる。

【００５８】

典型的には、緩衝液は、ｍＲＮＡ原液のそれよりも大きい割合で混合される。例えば、緩衝液は、ｍＲＮＡ原液の割合より少なくとも１倍、２倍、３倍、４倍、５倍、６倍、７倍、８倍、９倍、１０倍、１５倍、または２０倍大きい割合で混合されてよい。いくつかの実施形態では、緩衝液は、約１００～６０００ｍｌ／分（例えば、約１００～３００ｍｌ／分、３００～６００ｍｌ／分、６００～１２００ｍｌ／分、１２００～２４００ｍｌ／分、２４００～３６００ｍｌ／分、３６００～４８００ｍｌ／分、４８００～６０００ｍｌ／分、または６０～４２０ｍｌ／分）の範囲の流速で混合されてよい。いくつかの実施形態では、緩衝液は、約６０ｍｌ／分、１００ｍｌ／分、１４０ｍｌ／分、１８０ｍｌ／分、２２０ｍｌ／分、２６０ｍｌ／分、３００ｍｌ／分、３４０ｍｌ／分、３８０ｍｌ／分、４２０ｍｌ／分、４８０ｍｌ／分、５４０ｍｌ／分、６００ｍｌ／分、１２００ｍｌ／分、２４００ｍｌ／分、３６００ｍｌ／分、４８００ｍｌ／分、または６０００ｍｌ／分以上の流速で混合される。

【００５９】

いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡ原液は、約１０～６００ｍｌ／分（例えば、約５～５０ｍｌ／分、約１０～３０ｍｌ／分、約３０～６０ｍｌ／分、約６０～１２０ｍｌ／分、約１２０～２４０ｍｌ／分、約２４０～３６０ｍｌ／分、約３６０～４８０ｍｌ／分、または約４８０～６００ｍｌ／分）の範囲の流速で混合される。いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡ原液は、約５ｍｌ／分、１０ｍｌ／分、１５ｍｌ／分、２０ｍｌ／分、２５ｍｌ／分、３０ｍｌ／分、３５ｍｌ／分、４０ｍｌ／分、４５ｍｌ／分、５０ｍｌ／分、６０ｍｌ／分、８０ｍｌ／分、１００ｍｌ／分、２００ｍｌ／分、３００ｍｌ／分、４００ｍｌ／分、５００ｍｌ／分、または６００ｍｌ／分以上の流速で混合される。

【００６０】

脂質溶液

本発明に従い、脂質溶液は、ｍＲＮＡをカプセル化するための脂質ナノ粒子を形成するのに好適な脂質の混合物を含有する。いくつかの実施形態では、好適な脂質溶液は、エタノールをベースとする。例えば、好適な脂質溶液は、純エタノール（すなわち、１００％エタノール）中に溶解された所望の脂質の混合物を含有し得る。別の実施形態では、好適

な脂質溶液は、イソプロピルアルコールをベースとする。別の実施形態では、好適な脂質溶液は、ジメチルスルホキシドをベースとする。別の実施形態では、好適な脂質溶液は、限定されないが、エタノール、イソプロピルアルコール及びジメチルスルホキシドを含む好適な溶媒の混合物である。

【００６１】

好適な脂質溶液は、様々な濃度で所望の脂質の混合物を含有してよい。例えば、好適な脂質溶液は、約０．１ｍｇ／ｍｌ、０．５ｍｇ／ｍｌ、１．０ｍｇ／ｍｌ、２．０ｍｇ／ｍｌ、３．０ｍｇ／ｍｌ、４．０ｍｇ／ｍｌ、５．０ｍｇ／ｍｌ、６．０ｍｇ／ｍｌ、７．０ｍｇ／ｍｌ、８．０ｍｇ／ｍｌ、９．０ｍｇ／ｍｌ、１０ｍｇ／ｍｌ、１５ｍｇ／ｍｌ、２０ｍｇ／ｍｌ、３０ｍｇ／ｍｌ、４０ｍｇ／ｍｌ、５０ｍｇ／ｍｌ、または１００ｍｇ／ｍｌ以上の総濃度で所望の脂質の混合物を含有してよい。いくつかの実施形態では、好適な脂質溶液は、約０．１～１００ｍｇ／ｍｌ、０．５～９０ｍｇ／ｍｌ、１．０～８０ｍｇ／ｍｌ、１．０～７０ｍｇ／ｍｌ、１．０～６０ｍｇ／ｍｌ、１．０～５０ｍｇ／ｍｌ、１．０～４０ｍｇ／ｍｌ、１．０～３０ｍｇ／ｍｌ、１．０～２０ｍｇ／ｍｌ、１．０～１５ｍｇ／ｍｌ、１．０～１０ｍｇ／ｍｌ、１．０～９ｍｇ／ｍｌ、１．０～８ｍｇ／ｍｌ、１．０～７ｍｇ／ｍｌ、１．０～６ｍｇ／ｍｌ、または１．０～５ｍｇ／ｍｌの範囲の総濃度で所望の脂質の混合物を含有してよい。いくつかの実施形態では、好適な脂質溶液は、最大で約１００ｍｇ／ｍｌ、９０ｍｇ／ｍｌ、８０ｍｇ／ｍｌ、７０ｍｇ／ｍｌ、６０ｍｇ／ｍｌ、５０ｍｇ／ｍｌ、４０ｍｇ／ｍｌ、３０ｍｇ／ｍｌ、２０ｍｇ／ｍｌ、または１０ｍｇ／ｍｌまでの総濃度で所望の脂質の混合物を含有してよい。

【００６２】

任意の所望の脂質は、ｍＲＮＡをカプセル化するために好適な任意の比率で混合されてよい。いくつかの実施形態では、好適な脂質溶液は、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脂質）及び／またはＰＥＧ化脂質を含む所望の脂質の混合物を含有する。いくつかの実施形態では、好適な脂質溶液は、１つ以上のカチオン性脂質、１つ以上のヘルパー脂質（例えば、非カチオン性脂質及び／またはコレステロール脂質）及び１つ以上のＰＥＧ化脂質を含む所望の脂質の混合物を含有する。

【００６３】

カチオン性脂質

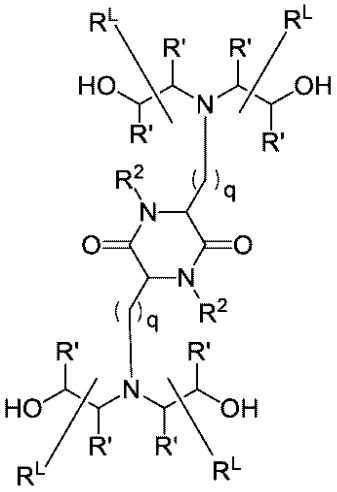
本明細書で用いるとき、「カチオン性脂質」という語句は、生理的ｐＨなどの、選択されたｐＨで実効正電荷を有する多くの脂質種のいずれかを指す。いくつかのカチオン性脂質は、文献において記載されており、その多くが市販されている。本発明の組成物及び方法において使用するのに特に好適なカチオン性脂質には、その両方が参照により本明細書に組み込まれる、国際特許公開ＷＯ２０１０／０５３５７２（及び特に、段落［００２２５］で記載されるＣ１２－２００）及びＷＯ２０１２／１７０９３０において記載されるものが含まれる。ある特定の実施形態では、本発明の組成物及び方法に好適なカチオン性脂質には、２０１２年3月２９日に出願された、米国仮特許出願第６１／６１７，４６８号（参照により本明細書に組み込まれる）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）が含まれる。

【００６４】

いくつかの実施形態では、本発明の組成物及び方法に好適なカチオン性脂質には、その両方が参照により本明細書に組み込まれるＷＯ２０１３０６３４６８及び“Ｌｉｐｉｄ Ｆｏｒｍｕｌａｔｉｏｎｓ ｆｏｒ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ ｏｆ Ｍｅｓｓｅｎｇｅｒ Ｒ

ＮＡ”という表題の米国仮特許出願に記載のカチオン性脂質が含まれる。いくつかの実施形態では、カチオン性脂質は、式Ｉ－ｃ１－ａ：

【化１】



Ｉ－ｃ１－ａ、

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、
の化合物またはその医薬的に許容され得る塩を含む。

【００６５】

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。

【００６６】

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。

【００６７】

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。

【００６８】

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。

【００６９】

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。

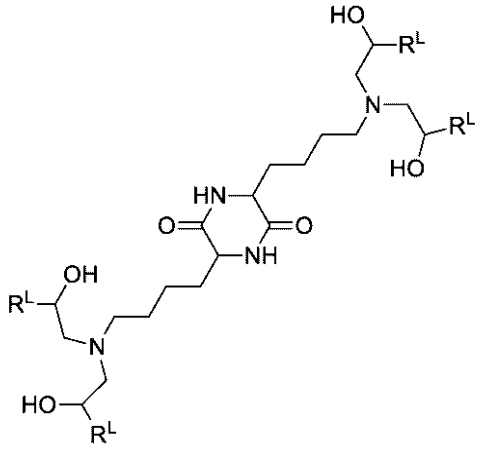
【００７０】

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；各Ｒ^{L}は、独立して、C_{8-12}アルキルである。

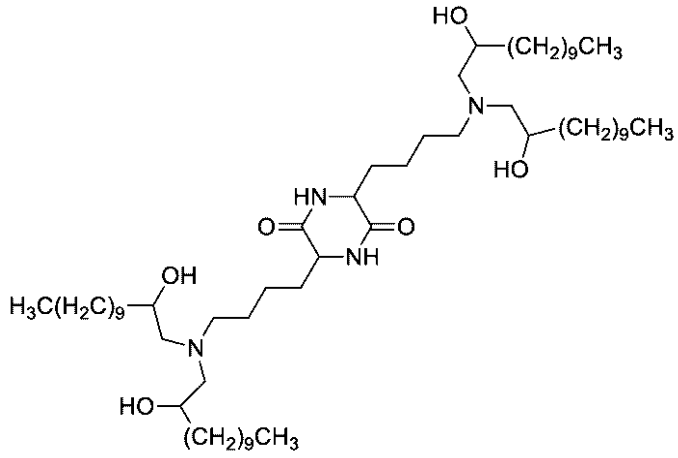
【００７１】

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。

【００７２】
いくつかの実施形態では、カチオン性脂質は、式Ｉ－ｇ：
【化２】



Ｉ－ｇ、
式中、各Ｒ^{L}は、独立して、Ｃ$_{8-12}$アルキルである、の化合物またはその医薬的に許容され得る塩を含む。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。
【００７３】
ある特定の実施形態では、好適なカチオン性脂質は、ｃＫＫ－Ｅ１２、または（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）である。ｃＫＫ－Ｅ１２の構造を以下に示す：
【化３】



。
【００７４】
いくつかの実施形態では、本発明に好適な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リドまたは「ＤＯＴＭＡ」であってよい（Ｆｅｉｇｎｅｒら、（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ’ｌ Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．８４，７４１３（１９８７）；米国特許第４，８９７，３５５号）。他の好適なカチオン性脂質には、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または「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－プロパナミニウムまたは「ＤＯＳＰＡ」（Ｂｅｈｒら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ．’ｌ Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．８６，６９８２（１９８９）；米国特許第５，１７１，６７８号；米国特許第５，３３４，７６１号）、１，２－ジオ

レオイル－３－ジメチルアンモニウム－プロパンまたは「ＤＯＤＡＰ」、１，２－ジオレオイル－３－トリメチルアンモニウム－プロパンまたは「ＤＯＴＡＰ」が挙げられる。

【００７５】

さらなる例示的なカチオン性脂質には、１，２－ジステアリルオキシ－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－アミノプロパンまたは「ＤＳＤＭＡ」、１，２－ジオレイルオキシ－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－アミノプロパンまたは「ＤＯＤＭＡ」、１，２－ジリノレイルオキシ－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－アミノプロパンまたは「ＤＬｉｎＤＭＡ」、１，２－ジリノレニルオキシ－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－アミノプロパンまたは「ＤＬｅｎＤＭＡ」、Ｎ－ジオレイル－Ｎ，Ｎ－ジメチルアンモニウムクロリドまたは「ＤＯＤＡＣ」、Ｎ，Ｎ－ジステアリル－Ｎ，Ｎ－ジメチルアンモニウム（ａｒｎｒｎｏｎｉｕｍ）ブロミドまたは「ＤＤＡＢ」、Ｎ－（１，２－ジミリスチルオキシプロプ－３－イル）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－Ｎ－ヒドロキシエチルアンモニウムブロミドまたは「ＤＭＲＩＥ」、３－ジメチルアミノ－２－（コレスタ－５－エン－３－ベーター－オキシブタン－４－オキシ）－１－（シス，シス－９，１２－オクタデカジエンオキシ）プロパンまたは「ＣＬｉｎＤＭＡ」、２－［５’－（コレスタ－５－エン－３－ベーター－オキシ）－３’－オキサペントキシ）－３－ジメチル－１－（シス，シス－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または「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または「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または「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または「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または「ＤＬｉｎＣＤＡＰ」、２，２－ジリノレイル－４－ジメチルアミノメチル－［１，３］－ジオキソランまたは「ＤＬｉｎ－－ＤＭＡ」、２，２－ジリノレイル－４－ジメチルアミノエチル－［１，３］－ジオキソランまたは「ＤＬｉｎ－Ｋ－ＸＴＣ２－ＤＭＡ」、及び２－（２，２－ジ（（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－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ら、Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈ．２８：１７２－１７６（２０１０）を参照されたい）、またはそれらの混合物が挙げられる（Ｈｅｙｅｓ，Ｊ．ら、Ｊ Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ Ｒｅｌｅａｓｅ １０７：２７６－２８７（２００５）；Ｍｏｒｒｉｓｓｅｙ，ＤＶ．ら、Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２３（８）：１００３－１００７（２００５）；ＰＣＴ公開ＷＯ２００５／１２１３４８Ａ１）。いくつかの実施形態では、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、またはグアニジウム部分の少なくとも１つを含む。

【００７６】

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－ジリノレイル－４－ジメチルアミノエチル－［１，３］－ジオキソラン）、ＭＣ３（（（６Ｚ，９Ｚ，２８Ｚ，３１Ｚ）－ヘプタトリアコンター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］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－ジオレイル－３－ジメチルアンモニウムプロパン）、ＨＧＴ４００３（ＷＯ２０１２／１７０８８９、その教示はそれらの全体が参照により本明細書に組み込まれる）、ＩＣＥ（ＷＯ２０１１／０６８８１０、その教示はそれらの全体が参照により本明細書に組み込まれる）、ＨＧＴ５０００（米国仮特許出願第６１／６１７，４６８号、その教示はそれらの全体が参照により本明細書に組み込まれる）またはＨＧＴ５００１（シスまたはトランス）（仮特許出願第６１／６１７，４６８号）、ＷＯ２０１０／０５３５７２に開示されているものなどのアミノアルコールリピド

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．；Ｍａｃ Ｌａｃｈｌａｎ，Ｉ．“Ｃａｔｉｏｎｉｃ ｌｉｐｉｄ ｓａｔｕｒａｔｉｏｎ ｉｎｆｌｕｅｎｃｅｓ ｉｎｔｒａｃｅｌｌｕｌａｒ ｄｅｌｉｖｅｒｙ ｏｆ ｅｎｃａｐｓｕｌａｔｅｄ ｎｕｃｌｅｉｃ ａｃｉｄｓ”Ｊ．Ｃｏｎｔｒ．Ｒｅｌ．２００５，１０７，２７６－２８７）、ＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡ（Ｓｅｍｐｌｅ，Ｓ．Ｃ．ら、“Ｒａｔｉｏｎａｌ Ｄｅｓｉｇｎ ｏｆ Ｃａｔｉｏｎｉｃ Ｌｉｐｉｄｓ ｆｏｒ ｓｉＲＮＡ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ”Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈ．２０１０，２８，１７２－１７６）、Ｃ１２－２００（Ｌｏｖｅ，Ｋ．Ｔ．ら、“Ｌｉｐｉｄ－ｌｉｋｅ ｍａｔｅｒｉａｌｓ ｆｏｒ ｌｏｗ－ｄｏｓｅ ｉｎ ｖｉｖｏ ｇｅｎｅ ｓｉｌｅｎｃｉｎｇ”ＰＮＡＳ ２０１０，１０７，１８６４－１８６９）から選択されてよい。

【００７７】

いくつかの実施形態では、カチオン性脂質は、重量またはモルで、好適な脂質溶液中の総脂質の少なくとも約５％、１０％、２０％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、または７０％を構成する。いくつかの実施形態では、カチオン性脂質（複数可）は、重量またはモルで、総脂質混合物の約３０～７０％（例えば、約３０～６５％、約３０～６０％、約３０～５５％、約３０～５０％、約３０～４５％、約３０～４０％、約３５～５０％、約３５～４５％、または約３５～４０％）を構成する。

【００７８】

非カチオン性／ヘルパー脂質

本明細書で用いるとき、「非カチオン性脂質」という語句は、任意の中性、双性イオンまたはアニオン性の脂質を指す。本明細書で用いるとき、「アニオン性脂質」という語句は、生理学的ｐＨなどの選択されたｐＨで、正味負電荷を持つ多くの脂質種のいずれかを指す。非カチオン性脂質は、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－トランスＰＥ、１－ステアロイル－２－オレオイル－ホスファチジエタノールアミン（ＳＯＰＥ）、またはそれらの混合物を含むがこれらに限定されない。

【００７９】

いくつかの実施形態では、非カチオン性脂質は、重量またはモルで、好適な脂質溶液中の総脂質の少なくとも約５％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％または７０％を構成してよい。いくつかの実施形態では、非カチオン性脂質（複数可）は、重量またはモルで、好適な脂質溶液中の総脂質の約３０～５０％（例えば、約３０～４５％、約３０～４０％、約３５～５０％、約３５～４５％、または約３５～４０％）を構成する。

【００８０】

コレステロール系脂質

いくつかの実施形態では、好適な脂質溶液は、１つ以上のコレステロール系脂質を含む。例えば、好適なコレステロール系カチオン性脂質は、例えば、ＤＣ－Ｃｈｏｉ（Ｎ，Ｎ－ジメチル－Ｎ－エチルカルボキサ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ら、Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍ．１７９，２８０（１９９１）；Ｗｏｌｆら、ＢｉｏＴｅｃｈｎｉｑｕｅｓ

２３，１３９（１９９７）；米国特許第５，７４４，３３５号）、またはＩＣＥを含む。いくつかの実施形態では、コレステロール系脂質（複数可）は、重量またはモルで、好適な脂質溶液中の総脂質の少なくとも約５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、または７０％を構成する。いくつかの実施形態では、コレステロール系脂質（複数可）は、重量またはモルで、好適な脂質溶液中の総脂質の約３０～５０％（例えば、約３０～４５％、約３０～４０％、約３５～５０％、約３５～４５％、または約３５～４０％）を構成する。

【００８１】

ＰＥＧ化脂質

いくつかの実施形態では、好適な脂質溶液は、１つまたは複数のＰＥＧ化脂質を含む。ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）修飾されたリン脂質及び誘導化された脂質、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］（Ｃ８ＰＥＧ－２０００セラミド）を含む、誘導体化されたセラミド（ＰＥＧ－ＣＥＲ）の使用も本発明により企図される。企図されるＰＥＧ修飾された脂質は、$Ｃ_{6}$－$Ｃ_{20}$長さのアルキル鎖（複数可）で脂質に共有付着する最大で５ｋＤａまでの長さのポリエチレングリコール鎖を含むが、これに限定されない。いくつかの実施形態では、ＰＥＧ修飾されたまたはＰＥＧ化脂質は、ＰＥＧ化コレステロールまたはＰＥＧ－２Ｋである。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、$Ｃ_{14}$または$Ｃ_{18}$）を有するＰＥＧ－セラミドである。

【００８２】

ＰＥＧ修飾されたリン脂質及び誘導体化脂質は、重量またはモルで、好適な脂質溶液中の総脂質の少なくとも約５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、または７０％を構成してよい。いくつかの実施形態では、ＰＥＧ化脂質脂質（複数可）は、重量またはモルで、好適な脂質溶液中の総脂質の約３０～５０％（例えば、約３０～４５％、約３０～４０％、約３５～５０％、約３５～４５％、または約３５～４０％）を構成する。

【００８３】

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修飾された脂質の例示的な組み合わせを実施例の項にて記載する。例えば、好適な脂質溶液は、ｃＫＫ－Ｅ１２、ＤＯＰＥ、ｃｈｏｌ、及びＤＭＧ－ＰＥＧ２Ｋ；Ｃ１２－２００、ＤＯＰＥ、コレステロール、及びＤＭＧ－ＰＥＧ２Ｋ；ＨＧＴ５０００、ＤＯＰＥ、ｃｈｏｌ、及びＤＭＧ－ＰＥＧ２Ｋ；ＨＧＴ５００１、ＤＯＰＥ、ｃｈｏｌ、及びＤＭＧ－ＰＥＧ２Ｋ；ｃＫＫ－Ｅ１２、ＤＰＰＣ、ｃｈｏｌ、及びＤＭＧ－ＰＥＧ２Ｋ；Ｃ１２－２００、ＤＰＰＣ、コレステロール、及びＤＭＧ－ＰＥＧ２Ｋ；ＨＧＴ５０００、ＤＰＰＣ、ｃｈｏｌ、及びＤＭＧ－ＰＥＧ２Ｋ；またはＨＧＴ５００１、ＤＰＰＣ、ｃｈｏｌ、及びＤＭＧ－ＰＥＧ２Ｋを含有してよい。脂質混合物を含むカチオン性脂質、非カチオン性脂質、及び／またはＰＥＧ修飾された脂質の選択、ならびにそのような脂質の相互に対する相対的モル比は、選択された脂質（複数可）の特徴、ならびにカプセル化されるｍＲＮＡの特徴及び性質に基づく。さらなる考慮事項は、例えば、アルキル鎖の飽和、ならびに選択された脂質（複数可）のサイズ、電荷、ｐＨ、ｐＫａ、膜融合性、及び毒性を含む。ゆえに、モル比は適宜調整されてよい。

【００８４】

混合プロセス

本発明は、ｍＲＮＡカプセル化効率及び回収率に及ぼす温度の予期しない効果の発見に基づく。ゆえに、いくつかの実施形態では、本発明は、本明細書に記載の、ｍＲＮＡ溶液と脂質溶液を混合することによって脂質ナノ粒子中にメッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）をカプセル化するプロセスであって、ｍＲＮＡ溶液及び／または脂質溶液が周囲温度を超える所定の温度まで加熱される前記プロセスを提供する。本明細書で用いるとき、「周囲温度」という用語は、室温の温度、または加熱または冷却無しに、対象となる目的物（例えば、ｍＲＮＡ溶液または脂質溶液）を囲む温度を指す。いくつかの実施形態では、周囲

温度は、約２０～２５℃の範囲の温度を指す。

【００８５】

それゆえ、周囲温度を超える所定の温度は、典型的には約２５℃を超える。いくつかの実施形態では、本発明に好適な所定の温度は、約３０℃、３７℃、４０℃、４５℃、５０℃、５５℃、６０℃、６５℃、または７０℃以上である。いくつかの実施形態では、本発明に好適な所定の温度は、約２５～７０℃、約３０～７０℃、約３５～７０℃、約４０～７０℃、約４５～７０℃、約５０～７０℃、または約６０～７０℃の範囲である。特定の実施形態では、本発明に好適な所定の温度は、約６５℃である。

【００８６】

ｍＲＮＡ溶液、または脂質溶液、またはその両方は、混合の前に周囲温度を超える所定の温度まで加熱されてよい。いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡ溶液及び脂質溶液は、混合の前に別々に所定の温度まで加熱される。いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡ溶液及び脂質溶液は、周囲温度で混合されるが、それから混合後所定の温度まで加熱される。いくつかの実施形態では、脂質溶液は、所定の温度まで加熱され、周囲温度でｍＲＮＡ溶液と混合される。いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡ溶液は、所定の温度まで加熱され、周囲温度で脂質溶液と混合される。

【００８７】

いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡ溶液は、周囲温度のｍＲＮＡ原液を加熱された緩衝液に加えて所望の所定の温度を達成することによって所定の温度まで加熱される。

【００８８】

ｍＲＮＡ溶液及び脂質溶液は、ポンプを使用して混合されてよい。カプセル化手順は、広範な規模で生じることができるため、所望の規模に適応するために異なるタイプのポンプを使用してよい。しかしながら、概して、低パルス流ポンプを使用することが望ましい。本明細書で用いるとき、低パルス流ポンプは、安定した流速で連続的な流れを確立することができる任意のポンプを指す。好適なポンプの種類には、これらに限定されないが、ギアポンプ及び渦巻きポンプが含まれる。例示的なギアポンプには、これらに限定されないが、Ｃｏｌｅ－ＰａｒｍｅｒまたはＤｉｅｎｅｒのギアポンプが含まれる。例示的な渦巻きポンプには、これらに限定されないが、ＧｒａｉｎｇｅｒまたはＣｏｌｅ－Ｐａｒｍｅｒにより製造されたものが含まれる。

【００８９】

ｍＲＮＡ溶液及び脂質溶液は、様々な流速で混合されてよい。典型的には、ｍＲＮＡ溶液は、脂質溶液のそれを超える割合で混合されてよい。例えば、ｍＲＮＡ溶液は、脂質溶液のそれより少なくとも１倍、２倍、３倍、４倍、５倍、６倍、７倍、８倍、９倍、１０倍、１５倍、または２０倍大きい割合で混合されてよい。

【００９０】

混合に好適な流速は、規模に基づいて決定されてよい。いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡ溶液は、約４０～４００ｍｌ／分、６０～５００ｍｌ／分、７０～６００ｍｌ／分、８０～７００ｍｌ／分、９０～８００ｍｌ／分、１００～９００ｍｌ／分、１１０～１０００ｍｌ／分、１２０～１１００ｍｌ／分、１３０～１２００ｍｌ／分、１４０～１３００ｍｌ／分、１５０～１４００ｍｌ／分、１６０～１５００ｍｌ／分、１７０～１６００ｍｌ／分、１８０～１７００ｍｌ／分、１５０～２５０ｍｌ／分、２５０～５００ｍｌ／分、５００～１０００ｍｌ／分、１０００～２０００ｍｌ／分、２０００～３０００ｍｌ／分、３０００～４０００ｍｌ／分、または４０００～５０００ｍｌ／分の範囲の流速で混合される。いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡ溶液は、約２００ｍｌ／分、約５００ｍｌ／分、約１０００ｍｌ／分、約２０００ｍｌ／分、約３０００ｍｌ／分、約４０００ｍｌ／分、または約５０００ｍｌ／分の流速で混合される。

【００９１】

いくつかの実施形態では、脂質溶液は、約２５～７５ｍｌ／分、２０～５０ｍｌ／分、２５～７５ｍｌ／分、３０～９０ｍｌ／分、４０～１００ｍｌ／分、５０～１１０ｍｌ／分、７５～２００ｍｌ／分、２００～３５０ｍｌ／分、３５０～５００ｍｌ／分、５００

～６５０ｍｌ／分、６５０～８５０ｍｌ／分、または８５０～１０００ｍｌ／分の範囲の流速で混合される。いくつかの実施形態では、脂質溶液は、約５０ｍｌ／分、約１００ｍｌ／分、約１５０ｍｌ／分、約２００ｍｌ／分、約２５０ｍｌ／分、約３００ｍｌ／分、約３５０ｍｌ／分、約４００ｍｌ／分、約４５０ｍｌ／分、約５００ｍｌ／分、約５５０ｍｌ／分、約６００ｍｌ／分、約６５０ｍｌ／分、約７００ｍｌ／分、約７５０ｍｌ／分、約８００ｍｌ／分、約８５０ｍｌ／分、約９００ｍｌ／分、約９５０ｍｌ／分、または約１０００ｍｌ／分の流速で混合される。

【００９２】

典型的には、ｍＲＮＡ溶液及び脂質溶液は、脂質が、ｍＲＮＡをカプセル化するナノ粒子を形成することができるように、溶液中に混合される。そのような溶液は、製剤またはカプセル化溶液とも称される。好適な製剤またはカプセル化溶液は、エタノールなどの溶媒をベースとしてよい。例えば、好適な製剤またはカプセル化溶液は、約１０％エタノール、約１５％エタノール、約２０％エタノール、約２５％エタノール、約３０％エタノール、約３５％エタノール、または約４０％エタノールをベースとしてよい。

【００９３】

好適な製剤またはカプセル化溶液は、イソプロピルアルコールなどの溶媒をベースとしてよい。例えば、好適な製剤またはカプセル化溶液は、約１０％イソプロピルアルコール、約１５％イソプロピルアルコール、約２０％イソプロピルアルコール、約２５％イソプロピルアルコール、約３０％イソプロピルアルコール、約３５％イソプロピルアルコール、または約４０％イソプロピルアルコールをベースとしてよい。

【００９４】

好適な製剤またはカプセル化溶液は、ジメチルスルホキシドなどの溶媒をベースとしてよい。例えば、好適な製剤またはカプセル化溶液は、約１０％ジメチルスルホキシド、約１５％ジメチルスルホキシド、約２０％ジメチルスルホキシド、約２５％ジメチルスルホキシド、約３０％ジメチルスルホキシド、約３５％ジメチルスルホキシド、または約４０％ジメチルスルホキシドをベースとしてよい。

【００９５】

好適な製剤またはカプセル化溶液は、緩衝剤または塩も含有してよい。例示的な緩衝剤は、ＨＥＰＥＳ、硫酸アンモニウム、炭酸水素ナトリウム、クエン酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、リン酸カリウム及びリン酸ナトリウムを含んでよい。例示的な塩は、塩化ナトリウム、塩化マグネシウム、及び塩化カリウムを含んでよい。

【００９６】

精製

典型的には、製剤及びカプセル化の後、脂質ナノ粒子は、精製される及び／または濃縮される。様々な精製技術を使用してよい。いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子は、タンジェンシャルフローろ過を使用して精製される。クロスフローろ過とも称される、タンジェンシャルフローろ過（ＴＦＦ）は、ろ過される材料が、フィルタを通り抜けるよりむしろ接線的に通過するろ過の種類である。ＴＦＦでは、望ましくない透過水はフィルタを通り抜ける一方で、所望の被保持物はフィルタに沿って通り下流に集められる。従来のデッドエンドろ過において通常遭遇するものと反対に、ＴＦＦでは、典型的には、所望の材料が被保持物中に含有されていることに留意することが重要である。

【００９７】

ろ過される材料に依存して、ＴＦＦは、精密ろ過または限外ろ過のいずれかのために使用される。精密ろ過は、典型的には、フィルタが、０．０５μｍから１．０μｍの間、両端値を含む、の孔サイズを有する事例として定義され、一方で限外ろ過は、典型的には、０．０５μｍ未満の孔サイズを有するフィルタを必然的に含む。孔サイズは、特定のフィルタに対する分子量カットオフ（ＭＷＣＯ）とも称される、公称分画分子量（ＮＭＷＬ）も決定し、典型的には、精密ろ過膜は、１，０００キロダルトン（ｋＤａ）を超えるＮＭＷＬを有し、限外ろ過フィルタは、１ｋＤａから１，０００ｋＤａの間のＮＭＷＬを有する。

【００９８】
タンジェンシャルフローろ過の主要な利点は、従来の「デッドエンド」ろ過中に凝集してフィルタを遮断し得る非透過性粒子（ときに「ろ過ケーキ」とも称される）が、代わりにフィルタの表面に沿って運ばれることである。この利点により、概してフィルタを除去して清掃する必要がなくなり、そのため作業中断時間が著しく低下するために、タンジェンシャルフローろ過は連続運転を要する工業プロセスにおいて広く使用されることが可能になる。
【００９９】
タンジェンシャルフローろ過は、なかでも、濃縮及びダイアフィルトレーションを含むいくつかの目的のために使用することができる。濃縮は、それにより溶質分子が保持される一方で溶媒が溶液から除去される、プロセスである。試料を効率的に濃縮するために、保持される溶質分子の分子量よりも実質的に低いＮＭＷＬまたはＭＷＣＯを有する膜が使用される。通常、当業者は、標的分子（複数可）の分子量を３～６倍下回るＮＭＷＬまたはＭＷＣＯを有するフィルタを選択し得る。
【０１００】
ダイアフィルトレーションは、それにより、小さい望ましくない粒子がフィルタを通り抜け、一方で大きな所望のナノ粒子が、溶液中のそのナノ粒子の濃度を変えることなく、被保持物中に維持される、分画プロセスである。ダイアフィルトレーションは、溶液から塩また反応緩衝液を除去するためにしばしば使用される。ダイアフィルトレーションは、連続的または非連続的であってよい。連続ダイアフィルトレーションでは、ダイアフィルトレーション溶液は、ろ液が生成される速度と同じ速度で試料へと加えられる。非連続ダイアフィルトレーションでは、溶液をまず希釈し、次いで濃縮して出発濃度へと戻す。非連続ダイアフィルトレーションは、所望の濃度のナノ粒子に達するまで反復されてよい。
【０１０１】
精製された及び／または濃縮された脂質ナノ粒子は、例えば、ＰＢＳなどの所望の緩衝液中で製剤されてよい。
【０１０２】
ｍＲＮＡをカプセル化するナノ粒子の提供
本発明に係るプロセスは、従来技術のプロセスと比較して、より均質で小さい粒子サイズ（例えば、１００ｎｍ未満）、ならびに、著しく改善されたカプセル化効率及び／またはｍＲＮＡ回収率をもたらす。
【０１０３】
ゆえに、本発明は、本明細書に記載の精製されたナノ粒子を含む組成物を提供する。いくつかの実施形態では、組成物中の精製されたナノ粒子の大半、すなわち、精製されたナノ粒子の約５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％超は、約１００ｎｍ未満（例えば、約９５ｎｍ、約９０ｎｍ、約８５ｎｍ、約８０ｎｍ、約７５ｎｍ、約７０ｎｍ、約６５ｎｍ、約６０ｎｍ、約５５ｎｍ、または約５０ｎｍ未満）のサイズを有する。いくつかの実施形態では、実質的に全ての精製されたナノ粒子が、１００ｎｍ未満（例えば、約９５ｎｍ、約９０ｎｍ、約８５ｎｍ、約８０ｎｍ、約７５ｎｍ、約７０ｎｍ、約６５ｎｍ、約６０ｎｍ、約５５ｎｍ、または約５０ｎｍ未満）のサイズを有する。
【０１０４】
加えて、狭いナノ粒子サイズ範囲を有するより均質なナノ粒子が、本発明のプロセスによって達成される。例えば、本発明により提供される組成物中の精製されたナノ粒子の約７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％超が、約４０～９０ｎｍ（例えば、約４０～８５ｎｍ、約４０～８０ｎｍ、約４０～７５ｎｍ、約４０～７０ｎｍ、約４０～６５ｎｍ、または約４０～６０ｎｍ）の範囲のサイズを有する。いくつかの実施形態では、実質的に全ての精製されたナノ粒子が、約４０～９０ｎｍ（例えば、約４０～８５ｎｍ、約４０～８０ｎｍ、約４０～７５ｎｍ、約４０～７０ｎｍ、約４０～６５ｎｍ、または約４０～６０ｎｍ）の範囲のサイズを有する。

【０１０５】
いくつかの実施形態では、本発明により提供される組成物中のナノ粒子の分散性、または分子のサイズにおける均質性の尺度（ＰＤＩ）は、約０．１６未満（例えば、約０．１５、０．１４、０．１３、０．１２、０．１１、０．１０、０．０９、または０．０８未満）である。
【０１０６】
いくつかの実施形態では、本発明により提供される組成物中の精製された脂質ナノ粒子の約７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％超が、各個別の粒子内にｍＲＮＡをカプセル化する。いくつかの実施形態では、組成物中の実質的に全ての精製された脂質ナノ粒子が、各個別の粒子中にｍＲＮＡをカプセル化する。
【０１０７】
いくつかの実施形態では、本発明に係る組成物は、少なくとも約１ｍｇ、５ｍｇ、１０ｍｇ、１００ｍｇ、５００ｍｇ、または１０００ｍｇのカプセル化されたｍＲＮＡを含有する。いくつかの実施形態では、本発明に係るプロセスは、約６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％を超えるｍＲＮＡの回収をもたらす。
【実施例】
【０１０８】
本発明のある特定の化合物、組成物及び方法が、ある特定の実施形態に従って特異性とともに記載されている一方で、以下の実施例は、本発明の化合物を単に例示する役割を果たし、それを制限することを意図しない。
【０１０９】
実施例１．ナノ粒子カプセル化プロセスに及ぼす温度の効果
この実施例は、ナノ粒子カプセル化プロセス中の温度の増加が、収率及び／またはカプセル化効率の増加をもたらすことを実証する。
【０１１０】
脂質材料
以下の実施例に記載する製剤は、別段の指定がない限り、様々な核酸材料をカプセル化するように設計された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脂質）及びＰＥＧ化脂質を採用する様々な比率の多成分の脂質混合物を含有する。本プロセスのためのカチオン性脂質は、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．ら、“Ｒａｔｉｏｎａｌ Ｄｅｓｉｇｎ ｏｆ Ｃａｔｉｏｎｉｃ Ｌｉｐｉｄｓ ｆｏｒ ｓｉＲＮＡ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ”Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈ．２０１０，２８，１７２－１７６）、Ｃ１２－２００（Ｌｏｖｅ，Ｋ．Ｔ．ら、“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、グアニジウム系等を含むことができるが、これらに限定されない。ヘルパー脂質は、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－フォスホチジルコリン）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））、コレステロール等を含むことができるが、これらに限定されない。ＰＥＧ化脂質は、Ｃ６－Ｃ２０長さのアルキル鎖（複数可）で脂質に共有付着する最大で５ｋＤａまでの長さのポリ（エチレン）グリコール鎖を含むことができるが、これに限定されない。

【０１１１】

メッセンジャーＲＮＡ材料

コドン最適化ヒト脊髄運動ニューロン１（ＳＭＮ）メッセンジャーＲＮＡ、アルギニノコハク酸合成酵素（ＡＳＳ１）メッセンジャーＲＮＡ、修飾嚢胞性線維症膜コンダクタンス制御因子（ＳＮＩＭ（登録商標）ＣＦＴＲ、２５％シュードウリジン、２５％５－メチル－シチジン）メッセンジャーＲＮＡ、ホタルルシフェラーゼ（ＦＦＬ）メッセンジャーＲＮＡ、第ＩＸ因子（ＦＩＸ）メッセンジャーＲＮＡ、フェニルアラニンヒドロキシラーゼ（ｐｈｅｌｙａｌａｎｉｎｅ　ｈｙｄｒｏｘｙｌａｓｅ）（ＰＡＨ）メッセンジャーＲＮＡ及びアルファ－ガラクトシダーゼ（ＧＬＡ）メッセンジャーＲＮＡを、遺伝子をコードするプラスミドＤＮＡ鋳型からのインビトロ転写により合成し、その後、５‘キャップ構造（キャップ１）（Ｆｅｃｈｔｅｒ，Ｐ．；Ｂｒｏｗｎｌｅｅ，Ｇ．Ｇ．“Ｒｅｃｏｇｎｉｔｉｏｎ　ｏｆ　ｍＲＮＡ　ｃａｐ　ｓｔｒｕｃｔｕｒｅｓ　ｂｙ　ｖｉｒａｌ　ａｎｄ　ｃｅｌｌｕｌａｒ　ｐｒｏｔｅｉｎｓ”Ｊ．Ｇｅｎ．Ｖｉｒｏｌｏｇｙ　２００５，８６，１２３９－１２４９）及びゲル電気泳動により決定されたおおよそ２５０ヌクレオチドの長さの３’ポリＡ尾部が付加された。各ｍＲＮＡ生成物中に存在する５’及び３’非翻訳領域は、それぞれＸ及びＹとして表され、（下に）記載のように定義される。

コドン最適化ヒト脊髄運動ニューロン１（ＳＭＮ）ｍＲＮＡ：

ＸＡＵＧＧＣＣＡＵＧＡＧＣＡＧＣＧＧＡＧＧＣＡＧＣＧＧＣＧＧＡＧＧＡＧＵＧＣＣＣ
ＧＡＧＣＡＧＧＡＧＧＡＣＡＧＣＧＵＧＣＵＧＵＵＣＡＧＧＡＧＡＧＧＣＡＣＣＧＧＣＣ
ＡＧＡＧＣＧＡＵＧＡＣＡＧＣＧＡＵＡＵＣＵＧＧＧＡＣＧＡＵＡＣＣＧＣＵＣＵＧＡＵ
ＣＡＡＧＧＣＣＵＡＣＧＡＣＡＡＧＧＣＣＧＵＧＧＣＣＡＧＣＵＵＣＡＡＧＣＡＣＧＣＣ
ＣＵＧＡＡＡＡＡＣＧＧＧＣＧＡＣＡＵＣＵＧＣＧＡＧＡＣＣＡＧＣＧＧＧＣＡＡＧＣＣＣＡ
ＡＧＡＣＡＡＣＣＣＣＣＡＡＧＡＧＡＡＡＧＣＣＣＧＧＣＣＡＡＧＡＡＧＡＡＵＡＡＧＡＧ
ＣＣＡＧＡＡＡＡＡＧＡＡＣＡＣＣＧＣＣＧＣＣＡＧＣＣＵＧＣＡＧＣＡＧＵＧＧＡＡＧ
ＧＵＧＧＧＣＧＡＣＡＡＧＵＧＣＡＧＣＧＣＣＡＵＣＵＧＧＡＧＣＧＡＧＧＡＣＧＧＣＵ
ＧＣＡＵＣＵＡＣＣＣＣＧＣＣＡＣＣＡＵＣＧＣＣＡＧＣＡＵＣＧＡＣＵＵＣＡＡＧＡＧ
ＡＧＡＧＡＣＣＵＧＣＧＵＧＧＵＣＧＵＧＵＡＣＡＣＣＧＧＧＣＵＡＣＧＧＧＣＡＡＣＡＧＡ
ＧＡＧＧＡＧＣＡＧＡＡＣＣＵＧＡＧＣＧＡＣＣＵＧＣＵＧＡＧＣＣＣＣＡＵＵＵＧＵＧ
ＡＧＧＵＧＧＣＣＡＡＵＡＡＣＡＵＣＧＡＡＣＡＧＡＡＣＧＣＣＣＡＧＧＡＧＡＡＣＧＡ
ＧＡＡＵＧＡＡＡＧＣＣＡＧＧＵＧＡＧＣＡＣＣＧＡＣＧＡＧＡＧＣＧＡＧＡＡＣＡＧＣ
ＡＧＡＵＣＵＣＣＵＧＧＣＡＡＣＡＡＧＡＧＣＧＡＣＡＡＣＡＵＣＡＡＧＣＣＵＡＡＧＵ
ＣＵＧＣＣＣＣＵＵＧＧＡＡＣＡＧＣＵＵＣＣＵＧＣＣＣＣＣＵＣＣＵＣＣＡＣＣＣＡＵ
ＧＣＣＣＧＧＡＣＣＣＡＧＡＣＵＧＧＧＡＣＣＣＧＧＡＡＡＡＣＣＵＧＧＣＣＵＧＡＡＧ
ＵＵＣＡＡＣＧＧＡＣＣＡＣＣＵＣＣＣＣＣＵＣＣＡＣＣＵＣＣＵＣＣＣＣＣＡＣＣＵＣ
ＡＵＣＵＣＣＵＧＡＧＣＵＧＣＵＧＧＣＵＧＣＣＡＣＣＣＵＵＣＣＣＣＡＧＣＧＧＡＣＣ
ＣＣＣＵＡＵＣＡＵＣＣＣＡＣＣＡＣＣＣＣＣＵＣＣＣＡＵＣＵＧＣＣＣＣＧＡＣＡＧＣ
ＣＵＧＧＡＣＧＡＣＧＣＣＧＡＵＧＣＣＣＵＧＧＧＣＡＧＣＡＵＧＣＵＧＡＵＣＡＧＣＵ
ＧＧＵＡＣＡＵＧＡＧＣＧＧＣＵＡＣＣＡＣＡＣＡＧＧＡＵＡＣＵＡＣＡＵＧＧＧＣＵＵ
ＣＡＧＡＣＡＧＡＡＣＣＡＧＡＡＧＧＡＧＧＧＣＡＧＡＵＧＣＵＣＣＣＡＣＵＣＣＣＵＧ
ＡＡＣＵＧＡＹ

ヒトアルファ－ガラクトシダーゼ（ＧＬＡ）ｍＲＮＡ：

ＸＡＵＧＣＡＧＣＵＧＡＧＧＡＡＣＣＣＡＧＡＡＣＵＡＣＡＵＣＵＧＧＧＣＵＧＣＧＣＧ

CUUGCGCUUCGCUUCCUGGCCCUCGUUUCCUGGGACAUCC
CUGGGGCUAGAGCACUGGACAAUGGAUUGGCAAGGACGCC
UACCAUGGGCUGGCUGCACUGGGAGCGCUUCAUGUGCAAC
CUUGACUGCCAGGAAGAGCCAGAUUCCUGCAUCAGUGAGA
AGCUCUUCAUGGAGAUGGCAGAGCUCAUGGUCUCAGAAGG
CUGGAAGGAUGCAGGUUAUGAGUACCUCUGCAUUGAUGAC
UGUUGGAUGGCUCCCCAAAGAGAUUCAGAAGGCAGACUUC
AGGCAGACCCUCAGCGCUUUCCUCAUGGGAUUCGCCAGCU
AGCUAAUUAUGUUCACAGCAAAGGACUGAAGCUAGGGAUU
UAUGCAGAUGUUGGAAAUAAAACCUGCGCAGGCUUCCCUG
GGAGUUUUGGAUACUACGACAUUGAUGCCCAGACCUUUGC
UGACUGGGGAGUAGAUCUGCUAAAAUUUGAUGGUUGUUAC
UGUGACAGUUUGGAAAAUUUGGCAGAUGGUUAUAAGCACA
UGUCCUUGGCCCUGAAUAGGACUGGCAGAAGCAUUGUGUA
CUCCUGUGAGUGGCCUCUUUAUAUGUGGCCCUUUCAAAAG
CCCAAUUAUACAGAAAUCCGACAGUACUGCAAUCACUGGC
GAAAUUUUGCUGACAUUGAUGAUUCCUGGAAAAGUAUAAA
GAGUAUCUUGGACUGGACAUCUUUUAACCAGGAGAGAAUU
GUUGAUGUUGCUGGACCAGGGGGUUGGAAUGACCCAGAUA
UGUUAGUGAUUGGCAACUUUGGCCUCAGCUGGAAUCAGCA
AGUAACUCAGAUGGCCCUCUGGGCUAUCAUGGCUGCUCCU
UUAUUCAUGUCUAAUGACCUCCGACACAUCAGCCCUCAAG
CCAAAGCUCUCCUUCAGGAUAAGGACGUAAUUGCCAUCAA
UCAGGACCCCUUGGGCAAGCAAGGGUACCAGCUUAGACAG
GGAGACAACUUUGAAGUGUGGGAACGACCUCUCUCAGGCU
UAGCCUGGGCUGUAGCUAUGAUAAACCGGCAGGAGAUUGG
UGGACCUCGCUCUUAUACCAUCGCAGUUGCUUCCCUGGGU
AAAGGAGUGGCCUGUAAUCCUGCCUGCUUCAUCACACAGC
UCCUCCCUGUGAAAAGGAAGCUAGGGUUCUAUGAAUGGAC
UUCAAGGUUAAGAAGUCACAUAAAUCCCACAGGCACUGUU
UUGCUUCAGCUAGAAAAUACAAUGCAGAUGUCAUUAAAAG
ACUUACUUUAAY

コドン最適化ヒトアルギニノコハク酸合成酵素（ＡＳＳ１）ｍＲＮＡ：

XAUGAGCAGCAAGGGCAGCGUGGUGCUGGCCUACAGCGGC
GGCCUGGACACCAGCUGCAUCCUGGUGUGGCUGAAGGAGC
AGGGCUACGACGUGAUCGCCUACCUGGCCAACAUCGGCCA
GAAGGAGGACUUCGAGGAGGCCCGCAAGAAGGCCCUGAAG
CUGGGCGCCAAGAAGGUGUUCAUCGAGGACGUGAGCCGCG
AGUUCGUGGAGGAGUUCAUCUGGCCCGCCAUCCAGAGCAG
CGCCCUGUACGAGGACCGCUACCUGCUGGGCACCAGCCUG
GCCCGCCCCUGCAUCGCCCGCAAGCAGGUGGAGAUCGCCC
AGCGCGAGGGCGCCAAGUACGUGAGCCACGGCGCCACCGG
CAAGGGCAACGACCAGGUGCGCUUCGAGCUGAGCUGCUAC
AGCCUGGCCCCCCAGAUCAAGGUGAUCGCCCCCUGGCGCA
UGCCCGAGUUCUACAACCGCUUCAAGGGCCGCAACGACCU
GAUGGAGUACGCCAAGCAGCACGGCAUCCCCAUCCCCGUG
ACCCCCAAGAACCCCUGGAGCAUGGACGAGAACCUGAUGC
ACAUCAGCUACGAGGCCGGCAUCCUGGAGAACCCCAAGAA
CCAGGCCCCCCCCGGCCUGUACACCAAGACCCAGGACCCC
GCCAAGGCCCCCAACACCCCCGACAUCCUGGAGAUCGAGU

UCAAGAAGGGCGUGCCCGUGAAGGUGACCAACGUGAAGGA
CGGCACCACCCACCAGACCAGCCUGGAGCUGUUCAUGUAC
CUGAACGAGGUGGCCGGCAAGCACGGCGUGGGGCCGCAUCG
ACAUCGUGGAGAACCGCUUCAUCGGCAUGAAGAGCCGCGG
CAUCUACGAGACCCCCGCCGGCACCAUCCUGUACCACGCC
CACCUGGACAUCGAGGCCUUCACCAUGGACCGCGAGGUGC
GCAAGAUCAAGCAGGGCCUGGGCCUGAAGUUCGCCGAGCU
GGUGUACACCGGCUUCUGGCACAGCCCCGAGUGCGAGUUC
GUGCGCCACUGCAUCGCCAAGAGCCAGGAGCGCGUGGAGG
GCAAGGUGCAGGUGAGCGUGCUGAAGGGCCAGGUGUACAU 10
CCUGGGCCGCGAGAGCCCCCUGAGCCUGUACAACGAGGAG
CUGGUGAGCAUGAACGUGCAGGGCGACUACGAGCCCACCG
ACGCCACCGGCUUCAUCAACAUCAACAGCCUGCGCCUGAA
GGAGUACCACCGCCUGCAGAGCAAGGUGACCGCCAAGUGA
Y

コドン最適化ホタルルシフェラーゼｍＲＮＡ：

XAUGGAAGAUGCCAAAAACAUUAAGAAGGGCCCAGCGCCA
UUCUACCCACUCGAAGACGGGACCGCCGGCGAGCAGCUGC
ACAAAGCCAUGAAGCGCUACGCCCUGGUGCCCGGCACCAU
CGCCUUUACCGACGCACAUAUCGAGGUGGACAUUACCUAC 20
GCCGAGUACUUCGAGAUGAGCGUUCGGCUGGCAGAAGCUA
UGAAGCGCUAUGGGCUGAAUACAAACCAUCGGAUCGUGGU
GUGCAGCGAGAAUAGCUUGCAGUUCUUCAUGCCCGUGUUG
GGUGCCCUGUUCAUCGGUGUGGCUGUGGCCCCAGCUAACG
ACAUCUACAACGAGCGCGAGCUGCUGAACAGCAUGGGCAU
CAGCCAGCCCACCGUCGUAUUCGUGAGCAAGAAAGGGCUG
CAAAAGAUCCUCAACGUGCAAAAGAAGCUACCGAUCAUAC
AAAAGAUCAUCAUCAUGGAUAGCAAGACCGACUACCAGGG
CUUCCAAAGCAUGUACACCUUCGUGACUUCCCAUUUGCCA
CCCGGCUUCAACGAGUACGACUUCGUGCCCGAGAGCUUCG 30
ACCGGGACAAAACCAUCGCCCUGAUCAUGAACAGUAGUGG
CAGUACCGGAUUGCCCAAGGGCGUAGCCCUACCGCACCGC
ACCGCUUGUGUCCGAUUCAGUCAUGCCCGCGACCCCAUCU
UCGGCAACCAGAUCAUCCCCGACACCGCUAUCCUCAGCGU
GGUGCCAUUUCACCACGGCUUCGGCAUGUUCACCACGCUG
GGCUACUUGAUCUGCGGCUUUCGGGUCGUGCUCAUGUACC
GCUUCGAGGAGGAGCUAUUCUUGCGCAGCUUGCAAGACUA
UAAGAUUCAAUCUGCCCUGCUGGUGCCCACACUAUUUAGC
UUCUUCGCUAAGAGCACUCUCAUCGACAAGUACGACCUAA
GCAACUUGCACGAGAUCGCCAGCGGCGGGGGCGCCGCUCAG 40
CAAGGAGGUAGGUGAGGCCGUGGCCAAACGCUUCCACCUA
CCAGGCAUCCGCCAGGGCUACGGCCUGACAGAAACAACCA
GCGCCAUUCUGAUCACCCCCGAAGGGGACGACAAGCCUGG
CGCAGUAGGCAAGGUGGUGCCCUUCUUCGAGGCUAAGGUG
GUGGACUUGGACACCGGUAAGACACUGGGUGUGAACCAGC
GCGGCGAGCUGUGCGUCCGUGGCCCCAUGAUCAUGAGCGG
CUACGUUAACAACCCCGAGGCUACAAACGCUCUCAUCGAC
AAGGACGGCUGGCUGCACAGCGGCGACAUCGCCUACUGGG
ACGAGGACGAGCACUUCUUCAUCGUGGACCGGCUGAAGAG
CCUGAUCAAAUACAAGGGCUACCAGGUAGCCCCAGCCGAA 50

CUGGAGAGCAUCCUGCUGCAACACCCCAACAUCUUCGACG
CCGGGGUCGCCGGCCUGCCCGACGACGAUGCCGGCGAGCU
GCCCGCCGCAGUCGUCGUGCUGGAACACGGUAAAACCAUG
ACCGAGAAGGAGAUCGUGGACUAUGUGGCCAGCCAGGUUA
CAACCGCCAAGAAGCUGCGCGGUGGUGUUGUGUUCGUGGA
CGAGGUGCCUAAAGGACUGACCGGCAAGUUGGACGCCCGC
AAGAUCCGCGAGAUUCUCAUUAAGGCCAAGAAGGGCGGCA
AGAUCGCCGUGUAAY

ヒト第ＩＸ因子（ＦＩＸ）ｍＲＮＡ：

XAUGCAGCGCGUGAACAUGAUCAUGGCAGAAUCACCAGGC
CUCAUCACCAUCUGCCUUUUAGGAUAUCUACUCAGUGCUG
AAUGUACAGUUUUUCUUGAUCAUGAAAACGCCAACAAAAU
UCUGAGGCGGAGAAGGAGGUAUAAUUCAGGUAAAUUGGAA
GAGUUUGUUCAAGGGAACCUUGAGAGAGAAUGUAUGGAAG
AAAAGUGUAGUUUUGAAGAAGCACGAGAAGUUUUUGAAAA
CACUGAAAGAACAACUGAAUUUUGGAAGCAGUAUGUUGAU
GGAGAUCAGUGUGAGUCCAAUCCAUGUUUAAAUGGCGGCA
GUUGCAAGGAUGACAUUAAUUCCUAUGAAUGUUGGUGUCC
CUUUGGAUUUGAAGGAAAGAACUGUGAAUUAGAUGUAACA
UGUAACAUUAAGAAUGGCAGAUGCGAGCAGUUUUGUAAAA
AUAGUGCUGAUAACAAGGUGGUUUGCUCCUGUACUGAGGG
AUAUCGACUUGCAGAAAACCAGAAGUCCUGUGAACCAGCA
GUGCCAUUUCCAUGUGGAAGAGUUUCUGUUUCACAAACUU
CUAAGCUCACCCGUGCUGAGGCUGUUUUUCCUGAUGUGGA
CUAUGUAAAUUCUACUGAAGCUGAAACCAUUUUGGAUAAC
AUCACUCAAAGCACCCAAUCAUUUAAUGACUUCACUCGGG
UUGUUGGUGGAGAAGAUGCCAAACCAGGUCAAUUCCCUUG
GCAGGUUGUUUUGAAUGGUAAAGUUGAUGCAUUCUGUGGA
GGCUCUAUCGUUAAUGAAAAAUGGAUUGUAACUGCUGCCC
ACUGUGUUGAAACUGGUGUUAAAAUUACAGUUGUCGCAGG
UGAACAUAAUAUUGAGGAGACAGAACAUACAGAGCAAAAG
CGAAAUGUGAUUCGAAUUAUUCCUCACCACAACUACAAUG
CAGCUAUUAAUAAGUACAACCAUGACAUUGCCCUUCUGGA
ACUGGACGAACCCUUAGUGCUAAACAGCUACGUUACACCU
AUUUGCAUUGCUGACAAGGAAUACACGAACAUCUUCCUCA
AAUUUGGAUCUGGCUAUGUAAGUGGCUGGGGAAGAGUCUU
CCACAAAGGGAGAUCAGCUUUAGUUCUUCAGUACCUUAGA
GUUCCACUUGUUGACCGAGCCACAUGUCUUCGAUCUACAA
AGUUCACCAUCUAUAACAACAUGUUCUGUGCUGGCUUCCA
UGAAGGAGGUAGAGAUUCAUGUCAAGGAGAUAGUGGGGGA
CCCCAUGUUACUGAAGUGGAAGGGACCAGUUUCUUAACUG
GAAUUAUUAGCUGGGGUGAAGAGUGUGCAAUGAAAGGCAA
AUAUGGAAUAUAUACCAAGGUAUCCCGGUAUGUCAACUGG
AUUAAGGAAAAAACAAAGCUCACUUAAY

コドン最適化ヒトフェニルアラニンヒドロキシラーゼ（ＰＡＨ）ｍＲＮＡ：

XAUGAGCACCGCCGUGCUGGAGAACCCCGGCCUGGGCCGC
AAGCUGAGCGACUUCGGCCAGGAGACCAGCUACAUCGAGG
ACAACUGCAACCAGAACGGCGCCAUCAGCCUGAUCUUCAG
CCUGAAGGAGGAGGUGGGCGCCCUGGCCAAGGUGCUGCGC
CUGUUCGAGGAGAACGACGUGAACCUGACCCACAUCGAGA

GCCGCCCCAGCCGCCUGAAGAAGGACGAGUACGAGUUCUU
CACCCACCUGGACAAGCGCAGCCUGCCCGCCCUGACCAAC
AUCAUCAAGAUCCUGCGCCACGACAUCGGCGCCACCGUGC
ACGAGCUGAGCCGCGACAAGAAGAAGGACACCGUGCCCUG
GUUCCCCCGCACCAUCCAGGAGCUGGACCGCUUCGCCAAC
CAGAUCCUGAGCUACGGCGCCGAGCUGGACGCCGACCACC
CCGGCUUCAAGGACCCCGUGUACCGCGCCCGCCGCAAGCA
GUUCGCCGACAUCGCCUACAACUACCGCCACGGCCAGCCC
AUCCCCCGCGUGGAGUACAUGGAGGAGGAGAAGAAGACCU
GGGGCACCGUGUUCAAGACCCUGAAGAGCCUGUACAAGAC
CCACGCCUGCUACGAGUACAACCACAUCUUCCCCCUGCUG
GAGAAGUACUGCGGCUUCCACGAGGACAACAUCCCCCAGC
UGGAGGACGUGAGCCAGUUCCUGCAGACCUGCACCGGCUU
CCGCCUGCGCCCCGUGGCCGGCCUGCUGAGCAGCCGCGAC
UUCCUGGGCGGCCUGGCCUUCCGCGUGUUCCACUGCACCC
AGUACAUCCGCCACGGCAGCAAGCCCAUGUACACCCCCGA
GCCCGACAUCUGCCACGAGCUGCUGGGCCACGUGCCCCUG
UUCAGCGACCGCAGCUUCGCCCAGUUCAGCCAGGAGAUCG
GCCUGGCCAGCCUGGGCGCCCCCGACGAGUACAUCGAGAA
GCUGGCCACCAUCUACUGGUUCACCGUGGAGUUCGGCCUG
UGCAAGCAGGGCGACAGCAUCAAGGCCUACGGCGCCGGCC
UGCUGAGCAGCUUCGGCGAGCUGCAGUACUGCCUGAGCGA
GAAGCCCAAGCUGCUGCCCCUGGAGCUGGAGAAGACCGCC
AUCCAGAACUACACCGUGACCGAGUUCCAGCCCCUGUACU
ACGUGGCCGAGAGCUUCAACGACGCCAAGGAGAAGGUGCG
CAACUUCGCCGCCACCAUCCCCCCGCCCCUUCAGCGUGCGC
UACGACCCCUACACCCAGCGCAUCGAGGUGCUGGACAACA
CCCAGCAGCUGAAGAUCCUGGCCGACAGCAUCAACAGCGA
GAUCGGCAUCCUGUGCAGCGCCCUGCAGAAGAUCAAGUAA
Y

コドン最適化嚢胞性線維症膜コンダクタンス制御因子（ＣＦＴＲ）ｍＲＮＡ：
AUGCAGCGGUCCCCGCUCGAAAAGGCCAGUGUCGUGUCCA
AACUCUUCUUCUCAUGGACUCGGCCUAUCCUUAGAAAGGG
GUAUCGGCAGAGGCUUGAGUUGUCUGACAUCUACCAGAUC
CCCUCGGUAGAUUCGGCGGAUAACCUCUCGGAGAAGCUCG
AACGGGAAUGGGACCGCGAACUCGCGUCUAAGAAAAACCC
GAAGCUCAUCAACGCACUGAGAAGGUGCUUCUUCUGGCGG
UUCAUGUUCUACGGUAUCUUCUUGUAUCUCGGGGAGGUCA
CAAAAGCAGUCCAACCCCUGUUGUUGGGUCGCAUUAUCGC
CUCGUACGACCCCGAUAACAAAGAAGAACGGAGCAUCGCG
AUCUACCUCGGGAUCGGACUGUGUUUGCUUUUCAUCGUCA
GAACACUUUUGUUGCAUCCAGCAAUCUUCGGCCUCCAUCA
CAUCGGUAUGCAGAUGCGAAUCGCUAUGUUUAGCUUGAUC
UACAAAAAGACACUGAAACUCUCGUCGCGGGUGUUGGAUA
AGAUUUCCAUCGGUCAGUUGGUGUCCCUGCUUAGUAAUAA
CCUCAACAAAUUCGAUGAGGGACUGGCGCUGGCACAUUUC
GUGUGGAUUGCCCCGUUGCAAGUCGCCCUUUUGAUGGGCC
UUAUUUGGGAGCUGUUGCAGGCAUCUGCCUUUUGUGGCCU
GGGAUUUCUGAUUGUGUUGGCAUUGUUUCAGGCUGGGCUU
GGGCGGAUGAUGAUGAAGUAUCGCGACCAGAGAGCGGGUA

AAAUCUCGGAAAGACUCGUCAUCACUUCGGAAAUGAUCGA
AAACAUCCAGUCGGUCAAAGCCUAUUGCUGGGAAGAAGCU
AUGGAGAAGAUGAUUGAAAACCUCCGCCAAACUGAGCUGA
AACUGACCCGCAAGGCGGCGUAUGUCCGGUAUUUCAAUUC
GUCAGCGUUCUUCUUUUCCGGGUUCUUCGUUGUCUUUCUC
UCGGUUUUGCCUUAUGCCUUGAUUAAGGGGAUUAUCCUCC
GCAAGAUUUUCACCACGAUUUCGUUCUGCAUUGUAUUGCG
CAUGGCAGUGACACGGCAAUUUCCGUGGGCCGUGCAGACA
UGGUAUGACUCGCUUGGAGCGAUCAACAAAAUCCAAGACU
UCUUGCAAAAAGCAAGAGUACAAGACCCUGGAGUACAAUCU
UACUACUACGGAGGUAGUAAUGGAGAAUGUGACGGCUUUU
UGGGAAGAGGGGUUUUGGAGAACUGUUUGAGAAAGCAAAGC
AGAAUAACAACAACCGCAAGACCUCAAAUGGGGACGAUUC
CCUGUUUUUCUCGAACUUCUCCCCUGCUCGGAACACCCGUG
UUGAAGGACAUCAAUUUCAAGAUUGAGAGGGGACAGCUUC
UCGCGGUAGCGGGAAGCACUGGUGCGGGAAAAACUAGCCU
CUUGAUGGUGAUUAUGGGGGAGCUUGAGCCCAGCGAGGGG
AAGAUUAAACACUCCGGGCGUAUCUCAUUCUGUAGCCAGU
UUUCAUGGAUCAUGCCCGGAACCAUUAAAGAGAACAUCAU
UUUCGGAGUAUCCUAUGAUGAGUACCGAUACAGAUCGGUC
AUUAAGGCGUGCCAGUUGGAAGAGGACAUUUCUAAGUUCG
CCGAGAAGGAUAACAUCGUCUUGGGAGAAGGGGGUAUUAC
AUUGUCGGGAGGGCAGCGAGCGCGGAUCAGCCUCGCGAGA
GCGGUAUACAAAGAUGCAGAUUUGUAUCUGCUUGAUUCAC
CGUUUGGAUACCUCGACGUAUUGACAGAAAAAGAAAUCUU
CGAGUCGUGCGUGUGUAAACUUAUGGCUAAUAAGACGAGA
AUCCUGGUGACAUCAAAAAUGGAACACCUUAAGAAGGCGG
ACAAGAUCCUGAUCCUCCACGAAGGAUCGUCCUACUUUUA
CGGCACUUUCUCAGAGUUGCAAAACUUGCAGCCGGACUUC
UCAAGCAAACUCAUGGGGUGUGACUCAUUCGACCAGUUCA
GCGCGGAACGGCGGAACUCGAUCUUGACGGAAACGCUGCA
CCGAUUCUCGCUUGAGGGUGAUGCCCCGGUAUCGUGGACC
GAGACAAAGAAGCAGUCGUUUAAGCAGACAGGAGAAUUUG
GUGAGAAAAGAAAGAACAGUAUCUUGAAUCCUAUUAACUC
AAUUCGCAAGUUCUCAAUCGUCCAGAAAACUCCACUGCAG
AUGAAUGGAAUUGAAGAGGAUUCGGACGAACCCCUGGAGC
GCAGGCUUAGCCUCGUGCCGGAUUCAGAGCAAGGGGAGGC
CAUUCUUCCCCGGAUUUCGGUGAUUUCAACCGGACCUACA
CUUCAGGCGAGGCGAAGGCAAUCCGUGCUCAACCUCAUGA
CGCAUUCGGUAAACCAGGGGCAAAACAUUCACCGCAAAAC
GACGGCCUCAACGAGAAAAGUGUCACUUGCACCCCAGGCG
AAUUUGACUGAACUCGACAUCUACAGCCGUAGGCUUUCGC
AAGAAACCGGACUUGAGAUCAGCGAAGAAAUCAAUGAAGA
AGAUUUGAAAGAGUGUUUCUUUGAUGACAUGGAAUCAAUC
CCAGCGGUGACAACGUGGAACACAUACUUGCGUUACAUCA
CGGUGCACAAGUCCUUGAUUUUCGUCCUCAUCUGGUGUCU
CGUGAUCUUUCUCGCUGAGGUCGCAGCGUCACUUGUGGUC
CUCUGGCUGCUUGGUAAUACGCCCUUGCAAGACAAAGGCA
AUUCUACACACUCAAGAAACAAUUCCUAUGCCGUGAUUAU
CACUUCUACAAGCUCGUAUUACGUGUUUUACAUCUACGUA

10 20 30 40 50

GGAGUGGCCGACACUCUGCUCGCGAUGGGUUUCUUCCGAG
GACUCCCACUCGUUCACACGCUUAUCACUGUCUCCAAGAU
UCUCCACCAUAAGAUGCUUCAUAGCGUACUGCAGGCUCCC
AUGUCCACCUUGAAUACGCUCAAGGCGGGAGGUAUUUUGA
AUCGCUUCUCAAAAGAUAUUGCAAUUUUGGAUGACCUUCU
GCCCCUGACGAUCUUCGACUUCAUCCAGUUGUUGCUGAUC
GUGAUUGGGGCUAUUGCAGUAGUCGCUGUCCUCCAGCCUU
ACAUUUUUGUCGCGACCGUUCCGGUGAUCGUGGCGUUUAU
CAUGCUGCGGGCCUAUUUCUUGCAGACGUCACAGCAGCUU
AAGCAACUGGAGUCUGAAGGGAGGUCGCCUAUCUUUACGC
AUCUUGUGACCAGUUUGAAGGGAUUGUGGACGUUGCGCGC
CUUUGGCAGGCAGCCCUACUUUGAAACACUGUUCCACAAA
GCGCUGAAUCUCCAUACGGCAAAAUUGGUUUUUGUAUUUGA
GUACCCUCCGAUGGUUUCAGAUGCGCAUUGAGAUGAUUUU
UGUGAUCUUCUUUAUCGCGGUGACUUUUAUCUCCAUCUUG
ACCACGGGAGAGGGCGAGGGACGGGUCGGUAUUAUCCUGA
CACUCGCCAUGAACAUUAUGAGCACUUUGCAGUGGGCAGU
GAACAGCUCGAUUGAUGUGGAUAGCCUGAUGAGGUCCGUU
UCGAGGGUCUUUAAGUUCAUCGACAUGCCGACGGAGGGAA
AGCCCACAAAAAAGUACGAAACCCUAUAAGAAUGGGCAAUU
GAGUAAGGUAAUGAUCAUCGAGAACAGUCACGUGAAGAAG
GAUGACAUCUGGCCUAGCGGGGGGUCAGAUGACCGUGAAGG
ACCUGACGGCAAAAUACACCGAGGGAGGGAACGCAAUCCCU
UGAAAACAUCUCGUUCAGCAUUAGCCCCGGUCAGCGUGUG
GGGUUGCUCGGGAGGACCGGGGUCAGGAAAAUCGACGUUGC
UGUCGGCCUUCUUGAGACUUCUGAAUACAGAGGGUGAGAU
CCAGAUCGACGGCGUUUCGUGGGAUAGCAUCACCUUGCAG
CAGUGGCGGAAAGCGUUUGGAGUAAUCCCCCAAAAGGUCU
UUAUCUUUAGCGGAACCUUCCGAAAGAAUCUCGAUCCUUA
UGAACAGUGGGUCAGAUCAAGAGAUUUGGAAAGUCGCGGAC
GAGGUUGGCCUUCGGAGUGUAAUCGAGCAGUUUCCGGGAA
AACUCGACUUUGUCCUUGUAGAUGGGGGAUGCGUCCUGUC
GCAUGGGCACAAGCAGCUCAUGUGCCUGGCGCGAUCCGUC
CUCUCUAAAGCGAAAAUUCUUCUCUUGGAUGAACCUUCGG
CCCAUCUGGACCCGGUAACGUAUCAGAUCAUCAGAAGGAC
ACUUAAGCAGGCGUUUGCCGACUGCACGGUGAUUCUCUGU
GAGCAUCGUAUCGAGGCCAUGCUCGAAUGCCAGCAAUUUC
UUGUCAUCGAAGAGAAUAAGGUCCGCCAGUACGACUCCAU
CCAGAAGCUGCUUAAUGAGAGAUCAUUGUUCCGGCAGGCG
AUUUCACCAUCCGAUAGGGUGAAACUUUUUCCACACAGAA
AUUCGUCGAAGUGCAAGUCCAAACCGCAGAUCGCGGCCUU
GAAAGAAGAGACUGAAGAAGAAGUUCAAGACACGCGUCUU
UAA

５’及び３’ＵＴＲ配列

X＝

GGACAGAUCGCCUGGAGACGCCAUCCACGCUGUUUUGACC
UCCAUAGAAGACACCGGGACCGAUCCAGCCUCCGCGGCCG
GGAACGGUGCAUUGGAACGCGGAUUCCCCGUGCCAAGAGU
GACUCACCGUCCUUGACACG

Y＝

ＣＧＧＧＵＧＧＣＡＵＣＣＣＵＧＵＧＡＣＣＣＣＵＣＣＣＣＡＧＵＧＣＣＵＣＵＣＣＵＧ
ＧＣＣＣＵＧＧＡＡＧＵＵＧＣＣＡＣＵＣＣＡＧＵＧＣＣＣＡＣＣＡＧＣＣＵＵＧＵＣＣ
ＵＡＡＵＡＡＡＡＵＵＡＡＧＵＵＧＣＡＵＣＡＡＧＣＵ

【０１１２】

脂質ナノ粒子製剤

脂質の混合物（カチオン性脂質、ヘルパー脂質、双生イオン脂質、ＰＥＧ脂質等）のエタノール性溶液を調製して、報告された容量にし、選択された温度まで加熱した。個別に、ｍＲＮＡの緩衝水溶液（１０ｍＭクエン酸塩／１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、ｐＨ４．５）を、１ｍｇ／ｍＬの原液から調製し、選択された温度まで５～１０分間加熱した。

【０１１３】

小規模製剤については、脂質溶液を、シリンジポンプを使用してｍＲＮＡ水溶液に迅速に注入し（３．７１ｍＬ／秒）、結果得られた懸濁液を振とうして、脂質ナノ粒子を含む２０％エタノールを得た。結果得られたナノ粒子懸濁液を、１×ＰＢＳ（ｐＨ７．４）でダイアフィルトレーションし、濃縮し、２～８℃で保管した。

【０１１４】

２５℃での代表的な実施例

ｃＫＫ－Ｅ１２、ＤＯＰＥ、Ｃｈｏｌ及びＤＭＧ－ＰＥＧ２Ｋの５０ｍｇ／ｍＬエタノール性溶液の一定分量を混合し、エタノールで希釈して３ｍＬの最終容量とした。個別に、ＦＦＬ　ｍＲＮＡの緩衝水溶液（１０ｍＭクエン酸塩／１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、ｐＨ４．５）を、１ｍｇ／ｍＬの原液から調製した。脂質溶液を、ｍＲＮＡ水溶液に迅速に注入し、振とうして２０％エタノールの最終懸濁液を得た。結果得られたナノ粒子懸濁液をろ過し、１×ＰＢＳ（ｐＨ７．４）でダイアフィルトレーションし、濃縮し、２～８℃で保管した。最終濃度＝０．２０ｍｇ／ｍＬ　ＦＦＬ　ｍＲＮＡ（カプセル化）。Z_{ave}＝９１ｎｍ　ＰＤＩ（０．１６）。

【０１１５】

３７℃での製剤

ｃＫＫ－Ｅ１２、ＤＯＰＥ、Ｃｈｏｌ及びＤＭＧ－ＰＥＧ２Ｋの５０ｍｇ／ｍＬエタノール性溶液の一定分量を混合し、エタノールで希釈して３ｍＬの最終容量とした。個別に、ＦＩＸ　ｍＲＮＡの緩衝水溶液（１０ｍＭクエン酸塩／１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、ｐＨ４．５）を１ｍｇ／ｍＬの原液から調製した。脂質溶液を、ｍＲＮＡ水溶液に迅速に注入し、振とうして２０％エタノールの最終懸濁液を得た。結果得られたナノ粒子懸濁液をろ過し、１×ＰＢＳ（ｐＨ７．４）でダイアフィルトレーションし、濃縮し、２～８℃で保管した。最終濃度＝０．２０ｍｇ／ｍＬ　ＦＩＸ　ｍＲＮＡ（カプセル化）。Z_{ave}＝６４ｎｍ；ＰＤＩ（０．１２）。

【０１１６】

６５℃での製剤

ｃＫＫ－Ｅ１２、ＤＯＰＥ、Ｃｈｏｌ及びＤＭＧ－ＰＥＧ２Ｋの５０ｍｇ／ｍＬエタノール性溶液の一定分量を混合し、エタノールで希釈して３ｍＬの最終容量とした。個別に、ＦＩＸ　ｍＲＮＡの緩衝水溶液（１０ｍＭクエン酸塩／１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、ｐＨ４．５）を１ｍｇ／ｍＬの原液から調製した。脂質溶液を、ｍＲＮＡ水溶液に迅速に注入し、振とうして２０％エタノールの最終懸濁液を得た。結果得られたナノ粒子懸濁液をろ過し、１×ＰＢＳ（ｐＨ７．４）でダイアフィルトレーションし、濃縮し、２～８℃で保管した。最終濃度＝０．２０ｍｇ／ｍＬ　ＦＩＸ　ｍＲＮＡ（カプセル化）。Z_{ave}＝７３ｎｍ；ＰＤＩ（０．１３）。

【０１１７】

ナノ粒子カプセル化プロセスに及ぼす温度の効果

エタノール脂質溶液及びｍＲＮＡの緩衝水溶液（１０ｍＭクエン酸塩／１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、ｐＨ４．５）の両方を、製剤プロセスの前に異なる選択温度で加熱して、製剤の最終収率及びカプセル化効率に及ぼす温度の効果を決定した。

【０１１８】

ナノ粒子製剤プロセスに及ぼす温度の効果を、サイズ、サイズ分散性、カプセル化効率及び収率（または回収）について評価した。例示的なデータを表１に示す。見られるように、温度における増加（例えば、周囲温度を超える）は、カプセル化効率及び／または収率／回収の増加、ならびに粒子サイズ及び／またはサイズ分散性の低下をもたらす。

【表１】

表１．ナノ粒子形成及びｍＲＮＡカプセル化に及ぼす温度の効果

周囲温度（２５℃）での製剤プロセス：						
製剤番号	ｍＲＮＡ	温度	サイズ	ＰＤＩ	カプセル化	回収
1	FFL	25	91	0.16	71%	30%
2	FFL	25	88	0.14	76%	33%
３７℃での製剤プロセス：						
製剤番号	ｍＲＮＡ	温度	サイズ	ＰＤＩ	カプセル化	回収
3	FIX	37	77	0.13	57%	29%
4	FIX	37	80	0.12	68%	36%
5	FIX	37	64	0.12	69%	37%
6	FIX	37	63	0.12	65%	51%
６５℃での製剤プロセス：						
製剤番号	ｍＲＮＡ	温度	サイズ	ＰＤＩ	カプセル化	回収
7	ASS1	65	86	0.12	85%	64%
8	ASS1	65	84	0.11	96%	98%
9	ASS1	65	81	0.16	86%	64%
10	ASS1	65	84	0.11	96%	98%
11	PAH	65	79	0.12	82%	77%
12	FIX	65	73	0.13	81%	77%
13	FIX	65	79	0.14	92%	82%
14	FIX	65	85	0.13	95%	70%
15	FFL	65	68	0.10	92%	78%
16	FFL	65	83	0.12	91%	77%
17	FFL	65	80	0.11	91%	75%
18	FFL	65	83	0.11	88%	72%
19	FFL	65	80	0.16	90%	75%
20	FFL	65	78	0.11	81%	77%
21	FFL	65	86	0.12	82%	75%

【０１１９】

実施例２．規模を大きくした製剤プロセス

本実施例は、増加した温度でｍＲＮＡをカプセル化するための例示的な規模を大きくした製剤プロセスを例証する。

【０１２０】

例示的な規模を大きくした製剤プロセスを図１に示す。Ｉｓｍａｔｅｃのプログラム可能なデジタル駆動ポンプ（Ｃｏｌｅ　Ｐａｒｍｅｒ型番ＣＰ７８００８－１０）を使用した。ＭｉｃｒｏｐｕｍｐのＡマウント吸引シューポンプヘッド　３１６　ＳＳ本体／グラファイトギア／ＰＴＦＥシール、０．０８４ｍＬ／ｒｅｖ、内部バイパス無し（Ｃｏｌｅ　Ｐａｒｍｅｒ型番０７００２－２７）及びＰｈａｒｍａ　Ｐｕｒｅのチューブサイズ＃１４、０．０６“ＩＤ、１／１６”（Ｓｐｅｃｔｒｕｍ　ｌａｂｓ品番ＡＣＴＵ－Ｐ１４－２５Ｎ）を使用した。

【０１２１】

ナノ粒子製剤及びｍＲＮＡのカプセル化は、エタノール脂質溶液とｍＲＮＡをクエン酸

塩緩衝液（１０ｍＭクエン酸塩緩衝液、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、ｐＨ４．５）中で「Ｔ」ジャンクション（または「Ｙ」ジャンクション）を使用して混合することにより調製される。ｍＲＮＡを含むクエン酸塩緩衝液及び脂質を含むエタノール溶液の例示的な流速は、それぞれ、２００ｍｌ／分及び５０ｍｌ／分である。このプロセス中に、両方のポンプを同時に開始する。製剤の開始時及び終了時の分画は廃棄し、中間製剤のみを収集した。正確な流速及び低パルス流は、このプロセスの２つの重要なパラメータである。

【０１２２】

精製及び緩衝液交換

上記ステップから得た製剤の精製及び緩衝液交換を、Ｓｐｅｃｔｒｕｍ　ｌａｂｓからのＫｒｏｓＦｌｏ（登録商標）Ｒｅｓｅａｒｃｈ　ＩＩｉタンジェンシャルフローろ過システムで、修飾ポリエーテルスルホン中空糸フィルタモジュールを使用して行う。緩衝液交換は、６倍容量の滅菌ＰＢＳ（ｐＨ７．４）で、連続ダイアフィルトレーション形態において行う。図２を参照されたい。製剤を、サイズ（ＰＤＩ）及びカプセル化（収率）について分析する。例示的なデータを表２に表す。

【表２－１】

表２．規模を大きくした製剤の例

製剤	バッチサイズ（ｍｇ）	Ｎ／Ｐ	ｍＲＮＡ	サイズ（ｎｍ）	ＰＤＩ	カプセル化
22	5	4	ASS1	59	0.09	88%
23	5	4	ASS1	60	0.12	81%
24	5	4	ASS1	59	0.11	92%
25	5	4	ASS1	62	0.12	91%
26	5	4	ASS1	59	0.11	89%
27	5	4	ASS1	62	0.07	97%
28	5	4	ASS1	57	0.12	91%
29	5	4	ASS1	62	0.07	97%
30	5	4	ASS1	67	0.12	88%
31	5	4	ASS1	60	0.15	82%
32	5	4	ASS1	75	0.09	92%
33	5	4	ASS1	67	0.12	91%
34	5	4	ASS1	71	0.13	92%
35	5	4	ASS1	69	0.11	92%
36	5	4	ASS1	66	0.13	94%
37	5	4	ASS1	72	0.11	94%
38	5	4	ASS1	82	0.13	96%
39	5	4	ASS1	62	0.12	90%
40	5	4	ASS1	60	0.11	86%
41	5	4	ASS1	67	0.15	91%
42	5	4	ASS1	69	0.14	94%
43	5	4	ASS1	65	0.16	90%
44	5	4	ASS1	63	0.12	89%
45	5	4	ASS1	65	0.08	86%
46	5	4	GLA	62	0.11	95%
47	5	4	GLA	57	0.16	89%
48	5	4	GLA	54	0.08	95%
49	5	4	GLA	62	0.12	88%
50	5	2	SMN	61	0.14	81%
51	5	4	25%s2U, 25%5mC CFTR	60	0.13	96%
52	20	2	ASS1	72	0.10	90%
53	20	4	ASS1	75	0.12	92%
54	20	4	ASS1	81	0.11	82%
55	20	6	FFluc	82	0.11	94%
56	20	4	FFLuc	78	0.11	94%
57	20	4	CFTR	80	0.12	98%
58	30	4	CFTR	75	0.12	85%

【表２－２】

59	50	4	CFTR	69	0.17	92%
60	50	2	ASS1	73	0.15	82%
61	60	4	ASS1	71	0.13	95%
62	300	2	ASS1	59	0.18	95%
63	300	4	ASS1	64	0.11	96%
64	1000	2	ASS1	51	0.18	89%
65	1000	4	ASS1	61	0.19	91%
66	1000	2	ASS1	56	0.18	81%
67	1000	4	ASS1	71	0.08	92%
68	1000	2	ASS1	51	0.12	90%
69	1000	4	ASS1	73	0.13	89%
平均				65.8	0.12	91%

【０１２３】

このプロセスを使用して、非常に狭い粒子サイズ範囲、及び高いカプセル化効率（例えば、９０％を超える平均）が達成される。

【０１２４】

低パルス均質流の重要性を検査するために、ある程度の脈動流を有する蠕動ポンプを製剤プロセスのために使用した。図３を参照されたい。ｍＲＮＡを含むクエン酸塩緩衝液及び脂質を含む純エタノールを、それぞれ、２００ｍｌ／分及び５０ｍｌ／分の流速で混合した。例示的な結果を表３に示した。見ることができるように、このプロセス内での蠕動ポンプの使用は、より大きなサイズを有するナノ粒子の製剤をもたらす。これは、脈動流を要因とする非均質な混合による可能性が高い。

【表３】

表３．蠕動ポンプを用いた製剤の例

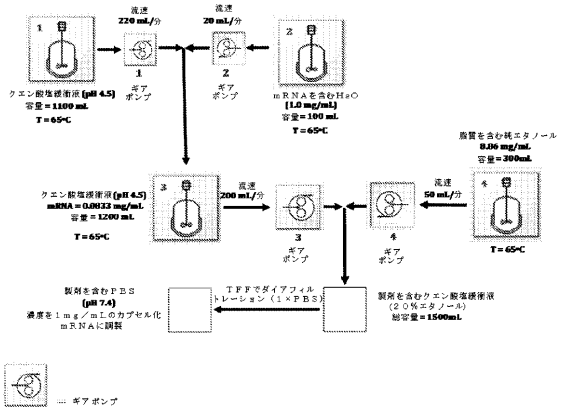
製剤番号	ｍＲＮＡ	サイズ（ｎｍ）	ＰＤＩ
70	CFTR	112	0.19
71	CFTR	116	0.17
72	FFL	128	0.14
73	FFL	134	0.16

【０１２５】

等価物及び範囲

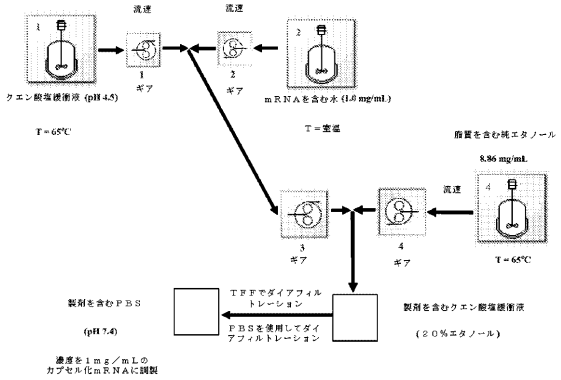
当業者は、本明細書に記載の本発明の特定の実施形態に対する多くの等価物を、認識するだろう、または通常の実験のみを使用して確認することができるだろう。本発明の範囲は、上記の説明により制限されることを意図しないが、以下の特許請求の範囲に明記される。

【図１】



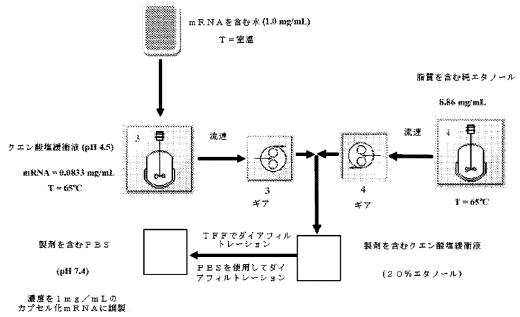
均質流ポンプを用いた規模を大きくした製剤プロセス

【図２】



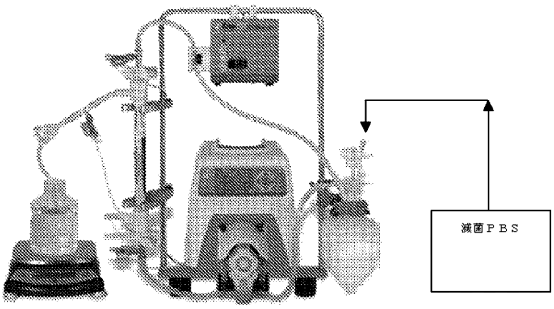
均質流ポンプを用いた規模を大きくした製剤プロセス

【図３】

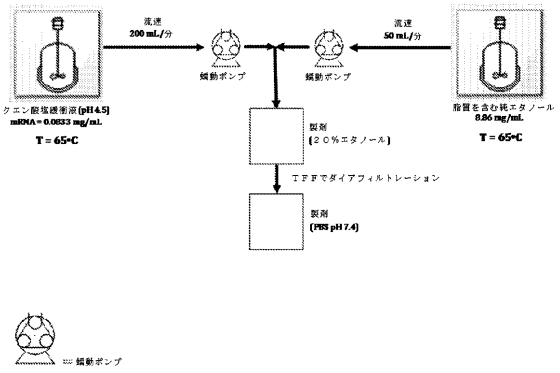


均質流ポンプを用いた規模を大きくした製剤プロセス

【図４】



【図５】



蠕動ポンプを用いた規模を大きくした製剤プロセス

【配列表】
0006782171000001.app

フロントページの続き

(74)代理人 230113332
弁護士 山本 健策
(72)発明者 デローザ, 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
(72)発明者 カーブ, シュリラング
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
(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

審査官 伊藤 基章

(56)参考文献 国際公開第２０１１／０６８８１０（WO, Ａ1）
国際公開第２０１３／０９３６４８（WO, Ａ1）
特表２００２－５２９２４０（ＪＰ, Ａ）
特開平０９－１７０５６８（ＪＰ, Ａ）
米国特許第０５６０５２５１（ＵＳ, Ａ）
特開２００７－０５１５５１（ＪＰ, Ａ）
特表平０２－５０４３６２（ＪＰ, Ａ）

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
Ａ６１Ｋ ９／００
Ａ６１Ｋ ３１／００
Ａ６１Ｋ ４７／００
Ａ６１Ｋ ４８／００